抗氧化剂对杏和中国李原生质体培养的影响

马锋旺 李嘉瑞
(西北农业大学园艺系,陕西杨凌 712100)

摘 要 以杏和中国李种胚愈伤组织为试材,研究了抗氧化剂对原生质体培养效果的影响。结果表明,在酶解液和培养基中加入聚乙烯吡咯烷酮对提高原生质体产量、活力和分裂能力具有显著的效果。在培养基中加入不同浓度的甘氨酸和抗坏血酸也可提高中国李原生质体培养的分裂频率和植板率。

关键词 杏,中国李,原生质体培养,抗氧化剂
分类号 S662.203.5

近年来,果树原生质体培养研究取得了很大的进展。但大多数果树只有少数基因型的原生质体培养获得了再生植株,如何提高原生质体的分裂频率仍是需要解决的重要问题。在原生质体的酶解分离和培养过程中褐化现象比较严重[1],同时会产生某些有毒物质给进一步的培养带来危害[2]。为此,齐放军等[3]通过向培养基中添加抗氧化剂清除活性氧,改善了苜蓿原生质体培养状况。在分离原生质体的酶液中加入 PVP(聚乙烯吡咯烷酮),也抑制了苹果原生质体的老化褐变[1]。本试验通过在酶解液和培养基中加入抗氧化剂,研究了几种抗氧化剂对杏和中国李原生质体培养效果的影响。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料为杏品种"龙王帽"和中国李品种"晚红李"的种胚愈伤组织。去壳后的成熟种子经 700 mL/L的酒精表面消毒 30 s,然后用 1 g/L的 $HgCl_2$ 消毒 12~15 min,经无菌水反复冲洗后在无菌条件下浸泡 12 h;剥去种皮,将种胚接于改良 MS(1/2 NH_4NO_3)附加 2,4-D 1.5 mg/L,BA 0.1 mg/L,琼脂粉 5 g/L和蔗糖 30 g/L的培养基中,置于 25℃的黑暗条件下诱导愈伤组织。愈伤组织每 20~30 d继代培养 1次。

1.2 原生质体分离

生长 20 d的愈伤组织用解剖刀切碎,称取 0.1 g置于 10 mL酶液中进行酶解。杏的酶液组成为 CPW盐+15 g/L Cellulase Onzuka R-10+5 g/L Macerozyme R-10+5 g/L Hemicellulase,渗透压 0.6 mol/L。中国李的酶液组成为 CPW盐+10 g/L Cellulase Onzuka R-10+5 g/L Macerozyme R-10+10 g/L Hemicellulase,渗透压 0.7 mol/L。酶液中加入不同浓度 PVP,经 0.45μm混合纤维素微孔滤膜过滤灭菌。将含有试材的酶液置于 40~50 r/min的摇床上,在 25℃下分别酶解 10和 12 h,然后进行过滤、离心和洗涤[4]。

收稿日期 1998-02-17
课题来源 国家自然科学基金资助项目,39170545
作者简介 马锋旺,男,1964年生,副教授,博士。
?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

用血球计算板统计原生质体产量,用 0.1% Evans Blus染色,检测原生质体活力[5]。每处理重复 3次。

1.3 原生质体培养

采用液体浅层培养法。杏的培养基为 KM8P基本培养基附加 2,4-D 1.0 mg/L和 BA 0.25 mg/L,以 0.50 mol/L山梨醇作渗透压,培养过程中逐步降压;中国李的培养基为改良 MS附加 2,4-D 1.0 mg/L和 BA 0.5 mg/L,以 0.55 mol/L葡萄糖作渗透压。在培养基中加入不同浓度的各种抗氧化剂。原生质体植板密度分别为 0.5×10^5 和 2×10^5 个/mL。在 25℃的黑暗条件下培养 10和 30 d,在倒置显微镜下分别统计原生质体分裂频率和植板率。每处理重复 3次。

2 结果与分析

2.1 PVP对原生质体分离的影响

在酶解液中分别加入 0,10,20,30 g/L的 PVP,研究了不同浓度 PVP对杏和中国李原生质体分离效果的影响(表 1)。由表 1看出,PVP对原生质体的分离效果具有明显的促进作用,在所试浓度范围内以 10 g/L的效果最好,其产量和活力均显著高于对照。随着 PVP浓度的增加,其效果逐渐下降。PVP的这种作用与吸附酚类物质,阻碍酶解期间原生质体的褐化现象有关。高浓度的 PVP可能吸附酶解液中的成分,因而其效果下降。

表 1　PVP对杏和中国李原生质体分离的影响

PVP浓度/(g·L⁻¹)	杏		李	
	原生质体产量/(10^6个/g)	原生质体活力/%	原生质体产量/(10^6个/g)	原生质体活力/%
0	1.36	71.2	8.04	74.8
10	1.63	90.5	10.23	91.5
20	1.54	85.7	9.81	87.4
30	1.43	80.2	9.07	80.9

注: 原生质体产量以鲜重表示。

2.2 抗氧化剂对原生质体培养的影响

在原生质体 0.5×10^5 和 2×10^5 个/mL 2种植板密度下,比较了在酶解液中加入 10 g/L PVP和培养基中加入 5,10和 20 g/L PVP对杏原生质体培养效果的影响。试验结果(表 2)表明,PVP对提高原生质体初始分裂和持续分裂能力有明显的作用。培养基中的 PVP在原生质体 0.5×10^5 个/mL的植板密度下以浓度 10 g/L最适,而在原生质体 2×10^5 个/mL的植板密度下,10和 20 g/L 2种浓度差异不大。酶解液中加入 10 g/L PVP对原生质体培养也具有明显的效果,但其作用明显低于培养基中加 10 g/L PVP的处理。在酶解液和培养基中都加入 10 g/L PVP,对培养效果的影响表现相加效应,分裂频率和植板率均明显高于单一处理。同时由试验结果可以看出,在原生质体 0.5×10^5 和 2×10^5 个/mL两种植板密度下的培养效果比较,在植板密度大的情况下 PVP的效果更明显。这是由于高密度培养褐化现象更严重,而 PVP的作用正是减轻了培养过程中的褐化现象而导致的。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://w

表 2 PVP对杏原生质体培养的影响 %

PVP浓度 /(g·L⁻¹)	植板密度 /(10⁵个·mL⁻¹)			
	0.5		2	
	分裂频率	植板率	分裂频率	植板率
0	11.56	1.24	4.07	0.21
5	13.64	1.87	6.36	0.78
10	14.67	2.34	9.24	1.78
20	12.75	1.34	9.47	1.66
酶解液中加 10 g/L PVP	13.68	1.47	5.95	0.68
培养基和酶解液均加 10 g/L PVP	15.02	2.56	11.01	2.07

在培养基中加入不同浓度的 PVP、甘氨酸和抗坏血酸,试验了不同抗氧化剂对中国李原生质体培养效果的影响。结果 (表 3)表明,这几种抗氧化剂在适宜浓度下对中国李原生质体再生细胞初始分裂和持续分裂能力均具有明显的促进作用,分裂频率和植板率均明显高于对照。在所试浓度范围内 PVP以 10 g/L、甘氨酸以 0.05 mol/L、抗坏血酸以 0.4 mmol/L效果最好。3种抗氧化剂比较而言,PVP和甘氨酸的效果优于抗坏血酸。PVP和甘氨酸可减轻培养过程中的褐化现象,而抗坏血酸反而加重了褐化。

表 3 抗氧化剂对中国李原生质体培养的影响

项目	对照	PVP/(g·L⁻¹)			甘氨酸 /(mol·L⁻¹)			抗坏血酸 /(mmol·L⁻¹)		
		5	10	20	0.05	0.1	0.2	0.1	0.2	0.4
分裂频率	13.21	16.29	18.75	13.66	18.54	17.43	15.28	13.28	15.61	16.25
植板率	2.02	2.67	3.24	2.42	3.41	2.88	2.54	2.21	2.85	2.98

3 讨 论

褐化是原生质体分离和培养过程中的普遍现象。褐化的原因是酚类物质被氧化成醌,醌聚化而产生褐色[6]。这种现象对原生质体培养会带来不利影响。据报道,酚酸含量低的猕猴桃愈伤组织原生质体能持续分裂,反之在培养时褐化现象严重,不能持续分裂[7]。在原生质体培养时,由于“群体效应”的存在,只有当植板密度达到一定程度后才能启动细胞分裂,而高的植板密度会加重褐化现象。因此,在原生质体分离和培养过程中,应采取减轻酚类物质氧化的措施。本试验在酶解液中加入 PVP,抑制了原生质体的老化褐变,提高了原生质体的活力和培养效果,这与有些报道的结果是相似的[1]。同时,在培养基中加入 PVP对提高原生质体的分裂频率和植板率的效果大于酶解液中加入 PVP.酶解液和培养基中均加入 PVP对培养效果的影响表现出相加效应,高密度培养时 PVP的效果更突出。这种效果正是由于 PVP具有较强的吸附酚类化合物和阻止其氧化的功能。在培养基中加入甘氨酸也减轻了褐化现象,改善了中国李原生质体的培养状况。抗坏血酸虽然加重褐化,但也可促进中国李原生质体再生细胞的分裂,其作用可能是通过消除酶解过程中产生的活性氧而体现的[3]。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

参 考 文 献

1 Wallin A, Welander M. Improved yield of apple leaf protoplasts from in vitro cultured shoots by using very young leaves and adding L-methionine to the shoot medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1985, 5: 69~ 72

2 Cultler A J, Saleem M, Coffey M A. Role of oxidative stress in cereal protoplast recalcitrance. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1989, 18: 113~ 117

3 齐放军,贾敬芬,李继胜.抗氧化剂对苜蓿原生质体早期培养的影响.实验生物学报, 1994, 27(1): 1~ 10

4 丁爱萍,王洪范,曹玉芬.苹果原生质体培养及植株再生.植物学报, 1994, 36(4): 271~ 277

5 孙勇如,安锡培.植物原生质体培养.北京: 科学出版社, 1991

6 Torre A M, Mau-Lastovicka T, Rezzaiyan R. Total phenolics and high performance liquid chromatography of phenolic acids of avacado. J Agric Food Chem, 1987, 35: 921~ 925

7 肖尊安,沈德绪,林伯年.猕猴桃愈伤组织的生理差异与原生质体生长和分化的关系.植物生理学报, 1992, 18(4): 369~ 375

Effect of Antioxidants on Protoplast Culture of Apricot and Chinese Plum

Ma Fengwang　Li Jiarui

(*Department of Horticulture, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi* 712100)

Abstract　In this paper, the effect of antioxidants on apricot and Chinese plum protoplast culture was studied using calli derived from embryos as donor materials. The results showed that the addition of PVP (polyvinylpirrolidone) to enzyme solution and culture medium had significant effects on protoplast isolation and culture. The addition of glucine and ascorbic acid of different concentrations to culture medium was also effective for inducing cell division.

Key words　apricot, Chinese plum, protoplast culture, antioxidants

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://w