

香蕉汁对花生组织培养及抗氧化酶活性的影响

刘 宾, 蒋继志*, 廖祥儒, 崔 哲

(河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002)

摘 要:通过对花生上胚轴组织培养,研究了香蕉汁对愈伤组织诱导的影响和外植体体内可溶性蛋白、SOD, CAT, POD, AP 几个生理指标的变化及其与愈伤组织诱导的关系.结果表明:接种在香蕉汁培养基中的上胚轴外植体的愈伤组织诱导率最高,达 95%;香蕉汁使外植体愈伤组织的蛋白质含量提高, SOD 的活性受到抑制, CAT, AP 和 POD 的活性被增强.

关键词:花生;上胚轴;香蕉汁;抗氧化酶

中图分类号:Q 945

文献标识码:A

文章编号:1000-1565(2006)06-0631-05

Effect of Banana Juice on Tissue Culture of Peanut and Activity of Antioxidase

LIU Bin, JIANG Ji-zhi, LIAO Xiang-ru, CUI Zhe

(College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: Effect of banana juice on tissue culture of peanut epicotyl and changes of protein content and activity of SOD, CAT, POD, AP in callus were investigated in this experiment. The results showed that the media with banana juice was optimum for callus induction of peanut epicotyl, which induction rate was 95 percent; The protein content in the explant callus was raised, the activity of SOD was inhibited, while the activity of CAT, POD, and AP are strengthened to some extent.

Key words: peanut; epicotyl; banana juice; antioxidantase

外植体愈伤组织培养是植物基因转化研究过程中的一个必需阶段,上胚轴是花生(*Arachis hypogaea* L.)离体组织培养和生理研究的重要材料之一.近年来国内外许多学者开展了利用不同植物提取物诱导愈伤组织,促使植株再生的研究^[1-4],其中应用玉米汁、荸荠汁、菠萝汁、胡萝卜汁的相关报道较多,而用香蕉汁培养基诱导愈伤组织的研究未见报道^[5].MS培养基是植物组织培养中最常用的基本培养基之一,它的营养充分^[6],适用于多种植物的不同器官和组织培养.花生是重要的油料作物,具有重要经济价值.超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、过氧化物酶(Peroxidase, POD)、抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbic acid peroxidase, AP)是许多植物中重要的抗氧化酶类,能够清除活性氧^[7],并在愈伤组织诱导和抗病过程中发挥重要作用.抗氧化酶还是植物生理代谢的指标酶,其活性的变化在一定程度上反映

收稿日期:2005-12-10

基金资助:河北省自然科学基金资助项目(300081);河北省省级重点学科生物工程资助项目

作者简介:刘 宾(1977-),男,河北邯郸人,河北大学在读硕士研究生,主要研究方向为植物基因工程与分子生物学.

* 通讯联系人

出外植体生理代谢水平的变化^[8-10]. 实验主要就香蕉汁对花生上胚轴愈伤组织诱导的影响及诱导过程中蛋白含量和抗氧化酶活性变化等方面进行研究, 为优化花生组织培养条件及其转基因受体的建立提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 花生上胚轴组织培养

在预备实验中, 发现经不同用量的香蕉汁处理后, 以 10 g/L 香蕉汁用量的处理所得愈伤组织诱导率为最高, 同时所得长势良好的愈伤组织数也最多. 供试香蕉是从市场上购买的普通香蕉, 剥皮后取 10 g, 切成小块, 加 300~400 mL 无离子水, 用纱布过滤, 煮沸 25 min, 定容至 1 L, 或不煮沸定容至 1 L 直接使用.

实验材料为冀花 2 号花生种子, 去壳后用自来水浸泡 2 h, 75% (质量分数) 酒精浸泡 30 s, 无菌水漂洗 3 次, 每次 1 min, 然后用质量分数为 0.1% 氯化汞浸泡 8~10 min, 无菌水冲洗 3 次, 每次 2 min, 接种于 MS₁ + 2,4-D (10 mg/L) 培养基上, 25 °C 暗培养 15 d.

挑选已发芽的种子, 切取上胚轴, 切成 5 mm 左右的小段, 分别接种于 MS₁: MS + 2,4-D (10 mg/L); MS₂: MS + 6-BA (5 mg/L); MS₃: MS + 2,4-D (10 mg/L) + 香蕉汁 (10 g/L) 培养基上, 25 °C 暗培养, 定期进行观察记录, 并统计愈伤组织诱导率.

1.2 蛋白质含量及酶活性测定方法

蛋白质含量按 Bradford 方法测定^[11], 测定蛋白质溶液在 595 nm 下的光吸收值. SOD 活性参照 Zhang 和 Kirkhan 报道的 NBT 法^[12]测定, 以 SOD 抑制 NBT (氮蓝四唑) 光化还原体积分数 50% 的酶量 ($\lambda = 560$ nm) 为一个酶活单位; CAT 活性根据反应混合液 1 min 内在 240 nm 处的吸光度随着 H₂O₂ 的分解而降低的程度来测定^[13], 采用每分钟分解 1 nmol H₂O₂ 的酶量表示 1 个活性单位 (U); POD 活性通过测定反应混合液在 470 nm 处的吸光度在 1 min 内因愈创木酚的氧化作用的增加来测定^[14], 1 个酶活单位 (1U) 定为 1 μ mol/min; AP 的活性根据反应混合液在 290 nm 处的吸光度在 1 min 内的降低程度来测定^[15], 1 个酶活单位 (1U) 为 1 μ mol/min.

1.3 数据分析

用 SPSS11.5 统计分析软件对实验测得数据进行统计, 绘制曲线趋势图表, 并进行相关性分析.

2 结果与分析

2.1 花生上胚轴组织培养

香蕉汁不经煮沸直接使用会造成其在培养基中溶解不均匀, 使培养基营养不均衡, 所以实验结果差别较大, 可信性低. 用煮沸后的香蕉汁经配得的培养基营养均衡, 所测结果稳定性较好.

接种在 3 种添加不同种类和浓度的生长调节剂培养基上的花生上胚轴段, 3 d 后体积均开始膨大; 9 d 后膨大停止, 切面处开始增厚; 12 d 后 MS₁, MS₂ 培养基上培养的上胚轴出现了黄绿色的愈伤组织; 15 d 后 MS₃ 也出现愈伤组织.

虽然在加入香蕉汁的培养基中, 愈伤组织的形成时期比不加香蕉汁的晚, 但从表 1 可以看出, 添加了香蕉汁的培养基对花生上胚轴愈伤组织的诱导率明显高于没有添加香蕉汁的培养基, 而且长势良好的愈伤组织数也远高于未加香蕉汁的培养基, 同时发现加入 2,4-D 的培养基中, 愈伤组织诱导率和长势良好的愈伤组织数高于加入 6-BA 的培养基. 长势良好的愈伤组织呈不软不硬的湿润颗粒状、嫩黄绿色, 为具分化能力的愈伤组织.

表 1 不同培养基对愈伤组织诱导率的影响*
Tab.1 Effect of different media on the induction rate of callus

培养基	基外植体数	愈伤组织数	长势良好的愈伤组织数	诱导率/%	长势良好的愈伤组织比率/%
MS ₃	80	76	68	95.00	89.47
MS ₁	80	35	21	43.75	60.00
MS ₂	80	28	11	35.00	39.29

* 仅列出和统计了诱导培养 18 d 后的数据

2.2 蛋白质含量

对外植体的蛋白质含量的测定(图 1A)结果表明:MS₃ 培养基中外植体的蛋白质含量在实验时间范围内均高于 MS₁,尤其是在第 6 天、第 9 天和第 18 天明显高出 MS₁ 许多,总体上成上升趋势,MS₁ 中外植体的蛋白质含量在第 6 天突然下降,出现 1 个低谷.表明香蕉汁有增加花生愈伤组织中蛋白质含量的作用.

2.3 抗氧化酶活性测定

2.3.1 SOD 活性测定

MS₃ 培养基中外植体的 SOD 活性比对照中的 SOD 活性低(图 1B),在 15 d 内 MS₃ 培养基中 SOD 活性总体上变化不大,第 15 天开始急剧下降.对照中外植体的 SOD 先为缓慢下降,第 8 天开始快速上升,第 13 天达到高峰,然后开始急剧下降,至第 18 天时最低.香蕉汁显示出降低 SOD 活性的作用.

2.3.2 CAT 活性测定

香蕉汁对花生外植体愈伤组织中 CAT 活性的影响见图 1C. MS₃ 培养基中外植体的 CAT 活性高于对照中外植体的 CAT 活性. MS₃ 培养基中,外植体 CAT 活性变化明显,先是平稳下降,第 2 天开始快速上升,第 7 天达到高峰后开始下降,第 12 天又开始上升.对照中外植体 CAT 活性趋于平稳,只在第 12 天出现 1 次最低值,随后又开始稳步回升.表明香蕉汁有增加 CAT 活性的功能.

2.3.3 POD 活性测定

加入香蕉汁和不加入香蕉汁的 2 种培养基中外植体愈伤组织的 POD 活性变化都十分明显(图 1D),但 MS₃ 培养基中的 POD 活性远远高于 MS₁ 中的活性.开始 3 d 内,MS₃ 培养基中外植体愈伤组织的 POD 活性先是略低于对照,3 d 后超过对照,并持续上升且远高于对照,第 12 天开始下降,第 15 天又开始上升.而对照中 POD 先下降,从第 6 天开始呈上升趋势,第 9 天开始缓慢下降,至第 15 天时与 MS₁ 培养基中的 POD 活性呈明显的反向走势.香蕉汁有明显促进 POD 活性持续增加的作用.

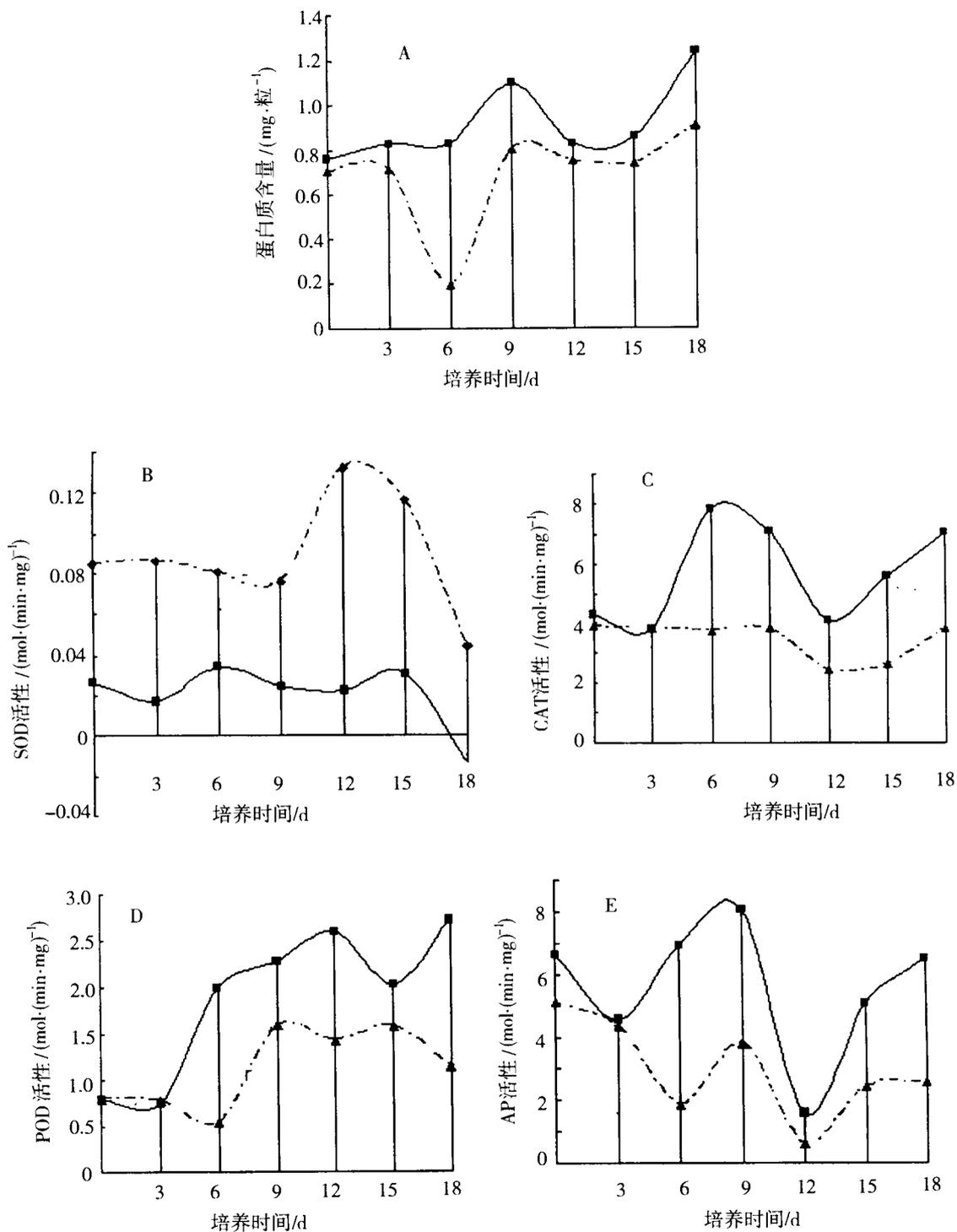
2.3.4 AP 活性测定

香蕉汁对花生外植体愈伤组织中 AP 活性的影响见图 1E. MS₃ 中 AP 的活性变化比对照明显,先急剧下降,第 3 天开始快速上升,至第 8 天达到高峰后开始急剧下降,第 12 天又开始快速上升.而对照中 AP 活性先快速下降,第 6 天上升,第 8 天开始下降,第 12 天又有所上升,第 15 天后趋于稳定.总体上 MS₃ 中外植体的 AP 活性高于 MS₁ 培养基中外植体的 AP 活性.表明香蕉汁有明显促进 AP 活性持续增加的作用.

2.4 相关性分析

用 SPSS11.5 软件进行相关性分析表明:花生上胚轴愈伤组织中蛋白质含量与愈伤组织诱导率呈正相关($P < 0.01$),说明愈伤组织诱导过程中蛋白质含量会相应增加. SOD 和 CAT 的活性与花生上胚轴愈伤组织诱导率呈负相关($P < 0.01$),说明超氧化物阴离子和 H₂O₂ 的累积可能有利于愈伤组织的诱导. POD, AP 活性与愈伤组织诱导率呈正相关($P < 0.01$),POD, AP 参与植物体中 H₂O₂ 的清除、细胞壁重建、多酚类化合物代谢、吡啶乙酸的氧化等多种过程,说明这些过程中的一些反应与愈伤组织的形成有关,但哪一类过氧化物酶参与这些过程、它们的性质如何还有待进一步研究.

香蕉培养基中外植体愈伤组织诱导过程中的蛋白质含量 SOD, CAT, POD, AP 活性与对照相比,总体上变化幅度较大,但两者整体趋势走向基本相同,相关性也基本相同.



实线表示 MS₃ 培养基中外植体几个生理指标的变化;虚线表示对照 MS₁ 培养基中外植体的生理指标的变化

图 1 香蕉汁对花生胚轴愈伤组织诱导过程中蛋白质含量及 SOD, CAT, PRD, AP 活性的影响

Fig.1 Effect of banana juice on the protein content and activity of SOD, CAT, POD, AP during the induction of epicotyl callus of peanut

3 讨论

实验发现花生上胚轴外植体在 MS₃ 培养基上愈伤组织诱导率很高(达 95%),且得到的长势良好的愈伤组织数最多,为转基因过程中花生转化受体的建立奠定了基础;香蕉汁的添加会使外植体愈伤组织的蛋白质含量提高,SOD 的活性受到抑制,CAT,AP 和 POD 的活性被增强;相关性分析结果表明植物中的抗氧化系统各组分在愈伤组织诱导过程中发挥着不完全相同的作用,但其中一些机理还不清楚,有待深入研究。

杜永芹等用天然麦芽提取液离体培养大麦花药,发现添加大麦提取液的培养基对大麦花药培养具有明显的促进作用^[15]。李亚东等用玉米、椰子等 5 种天然汁液添加到培养基中诱导绞股蓝愈伤组织,也得到了相似的结果^[6]。本实验用香蕉汁培养基对花生上胚轴愈伤组织进行诱导,所得结果与上述报道一致,再次验证了天然提取物促进愈伤组织形成和分化生长的作用,且香蕉价廉易得,有着很好的应用前景。但应用香蕉提取物配制培养基进行组培研究还未见报道,有待进一步深入和拓展。

参 考 文 献:

- [1] 林双荣,梁丽昆.花生幼叶为外植体的植物再生系统的建立[J].植物学通报,2003,20(3):307-312.
- [2] K CHENGALRAYAN,V B MHASKE,S HAZRA. High-frequency conversion of abnormal peanut somatic embryosvvv[J]. Plant Cell Reports,1997,16:783-786.
- [3] LI Z,JARRET RL,DEMSKI J W. Engineered resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic peanut expressing the viral nucleocapsid gene[J]. Transgenic Research,1997(6):297-305.
- [4] 晏立英,陈坤荣,罗莉霞,等.花生体细胞胚胎诱导和植株再生研究[J].中国油料作物学报,2000(3):9-12.
- [5] 李亚东,毕光扬.天然汁对绞股蓝愈伤组织增殖的反应[J].湖北大学学报(自然科学版),1999,21(4):392-394.
- [6] 李俊明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业大学出版社,1992:41-44.
- [7] 杨淑慎,高军凤.活性氧、自由基与植物的衰老[J].西北植物学报,2001,21(2):215-220.
- [8] 王俊刚,陈国良,张承烈.水分胁迫对 2 种生态型芦苇(Phragmitescommuis)的可溶性蛋白含量,SOD,POD,CAT 活性的影响[J].西北植物学报,2002,22(3):561-565.
- [9] 张海平,单世华,蔡来龙,等.钙对花生植株生长和叶片活性氧防御系统的影响[J].中国油料作物学报,2004,26(3):33-36.
- [10] 姜慧芳,任小平.干旱胁迫对花生叶片 SOD 活性和蛋白质的影响[J].作物学报,2004,30(2):169-174.
- [11] BRADFORA M. Arapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem,1976,72:248-254.
- [12] ZHANGJ-X,KIRKAHAM M B. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings[J]. New Phytol,1996,132:361-373.
- [13] JABLONSKY P P,ANDERSON J W. Light dependent reduction of dehydroascorbate by ruptured pea chliroplasts[J]. Plant Physiol,1981,67:1239-1244.
- [14] AMAKO K,CHEN GX,ASADA K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants[J]. Plant Cell Physiol,1994,35:497-504.
- [15] 杜永芹,陈儒梅,张国荣,等.天然麦芽提取液对大麦花药培养力的影响[J].上海农业学报,2001,17(1):27-30.

(责任编辑:梁俊红)