

文章编号 :1003-8701(2014)02-0071-03

脱毒马铃薯六种酶的活性变化分析

刘志文, 闫明明, 郭晶

(大连工业大学生物工程学院, 辽宁 大连 116034)

摘要: 本文对马铃薯脱毒苗和经优化培养后的脱毒苗在不同时期的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、多酚氧化酶(PPO)、果胶酶和纤维素酶 6 种酶的活性变化进行分析。结果表明:脱毒苗和优化培养的脱毒苗表现出相同的酶活变化趋势,不同时期 4 种保护性酶活性均较其对照提高,而果胶酶和纤维素酶的活性反而降低,这将会提高它们的抗性,为获得高产提供了基础。

关键词: 马铃薯;脱毒;酶活;变化分析

中图分类号: S532.01

文献标识码: A

Changes of Activity of Six Enzymes in Virus-free Potato Seedlings

LIU Zhi-wen, YAN Min-min, GUO Jing

(College of Bioengineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: Dynamic changes in activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), polyphenoloxidase (PPO), pectinase and cellulase of the virus-free potato seedlings and plantlets cultured in the optimal condition were measured and analyzed during different growth period in this study. The results showed that the virus-free and the optimal cultured seedlings displayed the same change trends, the activities of SOD, POD, PPO, CAT increased significantly and the activities of pectinase and cellulase decreased compared with the control. These changes could increase resistance of the potato seedlings and provide basis for their high-yield.

Keywords: Potato; Virus-free; Enzyme activities; Analysis of changes

生产上病毒和类病毒病的危害严重地影响马铃薯的产量和品质,而脱毒处理则是提高其产量和品质的重要途径之一^[1-2]。已有较多的研究表明,这主要是因为脱毒马铃薯的根系发达,吸收矿质营养和水分的能力强,生长势增强,抗高温干旱的能力较强,代谢增强,叶绿素的合成快,光合速率增强,同化面积大,光合生产率升高,光合产物运输畅通,使块茎膨大顺利等^[3-4]。而生理生化的酶活方面分析相对较少,特别是重要的保护酶和感病酶类^[5-6],而在其他作物中的相关研究则较多,如薛建平^[7]等通过对脱毒药菊与非脱毒药菊的 3 种保护酶活性等一系列生理生化指标进行测定,

从生理生化方面对脱毒药菊的优异品质进行揭示。王小刚等^[8]对脱毒薄荷的过氧化物酶同工酶进行了分析。扬鹏^[9]对枣树茎尖脱毒苗 3 种保护酶超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)的活性变化进行分析。

马铃薯脱毒种苗的低成本和快速繁殖是生产上的一个关键环节。因此,近年来很多研究单位进行了大量的相关工作,主要包括外源激素选择、培养方式、培养基和营养条件改善和优化等方面,以期高效和低成本地获得健壮的小苗,但这些工作很少从酶活方面进行研究,分析优化培养后的脱毒苗的生理变化和增产原因^[10-11]。

本文将分别对普通的脱毒苗和经优化培养的脱毒苗的 SOD、POD、CAT、多酚氧化酶(PPO)、果胶酶和纤维素酶 6 种酶活的变化进行分析,从生理生化方面研究脱毒技术增产的原因,为进一步开展该领域研究及应用在理论和实践上提供参考依据。

收稿日期: 2013-07-03

基金项目: 大连市科学技术基金项目(2010J21DW015)

作者简介: 刘志文(1972-),男,副教授,博士,主要从事植物分子生物学和脱毒技术研究。

1 材料与方法

1.1 材料

选用生产上已种植多代的刚发芽的马铃薯早大白,将其切分为两部分,一部分栽种于花盆中,培养1个月之后获得植株,另一部分用于茎尖脱毒,经过继代培养成生长健壮的脱毒苗,两部分的小苗均一一对应。所有小苗经RT-PCR检测,分别确认为有毒(PVY、PVX、PVS和PLRV)和无毒。脱毒试管苗培养28d后移栽于花盆中。

1.2 试验设置

本研究设置以下两组试验:

第一组:脱毒和未脱毒的马铃薯苗在不同时期的酶活比较。

第二组:经优化培养和普通培养的脱毒试管苗在不同时期酶活差异。优化条件为我们此前的研究结果^[10-11]。

两组试验分别在试管苗培养14d、28d,移栽14d、28d和42d时取样。

1.3 酶活测定

SOD、CAT和POD活性的测定参照肖家欣的方法^[12],PPO、果胶酶和纤维素酶分别参照李忠光^[13]、

赵凯^[14]和王小敏^[15]的方法测定,并分别定义相应的酶活单位,其中SOD定义为U/g,其余5种均为U/g·min。每个试验重复3次,取其平均值为性状值。

2 结果与分析

2.1 脱毒苗的酶活变化分析

保护酶具有较高的活性则可有效地清除细胞内的各种活性氧自由基,是植物适应和抵抗病害的一种有效方式。从表1的试验结果可以看出,随着生长时间的延长,脱毒苗与非脱毒苗4种保护酶SOD、POD、CAT和PPO的活性都会不同程度地升高,且在同一时期分别较其对照提高,提高幅度分别在60.71%~70.29%、60.25%~66.51%、43.82%~48.85%和21.48%~24.45%之间,其中SOD和POD的活性提高最多。纤维素酶与果胶酶与植物致病性密切相关,测定结果表明不同时期的两种酶活性均十分低,特别是果胶酶,几乎检测不到其酶的活性,且脱毒后的活性均比对照降低。这表明脱毒后马铃薯体内具有较强的防病能力,并有利于维持其细胞的正常结构和功能,为提高脱毒苗的抗逆性奠定了基础,对改善植株的代谢活动、提高产量和品质起到了重要作用。

表1 马铃薯脱毒苗的酶活变化结果

			SOD	POD	CAT	PPO	纤维素酶	果胶酶
试管苗	14 d	脱毒	340.26	813.13	36.76	55.77	0.467	0.094
		未脱毒	199.81	488.34	25.56	47.52	1.580	0.120
		增幅(%)	70.29	66.51	43.82	21.57	-70.44	-21.67
	28 d	脱毒	380.17	820.13	40.80	60.17	0.513	0.098
		未脱毒	230.12	501.43	28.27	49.53	1.705	0.138
		增幅(%)	65.20	63.56	44.68	21.48	-69.91	-28.98
移栽苗	14 d	脱毒	400.15	845.73	42.89	63.32	0.681	0.104
		未脱毒	241.30	520.54	29.31	51.25	1.813	0.145
		增幅(%)	65.83	62.47	46.33	23.55	-62.44	-28.28
	28 d	脱毒	420.23	880.91	45.13	67.54	0.813	0.125
		未脱毒	260.47	540.17	30.32	54.27	1.887	0.185
		增幅(%)	61.33	63.01	48.85	24.45	-56.91	-32.43
	42 d	脱毒	450.35	898.17	48.25	71.87	1.01	0.140
		未脱毒	280.23	560.47	32.56	58.49	2.31	0.201
		增幅(%)	60.71	60.25	48.19	22.89	-56.28	-30.35

2.2 优化后的脱毒苗酶活分析

如表2所示,优化培养与未优化的脱毒苗相比,其酶活变化结果与2.1结果类似,与对照相比,保护性酶类均有不同程度的增加,而感病性相关酶类的活性则有极大程度的降低,且活性均比较低。

这表明在脱毒苗的生产过程中可以通过对培养基和培养条件等进行不断的优化,寻找最合适的培养基和培养条件,不仅可以降低成本,还可为脱毒苗提供良好的生长条件,获得抗逆性更强的健壮小苗,为获得高产提供了一定的基础。

表 2 优化培养的试管苗酶活变化结果

			SOD	POD	CAT	PPO	纤维素酶	果胶酶
试管苗	14 d	优化	414.04	727.10	98.54	54.44	0.427	0.060
		对照	237.96	418.10	68.94	44.20	1.480	0.072
		增幅 (%)	74.00	73.91	42.94	23.12	-71.15	-16.67
	28 d	优化	435.07	800.89	105.61	57.45	0.535	0.091
		对照	258.12	450.31	72.34	45.21	1.720	0.111
		增幅 (%)	68.57	77.85	45.99	27.07	-68.89	-18.02
移栽苗	14 d	优化	450.72	838.13	112.71	61.51	0.586	0.106
		对照	260.35	480.58	78.46	50.21	1.823	0.127
		增幅 (%)	73.12	74.40	43.65	22.51	-67.86	-16.54
	28 d	优化	480.86	860.45	120.61	64.56	0.671	0.152
		对照	285.13	506.23	83.45	53.27	1.904	0.186
		增幅 (%)	68.65	69.97	44.53	21.19	-64.76	-18.28
	42 d	优化	501.13	901.26	127.78	69.18	0.801	0.207
		对照	307.25	536.17	89.96	57.47	2.130	0.259
		增幅 (%)	63.16	68.09	42.04	20.38	-62.39	-20.08

3 讨 论

植物的保护反应是复杂的新陈代谢的结果,其生理反应是通过酶催化活动来实现的。有关保护酶的活性增强可以提高植物抵抗病原菌的能力,从而使其健康生长,在生产上达到增产的目的^[16-17]。因此,从植物生理的角度上来说,有关酶的活性大小是其能否增产的原因之一。SOD、POD、CAT、PPO是植物体内重要的防御酶,参与活性氧清除及酚类、木质素和植保素等抗病相关物质的合成,能抵御活性氧及氧自由基对细胞膜系统的伤害,延长了叶片的功能期,增强植物对病害的抵抗能力^[18]。植物细胞壁的构架物质主要是纤维素和果胶质等,分别可被纤维素酶和果胶酶分解,导致抗性降低^[15]。本研究表明,脱毒苗和经优化培养脱毒苗的SOD、POD、CAT、PPO均比相应的对照要高,而纤维素酶及果胶酶这些感病性酶的活性比对照活性低,大大提高了脱毒苗和经优化培养脱毒苗的抗性,为获得高产提供了可能和基础。为此有学者提出将保护酶活性变化用作植物脱毒效果检测、植物感病早期诊断及抗病研究的指标和手段^[9]。

参考文献:

[1] 黄华康. 马铃薯脱毒对一些生理指标的影响[J]. 中国马铃薯, 2002, 16(3): 137-140.

[2] Nie XZ, Pelletier Y, Mason N. Aphids preserved in propylene glycol can be used for reverse transcription-polymerase chain reaction detection of Potato virus Y[J]. Journal of Virological Methods, 2011(175): 224-227.

[3] 夏平. 马铃薯植株感染Y病毒后生理指标变化与抗病性的关系[J]. 中国马铃薯, 2007, 21(3): 129-134.

[4] Stefani R, Carole B, Paul G. Census report of the potato virus Y (PVY) population in Swiss seed potato production in 2003

and 2008[J]. Potato Research, 2011(54): 105-117.

[5] 张树生, 胡蕾, 刘志良, 等. 植物体内抗病相关酶与植物抗病性的关系[J]. 安徽农学通报, 2006, 12(13): 48-49.

[6] Upeksha N N, Marie A G, Yvan P. Population growth of Myzus persicae on potato plants infected with different strains and variants of potato virus Y [J]. American Journal of Potato Research, 2013(1): 1-4.

[7] 薛建平, 张爱民, 盛玮, 等. 安徽药菊脱毒苗与非脱毒苗生理生化的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 24(6): 514-517.

[8] 王小刚, 高山林, 白雨, 等. 薄荷脱病毒苗的农艺性状和有关生理指标的测定[J]. 药物生物技术, 2003, 10(2): 92-95.

[9] 扬鹏, 郑晓军, 王玉国, 等. 枣树茎尖脱毒培养过程中的细胞显微结构和3种保护酶活性的变化[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(4): 341-343.

[10] 刘志文, 陈阳, 侯英敏. 不同培养基和培养条件对脱毒马铃薯快繁生长的影响[J]. 中国农学通报, 2011, 27(24): 179-182.

[11] 王英, 于丽丽, 刘志文. 不同水源和碳源对脱毒马铃薯快繁的影响[J]. 河南农业科学, 2011, 40(5): 148-151.

[12] 肖家欣, 刘志文, 罗充, 等. 植物生理学实验[M]. 安徽人民出版社, 2008.

[13] 李忠光, 龚明. 愈创木酚法测定植物过氧化物酶活性的改进[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(2): 323-324.

[14] 赵凯, 许鹏举, 谷广焯. DNS法测定纤维素酶活力最适条件研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 1998, 26(3): 66-69.

[15] 王小敏, 吴文龙, 阎连飞. 分光光度计法测定果胶酶活力的方法研究[J]. 食品工业科技, 2007(5): 227-229.

[16] Anja K, Veli-Matt R, Joachim K. Potato shoot tip cryopreservation[J]. Potato Research, 2011(54): 45-79.

[17] Galvino-Costa S B, Reis F, Camargos V V, et al. A novel type of Potato virus Y recombinant genome, determined for the genetic strain PVY [J]. Plant Pathology, 2011(1): 1-11.

[18] 康小晓, 刘孟君, 张艳, 等. 外源激素对脱毒马铃薯扦插苗生长及生理效应研究[J]. 西北植物学报, 2012, 32(7): 1412-1419.