

## 碳酸钙胁迫下枳壳愈伤组织的某些生理生化指标变化

吉前华\*

肇庆学院生物系, 广东肇庆 526061

**提要** 测定碳酸钙( $\text{CaCO}_3$ )胁迫下枳壳愈伤组织的某些生理生化指标的结果表明: 除全Fe含量外,  $\text{CaCO}_3$ 浓度与过氧化物酶(POD)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性、活性Fe含量、可溶性蛋白质含量、愈伤组织增重均呈显著或极显著负相关, 与培养液pH值呈显著正相关; 随着培养的时间, POD活性、活性Fe和可溶性蛋白质含量、愈伤组织增重呈降低趋势, SOD和CAT活性先升后降, 含高浓度 $\text{CaCO}_3$ 的培养液pH值仅在20日左右略有降低。

**关键词** 枳壳; 愈伤组织; 碳酸钙( $\text{CaCO}_3$ )胁迫; 生理生化指标

## Changes in Several Physiological and Biochemical Indexes in Callus Tissue of *Poncirus trifoliata* Under Calcium Carbonate Stress

Ji Qian-Hua\*

Department of Biology, Zhaoqing College, Zhaoqing, Guangdong 526061, China

**Abstract** The results of the physiological and biochemical indexes in callus tissue of *Poncirus trifoliata* tested under calcium carbonate( $\text{CaCO}_3$ ) stress indicated that except total iron content, the negative correlations among  $\text{CaCO}_3$  concentration and peroxidase(POD) activity, superoxide dismutase(SOD) activity, catalase(CAT) activity, active iron content, soluble protein content and callus growth were recorded. There were a positive correlation between  $\text{CaCO}_3$  concentration and medium pH. With the culture time extension, POD activity, active iron content, soluble protein content and callus growth showed a declining trend, SOD and CAT activities first increased then decreased. The pH value in liquid medium with high concentration of  $\text{CaCO}_3$  showed slight decline within about 20 days.

**Key words** *Poncirus trifoliata*; callus tissue;  $\text{CaCO}_3$  stress; physiological and biochemical index

地球上石灰性土壤广泛分布在南纬 $10^{\circ}\sim 40^{\circ}$ 和北纬 $10^{\circ}\sim 40^{\circ}$ 之间的地区。石灰诱导失绿症是石灰性土壤上作物最主要的营养失调综合症<sup>[1]</sup>, 也是我国柑桔生产中的严重问题, 尤以四川最为突出。四川土壤中碳酸钙( $\text{CaCO}_3$ )含量高, 一般为 $5\%\sim 10\%$ , pH  $7.5\sim 8.5$ <sup>[2]</sup>, 严重影响植株的生长和产量, 造成植株减产 $30\%\sim 40\%$ , 甚至根本无收成, 特别是综合性状良好的柑桔当家砧木——枳壳砧柑桔园表现尤为严重。因此, 筛选和培育抗性材料已成为目前和今后解决缺铁失绿问题的根本出路, 同时, 通过逆境反应及可能机制选择用于早期、快速、准确、简便、有效的诊断缺铁黄化及筛选柑桔铁高效基因型指标是非常重要的<sup>[3]</sup>。本文检测了 $\text{CaCO}_3$ 胁迫条件下枳壳愈伤组织的某些生理生化指标的变化。

### 材料与方 法

六年生的枳壳(*Poncirus trifoliata*)实生树取自

四川农业大学柑桔园, 用其嫩梢离体培养获得绿色瘤状愈伤组织。

材料培养25 d后, 进行液体滤纸桥静置培养。基本培养基为MT培养基(3%蔗糖, pH 5.8), 分别添加0、0.1%、0.4%、0.7%、1%的 $\text{CaCO}_3$ 进行胁迫培养。接种前称愈伤组织鲜重, 测定培养液的pH值, 取培养5、10、15、20、25 d的愈伤组织和培养液进行测定。重复3次。培养条件为光照 $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ , 光照度 $36\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 左右, 温度 $24^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度 $60\%\sim 80\%$ 。

全铁含量测定参照文献4的高氯酸、浓硝酸消化法, 活性铁含量测定参照杨玉爱<sup>[5]</sup>的HCl浸提法。用日本岛津AA-646型原子吸收分光光度计测定。工作条件: 波长 $2483\ \text{\AA}$ , 灯电流 $10\ \text{mA}$ ,

收稿 2004-11-24 修定 2005-04-11

资助 肇庆学院科研项目(02210)。

\*E-mail: qhgee@zqu.edu.cn, Tel: 0758-2716418

空气流量  $7.0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , 进样量  $6.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 乙炔流量  $1.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

可溶性蛋白质含量测定参照文献6的考马斯亮蓝G-250法。过氧化物酶(peroxidase, POD)活性的测定参照文献7的愈创木酚法。过氧化氢酶(catalase, CAT)活性的测定参照文献8的过氧化氢法。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性的测定参照文献7的氮蓝四唑法。用日本岛津UV-265型紫外-可见分光光度计测定。

愈伤组织增重=收获愈伤组织鲜重-接种愈伤组织鲜重。培养液pH用PHS-10A数字酸度/离子计测定。

实验数据采用SPSS for Windows软件包进行回归分析、曲线拟合和相关分析。

## 结果与讨论

### 1 愈伤组织的增殖

非胁迫条件下培养的愈伤组织增殖呈S形(图1)。含0.1%和0.4%  $\text{CaCO}_3$ 的培养液中愈伤组织增长较前者缓慢,而0.7%和1%  $\text{CaCO}_3$ 胁迫条件下培养的第10~15天已经达到最大增殖量,但不及同期非胁迫条件下培养的,之后呈明显的下降趋势,第25天,1.0%  $\text{CaCO}_3$ 胁迫条件下培养的愈伤组织(相对于接种量而言)呈现微弱的负增长,这可能与部分愈伤组织死亡有关。第25天,愈伤组织的增殖量与 $\text{CaCO}_3$ 浓度和培养液pH值呈极显著负相关( $r=-0.963^{**}$ 、 $-0.978^{**}$ ),与POD、SOD、CAT活性和活性铁含量呈显著或极显著的正相关( $r=0.988^{**}$ 、 $0.984^{**}$ 、 $0.985^{**}$ 、 $0.892^*$ )。

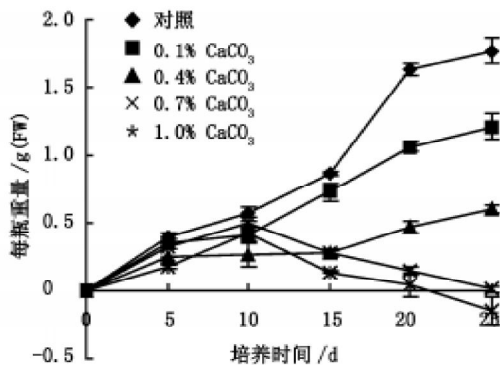


图1  $\text{CaCO}_3$ 胁迫下愈伤组织的增殖量  
Fig. 1 Increment of callus under  $\text{CaCO}_3$  stress

### 2 愈伤组织中的全铁和活性铁含量变化

图2显示:

(1) 非胁迫条件下培养的愈伤组织中全铁含量基本稳定 [ $58\sim70 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})$ ]。胁迫条件下培养5 d的全铁含量高于非胁迫条件下培养的,并且随着 $\text{CaCO}_3$ 浓度的增加而增加;随着培养天数的增加,0.1%和0.4%  $\text{CaCO}_3$ 胁迫条件下培养的呈下降趋势,0.7%和1%  $\text{CaCO}_3$ 胁迫条件下培养的在5~20 d呈下降趋势,第25天迅速回升,出现异常富集 [ $126.08 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})$ ]。相关分析表明,第25天,全铁含量与各因素间相关性均未达到显著水平。

(2) 非胁迫条件下培养的愈伤组织中活性铁含量随培养天数的增加而略有增加;胁迫条件下培养5 d的愈伤组织中活性铁含量随 $\text{CaCO}_3$ 浓度的增加而增加,均高于非胁迫条件下培养的,以后均呈下降趋势,随着 $\text{CaCO}_3$ 浓度的增加而加快,且含量均低于非胁迫条件下培养的。相关分析表

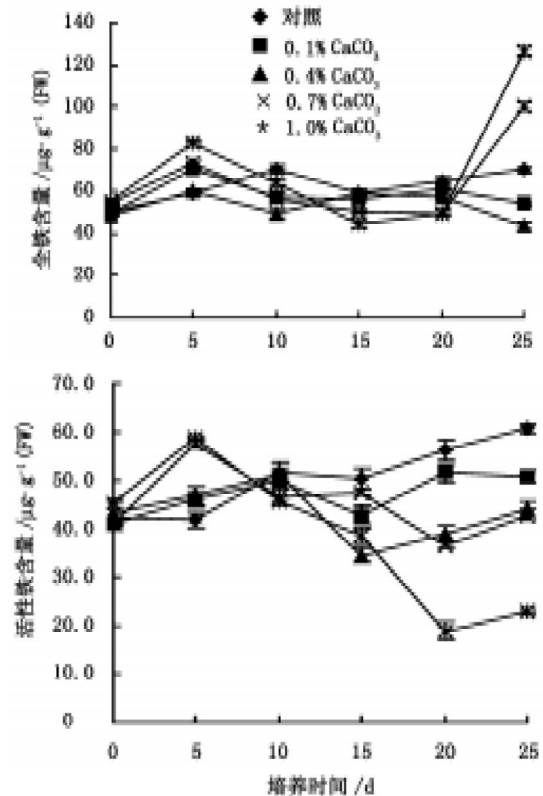


图2  $\text{CaCO}_3$ 胁迫下愈伤组织中全铁和活性铁含量的变化  
Fig. 2 Changes in total iron and active iron contents in callus under  $\text{CaCO}_3$  stress

明, 活性铁含量与  $\text{CaCO}_3$  浓度呈显著负相关 ( $r=-0.941^*$ ), 与 POD、SOD、CAT 活性, 可溶性蛋白质含量和愈伤组织增殖量呈显著正相关 ( $r=0.887^*$ 、 $0.931^*$ 、 $0.875^*$ 、 $0.939^*$ 、 $0.892^*$ )。本文结果表明, 在愈伤组织中的活性铁含量受  $\text{CaCO}_3$  浓度的影响显著。

### 3 培养液 pH 值的变化

图 3 表明, 不含  $\text{CaCO}_3$  的培养液 pH 值一直保持最适水平 (pH 5.8); 含 0.1%  $\text{CaCO}_3$  的培养液 pH 值随着培养天数的增加而略微下降; 含 0.4%、0.7% 和 1%  $\text{CaCO}_3$  的培养液 pH 值在第 5~15 天期间无明显变化, 而第 15~20 天则略微下降, 第 20 天后又有回升。枳壳在植株水平上表现为抗缺铁失绿能力差<sup>[9~11]</sup>, 其愈伤组织在含不同浓度  $\text{CaCO}_3$  的培养液中, 改变培养液 pH 值的能力也较差, 含高浓度  $\text{CaCO}_3$  的培养液中尤其是如此, 这可能与枳壳在细胞水平上耐盐能力差有关。

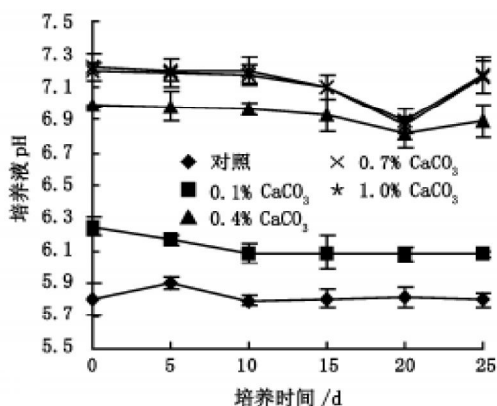


图 3  $\text{CaCO}_3$  胁迫下培养液 pH 值的变化

Fig. 3 Changes in pH in medium under  $\text{CaCO}_3$  stress

### 4 愈伤组织中可溶性蛋白质含量的变化

非胁迫条件下培养的愈伤组织中可溶性蛋白质含量在第 5、15 天出现 2 个高峰;  $\text{CaCO}_3$  胁迫条件下培养的均比非胁迫条件下培养的含量低, 并且随着  $\text{CaCO}_3$  浓度的增加而明显下降, 各种浓度  $\text{CaCO}_3$  胁迫条件下培养的可溶性蛋白质含量变化均只出现 1 个峰值, 分别出现在第 5、10、15 天 (图 4)。  $\text{CaCO}_3$  浓度显著影响愈伤组织中可溶性蛋白质的含量 ( $r=-0.917^*$ )。

### 5 愈伤组织的抗氧化酶活性变化

由图 5 可见: POD 活性随着培养进程呈上升趋势, 非胁迫条件下培养的 POD 活性在第 10、25

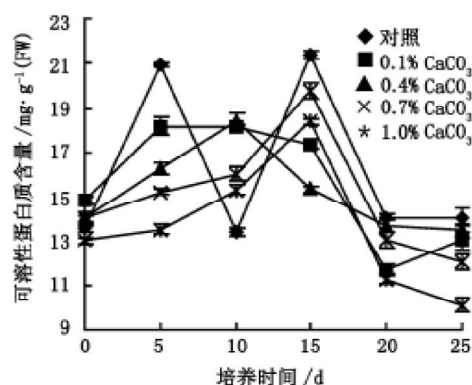


图 4  $\text{CaCO}_3$  胁迫下愈伤组织中可溶性蛋白质含量变化

Fig. 4 Changes in soluble protein content in callus under  $\text{CaCO}_3$  stress

天分别出现 2 个高峰, 胁迫条件下培养的 POD 活性低些, 且随着  $\text{CaCO}_3$  浓度增加而下降, 培养到第 25 天时, POD 活性与  $\text{CaCO}_3$  浓度和培养液 pH 值呈显著负相关 ( $r=-0.951^*$ 、 $-0.937^*$ ), 表明胁迫条件下酶活性受抑; CAT 活性在非胁迫条件下培养的呈上升趋势, 胁迫条件下培养 5 d 较非胁迫条件下培养的有所升高, 以后呈下降趋势, 随着  $\text{CaCO}_3$  浓度的增加而加快; SOD 活性在各种培养条件下均呈下降趋势, 不同  $\text{CaCO}_3$  浓度之间 SOD 活性变化趋势与 CAT 相同。培养 25 d 的愈伤组织中, CAT 和 SOD 活性与  $\text{CaCO}_3$  浓度呈显著或极显著的负相关 ( $r=-0.954^*$ 、 $-0.945^*$ ), 与培养液 pH 值呈显著或极显著的负相关 ( $r=-0.965^{**}$ 、 $-0.932^*$ ), 表明两种酶在胁迫条件下培养初期活性升高, 随着培养天数和  $\text{CaCO}_3$  浓度的增加, 从总体上说是受抑的。相关性分析显示 SOD 与 CAT ( $r=0.955^*$ )、SOD 与 POD ( $r=0.967^{**}$ )、POD 与 CAT ( $r=0.988^{**}$ ) 3 种酶之间也呈显著或极显著的正相关。各种逆境因素对保护酶系统活性有不同程度的抑制, 而且不同基因型之间有差异, 枳壳比其他柑桔属植物更易受到伤害<sup>[12~16]</sup>。本文中不同浓度  $\text{CaCO}_3$  在不同程度上抑制枳壳中 POD、CAT 和 SOD 的活性的结果, 显示  $\text{CaCO}_3$  胁迫下保护酶系统活性下降可能与枳壳愈伤组织不耐盐有关。另外, CAT 和 POD 均属于含铁酶, 细胞内活性铁含量降低也可能使 CAT 和 POD 活性下降, 因而两者在  $\text{CaCO}_3$  胁迫下均呈下降趋势。

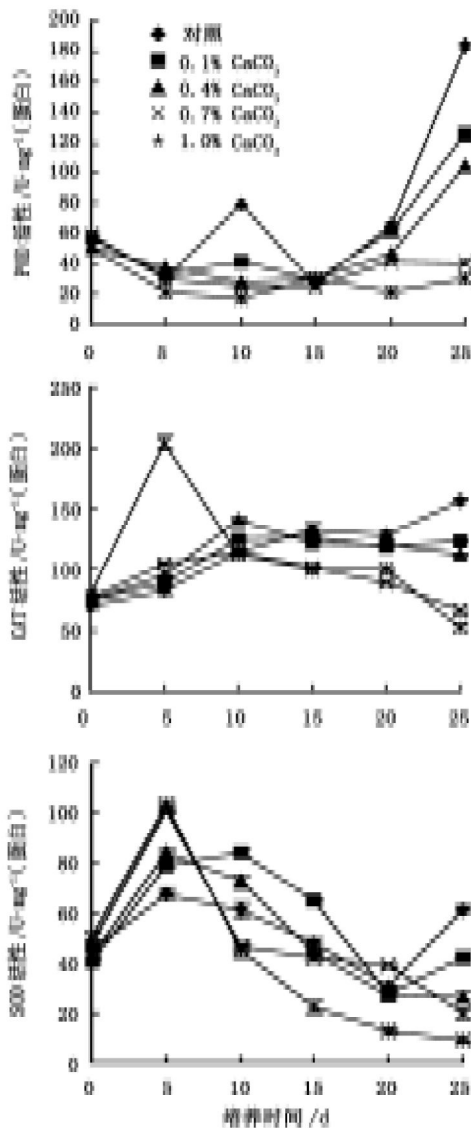


图5  $\text{CaCO}_3$  胁迫下愈伤组织中 POD、CAT 和 SOD 活性的变化

Fig. 5 Changes in the activities of POD, CAT and SOD in callus under  $\text{CaCO}_3$  stress

## 参考文献

- Schinas S. Lime-induced chlorosis. *J Soil Sci*, 1977, 28: 351~368
- 陈华林. 柑桔砧木基因型对石灰性紫色土缺铁黄化的抗性差异——选择利用的潜力. *西南农业学报*, 1993, 6(4): 61~67
- 吉前华, 李玉堂, 王永清. 石灰性土壤上柑桔缺铁黄化研究进展. *四川农业大学学报*, 1998, 16(3): 365~369
- 翁才浩. 作物的营养施肥及诊断技术. 南昌: 江西科学技术出版社, 1988. 171~176
- 杨玉爱. 柑桔的铁素营养诊断方法的探讨. *土壤通报*, 1988, (2): 74~80
- 文树基. 基础生物化学实验指导. 西安: 陕西科学技术出版社, 1994. 45~52
- 刘祖祺. 植物抗逆生理学. 北京: 中国农业出版社, 1994. 311~372
- 蒋传葵, 金承德, 吴仁龙等. 工具酶的活力测定. 上海: 上海科学技术出版社, 1982. 36
- 朱世江, 李道高, 苏军.  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ - $\text{HCO}_3^-$  对柑桔幼苗叶片含铁量及  $\text{H}^{14}$  放射性强度的影响. *绵阳经济技术高等专科学校学报*, 1997, 14(3): 5~7
- 袁玲, 黄建国, 杨邦俊. 柑桔根系对缺铁的生理反应. *植物营养与肥料学报*, 1995, 1(3): 42~47
- 朱世江, 李道高.  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{Fe}^{2+}$  对三种柑桔试管苗根系分泌的影响. *绵阳农专学报*, 1995, 12(2): 10~13
- 伍玲, 李道高.  $\text{HCO}_3^-$  和 pH 对 3 种柑桔悬浮培养材料的生理效应. *西南农业大学学报*, 2001, 23(1): 84~86
- 周红卫, 施国新, 陈景耀等. 6-BA 对水花生抗氧化酶系  $\text{Hg}^{2+}$  毒害的缓解作用. *生态学报*, 2003, 23(2): 387~392
- 陈月艳, 孙国荣, 阎秀峰.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  对星星草种子保护酶活性的影响. *草地学报*, 2002, 10(3): 194~197
- 殷华, 肖纬, 董占梅等. 碱性环境对苜蓿愈伤组织几种酶活性的影响. *哈尔滨师范大学自然科学学报*, 1997, 13(4): 94~96
- Siegel BZ. The isoperoxidases of *Disum sativum*. *Plant Physiol*, 1964, 42: 221~226