

卫星搭载苜蓿叶片愈伤组织对 PEG 胁迫的响应

李 波,陈雪梅,王 烨

(齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161000)

摘 要: 对卫星搭载的苜蓿叶片诱导产生愈伤组织进行干旱胁迫,探讨苜蓿愈伤组织对 PEG 胁迫的响应和抗氧化酶活性等生理指标的变化。结果表明:随着 PEG 浓度的升高,苜蓿愈伤组织的致死率逐渐增加,25%、30% PEG 浓度分别为愈伤组织半致死浓度和致死浓度。卫星搭载处理提高了苜蓿愈伤组织可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸含量,增加了 POD 和 SOD 活性,降低了丙二醛含量,且与对照差异均显著。综合各项生理生化指标卫星搭载可以提高苜蓿抗旱性,可获得高抗旱性苜蓿突变体。

关键词: 苜蓿;愈伤组织;卫星搭载;PEG 胁迫;生理特性

中图分类号: S311 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7601(2014)05-0052-03

Response to drought stress of leaf callus of alfalfa induced by satellite carrying

LI Bo, CHEN Xue-mei, WANG Ye

(School of Life Science and Agroforestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

Abstract: In order to improve the alfalfa's resistance to drought, the drought stress was simulated on leaf callus of alfalfa that was carried by satellite, and the response to PEG stress and 6 physiological and biochemical indexes were measured. The results showed that the rate of fatality increased gradually on alfalfa callus, with half lethal concentration and lethal concentration of PEG being 25% and 30%, as PEG concentration increased. In comparison with CK, satellite carrying significantly improved the contents of soluble sugar, soluble protein, and increased the POD and SOD activity, reduced the relative conductivity and malondialdehyde content. Satellite carrying increased drought resistance of the alfalfa callus, which could be useful for obtaining alfalfa mutants with high drought resistance.

Keywords: alfalfa; callus; satellite carrying; PEG stress; physiological characteristic

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.) 作为世界上最重要的豆科牧草,具有较高的营养价值和持久的利用价值。我国北方地区属于大陆性气候,春季干旱少雨,筛选或培育抗旱性强的牧草可解决干旱地区草资源的匮乏。利用太空的特殊环境对农作物种子的诱变作用产生的变异,再返回地面选育新种质、培育新品种,已广泛应用在粮食和经济作物上,但关于牧草空间诱变及应用的研究较少^[1-2]。利用卫星搭载技术,通过植物组织培养技术,筛选苜蓿耐干旱突变体,对进一步的品种资源改良和生产应用、提供抗旱种质资源具有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

卫星搭载和未搭载的龙牧 801 苜蓿种子均由黑

龙江省畜牧研究所提供。其种子 2008 年 10 月 15 日—11 月 2 日期间,经过返回式科学与技术实验卫星搭载,经 17 d 的空间诱变处理后返回地面,于 2009 年 5 月将搭载和未搭载的种子种植于齐齐哈尔大学的植物园。以苜蓿的叶片诱导出的愈伤组织为实验材料,分别简称为搭载和未搭载的苜蓿愈伤组织。

1.2 方 法

1.2.1 愈伤组织的诱导和继代培养 取卫星搭载和未搭载的苜蓿叶,流水冲洗 2 h,经 0.1% L 汞消毒 10 min 后,用无菌水冲洗 4~5 次。将处理后的叶切成大小为 1 cm² 左右小块,接种到 MS + 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA + 1 mg·L⁻¹ 2,4-D + 30% 蔗糖的琼脂培养基中,于 25℃ 条件下培养,每日漫射光照 12 h^[3]。

选取培养 20 d 左右的愈伤组织,切取其中白色、新鲜、松嫩的部分切成 0.5 cm³ 大小的块,然后

收稿日期:2014-01-13
基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12521610);“十二五”农村领域国家科技计划课题(2011BAD17B00)
作者简介:李 波(1962—),女,辽宁鞍山人,教授,主要从事植物的抗性生理、细胞生物的研究。E-mail:libo1962@163.com。

转入继代培养基中(培养基同上),愈伤组织需要继代 2 次。

1.2.2 PEG 致死浓度的确定 配置含不同浓度 PEG-6000 MS 液体培养基(激素成分同固体培养基),将未搭载的苜蓿愈伤组织接种在 PEG 浓度分别为 0%、15%、20%、25% 和 30% 的培养基中^[4],胁迫处理 2、4、6、8、10 d 后将其分别转接到 MS 固体培养基中,观察愈伤组织的存活与致死情况,15 d 后统计各处理浓度胁迫下愈伤组织的致死率,确定愈伤组织的半致死浓度及致死浓度。

1.2.3 搭载的愈伤组织 PEG 胁迫 将卫星搭载愈伤组织接种到 PEG 致死浓度液体培养基中,胁迫处理 10 d 后将其转接到 MS 固体培养基中,对存活的愈伤组织继代 3~4 次用于生理生化测定。

1.2.4 生理生化指标的测定 可溶性蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝法,丙二醛(MDA)和可溶性糖的含量测定采取硫代巴比妥酸法,游离脯氨酸含量测定采用茚三酮法,过氧化物酶活性测定采用愈

创木酚法,超氧化物歧化酶活性的测定采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法^[5-8]。各指标均重复 3 次。

1.2.5 统计分析 利用统计分析软件 SPSS17.0 对测定的生理生化指标进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 PEG 胁迫致死浓度的确定

图 1 显示在 PEG 胁迫条件下愈伤组织的长势,随着胁迫天数及浓度的增加,愈伤组织致死数量逐渐增多,愈伤组织生长情况的统计结果见表 1。由表 1 可知,在相同的胁迫天数,随着 PEG 浓度的升高,苜蓿愈伤组织的致死率呈逐渐增加趋势,在 PEG 胁迫 6d 时,含 25% PEG 浓度的愈伤组织致死率达 51.9%,含 30% PEG 浓度的愈伤组织死亡率达 59.3%,此 PEG 浓度为苜蓿愈伤组织胁迫的半致死浓度。在 PEG 胁迫 10 d 时,含 30% PEG 浓度的愈伤组织致死率为 97.2%,接近 100%,此 PEG 的浓度为苜蓿愈伤组织胁迫的致死浓度。

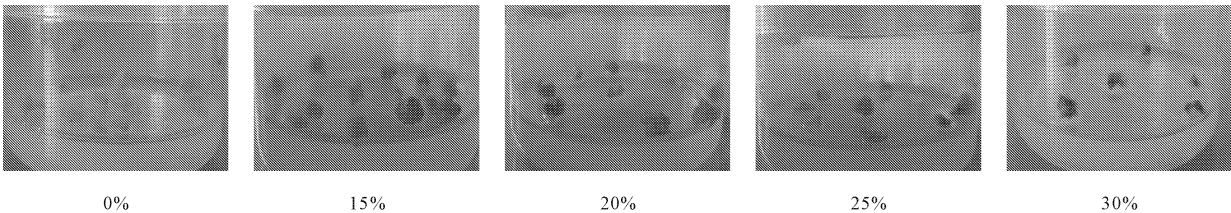


图 1 PEG 胁迫未搭载苜蓿愈伤组织

Fig.1 Callus of alfalfa under PEG stress

表 1 苜蓿愈伤组织 PEG 胁迫下的致死率/%

Table 1 The lethalarate of alfalfa callus under different PEG concentrations

天数 Day/d	浓度 Concentration/%				
	0	15	20	25	30
2	0.00	0.50	0.57	10.70	18.50
4	0.20	5.56	19.20	35.00	39.50
6	3.50	11.32	30.00	51.90	59.30
8	5.50	22.70	33.30	56.00	78.60
10	10.20	27.30	37.00	76.00	97.20

2.2 30% PEG 胁迫对搭载苜蓿愈伤组织生长影响

将卫星搭载的愈伤组织接种到含 30% 的 PEG 的液体培养基中培养,10 d 后转接到 MS 固体培养基内,观察愈伤组织的存活状况(见图 2),在培养 20d 后,愈伤组织的死亡率为 48.7%。挑选长势较好的愈伤组织进行继代培养。

2.3 卫星搭载对苜蓿愈伤组织生理特性的影响

2.3.1 丙二醛和可溶性糖含量的变化 在 4 份材料中,PEG 胁迫和卫星搭载处理都可降低苜蓿愈伤组织 MDA 含量,增加可溶性糖含量,PEG 胁迫后卫

星搭载的苜蓿愈伤组织 MDA 含量最低,可溶性糖含量最高(见表 2)。

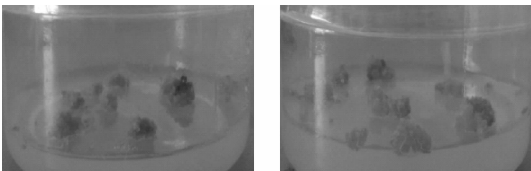


Fig.2 Callus of alfalfa induced by space flight with PEG stress

PEG 胁迫搭载组愈伤组织 MDA 含量相对于未搭载降低了 36.44%, 差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。MDA 含量的变化反映植物的抗逆性强弱, 空间环境使愈伤组织丙二醛含量降低, 提高苜蓿愈伤组织对干旱的抵抗能力。PEG 胁迫搭载组愈伤组织的可溶性糖含量相对于未搭载增加了 42.58%, 差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。愈伤组织的细胞中的可溶性糖的大量积累可以降低细胞的渗透作用, 增强植物抗旱性, 而空间环境又使愈伤组织积累了更多的可溶性糖。

2.3.2 可溶性蛋白和脯氨酸含量的变化 在 4 份材料中, PEG 胁迫和卫星搭载处理都可以使苜蓿愈伤组织可溶性蛋白和脯氨酸含量大量增加, PEG 胁迫搭载的苜蓿愈伤组织的可溶性蛋白和脯氨酸的含量最高(见表 2)。PEG 胁迫搭载的愈伤组织比对照的愈伤组织增加了 172%, 差异达到极显著水 ($P < 0.01$)。高含量的可溶性蛋白质可以使植物组织细胞维持在较低的渗透环境, 抵抗干旱胁迫对其产生的伤害, 而空间环境又使愈伤组织积累了更多的可

溶性蛋白。PEG 胁迫搭载的愈伤组织比未搭载的愈伤组织脯氨酸含量提高 51.56%, 差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。脯氨酸含量的增加, 使组织细胞维持在较高的水势环境中, 减少水分流失, 避免细胞因失水过多而导致死亡, 而空间环境又使愈伤组织积累了更多的脯氨酸。

2.3.3 POD 和 SOD 活性变化 PEG 胁迫和卫星搭载都可以使苜蓿愈伤组织 POD 和 SOD 活性增加, PEG 胁迫搭载的苜蓿愈伤组织的 POD 和 SOD 活性最高(见表 2)。PEG 胁迫搭载的愈伤组织的 POD 活性相对于未搭载的提高了 80.77%, 差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。POD 在愈伤组织内活性的升高证明愈伤组织在逆境中的活力增强。PEG 胁迫搭载的苜蓿愈伤组织的 SOD 活性最高(见表 2), PEG 胁迫搭载愈伤组织中 SOD 的活性相对于未搭载的高了 29.61%, 差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。SOD 活性越高, 增加植物对干旱环境的保护能力, 而空间环境又促进了 SOD 的活性提高。

表 2 愈伤组织生理指标的变化
Table 2 Changes of the physiological and biochemical indices of callus

项目 Item	未搭载愈伤组织 Callus	搭载愈伤组织 Callus of space flight	PEG 胁迫未搭载愈伤组织 Callus under PEG stress	PEG 胁迫搭载愈伤组织 Callus of space flight with PEG stress
丙二醛含量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})$ MDA content	13.09 ± 0.52aA	10.92 ± 0.43bB	9.97 ± 0.51bcBC	8.32 ± 0.74cC
脯氨酸含量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$ Proline content	159.15 ± 3.64dD	197.58 ± 2.56cC	223.70 ± 3.10bB	241.21 ± 4.28aA
可溶性糖含量/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$ Soluble sugar content	54.93 ± 0.53dD	56.32 ± 0.42cC	67.56 ± 0.28bB	78.32 ± 0.30aA
可溶性蛋白含量/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$ Soluble protein content	0.25 ± 0.02cC	0.37 ± 0.04bcB	0.46 ± 0.08bB	0.68 ± 0.05aA
POD 活性/ $(\Delta_{470}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1})$ POD activities	80.76 ± 1.23cC	84.35 ± 2.21cC	124.45 ± 1.43bB	145.43 ± 2.34aA
SOD 活性/ $(\text{U}\cdot\text{g}^{-1})$ SOD activities	77.34 ± 0.12dD	86.63 ± 0.16cC	97.12 ± 0.06bB	100.24 ± 0.21aA

注:小写字母表示差异极显著 ($P < 0.05$),大写字母表示差异显著 ($P < 0.01$)。
Note: capital letters indicate the significant difference at 1% level, small letters are significantly different at 5% level.

3 讨 论

3.1 愈伤组织的 PEG 胁迫

对 PEG 浓度的梯度进行确定时设置了五个浓度梯度,分别为 0%、15%、20%、25% 和 30%。对于培养方式的选择分别为 MS 培养基固体和静止液体培养,实验首先选用了固体培养基,发现高浓度的 PEG 与琼脂不相容,进而改用的液体培养基,选用了静止液体培养方法来培养^[5],在培养瓶内平铺 12 ~ 15 张的滤纸,注入液体培养基,液体不能没过愈伤

组织的 1/2 以上,最好使愈伤组织漂浮其上,达到对愈伤组织的胁迫处理,又使愈伤组织能得到氧气。

3.2 空间环境诱变效应

植物在受到干旱胁迫的情况下,其植物体内会发生一系列的生理生化反应,同样苜蓿在干旱逆境和空间环境下发生同样的变化^[9-11]。抗旱性是由多项因素共同的作用而形成的一个相对比较复杂的综合性状,因而选择对多种生理生化指标的测定进行综合评价是一项非常行之有效的方法,这样可以比较客观的鉴定在不同的处理下苜蓿愈伤组织的抗
(下转第 115 页)

表 2 冬小麦各发育期间隔日数与各气候要素的相关关系

Table 2 Correlation of interval days in each developing stage with each climate factor of winter wheat

发育阶段 Growth stage	冬前生长期 Before winter	越冬期 Wintering period	返青~拔节期 Turning green~ jointing stage	拔节~抽穗期 Jointing~ heading stage	抽穗~成熟期 Heading~ maturation period
降水量 Precipitation	0.062	0.411 *	-0.075	0.588 * *	0.643 * *
平均气温 Average temperature	0.002	-0.388 *	-0.8 * *	-0.662 * *	-0.633 * *
≥0℃ 积温 Acuity 0℃ accumulated temperature	0.771 *	-0.382	0.135	0.87 * *	0.889
5 cm 地积温 5 cm to accumulated temperature	0.721 *	-0.432	0.396	0.85 * *	0.723 * *
10 cm 地积温 10 cm to accumulated temperature	0.71 * *	0.582	0.321	0.889 * *	0.843 * *

注 Note: * * $P < 0.001$; * $P < 0.1$ 。

高复种指数;另一方面,由于旱塬区春季气温变率较大,发育期提前将导致作物受冻害的气候风险增大,尤其果树开花期遭受冻害^[10],将对产量构成严重威胁。冬季气温持续上升,将导致冬小麦条锈病孢子和林果病虫害等安全越冬,对病虫害防治工作带来很大难度。因此,气候变暖对旱塬农业生产将产生深刻的影响,相关部门必须做好相应的管理对策,趋利避害,合理调整种植结构,使当地农业经济快速发展。

参 考 文 献:

[1] 叶笃正,符淙斌,董文杰.全球变化科学进展与未来趋势[J].地球科学进展,2002,(4):467-469.
[2] 陈宜瑜.中国全球变化的研究方向[J].地球科学进展,1999,(4):319-323.
[3] 丁一汇,王守荣.中国西北地区气候与生态环境概论[M].北

京:气象出版社,2001.
[4] 卢宗凡.中国黄土高原生态农业[M].西安:陕西科学技术出版社,1997.
[5] 陕西省统计局:《陕西统计年鉴》.陕西省主要粮食大县情况统计(2000—2005)[M].北京:中国统计出版社,2006.
[6] 姚玉璧,李耀辉,王毅荣,等.黄土高原气候与气候生产力对全球气候变化响应[C]//推进气象科技创新加快气象事业发展——中国气象学会 2004 年年会论文集(下册).2004.
[7] 赵艳霞,王馥棠,刘文泉.黄土高原的气候生态环境、气候变化与农业气候生产潜力[J].干旱地区农业研究,2003,(4):145-149.
[8] 张 强,邓振镛,赵映东,等.全球气候变化对我国西北地区农业的影响[J].生态学报,2008,(3):29-37.
[9] 李栋梁,魏 丽,蔡 英.中国西北现代气候变化事实与未来趋势展望[J].冰川冻土,2003,25(2):22-29.
[10] 刘 璐,郭兆夏,柴 芊,等.陕西省苹果花期冻害风险评估[J].干旱地区农业研究,2009,27(5):257-266.

(上接第 54 页)

旱性^[11-13]。空间环境处理使苜蓿愈伤组织的丙二醛的含量下降,可溶性糖、游离脯氨酸和可溶性蛋白的含量及 POD 和 SOD 活性增加,说明太空特殊的环境如高辐射、强离子等的诱变作用,提高了苜蓿愈伤组织对干旱的抵抗能力。6 项指标可用于评价苜蓿愈伤组织的抗旱性的强弱。

参 考 文 献:

[1] 郭慧琴,李 晶.太空诱变对紫花苜蓿耐盐性及离体再生的影响[J].草原草坪,2013,33(1):25-27.
[2] 毛淑蕊.利用 PEG6000 离体鉴定花生抗旱性技术体系的研究[D].泰安:山东农业大学,2008:13-14.
[3] 王文国,赵小光,王胜华,等.PEG 胁迫对不同培养方式下金发草愈伤组织再生能力的影响[J].生物工程学报,2007,23(2):337-342.
[4] 程 玲,邱永福,刘 兵,等.PEG 胁迫下高羊茅幼苗几个生理生化指标的变化[J].长江大学学报(自然科学版),2011,8(1):227-230.
[5] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:北京高等教育出版社,2000:106-110.

[6] 徐宗才,田 丰.不同品种马铃薯叶片生理特性与抗旱性研究[J].干旱地区农业研究,2008,26(5):153-155.
[7] Wang J P, Bughrra S S. Evaluation of drought tolerance for Atlas rescue, and their progeny[J]. Euphytica,2008,164:113-122.
[8] Reddy T Y, Reddy V R, Anbumozhi V. Physiological responses of groundnut(*Arachis hypogea* L.) to drought stress and its amelioration: A critical review[J]. Plant Growth Regulation, 2013,41:75-88.
[9] 段碧华,尹伟伦,韩宝平.不同 PEG-6000 浓度处理下几种冷季型草坪草抗旱性比较研究[J].中国农学通报,2005,21(8):247-251.
[10] 王俊娟,叶武威,王德龙,等.PEG 胁迫条件下 41 份陆地棉种质资源萌发特性研究及其抗旱性综合评价[J].植物遗传资源学报,2011,12(6):840-846.
[11] 穆怀彬,德 英,等.PEG-60000 胁迫 10 个苜蓿品种幼苗期抗旱性比较[J].草业科学,2011,28(10):1809-1814.
[12] 张晨妮,周青平,颜红波,等.PEG-60000 对老芒麦种质材料萌发期抗旱性影响的研究[J].草业科学,2010,27(1):119-123.
[13] Abraham E M, Huang B R, Bonos S A, et al. Evaluation of drought resistance for Texas bluegrass, Kentucky bluegrass, and their hybrids[J]. Crop Science, 2004,44:1746-1753.