

聚乙二醇在植物渗透胁迫生理研究中的应用

张立军^{1,*} 樊金娟¹ 阮燕晔¹ 关义新²

¹沈阳农业大学生物科学技术学院, 沈阳 110161; ²中国农业科学院作物育种栽培研究所, 北京 100081

Application of Polyethylene Glycol in the Study of Plant Osmotic Stress Physiology

ZHANG Li-Jun^{1,*}, FAN Jin-Juan¹, RUAN Yan-Ye¹, GUAN Yi-Xin²

¹College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161; ²Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081

提要 介绍聚乙二醇(PEG)在调节培养液和固体培养基水势以及在水分胁迫和盐胁迫研究中的应用及应注意的问题, 并介绍 PEG 溶液水势的测定方法和水势计算公式。

关键词 聚乙二醇; 植物; 渗透胁迫; 水势计算

植物在生长发育过程中, 经常会遇到由于干旱和高盐引起的渗透胁迫。受到渗透胁迫的植物脱水, 细胞膨压丧失, 对植物产生许多不利效应: 发育受抑, 生产力降低, 甚至死亡。长期以来, 人们一直想通过揭示渗透胁迫伤害机理, 寻找提高植物抵抗胁迫能力的途径。但在研究过程中常为一些客观因素所困扰: 一是土壤的组分非常复杂, 作为实验系统常难以控制; 二是有时难以将渗透胁迫效应与土壤系统中的其它胁迫效应有效区分开。因此, 在植物渗透胁迫生理研究中, 实验能否在一个稳定而易于控制的模拟系统中进行就显得十分重要。聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)溶液培养则是人们在进行植物渗透胁迫研究中一个常用而比较理想的系统。

1 PEG 的性质

PEG 是乙醇聚合物, 分子式为 $\text{HOCH}_2 - [\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CH}_2]_n - \text{CH}_2\text{OH}$, 分子量有 200~20 000 不等。常见商品的分子量在 200~8 000 之间, pH 5~7, 溶于水, 也溶于大多数有机溶剂。随着分子量的增大, PEG 的物理性质也随之变化, 从无色无味的液体变为蜡状固体。由于 PEG 的性质特殊, 在很多行业中都有广泛的用途。如橡胶、纺织、金属等行业中用作水溶性润滑剂、软化剂、不饱和树脂等。PEG 分子有非离子化的长链, 化学性质不活泼^[1], 对生物的毒性很小, 所以也应用于制药业、化妆品业和医疗中。在生物科学研究中 PEG 也有广泛的应用。例如, PEG 用于介导细胞融合、DNA 转移, 分离生物大分子^[2]和测定生物

大分子的质量^[3], 以及促进种子萌发^[4~6]等。

2 PEG 水分渗透胁迫研究中的应用

在研究植物对干旱和高盐的反应时需要低水势处理。一般的做法是减少土壤或其它固体培养基的水分供应, 但在整个实验期间很难保持水势的恒定和一致。而且有些试验, 例如要求严格控制培养基水势、需要在短时间内使植物体达到较低水势、在实验过程中需要进行放射性标记的实验不适合用固体培养基培养植物, 而用液体培养则较为合适。此外, 在观察渗透胁迫对植物根系生长和形态变化的影响时, 溶液培养也有较大的优势。

2.1 PEG 溶液培养的特点及应用 用溶液培养对植物进行渗透胁迫时, 需要调节培养液的水势。如果单从调节水势的角度考虑, 无机盐、小分子的糖、醇等都可以选用。但对土壤干旱来说, 不仅要使植物的细胞脱水, 而且还要使细胞壁脱水。因此, 模拟土壤干旱的渗透物质, 其分子量要足够大, 才能不透过细胞壁, 产生与土壤干旱相同的脱水效应。如果渗透调节物质透过细胞壁, 甚至透过细胞膜进入细胞内部, 被代谢或产生其它效应, 将会使研究的问题复杂化。Greenway^[7]对液泡化和非液泡化的玉米组织进行渗透胁迫时, 发现复水后液泡化组织的代谢物外渗速率迅速增大, 而非液泡化的组织内含物外渗只

收稿 2003-09-27 修定 2004-02-23

* E-mail: ljzhang@syau.edu.cn, Tel: 024-88443713

有轻微的增加。因此,溶质是否能够透过细胞壁对植物细胞的效应是不同的^[8]。PEG可作为渗透调节物质^[9]。实验表明,分子量在6 000及6 000以上的PEG不能透过细胞壁。当细胞置于低水势溶液中,细胞内水分流出,细胞体积变小,如果溶质的分子量很小,可以透过细胞壁,则会引引起质壁分离(plasmolysis);如果溶质的分子量很大,不能透过细胞壁,水分的移出则会使细胞发生塌陷(cytorrhysis)。Carpita等^[10]用溶质分子量不同的溶液处理活体细胞时发现,甘露醇、PEG2000引起质壁分离,PEG6000引起塌陷,PEG4000既引起质壁分离又导致塌陷。所以,高分子量的PEG是模拟土壤干旱理想的水势调节物质。Rashmi和Agarwal^[11]在实验中还发现,用水势为-1.7和-2.1 MPa的PEG6000(0.27和0.3 g·g⁻¹水)和甘露醇(0.3和0.6 mol·L⁻¹)处理水稻幼苗时,胁迫诱导的脯氨酸含量增加,前者明显大于后者。

有人用PEG产生渗透胁迫处理玉米^[12,13]、水稻^[14]的幼苗时发现,各种植物表现出相同的特征:丙二醛含量增加,叶中相对含水量(RWC)下降,膜透性增高。此外,随着植物抗性生理研究向细胞水平的深入,需要以离体的器官、组织和细胞为试材进行研究。范建民和惠玉琴^[15]以不同苗龄的小麦离体叶片为材料,研究PEG对其衰老的影响时,发现PEG加速小麦衰老。同样,在细胞水平的研究中,PEG也是一种很好的水势调节物质。例如,Bajji和Chaumont^[16]就曾采用离体组织研究渗透胁迫对细胞膜离子通道、水孔蛋白和其它转运蛋白的影响。

近年来,随着分子生物学的发展,PEG渗透胁迫也用来研究基因的表达和调节^[17]问题。在许多植物中,蔗糖合成酶基因的表达受蔗糖所制约。Déjardin等^[18]研究表明,拟南芥的蔗糖合成酶基因(*Sus1*)表达由蔗糖所诱导外,还可以由透过性溶质(山梨醇、甘露醇)和非透过性溶质PEG8000所诱导。因而推断*Sus1*基因可能受渗透势调节,而不是受蔗糖代谢物的调节。

2.2 PEG固体培养的特点及应用 在某些植物渗透胁迫研究中需要在琼脂培养基上培养幼苗或离体组织,并进行渗透胁迫处理。通常的方法是在培养基中加入小分子的糖类、醇类物质或无机盐,如蔗糖、甘露醇、山梨醇等进行渗透胁迫。但这

些物质不适合较长时间的渗透胁迫实验^[19]。PEG可以应用于长时间的植物渗透胁迫实验,但在配制培养基的过程中,如果将PEG直接加入培养基中会干扰琼脂糖凝固,从而限制PEG在固体培养植物的渗透胁迫生理研究中的应用。Linossier等^[20]在研究PEG和脱落酸对橡胶树(*Hevea brasiliensis*)体细胞胚发育的影响时,向培养基中加入75、140和178 g·L⁻¹的PEG3350溶液(其水势分别相当于58、174和290 mmol·L⁻¹的蔗糖溶液),在制备培养基时,将上述浓度浓缩1倍,在120℃下灭菌20 min后,再分别与浓缩1倍的不含激素的MH(Mueller-Hinton)培养基等体积混合,配制时先将PEG溶液倒入到培养基中,然后再使培养基凝固。但应该注意的是,PEG经过高温灭菌后,水势会发生变化,因此实验过程中应考虑到这种变化的影响。van der Weele等^[21]建立了一种简便的方法,即将经无菌过滤的PEG溶液倒在已经凝固的琼脂培养基上,平衡一夜后倒掉PEG溶液,再接种植物材料。此法不仅能够满足实验对于水势的要求,而且对植物没有毒害作用。

3 PEG在研究盐胁迫中水分胁迫的作用

虽然盐胁迫的一个主要效应对植物产生渗透胁迫,其对植物的伤害与土壤干旱有共同的机制,但是盐胁迫还会产生离子毒害等其它效应。无机盐离子分子量小,不仅能透过细胞壁,而且可被细胞所吸收,在细胞内积累将会影响酶和其它蛋白的稳定性。因此,在研究盐胁迫机理时应将盐胁迫的渗透胁迫效应与其它效应区分开。

许多学者用PEG进行研究时,发现植物体在遭遇盐胁迫和渗透胁迫时,在许多反应上有差异。Skrecky^[22]用-1.0 MPa的非透过性溶质PEG8000和透过性溶质氯化钠处理假单胞菌(*Pseudomonas putida*)后置于透射电镜下观察,发现经PEG处理的细胞外膜出现断裂或皱褶,而用氯化钠处理和未经处理的细胞中则没有。Bajji和Chaumont^[16]用29%PEG6000和300 mmol·L⁻¹氯化钠(约-1.5 MPa)胁迫玉米幼苗时发现幼苗鲜重显著降低,PEG处理的降低程度大于氯化钠处理的,而且PEG处理的叶中相对含水量降低,幼苗转移到正常水势培养液中后,相对含水量恢复正常;氯化钠胁迫的叶中相对含水量不降低,但在转移到正常水势溶液中后,相对含水量则降低。

假单胞菌的反式不饱和脂肪酸与顺式不饱和脂肪酸的比值对 PEG8000、PEG200 和氯化钠渗透胁迫呈不同的反应: 在 -0.25 MPa 水势下, PEG200 和氯化钠处理的反式不饱和脂肪酸与顺式不饱和脂肪酸的比值高于 PEG8000 处理的; 水势进一步下降时, PEG8000 才诱导产生大量的反式饱和脂肪酸, 导致其与顺式不饱和脂肪酸的比值上升^[22]。马焕成和王沙生^[23]用等渗透势的氯化钠和 PEG 溶液处理胡杨时发现, 胡杨对渗透胁迫和盐胁迫有不同的响应: 处理 1 d 后, 受 -0.24 MPa 的氯化钠胁迫的胡杨根中 ABA 含量比未经氯化钠胁迫的处理增加 2.7 倍; 而用相同水势的 PEG 处理没有影响。李海云等^[24]研究盐生植物滨藜 (*Atriplex isatidea*)、碱蓬 (*Suaeda salsa*)、海蓬子 (*Salicornia europca*)、补血草 (*Limonium bicolor*) 种子萌发的抑制因子时发现, 虽然氯化钠和等水势的 PEG6000 都对种子萌发有抑制作用, 但 PEG6000 的抑制作用大于氯化钠。这都说明非透过性的 PEG 胁迫和盐胁迫有不同的机制。

总之, 用 PEG 产生渗透胁迫是盐胁迫生理研究中的一个重要手段。在实验过程中, 可以针对不同的实验目的, 用不同分子量的 PEG, 产生不同性质的渗透胁迫来研究细胞壁外脱水和细胞膜外脱水效应。

4 PEG 溶液水势的测定和计算

PEG 溶液水势可以用冰点下降法 (freezing-point depression) 和水蒸气压亏缺法 (vapor-pressure deficit) 测定^[25, 26]。但这两种测定方法的结果有较大的差异。Williams 和 Shaykewich^[27]发现 PEG 在低浓度 [50~150 g·(1 000 g)⁻¹(水)] 下, 冰点下降法的测定结果比水蒸气压亏缺法高 (负的少) 26%~44% 高浓度 [300~400 g·(1 000 g)⁻¹(水)] 下比水蒸气压亏缺法低 (更负) 14%~20%。PEG 在水溶液

中不遵循 van't Hoff 定律, 对于给定的 PEG 水势与摩尔浓度有关, 但不成线性关系。在相同摩尔浓度下, 水势随着分子量的增大而降低。PEG 的水势可能主要受乙醇亚单位的衬质势控制。

虽然 PEG 溶液的水势与摩尔浓度不呈线性关系。但 Michel 和 Kaufmann^[28]发现在一定范围内, PEG 溶液水势随浓度和温度的变化, 可用方程 $\Psi = a[\text{PEG}]^2 T + b[\text{PEG}]^2 + c[\text{PEG}] T + d[\text{PEG}]$ 描述, 式中 a 、 b 、 c 、 d 为常数。Michel 等^[29]1983 年又推导出如下经验公式, 对 PEG 溶液的水势进行计算或预测: $\Psi_{\text{PEG}} = 1.29[\text{PEG}]^2 T - 140[\text{PEG}]^2 - 4[\text{PEG}]$ 。式中, Ψ_{PEG} 为 PEG 溶液的水势, 单位为 bar; [PEG] 为 PEG 浓度, 单位为 g·g⁻¹(水); T 为温度 (摄氏度)。此公式在 PEG 浓度 0~0.8 g·g⁻¹(水)、温度 5~40℃ 的范围内可得到很好的预测结果, 误差在 5% 以内; 但在预测高浓度 PEG 溶液的水势时, 误差增大。

甘露糖和葡聚糖的水势计算可参见文献 29。

应该注意的是, PEG 与低分子量溶质混合时对水势的影响具有加成效应。例如将 PEG 与 K₂SO₄、NaCl、甘露醇混合时, 实测水势低于预测水势 (比预测水势更负, 表 1)。这为培养液水势预测带来了困难。但这个公式可应用在对水势精确度要求不高的实验中, 也可以在此基础上对水势进行进一步的精确调节。

5 结束语

虽然 PEG 广泛应用于植物渗透胁迫的溶液培养中, 但还存在着一些问题。首先, 氧气供应不足, 以致植物缺氧。这与一般溶液培养一样^[18]。在纯水中氧气的传递能力比空气中低 10⁴ 倍^[31], 而且在进行溶液培养时根系表面还存在着影响氧气扩散的界面层^[32], 界面层的厚度与搅拌程度和溶液的粘度有关。溶液的粘度愈大, 愈不利于氧气的

表1 盐和甘露醇对PEG溶液水势的影响^[30]

溶质	浓度/mol·L ⁻¹	PEG/g·g ⁻¹ (水)					
		0		0.2		0.3	
		实测水势/Mpa	加成效应/Mpa	实测水势/Mpa	加成效应/Mpa	实测水势/Mpa	加成效应/Mpa
		0	—	-0.31	—	-0.67	—
K ₂ SO ₄	0.355	-2.00	—	-3.20	0.89	-3.93	1.26
NaCl	0.410	-1.99	—	-2.74	0.44	-3.28	0.62
甘露醇	0.731	-1.95	—	-2.76	0.50	-3.37	0.75

扩散。PEG溶液的粘度较大,对根系的氧气供应有较大的不利影响,从而增大了根系缺氧的可能性。其次,对培养植物产生伤害。在培养过程中,PEG有时会进入组织内部,对植物尤其是植物的根系产生不同程度的伤害^[33]。此外,如果PEG本身纯度较低,其所含有的杂质也会对植物产生一定的伤害作用^[34]。这些都是我们在应用PEG的实验中需要加以注意的。

参考文献

- Couper A, Eley D. Surface tension of polyethylene glycol solutions. *J Polymer Sci*, 1948, 3: 354~349
- McClendon JH, Blinks LR. Use of high molecular weight solutes in the study of isolated intracellular structure. *Nature*, 1952, 170: 577~578
- Termaat CR, Hanson AD. Use of concentrated macronutrient solution to separate osmotic from NaCl-specific effects on plant growth. *Aust J Plant Physiol*, 1988, 13: 509~522
- Thill DC, Schirman RD, Appleby AP. Osmotic stability of mannitol and polyethylene glycol 20 000 solution used as seed germination media. *Agron J*, 1979, 71: 105~108
- Berkat O, Briske DD. Water potential evaluation of three germination substrates utilizing polyethylene glycol. *Agron J*, 1982, 74: 518~521
- 沈又佳, 陈靠山, 周燮等. NdCl_3 对胁迫下小麦种子萌发的影响. *干旱地区农业研究*, 1995, 13(1): 90~93
- Greenway H. Effects of slowly permeating osmotica on metabolism of vacuolated and nonvacuolated tissues. *Plant Physiol*, 1970, 46: 254~258
- Hohl M, Schopfer P. Water relations of growing maize coleoptile. Comparison between mannitol and polyethylene glycol 6000 as external osmotica for adjusting turgor pressure. *Plant Physiol*, 1991, 95: 716~722
- Jackson WT. Use of carbowaxes (polyethylene glycol) as osmotic agents. *Plant Physiol*, 1962, 39: 513~519
- Carpita NC, Sabularse D, Montezinos D et al. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science*, 1979, 205: 1144~1147
- Rashmi P, Agarwal RM. Water stress-induced changes in proline contents and nitrate reductase activity in rice under light and dark conditions. *Physiol Mol Biol Plants*, 1998, 4: 53~57
- 李双顺, 林植芳. 抗氧化剂和6-BA对根系胁迫的玉米叶片光合膜特性的影响. *植物学报*, 1994, 36(11): 871~877
- 韩建民, 史吉平, 商振清. 渗透胁迫对玉米幼苗不同叶片、叶片水分状况及SOD、POD活性的影响. *玉米科学*, 1995, 3(1): 71~74
- 肖用森, 王正直, 郭绍川. 渗透胁迫下稻苗中游离脯氨酸累积与膜脂过氧化的关系. *武汉植物学研究*, 1996, 14(4): 334~340
- 范建民, 惠玉琴. 光、渗透胁迫和激素对离体小麦叶片衰老的影响. *青海师范大学学报(自然科学版)*, 2002, (1): 60~62
- Bajji M, Chaumont F. Monitoring aquaporin gene expression in *Zea mays* L. under osmotic stress conditions. *Arch Physiol Biochem*, 2002, 110(5): B1-B42
- Stasolla C, van Zyl L, Egertsdotter U et al. The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiol*, 2003, 131(1): 49~60
- Déjardin A, Sokolov LN, Kleczkowski LA. An *Arabidopsis* stress-responsive sucrose synthase gene is up-regulated by low osmotic potential. Abstract Number 769. abstracts.aspb.org/aspb1998/48/0373.shtml
- Verslues PE, Ober ES, Sharp RE. Root growth and oxygen relation at low water potentials: impact of oxygen availability in polyethylene glycol solution. *Plant Physiol*, 1998, 116: 1403~1412
- Linossier L, Veisseire P, Cailloux F et al. Effect of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. *Plant Sci*, 1997, 124: 183~191
- van der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE et al. Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *J Exp Bot*, 2000, 51: 1555~1562
- Skrecky D. Differential effects of permeating and nonpermeating solutes on the fatty acid composition of *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(6): 2414~2421
- 马焕成, 王沙生. 胡杨对渗透胁迫和盐分胁迫的不同响应. *西北林学院学报*, 1998, 18(1): 1~7
- 李海云, 赵可夫, 王秀峰. 盐对盐生植物萌发的抑制作用. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2002, 33(2): 170~173
- Roders JA, Tam T. Solution behavior of polyethylene glycols in water using vapor pressure osmometry. *Can J Pharm Sci*, 1977, 67: 64~67
- Steuter AA, Amozafar JR. Good in water potential of aqueous polyethylene glycol. *Plant Physiol*, 1981, 67: 64~67
- Williams J, Shaykewich CF. An evaluation of polyethylene glycol (P.E.G) 6000 and P.E.G 20 000 in the osmotic control of soil water matrix potential. *Can J Soil*, 1969, 49: 397~401
- Michel BE, Kaufmann MR. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol*, 51: 914~916
- Michel BE, Wiggins OK, Outlaw Jr WH. A guide to establishing water potential of aqueous two phase solutions (polyethylene plus dextran) by amendment with mannitol. *Plant Physiol*, 1983, 72: 60~65
- Michel BE. Evaluation of the water potentials of polyethylene glycol 8000 both in the presence and absence of other solutes. *Plant Physiol*, 1983, 72: 66~72
- Nye PH, Tinker PB. Solute movement in the soil-root system. In: Janderson D, Greig-Smith P, Pitelida A (eds). *Studies in Ecology*. Berkeley, CA: University of California Press, 1977. 8~13
- Drew MC. Sensing soil oxygen. *Plant Cell Environ*, 1990, 13: 681~693
- Lawlor DW. Absorption of polyethylene glycols by plants and their effects on plant growth. *New Phytol*, 1970, 69: 501~513
- Plaut Z, Fderman E. A simple procedure to overcome polyethylene glycol toxicity on whole plants. *Plant Physiol*, 1985, 79: 559~561