

文章编号:1674-7054(2010)01-0045-04

木薯体细胞胚发生过程中抗氧化酶活性变化

王静^{1,2}, 李瑞梅^{1,2}, 郭建春¹

(1. 中国热带农业科学院 生物技术研究所, 热带作物生物技术国家重点实验室, 海南 海口 571101;

2. 海南大学 农学院, 海南 儋州 571737)

摘要:以木薯成熟体胚的子叶胚为外植物诱导的体细胞胚为材料, 研究其体细胞胚发生过程中抗氧化酶活性(SOD, POD, CAT 活性)和过氧化物酶同工酶谱的变化。结果表明, 木薯体细胞胚发生过程中, SOD 活性均在胚性细胞向球形胚转化时下降, 鱼雷形胚和子叶形胚发育时升高; 而 POD 和 CAT 活性呈相反趋势。初步认为, SOD 酶活性降低可作为木薯胚性细胞初期分化和胚胎早期发育的一个判断指标。在木薯胚性细胞发生到分化和成熟过程中, 过氧化物酶同工酶谱带由 5 条上升为 9 条, 其中有 5 种过氧化物酶同工酶稳定出现, 这可能是维持细胞基础代谢的一些基因表达的产物。

关键词: 木薯; 体细胞胚发生; 抗氧化酶活性; 同工酶; 酶谱

中图分类号: S 539

文献标志码: A

所有需氧生物都必须依赖氧才能获得能量和维持生命, 体细胞胚发生必然也有活性氧的参与, 存在活性氧代谢过程。植物体内活性氧的生成和清除处于动态平衡之中^[1], 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^[2]。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^[3-12], 其中崔凯荣等^[2]认为体细胞胚发生及发育是大量酶特异性合成及参与代谢的结果, 他们在研究枸杞体细胞胚发生过程中发现, SOD, POD 和 CAT 相互配合来调节胚性细胞的分化和发育, 这 3 种酶在胚胎发生与发育过程中具有特异性变化, 表明体细胞胚胎发生与超氧化物自由基的清除有关。詹园凤等^[3]发现, 在大蒜体细胞胚胎发生过程中 SOD, POD 和 CAT 活性的变化与胚性愈伤组织的诱导及胚的发育密切相关。同工酶是来源于生物体不同的结构而又能催化同一反应的酶, 是基因表达的次级反应。体细胞胚胎发生是体细胞脱分化, 进而再分化的代谢过程。在这个过程中同工酶也相应地发生变化, 体细胞胚胎发生过程中同工酶的变化在许多植物中已有报道, Coopens 和 Gillis^[13]在研究大麦中发现, 其体细胞胚胎发生过程中过氧化物酶、酯酶和酸性磷酸酯酶同工酶的结合使用可以作为体细胞胚胎发生的标志酶。陈力耕等^[14]、魏琴等^[15]和刘天磊等^[16]分别在柑桔、枸杞和苜蓿的体细胞胚胎发生体系中进行研究, 认为过氧化物酶同工酶可以作为体细胞胚胎发生早期的生化指标。但对木薯体细胞胚发生发育过程中抗氧化酶活性和过氧化物酶同工酶的研究尚未见深入报道; 对木薯体细胞胚发生过程中胚性细胞发生、分化时期的判断标准尚未建立。因此, 本实验以木薯成熟体胚的子叶胚为外植体诱导的体细胞胚为材料, 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和过氧化物酶同工酶酶谱的变化, 从而为建立稳定高效的木薯体细胞胚发生体系提供基础资料。

收稿日期: 2010-02-03

基金项目: 国家 973 重大基础性研究项目(2010CB126600); 国家自然科学基金 30860151; 中央级公益性科研院所基本科研项目 ITBBZD0721; 海南省普通高等学校研究生创新科研课题(Hxwby008-08)共同资助

作者简介: 王静(1982-), 女, 河南安阳人, 海南大学农学院 2007 级硕士研究生。

通信作者: 郭建春, 研究员, E-mail: jianchunguo@163.com, Tel: 0898-66890635.

1 材料与方

1.1 木薯体细胞胚诱导子叶的形成 取华南8号木薯的侧芽、嫩叶、叶耳作为外植体诱导体细胞胚的形成材料,以 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 暗培养,2周后将其继代到新鲜的体细胞胚诱导培养基($\text{MS} + 12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒莠定)上。每2周继代1次,体细胞胚可以通过继代不断增殖。继代2~3次后,将体细胞胚转移到胚成熟培养基(MS)上,以 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, $16 \text{ h} \cdot \text{d}$ 光照培养,诱导胚成熟并产生绿色的子叶为本实验的材料。

取诱导2周的绿色子叶,用解剖刀将其切成约 0.25 cm^2 的小块,把这些小块放到体细胞胚诱导培养基上,诱导体细胞胚发生。取在体细胞胚诱导培养基上培养0 d的外植体、5 d的胚性愈伤组织、10 d的球形胚、20 d的鱼雷形胚和30 d的子叶形胚进行SOD,POD和CAT活性测定。

1.2 生化样品制备 分别准确称取不同发育时期的木薯体胚诱导新鲜材料 0.3 g ,在冰浴上研磨,加入PBS($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液, $\text{pH} 7.8$)缓冲液 1.5 mL ,在冰浴中研磨成匀浆, $16\ 090 \times \text{g}$ 离心 30 min ,取上清液冷藏备用。实验重复3次。

1.3 SOD 酶活性测定 采用NBT光化还原法^[17],以抑制NBT光化还原率达50%的酶量为1个酶活性单位,其结果以鲜质量为 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示。重复3次,取平均值。

1.4 POD 活性测定 采用愈创木酚法,参考陈建勋^[18]的方法进行测定,以每分钟增加0.01个A值为1个活性单位,其结果以鲜质量为 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示。重复3次,取平均值。

1.5 CAT 活性测定 采用过氧化氢还原法,参考陈建勋^[18]方法进行测定,以每分钟减少0.01个A值为1个活性单位,其结果以鲜质量为 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示。重复3次,取平均值。

1.6 过氧化物同工酶分析 采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳^[19]。分离胶的质量分数为10%,浓缩胶的质量分数为5%,胶厚为 1.5 mm 。电泳在 4°C 冰箱中进行。电泳后用联苯胺染色,再用 $\varphi = 7\%$ 的醋酸固定保存,照相,并记录迁移率(Rf值), $\text{Rf} = \text{酶带迁移距离} / \text{溴酚蓝迁移距离}$ 。

2 结果与分析

2.1 体细胞胚发生过程中过氧化物酶活性变化

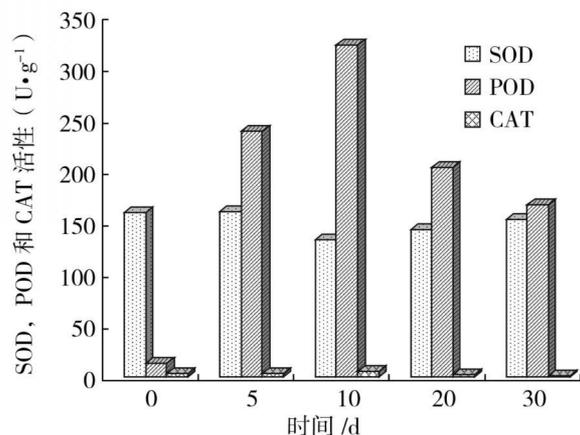
2.1.1 体细胞胚发生过程中 SOD 活性变化 当木薯外植体在体胚诱导培养基上培养5 d时(即胚性愈伤组织时期),SOD活性缓慢上升,球形胚时期急剧下降到最低值,但随着体细胞胚的不断发育和分化,鱼雷形胚时期(培养20 d)和子叶胚时期(培养30 d)时的SOD活性又缓慢上升(见图1)。在胚性细胞分裂形成球形胚的过程中SOD活性下降,似可作为判断木薯胚性细胞早期分化的一个指标。

2.1.2 体细胞胚发生过程中 POD 活性变化

在木薯体胚发生过程中,外植体脱分化早期POD活性迅速上升,球形胚时期达到最大值,但随着体细胞胚的不断发育和分化,鱼雷形胚时期(培养20 d)和子叶形胚时期(培养30 d)时的POD活性则下降(见图1)。这表明POD活性升高对木薯胚性细胞的形成和早期发育有诱导和促进作用。

2.1.3 体细胞胚发生过程中 CAT 活性变化

在木薯体胚发生过程中,外植体转移到诱导培养基后,CAT活性开始下降,球形胚时期(培养10 d)回升并达到最高,然后缓慢下降,子叶形胚时期活性降到最低(见图1)。CAT活性变化趋势与POD活性的基本趋于



0 d 外植体, 5 d 胚性愈伤组织, 10 d 球形胚, 20 d 鱼雷形胚, 30 d 子叶形胚

图1 木薯体细胞胚胎发生过程中SOD,POD和CAT的活性变化

一致,这也说明CAT活性升高对木薯胚性细胞的形成和早期发育有诱导和促进作用。

2.2 体细胞胚发生过程中过氧化物酶同工酶酶谱变化 木薯体细胞胚成熟过程中, POD 同工酶酶谱总的变化趋势是酶的种类增加、酶带变强,其发生初期有 5 条酶带,共出现有 9 条酶带。初期的 5 条酶带 P1 (Rf = 0.078 1)、P2 (Rf = 0.109 3)、P5 (Rf = 0.43 7)、P6 (Rf = 0.468 8) 及 P9 (Rf = 0.625 0) 是它们共有的酶带,发育后期有加强的趋势。球形胚时期(10 d)共 6 条酶带(新增 P8);鱼雷形胚时期(20 d)有 7 条酶带(新增 P7, P8);子叶胚时期(30 d)有 8 条酶带(新增 P3, P4, P7, P8)消失(见图 2)。

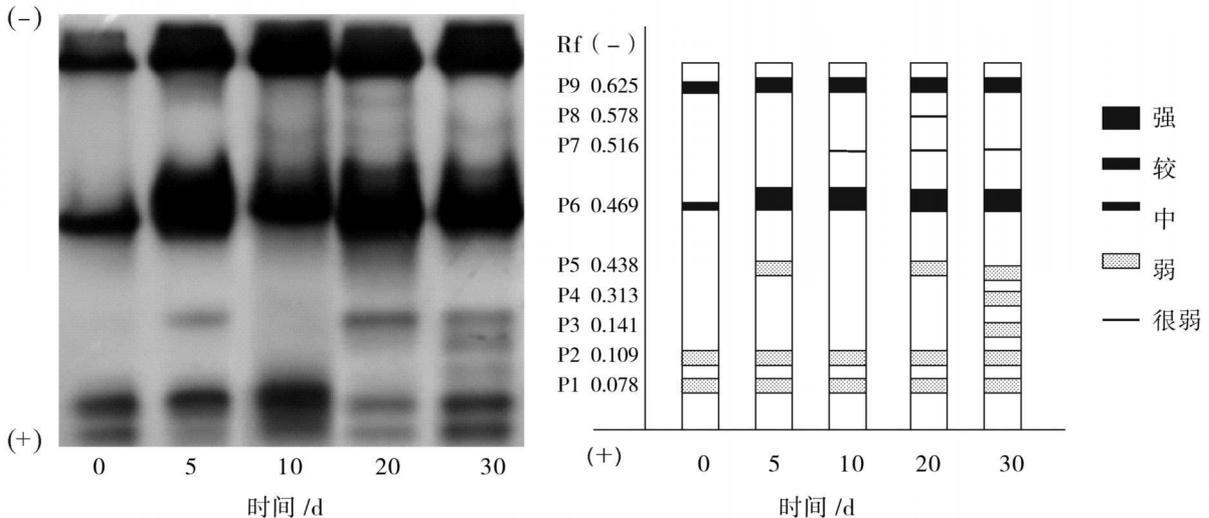


图 2 体细胞胚胎发生过程中超氧化物歧化酶同工酶谱及示意图

3 讨 论

过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)是植物细胞的抗氧化酶,调节活性氧的代谢,参与细胞的分裂和分化,它们的活性改变可影响植物体细胞胚的发生^[20-21]。St Clair 等^[21]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。本研究结果显示,3 种抗氧化酶活性在体细胞胚发生中有明显变化,在木薯胚性细胞的分化时期,POD 和 CAT 均表现为大幅度升高,而在木薯胚性细胞的分化后成熟过程中,它们的活性下降趋势基本一致,而 SOD 活性变化则相反。结果表明,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。崔凯荣等^[20]报道,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,其中 SOD 活性的变化趋势正好与 POD 和 CAT 活性的变化趋势相反,这与本研究结果类似;而杨和平等^[11]报道的在大蒜体细胞胚发生过程中,POD 活性的变化趋势则正好与 SOD 和 CAT 活性的变化趋势相反,这可能是不同作物的体胚发生过程中抗氧化系统的协调方式不同所致。从本研究结果推测,这 3 种酶活性的差异可能与胚性愈伤组织细胞分裂活跃和胚性的维持有关。木薯体胚性细胞形成时期和胚性细胞成熟时期的 SOD 酶活性维持较高水平,而 POD 和 CAT 活性在木薯体胚性细胞分化时期的活性相对较高。高活性的 SOD 必然产生较高水平的 H_2O_2 ,而 H_2O_2 对细胞分裂和分化都有促进作用^[20]。体细胞胚发生过程中,SOD 活性升高,产生较多的 H_2O_2 ,一方面, H_2O_2 可促进体细胞胚的发生,另一方面, H_2O_2 超过一定浓度就起毒害作用。而 POD 和 CAT 活性升高,对于清除过多的 H_2O_2 活性是有利的。这 3 种酶的活性变化使细胞中 H_2O_2 维持在一个适当的水平,既有利于体细胞胚的发生,又不至于对细胞造成伤害。在木薯体细胞发生过程中, H_2O_2 对木薯胚性细胞胚性的维持起一定作用。

在体细胞胚胎发生过程中,几种有关酶的同工酶的特异性表达,在一定程度上反映了体细胞胚胎的发生及发育过程中基因表达的时空顺序性,可作为体细胞胚胎发生的生化标志。如潘有福等^[22]、胡忠等^[23]和翟晓巧等^[24]分别在党参、宁夏枸杞和泡桐的体细胞胚发生体系中进行过研究,发现细胞分化在过

氧化物酶同工酶酶谱变化上都有极其细致的反映,从而推断过氧化物酶同工酶可以作为体细胞胚胎发生过程的分化指标。沈宗英等^[25]在花椰菜中研究表明体细胞胚发生和发育过程中具有较多的过氧化物酶同工酶种类和较高的酶活性,这与本实验结论类似。本实验中,木薯体细胞胚发育过程中,即从球形胚时期到子叶形胚时期的发育阶段的酶谱共出现9条酶带,其中P1, P2, P5, P6和P9为体细胞胚发育各时期的共有酶带,并且P1, P2, P6和P9酶带着色深且酶带较宽,表明这4条酶带对应的同工酶的活性强,它们可能是维持细胞基础代谢的基因表达产物,其余酶带随着体胚的发育而发生变化,酶带的消失和出现与这些发育阶段的形成有关,其中P8酶带是球形胚时期新出现的谱带,P7是鱼雷形胚时期新出现的谱带,P3和P4是子叶形胚时期新出现的谱带,这反映了体细胞胚不同发育阶段的不同生理状态。

参考文献:

- [1] GUPTA S D, DATTA S. Antioxidant enzyme activities during in vitro morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidants on plant regeneration[J]. *Biologia Plantarum*, 2003, 47(2): 179 - 183.
- [2] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 96.
- [3] 詹园凤, 吴震, 金潇潇, 等. 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]. *西北植物学报*, 2006, 26(9): 1799 - 1802.
- [4] CUI K R, XING G S, LIU X M, *et al.* Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L[J]. *Plant Science*, 1999, 146: 9 - 16.
- [5] 王亚馥, 王仑山, 陆卫, 等. 枸杞组织培养中过氧化物酶和可溶性蛋白质的变化[J]. *实验生物学报*, 1989, 22(1): 1 - 4.
- [6] 王亚馥, 崔凯荣, 汪丽红, 等. 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[J]. *兰州大学学报: 自然科学版*, 1993, 29(3): 189 - 193.
- [7] 李付广, 李秀兰, 李凤莲. 棉花体细胞胚胎发生及主要物质生化代谢机制[J]. *河南农业大学学报*, 1994, 28(3): 313 - 316.
- [8] 吴家和, 陈志贤, 李淑君, 等. 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[J]. *中国棉花*, 1999, 26(3): 17 - 18.
- [9] 邢更妹, 李杉, 崔凯荣. 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[J]. *生命科学*, 2000, 12(5): 214 - 216.
- [10] 刘成圣, 徐达, 孟祥红, 等. 苜蓿胚状体的分离及其发育过程中几种酶活性的变化[J]. *武汉大学学报: 理学版*, 2002, 48(2): 249 - 252.
- [11] 杨和平, 程进展, 周吉源, 等. 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[J]. *实验生物学报*, 1992, 25(1): 17 - 23.
- [12] 臧运祥, 郑伟尉, 孙仲序, 等. 植物胚状体发生过程中主要代谢产物变化动态研究进展[J]. *山东农业大学学报: 自然科学版*, 2004, 35(1): 131 - 136.
- [13] COPPENS L, GILLIS E. Soenzyme electrofocusing as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis in callus tissues of *Hrdeum vulgare*[J]. *Journal Plant Physiol*, 1987, 127: 153 - 158.
- [14] 陈力耕, 郑志亮, 胡西琴, 等. 柑桔珠心胚的高频离体诱导及其发生早期的生化标记研究[J]. *浙江农业学报*, 1997, 9(5): 256 - 259.
- [15] 魏琴, 曹有龙, 陈放. 枸杞髓组织培养中体细胞胚胎发生与过氧化物酶同工酶分析[J]. *广西植物*, 2000, 20(2): 168 - 171.
- [16] 刘天磊, 江晓雯, 王仑山. 苜蓿组织培养中球形胚发生时特异蛋白质和同工酶分析[J]. *西北植物学报*, 2002, 22(3): 625 - 628.
- [17] 李合生, 孙群, 赵世杰. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 164 - 194.
- [18] 陈建勋. 植物生理学实验指导[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2002: 120 - 121.
- [19] 何忠效, 张树政. 电泳[M], 北京: 科学出版社, 1999: 37 - 38, 286 - 300.

- [20] 崔凯荣,任红旭,邢更妹,等. 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]. 兰州大学学报:自然科学版,1998,34(3):93-99.
- [21] ST. CLAIR D K, OBERLEY T D, MUSE K E, *et al.* Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1994,16:275-282.
- [22] 潘有福,王仑山,RAJESH K T,等. 党参的体细胞胚发生及不同发育阶段几种同工酶的分析[J]. 西北植物学报,2005,25(1):1-7.
- [23] 胡忠,刘天磊,江晓雯,等. 宁夏枸杞愈伤组织器官发生和体细胞胚发生过程中过氧化物酶和酸性磷酸酶同工酶的研究[J]. 兰州大学学报:自然科学版,2006,36(3):147-153.
- [24] 翟晓巧,张胜,范国强. 泡桐体细胞胚胎发生过程中过氧化物酶的变化[J]. 河南科学,2006,24(1):56-59.
- [25] 沈宗英,沈曾佑,张志良. 花椰菜下胚轴培养过程中过氧化物酶活性及其同工酶谱的变化[J]. 植物生理学报,1985,11(1):17-24.

Changes of Antioxidase Activity in Somatic Embryogenesis of Cassava

WANG Jing^{1,2}, LI Rui-mei^{1,2}, GUO Jian-chun¹

- (1. National Key Laboratory of Tropical Crops Biotechnology, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China;
2. School of Agriculture, Hainan University, Danzhou 571737, China)

Abstract: During somatic embryogenesis of Cassava [*Manihot esculenta* Crantz (*M. utilissima* Pohl)], the activities of SOD (superoxidase) decreased when the embryogenic cells were developing to the globular embryos, while increased when the globular embryos were developing to the cotyledon embryos. However, the activities of POD (peroxidase) and CAT (catalase) showed a reverse trend to that of SOD. It suggested that the decreased SOD activity might be an index of the differentiation of embryogenic cells and early development of embryos in Cassava. During the differentiation and mature of embryogenic cells, the isozyme spectra of POD increased from five to nine, and five of them were stable.

Key words: Cassava; somatic embryogenesis; antioxidative enzyme activity; isozyme; spectra