

洋桔梗体细胞胚性愈伤组织诱导过程中超氧化物歧化酶和酯酶变化

刘明志, 陈勤, 刘希

(长沙学院 生物工程和环科学系, 长沙 410003)

摘要: 通过转移洋桔梗非胚性愈伤组织到含有 1.0 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基(ecIM)上诱导了洋桔梗胚性愈伤组织形成,而非胚性愈伤组织在含 1.0 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L KT 的 MS 培养基(necSM)上继代培养。本研究比较分析了洋桔梗愈伤组织在 ecIM 和 necSM 上的超氧化物歧化酶(SOD)活性及其同工酶谱、酯酶同工酶谱随着培养天数的变化。实验结果表明在 ecIM 和 necSM 上培养的洋桔梗愈伤组织的超氧化物歧化酶(SOD)活性在培养早期较低,然后随着培养天数增加而升高,维持在较高水平上,但 SOD 活性变化无明显规律性;另一方面,SOD 同工酶在第 4 天后出现一新的同工酶谱带;此外,在 ecIM 和 necSM 上培养洋桔梗愈伤组织的酯酶(EST)同工酶在培养至第 16~20 天期间呈现显著缺失。

关键词: 洋桔梗; 胚性愈伤组织; 非胚性愈伤组织; 超氧化物歧化酶; 酯酶; 同工酶

中图分类号: Q944.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2008)02-0247-04

Changes of superoxide dismutase and esterase in processes of embryogenic calli induction of *Eustoma grandiflorum*

LIU Ming-Zhi, CHEN Qin, LIU Xi

(Department of Bioengineering and Environmental Science, Changsha University, Changsha 410003, China)

Abstract: Embryogenic calli induction of *Eustoma grandiflorum* were carried out when non-embryogenic calli on necSM (MS medium containing 1.0mg/L 2,4-D and 0.5mg/L KT) were transferred onto ecIM (MS medium containing 1.0mg/L 2,4-D). Changes of superoxide dismutase (SOD) activities and isoenzymes and esterase (EST) isoenzymes in calli of *E. grandiflorum* cultured on ecIM and necSM for different days of cultures have been achieved. Experimental results have been shown that SOD activities in calli of *E. grandiflorum* on ecIM and necSM were low in early culture times and raised along with increasing days of cultures and maintained a higher level without an evident regularity for the changes of SOD activities, and for SOD isoenzymes there was also a new band of SOD isoenzyme until 4 days of culture;Estrase (EST) isozyme in calluses of *E. grandiflorum* cultured on ecIM and necSM had an distinct absence in the periods from 16 days to 20 days.

Key words: *Eustoma grandiflorum*; embryogenic callus; nonembryogenic callus; superoxide dismutase; esterase; isoenzyme

器官发生和体细胞胚胎发生是植物组织培养形态建成的两种主要方式。目前,器官发生和体细胞胚胎发生的分子生物学机理还了解得很少,主要来自模式植物,如对胡萝卜和烟草的研究结果。很可能对器官发生和体细胞胚胎发生的分子生物学机

理研究最终需要借助于基因组学和蛋白组学研究。另一方面,对器官发生和体细胞胚胎发生的生理生化变化的研究却有助于对器官发生和体细胞胚胎发生的深入认识和了解,特别是不同诱导条件对器官发生和体细胞胚胎发生所引起的内部的标志性生理

收稿日期: 2007-01-08 修回日期: 2007-05-19

作者简介: 刘明志(1963-),男,湖南岳阳市人,副教授,主要研究方向为植物细胞工程。

生化变化。

洋桔梗为龙胆科草原龙胆属的一种具有较高观赏价值的植物种,近年来十分流行,在荷兰花卉市场跻身十大切花之列。目前,对洋桔梗的研究主要集在其病理(Uga等,2004;Okamoto等,2002;Furuya等,2000;Yanagida等,2004)、生理(Mino等,2003)和花色(Derolles等,1998)方面。虽然洋桔梗在组织培养和无性快速繁殖方面也有一些报道(Griesbach & Semeniuk,1987;杨霞等,1997;李群等,2004),但均为器官发生实现植株再生,还没有洋桔梗体细胞胚发生的报道。本研究首次报道了洋桔梗胚性愈伤组织诱导,并比较分析了洋桔梗非胚性愈伤组织继代和胚性愈伤组织诱导过程中的超氧化物歧化酶活性及其同工酶和酯酶同工酶随培养天数的变化,有助于了解体细胞胚胎发生的标志性生理生化变化。

1 材料与方法

1.1 材料

洋桔梗(*Eustoma grandiflorum*)种子。

1.2 方法

1.2.1 胚性愈伤组织诱导与非胚性愈伤组织的继代

洋桔梗下胚轴和子叶接种于1.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L KT的MS培养基(Murashige & Skoog, 1962)上诱导形成非胚性愈伤组织,继代于相同激素配比的上述非胚性愈伤组织继代培养基 necSM 上。将洋桔梗非胚性愈伤组织转移至胚性愈伤组织诱导培养基 ecIM(含1.0 mg/L 2,4-D的MS培养基)诱导胚性愈伤组织形成。所有MS培养基含有3%蔗糖,0.8%琼脂粉,高压灭菌前pH值调至5.8。

1.2.2 SOD活性测定及同工酶分析 SOD酶粗提液制备及酶活性测定参照Giannopolitis & Ries(1977)的方法加以改进。分别取在ecIM和necSM上培养不同天数的洋桔梗愈伤组织1g加入2mL含1mmol/L EDTA的50mmol/L的磷酸缓冲液(pH7.8),冰浴研磨匀浆,在4℃于13000g离心20min,上清液为酶粗提液,用于SOD酶活性分析及电泳。SOD活性测定用NBT光还原法。以缓冲液代替酶液不经光照的反应液作为空白对照。以不加酶液,经光照的样品反应液作为NBT光化学反应还原的标准液。酶活性用抑制NBT光化学反应50%为一个酶活性单位表示。酶比活以每1mg蛋白SOD酶单位数表示。可溶性蛋白含量测定用考

马斯亮蓝G-250法(Bradford,1976)。SOD同工酶电泳和SOD同工酶活性染色参照Beauchamp & Fridovich(1971)方法。

1.2.3. EST同工酶分析 EST粗提液制备:分别取在ecIM和necSM培养不同天数的洋桔梗愈伤组织1g加入2mL TBE提取液(0.1mol/L Tris,0.1mol/L HNO₃,0.1mol/L EDTA),在冰浴研钵内快速磨成匀浆,匀浆液以12000r/min,4℃离心5min,取上清液作为酯酶粗提液用于电泳分析。EST电泳及染色:本实验采用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳法进行电泳。浓缩胶2.5%,分离胶7.5%,电极缓冲液为pH8.3的HCl-甘氨酸缓冲液,电流为2mA/样。电泳完毕后进行酯酶染色。染色采用醋酸萘酯-坚牢蓝RR染色法室温下染色。

2 结果分析

2.1 胚性愈伤组织诱导和非胚性愈伤组织继代

在本实验中,取洋桔梗无菌苗的子叶和下胚轴切成小块和小段接种于1.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L KT和2.0 mg/L BA+0.1 mg/L NAA的MS培养基上培养时均可诱导外植体脱分化和愈伤组织形成。在这两种培养基上外植体极易脱分化形成愈伤组织,愈伤组织形成为100%。随后将愈伤组织转移至necSM上继代培养时,这种愈伤组织为淡黄色块状,较为疏松,为非胚性愈伤组织。分化培养时,将愈伤组织转移至含1.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA的MS培养基上诱导不定芽分化和器官发生(图1)。为诱导洋桔梗胚性愈伤组织形成,将在necSM上继代培养的非胚性愈伤组织转移至ecIM上培养。实验中观察到在ecIM上形成了颗粒状黄绿色致密的胚性愈伤组织(图1)。按每块愈伤组织形成愈性组织计算,胚性愈伤组织诱导率为9.4%。如果将该胚性愈伤组织挑出转移至ecIM上继代培养时,胚性愈伤组织难于保持其胚性愈伤组织状态。

2.2 SOD活性及同工酶变化

洋桔梗愈伤组织在ecIM和necSM两种培养基上随着培养天数增加,其可溶性蛋白含量变化如表1所示,其SOD活性如表2所示。在两种培养基上洋桔梗的可溶性蛋白含量在第10天到第12天时达到最高,而这与愈伤组织的生长速度密切相关,因为大部分植物材料的愈伤组织均在第10天到第12天左右达到其最高生长的速度。

表 1 洋桔梗愈伤组织在 ecIM 和 necSM 上的可溶性蛋白质含量变化 (单位: mg/mL)
Table 1 Changes of soluble proteins of *Eustoma grandiflorum* calli on ecIM and necSM

培养基 Media	培养天数 Days of culture (d)											
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
ecIM	0.91	0.93	1.00	1.13	1.25	1.24	1.17	1.16	1.11	1.01	0.90	0.87
necSM	0.89	0.90	0.92	0.94	1.15	0.93	0.90	0.88	0.87	0.78	0.72	0.70

表 2 洋桔梗愈伤组织在 ecIM 和 necSM 上的 SOD 活性变化 (单位: /mg protein)
Table 2 Changes of SOD activities of *Eustoma grandiflorum* calli on ecIM and necSM

培养基 Media	培养天数 Days of culture (d)											
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
ecIM	0.82	1.10	1.87	3.14	2.70	2.53	2.71	2.97	3.05	3.27	3.60	4.32
necSM	0.87	1.13	1.94	3.65	2.93	2.90	3.12	3.30	3.69	4.03	4.66	4.34

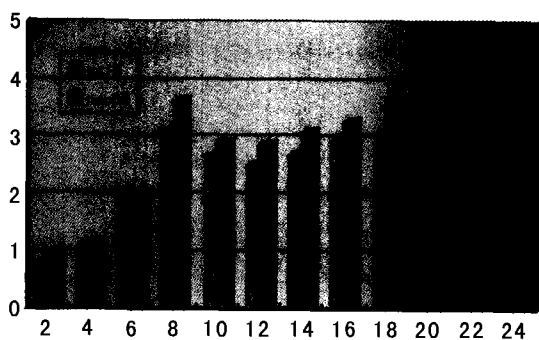


图 1 洋桔梗愈伤组织在 ecIM 和 necSM 上的 SOD 活性随培养天数的变化

Fig. 1 Changes of SOD activities of *Eustoma grandiflorum* calli on ecIM and necSM after different days of culture

从表 2 看出, 洋桔梗愈伤组织的 SOD 活性在 ecIM 和 necSM 上的变化趋势相似, 即在培养早期 SOD 活性较低, 第 6 天后活性逐渐升高, 第 8 天达到较高值, 然后稍微下降后又持续升高, 第 22 天时 SOD 活性达到最高值, 第 24 天 SOD 活性较第 22 天时稍低, 但仍维持在较高水平上。总的来说, 除了在培养早期外, 洋桔梗愈伤组织在 necSM 培养基上的 SOD 活性比其在 ecIM 培养基上的高。

洋桔梗愈伤组织在 ecIM 和 necSM 培养基上培养不同天数后, 其 SOD 同工酶电泳如图 2 所示。从图 2 看出, 在培养早期, 即培养至第 2~4 天看, 仅有一条 SOD 同工酶带, 其贯穿于整个培养周期, 从谱带判断可能为 Cu, Zn-SOD, 存在于细胞质中。在第 6 天后出现了一条新的 SOD 同工酶谱带, 从谱带判断可能为 Mn-SOD 或 Fe-SOD, 前者存在于线粒体中, 后者存在于叶绿体中。这也表明, 愈伤组织进入旺盛生长期后, 对氧的需求增加, 诱导了新的 SOD 同工酶表

达, 该 SOD 同工酶可能与细胞的生长及分化有关。

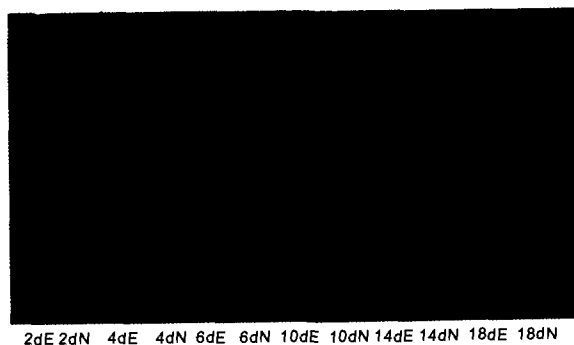


图 2 非胚性愈伤组织与胚性愈伤组织在不同培养天数的 SOD 同工酶酶谱变化

Fig. 2 Changes of SOD isoenzyme of *Eustoma grandiflorum* calli after different days of culture
d: 天数; E: 胚性愈伤组织; N: 非胚性愈伤组织。下同。
d: days of culture; E: embryogenic calli; N: non-embryogenic calli. The same below.

2.3 EST 同工酶的分析

洋桔梗愈伤组织在 ecIM 和 necSM 两种培养基上的酯酶同要酶电泳见图 3。从图 3 看出, 在第 16~20 天时, 在两种培养基上的洋桔梗愈伤组织的 EST 同工酶酶谱带呈现显著缺失。但在第 24 和 28 天时同工酶酶谱带增多, 但随着培养时间的延长 EST 同工酶酶谱带减少, 在两种培养基上 EST 同工酶谱带减少, 这表明 EST 同工酶谱带的数量与愈伤组织的生长发育状况相关。

3 讨论

3.1 SOD 与愈伤组织生长和分化有关, 与胚性愈伤组织诱导过程无相关性

SOD 与细胞内氧气的吸收及代谢有关。通常,

衰老的组织细胞(Del Rlo 等,2003),胁迫条件下(Gómez 等,2004),出现新的 SOD 同工酶谱带,SOD 活性也升高。在血红蛋白诱导的棉花体细胞胚胎发生过程中,SOD 活性升高(Ganesan 等,2004)。在松柏体细胞胚中 SOD 活性升高(Mathieu 等,2006)。在耐盐植物冰花研究中发现,Cu,Zn-SOD 出现于所有愈伤组织中,而 Fe-SOD 和 Mn-SOD 仅出现于具再生潜力的组织中(Libik 等,2005)。这些结果表明,SOD 与细胞分化和体细胞胚形成有关。本实验观察到在两种培养基上,SOD 活性在第 6 天后当愈伤组织进入生长期后,其活性升高,说明随着细胞生长和代谢活动增强,对氧

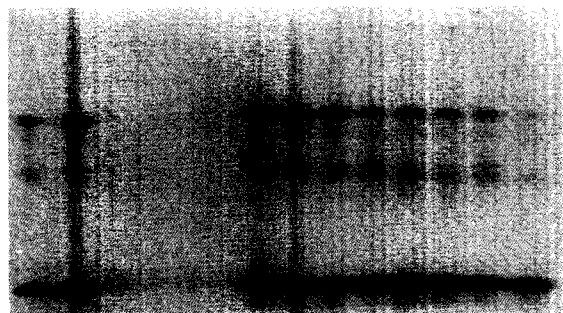


图 3 洋桔梗愈伤组织在 ecIM 和 necSM 上培养不同天数的酯酶同工酶变化

Fig. 3 Changes of EST isoenzyme of *Eustoma grandiflorum* calli after different days of culture

气的需求增加。另一方面,也出现了新的 SOD 同工酶谱带,同工酶谱带增加,使 SOD 活性维持在一个较高水平上。SOD 活性与同工酶的变化趋势是一致的。随着培养时间的延长,虽然在上述两种培养基上含有抑制细胞分化的 2,4-D,但培养的植物细胞均出现不同程度的分化,这也是必然趋势。比如,随着培养时间的增加,叶绿体和线粒体以及胞质内细胞器的分化是必然趋势。此外,随着培养时间延长,代谢废物的积累,细胞内产生的包括活性氧在内的自由基必然增加,这必然导致 SOD 活性的增加,以及新的 SOD 同工酶的表达。从本实验的研究结果看,SOD 活性及其同工酶与胚性愈伤组织诱导并无明显的相关性。但在体细胞胚胎发生的不同发育阶段以及器官发生时芽和根形成时,SOD 是否有显著差异,还需要进一步深入研究。

3.2 酯酶与分化有关

酯酶(estrace)是体内具有广泛生理作用的一类酶,在植物中的种类繁多。酯酶与细胞分化有关的

酶(Balen 等,2003)。在脱分化过程中,酯酶出现特征酶带,可作为脱分化的标志酶(赵洁等,1994),失去分化能力时,酯酶同工酶谱带减少(盛腊红等,1999;张改娜等,2003)。本实验观察到,在两种培养基上,当愈伤组织生长到第 16~20 天时,酯酶同工酶呈显著缺失,此前或此后酯酶同工酶均显示 10 条左右的谱带。为何出现这种现象?据观察,在这期间两种培养基上的愈伤组织的生长速度最快,进入了旺盛生长期。那么在这期间细胞内部的生理生化活动表现为合成代谢为主,而酯酶作为一种水解酶,活性受到抑制。而为何出现这种急剧变化,目前很难作出合理解释。随着培养时间延长酯酶同工酶谱带逐渐减少,可能与细胞衰老有关。

参考文献:

- Balen B, Krsnik-Rasol M, et al. 2003. Isoenzymes of peroxidase and esterase related to morphogenesis in *Mammillaria gracilliss* tissue culture[J]. *J Plant Physiol*, **160**(11):1 401-1 406
- Beauchamp C, Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrlamide gels[J]. *Anal Biochem*, **44**:276-287
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Anal Biochem*, **72**:248-254
- Del Rlo L A, Sandalio L M, Altomare D A, et al. 2003. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase; differential expression during leaf senescence[J]. *J of Exp Bot*, **54**(384):923-933
- Deroles S C, Bradley J M, Schwinn K E, et al. 1998. An antisense chalcone synthase cDNA leads to novel colour patterns in lisianthus(*Eustoma grandiflorum*)flowers[J]. *Mol Breed*, **4**(1):59-66
- Furuya N, Masunaga T, Khan A A, et al. 2000. Bacterial wilt of russell prairie gentian caused by *Burkholderia caryophylli*[J]. *J General Plant Pathol*, **66**(4):316-322
- Ganesan M, Jayabalan N. 2004. Evaluation of haemoglobin (erythrogen); for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* cv. SVPR 2)[J]. *Plant Cell Rep*, **23**(4):181-187
- Giannopolitis CN, Ries SK. 1977. Superoxide dismutase II: Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings[J]. *Plant Physiol*, **59**:315-318
- Gómez JM, Jiménez A, Olmos E, et al. 2004. Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea(*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts[J]. *J of Exp Bot*, **55**(394):119-130
- Griesbach RJ, Semeniuk P. 1987. Use of somaclonal variation in the improvement of *Eustoma grandiflorum*[J]. *J Hered*, **78**(2):114-116
- Libik M, Konieczny R, et al. 2005. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant[J]. *Plant Cell Rep*, **23**(12):834-841

(下转第 153 页 Continue on page 153)

外壁均为较大清晰的网状雕纹,但从网眼大小、数量及网脊和网眼内有无颗粒雕纹,3 属间存在明显区别。(3) 黄瓜属花粉粒为近球形,具 3 孔,外壁具坑、穴状雕纹。(4) 南瓜属花粉为球形,具散孔,外壁具刺状雕纹。

从属内种间关系来看,葫芦属中的葫芦和瓠子,花粉粒大小相近,均为近球形,具 3 孔沟,外壁为不规则的网状雕纹,种间差异不明显,花粉形态特征上无分类价值,支持瓠子为变种的观点。黄瓜属花粉为近球形,具 3 孔,外壁具坑状或穴状雕纹;黄瓜花粉最大,外壁雕纹为坑状,大小深浅不等,甜瓜和小马泡花粉大小相近,前者外壁为少量的穴状和大量坑状雕纹,后者为大量的坑状和大量穴状雕纹,外壁雕纹的特征可作为种间分类的依据。

前人对西瓜属的西瓜已有研究报道,花粉为近球形(王伏雄等,1997),笔者研究的结果为长球形,这是否是利用不同的研究手段造成的,有待进一步研究。

参考文献:

王伏雄,钱南芬,张玉龙,等. 1997. 中国植物花粉形态(第 2 版)[M]. 北京:科学出版社,166—168
陈汉斌,郑亦津,李法曾. 1997. 山东植物志(下卷)[M]. 青岛:

青岛出版社:1 231—1 256

- Huang LQ(黄璐琦), Yang B(杨滨), Yue CX(乐崇熙). 1997. Pollen morphology of *Trichosanthes* and its taxonomic significance(栝楼属花粉形态研究及其在分类学上的意义)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), **35**(2):125—135
Pang LQ(庞丽琴), Fu BC(付宝春), Kang HM(康红梅). 2006. Scanning electron microscope observation to pollen morphology of melon crops(瓜类植物花粉形态扫描电镜观察)[J]. *J Shanxi Agric Sci*(山西农业科学), **34**(4):39—41
Yang DK(杨德奎), Sun JT(孙京田). 2003. Studies on the pollen morphology of 8 species of *Lysimachia*(珍珠菜属八种植物的花粉形态研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **23**(2):143—144
Yang DK(杨德奎), Wu XX(吴晓霞). 2004. Studies on pollen morphology of *Oxalis* from Shandong(山东酢浆草属花粉形态的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **24**(2):128—129
Yang DK(杨德奎), Sun JT(孙京田). 2001. Studies of leaf stomatal apparatus and pollen submicroscopic morphology on *Pharbitis* from Shandong(山东牵牛属植物叶片气孔器及花粉亚显微研究)[J]. *Shandong Sci*(山东科学), **14**(2):10—15
Yang DK(杨德奎), Wang SE(王善娥), et al. 2005. The studies on the pollen morphology of Commelinaceae from Shandong(山东鸭趾草科植物的花粉形态研究)[J]. *J Shandong Normal Univ(Nat Sci)*(山东师范大学学报·自然科学版), **20**(3):80—82
Zhang ZY, Lu AM. 1989. Pollen morphology and its systematic significance of subtribe *Thladianthinae* (Cucurbitaceae) [J]. *Cathaya*, **1**:23—36

(上接第 250 页 Continue from page 250)

- Li Q(李群), Liu GY(刘光勇), Wang L(王丽). 2004. Effect of hormone on plantlet regeneration and studies of root regeneration culture of *Eustoma* sp. (激素对洋桔梗植株再生的影响及生根培养的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **24**(1):40—42
Mathieu M, Lelu-Walter M A, et al. 2006. Germin-like genes are expressed during somatic embryogenesis and early development of conifers[J]. *Plant Mol Biol*, **61**(4—5):615—627
Mino M, Oka M, Tasaka Y, et al. 2003. Thermoinduction of genes encoding the enzymes of gibberellin biosynthesis and a putative negative regulator of gibberellin signal transduction in *Eustoma grandiflorum*[J]. *Plant Cell Reports*, **22**(2):159—165
Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiol Plant*, **15**:473—497
Okamoto J, Limkaisang S, Nojima H, et al. 2002. Powdery mildew of prairie gentian; characteristics, molecular phylogeny and pathogenicity[J]. *J General Plant Pathol*, **68**(3):200—207
Sheng LH(盛腊红), He GC(何光存), Shu LH(舒理慧), et al. 1999. Improvement of plant differentiation frequency of wild rice *Oryza meyeriana* calli(提高疣粒野生稻愈伤组织分化能力的研究)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), **16**(5):614—617
Uga H, Kobayashi YO, Kyoji Hagiwara K, et al. 2004. S election

- of an attenuated isolate of bean yellow mosaic virus for protection of dwarf gentian plants from viral infection in the field[J]. *J General Plant Pathol*, **70**(1):54—60
Yang X(杨霞), Xu K(徐康). 1997. Tissue culture and rapid propagation of *Eustoma grandiflorum*(洋桔梗的组织培养及快速繁殖)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), **33**(6):435—438
Yanagida M, Mino M, Iwabuchi M, et al. 2004. Reduced glutathione is a novel regulator of vernalization-induced bolting in the rosette plant *Eustoma grandiflorum*[J]. *Plant and Cell Physiology*, **45**(2):129—137
Zhao J(赵洁), Cheng JC(程井辰). 1994. Studies on three kinds of isozymes changes during dedifferentiation of the shoot section in *Asparagus officinalis*(石刁柏茎段脱分化过程中三种同工酶变化的研究)[J]. *J Central China Normal Univ(Nat Sci)*(华中师范大学学报(自然科学版)), **28**(3):394—397
Zhang GN(张改娜), Jia JF(贾敬芬), Hao JG(郝建国), et al. 2003. Cytological observation and analysis of isoenzyme patterns in three types of hairy roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* A4(3 种发根农杆菌 A4 转化系毛根的细胞学观察及同工酶酶谱分析)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), **23**(9):1 533—1 538