

植物生理科学

培养基渗透压对延缓生长的苹果组培苗生理
代谢指标影响

王 晨,师校欣,杜国强,黄瑞虹
(河北农业大学园艺学院,河北保定 071001)

摘 要:以富士、乔纳金苹果试管苗为试材,研究了不同渗透压处理下苹果组培苗延缓生长以及恢复生长后 SOD、POD 活性和 MDA 含量的变化,以期为筛选苹果组培苗延缓生长种质保存的适宜方法提供依据。结果表明:在延缓生长保存期间,随培养基中蔗糖、琼脂浓度提高,添加甘露醇,试管苗 SOD、POD 活性逐渐升高,而 MDA 含量呈下降趋势,依品种不同分别在蔗糖浓度达到 50~60g/L、琼脂浓度达到 10~14g/L、甘露醇浓度达到 30~40g/L 时达显著差异水平。恢复生长当代试管苗的 SOD 活性、POD 活性以及 MDA 含量处理间表现相同。研究认为添加 50~60g/L 的蔗糖适宜苹果试管苗延缓生长法种质保存。
关键词:渗透压;苹果组培苗;POD 活性;SOD 活性;MDA 含量
中图分类号:S661 **文献标识码:**A

**Effect of Osmotic Pressure in Media on Physiological Indices of
Apple Explants *in vitro* for Retardant Growth Conservation**

Wang Chen, Shi Xiaoxin, Du Guoqiang, Huang Ruihong
(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: It was studied that the changes of SOD and POD activity and MDA amount in Fuji and Jonagold apple explants *in vitro* during conservation period in subculture media under certain osmotic pressures and recovery process in order to optimize the culture condition for retardant growth. The results showed that the SOD and POD activity increased and MDA amount decreased gradually along with the enhancing of the concentration of Sucrose, Agar, and Mannitol in subculture media during conservation period. The significant difference was found when the concentration was reached 50–60g/L of Sucrose, 10–14g/L of Agar, and 30–40g/L of Mannitol, depending on varieties. This difference disappeared when the explants were transferred to the conventional medium for recovery growth culture. It suggests that the supplying of 50–60 g/L Sucrose in a medium is suitable for retardant growth conservation in apple.

Key words: osmotic pressure, apple *in vitro*, SOD activity, POD activity, MDA amount

种质保存是利用天然或人工环境保存种质资源,并使材料保持完整的遗传性、最低的变异性和最高的生活力,且能通过繁殖将其遗传特性传递下去^[1]。当前果树种质资源离体保存的主要方法是采用植物组织培养技术,在组织培养中,培养物培养一段时间后,由于营养消耗、水分蒸发,要及时将其接种到新的培养基中

继代培养,以促进培养物分化增殖、生长。但在长期继代培养过程中,培养材料长期受外源激素的刺激,发生变异的几率会随之增大。通过在培养基中添加高渗化合物造成逆境环境可减少营养吸收,减弱新陈代谢活动,延缓细胞生长,从而达到延长继代保存时间,减少继代次数,降低变异几率的目的。

基金项目:河北省自然科学基金资助项目“不同继代次数苹果组培苗种质保存特性研究”(C2008000287)。

第一作者简介:王晨,女,1982 年出生,硕士研究生,主要从事果树生物技术研究。通信地址:071001 河北省保定市河北农业大学园艺学院, Tel: 0312-7528322, E-mail: biotech@hebau.edu.cn。

通讯作者:师校欣,女,1966 年出生,教授,硕士,主要从事园艺植物生物技术研究。通信地址:071001 河北省保定市河北农业大学园艺学院, Tel: 0312-7521817, E-mail: shixx@hebau.edu.cn。

收稿日期:2008-03-15,修回日期:2008-04-15。

许多逆境都能导致机体活性氧代谢的失调与自由基的积累,并进一步导致细胞膜结构损伤,所以,植物抗逆性的形成常常与抗氧化系统的活性增强密切相关^[2]。逆境胁迫时,植物体内可通过调节抗氧化酶类物质(如超氧化物歧化酶 SOD、过氧化物酶 POD 等)来抵御和清除活性氧,抑制膜脂过氧化,维持膜的稳定性;丙二醛(MDA)是膜脂受活性氧伤害而发生氧化的产物,其含量可反映植物遭受逆境伤害的程度^[3-5]。目前的报道多集中在干旱、水分、盐胁迫及低温逆境下保护酶活性、MDA 含量等研究方面^[2-11],种质保存的相关文章中对苹果试管苗的继代保存时间和存活率的报道较多^[12-14],但目前尚无对渗透压处理的苹果试管苗生理指标的研究报道。笔者通过对不同渗透压处理下苹果组培苗延缓生长以及恢复生长后 SOD、POD 活性和 MDA 含量的变化检测,探索渗透压处理造成逆境后组培苗的生理变化,结合延缓生长的情况,为筛选适宜的组培苗延缓生长的渗透压处理提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料为苹果品种乔纳金 (*Malus domestica* cv. Jonagold)、富士 (M. cv. Fuji) 试管苗,继代培养基:MS+BA0.5mg/L+NAA0.05mg/L+蔗糖 30g/L+琼脂 6g/L,pH6.0。试验于 2007 年在河北农业大学园艺学院生物技术实验室进行。

1.2 培养条件

试管苗培养条件:(25±3)℃,光照强度 2000lx,14h 照光/10h 黑暗。

1.3 试验方法

在富士、乔纳金苹果组培苗继代培养基中分别添加不同浓度的琼脂、蔗糖、甘露醇,造成不同渗透压延

缓生长培养 120d,转入相同继代培养基恢复生长 60d 后对组培苗的 SOD 活性、POD 活性以及 MDA 含量进行测定。随机称取 0.5g 样品(重复 3 次),加入 5.5ml pH7.8 的磷酸缓冲液,冰浴研磨,再加 2ml 磷酸缓冲液将研钵冲洗干净。在 10000r/min 下离心 20min,酶液用于 MDA、SOD、POD 的测定。MDA 测定参考张宪政的硫代巴比妥显色法测定;SOD 测定参考李柏林和梅慧生的 NBT 还原法测定,POD 测定参考李合生的愈创木酚显色法测定。

$MDA=[6.45 \times (D_{532}-D_{600})-0.56 \times D_{450}] \times \text{提取液体积} / \text{鲜重}$

$SOD=(\text{对照 OD 值}-\text{样品 OD 值}) / \text{鲜重} \times \text{稀释倍数}$

$POD=\text{样品 OD 值} / \text{鲜重} \times \text{稀释倍数}$

测定数据用 DPS 软件进行方差分析,显著水平 0.05。

2 结果与分析

2.1 蔗糖浓度对苹果组培苗延缓生长、恢复生长后 SOD、POD 活性和 MDA 含量的影响

在植物组织培养中,培养基中的蔗糖不仅提供碳源,也影响培养基的渗透势,进而影响试管苗生长发育。在培养基中添加适当的蔗糖浓度,能提高试管苗干物质含量,促进多糖物质的合成和贮藏,增强试管苗的抗逆能力,有利于组培苗的生长,但蔗糖浓度过高则会改变培养基中渗透压,使多糖物质的合成和贮藏受阻,影响营养物质的吸收及植株的正常生长^[9]。

对富士、乔纳金苹果试管苗添加蔗糖改变渗透压延缓生长培养 120d 后恢复生长 60d,分别对试管苗的 SOD 活性、POD 活性以及 MDA 含量进行测定。结果如表 1 所示:延缓生长处理中随着蔗糖浓度的增加,呈 SOD、POD 活性增强、MDA 含量下降趋势。对数据进行方差分析可以看出:对照植株 SOD、POD 活性最低、

表 1 蔗糖浓度对苹果组培苗 SOD、POD 活性和 MDA 含量的影响

苹果 品种	蔗糖 /(g·L ⁻¹)	延缓生长			恢复生长		
		SOD/(U·g ⁻¹ FW)	POD/(U·g ⁻¹ FW)	MDA/(μmol·g ⁻¹ FW)	SOD/(U·g ⁻¹ FW)	POD/(U·g ⁻¹ FW)	MDA/(μmol·g ⁻¹ FW)
富士	30	190.38b	68.75b	6.71a	133.71a	51.97a	5.88a
	40	183.74b	84.70ab	5.94ab	132.82a	53.78a	4.93a
	50	214.49a	88.52a	5.85ab	137.36a	56.32a	5.85a
	60	221.67a	94.31a	5.05b	140.39a	52.02a	4.77a
	70	228.76a	94.96a	4.82b	142.10a	57.34a	4.64a
乔纳金	30	197.04b	54.76b	6.81a	136.23a	43.59a	4.34a
	40	199.14b	75.57ab	7.00a	142.74a	46.21a	4.86a
	50	207.83ab	83.38a	6.86a	141.36a	47.66a	5.03a
	60	215.62a	90.06a	4.93b	143.08a	49.34a	5.11a
	70	223.04a	77.71a	4.77b	139.41a	50.12a	5.26a

注:表中同列数值后不同字母表示差异达 0.05 显著水平,相同字母表示差异不显著。以下各表相同。

MDA 含量最高,蔗糖浓度升至 50~60g/L 时处理植株 SOD、POD 活性差异提高,蔗糖浓度达到 60g/L 时 MDA 含量显著下降。延缓生长的试管苗转入普通继代培养基后当代即可恢复生长,测定当代试管苗的 SOD 活性、POD 活性以及 MDA 含量差异均不显著。从 SOD、POD 活性及 MDA 含量变化结果,作者认为苹果组培苗延缓生长以添加 60g/L 蔗糖为宜,这也与延缓试管苗生长的最适浓度相一致(另有论文发表)。

2.2 琼脂浓度对试管苗生理指标的影响

对苹果组培苗富士、乔纳金添加不同浓度的琼脂

延缓生长培养 120d 且恢复生长 60d 后,分别对试管苗的 SOD 活性、POD 活性以及 MDA 含量进行测定。结果如表 2 所示:琼脂浓度增加,SOD、POD 活性及 MDA 含量有所变化。琼脂浓度分别高于 12g/L 和 14g/L 时富士、乔那金试管苗 SOD 活性显著增加;琼脂浓度分别超过 10g/L 和 12g/L 时富士、乔那金试管苗 POD 活性显著增加;MDA 含量的变化两品种表现一致,均在添加 12g/L 琼脂时 MDA 含量差异下降。

恢复生长当代试管苗的 SOD 活性、POD 活性以及 MDA 含量各处理间差异均不显著。

表 2 琼脂浓度对苹果组培苗 SOD、POD 活性和 MDA 含量的影响

苹果品种	琼脂 /(g·L ⁻¹)	延缓生长			恢复生长		
		SOD/(U·g ⁻¹ FW)	POD/(U·g ⁻¹ FW)	MDA/(μmol·g ⁻¹ FW)	SOD/(U·g ⁻¹ FW)	POD/(U·g ⁻¹ FW)	MDA/(μmol·g ⁻¹ FW)
富士	6	204.96b	78.37b	7.45a	127.47a	47.53a	5.76a
	8	212.39b	89.58b	6.04ab	129.76a	38.72a	5.59a
	10	205.42b	111.96a	5.59ab	134.18a	44.12a	5.78a
	12	231.36a	113.13a	4.78bc	135.54a	44.70a	5.32a
	14	238.30a	110.68a	3.29c	132.56a	41.10a	5.85a
乔纳金	6	192.15b	80.19b	7.76a	135.89a	45.03a	6.85a
	8	192.34b	91.23b	7.49a	139.13a	42.92a	7.20a
	10	191.81b	108.14b	6.42ab	139.04a	36.96a	6.44a
	12	192.66b	145.17a	5.76b	132.00a	39.45a	7.00a
	14	227.30a	149.66a	4.01c	139.07a	41.08a	6.86a

2.3 甘露醇浓度对试管苗生理指标的影响

甘露醇是一种在植物代谢中不活泼的蔗糖乙醇,其作用机理是降低了细胞膨压,提高了培养基的渗透势负值,造成水分逆境,使水分和养分吸收受阻,减少营养消耗。同时细胞壁酶活性受到抑制,减弱新陈代谢活动,延缓细胞生长,培养基中加入一定浓度的甘露醇可减缓植株生长,延长保存时间^[13-15]。

对苹果组培苗富士、乔纳金添加甘露醇延缓生长

培养 120d 并且恢复生长 60d 后,分别对试管苗的 SOD 活性、POD 活性以及 MDA 含量进行测定。结果如表 5 所示:添加低浓度(10~20g/L)的甘露醇时 SOD 活性、POD 活性变化不显著,直至甘露醇浓度达到 30~40g/L 时,两品种 SOD 活性、POD 活性均显著增加;没有甘露醇或甘露醇浓度较低时两品种试管苗 MDA 含量处于较高水平,甘露醇浓度达到 20g/L 以上时富士试管苗 MDA 含量显著下降,甘露醇浓度达到

表 3 甘露醇浓度对乔纳金试管苗生理指标的影响

苹果品种	蔗糖+甘露醇 /(g·L ⁻¹)	延缓生长			恢复生长		
		SOD/(U·g ⁻¹ FW)	POD/(U·g ⁻¹ FW)	MDA/(μmol·g ⁻¹ FW)	SOD/(U·g ⁻¹ FW)	POD/(U·g ⁻¹ FW)	MDA/(μmol·g ⁻¹ FW)
富士	20+0	173.26b	232.19b	4.56a	132.46a	38.49a	6.81a
	20+10	191.34ab	239.78b	4.45a	127.37a	45.28a	6.71a
	20+20	198.92ab	262.74ab	3.67b	125.44a	42.07a	5.96a
	20+30	209.33a	285.43a	3.21b	133.62a	39.64a	6.34a
	20+40	211.63a	287.06a	2.46c	130.08a	45.11a	5.88a
乔纳金	20+0	211.64b	191.73b	8.28a	138.76a	39.28a	7.32a
	20+10	221.34ab	263.97ab	7.63a	136.23a	40.12a	6.71a
	20+20	219.98ab	270.26ab	6.97a	141.42a	39.27a	7.14a
	20+30	215.85ab	294.60a	4.10b	139.06a	43.06a	8.06a
	20+40	227.47a	298.14a	4.18b	135.84a	40.93a	7.63a

30g/L 以上时乔那金试管苗 MDA 含量显著下降。

延缓生长各处理的试管苗转入普通继代培养基后当代生长情况就恢复到处理前的状态,对试管苗的 SOD 活性、POD 活性以及 MDA 含量测定表明,各处理间差异均不显著。

3 讨论

植物种质离体保存时为减少继代次数、减少工作量、降低变异几率,需延缓试管苗生长。笔者对富士、乔纳金苹果试管苗提高渗透压处理后,抑制了试管苗生长,同时对不同渗透压处理下以及恢复生长后 SOD、POD 活性和 MDA 含量的变化研究表明,增加渗透压处理后的试管苗 SOD、POD 活性较对照高,MDA 含量较对照低。说明在保存过程中,增加渗透压后试管苗能发生生理代谢的协调变化以降低逆境对苹果试管苗细胞膜系统的伤害,增强保护酶的活性,从而增强试管苗对环境的抗逆性,延缓衰老,达到延长保存时间的目的。

从改变渗透压处理后试管苗生长受到抑制的生长状态和生理代谢变化的结果看,二者符合一定的规律,即达到或超过试管苗生长受到明显抑制的处理浓度后,其 SOD、POD 活性及 MDA 含量也发生显著变化。试验还发现了不同品种间的差异,富士在各处理中保存效果都很好,而乔那金在琼脂和甘露醇处理中有部分茎尖枯死,从 SOD、POD 活性及 MDA 含量的测定结果看,富士在较低的琼脂和甘露醇处理浓度下即表现差异,而乔那金品种 SOD、POD 活性及 MDA 含量变化较迟钝,在较高的浓度才表现差异,说明乔那金品种试管苗对逆境的适应性不及富士品种。

添加 50~70g/L 蔗糖对苹果试管苗的抑制作用明显^[13,14],笔者也研究证实,在 60g/L 的蔗糖浓度下,可有效延缓富士、乔那金试管苗生长,且此时试管苗生理活性较高,受逆境伤害最小,在恢复生长后的第 1 代,生长情况和生理代谢均恢复正常状态。结合延缓生长和生理指标检测结果,笔者认为添加 60g/L 左右的蔗糖适宜苹果试管苗的种质保存。提高琼脂浓度、添加甘露醇处理也抑制了试管苗生长,试管苗生理代谢也发生了相应变化,但对乔那金品种造成部分茎尖枯死,应慎重使用。

重使用。

4 结论

培养基中提高蔗糖、琼脂浓度,添加甘露醇,增加渗透压处理后乔纳金和富士的试管苗 SOD、POD 活性提高,MDA 含量降低。对其恢复生长后试管苗生理活性测定表明,恢复生长当代 SOD、POD 活性和 MDA 含量恢复正常。说明适当增加渗透压处理能增强保护酶的活性,延缓衰老,可用于种质离体保存。

参考文献

- [1] 马缘生.作物种质资源保存技术.北京:学术书刊出版社,1989:1-68.
- [2] 刘慧英,朱祝军,吕国华.低温胁迫对嫁接西瓜耐冷性和活性氧清除系统的影响.应用生态学报,2004,15(4):659-662.
- [3] 刘建福. NaCl 胁迫对澳洲坚果叶片生理生化特性的影响. 西南师范大学学报,2007,32(4):25-29.
- [4] 曹福亮,赵永艳,张往祥,等.盐胁迫对南方 7 个造林树种生理特性的影响.山东林业科技,1997,6:1-8.
- [5] 郭爱华,陈钰,姚延涛.低温逆境下杏花蕾中保护酶、蛋白质、MDA 含量变化初探.科技情报开发与经济,2007,17(23):161-162.
- [6] 杨方云,魏朝富,刘英.干旱胁迫下甜橙叶片保护酶体系的变化研究.植物营养与肥料学报,2006,12(1):119-124.
- [7] 孙国荣,彭永臻,阎秀峰,等.干旱胁迫对白桦实生苗保护酶活性及脂质过氧化作用的影响.林业科学,2003,39(1):165-167.
- [8] 韦小丽,徐锡增,朱守谦.水分胁迫下榆科 3 种幼苗生理生化指标的变化.南京林业大学学报,2005,25(2):47-50.
- [9] 刘奕清,刘长春,徐安辉.蔗糖对黄金果芋试管苗生长及生理的影响.西南大学学报,2007,29(6): 143-146.
- [10] PAUK K P, THOMPSON J E. *In vitro* simulation of senescence-related membrane damage by ozone-induced lipid peroxidation. Nature, 1980,28(3):504-506.
- [11] MISHRA N P, MISHRA R K, SINGHAL G S. Changes in the activities of antioxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. Plant Physiol, 1993,102:903-908.
- [12] LUNDERGAN C, JANICK J. Low temperature storage of *in vitro* apple shoots. HortScience, 1979,14(4):5-14.
- [13] 吴永杰, 赵艳华. 苹果种质资源离体条件下保存效果. 河北果树, 1998,4:9-10.
- [14] 王桂兰,陈超,李玉华.延长苹果试管苗保存时间的研究.河北林果研究,2002,17(3):239-241.
- [15] 陈辉,陈晓玲,陈龙清.百合种质资源限制生长法保存研究.园艺学报,2006,33(4):789-793.