

刘兆明, 钟小仙, 钱 晨, 等. 苏丹草管状分子体外诱导及木质素合成相关酶活力的变化[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 846-854.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.04.022

苏丹草管状分子体外诱导及木质素合成相关酶活力的变化

刘兆明^{1,2}, 钟小仙², 钱 晨², 刘大林¹

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009; 2. 江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为探索 C4 作物次生细胞壁合成机制, 以苏丹草新品系苏牧 3 号的胚性愈伤组织为材料, 研究了光照、外源植物激素和活性炭对愈伤组织管状分子分化的影响, 并对管状分子诱导过程中木质素含量、可溶性酚醛组分含量及其相关酶活力变化进行了分析。结果表明, 在每天光照 16 h、不含外源植物激素的基本培养基中添加 3 g/L 活性炭, 诱导培养 20 d, 管状分子分化率最高, 为 51.97%, 管状分子出现的起始时间为诱导培养第 4 d; 诱导培养 21 d 时, 木质素含量达到最高值 18.11%, 与木质素合成相关的酶 PAL、CAD 活力也同时达到最高值, 分别为 5.915×10^{-3} U/mg、 8.3667×10^{-2} U/mg, 此后木质素含量和 PAL、CAD 酶活力均无显著变化; POD 活力诱导培养 9 d 时达到最高值 132.24 U/mg, 显著高于继代培养; 可溶性酚醛组分含量先增后减, 诱导培养 12 d 时达到最高值 1.09 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

关键词: 苏丹草; 管状分子; 体外诱导; 木质素合成

中图分类号: S544+.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)04-0846-09

In vitro induction of tracheary elements of *Sorghum sudanense* and changes in lignin synthesis related enzymes activities

LIU Zhao-ming^{1,2}, ZHONG Xiao-xian², QIAN Chen², LIU Da-lin¹

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To reveal the secondary cell wall synthesis mechanism of C4 crops, the effect of illumination, exogenous hormone and activated carbon concentration on tracheary elements induction *in vitro* was studied on sudangrass Sumu No. 3. The changes of lignin content, soluble phenolic components contents and related enzymes activities were

收稿日期: 2015-03-26

基金项目: 国家牧草产业技术体系综合试验站项目(CARS-35); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(13)3035]; 江苏省第四期“333 工程”培养资金资助项目

作者简介: 刘兆明(1990-), 男, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事牧草育种研究。(Email) lzzm2012@163.com

通讯作者: 钟小仙, (Tel) 025-84390239; (E-mail) zhpansy@aliyun.com

analyzed in the process of tracheary elements induction as well. The results showed that the differentiation rate of tracheary elements reached the highest point (51.97%) at 20th day induction in 16-h daily illumination when calli were cultured in plant hormone-free MS medium with 3 g/L activated carbon addition. After 21-d induction, lignin content get to the peak value of 18.11%, and so did the activities of enzymes PAL

(phenylalanine ammonia lyase and CAD (cinnamyl alcohol dehydrogenase, which were shown to be $5.915\ 0\times 10^{-3}$ U/mg and $8.366\ 7\times 10^{-2}$ U/mg, respectively. The lignin content and enzymatic activities did not changed significantly afterwards. The activity of enzyme POD (peroxidase) came to its maximum value of 132.24 U/mg after 12-d induction. Soluble phenolic components content increased over time and reached the highest of 1.09 $\mu\text{g}/\text{mg}$ after 12-d induction 12th day, and then decreased.

Key words: sudangrass(*Sorghum sudanense*); tracheary element; *in vitro* induction; lignin synthesis

植物的次生细胞壁主要沉积在包括木质部中起输导和支持功能的细胞中,如管胞和导管分子,二者统称为管状分子,管状分子是一种无原生质体、壁加厚的非生活细胞,为植物木质部输导结构,兼具支持功能,存在于所有维管植物中,分化成熟过程中会发生明显的形态学变化,形成特征性的加厚的次生细胞壁。自 1975 年 Kohlenbach 等^[1]首次发现百日草(*Zinnia elegans* L.)机械分离的单个叶肉细胞可以直接分化形成管状分子后,迄今已建立了百日草^[2]、拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.]^[3]、烟草(*Nicotianatabacum* L.)^[4]、杨树(*Populus tremula* \times *P. tremuloides*)^[5]、辐射松(*Pinus radiata* D. Don)^[6]和花旗松(*Pseudotsuga mensiesii*)^[7]等的管状分子体外诱导体系,为植物次生细胞壁及其木质素合成机制研究提供了简单有效的模式系统,但 C4 作物管状分子体外诱导体系尚未见报道。

木质素是一种酚类聚合物,在管状分子分化成熟过程中不断掺入次生细胞壁中,从而增加细胞壁的硬度。木质素由香豆醇、松柏醇、芥子醇 3 种单体在多种酶综合调控下聚合而成。苯丙氨酸解氨酶(PAL)是限速酶,对木质素的合成起总开关的作用;肉桂醇脱氢酶(CAD)催化松柏醇和芥子醇单体合成的最后一步反应,是木质素合成的重要调节酶;过氧化物酶(POD)催化木质素单体聚合过程,参与调节木质素在细胞壁的沉积^[8]。可溶性酚醛组分为植物次生细胞壁与木质素合成过程的中间物质^[9]。研究次生细胞壁合成过程中木质素含量及其相关酶活性的变化,对解析次生细胞壁合成机制及植物定向改良具有重要意义。

苏丹草[*Sorghum sudanense* (Piper.) Stapf.]为禾本科(Poaceae)高粱属(*Sorghum*)牧草^[10-11],具有生物产量高、耐贫瘠、抗干旱、可多次刈割及光合效率高的特性,作为能饲粮兼用型禾本科 C4 作物正日益受到世界各国的重视^[12-13]。本研究以苏丹草新品系苏牧 3 号愈伤组织为材料,通过研究光照培

养时间、培养基中有无植物激素和不同活性炭浓度对管状分子分化率的影响,建立苏丹草管状分子体外诱导技术体系,并通过研究管状分子诱导过程中木质素含量、可溶性酚醛组含量及其相关酶活力变化,探索苏丹草次生细胞壁与木质素合成调控机制,为苏丹草定向育种提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

苏丹草新品系苏牧 3 号淡黄色愈伤组织,由江苏省农业科学院畜牧研究所提供。

1.2 培养基成分

基本培养基由 MS 大量元素、MS 微量元素^[14]、B₅有机成分^[15]组成,添加蔗糖 30 g/L、琼脂条 8 g/L,培养基在高压灭菌前用氢氧化钠或盐酸调整 pH 值至 5.8。

愈伤组织继代培养基 SM: 在基本培养基中添加 2,4-D 2.0 mg/L 和 6-BA 0.05 mg/L;管状分子诱导培养基(TEM 和 TESM): 在基本培养基和继代培养基中分别添加 0 g/L、1 g/L、3 g/L、5 g/L、7 g/L、9 g/L 的活性炭(表 1)。

1.3 管状分子分化率的测定方法

将继代培养基中培养 28 d 的淡黄色颗粒状愈伤组织转入不同的管状分子诱导培养基中,每个处理设 3 个重复,每个重复接种 4 瓶,每瓶接种 20 块愈伤组织,分别在黑暗和每天 16 h 光照条件下培养 28 d。管状分子诱导培养期间,每隔 2 d 取样,每个重复随机选取 2 块愈伤,用刀片分别切取愈伤组织块表面 2 mm 的部分,10% NaOH 浸泡过夜后蒸馏水冲洗 3 次,用 0.01% 番红染色 30 min,光学显微镜明场下进行图像采集,每块愈伤组织随机挑选 10 个图像进行细胞计数和管状分子分化率的测定,管状分子分化率计算公式如下:

管状分子分化率 = 图像中管状分子总数/图像中细胞总数 $\times 100\%$ 。

表 1 管状分子诱导培养基配方

Table 1 Concentration of activated carbon in the media

培养基 编号	基本培养基	培养基 编号	继代培养基
	活性炭浓度 (g/L)		活性炭浓度 (g/L)
TEM0	0	TESM0	0
TEM1	1	TESM1	1
TEM3	3	TESM3	3
TEM5	5	TESM5	5
TEM7	7	TESM7	7
TEM9	9	TESM9	9

1.4 管状分子形态学特征的观察

用光学显微镜对管状分子诱导培养期间的形态学特征进行观察,并将采集的图像进行管状分子形态特征分析。

1.5 可溶性酚醛组分含量与木质素含量分析

以黑暗条件下继代培养的愈伤组织和最适宜的管状分子诱导培养条件下培养的愈伤组织为材料,每隔 3 d 取样,参照 Möller 等^[9]的方法,进行可溶性酚醛组分含量和木质素含量测定,参照 Krishnamurthy 等^[16]的方法,对最适宜的管状分子诱导培养条件下的愈伤组织,采用间苯三酚进行木质素特异染色,用数码相机进行图像采集。

1.6 PAL、CAD、POD 活力的测定

以黑暗条件下继代培养的愈伤组织和最适宜的管状分子诱导培养条件下培养的愈伤组织为材料,每隔 3 d 取样,PAL 活力测定参照 Edwards 等^[17]的方法;CAD 活力测定参照 Wyrambik 等^[18]的方法;POD 活力测定采用 POD(植物)试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)。

1.7 数据统计

用 Excel 软件进行数据统计,使用 SAS9.2 软件进行方差分析,采用新复极差法进行多重比较。

2 结果

2.1 光照、外源植物激素和活性炭对愈伤组织管状分子分化率的影响

将继代培养基中培养 28 d 的淡黄色颗粒状愈

伤组织(图 1)转入不同的管状分子诱导培养基中,在黑暗和每天 16 h 光照条件下培养。结果见图 2。

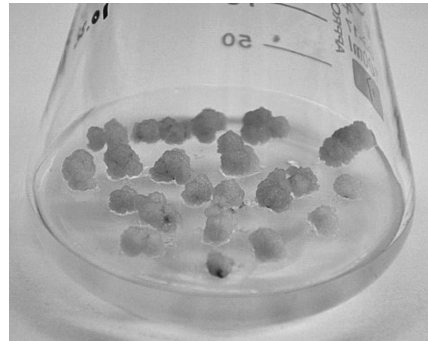


图 1 继代培养 28 d 的愈伤组织

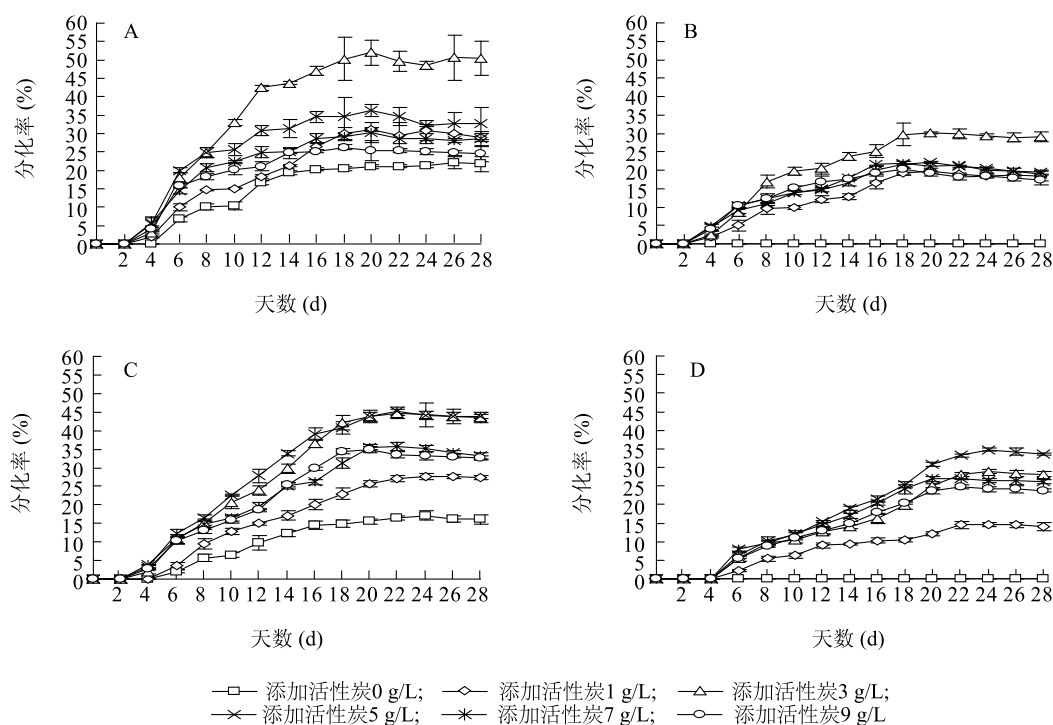
Fig. 1 Calli subcultured for 28 d of sudangrass

在各种不同的培养基上,每天 16 h 光照条件培养的愈伤组织管状分子分化率为 17.15% ~ 51.97%,平均值为 33.60%,黑暗条件下培养的愈伤组织管状分子分化率为 0 ~ 34.9%,平均值为 20.36%,每天光照 16 h 培养极显著提高了愈伤组织的管状分子分化率($P < 0.01$)。

在不含外源植物激素的基本培养基中,添加不同浓度活性炭培养的愈伤组织管状分子分化率为 0 ~ 51.97%,平均值为 26.00%。在含外源植物激素的继代培养基中,添加不同浓度的活性炭,培养的愈伤组织管状分子分化率为 0 ~ 45.54%,平均值为 27.95%,二者差异不显著($P > 0.05$)。

进一步的分析发现,培养时有无光照、培养基中是否含外源植物激素和培养基中不同活性炭浓度对愈伤组织管状分子分化率的影响存在极显著的交互作用,以不含外源植物激素的基本培养基中添加 3 g/L 活性炭每天光照 16 h 培养的处理(TEM3)为管状分子诱导最优化培养条件,在此培养条件下愈伤组织管状分子分化率最高,为 51.97%。

黑暗培养条件下,选用不含外源植物激素的基本培养基或含外源植物激素的继代培养基、不添加活性炭,对愈伤组织培养 28 d,未观察到管状分子分化。每天光照 16 h 培养条件下,不同培养基处理愈伤组织管状分子开始出现的时间为开始培养后 4 ~ 6 d,管状分子分化率达到最高值的时间为开始培养后 18 ~ 26 d。



A: 每天光照 16 h+基本培养基; B: 黑暗+基本培养基; C: 每天光照 16 h+继代培养基; D: 黑暗+继代培养基。

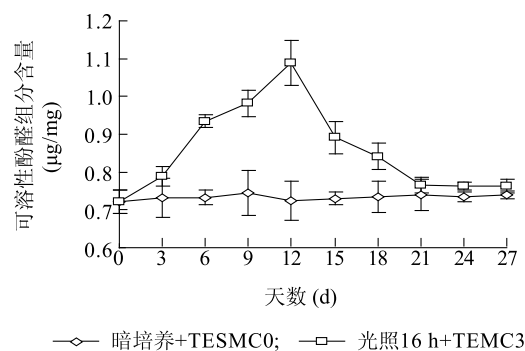
图2 光照时间、外源植物激素和活性炭浓度组合对管状分子分化率的影响

Fig.2 Effect of illumination time duration,ogenous hormone and activated carbon concentration on differentiation rate of tracheary elements

2.2 愈伤组织中可溶性酚醛组分含量与木质素含量变化

每天光照 16 h、基本培养基中添加 3 g/L 活性炭试验组,在诱导愈伤组织管状分子分化过程中,可溶性酚醛组分含量随诱导天数增加呈现先增后减的变化规律(图 3),在培养第 12 d 时达到最高(1.09 $\mu\text{g}/\text{mg}$);黑暗条件、继代培养基中不添加任何植物激素的对照组,愈伤组织中的可溶性酚醛组分含量为 0.72 ~ 0.75 $\mu\text{g}/\text{mg}$,不同培养天数间无显著差异;管状分子诱导培养 3 d 以前和 21 d 以后,可溶性酚醛组分含量试验组和对照组间无显著差异,培养 3 ~ 21 d 时试验组的可溶性酚醛组分含量均极显著高于对照组。

每天光照 16 h、基本培养基中添加 3 g/L 活性炭试验组,木质素含量随管状分子诱导培养天数的增加极显著提高(图 4),管状分子诱导培养 21 d 时木质素含量达到最高(18.11%),此后木质素含量无显著变化;黑暗条件、继代培养基中不添加任何植物激素的对照组,愈伤组织中的木质素含量为

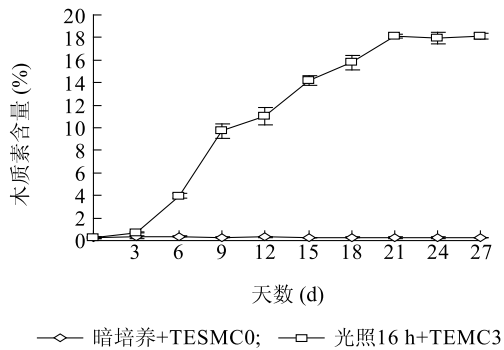


暗培养+TESMC0: 继代培养基中添加 0 g/L 活性炭暗培养; 光照 16 h+TEMC3: 基本培养基中添加 3 g/L 活性炭每天 16 h 光照条件下培养。

图3 苏丹草愈伤组织可溶性酚醛组分含量变化

Fig.3 The change of soluble phenolic components contents in sudangrass calli

0.26% ~ 0.35%, 不同培养天数间无显著变化; 试验组管状分子诱导培养 3 d 以前与对照组的木质素含量无显著差异, 其余培养时间试验组的木质素含量均极显著高于对照组。



暗培养+TESMC0:继代培养基中添加 0 g/L 活性炭暗培养;光照 16 h+TEM3:基本培养基中添加 3 g/L 活性炭每天 16 h 光照条件下培养。

图 4 苏丹草愈伤组织木质素含量变化

Fig. 4 The change of lignin content in sudangrass calli

对每天光照 16 h、基本培养基中添加 3 g/L 活性炭培养的愈伤组织块及其匀浆液,采用盐酸-间苯三酚进行木质素特异染色(图 5),结果显示,在愈伤组织管状分子诱导培养 21 d 内,随培养时间的延长,愈伤组织块表面红色面积逐渐增多,匀浆液红颜色逐渐加深;管状分子诱导培养 24 d 和 27 d 时,由于愈伤组织块表面部分出现褐化,采用盐酸-间苯三酚染色后愈伤组织块表面和匀浆液呈红褐色和棕褐色。

2.3 愈伤组织诱导的管状分子的形态特征

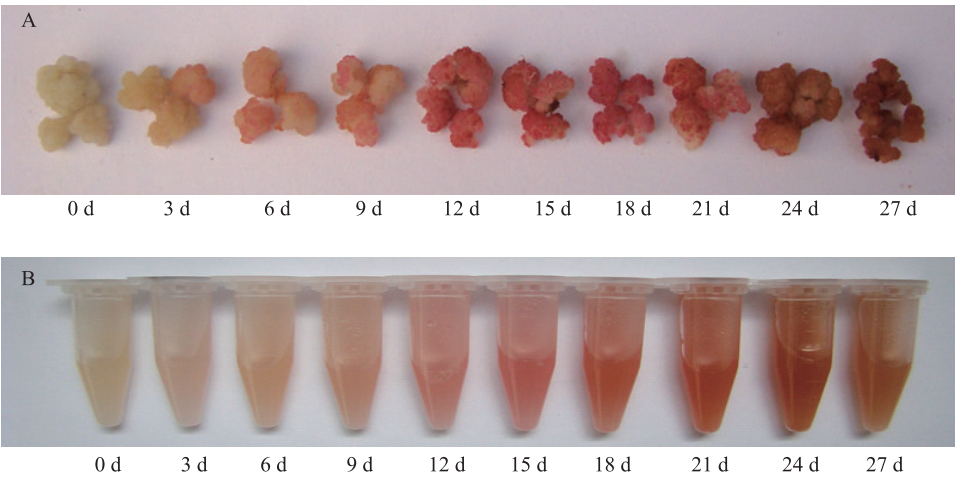
显微观察结果表明,大量管状分子呈集团状分布于愈伤组织细胞簇中(图 6A)。将视野放大,可以观察到不同形态特征的单个管状分子,主要有两种类型:一种为两头尖、两端不开口的管胞,另一种是伸长的、两端开口的导管分子(图 6B);同时,在视野中也可以观察到处在不同发育阶段的管状分子:一是发育早期的管状分子轮廓模糊,次生细胞壁增厚不明显,骨架结构不完整(图 7A);二是发育中期的管状分子轮廓结构清晰,但骨架结构还不完整,次生细胞壁明显加厚(图 7B);三是发育成熟的管状分子骨架结构完整,次生细胞壁显著增厚,形成不同类型的纹孔(图 7C)。成熟的管胞类型中绝大部分为网状管胞(图 7F),还有部分梯状管胞(图 7D)。还可以观察到成熟管胞以其倾斜的两端相互连接形成的输导组织(图 7E);导管分子大部分为网状类型(图 7G),也可以观察到少量孔状类型(图 7H),大量发育成熟的导管分子通过端壁的穿孔相互连接形成导管(图 7I)。

2.4 愈伤组织中 PAL、CAD、POD 活力变化

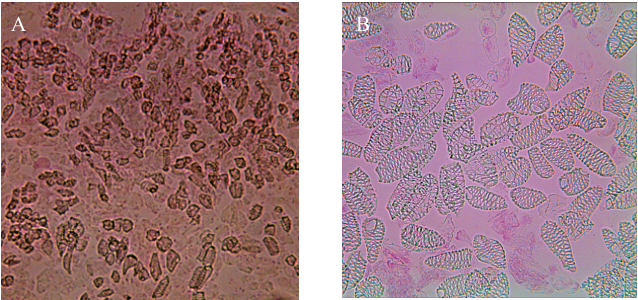
每天光照 16 h、基本培养基中添加 3 g/L 活性炭的试验组,管状分子诱导培养 0 d、3 d、6 d、9 d、12 d、18 d 和 21 d 时,愈伤组织中的 PAL 活力随培养天数的增加而显著提高(图 8),但 PAL 活力诱导培养 15 d 与 9 d 无显著差异,但显著低于 12 d,诱导培养 21 d 时 PAL 活力达到最高 ($5.915 0 \times 10^{-3}$ U/mg),且随后的诱导培养 24 d、27 d 的愈伤组织中 PAL 活力较诱导培养 21 d 未发生显著变化;黑暗培养、继代培养基中不添加活性炭的对照组,继代培养 3 d 和 6 d 的愈伤组织中 PAL 活力无显著差异,但显著高于初始培养时愈伤组织中 PAL 活力,黑暗条件、继代培养基培养 6 d、9 d、12 d、15 d、18 d、21 d,愈伤组织中的 PAL 活力随培养天数增加而降低,黑暗条件、继代培养基培养 21 d、24 d 和 27 d 间 PAL 活力无显著差异,但均极显著低于黑暗条件、继代培养基培养 3 d 时的 PAL 活力;PAL 活力试验组管状分子诱导培养 3 d 时开始极显著高于对照组。

每天光照 16 h、基本培养基中添加 3 g/L 活性炭的试验组,管状分子诱导培养 0 d、3 d、6 d、9 d 时,愈伤组织中的 CAD 活力随培养天数的增加而极显著提高(图 9);管状分子诱导培养 9 d、12 d、15 d 时,愈伤组织中的 CAD 活力无显著差异,但均极显著高于管状分子诱导培养 6 d 时的 CAD 活力;管状分子诱导培养 21 d 时, CAD 活力最高 ($8.366 7 \times 10^{-2}$ U/mg),但与管状分子诱导培养 18 d、24 d、27 d 时的 CAD 活力无显著差异。黑暗条件、继代培养基培养 3 d 时,愈伤组织中的 CAD 活力最高,其余培养天数间 CAD 活力无显著差异;CAD 活力试验组管状分子诱导培养 6 d 时开始极显著高于黑暗条件、继代培养基培养的对照组。

每天光照 16 h、基本培养基中添加 3 g/L 活性炭的试验组,管状分子诱导培养 3 d、6 d、9 d 时,愈伤组织中的 POD 活力随培养天数的增加而极显著提高(图 10),且管状分子诱导培养 9 d 时 POD 活力达到最高 (132.24 U/mg),此后 POD 活力都极显著高于黑暗继代培养的对照组;黑暗继代培养的愈伤组织,除培养 3 d 时的 POD 活力最低外,其余培养天数间 POD 活力均无显著差异。

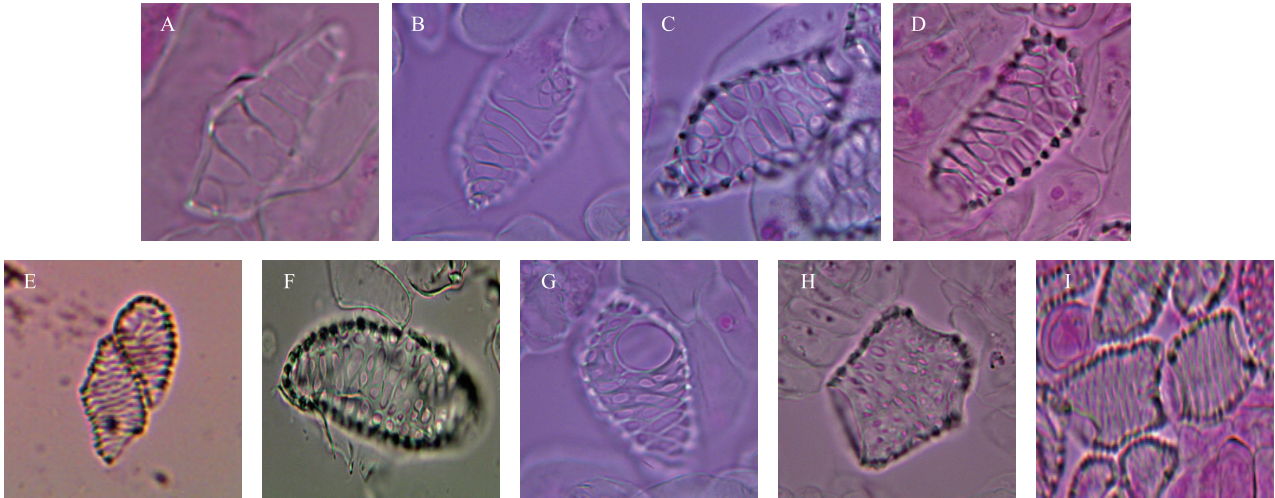


A:愈伤组织块;B:愈伤组织块匀浆液。
图5 管状分子诱导培养0~27 d的愈伤组织块及其匀浆液盐酸间苯三酚染色图片
Fig. 5 Calli and their homogenate stained with phloroglucinol-HCl after 27-d induction



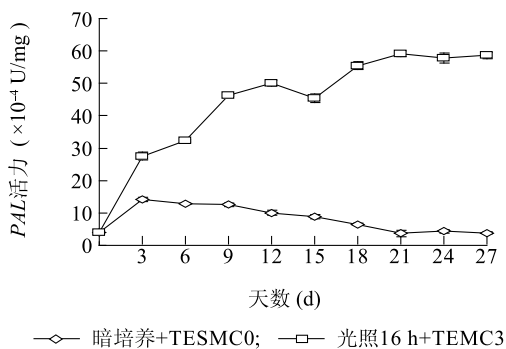
A:×100;B:×400。Bar=100 μm。
图6 苏丹草愈伤组织诱导的管状分子

Fig. 6 Tracheary elements induced in sudangrass calli



A:发育前期管胞;B:发育中期管胞;C:成熟期管胞;D:梯状管胞;E:管胞连接;F:网状管胞;G:网状导管分子;H:孔状导管分子;I:导管。
Bar=50 μm。

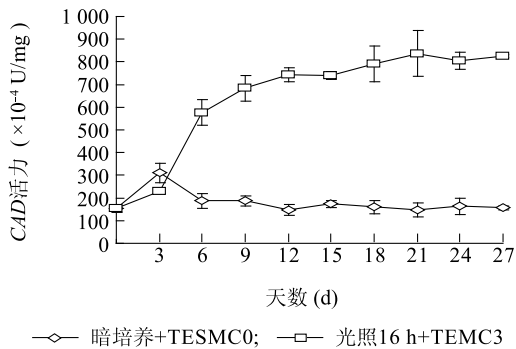
图7 苏丹草愈伤组织诱导的管状分子类型
Fig. 7 Types of tracheary elements induced in sudangrass calli



暗培养+TESMC0:继代培养基中添加 0 g/L 活性炭暗培养;光照 16 h+TEM3:基本培养基中添加 3 g/L 活性炭每天 16 h 光照条件下培养。

图 8 苏丹草愈伤组织 PAL 活力变化

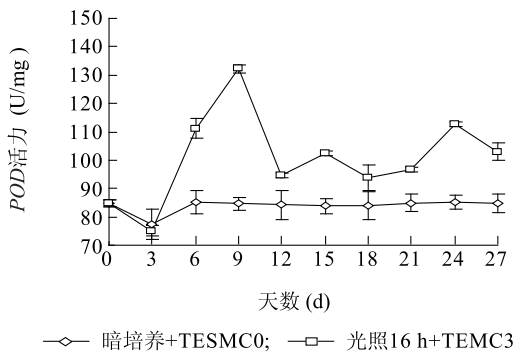
Fig. 8 The change of PAL activity in sudangrass calli



暗培养+TESMC0:继代培养基中添加 0 g/L 活性炭暗培养;光照 16 h+TEM3:基本培养基中添加 3 g/L 活性炭每天 16 h 光照条件下培养。

图 9 苏丹草愈伤组织 CAD 活力变化

Fig. 9 The change of CAD activity in sudangrass calli



暗培养+TESMC0:继代培养基中添加 0 g/L 活性炭暗培养;光照 16 h+TEM3:基本培养基中添加 3 g/L 活性炭每天 16 h 光照条件下培养。

图 10 苏丹草愈伤组织 POD 活力变化

Fig. 10 The change of POD activity in sudangrass calli

3 讨论

Mizuno 等^[19]研究发现,光照对胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 根外植体管状分子分化是必需的,胡萝卜根外植体只有在光照培养条件下才能正常生长和进行管状分子分化。冰叶日中花 (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) 愈伤组织也只有在光照培养条件下才出现管状分子分化,管状分子分化率为 20%^[20]。Möller 等^[5]研究指出,光照对辐射松 (*Pinus radiata* D. Don) 愈伤组织体外管状分子分化是非必需的,在添加 2 g/L 活性炭不含植物激素的培养基中,黑暗培养条件下管状分子分化率可达 12.63%, Möller 等^[21]进一步研究发现,在添加 2 g/L 活性炭不含植物激素培养基中,每天光照 24 h 培养条件下管状分子分化率达到 31.75%。本研究结果表明,光照对苏丹草愈伤组织管状分子分化是非必需的,每天光照 16 h 和黑暗培养条件下管状分子分化率的平均值分别为 33.60% 和 20.36%,每天光照 16 h 培养可以极显著提高苏丹草管状分子分化率。

植物激素作为植物组织培养必需的营养成分,在培养基中添加适当比例的植物激素可以维持离体培养细胞正常的生长和发育。在植物管状分子体外诱导过程中,培养基中是否含有植物激素也会影响体外管状分子的分化率。Möller 等^[5, 21]研究发现,在每天光照 24 h、不含活性炭和植物激素的培养基中,辐射松管状分子分化率为 32.26%,若在培养基中添加 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 和 2.6 $\mu\text{mol/L}$ 6-BA,管状分子分化率将低于 1%。Oda 等^[3]利用拟南芥悬浮培养细胞进行体外管状分子分化研究时发现,2,4-D 会抑制管状分子分化,用不含 2,4-D 的液体培养基冲洗悬浮细胞 4 次,在培养基中添加 0 $\mu\text{mol/L}$ 、0.04 $\mu\text{mol/L}$ 、0.41 $\mu\text{mol/L}$ 、4.10 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D,结果显示,在诱导培养 168 h 时,2,4-D 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 处理的管状分子分化率为 30%,而 2,4-D 浓度为 4.10 $\mu\text{mol/L}$ 处理的无管状分子产生。百日草叶肉细胞悬浮培养体系中,添加 0.1 mg/L NAA 和 1 mg/L 6-BA,管状分子的分化率可达到 30%^[22],添加 0.1 $\mu\text{mol/L}$ NAA 和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 6-BA,诱导的管状分子分化率为 25%~40%^[23],添加 0.5 $\mu\text{mol/L}$ NAA 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 6-BA,百日草管状分子的分化率最高达 53%^[24]。活性炭是植物组织培养常用的介质,具有强烈的吸附性能,可以吸附植

物细胞培养过程中产生的酚类物质,同时也可以吸附添加到培养基中的营养成分和植物激素等,从而对培养物的发育、生长和分化产生促进或抑制作用^[25]。Möller 等^[9]研究发现,在含有 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 和 4.4 $\mu\text{mol/L}$ 6-BA 的辐射松悬浮培养体系中未添加活性炭,没有出现管状分子分化,而在不含植物激素的培养基中添加 2 g/L 活性炭,诱导培养 18 d 时管状分子分化率可达 18%。Yamagishiy 等^[26]研究指出,暗培养条件下,在不含植物激素的培养基中添加 5 g/L 的活性炭,日本榧树和日本柳杉诱导培养 4 周,管状分子分化率可以达到 47.2% 和 31.0%,均显著高于未添加活性炭处理的管状分子分化率。本研究结果表明,植物激素和活性炭之间具有显著的交互作用,在每天光照 16 h 培养条件下,以不含植物激素的基本培养基中添加 3 g/L 活性炭时管状分子分化率最高(51.97%);在暗培养条件下,以含有 2.00 mg/L 2,4-D + 0.05 mg/L 6-BA 的继代培养基中添加 5 g/L 活性炭时管状分子分化率最高(34.79%)。

管状分子在分化过程中会发生明显的次生细胞壁加厚,形成网状、螺旋状、孔状、梯状、环状等多种类型的纹孔^[9],其中木质素的沉积是次生细胞壁形成过程中的标志性动作^[27],木质素沉积是多种酶综合调控的结果,到目前为止,大部分参与木质素合成调控的酶都已被鉴定和分离,并进行了相关功能分析^[28]。陈永忠等^[29]研究指出,植物细胞壁在形成过程中会发生木质化,木质素会逐步掺入到细胞壁中,使细胞壁的硬度增加,起到支持植物体的作用。Möller 等^[9]研究发现,在辐射松管状分子分化过程中利用紫外吸收光谱的方法发现了细胞外存在数量较多的液滴状物质,统称为可溶性酚醛组分^[30],其在诱导培养过程中呈现先增后减的变化规律,在诱导培养 12 d 时达到最高值,经间苯三特异性染色呈现红色,证明与木质素同源,都含有芳醛结构,而芳醛是木质素合成的前体物质;木质素含量随管状分子诱导培养时间的增加持续升高,在诱导培养 18 d 时达到最高值(18%)。Sato 等^[31]研究发现,在利用百日草叶肉细胞悬浮培养进行管状分子诱导过程中,*PAL* 和 *CAD* 活力会伴随管状分子次生壁的不断木质化而显著升高;Möller 等^[21]研究发现,辐射松愈伤组织在诱导培养 8 d 时诱导率达到最高(45%),*PAL* 活力从诱导培养 3 d 开始显著升高,在

诱导培养 5 d 时达到最高值,之后 *PAL* 活力无显著变化;*CAD* 活力在诱导培养第 9 d 时达到最高值。Zwliha 等^[32]研究发现,在杨树中反向转入 *POD Shpx6a* 基因,木质素含量降低,证明了 *POD* 确实与木质素单体的聚合有关。本研究结果显示,苏丹草诱导形成的管状分子次生壁加厚大部分呈现网状,同时还有少量的梯状管胞和孔状导管分子;可溶性酚醛组分含量随诱导培养时间的增加先升后降,诱导培养 12 d 之后含量显著降低,与 Möller 等^[9]在辐射松管状分子分化过程中的研究结果相似;从诱导培养第 3 d 开始 *PAL* 和 *CAD* 活力显著升高,在诱导培养 21 d 时同时达到最高值,木质素含量在诱导培养 21 d 时达到最高值(18.11%),之后木质素含量及 *PAL*、*CAD* 活力都无显著变化,而 *POD* 活力始终维持在较高的水平。由此可见,*PAL*、*CAD*、*POD* 活力与苏丹草体外管状分子诱导过程中木质素的合成具有显著的相关性。

参考文献:

- [1] KOHLENBACH H W, SCHMIDT B. Cytodifferenzierung in form einer direkten umwandlung isolierter mesophyllzellen zu tracheiden (Cytodifferentiation in the mode of a direct transformation of isolated mesophyll cells to tracheids) [J]. Z Pflanzenphysiol, 1975, 75:369-374.
- [2] FUKUDA H, KOMAMINE A. Establishment of an experimental system for the tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans* [J]. Plant Physiology, 1980, 65:57-60.
- [3] ODA Y, MIMURA T, HASEZAWA S. Regulation of secondary cell wall development by cortical microtubules during tracheary element differentiation in *Arabidopsis* cell suspensions [J]. Plant Physiology, 2005, 137(3):1027-1036.
- [4] BLEE K A, WHERTELEY E R, BONHAM V A, et al. Proteomic analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that synthesizes secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters [J]. Planta, 2001, 212:404-415.
- [5] MÖLLER R, MCDONALD A G, WALTER C, et al. Cell differentiation, secondary cell wall formation and transformation of callus tissue of *Pinus radiata* D. Don [J]. Planta, 2003, 217: 736-747.
- [6] OHLSSON A B, DJERBI S, WINZELL A, et al. Cell suspension cultures of *Populus tremula* \times *P. tremuloides* exhibit a high level of cellulose synthase gene expression that coincides with increased in vitro cellulose synthase activity [J]. Protoplasma, 2006, 228(4): 221-229.

- [7] PILLAI K V, McDONALD A G, WAGNER F G. Developing a model system *in vitro* to understand tracheary element development in douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) [J]. Maderas Cienciaci Tecnologia, 2011, 13 (1): 3-18.
- [8] 吕淑萍,倪志勇,范玲. 木质素生物合成相关酶基因调控的研究进展[J]. 分子植物育种, 2011, 75(9): 1545-1555.
- [9] MÖLLER R, KOCH G, NANAYAKKARA B, et al. Lignification in cell cultures of *Pinus radiata*: activities of enzymes and lignin topochemistry[J]. Tree Physiology, 2005, 26: 201-210.
- [10] 吕宗友,苏衍菁,赵国琦,等. 不同防褐化措施对苏丹草愈伤诱导以及抗褐化的效果研究[J]. 草业学报, 2011, 20(3): 174-181.
- [11] 刘晨,哈斯亚提·托逊江,热沙来提汗·买买提,等. 香梨与牧草套种对产草量及土壤性状的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 209-211.
- [12] 钟小仙,余建明,顾洪如,等. 苏丹草幼穗离体培养植物的再生技术[J]. 江苏农业学报, 2005, 21(4): 331-335.
- [13] KRALIK D, ELTER A M, KUKIC S, et al. Sudan grass-energy crop for biogas production[J]. Krmiva, 2009, 51(3): 171-178.
- [14] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium from rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. Physiology Plant, 1962, 15: 473-497.
- [15] GAMBORG O L, MILLER R A, OJIMA K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells[J]. Exp Cell Res, 1968, 50: 151-158.
- [16] KRISHNAMURTHY K V. Methods in Cell Wall Cytochemistry [M]. Boca Raton :CRC Press, 1999.
- [17] EDWARDS R A, KESSMANN H. Isoflavonoid phytoalexins: their biosynthetic enzymes [M]. Oxford: Oxford University Press, 1992: 54-55.
- [18] WYRAMBIK D, GRISEBACH H. Purification and properties of isoenzymes of cinnamyl-alcohol dehydrogenase from soybean-cell-suspension cultures[J]. European Journal of Biochemistry, 1975, 59(1): 9-15.
- [19] MIZUNO K, KOMAMINE A, SHIMOKORIYAMA M. Vessel element formation in cultured carrot-root phloem slices[J]. Plant and Cell Physiology, 1971, 12(6): 823-830.
- [20] YEN H E, YEN S K. Effect of high salinity on tracheary element differentiation in light-grown callus of *Mesembryanthemum crystallinum* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 58: 59-65.
- [21] MÖLLER R, BALL R D, HENDERSON A R, et al. Effect of light and activated charcoal on tracheary element differentiation in callus cultures of *Pinus radiata* D. Don [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2006, 85: 161-171.
- [22] FUKUDA H, KOMAMINE A. Establishment of an experimental system for the study of tracheary element different from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans* [J]. Plant Physiol, 1980, 65(1): 57-60.
- [23] SATO Y, YAJIMA A Y, TOKUNAGA N, et al. Comparison between tracheary element lignin formation and extracellular lignin-like substance formation during the culture of isolated *Zinnia elegans* mesophyll cells [J]. Biologia, 2011, 66 (1): 88-95.
- [24] CHURCH D L, GALSTON A W. Hormonal induction and antihormonal inhibition of tracheary element differentiation in *Zinnia* cell cultures [J]. Phytochemistry, 1988, 27 (8): 2435-2439.
- [25] 刘根林,梁珍海,朱军. 活性炭在植物组织培养中的作用概述[J]. 江苏林业科技, 2001, 28(5): 46-48.
- [26] YAMAGISHI Y, SATO T, UCHIYAMA H, et al. Tracheary elements that resemble secondary xylem in calli derived from the conifers, *Torreya nucifera* and *Cryptomeria japonica* [J]. Journal of Wood Science, 2012, 58: 557-562.
- [27] 田敏,夏琼梅,李纪元. 植物的次生长及其分子调控[J]. 遗传, 2007, 29(11): 1324-1330.
- [28] PETER G, NEALE D. Molecular basis for the evolution of xylem lignification [J]. Curr Opin Plant Biol, 2004, 7: 737-742.
- [29] 陈永忠,谭晓风,DAVID C. 木质素生物合成及其基因调控研究综述[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(4): 613-617.
- [30] KOCH G, KLEIST G. Application of scanning UV micro-spectrophotometry to localise lignins and phenolic extractives in plant cell walls [J]. Holzforschung, 2001, 55: 563-567.
- [31] SATO Y T, WATANABE A, KOMAMINE T, et al. Changes in the activity and mRNA of cinnamyl alcohol dehydrogenase during tracheary element differentiation in *Zinnia* [J]. Plant Physiology, 1997, 113: 425-430.
- [32] ZWILHA I, TIJEN O, AHU A, et al. Reduced leaf peroxidase activity is associated with reduced lignin content in transgenic poplar [J]. Plant Biotechnology, 1999, 16(5): 381-387.

(责任编辑:陈海霞)