

光质对一品红叶离体培养中形态发生及生化变化的影响

倪德祥 冯文煦 张丕方 王凯基

(复旦大学生物学系)

摘要 本文讨论了将光质应用于一品红 (*Euphorbia pulcherrima*) 大规模细胞繁殖及形态发生调控的可行性, 并测定了一些形态及生化指标作为这种调控的参数。

以一品红试管苗的叶片作为外植体, 置于MS培养基中并分别培养于白(W)、红(R)、黄(Y)、蓝(B)、绿(G)色光及黑暗(D)下, 一个月后进行测定。蓝光和黄光明显促进出苗, 而愈伤组织形成的情况则正相反, 红光利于愈伤组织的形成, 黄光效果最差。过氧化物酶、过氧化氢酶活力及蛋白质、RNA、碳水化合物的含量与愈伤组织形成有较为一致的关系, 但与分化不直接相关。

实验中还测定了叶绿素a、叶绿素b及类胡萝卜素的含量。白光与蓝光均能促进叶绿素及类胡萝卜素的合成, 但蓝光中chl b/chl a的比率较高。此外, 本文尚涉及暗处理中的晶质化现象(vitrification)及其成因。

关键词 一品红; 光质; 植物组织培养; 形态发生; 生化变化

自从 de Capite^[6] 在1955年首次报道将光因子应用于植物组织培养的调控以来, 虽然人们对于研究光质在高等植物离体培养中作用的热情越来越高, 报道的文章越来越多(Ziv, 1984^[7], 倪德祥等, 1985^[1,2]), 但光质对不同植物作用情况的详细资料仍很缺乏, 包括光质对细胞分化, 植物生长及有关生化变化的影响等等。

鉴此, 本实验以将光质应用于大规模细胞繁殖及形态发生的问题为中心, 对一品红离体培养受光质影响的情况作了一些探讨, 主要着眼于光质对出苗数、生物量、干重、叶绿素a、叶绿素b及类胡萝卜素含量、过氧化物酶、过氧化氢酶活力、碳水化合物、蛋白质、DNA和RNA含量的影响。

童哲(1985)^[3,8]曾报道过光质对活体植物内色素含量影响的情况, 但很少有人进行过离体情况下的实验, 我们的实验研究了色素形成与形态发生之间的关系, 以期探讨在光形态建成过程中这些色素的行为提供一些资料。

过氧化物酶和过氧化氢酶对各种理化因子甚为敏感, 因而有人建议将这两种酶作为估价细胞生化与分化的参数。在本实验中, 亦进行了过氧化物酶及过氧化氢酶活力的测定。

此外, 还对蛋白质、糖、DNA和RNA含量的变化进行了测定来观察生化变化与形态发生间是否存在着相关性。

材料与方 法

培养条件综合如下: 将取自一品红 (*Euphorbia pulcherrima*) 花茎继代培养材料^[4]的叶外植体接种于附加0.2ppm NAA和2ppm 6-BA的MS培养基上, 并分别培养于白光

(W)、红光(R)、黄光(Y)、蓝光(B)、绿光(G)和黑暗(D)中。室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，每昼夜光照9小时，辐照度为 3.2 WM^{-2} 。彩色荧光灯管由本校电光源研究所提供，技术参数如表1所列。每种处理至少有8瓶重复。

表1 光源技术参数
Table 1 Technical parameters of light sources

灯色 colour	黑 black	白 white	红 red	黄 yellow	绿 green	蓝 blue
波长范围(nm) wave length	—	410—690	600—690	520—650	490—590	400—510
峰值(nm) peak value	—	—	652	580	525	455
功率(watt) power	—	40	40	40	40	40

培养物在培养一个半月后进行生化物质测定。取1克植物组织在 4°C 下匀浆。过氧化物酶、过氧化氢酶活力、蛋白质及色素含量的测定主要依照波钦诺克(1981)^[5]所述进行。

过氧化氢酶的相对活力以匀浆液在 20°C 下、5分钟内催化 H_2O_2 转变成 H_2O 并释放 O_2 的能力为据。剩余的 H_2O_2 以KI和淀粉显色， $\text{Ma}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 返滴定。

过氧化物酶的测定则以匀浆冰冻离心(10,000 rps × 15 min)后的上清液在15分钟内催化 H_2O_2 还原反应的能力为据，加入愈创木酚作为显色剂，在440 nm波长处测光密度(OD)值作为相对标准。

蛋白质含量测定以Bradford试剂作显色液，在595 nm波长处读取OD值作为相对含量。

色素含量测定亦依据波钦诺克的方法进行。色素的丙酮抽提液分别在662、644及440 nm处测定OD值。叶绿素a(chl a)、叶绿素b(chl b)和类胡萝卜素(Ck)的浓度依照下列公式计算：

$$\text{Ca} = 9.78 \times \text{OD}_{662} + 0.99 \times \text{OD}_{644}$$

$$\text{Cb} = 21.43 \times \text{OD}_{644} + 4.65 \times \text{OD}_{662}$$

$$\text{Ca} + \text{Cb} = 5.13 \times \text{OD}_{662} + 20.44 \times \text{OD}_{644}$$

$$\text{Ck} = 4.7 \times \text{OD}_{440} - (1.38 \times \text{OD}_{662} + 5.48 \times \text{OD}_{644})$$

核酸及碳水化合物的测定主要依照Madison(1976)^[9]进行，但作了些改进，以适应本实验中的微量生化分析。植物组织在 4°C 下用甲醇抽提并冰冻离心(4,000 rps × 10 min)。沉淀分别用甲醇、乙醇、乙醚、过氯酸及其混合物洗涤并用过氯酸加热水解，水解物离心后的上清液分别在260、280 nm上进行紫外分光分析，总核酸浓度计算如下：

$$\text{总核酸浓度} = 0.0629 \text{ OD}_{260} - 0.0360 \text{ OD}_{280}$$

另以二苯胺及乙醛配成之显色剂对上清液显色并保温，然后测定600 nm处OD值作为DNA的相对含量。

结 果

一、生物量与干重 培养物受光质影响总的形态变化见图版2(第360页)。

实验表明, 白光和红光能提高培养物的生物量。由于愈伤组织的生物量占了培养物总生物量的相当大部分, 该结果实际上表明白光与红光明显促进愈伤组织的生长, 而蓝光与黄光最为无效, 见图 1。

暗处理中, 培养物含水量相对较高, 并且观察到植株晶质化现象 (vitrification phenomenon), 具体表现为叶缺绿、透明、苗细长、黄化, 此现象与暗处理中的高含水量一致。

二、出苗数 出苗数显著地受蓝光和黄光促进, 但被绿光强烈抑制(图 2)。如前所述, 蓝光和黄光对于促进愈伤组织形成却是最为无效的, 由此看来, 在一定程度上, 光对分化成苗和愈伤组织生长的效应间存在着一种负相关关系。

三、色素含量 表 2 为不同光处理间的相对色素含量。蓝光处理的培养物总的说来色素含量最为丰富, 仅类胡萝卜素略少一些。

不同光处理之间 chl b/chl a 的比例均有差别。这可归结于不同处理的培养物对蓝光与红光吸收比例不同的缘故, 因为 chl b 吸收光谱中的蓝光比例高于 chl a。

对类胡萝卜素而言, 数据表明白光对其形成最为有效, 而绿光则能抑制其形成。

四、蛋白质、核酸及碳水化合物

光质对蛋白质、核酸及碳水化合物含量影响的情况分别如图 3、图 4 和图 5 所示。

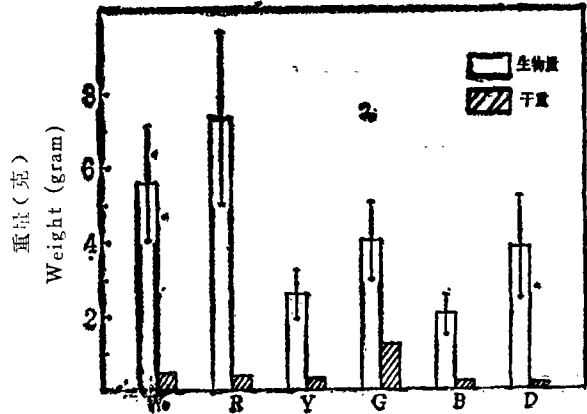


图 1 培养物生物量与干重

Fig 1 The biomass and dry weight of the cultures

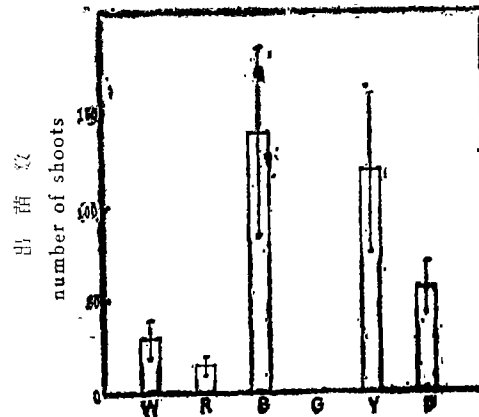


图 2 外植体出苗数

Fig 2 Number of shoots from leaves explants

表 2 叶绿素 a (Ca)、叶绿素 b (Cb) 及类胡萝卜素 (Ck) 含量
Table 2 Contents of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoides

	Ca	Cb	Ca+Cb	Ck	Cb/Ca
白 (W)	1.32±0.02	2.06±0.02	3.39±0.02	1.46±0.01	1.56
红 (R)	1.16±0.04	1.63±0.05	2.79±0.08	1.14±0.01	1.41
黄 (Y)	0.598±0.013	1.04±0.01	1.64±0.02	1.05±0.02	1.74
绿 (G)	0.368±0.038	0.838±0.035	1.21±0.05	0.593±0.018	2.28
蓝 (B)	1.39±0.04	2.82±0.08	4.15±0.03	1.06±0.01	2.03
黑 (D)	0.243±0.013	0.443±0.013	0.685±0.040	0.06±0.01	1.82

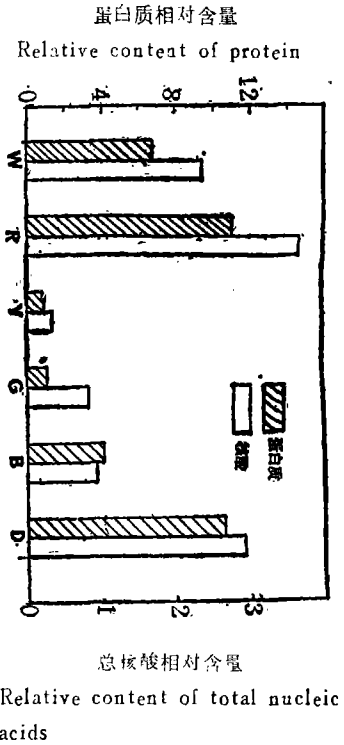


图3 蛋白质与总核酸含量
Fig 3 Contents of protein and total nucleic acids

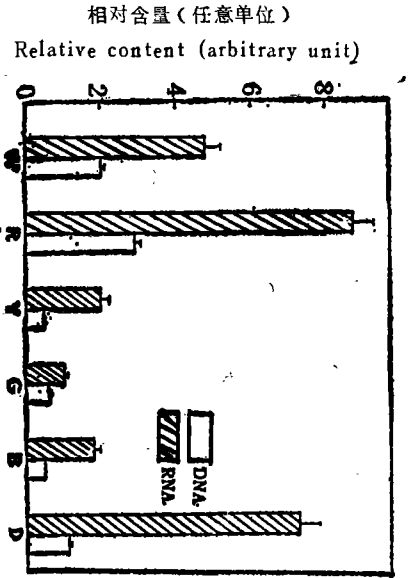


图4 DNA与RNA含量
Fig 4 Contents of DNA and RNA

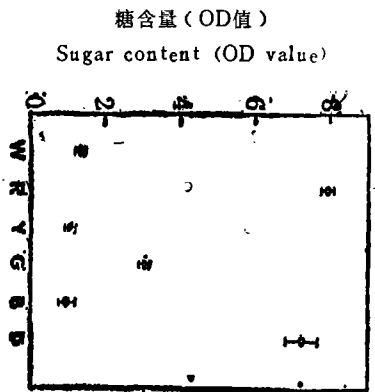


图5 碳水化合物含量
Fig 5 Content of carbohydrate

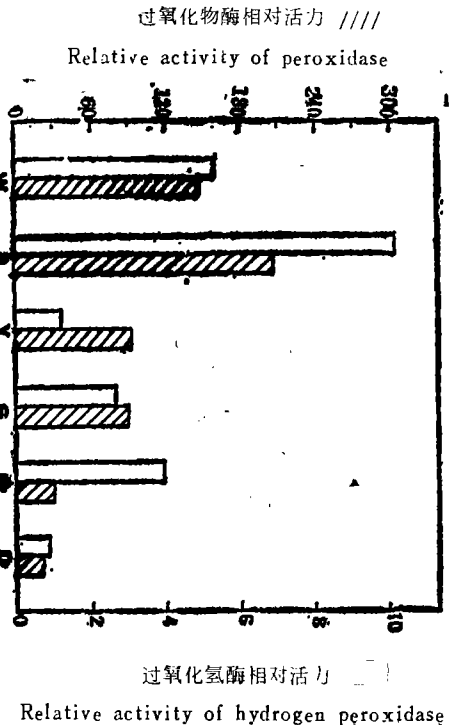


图6 过氧化物酶与过氧化氢酶活力
Fig 6 Activities of peroxidase and hydrogen peroxidase

蓝光特别有利于提高培养物中蛋白质及RNA的含量, 而DNA含量除暗处理中的以外, 一般保持恒定。在蛋白质、RNA及碳水化合物含量之间存在着正相关性, 这种情况与愈伤组织形成亦有对应关系。Thorpe和Meier曾认为积累于器官发生活跃组织中的淀粉粒可能起到一种能源的作用^[10]。在我们的实验中, 也发现愈伤组织生长旺盛的培养物中含有高浓度的碳水化合物, 这种碳水化合物可能也起一种能源的作用。红光处理中的糖含量最高, 几乎为最低者蓝光中的8倍(见图5)。

五、过氧化物酶与过氧化氢酶 实验数据表明, 过氧化物酶与过氧化氢酶的活力相当一致(图6)且与其它大分子物质及愈伤组织形成也有正相关关系。

红光能显著提高培养物的酶活力, 而暗处理效应最差。

讨 论

实验结果表明, 无论光处理或暗处理, 都有植株的再生, 这就表明光合系统至少不是控制植株再生的唯一系统。

考虑到原种植物的生态习性, 我们注意到一品红原为阳生植物。一般地说, 阳生环境光谱中所含的长波光(红光)较多, 因而容易想到, 红光可能会促进这种植物的生长。事实也是如此, 在我们的实验中, 红光确实能促进苗的生长和愈伤组织形成, 但有趣的是, 苗的分化却显著地受短波光(蓝光)的促进, 而红光对其则不那么理想, 因而我们认为在培养物的生长与形态发生之间似乎存在着一种矛盾关系, 这种关系在指导大规模细胞繁殖系统的建立上也是很有意义的。当培养的目的在于快速获得大量种苗时可采用能有效促进分化的处理手段, 而当培养的目的是进行细胞培养产物或其特定成份的提取时, 则可采取使细胞快速增殖的方法。但生长与分化两者之间的联系及调节机制还有待进一步的探讨。

在实验中还观察到蛋白质、RNA、碳水化合物含量与过氧化物酶、过氧化氢酶活力之间的相关性。众所周知, RNA在遗传信息的表达过程中起了一种信息中介者的作用。在一定程度上, RNA含量越高意味着蛋白质合成越活跃(包括酶与结构蛋白), 但器官发生并不直接与RNA、蛋白质含量相关, 而只是与其种类的多少即与特定蛋白质的合成成正相关。

与上述情况相反, 实验中过氧化物酶的活力却与形态发生能力呈负相关。人们已经知道, 高浓度的内源IAA一般能够抑制形态发生, 尤其是苗的形成。Gaspar等^[11]认为, 细胞中与膜结合的及可溶性的酸性过氧化物酶能同时兼有一种IAA氧化酶的作用, 据此我们认为, 植物组织培养系统中的过氧化物酶可能部分地起到调节内源IAA水平, 从而影响形态发生的作用。

暗处理中晶质化现象显然是由于叶绿素缺损及细胞过度充水所致。Kevers等(1982)^[12]提出假说认为, 这种晶质化是由于受过氧化物酶-IAA氧化酶系所控制的乙烯释放而引起的, 但在我们的实验中, 并没有观察到晶质化与过氧化物酶活力间的一致性关系。

对于光质影响叶绿素形成的研究, 已有人在活体情况下作过尝试。Withrow等(1956)^[13]首次简要报道红光能促进菜豆中的叶绿素形成。Virgin^[14]、^[15]、Mohr^[16]与Kasemir等^[17]进一步指出这缘于光敏色素的诱导效应。童哲(1985)曾报道暗处理能提高欧洲赤松(*Pinus sylvestris*)中chl b/chl a的比率, 而光照(白、红、远红外)则能降低该比率,

但在我们的实验中却是蓝光能显著提高叶绿素、尤其是chl b的含量, chl b/chl a的比值则在绿光和黄光中最高。这或许可归咎于植物种类不同以及离体和整体环境之间的差别, 有待进行进一步的探索。

参 考 文 献

- [1] 倪德祥等, 1985: 光质对康乃馨试管苗生长发育的影响。园艺学报, 12(3): 197—202。
- [2] 倪德祥等, 1985: 光质对锦葵愈伤组织生长和发根的效应。上海农业学报, 1(3): 39—46。
- [3] 童哲, 1985: 光质和除草剂norflurazon对欧洲赤松子叶质体形成的影响。植物学报, 27(1): 57—62。
- [4] 倪德祥等, 1986: 一品红花轴培养成完整植株。植物生理学通讯, 1986(3): 46—47。
- [5] 波钦诺克, X. H.荆家海、丁钟荣译, 1981: 植物生物化学分析方法。科学出版社。
- [6] de Capite, L., 1955: Action of light and temperature on growth of plant tissue cultures in vitro. Am. J. Bot, 42:869。
- [7] Ziv, M., Sager, J.C, 1984: The influence of light quality on peanut (*Arachis hypogaea* L.) gynophore pod and embryo development in vitro. Plant Sci. Lett. 34: 211—218。
- [8] Tong, Z., Kasemir, H., Mohr, H. 1983: Coaction of light and cytokinin in photomorphogenesis. Planta 159(2): 136—142。
- [9] Madison, J.T., Thompson, J.F., Menuster, A.M.E., 1976: Deoxyribonucleic acids, protein and uncombined amino acids content of legume seeds during embryogeny. Ann.Bot.40(168): 745—756。
- [10] Thorpe, T.A., Meier, D.D. 1973: Effects of gibberellic acid and abscisic acid on shoot formation in tobacco callus cultures. Physiol. Plant. 29: 121—124。
- [11] Gaspar, Th., Penel, C., Thorpe, T. & Greppin, H. 1982: Peroxidases 1970—1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Univ. de Geneve-Centre de Botanique publ., Geneve, 324p。
- [12] Kerers, C., Coumans, M., Coumans-Gilles, M.F., Gaspar, Th. 1984: Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. Physiol. Plant. 61(1): 69—74。
- [13] Withrow, R.B., Wolff, J.B., Price, I. 1956: Elimination of the lag phase of chlorophyll synthesis in dark-grown bean leaves by a pretreatment with low irradiances of monochromatic energy. Plant Physiol. 31: Suppl. XII。
- [14] Virgin, H.I. 1957: Chlorophyll content and transpiration of etiolated wheat leaves after pretreatment with a short light impulse followed by dark periods of varying lengths. Physiol Plant. 10: 445—453。
- [15] Virgin, H.I. 1958: Studies on the formation of protochlorophyll and chlorophyll a under varying light treatment. Physiol. Plant. 11: 347—362。
- [16] Mohr, H., Kasemir, H. 1975: The action of phytochrome and actinomycin D on chlorophyll a formation in mustard seedling. Planta 72: 187—197。
- [17] Kasemir, H., Obdorfer, U., Mohr, H. 1973: A twofold action of phytochrome in controlling chlorophyll a accumulation. Photochem, Photobiol 18: 481—486。

EFFECTS OF LIGHT QUALITY ON MORPHOGENESIS AND BIOCHEMICAL CHANGES OF EUPHORBIA PULCHERRIMA CULTURED IN VITRO

Ni De-xiang Feng Wen-xue Zhang Pi-fang and Wang Kai-ji

(Biology Department, Fudan University)

Abstract The recent paper deals with the feasibility of light quality regulation on large-scale plant cell proliferation and morphogenesis of *Euphorbia pulcherrima*. Some morphological and biochemical changes were measured as the parameters of the regulation.

Leaves from single genotype of *Euphorbia pulcherrima* were cultured in white, red, yellow, green, blue lights and in dark respectively. Blue and yellow lights stimulated shooting significantly while callus growth was quite the opposite. Red light was most effective to callus formation and yellow the least effective. The activities of peroxidase, hydrogen peroxidase and contents of protein, RNA, carbohydrate were relatively consistent with the ability of callus formation but not differentiation.

Contents of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids were also determined. White and blue lights increased both chlorophyll and carotenoids contents while the ratio of Chl b/Chl a was much higher in blue light.

The vitrification phenomena in dark treatment was also discussed.

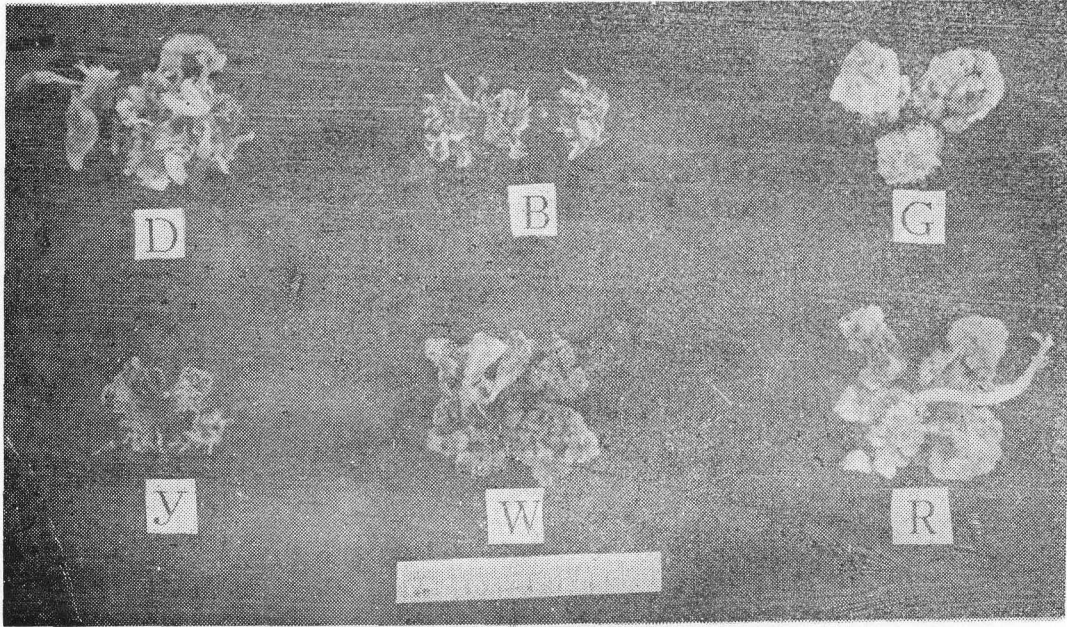
Key words *Euphorbia pulcherrima*; Light quality; Plant tissue culture; Morphogenesis; Biochemical changes

倪德祥等: 光质对一品红叶离体培养中形态发生及生化变化的影响

图版 I

Ni De-xiang et al.: Effects of light quality on morphogenesis and biochemical changes of *Euphorbia pulcherrima* cultured in vitro

Plate I



不同光质下的一品红生长情况

Regenerated shoots from leaves of *Euphorbia pulcherrima* under different light qualities