

甜瓜愈伤组织诱导过程中的生理生化变化

辛建华, 苑育文, 张永华

(新疆石河子大学农学院园艺系 832000)

摘要:通过对甜瓜不同外植体诱导的愈伤组织进行可溶性蛋白、过氧化物酶、超氧化物歧化酶的生理生化指标测定。结果表明:在愈伤组织培养过程中,可溶性蛋白含量与酶活性变化具有一定规律性,显示出2个峰值;不同外植体脱分化后的细胞组织生理生化指标差异显著,受脱分化前器官组织类型的影响较大。

关键词:酶活性;可溶性蛋白;过氧化物酶;超氧化物歧化酶

中图分类号:S 652.03.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)07-0171-02

甜瓜(*Cucumis melo* L),葫芦科(*Cucurbitaceae*)甜瓜属(*Cucumis*)。新疆甜瓜属于网纹甜瓜,是厚皮甜瓜亚种的变种之一^[1],是新疆特色经济果品。但近年来,新疆甜瓜品种退化严重,抗病虫能力急剧下降,影响了甜瓜的品质。甜瓜的组织培养可以为转基因技术在甜瓜育种上应用提供了良好的载体,可以加快甜瓜新品种的选育的进程。

以甜瓜子叶、下胚轴、子房为实验材料,对其进行愈伤诱导,测定其在愈伤过程中的可溶性蛋白含量、过氧化物酶和超氧化物歧化酶的酶活性,为甜瓜改良育种做一些有益的尝试。

1 材料与方法

1.1 供试材料

取温室中杂交皇后开花前1d的子房和组培室中杂交皇后无菌苗子叶与下胚轴进行离体诱导培养,获得愈伤组织,取不同时期的愈伤组织进行可溶性蛋白含量和酶活性测定。

1.2 外植体离体诱导

将甜瓜种子去壳,用75%的酒精消毒30s,在0.1% HgCl₂中灭菌5min,再用无菌水冲洗5次,用无菌滤纸吸干种子后接种于1/2MS(无糖)固体培养基中,在25℃培养箱暗培养1d后放入培养条件为:温度27℃,光照强度3000Lx,光周期为16h/8h的培养箱中培养,6d后切取子叶和下胚轴接入诱导培养基MS+6-BA 1.0mL/L+2,4-D 0.1mL/L,在温度27℃,光照强度3000Lx,光周期为16h/d的培养箱中培养。

将开花前1d的甜瓜子房用75%的酒精消毒30s,

在0.1% HgCl₂中灭菌5min,再用无菌水冲洗5次,切成小块接入诱导培养基MS+6-BA 1.0mL/L+2,4-D 0.1mL/L,在温度27℃,光照强度3000Lx,光周期为16h/d的培养箱中培养。

1.3 可溶性蛋白和酶活性测定方法

可溶性蛋白含量测定:采用考马斯亮兰G-250法^[2]。以牛血清白蛋白做标准曲线,计算各样品的蛋白质浓度。SOD活性测定:采用NBT光化还原法^[3]。以NBT的光化学还原被SOD抑制50%时的酶用量为一个酶活性单位。POD活性测定:采用愈创木酚法^[4]。以 $\Delta A_{470}/(\text{min} \cdot \text{g} \cdot \text{FW})$ 表示一个酶活性单位。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织形成情况

接种在诱导培养基上的不同外植体于不同时期进行观察,结果如表1。子叶产生愈伤组织速度最快,质地紧密,且生长量也大。子房产生愈伤也快,质地紧密,但其在愈伤生长方面比较慢。下胚轴愈伤组织产生速度慢,质地疏松,但生长速度快。后两者在后期都出现了不同程度的褐化。

表1 不同外植体愈伤组织生长情况

外植体种类	5 d	15 d	25 d	33 d
子叶	表面膨大,产生愈伤最早	愈伤绿色	大量愈伤绿色,生长快	大量愈伤质地紧密,出现芽点,没有褐化
下胚轴	表面膨大,产生愈伤最慢	愈伤淡绿色	大量愈伤淡绿色,生长较快	大量愈伤质地疏松,出现褐化
子房	表面膨大,产生愈伤	愈伤白色	大量愈伤,生长慢	大量愈伤质地紧密,出现褐化

2.2 不同时期可溶性蛋白和酶活性变化

2.2.1 可溶性蛋白含量变化 在培养第9d时,可溶性蛋白含量出现一个高峰,对应形态为子叶、下胚轴和子房愈伤组织大量生长,说明接入材料脱分化后开始旺盛的分裂,第2个可溶性蛋白峰出现在第21d,对应形态为子叶愈伤组织有不定芽分化,此时的峰值说明了再分化形成组织器官的物质积累。而对于下胚轴,在培养后期

第一作者简介:辛建华(1968-),男,河南洛阳人,副教授,主要从事蔬菜育种研究。

通讯作者:苑育文(1979-),男,山西大同人,硕士研究生,主要从事甜瓜育种研究, E-mail: mosquito521@163.com.

收稿日期:2007-02-05

褐化, 图 1 显示只是出现了一次不明显的峰值, 而后期没有, 即褐化后蛋白只有消耗, 而产生较少。对于子房, 初期便是高蛋白含量, 这和子房本身的生殖器官储存大

量蛋白有关。接入培养基后, 产生愈伤组织, 出现一个小峰值, 但后期愈伤组织生长缓慢且褐化, 可溶性蛋白含量没有多大变化。

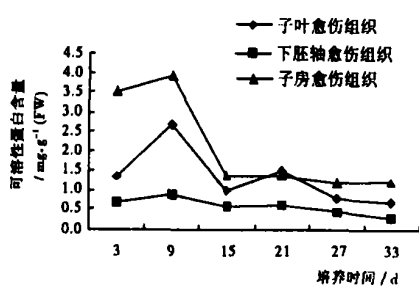


图1 可溶性蛋白含量变化

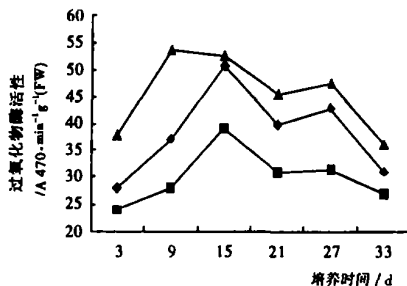


图2 POD 活性变化

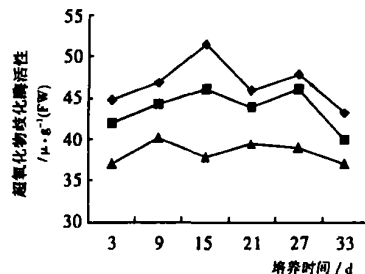


图3 SOD 活性变化

2.2.2 过氧化物酶(POD)的活性变化 过氧化物酶(POD)与物质和能量代谢密切相关。同时, POD 和超氧化物歧化酶(SOD)是植物细胞的抗氧化酶, 调节活性氧的代谢, 参与细胞的分裂和分化, 它们活性的改变可影响植物体胚的发生^[5,6]。在愈伤组织形成初期, POD 酶活性上升, 出现一个小峰, 这可能是接种引起的损伤反应, Galston 等^[7]人认为损伤能使合成 POD 酶的基因去抑制, Ridge 等^[8]则认为是损伤使 POD 酶合成抑制物渗漏, 导致酶活性增强。从第 9 天开始, 过氧化物酶活性显著上升, 第 15 天达到最大, 比较此时的细胞形态, 可以认为可能是分化状态细胞中过氧化物酶活性较高的原因。之后下降, 于第 30 天略有回升, 然后趋于平稳。

2.2.3 超氧化物歧化酶(SOD)的活性变化 超氧化物歧化酶(SOD)在整个愈伤组织生长中出现 2 个峰, 第 1 个峰与愈伤组织大量增殖有关, 与杨和平等^[9]、何梦玲^[10]试验结果相似, 第 2 个峰的出现与培养基中营养物质消耗减少导致细胞老化有关, 是由于成熟、衰老过程中氧自由基活动增强而产生的一种适应现象, 即 SOD 的抗衰老作用。

3 讨论

在植物细胞中, SOD 通过歧化反应消耗活性氧, 同时产生 H_2O_2 , H_2O_2 又在 POD 或是 CAT 的作用下分解成 H_2O 。从试验结果中也可以看到超氧化物歧化酶与过氧化物酶出现的峰值基本在同一时期出现。

在开始的几天中, 3 种酶活性都有所上升, 此后又下降是由刚接入培养基中的“逆境”造成。后期又有个小

峰可能是愈伤组织大量生长导致的酶活性增强。

植物组织培养的过程可以看作是一系列基因在时间和空间上顺序表达的过程, 蛋白、酶类等都是基因表达的产物。这些物质的变化, 是由于一定条件下基因依次顺序表达的引发与抑制的结果。研究了解其生理生化规律特征可以更好为转基因研究提供科学依据。

参考文献

- [1] 马得伟, 高锁柱. 甜瓜花粉形态研究及起源、分类的划分[J]. 园艺学报 1989(5): 134-138.
- [2] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [3] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [4] 张志良. 植物生理学实验指导(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [5] 崔凯荣, 任红旭, 邢更妹, 等. 枸杞组织培养中抗氧化酶活性与体细胞胚发生相关性的研究. 兰州大学学报(自然科学版)[J]. 1998, 34(3): 93-99.
- [6] Dare KSG, Oberley TD, Mouse KE, et al. Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation. Free Rad Biol Med 1994, 16: 275-282.
- [7] Galston A W, Davis J P. Hormonal regulation in higher plants[J]. Science. 1969, 163(5): 1288-1297.
- [8] Ridge I, Osborne DL. Regulation of peroxidase activity by ethylene in *Pisum sativum*: regiments for protein and RNA synthesis[J]. J Exp Bot 1970, 21: 720-734.
- [9] 杨和平, 程井辰, 石刁柏体细胞胚胎发生过程中超氧化物歧化酶活性的变化[J]. 植物学报 1993 35(6): 490-493.
- [10] 何梦玲, 周吉源. 不同光照对喜树细胞培养生长和生理生化特性的影响[J]. 华中师范大学学报(自然科学版). 2002, 36(4): 489-493.

Study of Physiological and Biochemical Characteristics on Callus of Different Explants of Cucumis melon

YUAN Yu-wen, XIN Jian-hua, ZHANG Yong-hua

(College of Agriculture, Shihezi University, Shihezi 832000 Xinjiang, China)

Abstract: It was mensurated that physiological and biochemical characteristics on callus of different explants of Cucumis melon. The result showed that rule on enzyme actives and soluble protein content, two peaks was showed in most of them. It was different markedly on physiological and biochemical characteristics on callus of different explants of Cucumis melon, and they were relationship between physiological and biochemical characteristics and species of explants.

Key words: Activities of Enzymes; Soluble Protein Content; POD Actives; SOD Activities