

PP₃₃₃对马铃薯试管苗抗氧化酶及蛋白质含量的影响

靳欢¹, 苟琳¹, 倪苏², 李文博², 黄鹏²

(¹四川农业大学生命科学与理学院, 四川雅安 625014; ²四川农业大学农学院, 四川雅安 625014)

摘要:为探明PP₃₃₃对马铃薯试管苗壮苗及离体保存延缓衰老的作用机理。本试验以马铃薯试管苗为材料,在MS培养基中添加不同浓度PP₃₃₃,测定其生长过程中CAT、POD、SOD等抗氧化酶活性及MDA和可溶性蛋白含量的动态生理指标。结果显示:0.01、0.05及0.25 mg/L PP₃₃₃处理,诱导了CAT、POD、SOD等抗氧化酶活性的上升,保持了膜脂过氧化产物MDA相对较低的含量水平,并延缓了可溶性蛋白的下降。而1.25 mg/L PP₃₃₃处理,虽有较高的CAT、POD活性,但SOD活性低,可溶性蛋白明显下降。由此可知,低浓度(0.01~0.25 mg/L)PP₃₃₃可保持较高的抗氧化酶和蛋白质水平以及较低含量的MDA,从而培育壮苗和延缓试管苗的衰老。较高浓度(1.25 mg/L)PP₃₃₃则使蛋白质含量和SOD活性降低,表现出一定的毒害作用。

关键词:马铃薯;PP₃₃₃;抗氧化酶;蛋白质

中图分类号:S532

文献标志码:A

论文编号:2010-2811

The Effects of PP₃₃₃ on Antioxidase and Protein Content in Potato Test-tube Plantlets

Jin Huan¹, Gou Lin¹, Ni Su², Li Wenbo², Huang Peng².

(¹College of Bioscience, Sichuan Agricultural University, Ya'an Sichuan 625014;

²College of Agriculture, Sichuan Agricultural University, Ya'an Sichuan 625014)

Abstract: To study the action mechanism of PP₃₃₃ on nurturing in vitro preserved strong seedling of potato test-tube plantlets and on delaying its aging, potato test-tube plantlets were used as explants, different concentrations of PP₃₃₃ were added into MS culture media to determine the activity of antioxidantase (CAT, POD, SOD etc.) and the dynamic physiological indices of MDA and soluble protein content. The results showed that samples treated with 0.01, 0.05 and 0.25 mg/L PP₃₃₃ had an increased antioxidantase (CAT, POD, SOD etc.) activity, kept a relatively low content level of MDA and their decreasing of soluble protein content was delayed. The samples treated with 1.25 mg/L PP₃₃₃ had a low SOD activity and their soluble protein content was decreased significantly, though they kept a relatively high CAT and POD activities. In conclusion, low concentration of PP₃₃₃ can help nurturing strong seedlings and delaying the aging of test-tube plantlets by keeping a low MDA concentration and a high antioxidantase and protein level while high concentration (1.25 mg/L) of PP₃₃₃ showed detrimental effects by lowering the content of protein and the activity of SOD.

Key words: potato; PP₃₃₃; antioxidantase; protein

0 引言

多效唑(PP₃₃₃)是一种高效低毒的植物生长调节

剂,可抑制赤霉素的生物合成,具有抑制茎枝伸长,提高植物抗逆性和延缓植物衰老等多种效应^[1]。大田生

基金项目:“四川省科技厅马铃薯优质高产关键技术研究产业化示范项目”(05NG001-021-2);“四川农业大学创新基金项目”(1315);“四川农业大学学位论文培育计划”(00109026)。

第一作者简介:靳欢,女,1988年出生,本科,从事植物组织培养及生理生化研究。通讯地址:625014 四川农业大学8-33 邮箱,Tel:0835-2882449, E-mail: jhjinzehui@163.com。

通讯作者:倪苏,女,1962年出生,副教授,本科,从事植物组织培养及生理生化研究。通讯地址:625014 四川农业大学农学院, Tel:0835-2882449, E-mail: ns13@163.com。

收稿日期:2010-09-27, **修回日期:**2010-11-26。

产中PP₃₃₃的应用多有报道。近年来,在小麦、水稻、大蒜、香蕉等组织培养中的研究表明,PP₃₃₃具有培育壮苗、提高分化率等作用^[2],并广泛应用于马铃薯^[3]、甘薯^[4]、葡萄^[5]、怀地黄^[6]等试管苗的离体保存。进一步深入研究PP₃₃₃诱导其壮苗及延缓衰老的作用机理,更有效的广泛利用,颇具意义。

研究认为,植物的衰老与光合效率的降低、叶绿素、蛋白质的降解及代谢水平的下降有关^[7]。植物在生长发育过程中,体内可通过多种途径产生活性氧,而过多的活性氧积累是植物衰老的原因之一,同时细胞内存在的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)及过氧化物酶(POD)等保护酶^[8],是活性氧清除酶系统中三种重要的抗氧化酶,它们能有效地阻止活性氧的积累,防止膜脂过氧化,从而延缓植物的衰老。一些学者研究了低温、干旱、病菌、重金属等对植物体内抗氧化酶系统的影响^[9]。但针对PP₃₃₃对马铃薯试管苗抗氧化酶活性及蛋白质含量的动态变化研究较少,本文以马铃薯试管苗为材料,经不同浓度PP₃₃₃处理,探讨其生长过程中抗氧化酶活性及蛋白质含量的动态变化,以期为PP₃₃₃在马铃薯试管苗壮苗及种质资源离体保存中的合理利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为马铃薯品种‘坝薯10号’脱毒试管苗,由四川农业大学农学院马铃薯研究与开发中心提供。多效唑(PP₃₃₃)购自江苏景宏化工有限公司,其含量≥95.0%。

1.2 方法

1.2.1 试管苗增殖培养基 以MS为增殖基本培养基,分别附加0.01、0.05、0.25、1.25 mg/L的PP₃₃₃,用5.5 g/L的琼脂固化,加蔗糖3%,pH5.8,以不添加PP₃₃₃为对照。

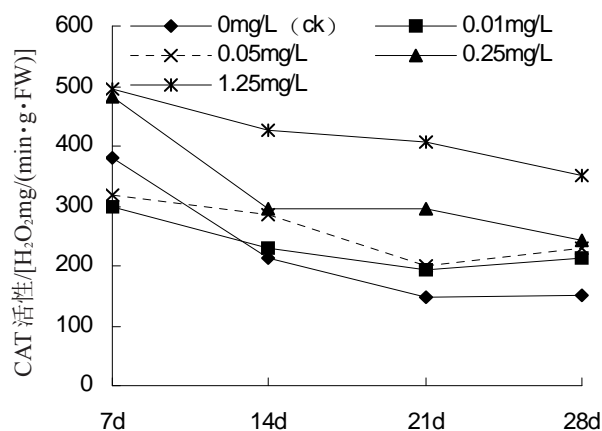


图1 不同浓度PP₃₃₃处理下马铃薯试管苗CAT活性动态变化

1.2.2 接种及培养条件 取约1.5 cm长(带3~4片叶)的试管苗顶芽,接种于增殖培养基中,每种浓度处理各重复20瓶,每瓶接种10苗。置于光强1500~2000 lx,光照时间14 h/天,温度(20±2)°C的培养室连续培养28天。每7天取样测定一次,共4次。

1.2.3 样品处理 粗酶提取参照朱祝军^[10]的方法。取0.5 g新鲜材料,剪碎后置于预冷的研钵中,加5 mL 0.05 M磷酸盐缓冲液(PBS,含0.2 mM EDTA,2 mM ASA和2% PVP,pH6.8)。研磨,8000 g,4°C离心20 min,取上清,即为粗酶提取液,-20°C保存备用,用于抗氧化酶活性及可溶性蛋白质测定。

1.2.4 测定项目 CAT活性测定采用紫外吸收法^[11]; POD活性测定采用愈创木酚法^[12]; SOD活性测定采用NBT光氧化还原法^[13]; MDA含量测定,采用赵世杰等的方法^[14];可溶性蛋白含量测定,采用考马斯亮蓝G-250法^[15]。

2 结果与分析

2.1 PP₃₃₃对抗氧化酶活性的影响

SOD、CAT和POD是植物体内重要的活性氧清除酶,其活性的增加可有效阻止过多活性氧的积累,减轻或防止细胞膜脂过氧化,从而延缓植物衰老,增加植株抗逆性。

由图1显示,从整体趋势上可知,PP₃₃₃处理后的CAT活性均高于对照,不同浓度PP₃₃₃处理对马铃薯试管苗CAT活性及变化趋势基本一致,但其变化幅度和各时期活性存在一定差异。处理后7天开始,CAT活性逐渐下降,在处理28天时降至最低。不同浓度间的CAT活性关系为:1.25 mg/L>0.25 mg/L>0.05 mg/L>0.01 mg/L。说明PP₃₃₃处理可以增加马铃薯试管苗的CAT活性,从而增加其清除H₂O₂的能力。

图2可知,马铃薯试管苗POD活性在7~21天内呈

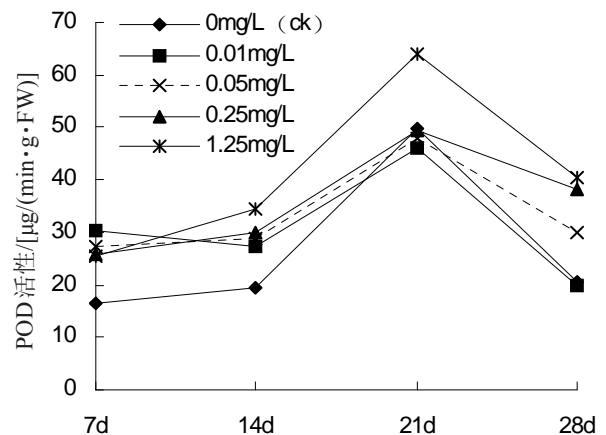


图2 不同浓度PP₃₃₃处理下马铃薯试管苗POD活性的动态变化

波动上升趋势,21天达最高峰,随后其活性逐渐下降。与对照相比,各处理均能提高POD的活性,尤以1.25 mg/L处理效果最明显。说明PP₃₃₃处理可增加其POD活性,推知一定浓度PP₃₃₃处理增加了清除H₂O₂的能力。

由图3数据得知,0.01、0.05 mg/L PP₃₃₃浓度处理下的SOD活性高于对照,出现逐渐上升的趋势;0.25 mg/L PP₃₃₃浓度下的SOD活性则表现为先下降,而后缓慢上升的态势,并高于对照;1.25 mg/L PP₃₃₃浓度下的SOD活性平稳,较对照低,但处理21天后高于对照,并趋于上升;而对照的变化非常不稳定,试管苗培养7~14天期间SOD活性上升,之后一直下降至最低值,且上升

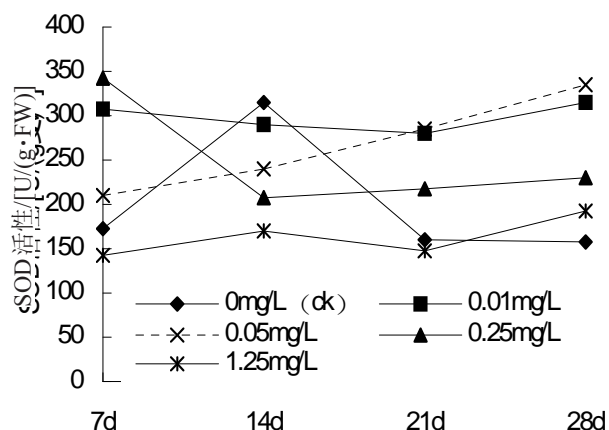


图3 不同浓度PP₃₃₃处理下马铃薯试管苗SOD活性的动态变化

含量均明显低于对照。

2.3 PP₃₃₃对可溶性蛋白含量的影响

由图5所示,不同浓度PP₃₃₃处理与对照的可溶性蛋白含量呈一致波动下降趋势,其含量关系大致为:

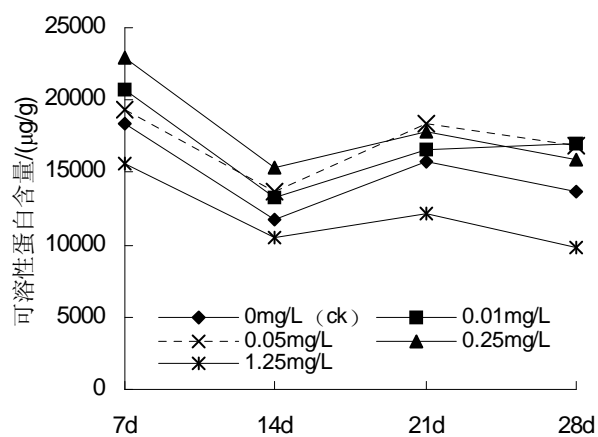


图5 不同浓度PP₃₃₃处理下马铃薯试管苗可溶性蛋白质含量动态变化

下降的幅度都比较大。表明低浓度PP₃₃₃处理马铃薯试管苗后,SOD活性上升,但浓度过高则会使其活性下降,对其产生毒害。

2.2 PP₃₃₃对MDA含量的影响

MDA是膜脂过氧化产物之一,其含量多少与膜脂过氧化水平和细胞膜损伤程度有关。由图4可知,不同浓度PP₃₃₃处理后发生较明显的变化。在整个试验过程中,与对照相比,1.25 mg/L PP₃₃₃处理的MDA含量显著下降,0.25 mg/L处理表现相对平稳较低的含量,而0.01 mg/L和0.05 mg/L处理在培养7天时的MDA高于对照。随着培养时间的延长,14天后,其MDA含量呈现缓慢上升的趋势,但各浓度PP₃₃₃处理的MDA

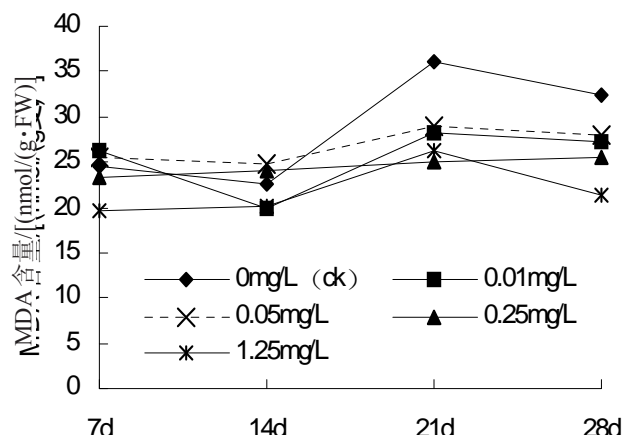


图4 不同浓度PP₃₃₃处理下马铃薯试管苗MDA含量动态变化

0.25 mg/L>0.05 mg/L>0.01 mg/L>0 mg/L>1.25 mg/L。由此表明:0.01~0.25 mg/L PP₃₃₃处理可延缓蛋白质的降解,从而延缓植物衰老。而1.25 mg/L高浓度PP₃₃₃处理使可溶性蛋白含量显著降低,对马铃薯试管苗造成一定伤害。

3 结论与讨论

高等植物叶片衰老是个复杂的过程,研究表明,衰老源于活性氧代谢的失调,与活性氧在体内的过量积累有关^[8],而SOD、CAT和POD等抗氧化酶活性及MDA积累量的变化反映了植物对活性氧、自由基的清除能力^[16]。本试验表明,培养基中添加适宜浓度的PP₃₃₃可延缓马铃薯试管苗的衰老,有利于种质资源保存,这与艾辛等^[17]的研究结果一致。同时本结果显示,PP₃₃₃可提高马铃薯试管苗SOD、CAT和POD抗氧化酶活性及降低MDA含量,说明PP₃₃₃参与了活性氧代谢的调节过程,通过提高其抗氧化酶活性,增强了机体对自由基的清除能力,减少MDA积累,从而达到保护膜结构,延缓试管苗衰老之目的。

蛋白质降解是植物叶片衰老的特征之一^[8],被降解蛋白主要是可溶性蛋白质,而它在细胞内主要以酶的形式存在,如光合作用的 RuBP 羧化酶约占叶片可溶性蛋白的 50%^[18]。研究指出,PP₃₃₃可提高 RuBP 羧化酶的活性,加快卡尔文循环过程,也可提高硝酸还原酶的活性,促进氮素的吸收利用,使蛋白质合成加快^[19]。本研究表明,适宜浓度的 PP₃₃₃ 处理延缓了蛋白质的降解,说明其可能参与了蛋白质合成及某些酶的活性调节。

叶绿素含量与衰老间存在明显的负相关^[8],因组培材料污染,导致测定时材料不足而未做相关测定。

本试验发现 PP₃₃₃ 能诱导形成试管薯,处理培养 7 天后,部分腋芽出现膨大,28 天后低浓度 PP₃₃₃ 处理可形成 0.5 cm 大小的腋芽薯,但其如何更有效地诱导试管薯的生成需进一步探究。

参考文献

[1] 张石城,刘祖祺.植物化学调控原理与技术[M].北京:中国农业科技出版社,1999,333-334.
 [2] 王存.多效唑在植物生产上的应用现状[J].热带农业科学,2009,29(2):67-72.
 [3] 阮龙,王钰,严平等.多效唑在马铃薯试管苗上的应用研究[J].杂粮作物,2005,25(1):32-34.
 [4] 张希太.应用多效唑常温保存甘薯试管种质研究[J].中国生态农业学报,2003,1(1):41-43.

[5] 张利平,曹孜义,李唯.多效唑在葡萄试管种质常温保存中的应用[J].园艺学报,1994,21(4):389-391.
 [6] 张晓丽,刘文英,张楠.PP₃₃₃对怀地黄种质离体保存的影响[J].河南师范大学学报(自然科学版),2009,37(3):171-174.
 [7] 王虹,姜玉萍,师恺,等.光质对黄瓜叶片衰老与抗氧化酶系统的影响[J].中国农业科学,2010,43(3):529-534.
 [8] 王旭军,徐庆国,杨知建.水稻叶片衰老生理的研究进展[J].中国农学通报,2005,23(3):187.
 [9] 刘家忠,龚明.植物抗氧化系统研究进展[J].云南师范大学学报,1999,19(6):5-7.
 [10] 朱祝军,喻景权,等.氮素形态和光照强度对烟草生长和H₂O₂清除酶活性的影响[J].植物营养与肥料学报,1998,4(4):379-385.
 [11] Aebi H. Catalase in vitro[J].Methods Enzymol,1984,105:121-126.
 [12] 熊庆娥.植物生理实验教程[M].四川科学技术出版社,2003:72.
 [13] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].高等教育出版社,2000:167-169.
 [14] 赵世杰,许长成,邹琦,等.植物组织中丙二醛测定方法的改进[J].植物生理学通讯,1994,3(3):207-210.
 [15] 苟琳,单志.生物化学实验[M].西南交通大学出版社,2010,72-73.
 [16] 武立权,王荣富,吴殿星,等.水稻黄叶突变体的剑叶衰老与保护酶活性关系的研究[J].核农学报,2008,22(1):1-4.
 [17] 艾辛,夏志兰,刘明月,等.植物生长调节剂对马铃薯试管苗生长和保存的影响[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2005,31(5):514-517.
 [18] 郭丽果,陶佩君,尹宝重,等.不同浓度多效唑与己杨酸酯对小豆生理生化特性的影响[J].贵州农业科学,2010,38(6):65-68.
 [19] 陈向明,张圣旺,孟丽.多效唑(PP₃₃₃)对花生叶片衰老的影响[J].安徽师范大学学报(自然科学版),2001,24(2):163.