

新铁炮百合离体培养的生理生化变化初探

陈丽静¹, 孙春玉¹, 马慧¹, 陶承光², 阮燕晔³, 李天来¹, 王玉坤¹

(1. 沈阳农业大学, 辽宁省生物技术重点实验室 设施园艺省部共建教育部重点实验室 辽宁 沈阳 110866;

2. 辽宁省农业科学院 辽宁 沈阳 110161; 3. 中国农业科学院 蔬菜花卉研究所 北京 100081)

摘要:以离体培养不同时间的新铁炮百合新品种“沈香一号”鳞茎为材料,在MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L和MS无激素培养基条件下,测定并分析激素对新铁炮百合生理生化特性的影响。结果表明:激素处理的新铁炮再生苗中可溶性蛋白和非可溶性蛋白含量的变化趋势较大,适宜的激素处理能促进可溶性糖和淀粉含量的相互转变,明显增加新铁炮百合组织中过氧化物歧化酶(SOD)含量和降低丙二醛(MDA)含量;在不定芽形成过程中,激素处理可以增强百合分化和脱分化过程中的蛋白和糖代谢,还会提高组织抗逆性。

关键词:新铁炮百合;鳞茎;激素;生理生化特性

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)01-0149-04

新铁炮百合(*Lilium longiflorum* Thunb)是用麝香百合和台湾百合杂交育成的杂种铁炮百合,是百合切花中的优良品种,其花大瓣厚,花形特别,花朵不同于铁炮

百合向前开放,而是朝天怒放,尤其适宜用作切花。又因其各种优良性状,倍受人们的喜爱。新铁炮百合市场潜力大,近几年来全国各地有较大面积的栽培。随着百合需求量的增加,百合的种植面积不断扩大,对百合种球的需求量也将大幅度的上升。百合种球的繁殖方式主要为有性繁殖和无性繁殖。有性繁殖主要通过种子繁殖,虽能获得大量无病健康的幼苗,但是在其形成过程中常常授粉不亲和及胚发育早期死亡,导致结实率十分低,收获的种子数量很少。无性繁殖方式主要有小鳞茎分株繁殖方式、单鳞片扦插,且这2种繁殖方式会造成病毒的积累,导致百合的品质下降,单鳞片扦插还存在鳞片易腐烂的问题,所以,依靠这2种方法生产远不能满足市场对高质量百合种球的需求^[1,2]。

第一作者简介:陈丽静(1971-),女,山东海阳人,博士,副教授,研究方向为植物基因工程与细胞工程。E-mail: chenlijing1997@126.com。

通讯作者:阮燕晔(1971-),男,在读博士,副教授,现从事植物基因工程研究工作。E-mail: yanyeruan@yahoo.com.cn。

基金项目:国家高新技术研究发展计划(863计划)资助项目(2006AA100109);中国博士后科学基金资助项目(20100471471);辽宁省教育厅资助项目(L2010495)。

收稿日期:2010-11-10

Identification and ITS-5.8S rDNA Sequence Analysis of the Antagonistic Yeast Strain 0732-1 for Against *Acidovorax avena* subsp. *citrulli*

WANG Xiao-dong¹, LI Guo-qing², ZHANG Li¹, GE Mi-hong³

(1. Department of Plant Pathology of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003; 2. Department of Plant Pathology of

Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070; 3. Wuhan Institute of Agricultural Science, Wuhan, Hubei 430065)

Abstract: Yeast strain 0732-1, isolated from watermelon leaf samples of Tianshan reservation region, showed inhibitory activity when its filtrate was drop onto the KBA medium plate surface spreading evenly *A. avena* subsp. *citrulli*. Based on its morphological, cultural characteristics, general physiological and biochemical properties and analysis of the DNA sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA (The genbank accession number EU380207), the yeast strain 0732-1 was identified as *Pichia anomala* Kurtzman. To our knowledge, this is the first report of *P. anomala* with potential for biocontrol of bacterial fruit blotch of hami melon caused by *A. avena* subsp. *citrulli*.

Key words: bacterial fruit blotch; yeast; ITS-5.8S rDNA; identification

利用组织培养技术,能够迅速去除病毒和更新品种,加快百合的繁殖速度,缩短生育周期,弥补种球繁育的不足。植物组织培养是利用植物组织或器官作为外植体,使它们产生完整的植株,通常是先使它们发生脱分化。但到目前为止,还有很多植物的组织或器官在离体培养时脱分化的比率低,有些甚至不发生脱分化。脱分化过程与组织、细胞内部物质代谢的变化有关。所以,对脱分化机理的研究是重要的植物组织培养应用基础研究理论课题。现以鳞茎为外植体进行离体培养,以激素调节处理与无激素处理进行对比,分析几种生理生化指标的变化规律,研究离体培养中激素影响百合再生的机理,以期为新铁炮百合的推广和深入研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试百合品种为新铁炮百合“沈香一号”(暂定名),沈阳农业大学选育。

1.2 试验方法

把供试百合的鳞茎接种在2种培养基上(要求接种条件一致),一种为最佳初代诱导培养基MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L,另一种为MS无激素培养基(对照)。外植体选择鳞片接种,光照强度2 000 lx,温度(25±1)℃,每天光照时间12 h。把经过不同培养时间(0、7、14、21、28、35 d)的百合鳞茎进行冷冻保存,35 d进行指标测定。

1.3 生理生化指标的测定方法

蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝法^[3];糖及淀粉含量的测定采用蒽酮比色法^[4];SOD活性的测定采用NBT光化还原法^[5];丙二醛含量的测定采用硫代巴比妥酸比色法^[6];数据处理及作图采用Excel软件。

2 结果与分析

2.1 新铁炮百合再生苗诱导过程中蛋白质含量的变化

2.1.1 新铁炮百合再生苗诱导过程中可溶性蛋白含量变化 由图1可以看出,用激素处理离体百合鳞片在诱导过程中,随着不定芽的直接分化,蛋白质含量随着培养天数逐渐上升,到28 d时达到峰值3.803 mg/g之后呈急速下降趋势。其中7~14 d略有降低,这可能是外植体在培养初期开始分化尚未合成新的蛋白质,原有蛋白质被消耗所致。用激素处理的百合鳞片可溶性蛋白含量变化趋势与对照(CK)差异较大,用激素处理过的百合鳞片中可溶性蛋白含量的变化趋势较大,并且上升下降的程度比较大,而未处理的百合鳞片中蛋白含量的变

化比较平稳。说明适宜的激素处理可以调节鳞片外植体内蛋白质代谢,使蛋白质活性增强,可溶性蛋白含量变化较大。

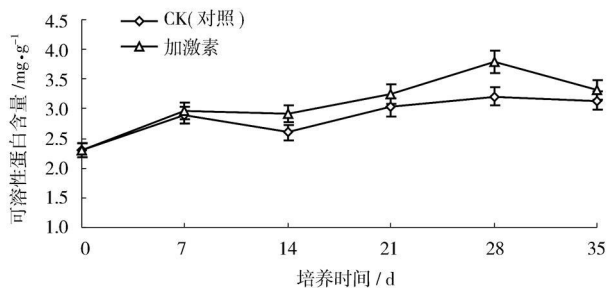


图1 再生苗诱导过程中可溶性蛋白含量变化

2.1.2 新铁炮百合再生苗诱导过程中非可溶性蛋白含量的变化

前人研究表明,非可溶性蛋白主要是一些不具备生理活性的结合蛋白。从图2可以看出,用激素处理的离体百合鳞片在诱导过程中,非可溶性蛋白随着脱分化进程推进逐渐上升,培养到28 d时呈现最高值0.443 mg/g,之后趋于平稳。未用激素处理的离体百合鳞片非可溶性蛋白随着培养天数逐渐上升,到28 d时达到最大值0.51 mg/g,之后逐渐下降,趋势比较缓慢。用激素处理的百合鳞片在离体诱导过程中非可溶性蛋白含量比对照(CK)含量少。可能是因为用激素处理后,蛋白质活性增强,蛋白质代谢变快,非可溶性蛋白减少。

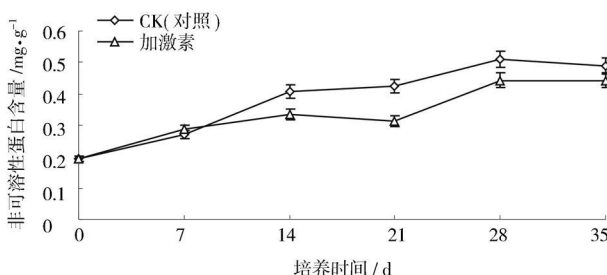


图2 再生苗诱导过程中非可溶性蛋白含量变化

2.2 新铁炮百合再生苗诱导过程中糖含量的变化

2.2.1 新铁炮百合再生苗诱导过程中可溶性糖含量的变化

在诱导过程中,百合鳞片外植体中可溶性糖含量变化显著,趋势如图3所示。加激素的百合鳞片外植体在整个培养期呈波动不大的平稳趋势,在21 d时为最高值5.828 mg/g。无激素处理的百合鳞片外植体(CK)在诱导过程中可溶性糖含量在培养初期呈下降趋势,在7 d达到最低值1.552 mg/g,之后开始逐渐上升到14 d后开始快速上升,在21 d时达到最大值10.824 mg/g,之后开始迅速下降与培养7 d水平相似,之后趋于平稳。对比2种处理的可溶性糖含量变化趋势,加激素处理变化幅

度小,说明再生苗诱导过程中,激素可以调节外植体中碳代谢,保持较稳定的可溶性蛋白含量。

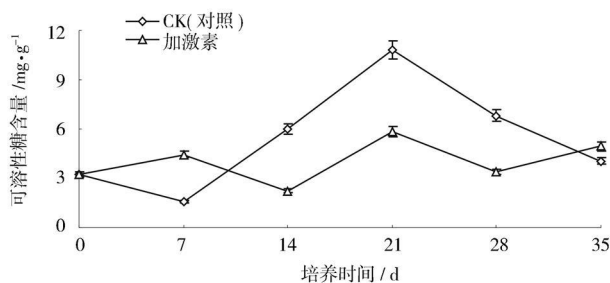


图3 再生苗诱导过程中可溶性糖含量变化

2.2.2 新铁炮百合再生苗诱导过程中淀粉含量的变化

在器官形态发生中,淀粉代谢是影响百合鳞片形态发生途径的关键因素之一,从图4可以看出,加激素的离体百合鳞片在诱导过程中初期与不加激素的差异不明显,到培养21 d时,经激素处理的百合鳞片淀粉含量比未处理的百合鳞片淀粉含量高很多。从总体趋势上看,加激素处理淀粉含量随时间变化比对照处理更平稳,这与外植体中可溶性糖的变化趋势相对应。淀粉作为一种在细胞中可利用的能源和结构物质,在分化过程中呈现出积累、消耗、再积累的变化过程,同时可以看出培养28 d后激素处理可以加快外植体内淀粉的分解,使淀粉通过碳代谢过程为外植体更稳定的提供能量。

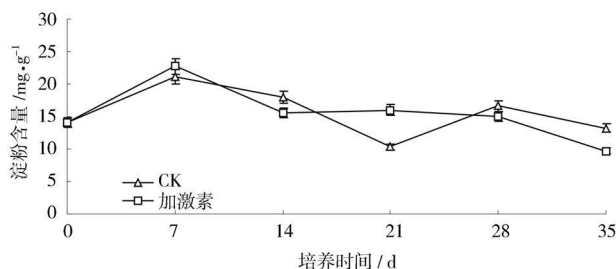


图4 再生苗诱导过程中淀粉含量变化

2.3 新铁炮百合再生苗诱导过程中丙二醛含量的变化

丙二醛是反映植物体衰老重要的指标。植物器官衰老时或在逆境条件下,往往发生膜脂过氧化作用,其产物丙二醛(MDA)会严重损伤生物膜。通常利用它作为膜脂过氧化指标表示细胞膜脂过氧化程度和植物衰老指标及对逆境条件反映的强弱。由图5可以看出,在培养前7 d MDA 含量均呈升高状态,这与外植体在接种时受损伤有关,经过激素处理的百合鳞片在14 d时MDA 含量最低,测定值为8.436 mg/g,后开始缓慢升高,未处理的外植体在21 d后MDA 含量上升较快。激

素处理的百合鳞片在离体诱导过程中MDA 含量均低于对照(CK)的离体百合,说明在诱导过程中,适宜的激素处理可提高外植体的抗逆性,减缓组织衰老。

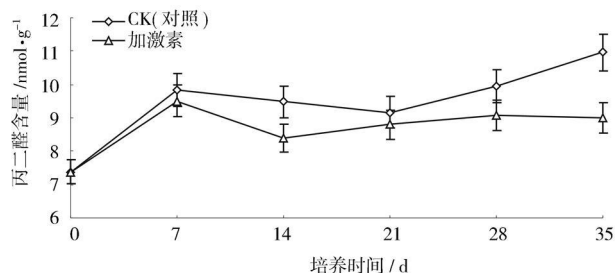


图5 再生苗诱导过程中丙二醛含量变化

2.4 新铁炮百合再生苗诱导过程中超氧化物歧化酶活性的变化

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,简称SOD)是生物体内普遍存在的一种活性氧清除剂,它能清除对生物体有毒害作用的氧自由基,保护细胞膜的稳定性,有效地防止细胞膜的衰老。在百合离体鳞片诱导再生过程中,SOD 活性的变化总体呈先上升后下降的趋势。由图6可以看出,2条曲线大体变化趋势相同,均为培养初期上升;未经过激素处理的百合鳞片SOD 活性到7 d开始下降,加激素的百合鳞片在21 d时达到最大值485.516 mg/g,随后缓慢下降;无激素处理的百合鳞片SOD 值与加激素处理在前期差距很小,14 d后差距加大,在培养28 d后,不加激素的百合鳞片中SOD 活性迅速下降。综合比较二者的异同,可知适当的添加激素可以增加外植体内超氧化物浓度,增强其抗氧化性损伤的能力。

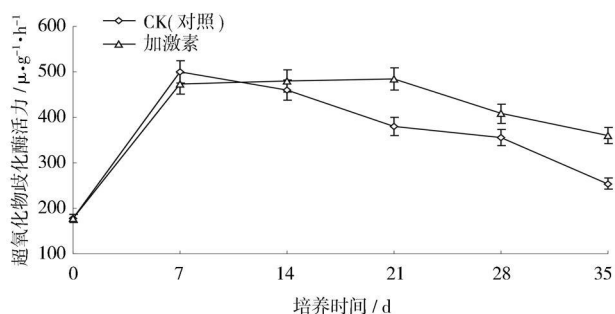


图6 再生苗诱导过程中SOD 活性变化

3 讨论

不同植物、组织和器官在离体培养条件下对脱分化的诱导条件要求是不同的,虽然引起植物组织脱分化的原因较复杂,受影响的因素又是多方面的,但最终结果都会通过生理生化的反应表现出来。新铁炮百合在脱

分化过程中, 百合鳞茎中糖、淀粉、蛋白质、SOD、MDA 都有不同程度的变化, 且表现出添加激素在碳代谢、蛋白质代谢和抗逆性的指标中的优势。

脱分化期间, 新铁炮百合鳞茎为了维持正常的生理代谢活动, 必须不断地消耗贮藏的养分。淀粉和可溶性糖可能是作为形态建成过程中迅速可利用的贮藏能源, 淀粉与可溶性糖的转化影响外植体形成建成。适宜的激素可以促进鳞片外植体可溶性糖和淀粉的分解及相互转化, 从而调节碳代谢过程, 同时通过增强有关酶活性, 用来转化这些物质以满足鳞片形态发生的能量需要。

生物机体中的每一个细胞和所有重要组成部分都有蛋白质参与, 所以新铁炮百合脱分化期间, 可溶性蛋白质含量的高低可间接反应各种代谢活动的强弱。有研究表明, 大白菜品种的耐热性与可溶性蛋白质含量成正相关, 耐热性强的品种其可溶性蛋白质下降的幅度低于不耐热的品种^[7]。可溶性蛋白可以反应组织细胞中酶的含量, 虽然它们是次生代谢的酶, 但它和细胞分裂生长有着密切的关系。试验中百合的可溶性蛋白含量和非可溶性蛋白含量均表现出逐渐增加。这些变化都说明百合脱分化时期, 其发育与蛋白质的分解代谢密切相关。通过对比可以看出, 培养基中添加适当激素可以调节蛋白质代谢, 增加组织中可溶性蛋白质含量, 提高

新铁炮百合体内蛋白质活性。

对新铁炮百合外植体进行膜脂过氧化相关指标测定结果表明, 在百合脱分化过程中, MDA 的含量是平稳中有所增加, 变化趋势是先快速增加再缓慢增加。而 SOD 的含量则是先大幅度的增加随后很长一段时间内缓慢下降。可见新铁炮百合在脱分化过程初期由于外植体在接种时受损伤, 造成明显的膜脂过氧化作用波动。通过添加激素处理与常规培养相比较可知, 添加激素可以明显增加新铁炮百合组织中 SOD 含量和降低 MDA 含量, 从而增强其抗逆性和环境适应能力。

参考文献

- [1] 穆鼎. 观赏百合—生理、栽培、种球生产与育种[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 2-5.
- [2] 赵祥云, 王文和. 百合品种退化原因及国产种球繁殖与复壮技术[J]. 中国花卉园艺, 2008(6): 14-17.
- [3] 张治安, 张美善, 蔚荣海. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004: 65-67, 75-76.
- [4] 何照范. 粮油籽粒品质及其分析技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1985: 140-150.
- [5] 郝建军, 刘延吉. 植物生理实验技术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2001: 86-169.
- [6] 邹琦. 植物生理生化实验指标[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [7] 叶陈亮, 柯玉琴, 陈伟. 大白菜耐热性的生理研究酶性和非酶性活性氧清除能力与耐热性[J]. 福建农业学报, 1997, 26(4): 498-501.

Physiological and Biochemical Changes During Regeneration of the *Lilium longiflorum* Thunb

CHEN Li-jing¹, SUN Chun-yu¹, MA Hui¹, TAO Cheng-guang², RUAN Yan-ye³, LI Tian-lai¹, WANG Yu-kun¹

(1. Bioscience and Technology Institute and Key Laboratory of Protected Horticulture, Ministry of Education, Shenyang Agricultural University, Shenyang Liaoning 110161; 2. The Liaoning Academy of Agricultural Sciences Shenyang Liaoning 110161; 3. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: With new varieties of the *Lilium longiflorum* Thunb "ShenXiang1" as the experimental material, determined and analyzed the effects of hormones on physiological and biochemical variations of the *Lilium longiflorum* Thunb, on MS medium added 6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L and one without hormone. The results showed that with the hormone treatment of regenerated seedlings of the *Lilium longiflorum* Thunb, the increasing of soluble protein and non-soluble protein content was much bigger. Proper hormone treatment could induce the mutually transformational of soluble sugar and starch content, could induce Malondialdehyde (MDA) content and bring down superoxide dismutase (SOD) of the *Lilium longiflorum* Thunb. In conclusion, hormone treatment could enhance the protein and carbohydrate metabolism in the process of the *Lilium longiflorum* Thunb differentiation and de-differentiation, and improved organizational resistance.

Key words: *Lilium longiflorum* Thunb; bulb; hormones; regeneration; physiological and biochemical changes