

草莓愈伤组织再生能力与活性氧代谢水平相关性研究

田 敏^{1,2} 韩 凝² 边红武² 朱睦元^{2*}(¹ 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 富阳 311400; ² 浙江大学生命科学学院, 杭州 310012)

摘 要: 草莓外植体在不同组合培养基上诱导产生 3 类愈伤组织, I 型愈伤组织的再生能力较低, II 和 III 型愈伤组织具有较高的再生能力。II 和 III 型初生愈伤组织 H_2O_2 的含量分别是 I 型的 5 倍和 9 倍, $O_2^{\cdot-}$ 的释放速率是其 3 倍和 4 倍, 并且具有较高的抗氧化酶活性。在继代培养过程中, 愈伤组织的形态发生能力下降, I 型愈伤组织逐渐失去再生能力, 同时所有类型愈伤组织中 H_2O_2 含量缓慢上升, $O_2^{\cdot-}$ 释放速率较快增长, 而抗氧化酶活性降低。

关键词: 草莓; 活性氧; 抗氧化酶; 再生能力; 愈伤组织

中图分类号: S 668.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 03-0372-03

The Possible Relationship between the Regeneration Capacity and Reactive Oxygen Species in the Strawberry Calli

Tian Min^{1,2}, Han Ning², Bian Hongwu², and Zhu Muyuan^{2*}(¹ The Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, China; ² College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Three types of callus, which present different regeneration capacity, were established in the tissue culture of strawberry. The II and III types of callus possessed higher regeneration capacity while I type of callus had much lower. In the freshly induced calli, the II and III types of callus had 5-fold and 9-fold higher contents of intracellular H_2O_2 , and 3-fold and 4-fold higher level of $O_2^{\cdot-}$, compared with the I type of callus, respectively. Also, the calli II and III had much higher activities of antioxidant enzymes than the callus I. During the subculture, H_2O_2 level increased gradually and $O_2^{\cdot-}$ rapidly, while the activities of antioxidant enzymes gradually declined. The ability of expression of totipotency in calli decreased, especially the callus I lost the ability after 12 week subculture. The results indicated that the reactive oxygen species might play a dual role in the regeneration of strawberry calli. On the one hand, a certain level of ROS may have a positive effect on the regeneration, and on the other hand, high level of ROS is inhibitory for the expression of totipotency in calli.

Key words: Strawberry; Reactive oxygen species; Antioxidant enzymes; Regeneration capacity; Callus

1 目的、材料与方 法

活性氧最初被认为是细胞内多种生理反应产生的毒副产品。近年来的研究表明活性氧参与了植物对病原物及环境胁迫的防御反应, 尤其是 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 可能是作为信号传导分子而发挥作用^[1]。本研究以凤梨草莓 (*Fragaria ananassa* Duch.) ‘梅宝 2 号’ 无菌苗的叶片和叶柄为外植体, 诱导出 3 类具有不同再生能力的愈伤组织, 测定比较活性氧代谢水平, 分析其与愈伤组织再生能力的相关性。诱导培养基分别为: (1) MS + 6-BA 0.5 mg/L + 2, 4-D 2.0 mg/L; (2) MS + 6-BA 0.5 mg/L + 2, 4-D 0.5 mg/L; (3) MS + KT 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L; (4) MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L。培养条件: (1) 25℃、黑暗; (2) 25℃、16 h 光照 ($30 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)/8 h 黑暗。愈伤组织每 3 周继代 1 次。愈伤组织中 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 、SOD、CAT 和 POD 的测定^[2~6] 至少重复 3 次, 取平均值进行统计分析。

收稿日期: 2003-11-10; 修回日期: 2004-04-06

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lsczhumy@mail.hz.zj.cn

2 结果与分析

2.1 不同类型愈伤组织再生能力的差异

黑暗条件下 MS 加 KT 2.0 mg/L 和 NAA 0.5 mg/L 培养基上诱导的愈伤为灰白色, 松软湿润, 称为 I 型愈伤组织 (图版, a); 其它培养基上产生的愈伤组织黄色或浅黄色, 质地紧密, 呈颗粒状, 称为 II 型愈伤组织 (图版, b)。光照条件下 MS 加 NAA 0.1 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L 培养基诱导产生的愈伤组织为绿色, 结构致密, 呈瘤状, 称为 III 型愈伤组织 (图版, c)。将 3 类愈伤组织转移到含有 NAA 0.2 mg/L 和 6-BA 2.0 mg/L 的 MS 分化培养基上, 在光照条件下均能以器官发生的形式再生植株 (图版, d, e), 但其再生能力有显著差异。I、II 和 III 型愈伤组织的再生率分别约为 20.7%、70.5% 和 82.7%。

表 1 初生愈伤组织的活性氧及其代谢酶活性

Table 1 Contents of ROS and activities of antioxidant enzymes in freshly induced calli

愈伤组织类型 Callus type	H ₂ O ₂ ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$)	O ₂ ⁻ ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$)	SOD ($\text{U} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$)	CAT ($\text{H}_2\text{O}_2 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$)	POD ($\Delta A_{470} \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$)
I	6.3 ± 0.7	4.3 ± 0.2	36.4 ± 3.4	58.6 ± 5.5	117.8 ± 6.0
II	30.5 ± 2.3	13.9 ± 1.3	990.7 ± 72.4	130.4 ± 6.6	303.4 ± 27.6
III	56.4 ± 4.9	16.5 ± 1.0	979.9 ± 63.2	113.8 ± 10.4	319.6 ± 19.9

3 类愈伤组织分别在 KT 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L, 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 和无激素的 MS 培养基上继代培养。随继代时间的延长, 再生能力下降, I 型愈伤组织在 12 周和 18 周转到再生培养基上后全部死去。II、III 型愈伤组织在继代培养 12 周和 18 周仍有较高的分化率, 特别是绿色的 III 型愈伤组织, 分化率为 54.4% (图 1)。

2.2 初生愈伤组织活性氧含量及抗氧化酶活性

如表 1 所示, II 和 III 型愈伤组织中 H₂O₂ 含量和 O₂⁻ 释放速率远远高于 I 型愈伤组织。对于 H₂O₂, 前两者分别约是后者的 5 倍和 9 倍, O₂⁻ 则分别为 3 倍和 4 倍。抗氧化酶活性差异更大。相对 II 和 III 型愈伤组织来说, I 型愈伤组织的酶活性明显降低, 几乎不具有 SOD 活性, 而 CAT 和 POD 活性也仅约为前两者的 1/2 和 1/3。

2.3 继代培养过程中愈伤组织的 H₂O₂ 和 O₂⁻ 水平

在 3 类愈伤组织的继代培养中, H₂O₂ 含量和 O₂⁻ 释放速率都呈现上升趋势 (图 2), H₂O₂ 积累均较慢, 而 O₂⁻ 增长较快。特别是 I 型愈伤组织 O₂⁻ 释放速率增加最为明显, 到培养第 12 周已达到 II 型水平, 并高于 III 型; 到第 18 周已明显高于 II 型和 III 型。

2.4 继代培养过程中愈伤组织的抗氧化酶活性

愈伤组织继代培养过程中, 抗氧化酶活性在整体上呈现下降趋势。SOD 活性在 II 和 III 型愈

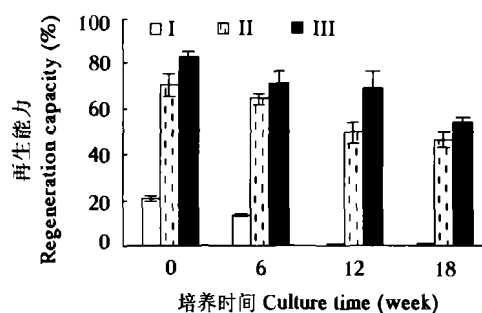


图 1 继代培养时间对 3 类愈伤组织植株再生的影响

Fig. 1 Effect of subculture time on the plant regeneration

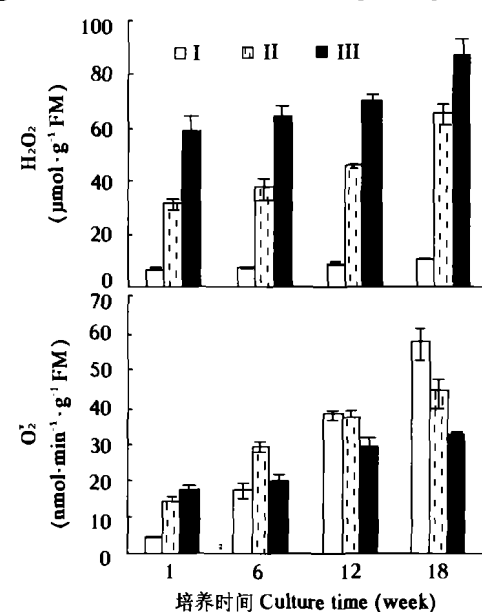


图 2 愈伤组织继代培养过程中 H₂O₂ 含量和 O₂⁻ 的产生速率

Fig. 2 Levels of H₂O₂ and O₂⁻ in the calli subculture

伤组织中下降缓慢,在 I 型中下降较快,到第 12 周已检测不到其活性。I 和 II 型中 CAT 活性降低较快,III 型中 CAT 比较稳定,只在第 18 周时稍有降低。愈伤组织在培养 12 周后,POD 活性明显下降(图 3)。

综合本研究结果表明,草莓愈伤组织的再生过程中活性氧可能起着双重作用,一方面,一定含量的活性氧对愈伤组织的再生起促进作用,甚至是启动再生过程所必需的;另一方面高水平的活性氧可能又会对细胞造成氧化胁迫,从而抑制愈伤组织的再生潜能。

参考文献:

- 1 Breusegen F V, Vranova E, Dat J F, et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.*, 2001, 61: 405~414
- 2 Patterson B D, Mackae E A, Ferguson I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium. *Anal. Biochem.*, 1984, 39: 487~492
- 3 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系. *植物生理学通讯*, 1990, 6: 55~57
- 4 Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.*, 1971, 44: 276~287
- 5 Beers R F, Sizer I W. A spectrophotometric method for measuring breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, 1952, 195: 133~140
- 6 Hammerschmidt R, Nuckles E M, Kue J A. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1982, 20: 73~82

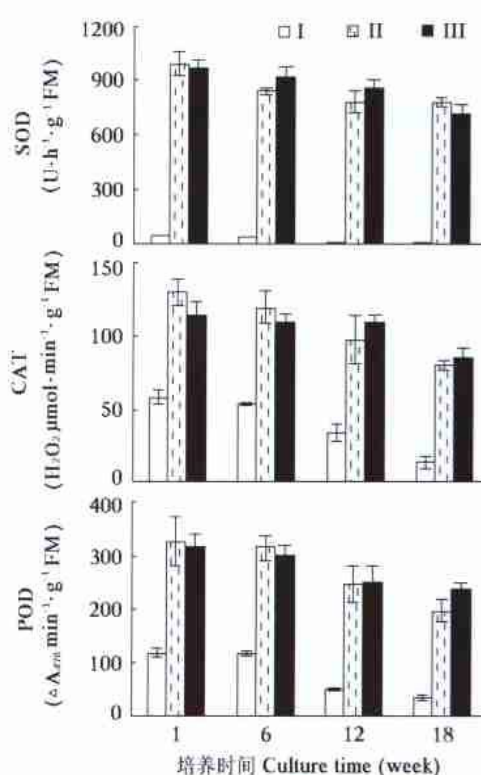
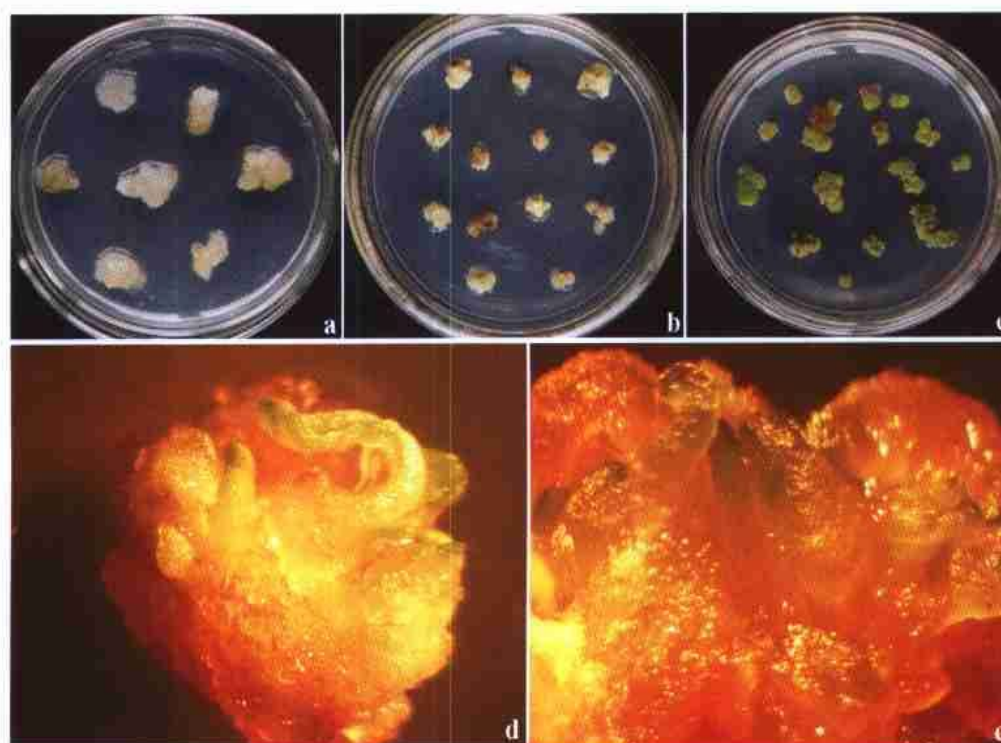


图 3 愈伤组织继代培养过程中的抗氧化酶活性
Fig. 3 Antioxidant enzymes activity in the calli subculture



图版说明: a. I 型愈伤组织; b. II 型愈伤组织; c. III 型愈伤组织; d. 愈伤组织上萌生的不定芽; e. 芽簇。

Explanation of plates: a. Type I callus; b. Type II callus; c. Type III callus; d. Shoot bud from callus; e. Shoot cluster.