

陆地棉新品种在体细胞培养中 愈伤组织褐化机理研究

师海荣^{1,2}, 王清连^{2*},

(1. 河南师范大学, 河南 新乡 453002; 2. 河南科技学院, 河南 新乡 453002)

摘要: 对陆地棉新品种百棉 1 号和百棉 3 号的 115d 正常愈伤组织与褐化愈伤组织的可溶性糖、丙二醛(MDA)、棉酚含量及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、多酚氧化酶(PPO)活性进行测定, 结果表明, 褐化愈伤组织的 PPO 活性、棉酚含量和 MDA 含量均高于正常的愈伤组织, 而褐化愈伤组织的 SOD 活性、CAT 活性和可溶性糖的含量均低于正常的愈伤组织。当细胞膜遭到破坏时, MDA 的含量升高, 遭到破坏的膜使 PPO 与棉酚在有氧条件下结合生成醌类物质, 导致愈伤组织的褐化。而愈伤组织的褐化促使了 SOD、CAT 活性下降和可溶性糖含量降低。

关键词: 陆地棉; 愈伤组织; 褐化; 机理

中图分类号: S562 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)03-0032-05

Physiological-biochemical Changes during *G. hirsutum* Callus Browning

SHI Hai-rong^{1,2}, WANG Qing-lian^{2*}

(1. Henan Normal University, Xinxiang 453002, China;

2. Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453002, China)

Abstract: The contents of soluble sugar, MDA, gossypol and the activities of SOD, CAT and PPO were measured in 115-day normal and browning callus of upland cotton cultivars Baimian No. 1 and Baimian No.3. The results showed that the activity of PPO and the content of gossypol and MDA in browning callus were higher than in normal ones while the activities of SOD, CAT and the content of solubility sugar in the browning were lower than in the normal. When cell membrane was destroyed, the content of MDA increased, the anthraquinone from the combination of PPO with Gossypol under oxygen resulted in callus browning, which made the activities of SOD, CAT and the content of solubility sugar in browning callus decrease.

Key words: Upland cotton; Callus; Browning; Mechanism

棉花组织培养作为棉花生物技术的基础研究工作, 在国内外均受到重视, 很多在生产上广泛推广的优质品种通过组织培养技术也获得了再生苗, 不再仅仅限于以前的在生产上无多大实用价值的国外品

种(主要是珂字棉系列)和国内生产上已经淘汰的品种(如鲁棉 1 号、6 号、冀合 321 等)。关于培养技术改进、胚状体发生的形态学方面已有较多报道^[1~7], 但有关棉花胚状体发生的生理生化机制方

收稿日期: 2005-11-26

基金项目: 河南省自然科学基金项目(004011200, 0311030300)

作者简介: 师海荣(1979-), 女, 河南项城人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物生理生化。

通讯作者: 王清连(1956-), 男, 河南浚县人, 教授, 主要从事植物生理生化教学与研究。E-mail: wangql@163.com

面的研究较少^[7~15],对于棉花组织培养过程中褐化问题的报道更少^[16]。而棉花组织培养之所以较其他的植物难获得再生植株,很大方面与棉花的愈伤组织容易褐化有关。本研究以陆地棉新品种百棉 1 号和百棉 3 号为材料,对其褐化愈伤组织的主要生化代谢物质进行了初步分析,进而对棉花组织培养褐化的理化机制进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

百棉 1 号、百棉 3 号系河南科技学院棉花育种与生物技术重点实验室新近育出的陆地棉品种。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的培养 种籽用硫酸脱绒后,70%的酒精浸泡 30 s,蒸馏水冲洗 3 次,15%的 H₂O₂ 浸泡 4~5 h,在无菌操作台上用无菌水冲洗 3 次后,置于无菌操作台用无菌水浸泡过夜,待露白后脱皮种植于自来水质 1/2MS (仅加大量元素)灭菌培养基上,在 28℃暗培养 2 d、光照 2 000 lx 下培养 4~5 d 后,取无菌苗的下胚轴,剪成 8~10 mm 的小段作外植体。

1.2.2 培养条件 诱导培养基为 MS+0.1 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L KT+0.1 mg/L IBA;继代培养基为 MS+0.1 mg/L KT+0.4 mg/L IBA。葡萄糖 25 g/L,pH 为 5.8~6.2,培养温度 28℃,光照强度 2 000~3 000lx,每天光照 14 h。

1.2.3 外植体接种 40 d 后第 1 次继代,以后每隔 30 d 继代一次,取 3 次继代后的 115 d 的上述材料测定各代谢物质的含量。

1.2.4 测定方法^[17] 可溶性糖采用蒽酮比色法,丙二醛(MDA)采用硫代巴比妥酸法测定,超氧化物歧化酶(SOD)采用 NBT 光还原法测定,多酚氧化酶(PPO)采用儿茶酚比色法测定,过氧化氢酶(CAT)、棉酚采用直接比色法测定。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织生长分化过程的观察

下胚轴切段在培养 4d 时,茎段两端开始变粗、膨大(图 1),20d 后产生大量愈伤组织(图 2),30d 以后是愈伤组织鲜重增加的高峰期(图 3),50d 以后逐渐减慢,60d 后愈伤组织的鲜重基本不再增加(图 4)。随着继代次数的增加,愈伤组织褐化逐渐严重,115d 时褐化程度最严重(图 5、图 6),其中,百棉 1 号的褐化较严重。

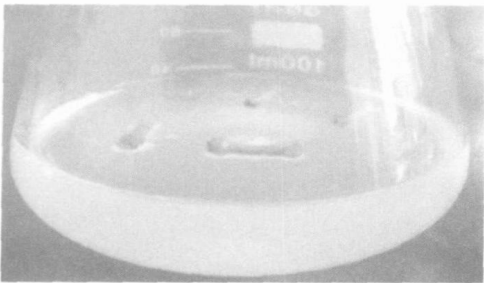


图 1 百棉 1 号培养 4d 的愈伤组织

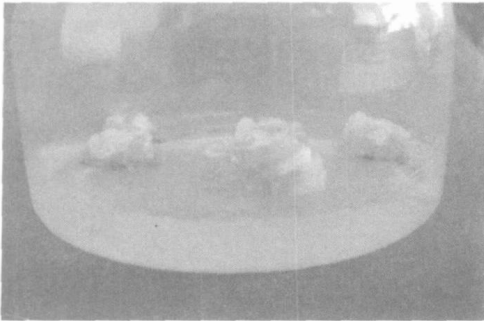


图 2 百棉 1 号培养 20d 的愈伤组织

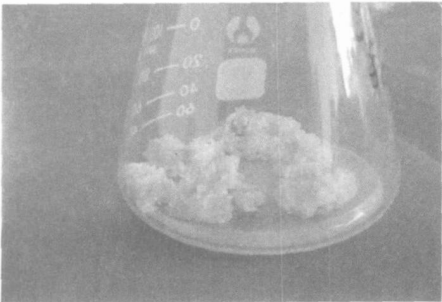


图 3 百棉 1 号培养 30d 的愈伤组织

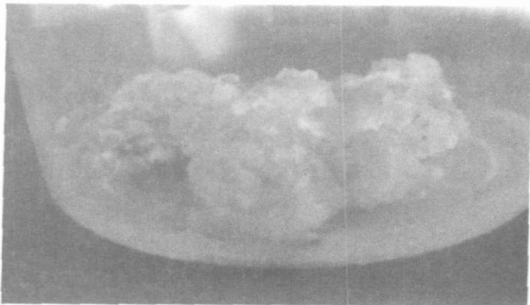


图 4 百棉 1 号培养 60d 的愈伤组织

2.2 可溶性糖含量的变化

试验表明,2 个陆地棉品种的可溶性糖的含量均表现为正常愈伤组织高于褐化愈伤组织,褐化愈伤组织中可溶性糖含量以百棉 1 号的较高,见图 7。这可能是因为褐化的愈伤组织代谢减弱,合成的可

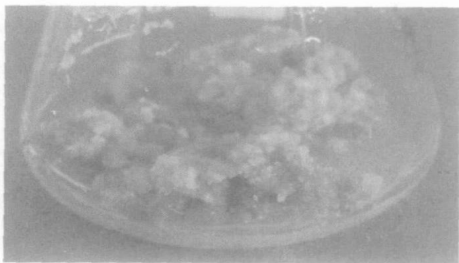


图 5 百棉 1 号培养 90d 的褐化愈伤组织

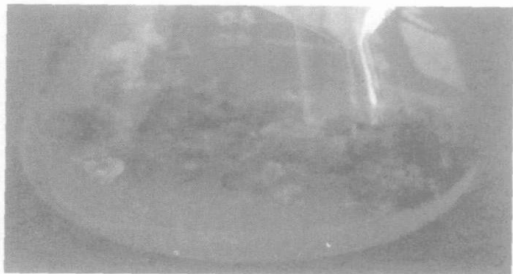


图 6 百棉 1 号培养 115d 褐化的愈伤组织

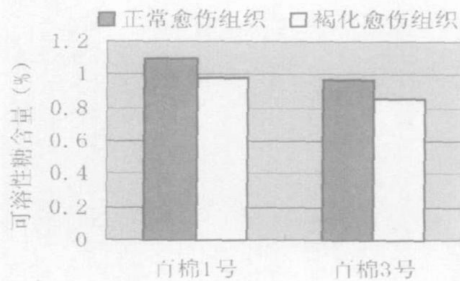


图 7 2 个陆地棉品种可溶性糖含量变化比较

溶性糖减少。

2.3 MDA 含量变化

从图 8 可以看出, 2 个品种均表现为褐化愈伤组织 MDA 含量高于正常愈伤组织, 其中, 在褐化的愈伤组织中, 以百棉 1 号含量较高。植物器官衰老或在逆境下遭受伤害, 往往发生膜脂过氧化作用, MDA 是膜脂氧化的最终分解产物, 从膜上产生的位置释放出后, 与蛋白质、核酸起反应修饰其特征; 使纤维素分子间的桥键松弛, 或抑制蛋白质的合成, MDA 的积累对膜和细胞造成一定的伤害。褐化愈伤组织中 MDA 含量以百棉 1 号较高, 这说明百棉 1 号的膜受损程度较高, 褐化程度比百棉 3 号严重, 与观察结果相符。

2.4 SOD 活性变化

SOD 是需氧生物中普遍存在的一种含金属的

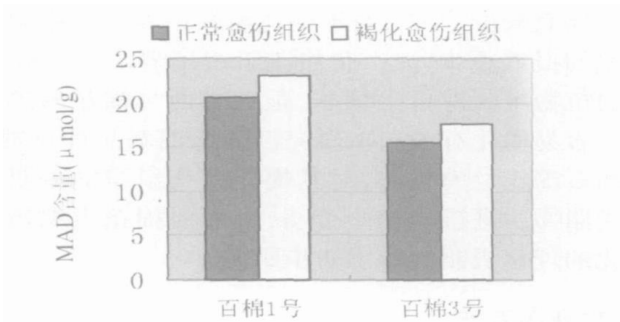


图 8 2 个陆地棉品种丙二醛含量变化比较

酶, 能催化超氧化物阴离子自由基的歧化反应, 是一种细胞保护酶。从图 9 可看出, 正常愈伤组织的 SOD 活性均高于褐化愈伤组织, 且 2 个陆地棉品种的 SOD 活性都有不同程度的下降。SOD 活性的下降, 与愈伤组织的褐化有关。

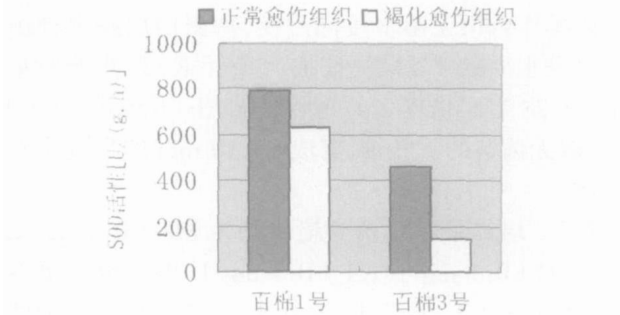


图 9 2 个陆地棉品种 SOD 活性变化比较

2.5 CAT 活性变化

CAT 是一种氧化还原酶, 参与活性氧代谢过程, 氧分子对生物体是无毒性的, 一旦氧分子的电子分布发生改变, 就变成活性氧, 特别是在环境胁迫等逆境情况下, 生物体内广泛存在活性氧爆发现象, 导致自由基增多, 使细胞膜产生过氧化, 导致细胞膜的破坏和损伤, CAT 在清除超氧自由基、H₂O₂ 和过氧化物以及阻止或减少羟基自由基形成等方面发挥重要作用。从图 10 可看出, 正常愈伤组织的 CAT 活

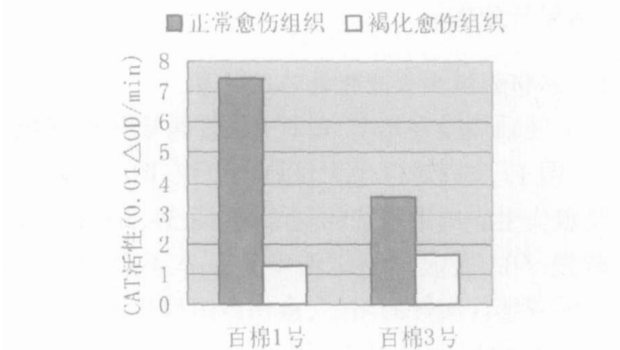


图 10 2 个陆地棉品种 CAT 活性变化比较

性比褐化愈伤组织高。CAT 大幅度的降低,表明其清除超氧自由基、 H_2O_2 和过氧化物等能力减弱,致使细胞膜产生过氧化,从而导致细胞膜的破坏和损伤,最终导致了愈伤组织的褐化甚至死亡。百棉 1 号的 2 种愈伤组织的 CAT 活性变化较大,因而百棉 1 号的褐化较严重。

2.6 PPO 活性变化

在 2 个陆地棉品种中,正常愈伤组织的 PPO 活性均低于褐化的愈伤组织,且褐化愈伤组织的 PPO 活性以百棉 1 号较高(图 11)。PPO 广泛存在于植物组织中,是一种独立的质体酶,与内囊体膜结合在一起,天然状态无活性,其活性受制于 PPO 状态和底物的缺少。在正常发育的植物组织中,底物、氧气、PPO 同时存在并不发生褐变,这是因为在正常的组织细胞内由于多酚类物质分布在细胞的液泡内,而 PPO 则分布在各种质体或细胞质内,这种区域性分布使底物与 PPO 不能接触。而当细胞膜的结构发生变化和破坏时,则为酚类物质创造了与 PPO 接触的条件,在氧存在的情况下使酚类物质氧化成醌类物质,进行一系列的脱水、聚合反应,最后形成黑褐色物质,从而引起褐化。

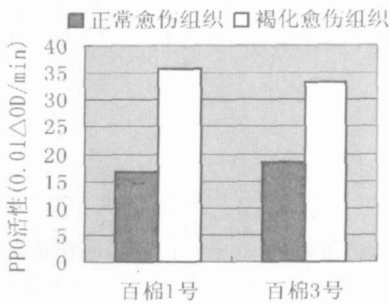


图 11 2 个陆地棉品种 PPO 活性变化比较

2.7 棉酚含量变化

棉酚是棉属植物所特有的次生物质,它对许多棉花病虫害具有一定的抗性,是棉花自身的抗生物物质之一,并且能够调控树和烟草腋芽的发育,降低植物种子的萌发率,抑制植物幼苗生长,降低植物 CAT 活性,而 CAT 在活性氧代谢过程中起到重要的作用。从图 12 中可以看出,以生长旺盛的正常愈伤组织为对照,褐化的愈伤组织棉酚含量均高于对照,且以百棉 1 号的含量较高。

3 讨论

棉花褐化的问题是棉花组织培养中遇到的一大难题,是导致棉花组织培养没有其他的植物发展迅

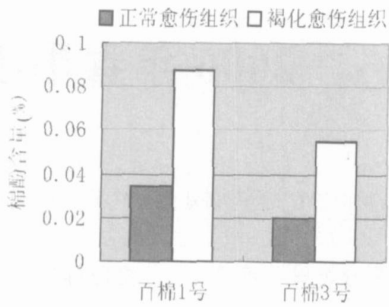


图 12 2 个陆地棉品种棉酚含量变化比较

速的原因之一。导致棉花愈伤组织褐化的原因很多,外界的因素有培养时的温度、光照;培养基种类;培养基的状态、激素种类和浓度、固化剂的多少、pH 值的大小及吸附剂和抗氧化剂的有无等;外植体的基因型、年龄、部位及受伤害程度等;培养时的转瓶周期、培养方法等^[18]。关于这方面的报道很多,并且都已经找出了相应的解决办法。除了外界的因素,愈伤组织内部的各种酶的活性、酚类物质(特别是棉酚)的变化、细胞的程序性死亡也是其褐化的关键因素之一。关于褐化的机制一直存在 2 种看法:一种认为多酚氧化酶与酚类物质在有氧的条件下被氧化为醌类物质,并抑制了很多酶的活性,从而影响了愈伤组织的正常生长,甚至导致其死亡^[19]。一种认为是受不利条件的影响造成的细胞死亡(程序化死亡)或自然条件下发生的细胞死亡(坏死)而形成的褐化^[20]。吴家和等^[17]报道,棉花愈伤组织的褐化可能与细胞程序性死亡(PCD)有关。我们通过实验发现,2 个陆地棉品种的褐化愈伤组织中的 PPO 的活性、棉酚含量均高于正常的愈伤组织。丙二醛的含量代表了细胞膜的受损害的程度,而褐化愈伤组织的 MDA 含量均高于对照,说明细胞膜受到了破坏。当细胞膜遭到破坏时,PPO 与棉酚在氧的条件下结合,生成醌类物质,导致愈伤组织的褐化。而愈伤组织的褐化导致了 SOD 酶、CAT 酶的活性下降,使代谢减弱,可溶性糖的含量也下降。试验结果与第 1 种看法是一致的。

参考文献:

[1] 王清连,刘方,周云,等.棉花组织培养直接胚胎发生和植株再生[J].棉花学报,2002,14(6):340—343.
[2] 于娅,刘传亮,马峙英,等.陆地棉中棉所 24 胚性愈伤组织的诱导及植株再生[J].西北植物学报,2004,24(2):306—310.
[3] 蔡小宁,吴敬音,余建明.陆地棉胚性愈伤组织诱导和植株再生[J].江苏农业学报,1997,1(4):225—230.
[4] 张宝红.棉花体细胞胚的快速诱导法[J].西北农业学报,1994,3(3):37—40.

2006 年春季小麦苗情分析及管理意见

季书勤¹, 刘发魁¹, 田云峰¹, 宋玉立²

(1. 河南省农业科学院小麦研究所, 河南 郑州 450002; 2. 河南省农业科学院植物保护研究所, 河南 郑州 450002)

中图分类号: S512.1 文献标识码: C 文章编号: 1004—3268(2006)03—0036—02

进入 2006 年春季之后, 河南省小麦相继进入返青、起身、拔节期, 小麦生长由冬前以根、蘖、叶等营养生长为主的时期转变为根、叶、蘖、茎、穗等营养与生殖生长同时并进的时期, 群体和个体发展迅速, 植株生长量大、需肥需水也多, 是小麦一生变化最大和决定产量的关键时期。为客观分析小麦苗情长势, 科学提出春季麦田管理意见, 春节刚过, 河南省农科院组织小麦所、植保所、土肥所等的科技人员, 对河南省中南部的信阳、罗山、息县、汝南、西平, 中部地区的宁陵、杞县和豫北的安阳、汤阴、滑县、辉县、获嘉、新乡等地麦田苗情进行了调查, 在此基础上, 提出了春季麦田管理意见。

1 小麦苗情分析

从全省范围看, 2006 年苗情好于 2005 年, 接近

常年, 长势正常。主要表现为群体比较适宜, 群体偏大的过旺苗很少, 群体在 675 万/hm² 以下弱苗不多, 多数麦田群体集中在每公顷 750~1 200 万, 这种群体基础有 2 点好处: 一是可以保证有较适宜的成穗数; 二是由于群体相对常年偏小, 为拔节期追肥浇水创造了良好的条件, 一般不会有倒伏危险。从麦苗个体素质看, 与常年相比, 单株叶片、分蘖、次生根略微偏少, 但只要加强春季麦田科学管理, 对产量不会造成负面影响。

苗情好主要有以下 3 个方面的原因: 一是 2005 年麦播前全省普遍降水较多, 播种时底墒充足。二是全省总体播期比较适宜, 也比较集中(10 月 15~25 日)。虽然由于降水原因, 豫北地区比常年有所推迟, 播期集中在 10 月 15 日前后, 距适宜播期 3~5d; 中部地区播期在 10 月 15~22 日, 在适宜播期

收稿日期: 2006—02—20
作者简介: 季书勤(1956—), 女, 河南卫辉人, 研究员, 硕士, 主要从事小麦栽培研究。

[5] 张宝红, 李秀兰. 棉花组织培养植株再生技术的研究 [J]. 西南农业学报, 1995, 8(4): 42—47.

[6] 张宝红, 王清连, 丰嵘, 等. 棉花体细胞胚胎发生模式与植株再生 [J]. 农业生物技术学报, 1996, 5(2): 31—36.

[7] 张献龙, 张家明, 姚明镜, 等. 棉花体细胞培养及其基础研究 [J]. 华中农业大学学报, 1993, 12(5): 421—426.

[8] 李付广, 李秀兰, 李凤莲, 等. 陆地棉胚胎发生的生化基础研究初报 [J]. 中国棉花, 1994, 21(4): 17—18.

[9] 李付广, 李秀兰, 李凤莲. 棉花体细胞胚胎发生及主要物质生化代谢机制 [J]. 河南农业大学学报, 1994, 28(3): 313—316.

[10] 董合忠, 傅振华. 棉花组织培养胚状体发生的生理生化研究 [J]. 中国棉花, 1997, 24(2): 10—11.

[11] 吴家和, 陈志贤, 李淑君, 等. 棉花体细胞再生过程中代谢物质变化规律的初探 [J]. 生物学杂志, 1999, 16(2): 25—26.

[12] 李付广, 李秀兰, 李凤莲, 等. 棉花抗枯萎病胚性愈伤组织某些生化物质代谢的变化 [J]. 西南农业学报, 1994, 7(3): 63—67.

[13] 姚明镜, 张献龙, 刘金兰, 等. 陆地棉抗黄萎病细胞系几个生理生化指标的测定 [J]. 华中农业大学学报, 1995, 14(4): 338—343.

[14] 毛桂莲, 许兴. 枸杞耐盐突变体的筛选及生理生化分析 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(2): 275—280.

[15] 吉前华. 碳酸钙胁迫下积壳愈伤组织的某些生理生化指标变化 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(3): 289—292.

[16] 吴家和, 张献龙, 聂以春. 棉花体细胞增殖和胚胎发生中的细胞程序性死亡 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(6): 515—520.

[17] 龚富生, 张嘉宝. 植物生理学实验 [M]. 北京: 气象出版社, 1995. 124—247.

[18] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题 [J]. 植物生理通讯, 1999, 35(6): 501—506.

[19] 陈凯. 植物组织培养褐变的产生机理及抑制措施 [J]. 安徽农业科学, 2004, 32(5): 1034—1036.

[20] 萨基拉, 李文彬, 孙勇如. 植物细胞凋亡研究进展 [J]. 高新技术通讯, 2000(6): 95—98.