

## 石刁柏体细胞胚发生过程中多胺代谢酶和过氧化氢清除酶的活性变化

邓白平<sup>1</sup>, 陈小飞<sup>2</sup>, 鲁旭东<sup>2,3</sup>, 刘华英<sup>4</sup>, 萧浪涛<sup>2,\*</sup>

湖南农业大学<sup>1</sup> 资产管理处, <sup>2</sup>湖南省植物激素与生长发育重点实验室, 长沙 410128; <sup>3</sup>孝感学院生命科学技术学院, 湖北孝感 432000; <sup>4</sup>广西师范大学生命科学技术学院, 广西桂林 541001

**摘要:** 石刁柏体细胞胚发生过程中精氨酸脱羧酶(ADC)活性变化趋势与内源腐胺的含量变化相同, 多胺氧化酶(PAO)活性变化幅度较小。外源腐胺对ADC活性的影响与不作外源腐胺处理的差异不显著性, 但促进体细胞胚发生前期的PAO活性, 过氧化物酶和过氧化氢酶活性受外源腐胺的影响很小, 两者的活性变化与PAO活性变化趋势一致。

**关键词:** 体细胞胚胎发生; 多胺代谢酶; 过氧化氢清除酶

## Changes in Activities of Enzymes Involved in Polyamines Metabolism and Elimination of Hydrogen Peroxide during Somatic Embryogenesis in *Asparagus officinalis* L.

DENG Bai-Ping<sup>1</sup>, CHEN Xiao-Fei<sup>2</sup>, LU Xu-Dong<sup>2,3</sup>, LIU Hua-Ying<sup>4</sup>, XIAO Lang-Tao<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Assets Management, <sup>2</sup>Hunan Provincial Key Laboratory of Phytohormones and Development, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; <sup>3</sup>School of Life Science and Technology, Xiaogan College, Xiaogan, Hubei 432000, China;

<sup>4</sup>College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541001, China

**Abstract:** In order to get a better understanding on how the polyamines play roles in somatic embryogenesis, the changes in enzymes activities involved in polyamines metabolism and hydrogen peroxide eliminating during somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* were investigated. The arginine decarboxylase (ADC) had the same change trend as endogenous putrescine during the initial progress. The polyamine oxidase (PAO) activity varied in a gentle way. The ADC activity was not affected significantly by exogenous putrescine applied during the later progress of somatic embryogenesis. While the PAO was up-regulated in the early stage of somatic embryogenesis, the activities of catalase and peroxidase, which varied as same as the PAO activity, were little affected by exogenous putrescine.

**Key words:** somatic embryogenesis; polyamine metabolism enzymes; hydrogen peroxide eliminating enzymes

多胺(polyamines, PAs)参与植物细胞的增殖、分化、衰老、抗逆和植物形态发生等一系列生理生化反应(Kakkar 和 Sawhney 2002)。多胺氧化酶(polyamine oxidase, PAO)和精氨酸脱羧酶(arginine decarboxylase, ADC)作为植物多胺代谢的关键酶, 参与细胞多胺水平和生成物浓度的调节, 还与植物的氮代谢、细胞内活性氧的调节有关(杨洪强和高华君 2007; Cona 等 2006)。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与细胞分裂、分化也有关, 对胚性细胞的分化有促进作用。关于多胺与抗氧化酶活性之间的关系, 其在植物衰老、抵抗逆境中的作用已有较多报道, 但体胚发生过程中多胺与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除酶之间的关系报道较少。本文采用石刁柏体细胞胚(简称体胚)发生体系(陈小飞等 2006, 2007; 鲁旭东等 2006), 检测了体细胞胚发生过程中多胺代谢酶和活性氧代谢酶的活性变化, 为

进一步揭示多胺在体细胞胚发生中的作用机制建立基础。

### 材料与方法

石刁柏(*Asparagus officinalis* L.)体细胞胚诱导参照前文(陈小飞等 2007)中的方法。分别取胚性愈伤组织(标为 0 d)和放在 MS (对照)以及 MS+Put 25 mg·L<sup>-1</sup> (处理)培养基上诱导体细胞胚发生 7、14、21、28、35 d 后, 取培养物测定 ADC、PAO、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性。另取

收稿 2008-03-06 修定 2008-06-23

资助 国家自然科学基金(30540019)和湖南农业大学 2007 年度教学改革研究项目。

\* 通讯作者(E-mail: ltxiao@hunau.net; Tel: 0731-4635259-8001)。

材料用FAA (福尔马林:70%酒精:冰醋酸=9:0.5:0.5) 固定液固定, 按常规石蜡切片法制片。切片分别进行铁钒-苏木精和高碘酸锡夫试剂(PAS)染色(李正理 1996)。切片于数码显微系统下观察、拍照。POD活性测定采用愈创木酚法(张志良1990); CAT活性测定采用过氧化氢分解法(张志良1990); PAO活性测定参照汪天等(2004)文中的方法; ADC的提取和活性测定参照赵福庚和刘友良(2000)、刘华英等(2005)文中的方法。酶活性用SPSS 16.0软件进行One Way ANOVA分析。

## 结果与讨论

### 1 体细胞胚发生过程中的形态解剖观察

石蜡切片观察结果表明, 体细胞胚的发生和发育经历2-细胞、4-细胞、多细胞原胚、球形胚、梨形胚、棒状胚和香蕉胚等发育阶段。第7天出现2-细胞、4-细胞原胚以及各种形态的胚性细胞团(图1-a、b)。第14天观察到明显的球形胚和梨形胚(图1-c、d)。21 d时观察到棒状胚的出现(图1-e), 28~30 d时观察到香蕉胚(图1-f)。

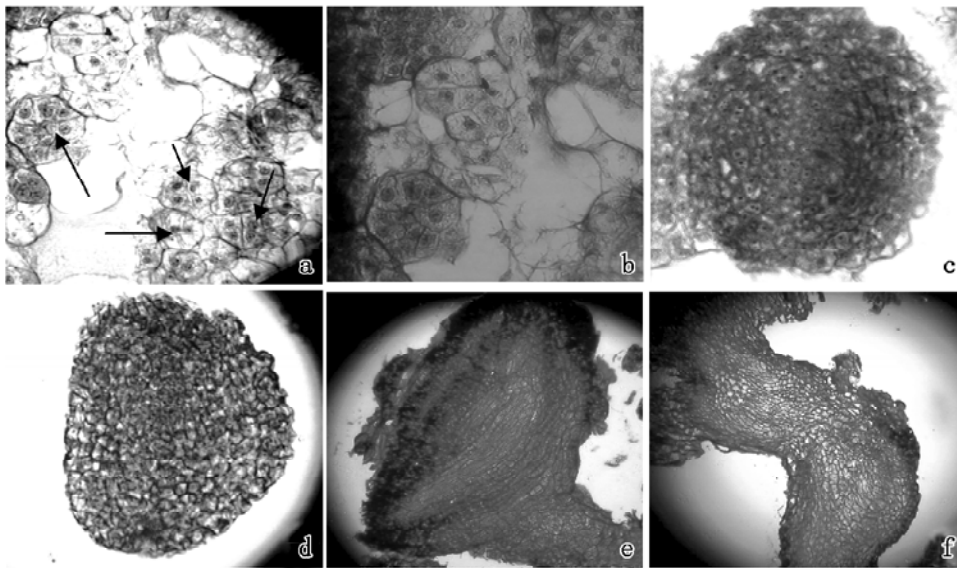


图1 不同发育时期的体细胞胚胎

Fig.1 Somatic embryos at different development stages

a: 2-细胞、4-细胞原胚( $\times 400$ ); b: 胚性细胞团( $\times 400$ ); c: 球形胚( $\times 200$ ); d: 梨形胚( $\times 100$ ); e: 棒状胚( $\times 100$ ); f: 香蕉胚( $\times 100$ )。

### 2 体细胞胚发生过程中的ADC和PAO活性变化

精氨酸脱羧酶和鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)是高等植物中催化精氨酸向腐胺(Put)转化的关键酶。从图2-a可以看出, 体细胞胚发生诱导各时期ADC酶活性低于胚性愈伤组织( $P < 0.05$ ), 棒状胚出现时(14 d) ADC活性降至最低, 且ADC活性变化与内源Put水平变化趋势(陈小飞等2007)相同, 说明内源Put水平与ADC活性之间有一定的相关性。外源Put处理的除21 d的以外( $F = 4.304, P = 0.0165 < 0.05$ ), 其余各时期差异不显著, 说明外源Put对体胚发生过程ADC酶活性作用不显著。ODC是部分植物多胺合成的关键酶, 但我们并未检测到ODC活性。PAO活性在体细胞胚胎诱

导过程中呈下降趋势, 诱导7 d内下降幅度较大, 7 d后各时期变化不明显( $P > 0.05$ ), Santanen和Simola (1994)在印度冷杉中也得到类似的结果。Put处理的发生系统PAO活性变化差异显著( $F = 5.314, P = 0.033 < 0.05$ ), 曲线变化趋势有所改变, 经历了升高、下降、再上升的过程。7 d到14 d (尤其是7 d)都高于不加Put的。PAO活性较高, 可迅速降解Spd和Spm, 这可能是内源多胺水平较低的一个原因。在21~28 d间活性较低, 分解的多胺减少, 多胺水平相对较高, 可能有利于棒状胚和香蕉胚的发育。

### 3 体细胞胚发生过程中的POD和CAT活性变化

PAO催化多胺氧化, 一方面降解多胺导致多胺

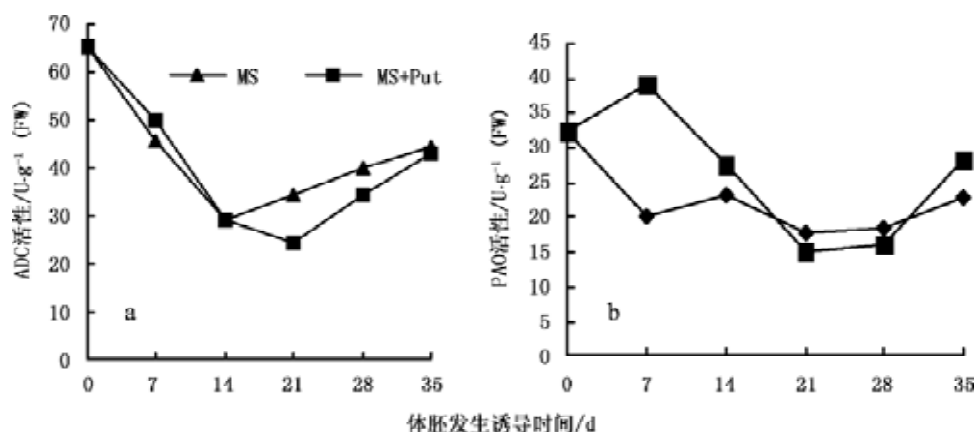


图2 体细胞胚发生过程中ADC和PAO活性的变化

Fig.2 Changes of ADC and PAO activities during somatic embryogenesis in *A. officinalis*

水平下降, 另一方面可形成活性氧产物  $H_2O_2$ 。植物多胺降解产生的  $H_2O_2$  参与细胞壁成熟、分化等生理过程(Angelini 等 2008; Cona 等 2006), 为此我们检测了与  $H_2O_2$  清除相关的酶POD及CAT活性。从图3可见, 胚性愈伤组织转移到体胚诱导培养基后, POD活性迅速降低, 之后逐渐回升, 21 d时再降低。POD活性水平低, 分解的  $H_2O_2$  少, 细胞内可以保持相对较高的  $H_2O_2$  水平, 这是对细胞的分裂和增殖有利的。7 d和21 d分别是多细胞胚性细胞团和棒状胚出现期, 伴随着细胞的增殖和分裂形成不同形状的胚胎, POD活性变化的意义可能就在

此。Put处理与不做Put处理之间差异不显著( $F=0.571, P=0.457>0.05$ ), POD酶活性也有同样的变化趋势, 所不同之处在于诱导后14~28 d内其活性变化相对平稳(图3-a)。CAT活性在胚性愈伤组织转移到体胚诱导培养基后到21 d, 均一直上升。21 d后呈现降低趋势, 在28 d下降至最低水平, 此时(胚胎发生中后期)正是细胞分裂和分化的旺盛期, 棒状胚和香蕉胚形成。之后CAT活性继续升高。Put处理与否CAT酶活性差异很小(图3-b), 说明体胚发生过程中CAT活性受外源Put影响很小。

将2种  $H_2O_2$  清除酶联系起来考虑可以看出, 外

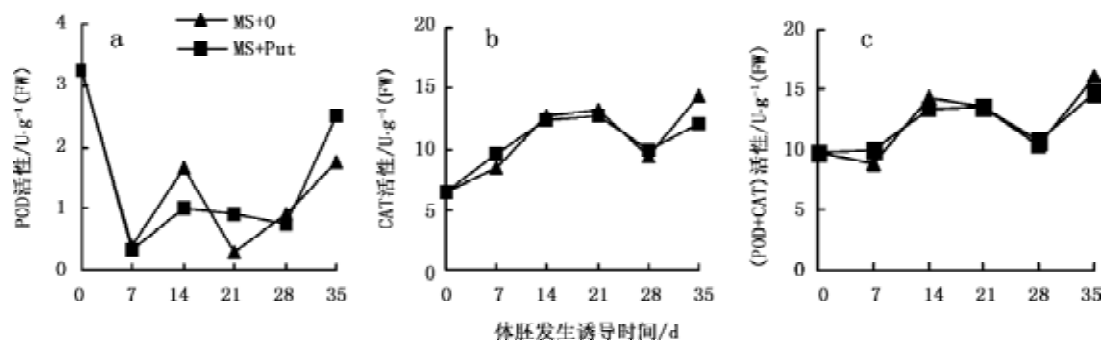


图3 体细胞胚发生过程中POD和CAT活性的变化

Fig.3 Changes of POD and CAT activities during somatic embryogenesis in *A. officinalis*

源Put对  $H_2O_2$  清除酶活性影响很小, 不管Put处理与否, 诱导后的7 d和28 d分别呈现出2个低峰, 14 d和35 d是活性高峰期(图3-c), 而且这种变化趋势与PAO活性变化趋势一致。至于ADC、PAO等多胺氧化酶与CAT及POD等抗氧化酶的关系,

目前未见有系统报道。ADC和PAO等多胺氧化酶可调节多胺的合成降解, 直接调节多胺水平, CAT及POD等抗氧化酶可清除多胺降解产生的  $H_2O_2$ , 它们之间是否还有其他什么关系, 尚待进一步研究。

## 参考文献

- 陈小飞, 萧浪涛, 鲁旭东, 刘素纯(2007). 外源腐胺对石刁柏愈伤组织胚性能力的影响. 植物生理学通讯, 43 (3): 461~464
- 陈小飞, 萧浪涛, 鲁旭东, 童建华(2006). 石刁柏胚性细胞诱导过程中的内源激素和多胺含量变化. 植物生理学通讯, 42 (5): 826~830
- 李正理(1996). 植物组织制片学. 北京: 北京大学出版社
- 刘华英, 萧浪涛, 鲁旭东, 胡家金, 吴顺, 何长征, 邓秀新(2005). 伏令夏橙愈伤组织体细胞胚发生中多胺水平的变化. 植物生理与分子生物学学报, 31 (3): 275~280
- 鲁旭东, 萧浪涛, 刘素纯, 刘华英, 陈小飞(2006). 2,4-D对石刁柏愈伤组织诱导的影响. 安徽农业科学, 34 (21): 5546~5548
- 汪天, 郭世荣, 刘俊, 高洪波(2004). 多胺氧化酶检测方法的改进及其在低氧水培黄瓜根系中的应用. 植物生理学通讯, 40 (3): 358~360
- 杨洪强, 高华君(2007). 植物精氨酸及其代谢产物的生理功能. 植物生理与分子生物学学报, 33 (1): 1~8
- 张志良(1990). 植物生理学实验指导. 第2版. 北京: 高等教育出版社
- 赵福庚, 刘友良(2000). 精氨酸脱羧酶和谷酰胺转移酶活性的测定方法. 植物生理学通讯, 36 (5): 442~445
- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. Trends Plant Sci, 11 (2): 80~88
- Kakkar RK, Sawhney VK (2002). Polyamine research in plants — a changing perspective. Physiol Plant, 116 (3): 281~292
- Santanen A, Simola LK (1994). Catabolism of putrescine and spermidine in embryogenic and non-embryogenic callus lines of *Picea abies*. Physiol Plant, 90 (1): 125~129