

花楸体细胞胚发生过程中抗氧化酶活性的变化

张建瑛, 杨玲, 沈海龙*

东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040

摘要: 花楸体细胞胚发生过程中, 胚性愈伤组织可溶性蛋白含量高于其他类型的愈伤组织, 非胚性愈伤组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性均高于其他类型的愈伤组织; SOD、POD活性均在胚性细胞向球形胚转化时下降, 球形胚向心形胚发育时下降, 心形胚向鱼雷形胚和鱼雷形胚向子叶形胚发育时再升高; CAT活性变化规律与SOD和POD活性变化不同, 从胚性细胞到鱼雷形胚的3个发育时间内表现为下降-升高-下降的趋势, 鱼雷形胚向子叶胚发育时略有回升。据此认为, SOD酶活性降低似可作为花楸胚性细胞分化以及胚胎早期发育的一个判断指标。
关键词: 花楸; 体细胞胚发生; 抗氧化酶活性

Changes of Antioxidative Enzyme Activity in Somatic Embryogenesis of *Sorbus pohuashanensis* Hedl

ZHANG Jian-Ying, YANG Ling, SHEN Hai-Long*

School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: During somatic embryogenesis of *Sorbus pohuashanensis*, the content of soluble protein in embryonic callus was higher than that in other types of calli and the activities of SOD (superoxide dismutase), POD (peroxides) and CAT (catalase) in non-embryonic callus were higher than that in other types of calli; the activities of SOD and POD decreased from embryogenic tissues to globular embryos, decreased from globular embryos to heart-shaped embryos, and increased again from heart-shaped embryos to torpedo embryos and from torpedo embryos to cotyledon embryos. The activity variation pattern of CAT differed from SOD and POD, showed a decrease-increase-decrease pattern during the first 3 stages from embryogenic tissues to torpedo embryos and increased slightly in the last stage from torpedo embryos to cotyledon embryos. Accordingly, SOD activity decreased may be an index of differentiation of embryogenic cells and early development of somatic embryos of *Sorbus pohuashanensis*.

Key words: *Sorbus pohuashanensis*; somatic embryogenesis; antioxidative enzyme activity

影响植物体细胞胚发生的因素有基因型、外植体、植物生长物质、还原性氮盐和外源氨基酸、蔗糖渗透压、活性炭、金属离子、光、活性氧和pH值等内外各种因素(袁澍等2003), 其中活性氧对植物体既有伤害作用也有诱导作用(田敏等2005), 适当浓度的H₂O₂对体细胞胚的发生有很好的诱导作用(崔凯荣等1998), 活性氧还可以诱导多种多肽的合成和引起细胞内Ca²⁺的释放, 从而调控基因的表达(Cui等1999)。植物体内活性氧的生成和清除处于动态平衡之中(Gupta和Datta2003), 这种动态平衡主要是通过过氧化物酶(peroxides, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)等酶系统调节的(崔凯荣和戴若兰2000)。所以抗氧化酶活性变化可以反映活性氧的平衡状态。研

究体细胞胚发生过程中抗氧化酶活性变化, 以了解体细胞胚发生与活性氧平衡的关系, 对人工调控活性氧平衡状态, 控制体细胞胚发生和发育是有意义的。植物体细胞胚发生和发育过程中抗氧化酶活性研究已有些报道(詹园凤等2006; Cui等1999; 王亚馥等1989, 1993; 李付广等1994; 吴家和等1999; 邢更妹等2000; 刘成圣等2002; 杨和平等1992; 臧运祥2004), 但花楸体细胞胚

收稿 2006-12-31 修定 2007-03-12

资助 国家“十一五”科技支撑课题(2006BAD03A04)和东北林业大学校立基金(2005-2007)。

* 通讯作者(E-mail: shenhl-cf@nefu.edu.cn; Tel: 0451-82191044)。

发生发育过程中抗氧化酶活性的研究尚未见报道。本文以花楸未成熟合子胚为外植体诱导的愈伤组织和体细胞胚为材料, 研究其体细胞胚发生过程中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、POD和CAT活性变化及其与体细胞胚发生发育的关系, 从而为建立稳定高效的花楸体细胞胚发生体系建立基础资料。

材料与方法

以MS为基本培养基, 在不同浓度6-BA (6-benzyladenine)和2,4-D (2,4-dichlorophen oxyacetic acid)的组合下诱导花楸(*Sorbus pohuashanensis* Hedl)体细胞胚发生。取暗培养的胚性愈伤组织(黄色、颗粒状、松散)、非胚性愈伤组织(白色或浅黄色、致密)、褐色愈伤组织(经过多次继代胚性愈伤呈现褐色、松散状态)和光(光照16 h/黑暗8 h, 光强 $40\sim 60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)下的绿色愈伤组织以及在体细胞胚分化培养基(MS+0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D, pH=5.8)上培养0 d的胚性愈伤组织、7 d的多细胞原胚和球形胚、14 d的心形胚、21 d的鱼雷形胚和30 d的子叶形胚为材料进行SOD、POD和CAT活性的测定, 并同步测定可溶性蛋白质含量。

样品制备时, 准确称取0.5 g左右上述材料的新鲜样品, 加入5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 7.8)的磷酸缓冲液, 于冰浴中研磨匀浆, 4℃下以 $10\ 000\times g$ 离心20 min, 上清液为粗酶液。可溶性蛋白含量测定用考马斯亮蓝G-250法(李合生2001)。SOD活性测定用NBT光化还原法(李合生2001), POD活性测定用愈创木酚显色方法(Amako等1994), SOD和POD活性均以 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)表示。CAT活性测定参考Beers和Sizer(1952)的紫外分光光度法并加以改进, 酶活性单位以 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白) $\cdot\text{min}^{-1}$ 表示。

数据采用Excel 2003软件进行作图, 用SPSS软件对测定数据进行统计分析。

结果与讨论

1 可溶性蛋白含量变化

如图1和图2所示, (1)暗培养下, 胚性愈伤组织的可溶性蛋白含量显著高于非胚性愈伤组织和经过几次继代的褐色愈伤组织, 光照下绿色愈

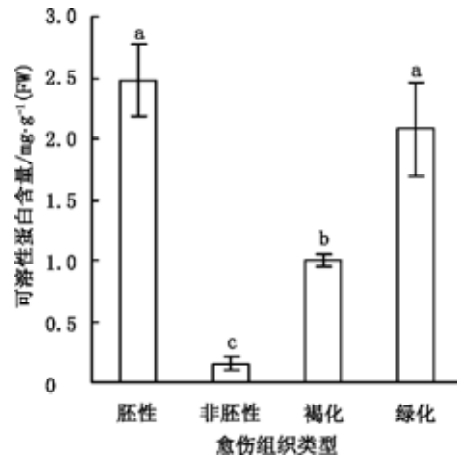


图1 不同类型愈伤组织中可溶性蛋白含量变化
Fig.1 Changes of soluble protein contents in different types of calli

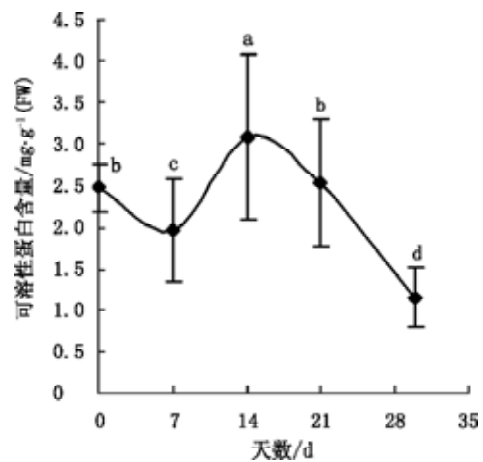


图2 体细胞胚发生过程中可溶性蛋白含量变化
Fig.2 Changes of soluble protein contents during somatic embryogenesis

伤组织的可溶性蛋白含量略低于暗培养下的胚性愈伤组织($P<0.05$)(图1);(2)球形胚(培养7 d)的可溶性蛋白含量低于胚性愈伤组织, 心形胚时期(培养14 d)显著增加, 且高于胚性愈伤组织, 以后随着发育时间的延长可溶性蛋白含量又表现为下降趋势, 子叶形胚时期(培养30 d)达到最低值($P<0.05$)(图2)。

花楸胚性愈伤组织的可溶性蛋白含量显著高于非胚性愈伤组织, 表明前者的代谢比后者活跃, 这与高述民等(2001)和向太和等(1997)的结论一致。球形胚时期(培养7 d)的可溶性蛋白含量低

于胚性愈伤组织,表明胚性细胞的分化和发育过程是极其复杂的。从球形胚时期到心形胚时期,可溶性蛋白含量有所升高,这为体细胞胚的进一步发育提供了物质基础。此后,随着体细胞胚的分化和发育,分化代谢活跃,可溶性蛋白含量下降,至子叶形胚时期,胚的大小接近成熟胚且分化停止,可溶性蛋白含量最低。

2 SOD 酶活性变化

如图3和图4所示(1)光照和黑暗条件下,非胚性愈伤组织中的SOD活性均显著高于其他类型的愈伤组织($P<0.05$),而其他类型愈伤组织之间的SOD活性则相差不大(图3);(2)体细胞胚发生和不同发育时期的体细胞胚SOD活性均有变化

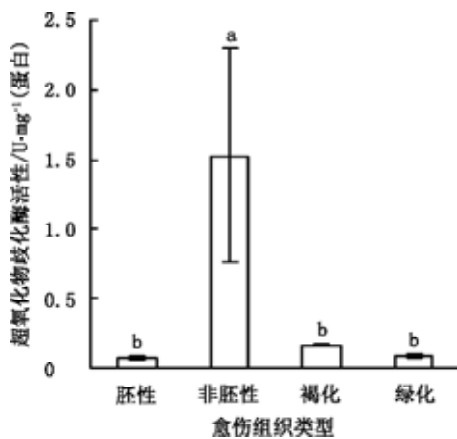


图3 不同类型愈伤组织SOD活性变化

Fig.3 Changes of SOD activity in different types of calli

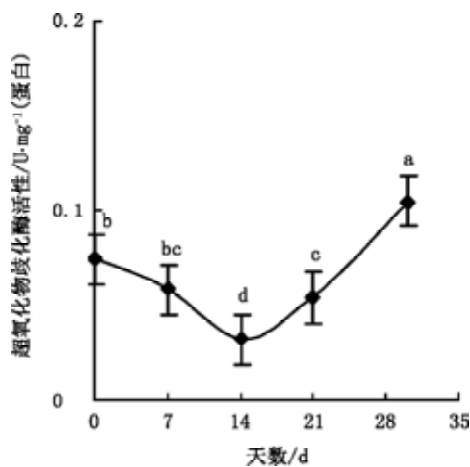


图4 体细胞胚发生过程中SOD活性变化

Fig.4 Changes of SOD activity during somatic embryogenesis

($P<0.05$),随着体细胞胚的出现,SOD活性开始下降,心形胚时期(培养14 d)的SOD活性下降至最低,其后SOD活性持续增加,到子叶胚时期(培养30 d)的SOD活性增加为最高(图4)。

花楸非胚性愈伤组织的SOD活性高于其他类型愈伤组织,说明非胚性愈伤组织的氧自由基含量比较高。在培养过程中,为了诱导细胞的脱分化和再分化,必须在培养基中加入各种激素等物质,而这些物质多为富含氧化还原化合物,这就使细胞可能处于较严重的氧化胁迫中,从而导致愈伤组织丧失分化能力。胚性细胞分裂形成球形胚的过程中SOD活性下降,这提示我们,SOD活性下降似可作为判断花楸胚性细胞分化以及胚胎早期发育的一个指标。

3 POD 酶活性变化

如图5和图6所示(1)不同类型愈伤组织中POD活性的变化规律与SOD相似。在所有的愈伤组织中,非胚性愈伤组织中的POD活性最高,胚性愈伤组织的POD活性最低,前者是后者的58倍。光照下绿色愈伤组织的POD活性高于胚性愈伤组织(图5);(2)在胚性愈伤组织转化为体细胞胚过程中,球形胚(培养7 d)的POD活性下降,至心形胚时期(培养14 d)下降最低,随着体细胞胚的不断发育和分化,鱼雷形胚时期(培养21 d)和子叶形胚时期(培养30 d)时POD活性又回升(图6),但始终低于胚性愈伤组织。

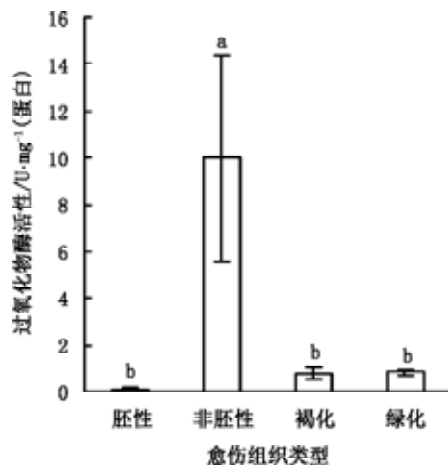


图5 不同类型愈伤组织中POD活性变化

Fig.5 Changes of POD activity in different types of calli

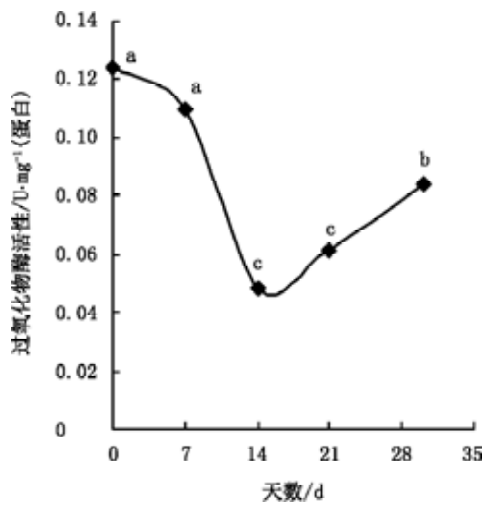


图6 体细胞胚发生过程中POD活性变化

Fig.6 Changes of POD activity during somatic embryogenesis

4 CAT活性变化

如图7和图8所示 (1)暗培养下非胚性愈伤组织的CAT活性显著高于胚性愈伤组织和褐色愈伤组织,是胚性愈伤组织中的17倍,光照下绿色愈伤组织中CAT活性低于暗培养中的胚性愈伤组织的CAT活性,4种愈伤组织之间CAT活性差异显著($P<0.05$)(图7);(2)不同发育时期体细胞胚的CAT活性间差异显著($P<0.05$),胚性愈伤组织转移到分化培养基上后CAT活性开始下降,球形胚时期(培养7 d)至心形胚时期(培养14 d)回升并达到最高,然后急剧下降,鱼雷形时期降到最低,子叶胚期时活性又略有升高(图8)。

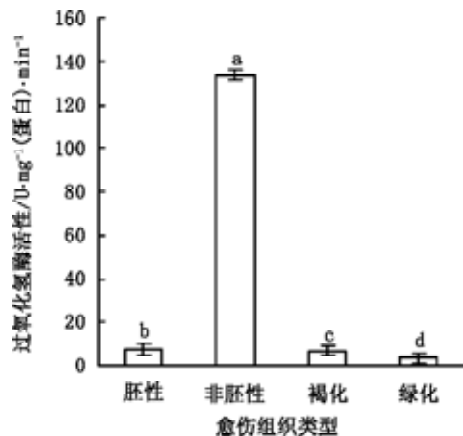


图7 不同类型愈伤组织中CAT活性变化

Fig.7 Changes of CAT activity in different types of calli

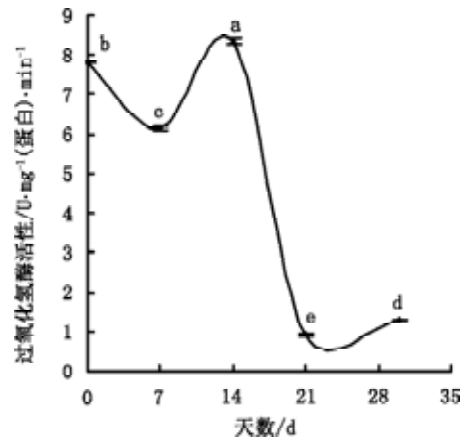


图8 体细胞胚发生过程中CAT活性变化

Fig.8 Changes of CAT activity during somatic embryogenesis

St Clair 等(1994)认为SOD、POD和CAT的活性变化与 O_2 和 H_2O_2 有关系并决定着体细胞胚分化。在枸杞体细胞胚发生中,SOD、POD和CAT相互配合调节胚性细胞的分化和发育(崔凯荣等1998)。本文结果显示,3种抗氧化酶活性在体细胞胚发生中有明显变化,而随着胚性细胞的分化和发育,SOD和POD均表现为先下降后升高这样一个曲线变化且变化趋势基本一致,而CAT活性变化则相反。这提示我们3种抗氧化酶活性与 O_2 和 H_2O_2 的关系可能决定着胚性细胞的分化。

已有报道认为,适当浓度的 H_2O_2 对体细胞胚的发生有很好的诱导作用(崔凯荣等1998),但对其中机制却并不清楚。 H_2O_2 可能作为一种细胞信号传递物质,通过细胞的信号传递系统影响基因的调控表达。从本质上讲,胚性细胞的形成过程也就是细胞的分化过程,这一过程的核心就是基因的差别表达过程,因此 H_2O_2 可能是在分子水平上诱导胚胎发生的(崔凯荣等1998)。关于外源 H_2O_2 和内源 H_2O_2 对花楸体细胞胚发生的影响及其与花楸体细胞胚发生和发育的关系还有待进一步研究。

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.北京:科学出版社,96
 崔凯荣,任红旭,邢更妹,王亚馥(1998).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.兰州大学学报(自然科学版),34(3):93~99
 高述民,陆帼一,杜慧芳(2001).大蒜胚状体发育分化中特异蛋白

- 和某些生理生化变化. 植物生理学通讯, 37 (3): 207~210
- 李付广, 李秀兰, 李凤莲(1994). 棉花体细胞胚胎发生及主要物质生化代谢机制. 河南农业大学学报, 28 (3): 313~316
- 李合生(2001). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 164~261
- 刘成圣, 徐达, 孟祥红, 唐学玺(2002). 苜蓿胚状体的分离及其发育过程中几种酶活性的变化. 武汉大学学报(理学版), 48 (2): 249~252
- 田敏, 饶龙兵, 李纪元(2005). 植物细胞中的活性氧及其生理作用. 植物生理学通讯, 41 (2): 235~241
- 王亚馥, 崔凯荣, 汪丽红, 王仑山(1993). 小麦体细胞胚发生中蛋白质组分和过氧化物酶同工酶的变化. 兰州大学学报(自然科学版), 29 (3): 189~193
- 王亚馥, 王仑山, 陆卫, 逮斌, 安黎哲(1989). 枸杞组织培养中过氧化物酶和可溶性蛋白质的变化. 实验生物学报, 22 (1): 1~4
- 吴家和, 陈志贤, 李淑君, 李燕娥, 焦改丽(1999). 棉花体细胞愈伤组织诱导和增殖期间某些代谢产物的动态变化. 中国棉花, 26 (3): 17~18
- 向太和, 梁海曼, 钟华鑫, 颜秋生, 张雪琴(1997). 水稻胚性悬游细胞系建立过程中生理生化变化. II. 氨基酸、多胺及内源激素的变化. 作物学报, 23 (3): 353~359
- 邢更妹, 李杉, 崔凯荣(2000). 植物体细胞胚发生中抗氧化系统代谢动态和程序性细胞死亡. 生命科学, 12 (5): 214~216
- 杨和平, 程进展, 周吉源, 周子游, 李根昌, 郭爱平(1992). 石刁柏体细胞胚胎发生过程中蛋白质及同工酶变化的研究. 实验生物学报, 25 (1): 17~23
- 袁澍, 贾勇炯, 林宏辉(2003). 诱导植物体细胞胚发生的几个生理因素. 植物生理学通讯, 39 (5): 508~512
- 臧运祥, 郑伟尉, 孙仲序, 达克东(2004). 植物胚状体发生过程中主要代谢产物变化动态研究进展. 山东农业大学学报(自然科学版), 35 (1): 131~136
- 詹园凤, 吴震, 金潇潇, 王广东(2006). 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. 西北植物学报, 26 (9): 1799~1802
- Amako K, Chen GX, Asade K (1994). Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiol*, 35: 497~504
- Beers RF, Sizer IW (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem*, 195: 133~140
- Cui K, Xing G, Liu X, Xing G, Wang Y (1999). Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Sci*, 146: 9~16
- Gupta SD, Datta S (2003). Antioxidant enzyme activities during *in vitro* morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidants on plant regeneration. *Biol Plant*, 47 (2): 179~183
- St Clair DK, Oberley TD, Muse KE, St Clair WH (1994). Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation. *Free Rad Biol Med*, 16: 275~282