中 国 科 学 (B 辑)
第 24 卷 第 2 期 SCIENCE IN CHINA (Series B) 1994 年 2 月

缺铁条件下苹果砧木愈伤组织的特异反应及多肽分析*

卞学瑜** 李港丽 苏润宇 陈正华
(北京农业大学园艺系，北京 100094) (中国科学院遗传研究所，北京 100101)

摘 要

以苹果属砧木种对缺铁敏感的山定子(*Malus baccata* (L.) Borkh.)和对缺铁耐受的西府海棠(*Malus micromalus* Makino)为材料，用无菌苗茎段建立了可继代培养的愈伤组织试验体系．比较了两种愈伤组织在不同铁营养条件下其生理与生化的变化．山定子愈伤组织在铁逆境下，其干重和鲜重显著增加，P, S, Mg, K, Zn, B 等元素含量也均有所增加，三价铁还原能力未发生变化，细胞的超微结构遭到一定损伤，并在加重碳酸根离子(HCO_3^-)的缺铁逆境下合成了一种 25 kD 的多肽．相反，西府海棠愈伤组织在缺铁条件下，干重和鲜重未发生显著变化，P 和 S 元素含量显著降低，三价铁还原能力增加，并形成了传递细胞，在低铁和低铁加重碳酸根离子逆境下，合成了 25 kD, 34 kD 和 100 kD 的多肽．以上结果表明，对缺铁敏感的山定子和对缺铁耐受的西府海棠对缺铁营养逆境的反应不同，这是由其不同的遗传基础决定的．本结果为今后培育耐缺铁新类型提供了理论依据．

关键词 苹果砧木、愈伤组织、缺铁营养逆境、多肽分析

苹果是我国北方重要的果树，但当其栽种于石灰性土壤时，常常出现缺铁失绿的症状，严重地影响着果品的产量及品质[1]．影响土壤中铁的供给因素较多，而石灰性土壤中形成的重碳酸根离子(HCO_3^-)则是诱致果树如苹果、梨、葡萄等，以及玫瑰、大豆等多种作物缺铁失绿最重要的土壤因子[2]．据估计，地球表面约 25—30% 的土壤为石灰性土壤．因此，解决石灰性失绿更具有广泛的意义[2]．

目前从栽培管理上矫正植物缺铁失绿的方法主要有：土施铁肥及有机物，向树体内高压注射铁的化合物，叶面喷施铁肥，改善土壤排水、透气性和调节土壤 pH 值等[2]．这些方法的效果一般不太稳定，而且也不经济．选育适应于石灰性土壤条件的种和品种，是解决植物缺铁失绿症的唯一经济、有效的方法[3]．而对植物吸铁机理的深入了解，是选育耐缺铁营养逆境的种和品种的重要的前提．

1993-08-09 收稿．
* 国家自然科学基金资助项目．
** 现在地址：中国林业科学研究院林业研究所育种二室，北京 100091．

苹果砧木属异花授粉作物，个体之间遗传差异较大，加之有诸多因素影响土壤中铁的供给能力，这些都极大地限制了在常规条件下对苹果砧木吸铁机理的研究．

随着生物技术的发展，组织培养已成为重要的研究手段[4, 5]. Sain 和 Johnson 曾用细胞悬浮系，研究大豆的吸铁机理[6]. 目前在组织培养条件下研究植物缺铁失绿症，虽处在刚刚起步阶段，但同田间条件相比，它却有较明显的优点：在组织培养条件下生长的材料均一程度高，对缺铁营养逆境反应一致，条件易于控制．这些均为吸铁机理的研究提供了便利条件．

本工作选择我国北方苹果生产广泛采用的砧木山定子与西府诲棠为试材，在离体条件下，建立了可以继代培养的愈伤组织试验体系，研究了它们在不同铁营养条件下的生理与生化变化．研究表明：不同种的苹果砧木愈伤组织在缺铁营养逆境下的反应和新合成的多肽是不同的，而这种差异是由其不同的遗传基础造成的．这就为筛选耐缺铁营养逆境的苹果砧木提供了理论基础．用离体培养的材料研究苹果缺铁失绿的机理，至今国内外尚未见报道．

1　材　料　和　方　法

1.1　材料

选用在石灰性土壤条件下对铁营养逆境较敏感的山定子和较不敏感的西府海棠为试材．山定子种子取自山西太谷县，西府海棠种子取自河北怀来县（系华北地区生产上常用的砧木品种“八楞海棠”），将种子层积于 4°C 冰箱中，发芽后播种于湿润、通气良好的蛭石中，待实生苗长到 4—5 片真叶时，切取 0.5 cm 长的茎尖，接种于 MS＋0.5 mg/L BA(6-苄基氨基嘌呤）的培养基中，并继代培养．

1.2　方法

1.2.1　愈伤组织的诱导与继代培养　切取山定子、西府海棠无菌苗的无芽茎段（0.5 cm）接种于诱导愈伤组织培养基上．培养基成分为：MS＋0.2 mg/L KT（激动素）＋0.2 mg/L NAA（萘乙酸）＋1.0 mg/L 2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸）[7]（以下简称 A4 培养基）．以后严格挑选那些生长迅速、淡黄色、较易分散的愈伤组织进行继代培养，继代培养基亦为 A4 培养基．

1.2.2　缺铁营养逆境的设置　本试验设置了以下 3 种不同铁营养条件的处理：处理 1（正常铁含量）：A4＋5.6 mg/L Fe^{2+}EDTA，处理 2（低铁含量）：A4＋0.056 mg/L Fe^{3+}EDTA，处理 3（低铁加碳酸氢钠）：A4＋0.056 mg/L Fe^{3+}EDTA＋122 mg/L $NaHCO_3$.

1.2.3　愈伤组织在缺铁营养逆境下干鲜重和矿质元素含量的测定　将山定子和西府海棠的愈伤组织 2.0 g，接种于上述 3 种培养基中，每处理 5 次重复．生长 25 天后称鲜重，然后在 70—80°C 烘箱中烘 24 h，测定干重．矿质元素的测定按吴金绥等报道的方法进行[8].

1.2.4　愈伤组织三价铁还原能力的测定　将山定子、西府海棠愈伤组织接种于处理 1，2 和 3 的双层培养基中（即下层为固体培养基铺成的平板，上层为液体培养基），培养 6，9 和 12 天，然后进行愈伤组织三价铁还原能力的测定，方法参照 Chaney 等的报道[9].

1.2.5　细胞超微结构的电镜观察　将山定子、西府海棠的愈伤组织接种于处理 1 和 3 的双层培养基中，培养 20 天，然后进行细胞超微结构的电镜观察，电镜样品制作方法参照 Kramer 的报道[10].

1.2.6　缺铁营养逆境下新合成多肽的分析　将山定子和西府海棠继代培养的愈伤组织 200 mg，分别接种于上述 3 种处理双层培养基中，使愈伤组织在上述 3 种铁水平条件下生长 0 h，

6 h, 12 h, 24 h, 2 天和 4 天. 然后将各处理的培养物在与原来相同的铁营养条件下, 用同位素 (^{35}S-Methionine 10 μCi/ml 培养基) 脉冲标记 3 h, 在无同位素的培养基中洗 2 次后, 继续培养 1 h. 电泳方法参照 Granier 的报道[11].

1.2.7 试验结果的统计分析 利用方差分析法分析试验结果, 在 alpha = 5% 水平上按邓肯 (Duncan) 多重比较法进行比较. 各表中在平均值后面标有小写英文字母, 两个平均值所标字母不同时, 表示该两数据间差异显著.

2 结 果

2.1 愈伤组织鲜重、干重和元素含量的变化

山定子和西府海棠愈伤组织在所设置的 3 种不同的铁营养条件下生长25 天后, 其干重和鲜重变化是不同的. 同正常铁条件相比, 在缺铁营养逆境下, 山定子的干重、鲜重均显著增加; 而西府海棠的干重、鲜重均无明显增加 (表 1).

表 1 不同铁营养条件对山定子和西府海棠愈伤组织干重和鲜重的影响 (g)[a)]

种 / 指标 / 处理	山定子		西府海棠	
	干重	鲜重	干重	鲜重
正常铁含量	0.21 a	5.52 a	0.30 a	8.84 a
低铁含量	0.28 b	6.98 b	0.25 a	7.07 a
低铁加 $NaHCO_3$	0.27 b	6.39 b	0.26 a	8.37 a

a) 两个平均值后所标字母不同时, 表示该二数据在 α=5% 水平上差异显著, 以下各表同.

山定子和西府海棠愈伤组织元素含量变化同其干重、鲜重变化有相同的趋势. 同正常铁条件相比, 山定子愈伤组织中元素 P, S, Mg, K, Zn, B 等的含量在缺铁逆境下显著增加, 元素 Mn 和 Na 的含量只有在加 $NaHCO_3$ 的处理中显著增加, 而元素 Ca, Cu 和 Co 的含量不受铁营养条件的影响. 同正常铁条件相比, 西府海棠愈伤组织在缺铁条件下, 其元素 P 和 S 含量显著降低, 元素 B 的含量只在加 $NaHCO_3$ 的处理中显著降低, 其它元素不受铁逆境的影响. 而两个种中 Fe 元素的含量则呈相同的变化趋势: 在正常铁条件下含量最高, 在低铁条件下次之, 加 $NaHCO_3$ 的处理中含量最低, 但山定子的低铁和低铁加 $NaHCO_3$ 两个处理的铁含量差异不显著.

表 2 不同铁营养条件对山定子和西府海棠愈伤组织元素含量的影响

种 / 元素 / 处理		P	K	Ca	Mg	S	Fe	Zn	B	Mn	Cu	Al	Co	Mo	Na
		(%)					(mg/kg)								
山定子	1	0.40 b	2.80 b	0.59 a	0.18 b	0.24 b	289.0 a	30.3 d	33,8 b	137.2 b	10.6 b	420.5 a	0.8 a	9.4 a	670.9 b
	2	0.40 b	3.16 a	0.64 a	0.20 a	0.28 a	157.9 b	32.7 c	40.1 a	128.0 b	7.8 a	745.5 a	0.8 a	3.9 a	926.5 b
	3	0.45 a	3.20 a	0.60 a	0.22 a	0.29 a	139.1 b	35.0 b	37.3 a	176.3 a	8.5 a	505.0 b	0.8 a	6.1 a	2865.2 a
西府海棠	1	0.44 a	5.40 a	0.86 a	0.32 a	0.40 a	328.1 a	36.9 a	49.6 a	312.7 a	7.3 a	395.1 a	1.1 a	7.1 a	791.9 b
	2	0.38 b	4.68 a	0.84 a	0.31 a	0.32 b	223.4 b	39.4 a	45.3 ab	293.3 a	8.6 a	379.9 a	0.4 a	6.4 a	766.5 b
	3	0.36 b	5.08 a	0.71 a	0.27 a	0.31 b	153.5 c	33.7 a	42.1 b	271.7 a	7.8 a	502.1 a	0.7 a	6.3 a	3525.1 a

2.2　铁营养逆境下山定子和西府海棠愈伤组织三价铁还原能力的变化

山定子愈伤组织在低铁处理下培养到 12 天时，其三价铁还原能力略有增加；而在低铁加 $NaHCO_3$ 处理下培养到 9 天、12 天时，其三价铁还原能力未发生明显变化(表 3)．西府海棠愈伤组织在低铁处理下培养到 9 天时，其三价铁还原能力明显增加；在低铁加 $NaHCO_3$ 处理下培养到 9 天、12 天时，其三价铁还原能力均显著增加(表 4)．这表明，西府海棠愈伤组织在缺铁条件下，能够产生铁营养逆境反应，而山定子却不能．

表 3　山定子愈伤组织在不同铁营养条件下经不同培养天数后其三价铁还原能力的变化[a)]

铁营养处理 \ 培养天数	6 天	9 天	12 天
正常铁含量	0.073 a	0.060 a	0.063 a
低铁含量	0.033 b	0.033 b	0.051 a
低铁加 $NaHCO_3$	0.033 a	0.036 a	0.039 a

a) 单位：1.0×10^{-6} Fe^{2+}/g 鲜重/h.

表 4　西府海棠愈伤组织在不同铁营养条件下经不同培养天数后其三价铁还原能力的变化[a)]

铁营养处理 \ 培养天数	6 天	9 天	12 天
正常铁含量	0.062 a	0.071 a	0.076 a
低铁含量	0.022 b	0.072 a	0.068 a
低铁加 $NaHCO_3$	0.032 c	0.046 b	0.072 a

a) 单位同表 3 注．

2.3 铁营养逆境下山定子和西府海棠愈伤组织细胞超微结构的变化

山定子愈伤组织细胞的超微结构在缺铁逆境(0.056 mg/L Fe^{3+}EDTA+$NaHCO_3$)下，细胞不能发生适应性变化，与正常铁含量下培养的细胞(图 1(a))相比，缺铁逆境下的细胞超微结构

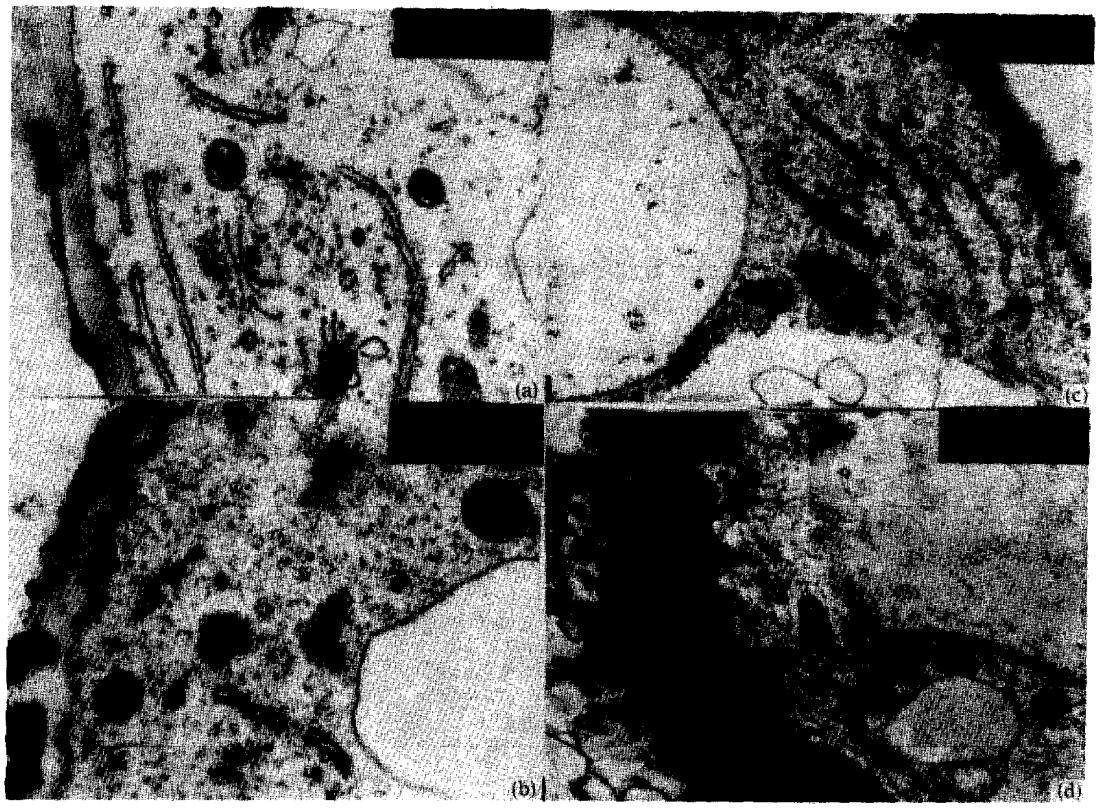

图 1　不同铁营养条件对山定子和西府海棠愈伤组织细胞超微结构的影响
(a)山定子(处理 1)，(b)山定子(处理 3)，(c)西府海棠(处理 1)，(d)西府海棠(处理 3)

显示出降解的特征(图 1(b)).而西府海棠愈伤组织细胞的超微结构在铁营养逆境下发生了明显的适应性.与正常铁含量下培养的细胞(图 1(c))相比,缺铁逆境下细胞膜明显向内曲折,线粒体在细胞膜附近积累.这是典型的传递细胞的特征(图 1(a)).

2.4 铁营养逆境下山定子和西府海棠愈伤组织合成的特异多肽

蛋白质凝胶电泳放射自显影图谱表明:同正常铁条件相比,山定子在缺铁营养逆境下生长两天后,只出现一条 25kD 的多肽特异带;而西府海棠愈伤组织在缺铁营养逆境下生长两天后,除出现 25kD 的多肽特异带外,还出现了 34kD 和 100kD 的多肽特异带(图 2).

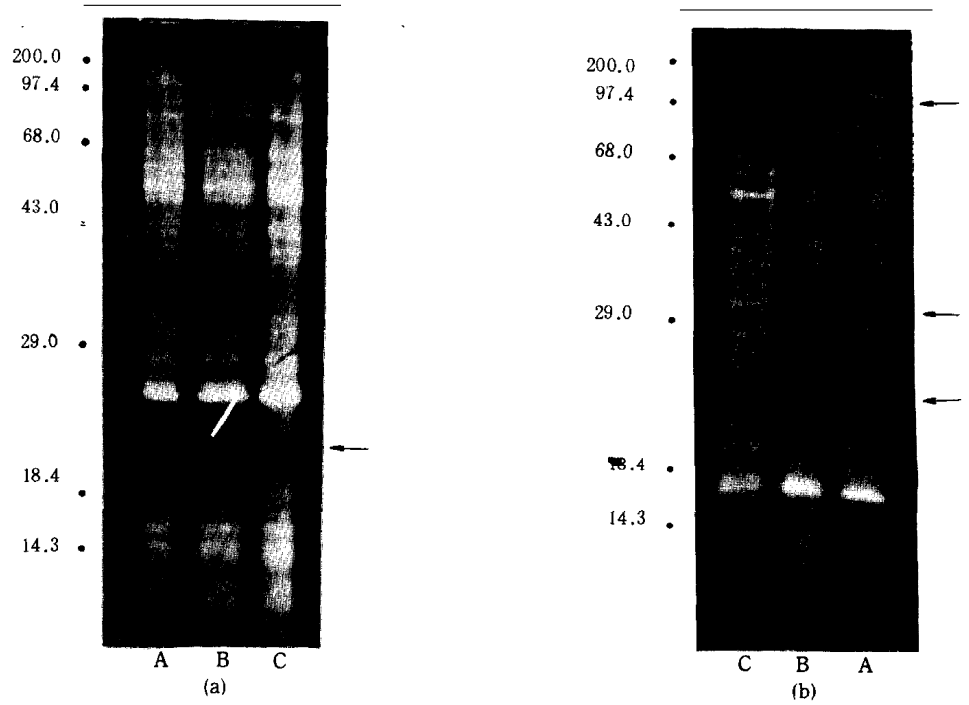

图 2 山定子(a)和西府海棠(b)愈伤组织在 3 种铁营养处理条件下培养 48 h 后,新合成蛋白质 SDS-PAGE 放射自显影图谱

A —— 正常铁处理,B —— 低铁处理,C —— 低铁加碳酸氢钠处理,'← '号所示为铁营养逆境下合成的特异多肽

3 讨 论

3.1 缺铁营养逆境下山定子、西府海棠愈伤组织超微结构及代谢变化

西府海棠愈伤组织在缺铁营养逆境下三价铁的还原能力增强的同时,形成向内曲折的细胞膜,这是典型的传递细胞的特征,且与三价铁还原能力的增加和ATP 酶质子泵的分泌作用同时发生,一般认为这是铁高效基因型植物在铁营养逆境下的特异反应之一[12]. 可以认为:西府海棠愈伤组织,在缺铁营养逆境下,能够产生缺铁营养逆境特异反应. 而山定子愈伤组织细胞膜向内曲折不明显,三价铁还原力变化也不显著. 上述西府海棠和山定子愈伤组织在缺铁逆境下的变化与其实生苗在液培条件下的反应一致[13].

在缺铁逆境下,西府海棠愈伤组织超微结构的另一特点是:大量线粒体在细胞膜附近积累,而且所有可见的淀粉粒都消失了. 这表明它有较强的呼吸作用[12]. 苹果实生苗在缺铁营养逆境下,整个植株中糖的含量下降,而琥珀酸、苹果酸和柠檬酸含量增加[13]. 糖经 PEP 途径

降解过程中形成的 H^+，可由 ATP 酶质子泵分泌到细胞外，以酸化环境；水解过程中形成的异柠檬酸可以还原 $NADP^+$，以形成 NADPH，为 Fe^{3+} 的还原提供电子[14]. 由此可以认为：在缺铁营养逆境下，西府海棠愈伤组织有较强的代谢活动，细胞内大量碳水化合物降解，造成干重下降；合成大量 ATP 和 NADPH 使细胞内 P,S,B 等元素含量下降.

在缺铁营养逆境下，山定子愈伤组织细胞膜向内曲折不明显，细胞膜周围积累的线粒体较少，因此可以认为：在缺铁营养逆境下，山定子愈伤组织不能够产生铁营养逆境特异反应（这与它在田间及液培条件下的反应一致），因而造成愈伤组织缺铁，使细胞内某些代谢活动受阻. 由于组织培养条件下，培养基中糖及必需元素的含量丰富，可能造成细胞的畸形生长，形成干物质积累，P,S,Mg,Ca,Zn 等元素含量升高.

3.2 植物在缺铁营养逆境下特异反应的分子生物学基础

西府海棠愈伤组织在缺铁营养逆境生长两天后，合成了分子量为 100kD 的多肽，有报道证明 ATP 酶质子泵是一条单链多肽，且其分子量约为 100kD，因此可以推测，此多肽为 ATP 酶质子泵，可分泌质子，酸化细胞周围环境，提供三价铁还原酶所适宜的 pH 值[15]. 山定子和西府海棠在缺铁营养条件下都合成了 25kD 的多肽，且它们在缺铁条件下又都表现出一定的三价铁还原能力，由此可推测 25kD 的多肽可能与三价铁还原酶有关，这与 Arulanantham 的报道是一致的[16]. 而西府海棠所合成的 34kD 多肽是否与向细胞内转运二价铁离子的载体蛋白有关尚需进一步探索.

本试验结果证明了 Bienfait 提出的铁高效反应调控假说. 他认为在细胞内存在着某种铁信号蛋白，能特异地与二价铁离子结合，不显活性；当细胞内二价铁离子浓度降低到一定程度时，细胞内便有大量游离的信号蛋白，此时它显出活性，可以启动三价铁还原酶及 ATP 酶质子泵的基因，合成三价铁还原酶及 ATP 酶质子泵，产生铁高效反应[14]. 西府海棠的愈伤组织一直在含有 Fe^{2+}EDTA 的培养基上生长，因而，细胞内含有较高浓度的二价铁离子，在接到铁逆境培养基上后，细胞内二价铁离子浓度不会立刻降低，所以，西府海棠愈伤组织在铁逆境下生长两天后才合成特异多肽. 但是否存在有信号蛋白尚需进一步的深入研究.

3.3 组织培养技术在吸铁机理研究和耐缺铁种质筛选上的应用

Sain 和 Johnson 用细胞悬浮培养体系，研究了铁高效基因型和铁低效基因型大豆吸收铁能力的差异，并获得了能够在低铁条件下生长的细胞系[6]. 本试验成功地研究了苹果砧木愈伤组织在缺铁营养逆境条件下，三价铁还原能力及其细胞超微结构的变化，分析了新合成多肽的差异. 这显示了组织培养手段特有的优点，在离体养条件下，对体细胞无性系进行筛选，试材高度均一，条件易于控制，为吸铁机理的研究提供了便利条件. 另外，可以用筛选到的体细胞无性系，进行继代培养，使之扩增，以便进一步鉴定和推广. 因此，组织培养技术在缺铁失绿症的研究中必将有较广阔的应用前景.

致谢　北京农业大学沈隽先生、张光中、韩振海等老师和中国科学院遗传研究所姚渝光、关月兰、刘桂珍等先生曾给予大力支持和精心指点，在此一并表示深深的谢意.

参　考　文　献

[1]　曾　骧，园艺学报，1964, 3: 237—247.

[2] Korcak, R. F., *Horti. Rev*$_{o}$ 1988, **9**: 133— 184.
[3] Brown, J. C., *Physiol. Plant.*, 1972, **31**: 221— 224.
[4] Carolep, P. M., *Plant Science Letters*, 1977, **12**: 25— 34.
[5] Croughan, T. P., Stavarek, S. J., Rain, D. W., *Crop. Science*, 1978, **18**: 959— 963.
[6] Sain, S. L., Johnson, B. V., *J. Plant Nutr.*, 1986, **9**: 729— 750.
[7] Hurwitx, C. D., Agrios, G. N., *J. Amer. Soc. Horti. Sci.*, 1984, **109**(3): 348— 350.
[8] 吴金绥、杨克琴，北京农业大学学报，1986, **12**: 175— 184.
[9] Cbaney, R. L., *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 1972, **36**: 755— 761.
[10] Kramer, D., Romheld, V., Landsberg E. *et al.*, *Planta*, 1980, **147**: 335— 339.
[11] Granier, F., *Electrophoresis*, 1988, (9): 712— 718.
[12] Landsberg, E. C., *Plant Physiol.*, 1986, **82**: 511— 517.
[13] Sun, X. P, Yang, S. Y., Tong Y. A. *et al.*, *J. Plant Nutr.*, 1987, **10**: 1021— 1030.
[14] Bienfait, H. F., *J. Plant Nutr.*, 1988, **11**: 605— 629.
[15] Romheld, V., Muller C., Marschner, H., *Plant Physiol.*, 1984, **76**: 603— 606.
[16] Arulanantham, A. R., Terry, N., *J. Plant Nutr.*, 1988, **11**: 1127— 1138.