

不同浓度糖氮对离体穗培养小麦粒重和叶片膜脂过氧化作用的影响

周琴 姜东 戴廷波 荆奇 曹卫星*

南京农业大学农业部作物生长调控重点实验室, 南京 210095

提要 在相同浓度配比的蔗糖和谷氨酰胺培养液中培养小麦品种扬麦9号和徐州26号的离体穗, 检测不同水平的糖氮对小麦粒重及叶片膜脂过氧化作用的影响。结果表明, 在一定浓度范围内, 提高培养液中蔗糖和谷氨酰胺供应水平后, 单粒重、叶片的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性提高, 膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)含量降低; 培养液中糖氮水平过高, 叶片的SOD和CAT活性则下降, MDA含量升高, 籽粒单粒重下降。

关键词 蔗糖 / 谷氨酰胺; 离体穗; 粒重; 叶片膜脂过氧化作用; 小麦

Effects of Different Concentrations of Sucrose and Glutamine in Culture Solution on Grain Weight and Cell Membrane Lipid Peroxidation in Flag Leaf of Wheat After the Ear Culture *in vitro*

ZHOU Qin, JIANG Dong, DAI Ting-Bo, JING Qi, CAO Wei-Xing*

Key Laboratory of Crop Growth Regulation, Ministry of Agricultural, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

Abstract When the concentrations of sucrose and glutamine in the culture medium were lower than 60 and 6 g·L⁻¹, respectively, the single grain weight and the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) increased, and the content of malondialdehyde (MDA) in flag leaves decreased. However, excessive supply of sucrose and glutamine reduced the activities of SOD and CAT, and increased MDA content in flag leaves, while the final single grain weight decreased. The results indicated that excessive levels of sucrose and glutamine in the liquid medium were unfavorable for ear growth, and thus reduced grain weight in wheat.

Key words sucrose/glutamine; detached ear; grain weight; cell membrane lipid peroxidation; wheat

穗培养作为一种实验方法很早就用于研究小麦穗花发育与籽粒形成的生理过程^[1]。1968年, Jenner^[2]在无菌条件下采用短期离体穗培养研究了小麦籽粒淀粉的合成。1977年澳大利亚学者Donovan和Lee^[3]进一步建立了长时间小麦穗培养系统。由于离体穗培养技术可以避免穗与其他器官的相互作用, 且在新的“源”(培养基)–“库”(穗器官)系统中, “源”的供应水平可以得到有效的控制^[4], 因此, 离体穗培养技术越来越受研究者的重视。1999年, Ahmadi和Baker^[5]研究了激素对小麦籽粒灌浆进程的影响, Cazetta等^[6]研究了蔗糖和氮对玉米籽粒生长的调控。此外, 采用离体穗培养法研究不同水平碳素或氮素对玉米淀粉蛋白质合成的调节作用及对籽粒蔗糖合成酶(SS)和ADPG焦磷酸化酶(ADPG-Ppase)活性的影响亦有所报道^[6,7]。可见, 离体穗培养技术对研究禾谷类作物穗、花、粒发育的调控、胚乳内含物的

分布与形成以及籽粒发育的酶学和动力学生理机制是一个很好的技术和手段。

在培养过程中, 由于外界光强一般较弱, 仅略高于叶片光补偿点, 基本上不能为籽粒提供灌浆底物, 所以, 可通过培养基提供糖和氮作为籽粒灌浆的主要底物源。另外, 叶片主要是作为库器官存在的, 因此, 叶片的生理活性可间接反映同为库器官穗的生长状况。小麦穗离体培养过程中, 由于伤口、营养液浓度和培养过程中微生物的侵染的影响, 会对离体穗的生长产生不良的影响。植物在逆境、矿质营养元素缺乏及毒害元素富集的情况下, 会引起植物体内活性氧代谢不平

收稿 2003-11-10 修定 2004-04-02

资助 国家自然科学基金(30170544、30200166)、教育部博士点基金(2000030707)和江苏省自然科学基金(BK2002205、BK2001063)。

* 通讯作者(E-mail: caow@njau.edu.cn, Tel: 025-4396575)。

衡和相应的清除系统的改变^[8]。本文在前人研究的基础上, 通过模拟大田小麦开花期植株体内碳氮比值($10 \sim 12$ ^[9]), 将培养液中蔗糖和谷氨酰胺浓度的比值恒定为10, 研究营养液浓度对叶片超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)活性及丙二醛(MDA)含量的影响, 寻找小麦离体穗培养最适糖氮供应水平, 以期为离体穗培养体系的建立和完善, 以及小麦籽粒发育研究提供参考。

材料与方 法

试验于2002年在本校卫岗试验站进行。材料为冬小麦(*Triticum aestivum*)品种扬麦9号和徐州26号。10月5日播种, 经低温春化后移至人工气候室生长, 开花期选取生长一致、同日开花的单茎进行挂牌标记, 花后2 d取单茎穗(连同旗叶)进行穗培养。穗颈节以下部分先用75%乙醇溶液表面消毒1 min, 0.1%的HgCl₂溶液表面消毒5 min, 以灭菌水冲洗干净后, 在超净工作台上将9个单茎穗转移到盛有150 mL培养液的三角瓶中, 用无菌医用棉封口。以MS为基本培养基, 蔗糖和谷氨酰胺为唯一碳源和氮源, 设置5个处理, 即蔗糖和谷氨酰胺浓度分别为: 20和2 g·L⁻¹(20S/2G)、40和4 g·L⁻¹(40S/4G)、60和6 g·L⁻¹(60S/6G)、90和9 g·L⁻¹(90S/9G)及120和12 g·L⁻¹(120S/12G), 每处理重复4次。穗培养的昼夜温度分别为25和20℃, 光强为120 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光/暗周期为16 h/8 h。培养5 d后取旗叶测定过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶活性及丙二醛含量。培养至成熟后(花后25 d)测定粒重。

过氧化氢酶活性的测定参照Chance和Maehly^[10]的方法。过氧化物酶活性的测定采用愈创木酚法^[11]。超氧化物歧化酶活性用NBT光化还原法测定, 根据SOD抑制NBT光化还原的量, 以引起50%光化还原抑制率的酶量为1个酶活力单位(U)^[12]。MDA含量的测定采用赵世杰等^[13]改进的方法: 取0.5 g叶片, 加50 mmol·L⁻¹ pH 7.0磷酸缓冲液, 匀浆后以3 000×g离心10 min, 取上清液加TBS(20%三氯乙酸+0.5%硫代巴比妥酸)混合后置沸水浴中30 min, 冷却后再离心1次, 分别测A₄₅₀、A₅₃₂、A₆₀₀, 最后求得

样品中的MDA含量。

结果与讨论

1 蔗糖和谷氨酰胺对小麦穗离体培养过程中粒重的影响

图1显示, 扬麦9号单粒重随着蔗糖和谷氨酰胺供应水平的提高呈单峰曲线, 培养液中蔗糖和谷氨酰胺浓度分别为60和6 g·L⁻¹的单粒重达到最大值, 而120S/12G处理的单粒重最低, 仅为前者的1/4。徐州26号单粒重的变化趋势与扬麦9号一致。表明一定范围内提高蔗糖和谷氨酰胺供应水平能促进籽粒生长, 但两者浓度过高则明显抑制籽粒的生长发育。在高浓度底物处理下徐州26号的单粒重高于扬麦9号, 表明不同品种对底物浓度的反应不同。

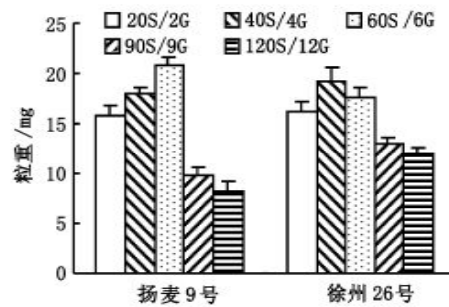


图1 不同浓度蔗糖和谷氨酰胺对小麦籽粒单粒重的影响
Fig.1 Effects of different concentrations of sucrose and glutamine on single grain weight of wheat

2 蔗糖和谷氨酰胺对小麦穗离体培养时旗叶中MDA含量及CAT和SOD活性的影响

图2显示, 随着底物浓度的提高, 小麦叶片中MDA含量呈先下降后上升趋势。扬麦9号60S/6G处理的MDA含量最低, 而120S/12G处理最高; 徐州26号变化趋势与扬麦9号一致。表明扬麦9号和徐州26号在中等碳氮水平下叶片膜脂过氧化程度最低。扬麦9号叶片中MDA含量总体高于徐州26号, 尤其是高浓度底物下差别明显, 表明扬麦9号叶片膜脂过氧化作用对高浓度底物供应的反应较徐州26号敏感。

从图3可见, 随着蔗糖和谷氨酰胺供应水平的提高, 扬麦9号和徐州26号旗叶中SOD和CAT活性呈单峰曲线, 扬麦9号以60S/6G处理的活性

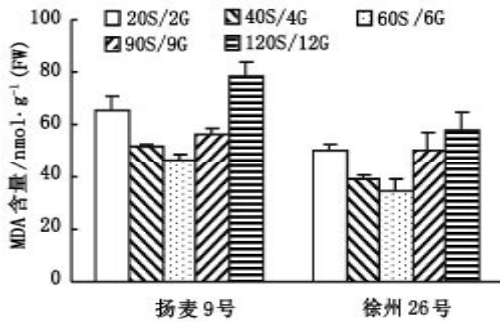


图2 不同浓度蔗糖和谷氨酰胺对小麦旗叶MDA含量的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of sucrose and glutamine on MDA content in flag leaf of wheat

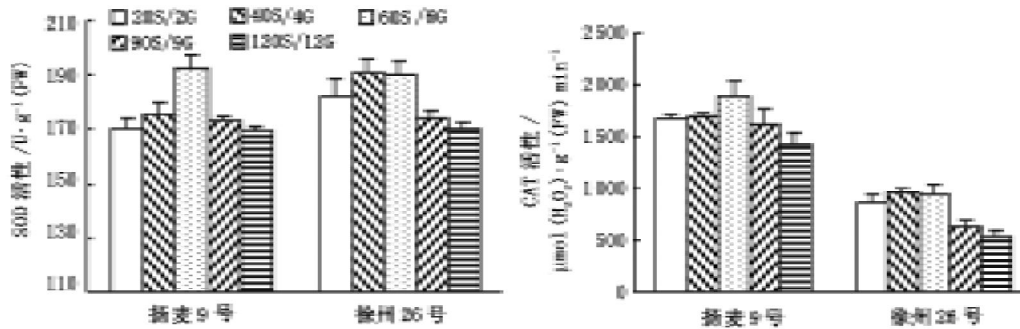


图3 不同浓度蔗糖和谷氨酰胺对小麦旗叶SOD和CAT活性的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of sucrose and glutamine on SOD and CAT activities in flag leaf of wheat

酸氧化酶催化降解生成 NH_3 、酮酸和 H_2O_2 ^[14], 从而导致SOD和CAT活性迅速下降, 最终导致粒重迅速降低。这表明, 叶片生理活性可间接反映小麦培养穗的生长状况。在我们的试验中, 培养基中蔗糖/谷氨酰胺比为10:1, 浓度分别在90和9 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下时, 比较有利于离体穗的生长, 但其最适浓度值还需进一步确定。

3 蔗糖和谷氨酰胺对小麦穗离体培养时旗叶中POD活性的影响

扬麦9号旗叶POD活性变化趋势与SOD和CAT不同。在20S/2G、40S/4G、60S/6G处理中, POD活性逐渐下降; 90S/9G处理中, POD活性有所回升; 浓度提高至120S/12G时, POD活性又迅速降低。徐州26号旗叶POD活性变化趋势与扬麦9号一致(图4)。扬麦9号叶片的POD活性明显低于徐州26号, 而CAT活性则相反(图3、4)。这可能与POD可协同CAT催化降解 H_2O_2

最高, 徐州26号则以40S/4G处理的活性最高。

两品种旗叶SOD和CAT活性与粒重变化趋势一致, 而与MDA含量变化趋势相反。这可能是由于20S/2G处理中, 较低水平的碳氮不足以满足籽粒生长的养分需要, SOD和CAT活性较低而MDA含量较高, 粒重较低所致; 而在40S/4G和60S/6G处理中, 籽粒生长的养分需要得到满足, 叶片SOD和CAT活性高, MDA含量低, 因而粒重高; 而在90S/9G和120S/12G处理中, 过高的碳氮供应水平可能产生养分胁迫, 加剧了MDA积累。此外, 谷氨酰胺浓度过高时, 会被氨基

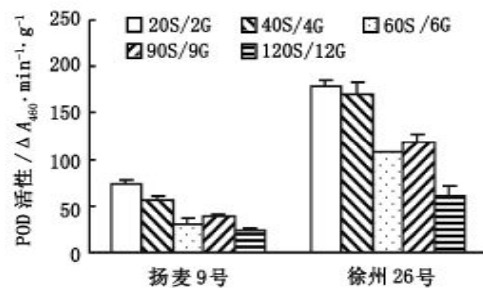


图4 不同浓度蔗糖和谷氨酰胺对小麦旗叶POD活性的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of sucrose and glutamine on POD activity in flag leaf of wheat

有关。据朱诚等^[15]报道, 水稻结实期间POD活性随CAT降低而升高。在20S/2G、40S/4G和60S/6G处理中, CAT活性逐渐增强, 清除 H_2O_2 能力也逐渐增强, 旗叶中 H_2O_2 含量逐渐减少, 因而POD活性逐渐降低; 而在90S/9G处理中, 由于

CAT 活性下降, H_2O_2 积累增多, POD 活性应激升高; 在 120S/12G 处理中, H_2O_2 积累量大大超出叶片 CAT 和 POD 清除能力, POD 自身遭到破坏, 因而活性下降。POD 的功能有多样性, 其在离体培养穗体系中的生理功能和特性还待进一步研究。

参考文献

- 1 Keller W. Seed production on grass culms detached prior to pollination. *J Am Soc Agron*, 1943, 35:617~624
- 2 Jenner CF. Synthesis of starch in detached ear of wheat. *Aust J Biol Sci*, 1968, 21:597~608
- 3 Donovan GR, Lee JW. The growth of detached wheat heads in liquid culture. *Plant Sci Lett*, 1977, 9:107~113
- 4 王志敏. 小麦穗培养系统的建立及其在花粒发育生理研究中的应用. *中国农学通报*, 1995, 11(6): 1~5
- 5 Ahmadi A, Baker DA. Effects of abscisic acid (ABA) on grain filling processes in wheat. *Plant Growth Regul*, 1999, 28: 187~197
- 6 Cazetta JO, Seebauer JR, Below FE. Sucrose and nitrogen supplies regulate growth of maize kernels. *Ann Bot*, 1999, 84: 747~754
- 7 Faleiros RRS, Seebauer JR, Below FE. Nutritionally induced changes in endosperm of *shrunk-1* and *brittle-2* maize kernels grown *in vitro*. *Crop Sci*, 1996, 36:947~954
- 8 潘晓华, 刘水英, 李锋等. 低磷胁迫对不同水稻品种叶片膜脂过氧化及保护酶活性的影响. *中国水稻科学*, 2003, 17(1): 57~60
- 9 朱新开, 严六零, 郭文善等. 淮北稻茬超高产小麦碳氮代谢特征研究. *麦类作物学报*, 2002, 22(1): 51~55
- 10 Chance B, Maehly AC. Assays of catalase and peroxidase. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds). *Methods of Enzymology* (Vol II). New York: Academic Press, 1955. 764~775
- 11 Miler AR, Kelley TJ, Mujer CV. Anodic peroxidase isoenzymes and polyphenol oxidase from cucumber fruit: tissue and specificity. *Phytochem*, 1990, 29:705~709
- 12 王爱国, 罗广华, 邵从本等. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. *植物生理学报*, 1983, 9:77~84
- 13 赵世杰, 许长成, 邹琦等. 植物中丙二醛测定方法的改进. *植物生理学通讯*, 1994, 30(3): 207~210
- 14 焦鸿俊. 基础生物化学. 南宁: 广西民族出版社, 1995. 206
- 15 朱诚, 傅亚萍, 孙宗修. 超高产水稻开花结实期间叶片衰老与活性氧的关系. *中国水稻科学*, 2002, 16(4): 326~330