

# 苜蓿抗性愈伤组织抗旱机理的初步研究

张志胜

(华南农业大学农学系)

赵世绪

(北京农业大学生物学院)

**摘要** 以稳定抗生理干旱的愈伤组织为材料,研究了抗旱愈伤组织的抗旱机理。结果表明:抗旱愈伤组织的干物质含量明显高于对照。水势为 $-10.76\text{bar}$ ,而对照愈伤组织的水势为 $-4.77\text{bar}$ 。脯氨酸的含量为对照的4.4倍, $\text{K}^+$ 和蔗糖的含量比对照稍低。脱落酸的含量是对照的3.4倍,但远远低于对照愈伤组织在含20%聚乙二醇的培养基上逆境四天的脱落酸含量。电泳结果表明:抗性愈伤组织中产生了新的蛋白质或多肽(分子量:17000,18000道尔顿),抗性愈伤组织细胞的膜特性得到了改善。提出了抗旱机理假设。

**关键词** 苜蓿;抗性愈伤组织;抗旱机理;聚乙二醇 PEG (分子量6000)

干旱对人类生存的威胁引起了科学工作者对该性状研究的深入。细胞水平上对抗旱机理进行研究在国外已见报道,这些研究集中在抗旱与渗透压<sup>[11]</sup>、脯氨酸<sup>[13]</sup>、脱落酸<sup>[16]</sup>和蛋白质<sup>[12]</sup>的关系上,但迄今尚未见到一篇较为系统的研究报告。在国内亦没有见到在细胞水平上有关抗旱机理研究的报道。本文以稳定的苜蓿抗旱愈伤组织为材料,旨在研究细胞抗PEG诱导的生理干旱的抗性机理,为抗旱育种提供理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 用静置液体培养法筛选出来的20%PEG诱导的生理干旱具有稳定抗性的苜蓿愈伤组织,对照愈伤组织。

### 1.2 方法

1.2.1 愈伤组织干物质含量的测定 取抗性和非抗性愈伤组织在 $100\text{C}$ 下烘至恒重,按下面公式计算干物质含量。

$$\text{干物质含量}\% = \frac{\text{烘干后愈伤组织重}}{\text{烘前愈伤组织重}} \times 100$$

1.2.2 愈伤组织生长进度的测定 接种一定数量的愈伤组织于培养基上,生长一段时间后,称量愈伤组织重量,按下面公式计算生长速度。

$$\text{生长速度}\% = \frac{\text{生长后愈伤组织重量} - \text{接种的愈伤组织重量}}{\text{接种的愈伤组织重量}} \times 100$$

1.2.3 水势的测定 采用水液流法<sup>[14]</sup>

1.2.4 脯氨酸测定 采用茚三酮法<sup>[13]</sup>

1.2.5 蔗糖含量的测定 采用蒽酮比色法<sup>[15]</sup>

1.2.6  $\text{K}^+$ 含量的测定 采用火焰光度法<sup>[12]</sup>

1.2.7 ABA含量的测定 采用Elisa法<sup>[16]</sup>

· 本课题得到国家自然科学基金资助

1992-08-25 收稿

1.2.8 PEG 含量测定 采用 (Newton 1990 所用的方法) 洗脱法<sup>[15]</sup>

1.2.9 电泳 SDS 密度梯度电泳 (4~20%)<sup>[6]</sup>

## 2 结果和讨论

### 2.1 结果

2.1.1 不同愈伤组织干物质含量和水势的测定 抗性愈伤组织的水势为-10.60bar, 明显低于对照 (表1), 而其干物质含量为 23.5%, 明显高于对照。说明抗性愈伤组织可能是通过干物质的积累进行渗透调节, 降低渗透压, 从而维持膨压的稳定, 维持细胞的正常生长。

表1 不同愈伤组织干物质含量及水势的测定

愈伤组织种类	CK	R	R <sub>25</sub>	R <sub>200</sub>
干物质含量 (%)	6	23.5	31.7	6.32
水势 (p <sub>wo</sub> -bar)	4.77	10.76	-	2.4

注 CK: 对照愈伤组织 R: 抗 20%PEG 的愈伤组织 R<sub>25</sub>: 抗 25%PEG 的愈伤组织 R<sub>200</sub>: 抗性愈伤在不含 PEG 培养基上继代后形成的愈伤组织 (下同)

2.1.2 几种常见的渗透调节物质的测定 在测定的三种渗透调节物质中 (表2), 抗性愈伤组织中的脯氨酸含量明显高于对照, 是对照的 44 倍, 而蔗糖和 K<sup>+</sup> 的含量稍低于对照愈伤组织中的含量, 这表明脯氨酸是抗性愈伤进行渗透调节的重要物质之一。

表2 渗透调节物质含量的测定

愈伤组织种类	CK	R	R <sub>200</sub>
脯氨酸 (%) F.w	0.0092	0.043	0.0063
蔗糖 (%) D.w	2.64	2.1	2.08
K <sup>+</sup> (ppm)	1625	1500	1500

### 2.1.3 ABA 含量的测定

表3 ABA 含量的测定

愈伤组织种类	CK	R	R <sub>25</sub>	对照愈伤组织在含 20%PEG 在培养基上逆境 4 天	对照愈伤组织在含 25%PEG 的培养基上逆境 4 天
ABA 含量 (ng/g. F.w)	0.44	1.5	1.73	6.41	65.53

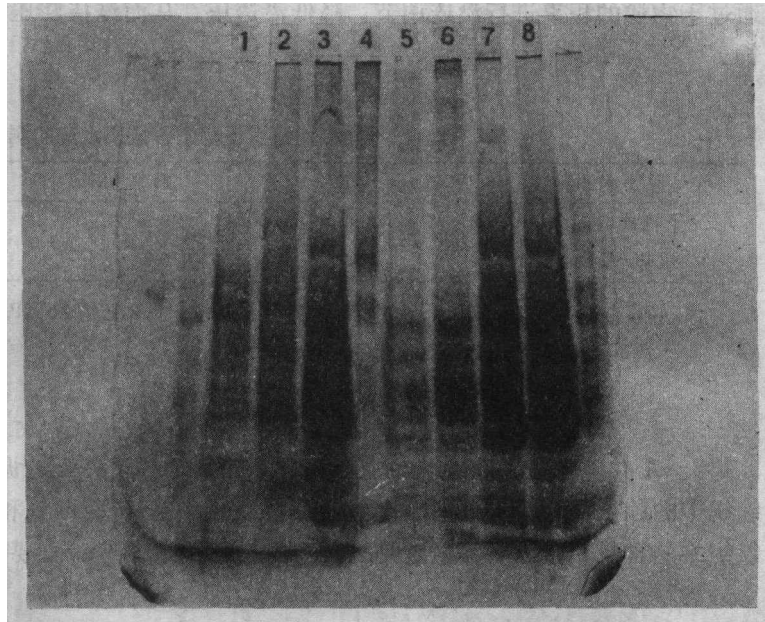
由表3可以看出渗透胁迫引起愈伤组织中内源 ABA 的大量积累, 且 PEG 浓度越高, ABA 积累越多。在稳定的抗性系中, ABA 的含量亦明显高于对照, 抗 20%PEG 的抗性愈伤组织中, 内源 ABA 的含量为对照的 3.4 倍, 但明显低于对照愈伤组织在含有 20%PEG 的培养基上逆境 4 天的 ABA 含量。ABA 在逆境过程中的显著变化表明其在逆境和适应的过程

中起着重要作用。

**2.1.4 PEG 含量的测定** 在含有 PEG 的培养基上生长的愈伤组织会从培养基中吸收 PEG。实验结果表明：抗 20%PEG 的愈伤组织中，PEG 含量占愈伤组织鲜重的 18.6%，占干重的 78.9%，这些 PEG 存在于细胞质外体和细胞之间，其作用有待于进一步研究。

在离心去除抗性愈伤组织所含 PEG 的过程中，经过八次离心，对照愈伤组织细胞破裂，而经过十次离心，抗性愈伤组织的细胞仍没有破裂，这表明抗性愈伤组织在细胞膜特性上得到了改善，从而维持其膜功能的正常执行。

**2.1.5 蛋白质电泳** 对不同愈伤组织进行 SDS 密度梯度电泳(4~20%)，结果表明：在早逆境下胁迫四天的愈伤组织和稳定的抗性愈伤组织中，均产生了新的蛋白质或多肽，其分子量为 17000 和 18000 道尔顿(图片 1)，胁迫的愈伤组织中新蛋白的量多于稳定的抗性系中新蛋白的量，抗性愈伤组织在不含 PEG 的培养基上继代一次后，新蛋白消失(图片 1)。



图片 1 首着抗性愈伤组织进行 SDS 密度梯度电泳后的结果  
注：1. 对照愈伤组织

2. R 在不含 PEG 的培养基上继代后形成的愈伤组织

3. 对照愈伤组织在含 25%PEG 的培养基上逆境 4 天后形成的愈伤组织

4. 标准蛋白质

5. R (抗 20%PEG 的愈伤组织)

6. R. (抗 25%PEG 的愈伤组织)

7. CK 在含 20%PEG 培养基上逆境 4 天后形成的愈伤组织

8. CK 在含 25%PEG 的培养基上逆境 4 天形成的愈伤组织

## 2.2 讨论

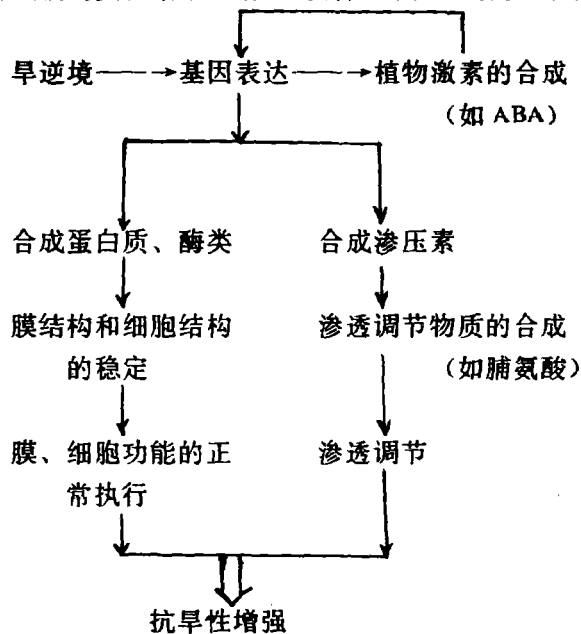
**2.2.1 抗性的性质** 在稳定的抗性系中，干物质、ABA、脯氨酸的含量明显高于对照，而且在这种愈伤组织中产生了新的蛋白质或多肽，当把这种愈伤组织转移到不含 PEG 的培养基上继代一代后，上述指标均和对照愈伤组织相似，把这种愈伤再转移到含 20%PEG 的培养基上仍能表现出对 PEG 诱导的早逆境的抗性，各项指标又回复到稳定的抗性系的水平，表明这种抗性是诱导性的，或者说是生理性的。这种情况在抗病方面有过类似的报道(李冠等 1990 年)。

**2.2.2 抗性机理** 植物对早逆境的响应是通过内源激素的变化，调整一系列生理生化过程来完成。本试验结果表明：早逆境引起细胞中大量的内源 ABA 的积累。随着细胞对早逆境的适应 ABA 含量逐渐降低，在稳定的抗性系中，ABA 含量远远低于逆境下对照愈伤组织中 ABA 含量。William<sup>[14]</sup>报道 ABA 可以直接启动基因的表达，刘恩<sup>[16]</sup>报道：干旱诱导谷类基因表达受 ABA 调控。Olaf Werner<sup>[16]</sup>认为，干旱忍耐的产生是以 ABA 为中介。Duncan 报道 ABA 可以促进愈伤组织中脯氨酸的积累。本实验结果表明愈伤组织中 ABA 和脯氨酸的含量有平

行关系(表 2, 3)。Singh<sup>[12]</sup>在抗 PEG 诱导的生理干旱的烟草愈伤组织中产生了新的蛋白质。本实验结果亦表明, 旱逆境胁迫下苜蓿愈伤组织中产生新的蛋白, 而且该种蛋白质的产生似乎与细胞中 ABA 的积累有关。关于新蛋白的作用则有待于进一步探讨。

Alinka<sup>[1]</sup>报道, ABA 处理强烈地影响着生物膜对水的透性。王洪春<sup>[7]</sup>认为 ABA 的作用可能是阻止谷胱甘肽和磷脂酸的下降, 从而防止膜的过氧化的作用。我们的结果亦表明, 在 ABA 含量比对照高的稳定的抗性系中, 细胞膜的特性得到改善, 而这种改善可能是 ABA 间接作用的结果。

综合我们的实验结果和前人的研究成果, 我们对细胞水平的抗旱机理提出如下设想:



致谢 本课题曾得到王承波、沙丽清、赖志强等同志的帮助, 特此致谢。

#### 参 考 文 献

- 1 雅可夫·莱什姆著. 植物生长调节的分子及遗传基础. 北京: 科学出版社, 1980.
- 2 南京农业大学主编. 土壤化学分析. 北京: 农业出版社, 1981.
- 3 西北农业大学主编. 基础生物化学实验指导 1985.
- 4 薛应龙. 植物生理学实验. 北京: 高等教育出版社, 1985.
- 5 上海植物生理学会. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科技出版社, 1985.
- 6 北京农业大学生理生化教研室. 基础生物化学实验. 北京: 北京农业大学出版, 1987.
- 7 王洪春. 生物膜结构功能和渗透调节. 上海: 上海科技出版社, 1987.
- 8 刘恩. 植物生长物质研究进展. 中国植物生理学会第五次全国会议专题报告 1990.
- 9 北京农业大学作物化控研究室. 植物激素酶联免疫试剂盒使用指南. 北京: 北京农业大学出版社, 1990.
- 10 汪良驹等. 盐逆境中无花果叶片蛋白质合成与脱落酸及脯氨酸积累的关系. 江苏农业学报, 1991, 17 (1): 38~44
- 11 Avtak k, Hand A et al. Characteristics of Cultured Tomato Cells after Prolonged Exposure to Medium Containing Polyethylene Glycol. *Plant physiol*, 1982, 69: 514~521

- 12 Singh et al. Proteins Associated with Adaptation of cultured Tobacco Cells to NaCl. *Plant Physiol*, 1985, 79, 126~137
- 13 Sangita Handa et al. Proline Accumulation and the Adaptation of Cultured Plant Cells to water Stress. *Plant Physiol*, 1986, 80, 938~945
- 14 William K, Marcofle Jr. et al. Regulation of a wheat Promotor by Abscisic Acid in Rice Protoplasts. *Nature*, 1988, Vol 335.
- 15 Newton R J et al. Polyethylene Glycol Content of Osmotically Stressed Callus Cultures. *J Plant physiol*, 1990, 135, 646~652
- 16 Olaf Werner et al. Abscisic-Acid-Induced Drought Tolerance in *Funaria Hygrometric Hedw.* *Planta*, 1991, 186, 99~103

### PRELIMINARY STUDIES ON THE MECHANISM FOR DROUGHT RESISTANCE OF ALFALFA RESISTANT CALLUS

Zhang Zhisheng

(Agronomy Dept. South China Agricultural University)

Zhao Shixu

(Biological college, Beijing Agricultural University)

**Abstract** Studies were carried on the mechanism for drought resistance, using stable callus resistant to physiological drought as material. The results showed, The content of dry matter was obviously higher than that of CK. Its water potential was  $-10.76\text{bar}$ , while the water potential of CK was  $-4.77\text{bar}$ . Proline content was 4.4 times as high as that of CK, and the content of k as well as sucrose was slightly lower than that of CK. The content of Abscisic Acid was 3.4 times as high as that of CK, but obviously lower than that of CK stressed on medium containing 20% PEG for four days. New proteins or polypeptides (M.W 17000. 18000 dorton) were produced in the callus. The property of cell membrane was improved. An assumption of the mechanism for drought resistance was put forward.

**Key words** Alfalfa, Resistant Callus, Mechanism for drought resistance, PEG (Polyethylene Glycol) Mw6000