

满天星试管玻璃化苗与正常苗的比较研究

曹天旭¹, 朴炫春², 廉美兰², 李美兰³

(1. 黑龙江农业经济职业学院绿色农业系, 黑龙江牡丹江 157041; 2. 延边大学长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 吉林延吉 133002; 3. 延边农业科学研究院, 吉林龙井 133400)

摘要:以满天星组培正常苗和玻璃苗为材料, 通过生理生化特性、同工酶分析, 探讨了满天星试管苗玻璃化发生原因。结果表明: 玻璃苗组织含水量较高, 为 95.8%, 而正常苗为 91.7%。玻璃苗的各种叶绿素平均含量及可溶性糖和还原糖含量分别为正常苗的 14.0%, 63.8% 和 86.9%; 而玻璃苗的过氧化物酶(POD)的活性增加, 是正常苗的 2.6 倍。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法对酯酶同工酶进行分析结果表明, 玻璃苗的酯酶同工酶电泳谱带出现缺失的异常现象, 同时其谱带颜色较浅; 过氧化物同工酶电泳结果表明玻璃苗与正常苗相比活性增加且谱带增多。

关键词: 满天星; 玻璃苗; 生理生化特性; 同工酶

中图分类号: S681.9 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)05-0086-03

Comparison between Vitrification and Normal Shoots of *Gypsophila paniculata* in vitro

CAO Tian-xu¹, PIAO Xuan-chun², LIAN Mei-lan², LI Mei-lan³

(1. Green Agriculture Department of Heilongjiang Agricultural Economy Vocational College, Mudanjiang, Heilongjiang 157041; 2. Key Laboratory for Organism Resources of the Changbai Mountain and Functional Molecules (Yanbian University), Ministry of Education, Yanji, Jilin 133002; 3. Yanbian Academy of Agricultural Sciences, Longjing, Jilin 133400)

Abstract: Normal and vitrification shoots was used in this experiment for proving up the mechanism of vitrification in *Gypsophila paniculata* L. through physiological and biochemical characteristic EST isozyme activity. Water content of vitrification shoot (95.8%) was higher than that of normal shoot (91.7%). For Chlorophyll average content, solubility and reductive sugar content, vitrification shoot was 14.0%, 63.8% and 86.9% of normal shoot, respectively, but POD activity of vitrification shoot increased, was 2.6 folds of normal shoot. The result of EST isozyme analysis using PAGE method, electrophoresis of EST isozyme appeared abnormality of lacking band, moreover band color was slight. In vitreous shoots the electrical conductivity and the activity of POD increased.

Key words: *Gypsophila paniculata* L.; vitrification; physiological and chemical characteristic; ES isozymes

满天星(*Gypsophila paniculata* L.)别名霞草,属于石竹科丝石竹属,为多年生宿根草本花卉,是世界上著名的切花植物之一。近些年,在满天星试管苗的扩繁方面已有大量的研究报道^[1-4],认为在规模化生产中,满天星组培快繁相对于其它花卉比较容易获得成功,但普遍存在玻璃化现象。导致玻璃苗发生的因素很多^[5],同时,玻璃苗一旦产生,其增殖系数明显下降,且因体内含水量高,吸收与光合功能不全,移栽不易生根,难以成活,因此玻璃化现象成为试管苗生产的一大

障碍^[5-6]。

目前,关于试管苗玻璃化现象的研究较为广泛^[5,7],主要通过对玻璃化苗的形态解剖学和植物生理学方面的研究,来探讨玻璃化发生的机理,从实践中提出一些防止试管苗玻璃化发生的有效措施。但是,关于试管苗玻璃化现象发生机理还比较模糊,尤其是从分子水平对玻璃化现象发生机理的研究尚未见报道。

本研究通过测定满天星试管正常苗和玻璃苗的某些生理生化指标和同工酶的分析,探讨满天星玻璃苗的生理特性和形成机理,同时利用 RAPD 技术,首次分析了玻璃苗与正常苗在分子水平上的差异,为玻璃化的有效控制提供依据。

收稿日期: 2009-05-14

第一作者简介: 曹天旭(1980-)男,吉林农安人,讲师,主要从事植物组织培养与植物生物技术方面的研究。E-mail: sixu5678000@163.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料

将茎尖培养得到的满天星试管苗接种于 $2MS + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA} + 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 蔗糖} + 7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 琼脂}$ 培养基中获得正常苗,接种于 $2MS + 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA} + 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 蔗糖} + 7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 琼脂}$ 培养基中获得玻璃苗。培养温度为 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿度 75% , 光照强度为 1600 lx , 每天光照 16 h 。培养 30 d 后, 取生长一致的正常苗和玻璃苗作为试验材料。

1.2 生理生化指标的测定

1.2.1 组织含水量 称取 0.5 g 左右鲜样, 于 $105 \sim 110 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱内杀青 $10 \sim 15 \text{ min}$, 后于 $70 \sim 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下烘干至恒重, 再精确称重, 并计算组织含水量。

1.2.2 叶绿素含量测定 采用丙酮法测定叶绿素含量^[8]。

1.2.3 可溶性糖含量的测定 采用蒽酮比色法^[8]。

1.2.4 还原糖含量的测定 采用 3,5-二硝基水杨酸比色法 (DNS)^[9]。

1.2.5 过氧化物酶 (POD) 活性测定 采用愈创木酚氧化法^[9]。

1.3 酯酶同工酶分析

取 0.3 g 叶片, 放入预冷的研钵中, 加入液氮研磨至粉末, 转入 1.5 mL 的离心管中, 加入 2 倍体积预冷的 $2 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ pH}8.0$ 的 Tris-HCl 缓冲液, $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min , 上清液采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离胶 ($\text{pH} 8.8$) 7.00% , 250 V 电压, 浓缩胶 ($\text{pH}6.8$) 4.00% , 200 V 电压, 在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内电泳。酯酶用醋酸萘酯—坚牢蓝 RR 盐染色法染色。同工酶区带的相对迁移率 (R_f) = 酶带移动距离 / 溴酚兰迁移距离。

1.4 过氧化物同工酶分析:

称取 0.2 g 叶片, 加 1 mL 预冷的 $0.128 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} 6.8$ 的 Tris-HCl 缓冲液研磨成匀浆后, $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min , 取上清加入等体积 10% 甘油, 摇匀后放 $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存。上清液采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离胶 ($\text{pH} 8.8$) 7.00% , 250 V 电压, 浓缩胶 ($\text{pH}6.8$) 4% , 200 V 电压, 在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内电泳。过氧化物酶同工酶染色采用联苯胺法。

2 结果与分析

2.1 各项生理指标和酶活性的测定

称取满天星玻璃苗鲜重 50.02 mg 和正常苗 50.40 mg 后, 经 $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 杀青, $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘至恒重。从表 1 可见, 正常苗和玻璃苗的干重分别为 4.18 mg 和 2.12 mg , 组织含水量玻璃苗 (95.8%) 多于正常苗 (91.7%)。玻璃苗的含水量明显高于正常苗, 说明植物体内由于自由水含量及水势增高, 束缚水含量降低^[10], 导致玻璃苗水分

生理异常, 生理代谢水平有可能下降^[11]。

表 1 玻璃苗与正常苗组织含水比较

类型	鲜重/mg	干重/mg	组织含水量/%
正常苗	50.40	4.18 **	91.7
玻璃苗	50.02	2.12	95.8 **

注: ** 为 0.01 显著水平 t 测验结果。

通过正常苗和玻璃苗的叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素总含量和可溶性总糖、还原糖含量及过氧化物酶活性的测定, 可知叶绿素含量玻璃苗明显低于正常苗, 玻璃苗的叶绿素 a、b 和总叶绿素含量仅为正常苗的 14% , 而叶绿素 a 与叶绿素 b 的比值两者间无差异 (见表 2)。从玻璃苗和正常苗的叶绿素含量测定结果, 表明玻璃化苗的水分代谢失调, 导致叶绿素合成系统受损或受阻, 合成的叶绿素少, 呈淡绿色或暗绿色, 同时无功能性气孔, 使玻璃苗光合效率降低, 随之其他代谢过程也受到影^[11], 移栽后玻璃化苗难以成活。可溶性总糖和还原糖的含量玻璃苗为正常苗的 63.8% 和 86.9% , 也是玻璃苗低于正常苗。玻璃苗和正常苗可溶性糖和还原糖含量测定结果可看出, 玻璃苗对培养基中碳源的吸收与转化能力低, 从而使玻璃苗含糖量降低, 因碳源供应的不足, 造成玻璃苗生长缓慢, 增殖率下降^[12]。玻璃苗的过氧化物酶的活性为 $1.33 (\Delta A470/\text{min} \cdot \text{gFW})$, 而正常苗仅为 $0.52 (\Delta A470/\text{min} \cdot \text{gFW})$, 玻璃苗高于正常苗, 是正常苗的 2.6 倍。过氧化物酶与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化有关, 一般在老化组织中活性较高, 幼嫩组织中活性较弱, 过氧化物酶活性高可抑制生长素的活动, 使细胞伸长较少, 导致组织畸变^[13]。玻璃苗的过氧化物酶活性较正常苗高, 说明玻璃苗组织中对碳水化合物的吸收减少, 妨碍了植物的正常生理代谢。从而导致了玻璃苗组织结构的变化, 使其形体异常。

表 2 满天星玻璃苗与正常苗生理生化特征

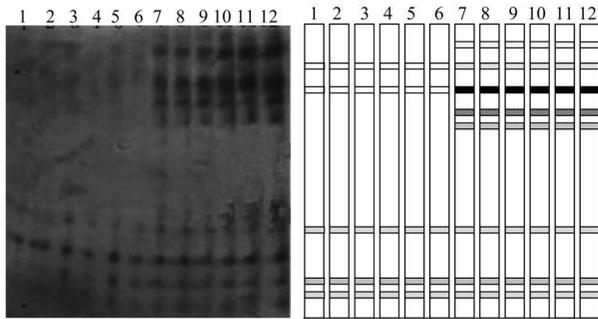
指标	玻璃苗	正常苗
叶绿素总量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$	0.15	1.07 **
叶绿素 a/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$	0.05	0.37 **
叶绿素 b/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$	0.10	0.70 **
叶绿素 a/b	0.53	0.53
可溶性总糖/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$	13.47	21.11 **
还原糖/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$	3.04	3.50 **
过氧化物酶活性 ($\Delta A470/\text{min} \cdot \text{gFW}$)	1.34 **	0.52

注: ** 为 0.01 显著水平 t 测验结果。

2.2 酯酶同工酶分析

对正常苗和玻璃苗进行酯酶同工酶酶谱分析, 结果表明正常苗和玻璃苗酯酶同工酶酶谱数及其活性存在明显差别 (见图 1)。正常苗的谱带数为 8 条, 而玻璃苗为 5 条, 玻璃苗缺少 R_f 值为 0.067 、 0.333 和 0.693 的三条谱带, 且玻璃苗的谱带颜色较正常苗浅, 说明玻璃苗不仅有缺失的谱带, 而且其活性也较正常苗低。

酯酶同工酶是一类比较复杂的酶,它参与许多酯类物质的合成和分解,有一些酯酶还参与许多非生理性酯类物质的分解,以及解毒作用,维持体内的代谢平衡。本试验结果表明玻璃苗酯酶同工酶谱带数减少,而且活性减弱,但这种酶在玻璃化中所起的作用尚需进一步探讨。这说明了玻璃苗在基因表达调控上出现差异,其内部机制可能已发生变化。

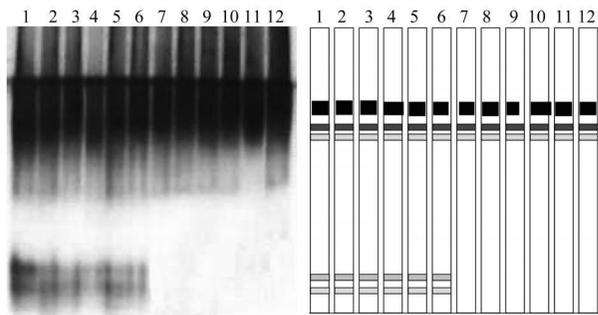


1~6:玻璃苗;7~12:正常苗

图1 正常苗和玻璃苗酯酶同工酶电泳

2.2 过氧化物同工酶分析

过氧化物酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明(见图2),玻璃苗的过氧化物酶活性明显高于正常苗,与酶活性测定结果一致,且玻璃苗过氧化物酶的谱带数也明显多于正常苗。由图2还可以看出,上述酶谱



1~6:玻璃苗;7~12:正常苗

图2 正常苗与玻璃苗过氧化物同工酶电泳

反映的是玻璃苗和正常苗的碱性过氧化物酶同工酶谱带和酶活性上的差异。碱性过氧化物酶具有IAA氧化酶的功能,并可以反映内源生长素水平,故玻璃苗碱性区酶带活性的增高可能反映了内源生长素水平的降低,从而可进一步影响生理生化代谢的变化。

3 结论

3.1 与正常苗相比,玻璃苗组织含水量、POD活性增加,而各种叶绿素含量及可溶性糖和还原糖含量低于正常苗。

3.2 与正常苗相比,玻璃苗的酯酶同工酶电泳谱带出现缺失现象,且谱带颜色较浅;过氧化物同工酶活性增加,谱带数增多。

参考文献:

- [1] 李黎,陈菲,曲彦婷.重瓣丝石竹的组织培养与快速繁殖[J].国土与自然资源研究,2004(2):96.
- [2] 韩玉琴.重瓣丝石竹规模化繁殖技术研究[J].北方园艺,2005(2):6.
- [3] 张春华,朴炫春,廉美兰等.培养基组成对满天星试管苗增殖的影响[J].延边大学学报,2005(1):35-39.
- [4] 陶艳,高红梅.满天星组培快繁体系的研究[J].云南农业科技,2005(5):18-19.
- [5] 卜学贤,陈维伦.试管植物的玻璃化现象[J].植物生理学通讯,1987(5):13-18.
- [6] 刘恩颖,王泰哲.香石竹玻璃苗的研究[J].园艺学报,1988(4):272-276.
- [7] 李彬.满天星试管苗继代培养中玻化苗的防治[J].甘肃农业科技,1999(3):46-47.
- [8] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2003:134-137.
- [9] 林加涵,魏文玲,彭宣宪.现代生物学实验(下册)[M].北京:高等教育出版社,2003:2-7.
- [10] 师较欣,陈四维.苹果砧木离体培养中玻璃化问题的研究[J].河北农业大学学报,1990,13(3):12-16.
- [11] 杨俊英,罗庆熙,宋明等.大蒜试管苗玻璃化机理的研究[J].西南农业学报,2005,18(6):801-805.
- [12] 贾伟琰,周小梅.康乃馨玻璃苗生理生化探讨[J].山西大学学报,1997,20(2):228-231.
- [13] 胡能书.同工酶技术及其应用[M].长沙:湖南科学技术出版社,1985.

(上接第85页)

在品质,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 何在佳.民乐苹果梨套袋技术[J].甘肃农业,2005(12):240-241.
- [2] 张红菊,赵怀勇,张东星,等.成龄密植苹果梨套袋技术研究[J].北方园艺,2006(3):84-86.
- [3] 柴全喜,许栋芬,何新朝,等.不同果袋对鸭梨套袋的效果[J].河北果树,2001(1):7-8.
- [4] 顾文毅,廖东.套袋对冬果梨品质及果皮特征的影响[J].农业科技通讯,2008(4):47-48.

- [5] 简经,李晓刚,颜志梅,等.套袋对梨果实品质的影响[J].江苏农业科学,2005(5):84-85.
- [6] 陈贵虎,李辉国.套袋对梨果实品质的影响[J].落叶果树,2005(2):13-14.
- [7] 程昌凤,廖聪学,吴纯清,等.翠冠梨套袋试验初报[J].西南园艺,2004(6):6-8.
- [8] Hong K H, Kim J K, Jang H I, et al. Effect of paper sources for bagging on the appearance of fruit skin in Oriental pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai cv. Gam chonbae and Yeongsanbae) [J]. J Korean Soc Hort Sci., 1999, 40(5):554-558.