

卫星搭载苜蓿种子叶片愈伤组织对逆境胁迫的响应

李波¹, 徐婉玉¹, 彭丹¹, 李红²

(1. 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 黑龙江省畜牧研究所, 黑龙江 齐齐哈尔 161000)

摘要: 对卫星搭载苜蓿种子的叶片进行愈伤组织的诱导和 NaCl、PEG 及温度胁迫处理, 探讨空间环境对不同逆境下苜蓿愈伤组织的脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白、相对电导率和丙二醛含量 5 项生理指标的影响, 采用隶属函数法对搭载愈伤组织的抗逆性进行评价。结果表明: 未搭载材料经 NaCl(2%)、PEG(30%)、高温(40℃, 6 d) 和低温(0℃, 8 d) 胁迫后, 其存活率分别为 2.68%、3.8%、43.68% 和 35.42%, 与未胁迫组间存在极显著差异。4 份苜蓿愈伤组织中, 搭载的苜蓿愈伤组织在脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白含量均高于未搭载愈伤组织, 相对电导率和丙二醛含量均低于未搭载愈伤组织。搭载的苜蓿愈伤组织比未搭载的愈伤组织的丙二醛含量降低了 39.47%, 相对电导率降低了 48.37%, 可溶性糖含量增加了 34.71%, 可溶性蛋白含量增加了 40.67%, 脯氨酸的含量增加了 55.6%。搭载的苜蓿愈伤组织抗逆性强弱为: 干旱 > 盐 > 低温 > 高温, 卫星搭载胁迫后的苜蓿愈伤组织对干旱和盐的抵抗能力比较强。

关键词: 苜蓿; 愈伤组织; 卫星搭载; 生理指标; 抗逆

中图分类号: S551+.7; S335.2 **文献标志码:** A

Response to abiotic stresses of leaf callus of alfalfa seed carried by satellite

LI Bo¹, XU Wan-yu¹, PENG Dan¹, LI Hong²

(1. College of Agriculture, Forestry and Life Sciences, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China;

2. Animal Science Institute of Heilongjiang, Qiqihar 161000, China)

Abstract: To study the influence of space environment on the leaf callus of alfalfa seed carried by satellite, the callus of alfalfa under different stress (NaCl and PEG and temperature stress) were studied, and the five physiological parameters including proline, soluble sugar, soluble protein, relative conductivity and MDA content were determined to evaluate the effect of satellite carrying on callus resistance. The results showed that the survival rates of no-carrying material were 2.68%, 3.8%, 43.68%, and 35.42% for NaCl (2%), PEG (30%), high temperature (40℃, 6d), and low temperature (0℃, 8d) stress, being significantly different with those of the control. Satellite-carrying resulted in higher proline, soluble sugar, protein contents, by an increase of 55.6%, 34.71%, and 40.67%, respectively. By contrast, the relative conductivity and MDA content were reduced by 48.37% and 39.47%. The degree of resistance of satellite carrying alfalfa callus was in the order of drought, salt, low temperature, and high temperature.

Keywords: alfalfa; callus; space flight; physiological parameters; resistance

紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 为豆科牧草, 是畜禽优选的饲料, 再生性和适应性较强。卫星搭载即太空育种, 即将农作物搭载于用于科学探测和技术试验的卫星上。空间环境具有安全可靠、诱变时间短、缩短育种年限等优点^[1]。目前, 在世界各地范围内大量的利用太空搭载技术对各种植物种子进行空间诱变处理, 以增强植物的抗逆性^[2]。太空环境中

有很多因素会对植物体产生影响^[3]。失重状态、真空状态、强紫外线辐射和高能量粒子与交流磁场等等, 这些都是太空所特有的条件。空间辐射和微重力对生物的影响是最显著的^[4]。空间辐射诱变主要是通过 χ 、 γ 、 α 、 β 射线和中子、紫外光等外界因素, 使植物体在分子水平上发生变异, 形成对生产生活有实际价值的发生突变的个体, 可以作为一种新的

植物或者成为新的遗传资源^[5-6]。20 世纪 90 年代以后对小麦、羊草、葡萄、油菜、茄子和水稻、菜心、菊花等进行抗逆突变体的研究^[7],但利用植物组织培养技术对卫星搭载的苜蓿种子的叶片产生愈伤组织进行苜蓿的抗逆性育种的研究很少,本文对卫星搭载后的苜蓿种子其叶片获得愈伤组织在盐碱、干旱、高温和低温逆境环境下生理生化变化,分析空间环境对苜蓿愈伤组织抗逆性的影响,为苜蓿抗逆性的研究提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

紫花苜蓿龙牧 801 的种子由黑龙江省畜牧研究所提供,种子于 2008 年 10 月 15 日—2008 年 11 月 2 日期间,经由返回式科学与技术试验卫星搭载,经过 17d 的空间诱变处理后返回地面,其种子种植于齐齐哈尔大学生物园。取搭载、未搭载苜蓿叶片进行愈伤组织诱导。

1.2 实验方法

1.2.1 愈伤组织的诱导及继代培养 取未搭载和搭载的苜蓿的叶片,用 0.1% 的 HgCl_2 消毒 8~10 min,无菌水冲洗 4~5 次,将其切割成 0.5 cm^2 大小的小块,接种于 $\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} 2,4\text{-D} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} 6\text{-BA} + 30 \text{ g}$ 蔗糖 + 8.5 g 琼脂的苜蓿愈伤组织诱导的培养基中^[7-8],在 25°C 的恒温培养箱中培养。培养 20 d 后,选取白色、新鲜、松嫩的愈伤组织,切割成 0.5 cm^3 左右,转接到继代培养基中(培养基同前),继代后的材料分别记为卫星搭载和未搭载的愈伤组织。

1.2.2 逆境胁迫未搭载苜蓿愈伤组织 盐胁迫:培养基分别添加 0.5%、1.0%、1.5% 和 2.0% 的 NaCl,每瓶接种 5~6 块 0.5 cm^3 左右愈伤组织,每个胁迫梯度 15 瓶, 25°C 的培养箱中培养,统计各盐浓度胁迫下的愈伤组织的死亡率。

PEG 胁迫:配置含 15%、20%、25% 和 30% PEG-6000 液体培养基,每瓶接种 8~10 块 0.5 cm^3 左右愈伤组织,每个胁迫梯度 12 瓶,在 25°C 恒温培养箱中培养,分别在处理 2 d、4 d、6 d、8 d、10 d 后转接到 MS 固体培养基中培养,统计各个浓度胁迫下愈伤组织的致死率。

温度胁迫:将未搭载的愈伤组织放入 40°C 和 0°C 温度的培养箱中进行培养,每个胁迫梯度 15 瓶,每瓶 5~6 块愈伤组织,培养 12 d 后观察愈伤组织的生长状况。

逆境胁迫搭载的苜蓿愈伤组织:将卫星搭载的

愈伤组织接种在 NaCl 和 PEG 浓度致死环境中,在 25°C 的恒温培养箱中培养。同时将卫星搭载的愈伤组织放入 40°C 高温和 0°C 低温的环境中培养。

1.2.3 指标测定 丙二醛含量和可溶性糖含量测定采用硫代巴比妥酸法,可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法,脯氨酸含量的测定采用茚三酮法^[9],相对电导率的测定采用浸泡法。各指标测定值均为重复 3 次的测定值。

1.2.4 耐性评价 采用隶属函数法对不同胁迫的苜蓿愈伤组织测得的各指标隶属值进行累加^[10-12],求得平均数并进行分析比较,与逆境胁迫的各指标呈正相关用(1)式;与逆境胁迫的各指标呈负相关用(2)式。

$$X_{1(u)} = (X - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min}) \quad (1)$$

$$\text{或} \quad X_{2(u)} = 1 - (X - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min}) \quad (2)$$

式中, X_u 为隶属函数值; X 为逆境胁迫下某指标的测定值; X_{\max} 为逆境胁迫中此指标的最大值; X_{\min} 为逆境胁迫中此指标的最小值。

2 结果与分析

2.1 不同逆境条件对苜蓿愈伤组织存活率的影响

干旱、盐碱、高温和低温等极端逆境对苜蓿愈伤组织的生长造成不同程度的影响,严重影响到苜蓿愈伤组织的存活率。由表 1 和图 1 可知随着盐浓度的增加和培养天数的增加,未搭载苜蓿愈伤组织的存活率逐渐降低,在培养 10 d、NaCl 浓度为 1% 时和 8 d、浓度 1.5% 时愈伤组织的存活率分别为 53.96% 和 54.31%,为盐半致死浓度,在培养 12 d、NaCl 浓度为 2% 时其存活率仅为 2.68%,为盐致死浓度。

由表 2 和图 2 可知,随着 PEG 浓度的增加和培养天数的增加,未搭载苜蓿愈伤组织的存活率逐渐降低,在培养 6 d、PEG 浓度为 30% 时,存活率为 59.30%,为 PEG 半致死浓度,在培养 10 d、PEG 浓度为 30% 时其存活率仅为 3.8%,为 PEG 致死浓度。

表 1 盐胁迫下未搭载愈伤组织的存活率/%

Table 1 Survival rate of callus of non-carrying under salt stress

天数 Days /d	NaCl 浓度/% Concentration of NaCl			
	0.5	1.0	1.5	2.0
4	93.21	87.96	73.92	56.53
6	84.52	73.21	68.17	42.19
8	73.69	65.47	54.31	32.74
10	62.17	53.96	43.27	17.45
12	43.84	43.84	22.46	2.68

表 2 PEG 胁迫下未搭载愈伤组织的存活率/%

Table 2 Survival rate of callus of non-carrying under PEG stress

天数 Days /d	PEG 浓度/% Concentration of PEG				
	0	15	20	25	30
2	100.00	99.50	94.43	89.30	81.50
4	99.80	94.44	80.80	65.00	60.70
6	96.50	88.68	70.00	48.10	59.30
8	95.50	77.30	66.70	44.00	21.40
10	89.80	72.70	63.00	23.00	3.80

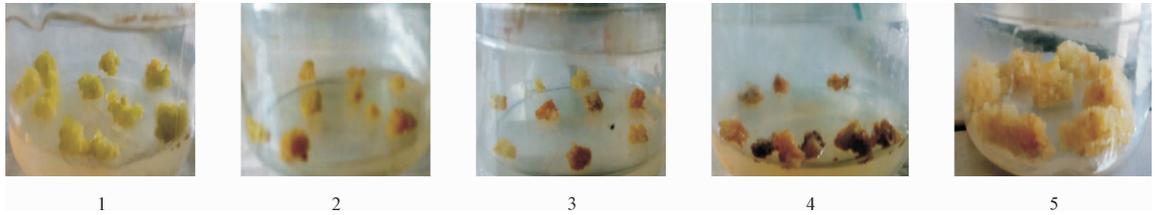
由表 3 和图 3 可知:随着培养天数的增加,经过搭载的愈伤组织存活率要比未经过搭载的愈伤组织存活率要高。40℃未搭载和搭载的愈伤组织在第 6 天时存活率分别为 43.68% 和 53.73%, 差异极显著。在 0℃低温环境下未经搭载和搭载的愈伤组织

在第 8 天时存活率分别为 35.42% 和 59.32%, 说明搭载的愈伤组织比未搭载的愈伤组织耐高温和低温的能力强。

表 3 不同温度胁迫下搭载与未搭载苜蓿愈伤组织的存活率/%

Table 3 The survival rate of alfalfa callus of carrying and non-carrying under different temperature stress

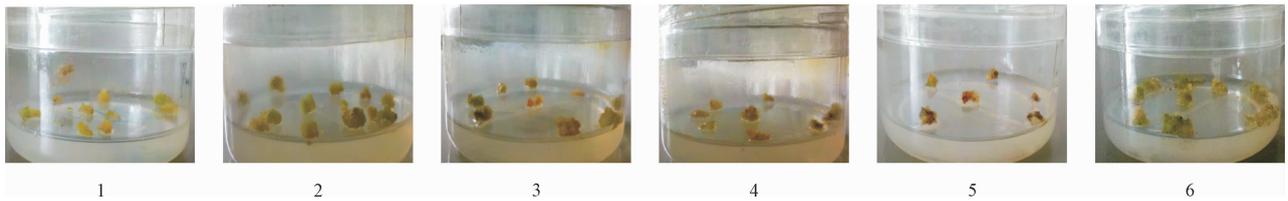
培养天数 Days of culture /d	温度 Temperature			
	40℃未搭载 40℃ Non- carrying	40℃搭载 40℃ Carrying	0℃未搭载 0℃ Non- carrying	0℃搭载 0℃ Carrying
4	57.43	62.42	69.44	72.67
6	43.68	53.73	58.92	69.42
8	33.24	47.21	35.42	59.32
10	21.95	32.19	22.18	47.69
12	13.19	26.48	17.94	34.57



注:1,2,3,4 为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 盐胁迫未搭载苜蓿愈伤组织;5 为 2.0% 盐胁迫搭载苜蓿愈伤组织。

Note: 1, 2, 3 and 4, non-carrying alfalfa callus under 0.5%, 1.0%, 1.5% and 2.0% salt stress. 5, carrying alfalfa callus under 2.0% salt stress.

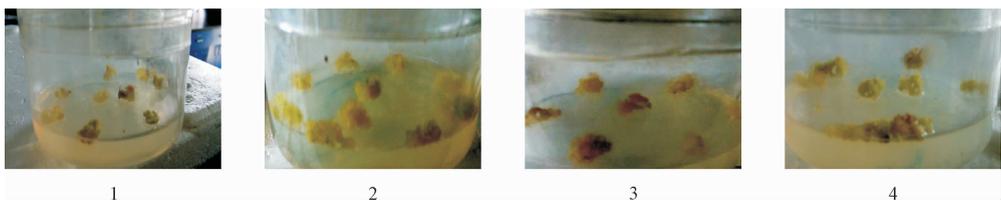
图 1 盐胁迫下苜蓿愈伤组织
Fig.1 Alfalfa callus under salt stress



注:1,2,3,4,5 分别为 10% PEG、15% PEG、20% PEG、25% PEG、30% PEG 胁迫未搭载苜蓿愈伤组织;6 为 30% PEG 胁迫搭载苜蓿愈伤组织。

Note: 1, 2, 3, 4 and 5, alfalfa callus of non-carrying under 10% PEG, 15% PEG, 20% PEG, 25% PEG, and 30% PEG stress. 6, alfalfa callus of carrying under 30% PEG stress.

图 2 PEG 胁迫下未搭载苜蓿愈伤组织
Fig.2 Alfalfa callus of non-carrying under PEG stress



注:1,2 为 40℃搭载和未搭载愈伤组织,3,4 为 0℃搭载和未搭载苜蓿愈伤组织。

Note: 1 and 2, callus of carrying and non-carrying under 40℃ stress. 3 and 4, callus of carrying and non-carrying under 0℃ stress.

图 3 不同温度胁迫下搭载与未搭载苜蓿愈伤组织
Fig.3 Alfalfa callus of carry and not carry under different temperature stress

2.2 卫星搭载对苜蓿愈伤组织生理的影响

植物受到逆境胁迫后,一些生理活动受到不同程度的影响,对搭载和未搭载及胁迫的苜蓿愈伤组织的丙二醛、可溶性蛋白、可溶性糖、相对电导率和脯氨酸含量的测定结果见表 4,所有搭载的苜蓿愈伤组织的可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸均高于未搭载的愈伤组织,而丙二醛和相对电导率均低于未搭载的愈伤组织,说明空间环境诱变改变了植物的渗透调节和膜脂氧化能力,进而提高苜蓿愈伤组织对不同逆境的抵抗能力。4 份材料中,经 NaCl 胁迫搭载的苜蓿愈伤组织比未搭载的愈伤组织的丙二醛的含量降低了 37.2%,相对电导率降低了 48.37%,可溶性糖的含量增加了 37.76%,可溶性蛋白含量增加了 21.56%,脯氨酸的含量增加了 55.6%;PEG 胁迫搭载的苜蓿愈伤组织比未搭载的苜蓿愈伤组织的丙二醛含量降低了 46.37%,可溶性糖的含量增加了 24.19%;可溶性蛋白的含量增加了 17.42%;脯氨酸

的含量增加了 59.6%,相对电导率降低了 10.99%;40℃高温胁迫未搭载的苜蓿愈伤组织和 0℃低温条件下比搭载的苜蓿愈伤组织的丙二醛含量分别降低了 53.5%和 77.19%,相对电导率降低了 40.41%和 16.91%,可溶性糖的含量增加了 5.92%和 9.44%;可溶性蛋白的含量增加了 22.19%和 35.28%;脯氨酸的含量增加了 20.07%和 19.10%。说明了空间环境的作用降低了细胞膜脂过氧化作用,增加了质膜稳定性,提高苜蓿愈伤组织对盐害逆境的抵抗能力。

在 4 份搭载胁迫愈伤组织中,丙二醛含量最高为高温胁迫组,最低为低温胁迫组中,相差 1.81 倍;可溶性糖含量最高为盐胁迫组,最低为高温胁迫组,相差 1.30 倍;可溶性蛋白含量最高为干旱胁迫组,最低为低温胁迫组,相差 1.28 倍;脯氨酸含量最高为干旱胁迫组,最低为低温胁迫组,相差 2.00 倍;相对电导率最高为低温胁迫组,最低为干旱胁迫组,相差 1.72 倍。

表 4 卫星搭载苜蓿愈伤组织对不同逆境生理指标的变化

Table 4 The change in physiological parameters of alfalfa callus of satellite carrying under different stress

生理指标 Physiological parameters	对照 Contrast		2% NaCl		30% PEG		40℃		0℃	
	未搭载 Non- carrying	搭载 Carrying								
丙二醛 MDA $/(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})$	1.14 ± 0.01	0.69 ± 0.04	0.54 ± 0.05	0.32 ± 0.03	0.42 ± 0.11	0.37 ± 0.14	0.53 ± 0.08	0.47 ± 0.07	0.32 ± 0.09	0.26 ± 0.06
可溶性糖 Soluble sugar $/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	7.26 ± 0.23	11.12 ± 0.27	13.24 ± 0.44	15.32 ± 0.42	12.88 ± 0.33	14.67 ± 0.23	7.96 ± 0.25	11.82 ± 0.47	9.13 ± 0.60	12.28 ± 0.57
可溶性蛋白 Soluble protein $/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	13.34 ± 0.50	22.47 ± 0.78	23.58 ± 0.71	27.32 ± 0.44	24.05 ± 0.57	27.21 ± 0.68	23.32 ± 0.68	28.88 ± 0.34	32.15 ± 0.66	34.72 ± 0.45
脯氨酸 Proline $/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	101.43 ± 0.57	102.50 ± 0.22	175.66 ± 0.43	231.33 ± 0.66	231.17 ± 0.41	253.75 ± 0.11	109.72 ± 0.68	128.25 ± 0.50	117.47 ± 0.45	126.71 ± 0.34
相对电导率 Relative conductivity/%	46.12 ± 0.23	21.23 ± 0.27	19.67 ± 0.17	13.45 ± 0.29	17.69 ± 0.75	10.24 ± 0.70	19.59 ± 0.38	12.65 ± 0.69	20.38 ± 0.5	17.64 ± 0.69

2.3 卫星搭载苜蓿愈伤组织抗逆性评价

根据各生理生化指标隶属度,综合分析卫星搭载后苜蓿愈伤组织对逆境的抗性,由表 5 知,不同胁迫条件下的隶属函数综合评价最高为 30% PEG 胁迫愈伤组织,最低为 40℃胁迫愈伤组织,抗逆性排序为干旱 > 盐 > 低温 > 高温,说明卫星搭载胁迫后的苜蓿愈伤组织对干旱和盐的抵抗能力增强。

3 讨论

航天技术和太空搭载实验开辟了生物育种的新途径。在空间高真空、微重力、强辐射和超洁净的条件下,植物性状、生物生理生化和遗传特性都会发生不同程度的变化,而且生理的变化是对不同环境条件的一种适应性反应,空间环境对植物体产生生理

表5 各指标的隶属值和抗逆性综合评价

Table 5 The membership values of each parameter and comprehensive evaluation of resistance

处理 Treatment	丙二醛 MDA	可溶性糖 Soluble sugar	可溶性蛋白 Soluble protein	相对电导率 Relative conductivity	脯氨酸 Proline	总和 Sum	排序 Order
2% NaCl 搭载 2% NaCl Carrying	0.714	1.000	0.015	0.823	0.567	3.12	2
30% PEG 搭载 30% PEG Carrying	0.477	0.785	0.000	1.000	1.000	3.26	1
40℃ 搭载 40℃ Carrying	0.000	0.000	0.222	0.012	0.673	1.56	4
0℃ 搭载 0℃ Carrying	1.000	0.150	1.000	0.000	0.000	2.15	3

生化的变化多与植物遗传、生长发育、抗逆性等都有关系^[13-14]。特别是脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白的积累,丙二醛和相对电导率的降低,在植物抗逆性中起着重要作用,与赵玉锦等^[15]在空间诱变高粱突变体的研究中发现可溶性糖含量增加和杨先国等^[14]发现航天搭载丹参种子的叶片的可溶性蛋白含量增加的结果一致。研究的卫星搭载愈伤组织中,其耐盐性、耐高温、耐低温和耐干旱性都要比未经卫星搭载的抗逆性强,经过搭载的苜蓿种子材料后代获得的愈伤组织可以诱导出抗逆性强的植株,试验各胁迫搭载的愈伤组织与对照的差异可能反映其生理生化、遗传、抗逆性等方面的变异,这些愈伤组织可作为进一步选育优良品种的基础材料,可将这些抗逆性强的愈伤组织进一步分化成植株,因此,还需要进一步选育的试验材料。试验缺少对卫星搭载获得的抗逆性突变体诱导植株的抗性测定和比较,深入研究这些变异,以便获得稳定的变异体,从而有选择地利用这些变异,培育新的抗逆性强的苜蓿优良品种。这对于畜牧业的发展和生态环境的改良具有积极意义。

参考文献:

- [1] 齐宝林. 苜蓿的研究与应用[J]. 农业与技术, 2011, 31(3): 41-45.
- [2] 李世娟, 诸叶平, 孙开梦, 等. 中国太空育种现状及其前景展望[J]. 中国农学通报, 2005, 21(1): 159-162.
- [3] 陈真. 空间搭载小麦 SP3 - SP4 世代变异规律的研究[D]. 四

川农业大学, 2011.

- [4] Takeo O, Akihisa T, Hiromi S, et al. Expression of p53-regulated genes in cultured mammalian cells after exposure to a space environment[J]. *Biological Sciences in Space*, 2010.
- [5] 田杰, 赵宪忠, 董泽锋, 等. 观赏植物辐射诱变育种的研究进展[J]. 河北林业科技, 2012, (1): 55-56, 67.
- [6] 杨兆民, 张璐. 辐射诱变技术在农业育种中的应用与探析[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(1): 87-91.
- [7] Nechitailo G S, Lu Jinying, Xue Huai, et al. Influence of long term exposure to space flight on tomato seeds[J]. *Advances in Space Research*, 2005, 36(7): 1329-1333.
- [8] 李红, 李波, 王丽玲, 等. 紫花苜蓿耐羟脯氨酸变异体的筛选及抗性研究[J]. 草业科学, 2008, 25(10): 29-33.
- [9] Shahn A Z G, Shekoore E H, Kouros H D, et al. Interactive effects of silicon and aluminum on the malondialdehyde(MDA), proline, protein and phenolic compounds in *Borago officinalis* L[J]. *Med Plants Res*, 2011, 5(24): 5818-5827.
- [10] 魏永胜, 梁宗锁, 山仑, 等. 利用隶属函数法评价苜蓿抗旱性[J]. 草业科学, 2005, 22(6): 33-36.
- [11] 张荟荟, 杨钢, 高洪文, 等. 10 份豆科牧草的苗期抗旱性综合评价[J]. 新疆农业科学, 2013, 50(5): 938-943.
- [12] Wang Yi, Ding Gui-jie. Physiological responses of mycorrhizal pinus massoniana seedlings to drought stress and drought resistance evaluation[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(3): 639-645.
- [13] 任卫波, 韩建国, 张蕴薇, 等. 卫星搭载对二色胡枝子生物学特性的影响[J]. 草地学报, 2006, 14(2): 112-115.
- [14] 杨先国, 刘塔斯, 崔蕾, 等. 航天搭载丹参的可溶性蛋白及 CAT、POD、SOD 同工酶分析[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(4): 904-907.
- [15] 赵玉锦, 赵琦, 白志良, 等. 空间诱变高粱突变体的研究[J]. 植物学通报, 2001, 18(1): 81-89.