

# 盐胁迫下小麦愈伤组织生理生化特性的变化

杨素欣 王振镒

(西北农业大学基础科学系, 陕西杨凌 712100)

**摘 要** 以小麦花药胚性愈伤组织为材料, 研究了用  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 处理后几种重要酶活性的变化。结果表明: NaCl 处理能抑制愈伤组织生长, 使可溶性蛋白质含量、组织含水量降低, SOD, POD 活性升高; 随着胁迫程度增加, MDA 含量升高, 膜脂过氧化程度加剧, POD, LOX 活性升高, SOD 活性下降。

**关键词** 小麦愈伤组织, 盐胁迫, 酶活性

**分类号** S512.101

细胞工程作为一种创新遗传资源的手段, 很早就应用于植物抗盐性的研究。迄今为止, 人们已在许多植物上发现了不少耐盐细胞系并开展了大量抗盐机理的研究工作<sup>[1]</sup>。但由于供试材料、取材时间以及胁迫程度等的差异, 过去的生理生化研究工作中经常出现结果相异的情况<sup>[2]</sup>。为了全面反映盐胁迫下无性细胞系整个生长周期的生理状况, 本试验研究了盐胁迫下小麦胚性愈伤组织不同生长阶段生理生化特性的变化, 对其在细胞水平的耐盐机理进行了探讨。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料及处理

本试验以 No18 小麦花药胚性愈伤组织为供试材料, 在附加  $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  2, 4-D 的 MS 培养基上进行继代培养。培养温度为  $25 \sim 28^\circ\text{C}$ , 每天光照 14 h, 光强为 3 000 lx。选择生长一致的胚性愈伤组织 50 瓶加入  $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 进行胁迫处理, 分别在处理后 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 d 取样测定各种生理生化指标。以同样生长条件下未加 NaCl 的同一批愈伤组织作对照。

### 1.2 测定项目及分析方法

用称重法测定组织含水量及生长量。可溶性蛋白含量测定按照 Bradford 的方法<sup>[3]</sup>, 以牛血清蛋白为标准蛋白。超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用光化学测定方法<sup>[4]</sup>, 酶活性单位采用抑制光还原 50% 为一个酶活性单位。过氧化物酶(POD)活性测定参照文献[5]的化学发光法测定, 所用发光计系瑞典 LKB 公司的发光光度计(Wallac, 1250 型), 酶活性用 V/g 蛋白表示。脂氧合酶(LOX)活性测定底物配制按照 Kenneth Surrey 的方法<sup>[6]</sup>, 用在 234 nm 处每毫克蛋白每 10 min 产生一个单位光密度表示一个酶活单位。丙二醛(MDA)含量按 Cakmak 等方法测定<sup>[7]</sup>。

收稿日期 1998-02-18

课题来源 国家自然科学基金资助项目, 39570066

作者简介 杨素欣, 女, 1968 年生, 讲师, 在读博士。现在陕西师范大学生物系工作, 西安 710062

## 2 试验结果

### 2.1 NaCl 对愈伤组织生长及组织含水量的影响

以细胞的鲜重增加量为指标, 测定生长量, 其生长曲线如图 1A。对照愈伤组织的生长呈 S 型曲线, 可明显地分为延迟期(0~10 d)、指数生长期(10~25 d)和静止期(25~31 d)。在 0~10 d, 组织刚转移到新的培养基, 是一个适应过程, 同时亦伴随着细胞数目的增加; 10~25 d 时, 细胞生长迅速, 这时生长量急剧增加; 到 25 d 以后生长又逐渐平缓, 由于营养和空间限制使之不能继续快速生长。NaCl 处理使愈伤组织生长受抑, 呈持续缓慢生长, 不呈 S 型曲线生长(图 1)。NaCl 处理使组织含水量一直呈下降趋势, 在 10~25 d 组织含水量保持相对稳定。NaCl 处理降低了培养基的水势, 引起渗透调节作用, 使得组织含水量能在一定时期内保持相对稳定, 但 25~30 d 时组织含水量继续降低, 可能是由于盐毒害作用破坏了膜的结构而引起。

### 2.2 NaCl 处理对 POD 和 SOD 活性的影响

正常愈伤组织培养期间, 在延迟期和指数生长末期有两个 POD 活性高峰(图 1B)。在延迟期 POD 升高是由于机械切伤和环境变化而引起的反应, 与细胞壁的修复和自由基清除有关<sup>[8]</sup>。第二活性高峰出现在指数生长后期, 此期细胞从脱分化向分化型转换, 新细胞壁的合成极快, POD 升高与细胞分化有关。

POD 活性在 NaCl 处理后, 前 15 d 高于对照, 然后降到较低水平, 随着胁迫程度增加, POD 活性呈上升趋势(图 1B)。这一变化趋势与 SOD 相反, 表明严重盐胁迫下会引起保护酶系统的破坏, 此时 POD 参与细胞氧化, 促进细胞解体。

NaCl 处理后 SOD 活性高于对照, 但随着胁迫时间延长 SOD 活性未呈升高趋势, 而是渐趋降低(图 1B)。表明 SOD 的保护作用与胁迫强度有关, 在轻度胁迫下酶活升高, 随着胁迫强度增加, 膜脂过氧化加剧会破坏保护酶系统, 使 SOD 活性下降。

### 2.3 NaCl 处理对 LOX 活性的影响

在正常愈伤组织生长过程中, LOX 活性在延迟期比较高, 在指数生长期一直保持较低的水平, 静止期时活性又有所提高。用 NaCl 处理, 第 5 天 LOX 活性降低, 比对照低 58.3%; 在 10 d 以后, LOX 活性都比对照高(图 1C)。这与水分胁迫下不同胁迫程度所引起的 LOX 活性变化趋势相一致。

### 2.4 NaCl 处理对丙二醛含量的影响

愈伤组织在整个生长期, 丙二醛有两个活性高峰(图 1D)。其一高峰在第 5 天出现, 是机械损伤和环境改变而引起脂质过氧化的结果。在 20 d 时出现另一高峰, 与细胞分化时 POD 活性升高相一致。在生长末期, MDA 含量又有升高趋势, 是组织接近衰老引起脂质过氧化加剧的结果(图 1D)。

NaCl 处理后, MDA 含量随着胁迫时间不同而变化。除第 20 天外, MDA 含量均比对照高。随着胁迫强度加深, 丙二醛含量升高。在一定胁迫强度内, 细胞的各种保护机制使得 MDA 含量维持在一定水平, 但胁迫强度超过特定阈值后, 细胞内代谢失调, 自由基积累, 膜脂过氧化作用加大, 丙二醛含量升高。

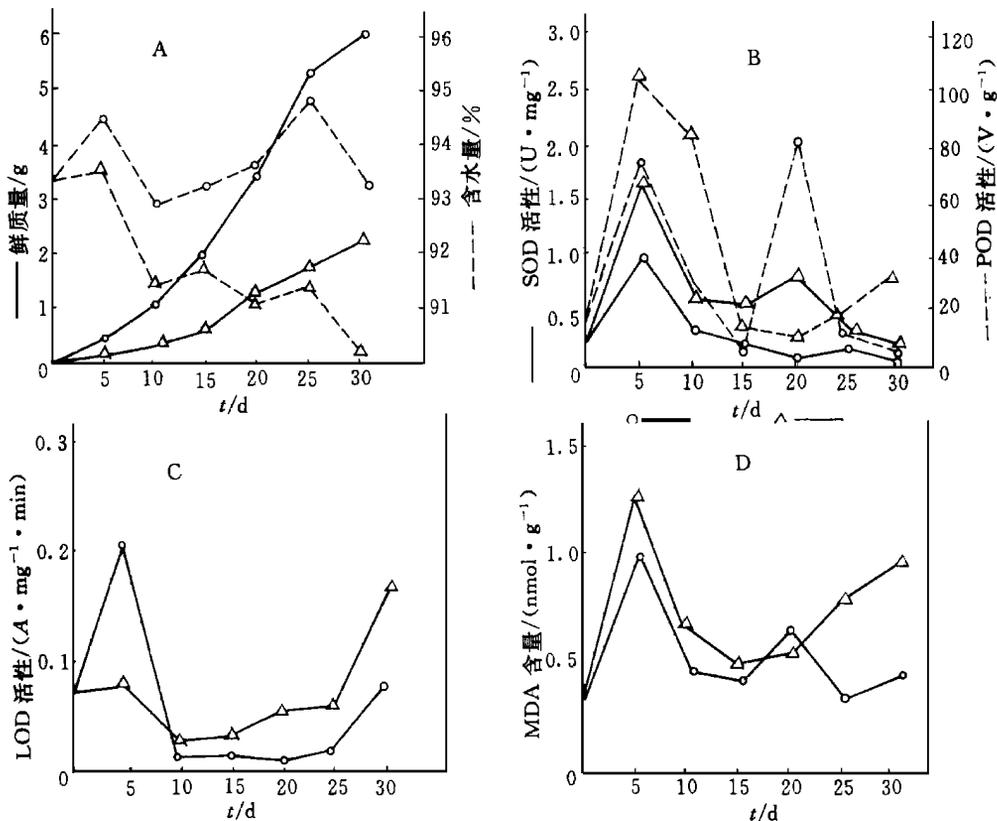


图 1 NaCl 对小麦愈伤组织生长过程的影响

A. 对生长和含水量的影响; B. 对 POD 和 SOD 活性的影响; C. 对 LOX 活性的影响; D. 对 MDA 含量的影响

— — — CK; — — — NaCl

### 3 讨论

植物在盐胁迫下所受到的危害中,脂质过氧化作用是一个重要的方面。其破坏了内膜系统完整性,使其通透性变大,并破坏了许多细胞器功能,如线粒体呼吸作用和叶绿体的光合作用,同时膜脂过氧化中间产物(自由基)和最终产物(MDA)还可引起蛋白质变性,丙二醛作为脂质过氧化水平的指标已为人们所接受,脂质过氧化作用愈强,丙二醛含量愈高<sup>[9]</sup>。在轻度盐胁迫下,脂质过氧化可以被保护酶防御系统抑制,表现为丙二醛含量下降,随着胁迫强度加深,丙二醛含量升高,膜脂过氧化作用加剧,组织含水量继续降低,膜损伤成为不可逆性。

SOD 是生物体内清除自由基的重要酶,其生理功能主要是清除超氧自由基。在植物正常生长情况下,SOD 活性一般很低,当处于各种逆境条件下,SOD 活性升高,抗逆力增强。在盐胁迫下,因代谢失调而积累活性氧会引起自由基伤害,SOD 的活性也升高。在一定范围内,随着盐浓度增加 SOD 活性也升高,但高浓度盐亦可产生离子毒害,降低 SOD 活性。高的盐浓度可通过除去其活性中心的一半金属离子而使其失活,其酶活性可通过加

入  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  离子再恢复, 因而说盐胁迫特别是高浓度对 SOD 存在着离子毒害作用<sup>[2]</sup>。因此利用 SOD 活性作为衡量抗盐性指标必须限定在一定范围内, 本试验证明不仅高盐浓度能降低 SOD 活性, 胁迫程度的增加同样可以降低 SOD 活性, 不同胁迫强度对 SOD 活性影响不同。

POD 是植物体普遍存在的重要酶之一, 参与多种生理代谢。具有催化多种细胞壁的结构成分的合成、控制细胞的生长发育、清除活性氧等作用<sup>[10]</sup>。POD 是对各种逆境变化较为敏感的酶, 同 SOD 相似水分胁迫可引起其活性上升; 随盐浓度增加活性升高, 亦有新同工酶带出现<sup>[11]</sup>。本试验结果表明, POD 在不同的生长阶段具有不同的生理功能, 在生长旺盛期较高的 POD 活性与新细胞壁迅速合成有关, 盐胁迫下活性升高是执行清除活性氧的生理功能, 后期随着胁迫强度加深, 则作为一种分解酶, 促进细胞分解衰老。

脂质过氧化实质是自由基和 LOX 等物质氧化不饱和脂肪酸的过程, LOX 的初级产物可与溶液中的氧形成氢过氧羟基自由基, LOX 的另外一个反应可能是参与单线态氧形成。除了 LOX 的加氧作用外, LOX 还有类胡萝卜素氧化酶功能, 即次级催化功能。它以初级产物为催化底物, 形成二聚体和氧化二烯酸等次级产物。LOX 研究虽然很多, 但由于 LOX 作用的复杂性, LOX 生理功能并不十分清楚。其主要功能可能是参与植物的生长发育、植物衰老、脂质过氧化作用以及愈伤反应和其他胁迫反应<sup>[12]</sup>。尽管关于 LOX 与膜脂过氧化作用关系尚有争议, 但试验结果表明, 在轻度盐胁迫下, LOX 活性比对照降低; 随着胁迫强度加深, 丙二醛含量升高, 膜脂过氧化作用加大, LOX 活性升高, 该活性在一定程度上反映了胁迫强度。

### 参 考 文 献

- 1 陈受宜, 朱立煌, 洪 建, 等. 水稻抗盐突变体的分子生物学鉴定. 植物学报, 1991, 33: 569
- 2 李长润, 刘友良. 小麦耐盐性及抗盐机理探讨. 江苏农业科学, 1993, 9(1): 8 ~ 12
- 3 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72: 248
- 4 Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide simutase: I occurrence in high plants. Plant Physiol, 1977, 59: 30
- 5 郭蔼光, 王振镒. 邻苯三酚自氧化—化学发光法. 植物生理学通讯, 1989(3): 54 ~ 57
- 6 Knneht Surry. Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. Plant Physiol, 1964, 38: 65 ~ 76
- 7 Cakmak I, Horst W J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dimutase, catalase and peroxidase activity in root tips of soybean. Plant Physiol, 1991, 38: 65 ~ 76
- 8 Dix P J. The use of tissue culture for investigating the physiology of salt stress plant cell culture in relation to biotechnology. Public Royal Irish Academy, 1983. 95 ~ 104
- 9 陈少裕. 膜脂过氧化对植物细胞的毒害. 植物生理学通讯, 1991(2): 84
- 10 Sore K B. Peroxidase. Plant Mol Boil, 1992, 16: 317 ~ 327
- 11 陆 卫, 贾敬芬. 盐胁迫下外源 ABA 对谷子耐盐愈伤组织生理生化特性的影响. 植物生理学报, 1997, 23: 61 ~ 67
- 12 James N S. Plant lipoygenase structure and function. Ann Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol, 1991, 42: 145 ~ 188

# Effect of NaCl on Physiological and Biochemical Characteristics of Wheat Callus

Yang Suxin<sup>1</sup> Wang Zhenyi<sup>2</sup>

(1 Department of Biology, Shaanxi Teacher's University, Xi'an, Shaanxi 710062)

(2 Department of Basic Science, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract** The changes of POD, SOD and LOX of wheat callus (*Triticum aestivum* L.) which grew in medium containing 1000 ppm NaCl has been studied. The results showed that NaCl inhibited the growth of wheat callus, decreased the tissue water content and soluble protein content, increased the activity of SOD, POD with an increase of salt stress, and made the amount of lipid peroxidation greater, the activity of LOX and POD higher, but caused the activity of SOD to decrease on the contrary.

**Key words** NaCl, cell callus, superoxide dismutase, peroxidase, lipoxygenase, lipid peroxidation

## 西北农业大学 1998 年度科技成果获奖情况(部分)

| 序号 | 获奖项目                      | 授奖部门   | 获奖名称及等级    | 第一完成人 |
|----|---------------------------|--------|------------|-------|
| 1  | 土壤-作物系统水分动力学及农业节水的生物学基础研究 | 教育部    | 部科技进步一等奖   | 康绍忠   |
| 2  | 西农 1376 小麦品种选育            | 陕西省农业厅 | 厅科技进步一等奖   | 王辉    |
| 3  | 旱地水肥交互作用的机理效应及应用          | 陕西省农业厅 | 厅科技进步一等奖   | 李生秀   |
| 4  | 蔬菜硝态氮累积机理及调控机制            | 陕西省农业厅 | 厅科技进步一等奖   | 李生秀   |
| 5  | 西瓜一代杂种的育种方法及应用            | 陕西省农业厅 | 厅科技进步一等奖   | 王鸣    |
| 6  | 陕西省烟草昆虫调查研究               | 陕西省农业厅 | 厅科技进步一等奖   | 袁锋    |
| 7  | CNT 促长剂研制及其提高畜禽生产性能的研究    | 陕西省农业厅 | 厅科技进步一等奖   | 曾林森   |
| 8  | 烘枣、低糖枣脯加工技术研究             | 陕西省教委  | 省教委科技进步一等奖 | 陈锦屏   |
| 9  | 黄土高原渭北生态经济型防护林体系优化模式建设技术  | 陕西省林业厅 | 厅科技进步一等奖   | 薛泉宏   |
| 10 | 苹果机械损伤生物力学特性的研究           | 陕西省农机局 | 局科技进步一等奖   | 李小昱   |
| 11 | 平底抛物线无喉段量水槽试验研究           | 陕西省水利厅 | 厅科技进步一等奖   | 朱凤书   |
| 12 | 异源细胞质小麦新品种西农 88           | 陕西省农业厅 | 厅科技进步二等奖   | 王明岐   |
| 13 | 秦巴山区综合治理开发模式研究            | 陕西省农业厅 | 厅科技进步二等奖   | 孙益知   |
| 14 | 普通小麦多小穗新品种质资源拓建与应用研究      | 陕西省农业厅 | 厅科技进步二等奖   | 李维平   |
| 15 | 肉奶蛋加工贮藏理论及推广              | 陕西省教委  | 省教委科技进步二等奖 | 蒋爱民   |