

马婧,杨系玲,孙聪,等.老山芹正常试管苗和玻璃化苗的生理生化特性比较[J].江苏农业科学,2018,46(24):158-160.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.24.042

老山芹正常试管苗和玻璃化苗的生理生化特性比较

马婧¹,杨系玲¹,孙聪¹,范文艳¹,戴凌燕²,金丽娜¹,宫占元²,贝丽霞¹,姜述君¹

(1.黑龙江八一农垦大学农学院,黑龙江大庆 163319; 2.黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院,黑龙江大庆 163319)

摘要:为了研究老山芹(*Heracleum moellendorffii* Hance)正常试管苗和玻璃化苗生理生化特征的差异,通过初代培养和2次增殖继代获得老山芹的正常苗与玻璃化苗。结果表明,老山芹玻璃化苗的继代苗均呈现玻璃化现象。与正常苗相比,玻璃化苗的淀粉、可溶性蛋白和总叶绿素含量及干物质积累率显著降低,而可溶性糖含量显著升高;老山芹玻璃化苗的MDA含量、相对电导率、 $O_2^- \cdot$ 产生速率及 H_2O_2 含量均显著高于正常苗;玻璃化苗的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性也显著升高。上述结果表明,抗氧化酶系统失调引起的活性氧积累可能是产生老山芹玻璃化苗的一个重要原因。

关键词:老山芹;玻璃化;生理生化特性;活性氧

中图分类号: S567.23+9.01

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2018)24-0158-03

老山芹(*Heracleum moellendorffii* Hance)属伞形科多年生草本植物,为药食两用植物,其幼嫩茎叶是美味的山野菜,具有极高的经济开发价值,同时其干燥根入药作独活^[1]。独活是我国常用的传统中药,广泛用于风寒湿痹、腰膝疼痛、感冒头痛、痛疮肿痛和慢性气管炎的治疗^[1-3]。一些研究表明,老山芹含有槲皮素、山奈素和芸香苷等黄酮类化合物^[4],此外还含有聚乙炔化合物^[5]及佛手柑内酯、茵芹内酯、异茵芹内酯等香豆素化合物^[6]。研究表明,佛手柑内酯具有显著的抗癌作用^[7-8],因此,老山芹潜在药用价值也不可忽视。由于老山芹种子萌发困难,导致老山芹的自然分布数量较少,分布片断化明显,从而使其开发利用受到制约。在众多生物技术中,植物组织培养技术是解决重要野生植物资源保护和可持续发展的的重要手段之一。

玻璃化现象是植物组织培养中经常发生的一种生理失调现象,并且严重影响组培体系的稳定性。由于物种间在遗传和代谢等方面的差异性,导致不同种类植物玻璃化苗在生理生化方面存在一定差异。如香草玻璃化苗的可溶性糖含量显著降低^[9],而菊花玻璃化苗可溶性糖含量显著高于正常苗^[10];苹果玻璃化苗的叶片中赤霉素(GA)含量极显著上升^[11],然而杂交山杨玻璃化苗的GA含量降低^[12]。目前关于老山芹试管苗培育及其玻璃化方面的研究鲜有报道。本研究拟分析老山芹玻璃化试管苗生理生化特征的变化,以期揭示老山芹试管苗玻璃化的发生机制奠定基础,并为老山芹试管苗玻璃化的有效预防及恢复提供参考依据。

1 材料与方法

收稿日期:2017-07-05

基金项目:黑龙江省教育厅资助项目(编号:12531455)。

作者简介:马婧(1988—),女,黑龙江大庆人,博士研究生,从事作物栽培研究。Tel:(0459)6819185;E-mail:35723668@qq.com。

通信作者:姜述君,博士,教授,从事资源植物开发与利用研究。Tel:(0459)6819185;E-mail:jsjfwy@sohu.com。

1.1 试验材料及培养

老山芹正常试管苗与玻璃化苗:由新梢茎段在MS基本培养基上初代培养得到初代苗,然后截取茎段,进行2次增殖继代培养获得。继代培养20 d后调查增殖苗数和增殖系数,35 d后调查玻璃化率。增殖培养基配方为1/2MS+1.2 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+2.5%蔗糖。培养基pH值为6.5,培养室温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照时间为16 h/d,光照度为 $35 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

1.2 生理生化指标的测定

淀粉、可溶性蛋白、总叶绿素、叶绿素a、叶绿素b、可溶性糖和丙二醛(MDA)含量及相对电导率的测定参考苍晶等的方法^[13]。

H_2O_2 含量、 $O_2^- \cdot$ 产生速率与过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性等的测定参考蔡庆生的方法^[14],以单位质量蛋白质中的酶活性计。过氧化氢酶(CAT)活性的测定参照Knörzer等的方法^[15]。在进行干物质积累测定时,每瓶3株作为1个测量单位。每个样品重复3次,取平均值。

1.3 数据分析

试验数据采用SPSS 11.0软件进行统计与分析。

2 结果与分析

2.1 老山芹正常苗与玻璃化苗增殖能力的比较

将老山芹玻璃化的试管苗进行继代培养后,其分化出的苗仍呈现出玻璃化状态,玻璃化率显著高于正常苗,而正常苗增殖后的玻璃化苗率仅为12.56%,可见老山芹玻璃化苗增殖能力显著低于正常苗;老山芹正常试管苗的增殖系数为5.52,而玻璃化苗的增殖系数为3.38,比正常苗的增殖系数降低38.77%(表1)。结果表明,在试管苗培养过程中,玻璃化现象的出现严重降低了老山芹试管苗的繁殖速度。

2.2 老山芹正常苗与玻璃化苗可溶性糖、淀粉、可溶性蛋白含量及干物质积累率的比较

由表2可以看出,玻璃化苗的可溶性糖含量显著高于正

表 1 老山芹正常苗与玻璃化苗增殖的差异

处理	接种数(个)	增殖数量(个)	增殖系数	玻璃化苗数(株)	玻璃化率(%)
正常幼苗	20	110.40 ± 3.76a	5.52 ± 0.25a	13.86 ± 0.96b	12.56 ± 0.09b
玻璃化幼苗	20	67.66 ± 1.43b	3.38 ± 0.13b	67.66 ± 1.43a	100.00 ± 0.00a

注:同列数据后标有不同小写字母表示经 Duncan’s 新复极差法检验,在 0.05 水平上差异显著。下同。

常苗,但其淀粉、可溶性蛋白含量及干物质积累率显著低于正常苗。正常苗的可溶性糖含量比玻璃化苗低 17.09%;但正常苗的淀粉含量、可溶性蛋白含量、干物质积累率分别比玻璃化苗高 33.65%、30.09%、66.94%。这些结果说明,玻璃化苗将光合产物直接转化为淀粉的能力较正常苗下降了。

表 2 老山芹正常苗与玻璃化苗的可溶性糖、淀粉和可溶性蛋白含量及干物质积累比较

处理	可溶性糖含量(mg/g)	淀粉含量(mg/g)	可溶性蛋白含量(mg/g)	干物质积累率(%)
正常幼苗	15.38 ± 1.44b	7.03 ± 0.51a	1.47 ± 0.09a	47.66 ± 3.56a
玻璃化幼苗	18.55 ± 1.23a	5.26 ± 0.38b	1.13 ± 0.08b	28.55 ± 1.87b

注:可溶性糖、淀粉、可溶性蛋白含量均为鲜质量含量。

2.3 老山芹正常苗与玻璃化苗叶绿素含量的比较

从表 3 可见,正常苗与玻璃化苗的总叶绿素、叶绿素 a、叶绿素 b 含量和叶绿素 a/叶绿素 b 均存在显著差异。正常苗的叶绿素 a 含量比玻璃化苗高 42.68%,叶绿素 b 含量比玻璃化苗高 52.17%,总叶绿素含量比玻璃化苗高 44.76%。而正常苗的叶绿素 a/叶绿素 b 比玻璃化苗降低了 6.18%。以上结果表明,老山芹玻璃化苗的光合能力与正常幼苗相比有所下降。

表 3 老山芹正常苗与玻璃化苗叶绿素含量差异

处理	叶绿素 a 含量(mg/g)	叶绿素 b 含量(mg/g)	总叶绿素含量(mg/g)	叶绿素 a/叶绿素 b
正常幼苗	1.17 ± 0.07a	0.35 ± 0.03a	1.52 ± 0.10a	3.34 ± 0.18b
玻璃化幼苗	0.82 ± 0.07b	0.23 ± 0.02b	1.05 ± 0.09b	3.56 ± 0.15a

注:叶绿素含量以鲜质量计。

2.4 老山芹正常苗与玻璃化苗叶片丙二醛含量、相对电导率及活性氧含量的比较

由表 4 可知,老山芹玻璃化苗 MDA 含量、相对电导率、O₂⁻ 的产生速率及 H₂O₂ 含量均显著高于正常苗。玻璃化苗的 MDA 含量、O₂⁻ 产生速率分别较正常苗提高了 82.78%、45.09%,而相对电导率、H₂O₂ 含量分别较正常苗提高了 1.64、1.12 倍。以上结果说明,老山芹玻璃化试管苗体内发生了活性氧的过度积累和较严重的膜脂过氧化。

表 4 老山芹正常苗与玻璃化苗丙二醛含量、相对电导率及活性氧差异

处理	MDA 含量(μmol/g)	相对电导率(%)	O ₂ ⁻ 产生速率[μmol/(g·min)]	H ₂ O ₂ 含量(μmol/g)
正常幼苗	26.83 ± 2.67b	16.41 ± 1.02b	8.56 ± 0.32b	21.58 ± 2.08b
玻璃化幼苗	49.04 ± 3.69a	43.39 ± 3.55a	12.42 ± 0.61a	45.66 ± 2.86a

注:MDA 含量、O₂⁻ 产生速率、H₂O₂ 含量的测定均使用鲜材料。

2.5 老山芹正常苗与玻璃化苗抗氧化酶活性的比较

由表 5 可知,老山芹玻璃化苗出现了抗氧化酶系统的失调。老山芹玻璃化苗抗氧化酶系统中的超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶、抗坏血酸过氧化物酶活性显著高于正常苗,上述 4 种抗氧化酶活性分别比正常苗提高了 23.84%、44.41%、92.07%、26.64%。

表 5 老山芹正常苗与玻璃化苗抗氧化酶活性的差异

处理	SOD 活性(U/mg)	CAT 活性(U/mg)	POD 活性(U/mg)	APX 活性(U/mg)
正常幼苗	1.72 ± 0.12a	18.51 ± 1.31a	8.32 ± 0.52b	5.93 ± 0.36a
玻璃化幼苗	2.13 ± 0.11b	26.73 ± 0.44b	15.98 ± 1.04a	7.51 ± 0.19b

3 讨论

玻璃化现象是植物组织培养过程中最为常见一种生理障碍。本试验结果显示,与正常苗相比,老山芹玻璃化苗的叶绿素、淀粉、可溶性蛋白含量和干物质积累率均出现大幅度的降低,而可溶性糖含量却比正常试管苗显著增加。这些结果表明,老山芹玻璃化苗出现了光合作用失调和代谢紊乱现象。在本试验中,玻璃化老山芹的可溶性糖含量显著高于正常苗,而网纹甜瓜^[16]、满天星^[17]和蓝莓^[18]的玻璃化苗可溶性糖含量显著低于正常苗,这种差异可能是由于不同植物种类对糖类吸收和利用方面存在差异造成的。

活性氧是植物细胞代谢过程中的正常产物,在通常情况下其产生和猝灭保持在一个适当平衡的状态,因此正常细胞中的活性氧含量保持在一个相对较低的水平。然而在各类不利的环境因子作用下,植物体内的活性氧水平的动态平衡会被打破,从而导致细胞内活性水平激增,诱导细胞的氧化伤害^[19]。在各类活性氧中,O₂⁻、H₂O₂ 是 2 个较为重要的活性氧种类。许多研究也表明,试管苗玻璃化与活性氧代谢失

调所引起的氧化胁迫密切相关,并且 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 、 H_2O_2 是玻璃化诱导过程中的重要破坏性因子^[9,18,20-22]。本试验结果显示,老山芹玻璃化苗的活性氧 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 、 H_2O_2 的水平较正常苗大幅度升高,说明老山芹试管苗在玻璃化过程中发生活性氧 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 、 H_2O_2 的暴发式增多。植物体内过量积累的活性氧会使细胞膜和细胞器膜的脂质过氧化作用增强,最终引起细胞膜的损伤,而 MDA 是构成细胞成分磷脂氧化最终产物之一,因此 MDA 是指示膜脂过氧化的重要指标^[23]。在本试验中,老山芹试管苗玻璃化苗的 MDA 含量和相对电导率均显著高于正常苗,说明老山芹试管苗在玻璃化过程中发生了氧化胁迫和细胞膜的氧化损伤。因此笔者推测,活性氧过度积累引起的氧化胁迫可能在老山芹试管苗玻璃化过程中起着重要作用。

植物体为了清除体内的活性氧,进化形成了一套高效复杂的抗氧化酶系统,它是由过氧化物酶、超氧化物歧化酶、抗坏血酸过氧化物酶和过氧化氢酶等多种酶系构成的。其中 SOD 可催化生物体内的 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成 H_2O_2 、 H_2O ,是抗氧化系统的第一道防线。 H_2O_2 与其他活性氧不同,不具有未配对电子,因此 H_2O_2 可以通过水孔蛋白通道穿过生物膜,并能引起远离其产生位点细胞的氧化伤害^[24]。在植物体内,除了 CAT 可直接催化 H_2O_2 生成 H_2O 、 O_2 外,植物体还可以利用抗坏血酸过氧化物酶,通过 APX-GSH(APX-谷胱甘肽)再生系统,将 H_2O_2 还原成 H_2O ,从而消除 H_2O_2 对细胞的伤害^[25]。由于 APX 对 H_2O_2 的亲性和性显著高于 CAT,因此,APX-GSH 再生系统被认为是植物细胞内活性氧清除的主要方式^[25-26]。POD 一方面可以清除 H_2O_2 ,另一方面也可参与叶绿素的降解和活性氧的产生^[27]。

本试验结果表明,老山芹玻璃化苗体内活性氧 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 、 H_2O_2 大量产生的同时,虽然伴随着多种抗氧化酶活性的上升,但是抗氧化酶活性升高的幅度明显小于活性氧积累的幅度,这一结果说明,SOD 活性的升高不足以清除老山芹玻璃化苗体内过量积累的活性氧 $\text{O}_2^{\cdot -}$,并且 POD、CAT、APX 这 3 种抗氧化酶活性的升高也无法有效降低老山芹玻璃化苗体内 H_2O_2 的积累。由此可见,抗氧化酶系统失调引起的活性氧积累可能是导致老山芹玻璃化苗产生的一个重要原因。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第 55 册第 3 分册)[M]. 北京:科学出版社,1992:181-212.
- [2] 孙星衍. 神农本草经[M]. 北京:人民卫生出版社,1963:17.
- [3] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,1976:629-631.
- [4] Basargin D D. Proportions of flavonoid compounds in far eastern species of cow parsnip (*Heracleum* L.) during the vegetation period[J]. Botanicheskii Zhurna (Leningrad), 1976, 61: 512.
- [5] Park D S. The screening of polyacetylenic compounds in Korean plants[J]. Seoul Tachakkyo Yakkak Nonmunjip, 1976, 1: 132.
- [6] 吴寿金,李德玉,张丽,等. 走马芹中香豆素成分的研究[J]. 药学报,1986, 21(8): 599-604.
- [7] 黄雪涛,陈泰华,祁敏倪,等. 佛手柑内酯抑制肺癌细胞分泌可溶性白细胞介素 2 受体[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2016, 10(11): 1567-1573.
- [8] 林碧华,马晓娟,万树伟,等. 佛手柑内酯对鼻咽癌细胞凋亡的影响

- 响[J]. 肿瘤防治研究, 2014, 41(11): 1163-1170.
- [9] Sreedhar R V, Venkatachalam L, Neelwarne B. Hyperhydricity - related morphologic and biochemical changes in vanilla (*Vanilla planifolia*) [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2009, 28(1): 46-57.
- [10] 孙庆春,郑成淑,丰震. 菊花玻璃化苗与正常苗的生理特性比较[J]. 山东农业科学, 2009(5): 45-47.
- [11] 牛自勉,王贤萍,许月明,等. 苹果砧木茎尖培养玻璃化与内源激素的关系[J]. 园艺学报, 1994, 21(4): 396-397.
- [12] 吴迪,关录凡,王秋玉. 杂种山杨玻璃化苗内源激素含量研究[J]. 林业科学, 2007, 43(10): 127-129.
- [13] 苍晶,赵会杰. 植物生理学实验教程[M]. 北京:高等教育出版社, 2013.
- [14] 蔡庆生. 植物生理学实验[M]. 北京:中国农业大学出版社, 2013.
- [15] Knörzer O C, Burner J, Boger P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress[J]. Physiologia Plantarum, 1996, 97(2): 388-396.
- [16] 齐红岩,陈岩,贾卓男,等. 网纹甜瓜玻璃苗外观形态、显微结构及生理特性的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2009, 40(6): 678-682.
- [17] 曹天旭,朴炫春,廉美兰,等. 满天星试管玻璃化苗与正常苗的比较研究[J]. 黑龙江农业科学, 2009(5): 86-88.
- [18] 吕敏,夏秀英,徐品三,等. 蓝莓玻璃化试管苗的显微结构及生理生化特性变化[J]. 植物生理学报, 2014, 50(4): 453-460.
- [19] Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Driscoll S, et al. Drought and oxidative load in the leaves of C_3 plants: a predominant role for photorespiration? [J]. Annals of Botany, 2002, 89(7): 841-850.
- [20] Saher S, Piqueras A, Hellin E, et al. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress[J]. Physiologia Plantarum, 2004, 120(1): 152-161.
- [21] 常有宏,张玉娇,李晓刚,等. “黄冠”梨正常试管苗与玻璃化苗生理生化及超微结构的比较研究[J]. 园艺学报, 2011, 38(2): 225-232.
- [22] Tian J, Jiang F L, Wu Z. The apoplastic oxidative burst as a key factor of hyperhydricity in garlic plantlet *in vitro* [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2015, 120(2): 571-584.
- [23] Mishra S, Jha A B, Dubey R S. Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings[J]. Protoplasma, 2011, 248(3): 565-577.
- [24] Bienert G P, Møller A L, Kristiansen K A, et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(2): 1183-1192.
- [25] Asada K. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxidase scavenging enzyme in plants[J]. Plant Physiology, 1992, 85(2): 235-241.
- [26] Wang J, Zhang H, Allen R D. Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress[J]. Plant & Cell Physiology, 1999, 40(7): 725-732.
- [27] Martinez C, Baccou J C, Bresson E, et al. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* [J]. Plant Physiology, 2000, 122(3): 757-766.