

# 单倍性烟草Hyp抗性愈伤组织变异系的选择 及其生理生化特性的研究

## Ⅲ. Hyp抗性变异系在逆境条件下的反应

许 耀

(兰州大学生物系, 兰州)

朱庆麟

(西北农业大学植物组织培养实验室, 咸阳)

在水分胁迫、盐分胁迫、抑制剂胁迫和 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -射线等逆境条件下, 烟草愈伤组织系中的游离脯氨酸含量随着逆境胁迫程度的增加而幅度不同地提高。在一定范围内, 二者之间存在着特定的正相关。在正常条件下积累游离脯氨酸的烟草Hyp抗性愈伤组织变异系 C<sup>-</sup>-2 虽在耐寒能力方面并不比其野生型 C<sup>+</sup> 高, 但对盐分逆境和模拟干旱处理的抗性均是其野生型的两倍多。烟草Hyp抗性愈伤组织变异系在研究抗旱和抗盐中具有潜在的应用价值。

**关键词** 逆境胁迫; 脯氨酸作用; Hyp抗性; 烟草组织培养

选择抗氨基酸或氨基酸类似物的高等植物突变体, 不仅对于改善其营养结构具有广阔的前景, 而且在植物改良中, 对于提高植物的抗性也具有重要的意义<sup>[1]</sup>。例如, 在细胞和原生质体水平上选出的抗蛋氨酸类似物蛋氨酸-亚砷亚胺的烟草突变体能够抗烟草野火病<sup>[2]</sup>。近年来, 关于植物抗逆性与脯氨酸(Pro)关系的研究日益受到重视, 因为在逆境胁迫(尤其是干旱和盐渍)条件下, 许多植物都大量地积累游离Pro<sup>[3,4]</sup>。因此, 不少学者提出将Pro积累水平作为植物在逆境条件下反应的一个生化参数<sup>[5]</sup>, 甚至作为植物抗逆性, 特别是抗旱的生理指标<sup>[6,7]</sup>。但也有人认为这并不是一个有效指标<sup>[8-10]</sup>。究竟Pro的积累是对逆境胁迫的一种适应, 还是由于胁迫的结果, 目前还是一个有争议的问题<sup>[9,11]</sup>。因此,

利用细胞工程技术, 选择在没有胁迫条件下积累Pro含量的突变体, 对于解决这一问题和研究Pro的作用以及提高植物的抗逆性可能是一种有效的途径。

我们以Pro类似物L-羟基脯氨酸(Hyp)为选择压力, 利用多步正筛选系统对 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -射线诱变的单倍性愈伤组织系经过连续八轮的分离与选择, 获得了抗Hyp的烟草愈伤组织变异系C<sup>-</sup>-2、H<sup>-</sup>-4和X<sup>-</sup>-1<sup>[12]</sup>。在正常条件下, Hyp抗性变异系能够特异性地积累游离Pro<sup>[13]</sup>。由于逆境胁迫与游离Pro含量之间存在着密切的关系, 因此本文报道在正常条件下积累游离Pro的烟草Hyp抗性愈伤组织变异系C<sup>-</sup>-2在逆境胁迫中的表现。

本文于1986年12月9日收到。

# 材料和方法

## (一) 材料

建立单倍性体细胞离体无性系的起始材料为普通烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 品种CC77046。本实验以单倍性 CC77046 的Hyp抗性愈伤组织变异系 C<sup>-</sup>-2 及其野生型愈伤组织系 C<sup>v</sup> 为材料进行逆境鉴定。培养条件同前<sup>[12]</sup>。

## (二) 游离Pro测定

愈伤组织内的游离Pro含量用酸性茚三酮比色法<sup>[13,14]</sup>测定。每处理重复两次。

## (三) 逆境处理

1. 水分胁迫 (即模拟干旱处理) : 用制备培养基时无琼脂培养液的渗透势 (-巴) 的高低表示。根据甘露醇在培养液中的浓度 (M) 和培养液渗透势 (-巴) 的标准曲线来配制不同渗透势的培养液。

2. 盐分胁迫: 用培养基中含 NaCl 的多少来表示盐分胁迫的程度。

3. 冷处理: 当愈伤组织系转到新鲜继代培养基上培养5天后, 将培养瓶置于普通冰箱的结冰室 (约 0—1℃) 内进行冷处理。其程度用在冰箱内持久的天数来表示。处理结束后, 取出培养瓶继续培养 (条件同未经冷处理的对照)。至接种日起, 培养一月后进行分析。

4. γ-射线处理: 方法同前<sup>[12]</sup>。

各逆境处理重复 2—6 次。每重复接 10—15 块培养物。

## (四) 统计分析

根据多项式回归分析原理, 利用 Apple II 计算机建立逆境胁迫 (X) 和烟草愈伤组织内游离Pro含量 (Y) 的关系。

# 结果与讨论

## (一) 在逆境条件下烟草愈伤组织系

## 内游离脯氨酸含量的变化

为了研究烟草愈伤组织系在逆境胁迫条件下游离Pro的变化规律, 设置了4种逆境胁迫环境, 即水分胁迫、盐分胁迫、抑制剂 (Hyp) 胁迫和 <sup>60</sup>Co γ-射线处理。每一逆境又设置了5个处理水平。当继代培养的烟草愈伤组织系在新鲜培养基上生长14天时, 转入到逆境处理培养基上。培养7—30天 (水分胁迫7天、盐分胁迫14天、抑制剂胁迫14天、辐射处理后30天) 时, 分析愈伤组织内的游离Pro含量。

逆境胁迫与烟草愈伤组织系内游离Pro含量之间的多项式回归曲线如图1所示。

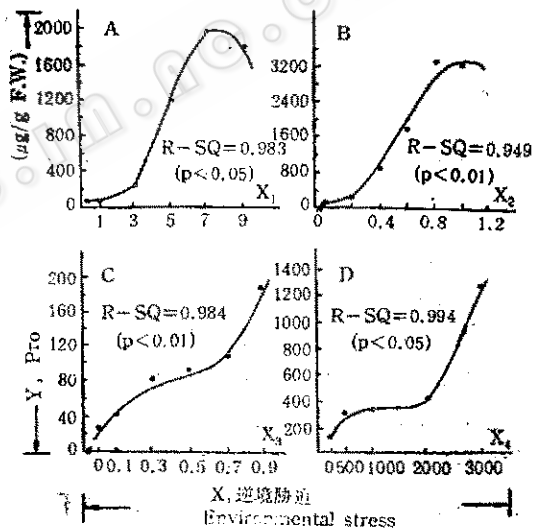


图1 逆境胁迫与烟草愈伤组织内游离脯氨酸含量的关系\*

Fig.1 Relation between environmental stress and free pro content in callus cultures of tobacco A. 水分胁迫 Water stress B. 盐分胁迫 Salt stress, C. 抑制剂胁迫 Inhibitor (Hyp) stress D. γ-射线胁迫 γ-ray stress X<sub>1</sub>. 无琼脂培养液渗透势 (-巴) Osmotic potential of agar-free medium solution (-bar) X<sub>2</sub>. NaCl浓度 concentration (%) X<sub>3</sub>. Hyp浓度 concentration (mM) X<sub>4</sub>. <sup>60</sup>Co γ-射线剂量 γ-ray dosage (R)

\* 图中虚线部分为非回归轨迹 The dotted lines are nonregression loci

R-SQ为可决系数 R-SQ is coefficient of determination

在各种逆境条件下, 烟草单倍性愈伤组织内游离 Pro 含量均有不同程度的积累。在一定范围内, 游离 Pro 含量随着逆境胁迫程度的增加而程度不同地提高, 二者之间呈现出特定的正相关。特别是在盐分胁迫和水分胁迫条件下, 愈伤组织内游离 Pro 含量具有较大幅度的提高。在无琼脂培养液渗透势降为 -7 巴的条件下, 愈伤组织内的游离 Pro 含量达最高值。但当渗透势降为 -9 巴时, 游离 Pro 含量却稍有降低。在盐分胁迫的试验中, 使愈伤组织内游离 Pro 含量达最大值的 NaCl 浓度为 0.8%。同样, 在抑制剂胁迫和辐射处理的试验中, 愈伤组织内的游离 Pro 含量也是随着 Hyp 浓度的提高和  $\gamma$ -射线剂量的增大而提高。但 Pro 的增加幅度远不如前二者。

在通常情况下, 植物体内游离 Pro 的含量很低, 占总游离氨基酸的比例较小。但在受到不同环境胁迫 (如旱、热、冷、冻、盐渍、微生物感染以及大气污染物等) 条件时, 大多数植物体内的游离 Pro 含量都表现出异常地增加<sup>[3,4]</sup>。在烟草单倍性愈伤组织系中, 不仅在水分胁迫、盐分胁迫和抑制剂胁迫条件下观察到这一现象, 而且还在  $\gamma$ -射线辐射条件下也观察到类似的现象 (图 1)。因此, Pro 的积累水平可以作为植物在逆境条件下反应的一个生化参数。由于逆境胁迫与游离 Pro 含量之间存在着密切的关系, 所以在正常条件下能够积累游离 Pro 的突变体就可能具有抵抗逆境胁迫的特性。为此, 需要鉴定在正常条件下积累游离 Pro 的烟草 Hyp 抗性愈伤组织变异系在逆境胁迫中的表现。

## (二) 模拟的干旱条件对 Hyp 抗性变异系及其野生型愈伤组织系生长的影响

在无选择压力条件下连续继代培养的 Hyp 抗性变异系 C<sup>r</sup>-2 及其相应转代培养的野生型 C<sup>w</sup> 愈伤组织在模拟干旱处理培养

基上连续培养一月后, 分析二者之间生长

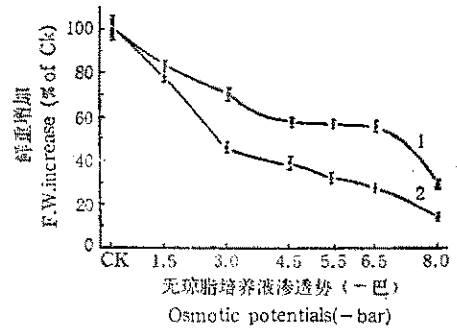


图 2 连续干旱处理对 Hyp 抗性变异系 C<sup>r</sup>-2 及其野生型 C<sup>w</sup> 愈伤组织生长的影响  
Fig. 2 Effect of water stress on fresh weight of callus cultures of Hyp-resistant varian C<sup>r</sup>-2 and its wild type C<sup>w</sup> 1, C<sup>r</sup>-2 2, C<sup>w</sup>

的差异。图 2 的结果表明, C<sup>w</sup> 的生长在干旱处理条件下受到了严重的抑制。虽然 C<sup>r</sup>-2 的生长也受到了一定程度的抑制, 但抑制程度比 C<sup>w</sup> 要轻得多。使生长抑制 50% 的无琼脂培养液渗透势, Hyp 抗性变异系 C<sup>r</sup>-2 比其野生型 C<sup>w</sup> 低 1.2 倍。从这个角度讲, 前者的抗旱性是后者的两倍多。

## (三) Hyp 抗性愈伤组织变异系与野生型之间耐寒性的比较

早在 50 年代, 就有研究结果表明, 在冷锻炼植物中有游离脯氨酸的累积<sup>[31]</sup>。但是, Yelenosky 指出, 在柑桔属树中 Pro 累积与抗冷性无关<sup>[15]</sup>。为了鉴定积累游离 Pro 的烟草 Hyp 抗性变异系愈伤组织的耐寒性, 在不同冷处理条件下比较了 C<sup>r</sup>-2 和 C<sup>w</sup> 对低温反应的差异。在冷处理条件下, C<sup>r</sup>-2 和 C<sup>w</sup> 的生长均受到了一定程度的抑制。但抑制的幅度都不大, 二者颇为相似 (表 1)。在冷处理天数少于 4 天的各处理条件下, C<sup>r</sup>-2 愈伤组织系的耐寒性稍高于 C<sup>w</sup>。但在 4 天以后的各处理条件下, C<sup>r</sup>-2 的耐寒性不但没有高出 C<sup>w</sup>, 反而还低于 C<sup>w</sup> 的耐寒性。因此看来, Hyp 抗性变异系 C<sup>r</sup>-2 的愈伤组织系并不比其野生型愈伤组织系具有较强的耐寒性。

表 1 Hyp抗性愈伤组织变异系 C<sup>r</sup>-2 与其野生型 C<sup>w</sup> 之间耐寒性的比较

Table 1 Comparison of cold endurance of callus cultures between Hyp-resistant variant C<sup>r</sup>-2 and its wild type C<sup>w</sup>

冷处理天数 Days of cold treatment	平均鲜重 (mg/块) F.W. (mg) per piece		鲜重为 (Ck) 的 % % of control (F.W.)	
	C <sup>w</sup>	C <sup>r</sup> -2	C <sup>w</sup>	C <sup>r</sup> -2
0 (Ck)	134.7 ± 6.0	110.0 ± 6.0	100 ± 4.5	100 ± 5.5
1	113.0 ± 1.4	102.0 ± 4.2	83.9 ± 1.0	92.7 ± 3.8
2	117.5 ± 10.6	99.5 ± 2.1	87.2 ± 7.9	90.5 ± 1.9
3	98.5 ± 3.5	89.0 ± 5.7	73.1 ± 2.8	80.9 ± 5.2
5	94.0 ± 4.2	68.5 ± 2.1	69.8 ± 3.1	62.3 ± 1.9
7	71.5 ± 2.1	56.6 ± 7.1	53.1 ± 1.6	50.9 ± 6.5
10	72.5 ± 2.1	54.0 ± 5.7	53.8 ± 1.6	49.1 ± 5.2

#### (四) Hyp 抗性愈伤组织变异系对盐逆境反应

利用细胞工程技术, 创造在无胁迫条件下具高Pro含量的突变体, 对于鉴定Pro在植物受逆境胁迫下的作用、评价植物体内Pro代谢与其抗逆性的关系以及探讨逆境条件下植物自动调节的机制等方面均具有重要的意义。例如, Csonka<sup>[16]</sup>用脯氨酸类似物铃兰氨酸 (AZC) 筛选出的积累Pro的鼠伤寒沙门氏菌突变种比其亲本耐盐能力高。并且, 通过质粒可将抗盐性及Pro积累特性传递给其他野生型细菌。Kueh等<sup>[17]</sup>报道的积累Pro的大麦抗性突变体能够忍受低浓度的盐分胁迫。为鉴定烟草Hyp抗性愈伤组织变异系对盐分逆境

的反应, 将C<sup>r</sup>-2及C<sup>w</sup>的愈伤组织系分别接入盐分梯度浓度培养基上进行培养。一月后, 生长在含NaCl 2.0%培养基上的C<sup>w</sup>因盐害而全部死亡。但生长在同样盐分浓度处理条件下的C<sup>r</sup>-2的生长量还占其对照(不含NaCl)生长量的31.18% (图3)。使生长受到50%抑制的NaCl浓度, 变异系C<sup>r</sup>-2是野生型C<sup>w</sup>的2.2倍。

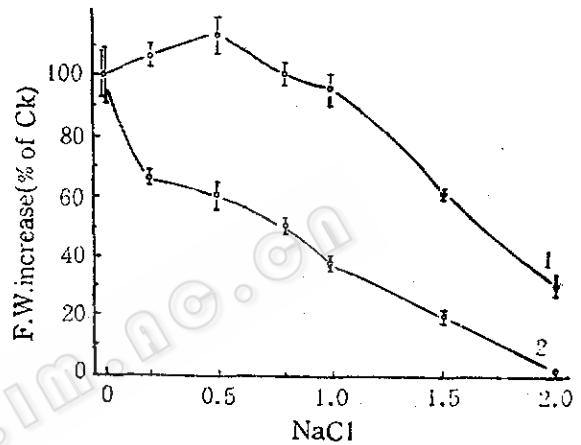


图 3 在盐分梯度培养基上Hyp抗性变异系及其野生型愈伤组织的生长  
Fig.3 Growth of callus cultures of Hyp-resistant variant and its wild type on a range of concentrations of NaCl 1. C<sup>r</sup>-2, 2. C<sup>w</sup>

在水分胁迫和盐分胁迫条件下, Hyp抗性变异系抗性的提高与其愈伤组织内游离Pro含量的提高有关。因此, 所获得的Hyp抗性变异系在研究抗旱和抗盐中具有潜在的应用价值。

#### 参 考 文 献

- [1] 许耀, 植物学通报, (印刷中), 1987.
- [2] Carlson, P.S., *Science*, 180:1366—1368, 1973.
- [3] 汤章城, 植物生理学通讯, 4:15—21, 1984.
- [4] Chandler, S.F. and Thorpe, T.A.: *Biotech. Adv.* 4:117—135, 1986.
- [5] 汤章城等, 植物生物学报, 10(1):37—45, 1984.
- [6] Singh, T.N. et al.: *Nature New Biol.*, 236:188—190, 1972.
- [7] Singh, T.N. et al.: *Aust. J. Biol. Sci.*, 26:65—76, 1973.
- [8] Hanson, A.D. et al.: *Crop Sci.*, 17:720—726, 1977.
- [9] Hanson, A.D. et al.: *Crop Sci.*, 19:489—493, 1979.
- [10] Ilahi, I. and Dorffling, K.: *Physiol. Plant*, 55:129—135, 1982.
- [11] Stewart, C.R. and Hanson, A.D.: *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*,

N. C. Turner *et al.* eds., John Wiley and Sons, New York, 1980, pp. 173—189.

[12] 许耀、朱庆麟：生物工程学报，2(4):35—42，1986。

[13] 许耀、朱庆麟：生物工程学报，3(2):137—145，1987。

[14] 朱广康等：植物生理学通讯，1:35—37，1983。

[15] Yelenosky, G.: *Plant Physiol.*, 64:425—427, 1979.

[16] Csonka, L.N.: *Mol. Gen. Genet.*, 182:82—86, 1981.

[17] Kueh, J. S. H. and Bright, S.W. J.: *Plant Sci. Lett.*, 27:233—241, 1982.

## SELECTION OF HYDROXY-L-PROLINE-RESISTANT VARIANTS OF TOBACCO FROM CULTURED HAPLOID CALLUS AND STUDIES ON THEIR PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS

### Ⅱ. RESPONSE OF THE HYP-RESISTANT VARIANT TO ENVIRONMENTAL STRESS

Xu Yao

(Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou)

Zhu Qinglin

(Laboratory of Plant Tissue Culture, Northwestern University of Agriculture, Xianyang)

A variant line resistant to hydroxy-L-proline (Hyp) of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. CC77046), denoted as C<sup>r</sup>-2, has been selected from haploid callus cultures by the multi-step direct selection system after  $\gamma$ -ray irradiations. In this paper, experiments are described which examine the response of Hyp-resistant variant C<sup>r</sup>-2 to environmental stress.

Under environmental stress, especially water and salt stress, the haploid callus cultures of tobacco could accumulate free proline to a considerable extent, which was directly correlated with the stress degree within a certain range. Therefore, the Hyp-resistant variant, which accumulated free proline under normal conditions, might be stress-resistant. Although the cold endurance of C<sup>r</sup>-2 callus cultures was not higher than that of wild type C<sup>w</sup>, the callus cultures of variant were more than twice as resistant to water- and salt-stress as those of wild type. This improvement of the stress resistance might be correlated with an increased free proline in the callus cultures of C<sup>r</sup>-2. It is apparent that the Hyp-resistant variant selected in this experiment has an important value to use for studying the role of proline in the stressed plants and improving the drought- or/and salt-resistance of plants.

#### Key words

Environmental stress; proline role; Hyp resistance; tissue culture