甘薯愈伤组织对干旱胁迫的生理反应研究

王兰兰[1],张立军[2],陈　贵[2]
(1.沈阳师范大学化学与生命科学学院,辽宁 沈阳 110034;2.沈阳农业大学生命科学技术学院,辽宁 沈阳 110161)

摘　要:以"芦选一号"甘薯愈伤组织为材料,研究干旱胁迫对细胞水势、可溶性蛋白、可溶性糖、脯氨酸含量、SOD、POD、CAT活性等的影响,从而在细胞水平上探讨甘薯抵御干旱胁迫的生理机制。主要结果如下:干旱胁迫下,甘薯愈伤组织的膜透性显著增大,水势降低;可溶性蛋白含量在轻度胁迫下降低,而在重度胁迫下升高;SOD活性在中度和重度胁迫下升高;POD活性在不同胁迫程度处理下普遍下降;CAT活性在中度和重度胁迫下升高;脯氨酸和可溶性糖含量在不同胁迫程度处理下普遍升高。

关键词:甘薯;愈伤组织;干旱胁迫;细胞膜透性;可溶性糖;脯氨酸
中图分类号:Q945.78　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-7601(2007)01-0143-06

甘薯(*Ipomoea batatas lam*)是旋花科甘薯属的一个重要栽培品种,又名红薯、番薯、山芋或红苕等,原产于南美洲,在世界薯类作物产量中居第二位(仅次于马铃薯)。甘薯在我国种植区域除高寒地区外,几乎遍布全国,产量占世界总产量的80%以上。世界上许多甘薯种植在干旱或半干旱地区,其它甘薯种植区也常常遇到不同程度的干旱影响,因此限制其产量的提高。因此,开展甘薯耐旱性研究,了解甘薯抵御干旱胁迫的生理机制,对于甘薯高产育种和高产栽培具有重要的理论和实践意义。在植物抵御干旱胁迫生理机制方面,大多数以田间、盆栽的完整植株,或离体的根、茎、叶为材料,采用自然干旱或高渗溶液处理的方法进行研究。这种方法不仅受环境影响较大,而且还受植株各组织高度分化的特征和形态变异所造成的复杂性的影响,给在干旱胁迫下甘薯形态、生理变化与抗性关系阐明带来了困难。植物抗逆机理的阐明需要综合在整体、器官、细胞和分子水平上的研究结果。本研究以甘薯愈伤组织为材料,利用PEG溶液作为渗透调节剂模拟干旱胁迫,从渗透调节、机体清除自由基的能力、细胞膜的稳定性及其它有关生理生化变化方面,较系统地研究甘薯对干旱胁迫的各种生理反应,从而在细胞水平上探讨甘薯抵御干旱胁迫的生理机制,为甘薯抗旱育种及高产优质栽培提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料

将"芦选一号"无菌苗植株上部的幼嫩叶片剪成(5～10) mm×(5～10) mm的小块作为外植体来诱导愈伤组织。本试验选用MS基本培养基,肌醇0.1%,琼脂0.75%,蔗糖3%。pH值为5.8,附加6－BA 0.5 mg/L,NAA 1.0 mg/L的浓度配比。温度26±1℃、光照强度2 000 lx,每日光照14 h条件下培养25 d。培养基上扩繁后生长12天的愈伤组织作为进行生理指标测定的材料。

1.2　试验方法

1.2.1　*模拟干旱胁迫的培养基的制备*　采用同条件MS培养基;配制浓度分别为0、10%、20%、40%(w/v)的PEG－6000溶液。将培养基与PEG溶液分别灭菌,待培养基凝固后,在无菌条件下,将灭菌后不同浓度的PEG溶液等体积倒入三角瓶中(每瓶25 ml)浸泡,使溶液与培养基水势充分平衡,并于不同时间测定其水势,以确定水势平衡所需时间。试验结果表明,无菌条件下加入等体积的浓度为0、10%、20%、40%(w/v)的PEG－6000溶液,浸泡12 h后将溶液倒出,不同浓度的PEG－6000溶液与培养基的水势均可以在12 h之内达到平衡。平衡后培养基水势可达到0、－0.52、－0.84、－1.1 MPa,可以形成模拟干旱胁迫的水分亏缺程度。后将愈伤组织接入处理后的培养基中,每瓶接入3～4块愈伤组织,每个处理3次重复。分别于0、24、48、72 h胁迫后测各项生理指标。

1.2.2　*测定方法*　采用考马斯亮蓝G－250染色法测定可溶性蛋白含量[1];采用蒽酮法测定可溶性糖含量[1];采用80%乙醇提取法测定游离脯氨酸含量[1];采用外渗电导率法测定细胞膜透性[1];采

收稿日期:2006-04-03
基金项目:辽宁省阜新科技园区项目;沈阳师范大学环境学科建设支助项目
作者简介:王兰兰(1978－),女,河北肃宁人,硕士,主要研究方向为植物细胞工程与抗性生理。E-mail:wangqi5387402006@yahoo.com.cn
中国知网 https://www.cnki.net

用愈创木酚法测定POD活性[2]；采用NBT光化学还原反应法测定SOD活性[3]；采用硫代巴比妥酸比色法测定丙二醛含量[1]；采用紫外分光光度法测定CAT活性[4]；使用HR－33T微伏露点仪测定水势。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫下甘薯愈伤组织质膜透性的变化

如图1所示，未经干旱胁迫时，愈伤组织细胞质膜外渗电导率没有显著变化，而经干旱胁迫处理后都较对照有所升高，而且胁迫时间越长，程度越重，电导率越大。即干旱胁迫使细胞膜透性显著增大，选择性降低，电解质外渗。

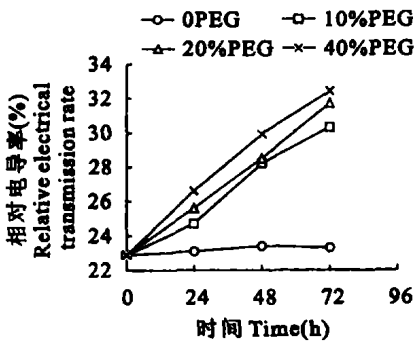

图1 干旱胁迫下甘薯愈伤组织相对电导率的变化

Fig.1 Changes of relative electrical transmission rates of callus of sweet potato under drought stress

2.2 干旱胁迫下甘薯愈伤组织可溶性蛋白含量的变化

如图2所示，未经干旱胁迫处理的愈伤组织可溶性蛋白含量呈缓慢上升趋势。经轻度胁迫处理后，可溶性蛋白含量随时间的延长先略有升高，后缓慢下降，但均低于对照；中度胁迫处理后可溶性蛋白含量随时间的延长，呈现上升趋势，且在24 h到48 h间上升较快，并在48 h到72 h间略高于对照；重度胁迫处理后可溶性蛋白含量随时间延长呈现先升高，后降低，再升高的波动性变化，且含量普遍高于对照。

2.3 干旱胁迫下甘薯愈伤组织中MDA含量的变化

如图3所示，MDA含量在轻度或中度干旱胁迫下均表现为与对照相似的变化趋势，而经重度胁迫处理，其含量在48 h内上升，以后又下降。且在24～72 h期间，含量明显高于对照。说明在达到一定胁迫程度及时间后，细胞膜受到较大伤害，引起MDA的积累。

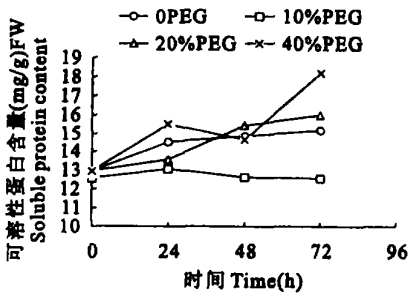

图2 干旱胁迫下甘薯愈伤组织可溶性蛋白含量的变化

Fig.2 Changes of soluble protein contents in callus of sweet potato under drought stress

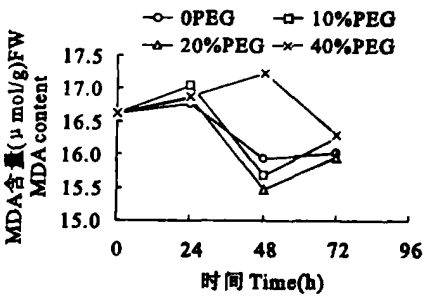

图3 干旱胁迫下甘薯愈伤组织MDA含量的变化

Fig.3 Changes of MDA contents in callus of sweet potato under drought stress

2.4 干旱胁迫下甘薯愈伤组织中保护酶活性的变化

如图4可见，不同程度的干旱胁迫下，24 h之内，愈伤组织SOD活性随着胁迫程度的增大而升高，这表明在短时间内，随着干旱胁迫程度的加强，SOD被诱导出现。而在48～72 h间，SOD活性均呈下降趋势，72 h之内不同胁迫处理过程中SOD活性均表现为先上升后下降的变化规律。重度胁迫下，SOD活性在各时间段均高于对照；未经干旱胁迫处理的愈伤组织POD活性随着时间延长上下波动，但幅度不大。经不同程度干旱胁迫处理后，72 h之内都呈现明显下降趋势，且在重度胁迫程度下，下降幅度最大。可见在干旱胁迫下，POD没有发挥保护酶的作用，相反胁迫越重，活力越低；未经干旱胁迫处理的愈伤组织CAT活性随时间延长变化不大。经不同程度干旱胁迫处理后，CAT活性均比对照有所升高。在轻度胁迫下，在24 h内上升，24～48 h内略有下降。48 h时CAT活性略低于对照，48 h后有小幅度上升，72 h时高于对照。而在中度和重度胁迫下，甘薯愈伤组织内的CAT活性明显上升，且在重度胁迫下上升最快。而且在72 h时比较不同程度干旱胁迫下的甘薯愈伤组织CAT活性，表明，胁迫程度越重，CAT活性越高。可见，CAT对干旱胁迫较为敏感。尤其对重度胁迫反应敏感，且其活性与干旱胁迫程度大小密切相关。

中国知网 https://www.cnki.net

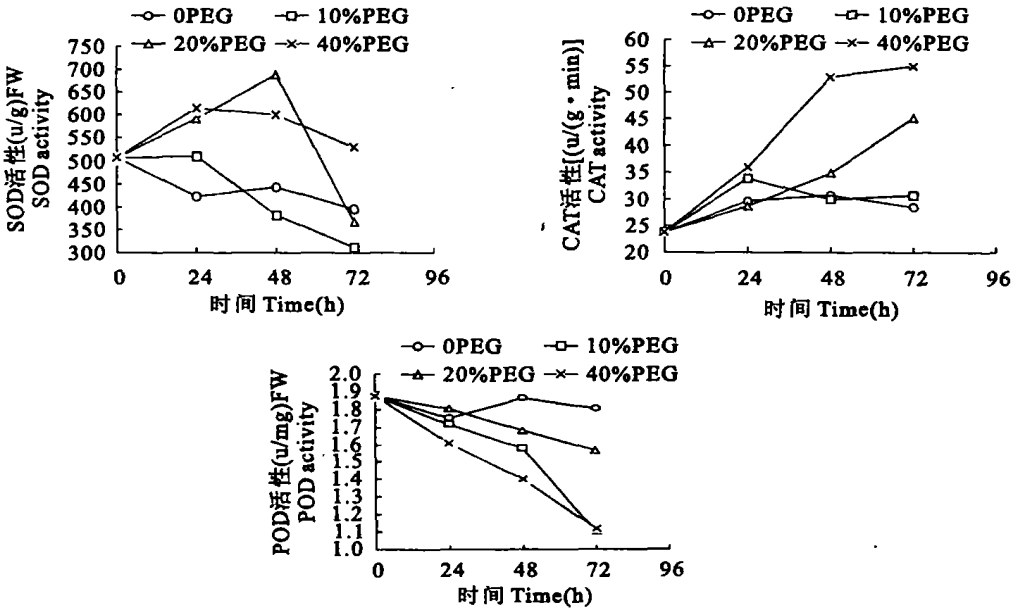

图 4　干旱胁迫下甘薯愈伤组织 SOD、POD、CAT 活性的变化

Fig.4　Changes of SOD、POD、CAT activities in callus of sweet potato under drought stress

2.5　干旱胁迫下甘薯愈伤组织水势的变化

如图 5 所示,干旱胁迫下,甘薯愈伤组织水势均低于对照。且随着胁迫时间延长,渗透势降低。这表明干旱胁迫下,甘薯愈伤组织细胞失水。

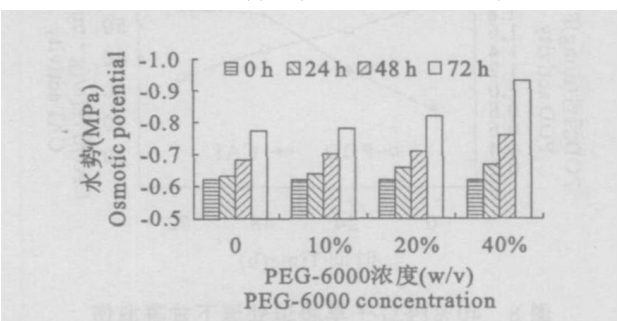

图 5　干旱胁迫下甘薯愈伤组织水势的变化

Fig.5　Water potential changes of sweet potato callus under drought stress

2.6　干旱胁迫下甘薯愈伤组织中渗透调节物质的变化

2.6.1　可溶性糖含量的变化　如图 6 所示,未经干旱胁迫处理的愈伤组织可溶性糖含量随时间的延长而降低。经干旱胁迫处理后,其含量均高于对照。且在 24 h 以内,胁迫程度越大,可溶性糖含量越高。推断短时期内,甘薯愈伤组织可溶性糖可作为主要的渗透调节物质,来降低细胞渗透势,进而适应逆境。轻度胁迫下,可溶性糖含量 48 h 内有所下降,48 h 后很快上升。中度胁迫下,可溶性糖含量则逐步上升。这表明随着干旱胁迫程度的加重,愈伤组织中可溶性糖作为渗透调节物质来降低植物中水势进而减少水分外渗,从而维持正常的代谢活动。重度胁迫下,可溶性糖含量随时间变化表现为先升高后降低。推测可能由于干旱胁迫程度较重,干扰了植物的代谢活动,严重影响了植物可溶性糖合成并加速其分解所致。

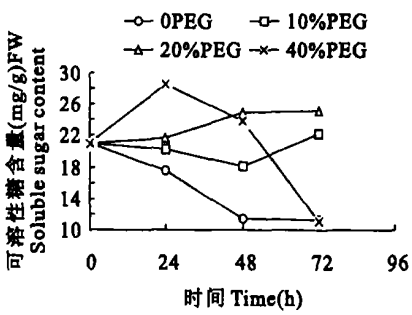

图 6　干旱胁迫下甘薯愈伤组织可溶性糖含量的变化

Fig.6　Changes of soluble sugar contents in callus of sweet potato under drought stress

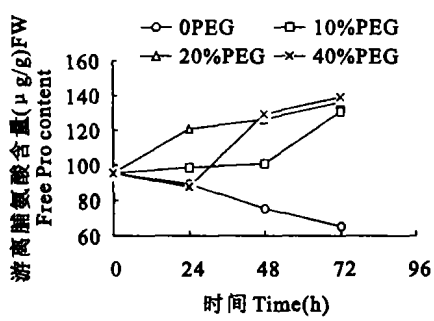

图 7　干旱胁迫下甘薯愈伤组织游离脯氨酸含量的变化

Fig.7　Changes of pro content in callus of sweet potato under drought stress

2.6.2　游离脯氨酸含量的变化　如图 7 所示,未经干旱胁迫处理的愈伤组织脯氨酸含量随时间的延长

中国知网 https://www.cnki.net

呈逐渐下降趋势，而经干旱胁迫处理后，除重度胁迫下脯氨酸含量在24 h内低于对照，且有所下降外，不同程度胁迫处理后，脯氨酸含量均高于对照。且主要呈上升趋势。这表明，干旱胁迫下，甘薯愈伤组织中脯氨酸有所积累。

3 讨 论

3.1 干旱胁迫下膜损伤机制

细胞质膜是细胞与外界环境相隔离的屏障，同时也是细胞与外界环境进行物质交换和信息交流的接触面，在细胞中还执行多种其它生化功能。干旱胁迫下细胞膜受到损伤，膜失去选择透性，可能原因有：(1) 在干旱胁迫下，细胞质膜因发生膜质过氧化作用而受到伤害，进而导致对物质选择透性降低，引起细胞内电解质大量外渗；(2) 在干旱胁迫下，植物细胞脱水，破坏了细胞膜的有序结构。正常情况下，膜脂分子呈双分子排列，这种排列靠磷脂极性头部与水分子相互连接，所以膜内必须有一定束缚水才能保持这种膜质分子的双层排列。细胞严重失水后，膜质分子结构即呈无序的放射状排列，膜上出现空隙和龟裂，透性增大，电解质、氨基酸、可溶性糖大量外渗[5]。本研究表明，在轻度、中度和重度干旱处理时都表现出相同的变化趋势，即膜透性迅速增大，增大的幅度与处理强度正相关。普遍认为，MDA是膜质过氧化的最终产物，它能抑制细胞保护酶活性和降低抗氧化物的含量，从而加剧膜质过氧化作用，其积累是毒害作用的表现。到目前为止，人们常以其作为判断膜质过氧化作用的一个指标。本研究表明，只有中度胁迫24 h以后，MDA含量才明显高于对照，即MDA是在一定程度的胁迫下才开始积累的。

3.2 干旱胁迫对甘薯愈伤组织可溶性蛋白含量的影响

在植物细胞的可溶性蛋白中，有相当一部分是具有特异性作用的调节代谢的酶；另有一些可能起脱水保护剂的作用，给细胞内的束缚水提供一个结合衬质以增加束缚水含量，从而使细胞结构在脱水时不致遭受更大的破坏[6]。干旱胁迫下，不同品种甘薯叶片中可溶性蛋白质含量均比对照有不同程度的增加[6]。在本试验中，愈伤组织可溶性蛋白质含量在干旱处理时，缓慢地升高，这表明，在一定程度的干旱胁迫下，细胞内可合成新的蛋白。

3.3 保护性酶活性变化的相互关系

研究表明，植物在干旱胁迫下，其体内SOD活性与植物的抗氧化能力呈正相关[7]。本试验中，中度干旱处理的甘薯在48 h内SOD活性先升高，而后呈下降趋势。

POD是植物体内保护细胞膜免受氧化的酶促防御系统中的重要物质。在对小麦进行过氧化物酶研究时发现干旱胁迫时小麦胚芽鞘细胞伸长受到抑制，同时POD活性上升[8]。甘薯叶片POD活性变化趋势与其它保护酶略有差异，轻度胁迫下，POD含量先上升后下降，而严重干旱胁迫时，POD活性下降[9]。在本试验中，干旱胁迫下POD活性呈下降趋势，严重干旱胁迫时下降更快。

CAT是植物防止脂质过氧化作用的保护酶成员之一，是清除H_2O_2的专性酶，但对H_2O_2亲和力低(Km高)，主要参与高浓度H_2O_2的清除。有研究表明CAT比POD有更强的应变能力，可以在逆境胁迫加重时过度表达，增强细胞的防卫能力[10]。本试验结果表明，CAT对干旱胁迫反应较为敏感，随着胁迫时间的延长而活性升高，在较重胁迫下，活性升高尤为显著，这与POD活性变化趋势相反(如图8)。这可能是由于在干旱胁迫下，H_2O_2过度累积诱发了CAT的合成。

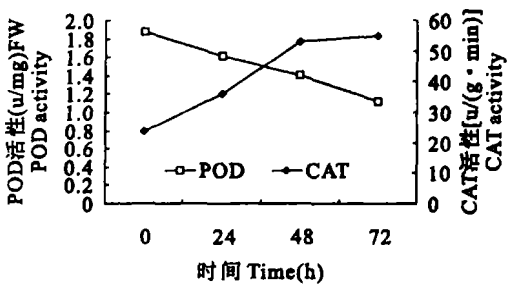

图8 40%PEG干旱胁迫处理下甘薯愈伤组织POD及CAT活性的变化

Fig. 8 Changes of POD and CAT activity in callus of sweet potato under 40% PEG drought stress

3.4 干旱胁迫下渗透调节物质的效应及作用相关性

可溶性糖和脯氨酸都是植物重要的渗透调节物质，参与渗透胁迫下细胞水势的调节[11~13]。脯氨酸具有偶极性，是水溶性最大的氨基酸(162.3 g/10 g H_2O_2，25℃)，有着较强的水合能力，以游离状态广泛存在于植物体内，具有稳定蛋白质的作用。蛋白质可通过它束缚更多的水，以防止受到干旱胁迫时蛋白质脱水，同时可防止或减轻酶蛋白由于胁迫引起变形。有关脯氨酸的研究很多，在干旱或其它逆境条件中植物体内脯氨酸含量会大量积累，这在许多作物研究中得到印证[14~15]。有研究用不同浓度的PEG对甘薯根系进行干旱处理，结果表明，

中国知网 https://www.cnki.net

叶片中脯氨酸含量反应较敏感,但在中度干旱胁迫强度以上,抗旱品种中的积累却比抗旱性较弱的品种少,在渐次加深的缓慢干旱胁迫中,脯氨酸积累从时间上和数量上都与甘薯品种的抗旱适应能力的关系不密切[16]。张明生等也发现干旱处理时不同抗旱性甘薯品种叶片脯氨酸含量比对照均有较大幅度增加,说明脯氨酸含量与品种抗旱性的关系不大[17]。在本试验中(图 6,图 7),轻度干旱胁迫 48 h 之内,愈伤组织的可溶性糖含量略有降低,然后快速增加,脯氨酸在 48 h 之内缓慢增加,48 h 之后快速增加;在中度胁迫下,可溶性糖和脯氨酸含量都较缓慢增加,但脯氨酸的增加速率快于可溶性糖;在重度胁迫下,可溶性糖含量在 24 h 内迅速升高,然后下降,而脯氨酸含量则在胁迫 24 h 之内略有下降,然后迅速上升(图 9),在 72 h 时,脯氨酸含量略高于轻度和中度干旱胁迫。这说明脯氨酸含量的增加与胁迫强度有关,而且在重度胁迫下,脯氨酸可能有补偿可溶性糖含量降低的作用。而柽柳植株可溶性糖在土壤缓慢干旱胁迫下主动积累。在干旱胁迫过程中,柽柳体内的脯氨酸与可溶性糖的积累进程不同,脯氨酸在干旱后期含量降低,而可溶性糖在干旱后期大量积累,因此,可溶性糖在干旱后期的大量积累可能是脯氨酸含量降低的补偿策略[18],之所以对脯氨酸的作用有相互矛盾的结果和观点,可能与植物抗旱性的多样性有关,也可能与试验材料的选用有关。

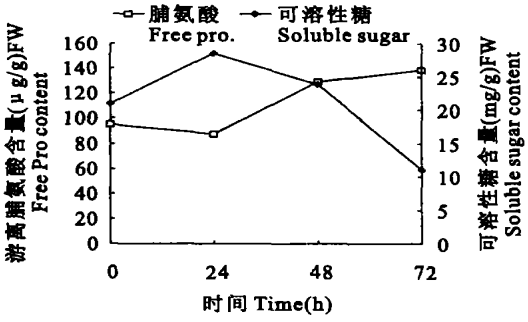

图 9　40% PEG 干旱胁迫处理下甘薯愈伤组织可溶性糖及游离脯氨酸含量的变化

Fig. 9　Changes of soluble sugar and free pro contents in callus of sweet potato under 40%PEG drought stress

4　结　论

干旱胁迫下,甘薯愈伤组织水势降低;膜选择透性增大,而 MDA 含量仅在重度胁迫中后期有所积累;可溶性蛋白含量短时间内,轻度胁迫下降低,即受逆境影响表现为分解加强,而重度胁迫下,经一定时间后升高,表明新蛋白被诱导合成;保护酶中,SOD 和 CAT 活性在中,重度胁迫下普遍升高,而 POD 活性普遍下降;一定胁迫程度和时间内,可溶性糖和脯氨酸作为渗透调节物质而含量升高,而且在重度胁迫下,脯氨酸可能有补偿可溶性糖含量降低的作用。

参 考 文 献:

[1]　郝建军,刘延吉.植物生理学实验技术[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,2001.

[2]　Britton C, Machly AC. Assay of catalase and peroxidase, Methods in Enzymology[M]. New York: Academic Prers lnc, 1955.764—775.

[3]　Bewley JD. Physiological aspects of desiccailon tolerance[J]. Aunnu Rev. Plant Physiology, 1979, 30: 195—238.

[4]　彭志英,蒋 黎.紫外速率直接法测定过氧化氢酶活性[J].华西医学,1995,10(1):4—7.

[5]　李合生.现代植物生理学[M].北京:高等教育出版社,2002.

[6]　张明生,谢 波,谈 锋,等. 甘薯可溶性蛋白、叶绿素及 ATP 含量变化与品种抗旱性关系的研究[J].中国农业科学,2003,36(1):13—16.

[7]　蒋明义,荆家海,王韶唐.干旱胁迫与植物膜脂过氧化[J].西北农业大学学报,1991,19(2):88—94.

[8]　顾者珉,沈曾佑,张志良,等.细胞分裂素对水分胁迫中小麦胚芽鞘生长的影响[J].植物生理学报,1984,10(4):341—353.

[9]　李文卿,潘廷国,柯玉琴,等.土壤干旱胁迫对甘薯苗期活性氧代谢的影响[J].福建农业学报,2000,15(4):45—50.

[10]　何 冰,许鸿源,陈 京.干旱胁迫对甘薯叶片质膜透性及抗氧化酶类的影响[J]. 广西农业大学学报,1997,16(4):287—290.

[11]　余叔文,汤章城.植物生理与分子生物学[M].第二版.北京:科学出版社,2001.739.

[12]　钮福祥,华希新,郭小丁,等.甘薯品种抗旱性生理指标及其综合评价初探[J].作物学报,1996,22(4):392—398.

[13]　Aspinall D, Paleg LG. The Physiology and Biochemistry of Drought Resistant in plants, Handbook of Plant and Crop Stress [M]. Sydney: Academic Press, 1981.1455—168.

[14]　黎 裕.植物的渗透调节与其它生理过程的关系与其在作物改良中的应用[J].植物学通讯,1994,30(5):377—385.

[15]　聂华堂,陈竹生,计 玉.干旱胁迫下柑桔的生理生化变化与抗旱性的关系[J].中国农业科学,1991,24(4):14—18.

[16]　陈 京,周启贵,张启堂 .PEG 处理对甘薯叶片渗透调节物质的影响[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),1995,(2):73—78.

[17]　张明生,谈 锋.干旱胁迫下甘薯叶绿素 a/b 比值的变化及其与抗旱性的关系[J].种子,2001,4:23—25.

[18]　王 霞,侯 平,尹林克,等.干旱胁迫对柽柳植物可溶性物质的影响[J].干旱区研究,1999,16(2):6—11.

中国知网　https://www.cnki.net

Physiological responses of sweet potato callus to drought stress

WANG Lan-lan[1], ZHANG Li-jun[2], CHEN Gui[2]

(1. *College of Chemistry and Life Science, Shenyang Normal University, Shenyang Liaoning* 110034;
2. *College of Life Science Technolege, Shenyang Agricultury University, Shenyang Liaoning* 110161)

Abstract: Callus of sweet potato "Lu-xuan 1" were cultured under drought stress, then the effects on water potential, contents of soluble protein, soluble sugar, proline, and activities of SOD, POD and CAT were studied in order to understand the physiological mechanism of sweet potato callus resistance to drought stress at cell level. The results showed as follows: the permeability of cytoplasm membrane of sweet potato callus increased prominently and the water potential of them decreased under drought stress; soluble protein contents decreased under slight drought stress but increased under severe stress; SOD activities increased under moderate and severe stress; POD activities decreased under different degrees of drought stresses; CAT activities increased under moderate and severe stress; contents of proline and soluble sugar increased under different degrees of drought stresses.

Keywords: sweet potato; callus; drought stress; plasma membrane permeability; soluble sugar; proline

(上接第142页)

Effects of chlorophyll content and POD activity on osmosis stress at seedling stage of maize hybrids

LI De-xiao, CUI Li-yan, CHEN Yao-feng

(*College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: Drought-tolerance at the seedling stage affects seriously germination of seeds and survival of young plants. Using 25% polyethyleneglycol(PEG) solution, germinated seed number, chlorophyll content and seedling-stage peroxide (POD) activity of 8 maize hybrids varieties were tested. The results showed that drought-tolerance coefficients, caculated from germinated seed number, were siginificantly different among hybrids, and germination ability of flinty kernels were better than that of dented ones; that chlorophyll content of seedling leaves increased differently after selection for seed gemination in the PEG solution; and that leaf POD activities were different in check treatments and increased after osmosis stress treatments, but degrees of increase were different among the hybrid varieties.

Keywords: chlorophyll; POD activity; gemination; osmosis stress; maize

中国知网 https://www.cnki.net