

# 花烛体细胞胚胎发生过程中 相关生理生化特征研究

许传营, 陈星旭, 辛伟杰, 王广东\*

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

**摘要:** 以花烛品种 Amigo 为材料, 研究了悬浮培养条件下花烛体细胞胚胎发生过程中相关生理生化特征。结果表明: POD、CAT 在胚性愈伤组织阶段维持较高活性, 而 SOD 在体胚发育后期阶段活性较高; 可溶性蛋白质含量在胚性愈伤组织阶段出现高峰; 可溶性糖含量变化表现为先上升后下降的趋势, 而淀粉含量表现为先下降后上升的趋势; SDS-PAGE 电泳分析表明, 胚性愈伤组织阶段蛋白质表达量高, 种类多, 并出现多种特异蛋白。分析认为胚性愈伤组织阶段是调控花烛体细胞胚胎发生过程的关键阶段。

**关键词:** 花烛; 体细胞胚胎发生; 生理生化特征

**中图分类号:** Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2010)01-0117-05

## Some physiological and biochemical characteristics of different developmental stages of somatic embryogenesis in *Anthurium andraeanum*

XU Chuan-Ying, CHEN Xing-Xu, XIN Wei-Jie, WANG Guang-Dong\*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Using *Anthurium andraeanum* cv. 'Amigo' as material, some physiological and biochemical characteristics of different developmental stages of somatic embryogenesis were studied. The results showed that the activity of POD and CAT maintained at a high level at the stage of embryogenic callus, and SOD activity present a high level at the later stage of somatic embryogenesis. The content of soluble protein was the highest at the stage of callus formation, and the content of starch went down first and up later but the content of soluble sugar up first and down later contrarily during the somatic embryogenesis. SDS-PAGE analysis showed that there are some specific proteins and high expression proteins at the stage of embryogenic callus. It concluded that the embryogenic callus formation stage is important for the regulation of somatic embryogenesis in *A. andraeanum*.

**Key words:** *Anthurium andraeanum*; somatic embryogenesis; physiological and biochemical characteristics

花烛(*Anthurium andraeanum*)又名红掌、安祖花, 为天南星科(Araceae)花烛属(*Anthurium*)植物, 是全球销量第二的热带花卉(Laws & Galinsky, 1996)。花烛种苗生产主要通过组织培养技术进行, 其离体培养技术最早由 Pierik 等(1974)成功建立并成为一种快速有效的繁殖方式。而花烛体细

胞胚胎发生途径最早由 Kuehnle 等(1992)进行了报道, 但由于受到花烛体胚发生体系稳定性以及发育同步化调控技术的局限, 目前尚未见大规模生产应用。本实验室于 2004 年对花烛的体细胞胚胎发生过程进行了探索和改进, 并建立了花烛体细胞胚胎的高频发生条件(辛伟杰等, 2006), 在此基础上进

收稿日期: 2008-06-23 修回日期: 2009-01-12

基金项目: 国家自然科学基金(30300244)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30300244)]

作者简介: 许传营(1981-), 男, 山东济南人, 硕士研究生, 从事园林植物与观赏园艺研究, (E-mail)xuchuanying\_001@163.com.

\*通讯作者(Author for correspondence, E-mail:gdwang@njau.edu.cn)

一步探讨花烛体胚发生机理,为合理进行花烛体胚发生调控提供依据。

植物体细胞胚胎发生过程的相关生理生化变化在多种植物上已有报道,但关于花烛体胚发生的生理生化特征尚未见报道。本试验在已建立的花烛体细胞胚胎发生条件的基础上,对花烛体细胞胚胎发生发育过程的生长指标(生长动态和干鲜比)、抗氧化酶活性(POD、CAT、SOD)及碳水化合物含量(可溶性糖、淀粉)和可溶性蛋白质含量进行了测定与分析,并对体胚发生发育过程各阶段的蛋白质组成进行 SDS-PAGE 电泳分析,明确体胚发生发育生理生化特征,以期在花烛体胚大量培养调控提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

花烛胚性愈伤组织诱导以及体胚发育条件参考辛伟杰等(2006)的方法。以花烛品种‘Amigo’无菌苗叶片为外植体,接种于胚性愈伤组织诱导培养基  $1/2MS+2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}2,4\text{-D}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}+3\%$ 蔗糖, pH5.5, 暗培养 40 d, 外植体边缘形成淡黄色颗粒状胚性愈伤组织。将获得的胚性愈伤组织接种于液体培养基中进行增殖培养, 得到深黄色、颗粒状胚性愈伤组织团。然后将增殖的胚性愈伤组织接种于液体发育培养基中进行培养, 30 d 后形成结构松散、淡黄色、较大颗粒的花烛盾形胚。将盾形胚接种到液体发育培养基中 20 d, 体胚萌发产生白色透明状胚根。液体条件下进行光照培养, 20 d 后胚根变绿并伴有胚芽萌发。将体胚转接于固体培养基中进行萌发成苗, 30 d 后胚根迅速伸长, 并生有白色根毛, 胚芽端萌发出真叶。

将整个花烛体细胞胚胎发生过程分为六个阶段: 外植体阶段(A)胚性愈伤组织阶段;(B)体细胞胚胎形成阶段;(C)胚根伸长阶段;(D)胚芽出现阶段;(E)萌发成苗阶段(F)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 抗氧化酶 POD、CAT、SOD 活性测定 分别准确称取花烛体细胞胚胎发生各阶段的新鲜材料 0.3 g, 在冰浴上研磨, 加入 PBS(pH7.8)缓冲液 1.6 mL, 充分混匀后,  $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 min, 取上清液冷藏备用, POD 活性采用氧化愈创木酚法(李合生等, 2000), 以每分钟 A 值增加 0.01 为 1 个活

性单位, 结果以  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{min}^{-1}$  表示; CAT 活性采用过氧化氢氧化法(Britton & Maehly, 1955), 以每分钟 A 值减少 0.01 为 1 个活性单位, 结果以  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{min}^{-1}$  表示; SOD 活性测定采用 NBT 光还原法(李合生等, 2000), SOD 活性单位以抑制 NBT 光化还原的 50% 为 1 个酶活性单位, 结果以  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})$  表示, 所有测定均重复 3 次。

### 1.2.2 可溶性蛋白质、可溶性糖及淀粉含量测定

(1)可溶性蛋白质含量测定:利用 1.2.1 提取的上清液,采用考马斯亮蓝比色法进行测定(李合生等, 2000),结果以  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})$  表示。(2)可溶性糖含量测定:利用干鲜比测定中制备的各阶段材料的干样,分别准确称取各发育阶段干样 0.05 g 进行研磨,加入 5 mL 蒸馏水,混匀后于  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴保温 30 min,冷却后  $10\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,将上清液利用蒽酮比色法测定可溶性糖含量(李合生等, 2000),结果以  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}(\text{DW})$  表示。(3)淀粉含量测定:将可溶性糖测定中各阶段离心后的残渣于  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  烘箱中烘干,加入 1.0 mL 蒸馏水,于沸水浴中糊化 30 min,冷却后加入高氯酸制备提取液,蒽酮法 620 nm 测定吸光度(Hall 等, 2001),计算淀粉含量,结果以  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}(\text{DW})$  表示。

1.2.3 各阶段 SDS 蛋白质电泳 SDS-PAGE 电泳参考萨姆布鲁克等(2002)的方法,采用 10% 分离胶,图像采集及分析采用软件 bandscan 5.0。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗氧化酶活性变化

如图 1:A 所示,POD 活性在整个花烛体胚发生过程中呈现急剧升高然后下降的规律性变化。由外植体到胚性愈伤组织阶段(A→B)急剧上升,由愈伤组织到体胚形成阶段(B→C)又迅速下降;随后各阶段陆续平缓下降。由图 1:B 可知,花烛体胚发生过程中,从外植体阶段到胚根出现阶段(A→D)CAT 活性维持在较高水平,仅在体细胞胚胎形成阶段略有下降;随后的胚芽出现阶段和萌发成苗阶段 CAT 活性明显下降。由图 1:C 可知,SOD 活性在花烛体胚发生过程中呈现先下降后上升随后又有所下降的趋势。由外植体到体细胞胚胎形成阶段(A→C)SOD 活性下降,随后到胚芽出现阶段(C→E)活性又上升至最高点;萌发成苗阶段又回落到和外植体活性相当的水平。

## 2.2 可溶性蛋白质、可溶性糖及淀粉含量动态变化

如图 2:A 所示,花烛体细胞胚胎发生过程中可溶性蛋白质含量呈现先升后降的规律性变化。由外植体阶段到胚性愈伤组织阶段(A→B)可溶性蛋白质含量急剧上升;在随后的体细胞胚胎形成阶段和胚根伸长阶段(B→D)含量迅速下降。图 2:B 所示

为可溶性糖含量动态变化,可溶性糖含量呈现先上升后下降的趋势。在胚根伸长阶段出现高峰;随后含量迅速下降;萌发成苗阶段略有升高。淀粉含量的动态变化如图 2:C 所示,呈现先下降后上升的趋势。由外植体到体细胞胚胎形成阶段(A→C)淀粉含量处在相对较平稳的水平;胚根伸长阶段出现迅

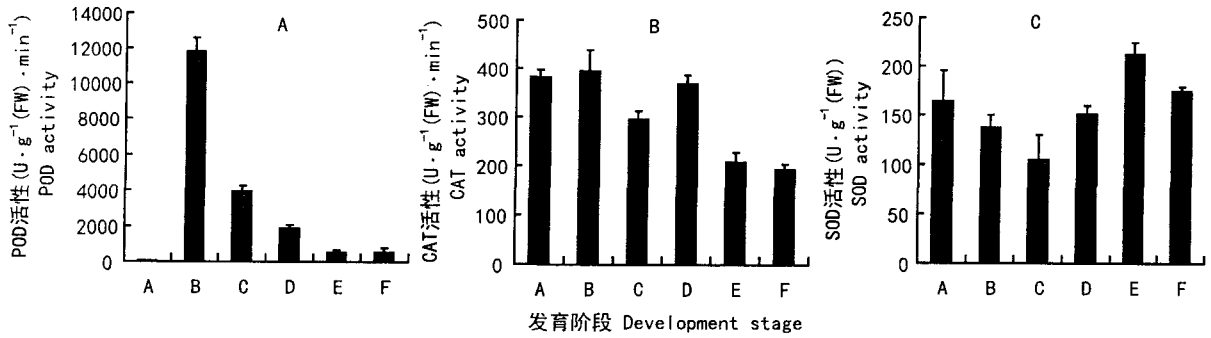


图 1 花烛体细胞胚胎发生过程中 POD、CAT、SOD 活性变化

Fig. 1 The change of POD, CAT and SOD activity during the somatic embryogenesis of *Anthurium andraeanum*.

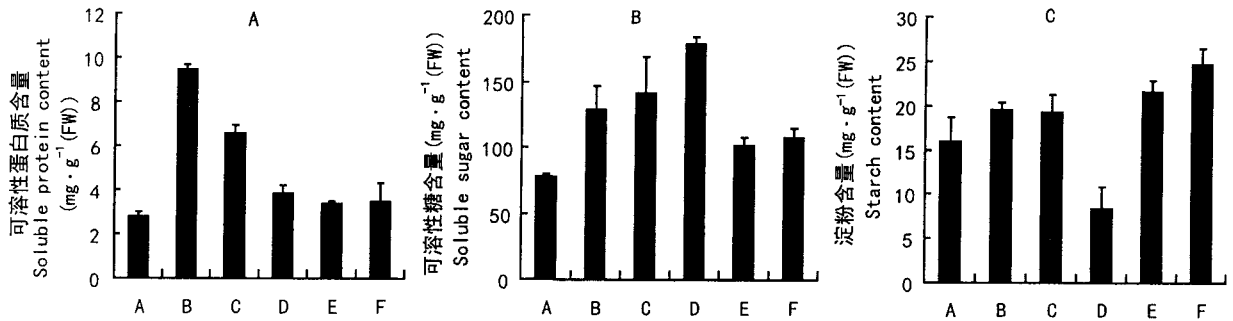


图 2 花烛体细胞胚胎发生过程中可溶性蛋白质、可溶性糖、淀粉含量变化

Fig. 2 The change of soluble protein, sugar and starch content during the somatic embryogenesis of *Anthurium andraeanum*.

速下降;胚根变绿胚芽出现阶段含量又迅速上升。

## 2.3 各阶段蛋白质组成变化

花烛体胚发生各阶段的蛋白质电泳图谱表明各阶段的蛋白质种类和含量存在明显差异(图 3)。蛋白质含量在胚性愈伤组织阶段最高,而在随后的发育阶段下降,这与所测定的可溶性蛋白质含量变化趋势相一致。蛋白质种类在胚性愈伤组织阶段最多,共有 12 条蛋白质谱带出现,体胚形成阶段有所减少,共有 9 条蛋白质谱带;这两个阶段出现的蛋白质谱带大致相同,但胚性愈伤组织阶段比体胚形成阶段蛋白质表达量高且多出 3 条特异蛋白质谱带。自胚根伸长到萌发成苗阶段蛋白质谱带数目和蛋白

质含量迅速减少。胚根伸长阶段出现的蛋白质谱带最少,仅为 5 条;胚芽出现及萌发成苗阶段与外植体阶段蛋白质谱带基本相同,仅在萌发成苗阶段多出一条蛋白质谱带。18KD、27KD、48KD 左右的蛋白质在所有阶段均有表达。143KD、82KD、41KD 左右蛋白质只在胚性愈伤组织中得到了特异性表达,可能其与胚性愈伤组织形成有关。14KD、25KD 左右的蛋白质在体胚萌发阶段和外植体阶段得到特异表达,可能与萌发成苗有关。55KD、38KD 左右蛋白质在体胚发生早期(B→C)和后期萌发成苗及外植体阶段表达,推测可能与体胚发生过程中的信号传导及控制体胚发育进程有关。

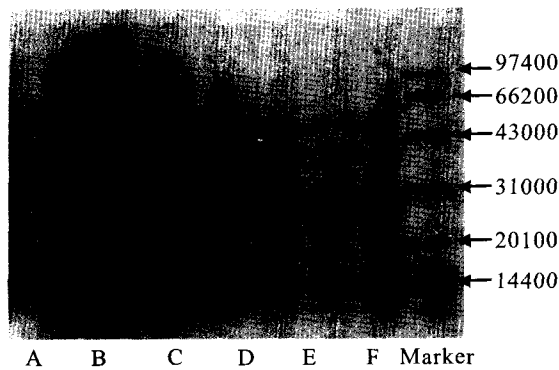


图3 花烛体细胞胚胎发生过程中各阶段的蛋白质电泳图谱

Fig. 3 Electrophoretic patterns of the proteins during somatic embryogenesis of *Anthurium andraeanum*

### 3. 讨论

高浓度的活性氧对植物细胞内的膜系统产生伤害,导致细胞死亡,抗氧化酶活性对清除植物体内的活性氧具有至关重要的意义,通常与各种胁迫相关(Larkindale & Huang, 2004; Foyer & Noctor, 2000; Mittler, 2002)。而植物组织培养中高浓度2,4-D和蔗糖等都对培养物产生胁迫作用。花烛体细胞胚胎发生过程中,POD、CAT活性在胚性愈伤组织阶段都表现较高活性,POD更是在胚性愈伤组织阶段出现活力高峰。推测可能与胚性愈伤组织阶段培养基中添加的高浓度2,4-D和高浓度蔗糖有关。活性氧在信号转导和细胞分化方面也具有重要作用(Gutteridge & Halliwell, 1990);崔凯荣等(1998)发现在枸杞体细胞胚胎发生过程中SOD起到重要作用,通过在分化培养基中加入 $H_2O_2$ ,大大提高了愈伤组织中体细胞胚的发生频率,指出在胚胎发生的早期阶段SOD活力高峰可能提高了培养物内的活性氧浓度,进而诱发了体细胞胚胎的发生。本研究发现,在花烛体细胞胚胎发生过程中,POD、CAT、SOD活性变化各不相同,其中POD活性在胚性愈伤组织阶段出现高峰,随后即迅速下降,与詹园凤等(2006)的研究结果基本一致。CAT活性在胚性愈伤组织阶段维持较高水平,SOD活性在花烛体胚形成过程中活性下降,在随后的胚根伸长和胚芽出现阶段快速上升。推测在花烛体胚发生的早期(胚性愈伤组织阶段),培养物中高浓度的2,4-D和

蔗糖胁迫促使了培养物体内活性氧浓度的提高,促进了体胚的形成和发育。POD、CAT在胚性愈伤组织阶段共同维持了培养物体内的活性氧代谢平衡。

植物体细胞胚胎发生过程的实质是基因顺序表达的结果,在胚性细胞分化和发育过程中必然存在有蛋白质含量的变化和特异蛋白质的出现与消失(崔凯荣等,2000)。本研究中可溶性蛋白质含量在胚性愈伤组织阶段出现高峰,随后的体胚形成阶段也维持相对较高的含量。这与詹园凤等(2006)和张建瑛等(2007)的研究结果基本一致。各阶段的蛋白质SDS-PAGE电泳分析表明,胚性愈伤组织阶段蛋白质含量高,且出现较多的特异蛋白。表明在体胚发生早期,体胚发生相关基因及某些特异基因的表达,促进了胚性愈伤组织的形成和增殖。可溶性糖作为主要能量代谢中间产物能反映植株体内能量代谢的快慢,而淀粉作为一种多糖储存物质,通常与可溶性糖在代谢变化中出现相互关联的动态变化(李华云等,2007)。可溶性糖和淀粉含量也呈现相关的动态变化,淀粉含量在胚根伸长阶段出现波谷,而可溶性糖含量在此阶段出现波峰,说明在胚根伸长阶段能量代谢较为活跃,淀粉转化为可溶性糖用于能量代谢。而部分植物的体细胞胚胎发生过程中会出现淀粉的积累和可溶性糖含量的下降(杨金玲,1998;詹园凤等,2006;李冬梅等,2005),但本研究中未出现此变化,可能与不同植物的代谢特征存在差异有关。

综上所述,在花烛体细胞胚胎发生发育过程中,胚性愈伤组织阶段出现较高浓度的内含物,较高水平的抗氧化酶活性,高水平的可溶性蛋白质含量,以及出现较多的特异蛋白的表达,表明胚性愈伤组织阶段是调控花烛体细胞胚胎形态发生过程中的关键阶段,可以通过加入不同的渗透调节物以及有机添加物来进一步优化花烛体细胞胚胎培养体系。

### 参考文献:

- 崔凯荣,戴若兰. 2000. 植物体细胞胚发生的分子生物学[M]. 北京:科学出版社:36
- 李合生. 2000. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社
- 萨姆布鲁克J,拉塞尔 DW. 2002. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京:科学出版社:1 713-1 722
- Britton C, Maehly AC. 1955. Assay of Catalase and Peroxidase. Methods in Enzymology. Vol. I[M]. New York: Academic Press Inc: 764-775
- Cui KR(崔凯荣), Ren HX(任红旭), Xin GM(邢更妹), et al.

1998. The positive correlations between the activities of antioxidant enzymes and somatic embryogenesis during the period of tissue culture in *Lycium barbarum* (枸杞组织培养中抗氧化酶活性与体细胞胚发生相关性的研究)[J]. *J Lanzhou Univ: Nat Sci*(兰州大学学报:自然科学版), **34**(3):93-99
- Foyer CH, Noctor G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: Regulation and signaling[J]. *New Phytol*, **146**:359-388
- Gutteridge JMC, Halliwell B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems[J]. *Trends Biochem Sci*, **15**(4):129-135
- Hall MB, Jennings JP, Lewis BA, et al. 2001. Evaluation of starch analysis methods for feed samples[J]. *J Sci Food Agric*, **81**:17-21
- Kuehnle AR, Chen FC, et al. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* [J]. *Plant Cell Reports*, **11**(9):438-442
- Larkindale J, Huang B. 2004. Thermo-tolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene[J]. *Plant Physiol*, **161**:405-413
- Laws N, Galinsky B. 1996. Anthurium world market survey[J]. *Floracult Inter*, (6):21
- Li DM(李冬梅), Lai ZX(赖钟雄). 2005. Changes of the contents of starches in the process of somatic embryomaturaton in longan (*Dinocarpus longan*) (龙眼体胚成熟过程中淀粉含量的变化)[J]. *J Fujian Agric Fore Univ: Nat Sci*(福建农林大学学报:自然科学版), **34**(2):220-223
- Li HY(李华云), Zhuang JP(庄军平), Huang SQ(黄胜琴), et al. 2007. Effects of elevated CO<sub>2</sub> concentration on growth and carbon fixation of phalaenopsis 'sogo Benz sogo' (高浓度 CO<sub>2</sub> 对蝴蝶兰 CO<sub>2</sub> 吸收速率和生长的影响)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **34**(3):705-710
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. *Trends Plant Sci*, **7**:405-410
- Pierik RLM, Steegmans HHM, vanDerMeys JAJ. 1974. Plantlet formation in callus tissues of *Anthurium andraeanum* [J]. *Sci Hort*, **2**(2):193-198
- Xin WJ(辛伟杰), Xu B(徐彬), Wang GD(王广东), et al. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Anthurium andraeanum* (花烛体细胞胚胎发生及植株再生研究)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **33**(6):1281-1286
- Yang JL(杨金玲). 1998. Studies on cytohistology and starch accumulation during somatic embryogenesis of *Picea meyeri* (白木千体细胞胚胎发生的细胞组织学和淀粉积累动态的研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), **18**(3):335-338
- Zhan YF(詹园凤), Wu Z(吴震), Jin XX(金潇潇), et al. 2006. Anti-oxidative enzymes and some physiological features in somatic embryogenesis of garlic (大蒜体细胞胚胎发生过程中抗氧化酶活性变化及某些生理特征)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), **26**(9):1799-1802
- Zhang JY(张建瑛), Yang L(杨玲), Shen HL(沈海龙). 2007. Changes of antioxidative enzyme activity in somatic embryogenesis of *Sorbus pohuashanensis* (花楸体细胞胚发生过程中抗氧化酶活性的变化)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), **43**(2):264-268

\*\*\*\*\*

(上接第144页 Continue from page 144)

- Li SH(李胜华), Wu XJ(伍贤进), Yu JP(郁建平). 2006. Study on extraction process of flavonoids from *Houttuymia cordata* leaves with supersonic extraction (超声波提取鱼腥草叶总黄酮优化工艺研究)[J]. *Food Sci*(食品科学), **27**(12):270-273
- Li SH(李胜华), Wu XJ(伍贤进). 2007. Study on extraction process of flavonoids extracting methods in different parts of *Houttuymia cordata* (鱼腥草总黄酮的提取及其方法对比)[J]. *J Jishou Univ: Nat Sci*(吉首大学学报:自然科学版), **28**(3):117-118
- Qi YC(齐迎春), Hu C(胡城), et al. 2001. Comparative analysis of nutrients in stems and leaves from *Houttuymia cordata* (鱼腥草茎、叶的营养成分对比分析)[J]. *Special Wild Economic Animal and Plant Research* (特产研究), **4**:45-46
- Ye C(叶春), Kan JQ(阚健全), Tan SM(谭书明). 2007. Study on extraction of flavonoids from *Houttuymia cordata* leaves (鱼腥草叶中总黄酮提取工艺研究)[J]. *Food Sci*(食品科学), **28**(11):192-195
- Wang H(王辉), Yan BZ(严宝珍). 2006. Study on extraction of total flavones from *Ginkgo biloba* by ultrasonic wave method (银杏叶中总黄酮超声提取法)[J]. *Nat Prod Res Develop* (天然产物研究与开发), **18**:135-138
- Zeng HY(曾虹燕), Zhou PH(周朴华), et al. 2002. Total flavones contents in cultural materials of *Hypericum sampsonii* (元宝草培养物的总黄酮量)[J]. *J Plant Res Environ* (植物资源与环境学报), **11**(1):59-60