

红掌叶片离体培养过程中酶活性及可溶性蛋白质含量的变化

夏时云¹, 麦瑜玲², 林书瀚², 吴国智³

(1. 天津市农业生物技术研究中心, 天津 300384;

2. 汕头市中蔬花卉有限公司, 广东 汕头 515041; 3. 天津花圃, 天津 300112)

摘要:以2个红掌品种为材料, 分别采用愈创木酚法、氮兰四唑(NBT)法、考马斯亮蓝比色法分析研究了红掌叶片愈伤组织诱导和植株再生过程中过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)活性及可溶性蛋白质含量的变化。结果表明: POD和SOD在幼嫩叶片内的活性均较低, 粉冠军的POD活性大于亚历桑娜, SOD活性及可溶性蛋白质含量则低于亚历桑娜; 在愈伤组织诱导阶段, POD和SOD活性及可溶性蛋白质含量都达到最高峰值; 在植株再生过程中, 2种酶及可溶性蛋白质含量都开始下降, 亚历桑娜的POD、SOD活性及可溶性蛋白质含量大于粉冠军; 在小苗移栽后, 酶活性及可溶性蛋白质含量均继续下降至较低水平, 尽管POD和SOD活性仍远高于幼嫩叶片, 但可溶性蛋白质含量却低于幼嫩叶片的水平。

关键词: 红掌; 离体培养; 过氧化物酶; 超氧化物歧化酶; 可溶性蛋白质含量

中图分类号: S682.1⁺4; Q55 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)06-0195-04

Study on Peroxidase, Superoxide Dismutase Activity and Soluble Protein Content Changes During Leaf Culture *in vitro* of *Anthurium andraeanum*

XIA Shi-yun¹, MAI Yu-ling², LIN Shu-han², WU Guo-zhi³

(1. Tianjin Agricultural Biotechnology Research Center, Tianjin 300384, China; 2. Shantou Zhongshu Flower Company Ltd, Shantou 515041, China; 3. Tianjin Flower Garden, Tianjin 300112, China)

Abstract: Changes in Peroxidase(POD), Superoxide Dismutase(SOD) activity and soluble protein content during the callus induction and buds differentiation in *Anthurium andraeanum* lind were studied with Guaiacol process, Nitroblue tetrazolium photoreduction method and Coomassie brilliant blue G-250 respectively. The results showed that POD, SOD and soluble protein content had a very high level in young leaves. However, there had a top level during callus induction stage. POD, SOD and soluble protein content start decrease; Activity of POD and SOD of "Arizon" had much higher than that of Pink Champion at the buds differentiation. After the plantlet transplanted, POD and SOD activity and soluble protein content kept low level in the two varieties since POD and SOD activity at this stage had still much higher than that of young leaves, soluble protein content had lower than that of young leaves.

Key words: *Anthurium andraeanum*; *In vitro*; Peroxidase(POD); Superoxide dismutase(SOD) activity; Soluble protein content

红掌(*Anthurium andraeanum*)是著名的热带观赏花卉。自1974年Pierik^[1]离体培养红掌首次取得成功以后, 红掌种苗生产主要通过组织培养进行种苗的快速繁殖。过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)是植物自由基清除系统中两种重要的酶, 广

泛存在于植物体中, 活性较高, 它们与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化等有关系, 在植物生长发育过程中它们的活性不断发生变化, 以调控生物体的代谢。植物外植体细胞应激于切割损伤和离体培养条件而出现脱分化与再分化, 刺激了细胞学上的一

收稿日期: 2007-01-31

基金项目: 广东省汕头投资建设总公司农业与花卉重点专项资助项目(2004-03-05A)

作者简介: 夏时云(1963-), 男, 四川金堂人, 副研究员, 主要从事植物细胞工程技术和观赏花卉植物组织培养技术研究工作。

系列变化^[2]。植物体细胞发生与发育过程中具有较高的 POD 酶活性和较多的同工酶类^[3-6]。自从 Galston 最早研究烟草髓部愈伤组织的分化与过氧化物酶同工酶的关系以来,大量的研究工作进一步表明,外植体的生长、分化始终与过氧化物酶及其同工酶等的变化有关,并且认为,过氧化物酶及其同工酶可作为器官分化的生化指标。可溶性蛋白质是各种酶类的主要成分,测定植物体内可溶性蛋白质含量是研究酶活性、了解植物体总代谢的一个重要指标。因此,分析研究 POD, SOD 活性、可溶性蛋白质含量在红掌叶片离体培养过程中的变化具有十分重要的理论与实践指导意义。

1 材料和方法

1.1 供试材料

试验于 2005-2006 年在天津市农业生物技术研究中心和汕头市中蔬花卉有限公司进行。选用红掌品种亚历桑娜 (Arizona, 图示简称 A) 和粉冠军 (Pink Champion, 图示简称 PC), 以刚展开或未完全展开的幼嫩叶片、发育良好的幼叶愈伤组织、再生的小植株和移栽于基质上的成活小植株为供试材料, 以上材料用预冷的蒸馏水清洗, 吸干表面的水分, 切碎混匀, 用塑料袋包装后置于 -30℃ 冷冻保存, 待测。

1.2 测定方法

1.2.1 酶液提取 将 1 g 材料加入 1 mL 预冷的酶提取介质(0.05 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.8), 冰浴研磨匀浆后, 经 4 层纱布过滤, 定容, 4℃ 条件下 5 000 × g 离心 20 min, 取上清液, 保存于 4℃ 冰箱中, 供测定。

1.2.2 酶活性和可溶性蛋白质含量测定 POD 活性采用愈创木酚比色法测定 470 nm 处的 OD 值, 以每分钟 OD₄₇₀ 变化 0.01 为 1 个活力单位, 酶活性表示为 $\Delta OD_{470} / (\text{min} \cdot \text{g})$ ^[7]; SOD 活性采用 NBT(氯化硝基氮蓝四唑)光化还原法测定, 以抑制 NBT 光化还原 50% 为 1 个酶活性单位(U/g)^[8]; 考马斯亮蓝 G-250 比色法测定可溶性蛋白质含量(mg/g)^[9]。重复 3 次, 取其平均值做统计分析。

2 结果与分析

2.1 POD 活性的变化

从图 1 可看出, 2 个品种在幼叶、愈伤组织及再生植株中 POD 活性变化呈相似的曲线, 即低—高一低的变化过程: 幼叶中 POD 活性较低; 在愈伤组织形成阶段达到最高峰值; 植株再生时 POD 活性开始

大幅度下降, 亚历桑娜的 POD 活性下降非常迅猛, 粉冠军下降较缓慢; 到植株移栽成活后, 植株体内 POD 活性还保持着较高水平。从品种间来看, POD 活性在各阶段也有明显的差异, 除了在愈伤组织形成阶段, 亚历桑娜远高于粉冠军外, 其余 3 个阶段均是粉冠军高于亚历桑娜。

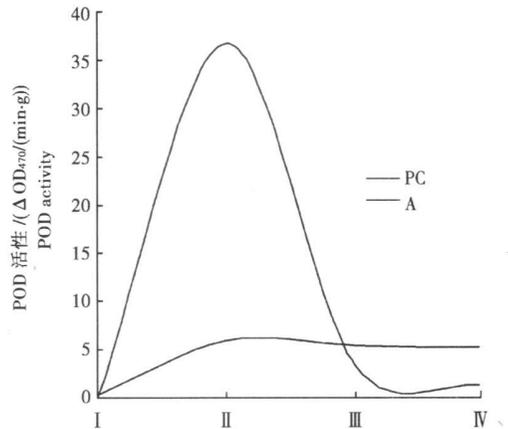


图 1 离体培养不同阶段 POD 活性的变化
I . 红掌幼叶; II . 愈伤组织; III . 再生植株; IV . 移栽植株(余图同)
I . Young leaves; II . Callus; III . Plantlet;
IV . Transplanted plantlet

图 1 离体培养不同阶段 POD 活性的变化

Fig. 1 The change of POD activity at different stages

2.2 SOD 活性的变化

由图 2 可看出, 2 个品种在 4 个不同阶段 SOD 活性的变化与 POD 几乎一样, 也经历了低—高一低的过程。幼叶中 SOD 活性最低, 在亚历桑娜中已无法检测到; 随着愈伤组织诱导形成, 2 个品种的 SOD 活性都达到最高峰值, 亚历桑娜略高于粉冠军; 进入分化再生小植株, 2 个品种的 SOD 活性逐渐缓慢下降, 粉冠军下降幅度更大些, 且粉冠军再生植株中的 SOD 活性低于亚历桑娜; 植株移栽成活后, 2 个品种的 SOD 活性继续下降, 亚历桑娜下降幅度很大, 粉冠军下降较少, 但此时 2 个品种植株体内的 SOD 活性都还保持着较高水平, 是母株幼叶的 49~85 倍。

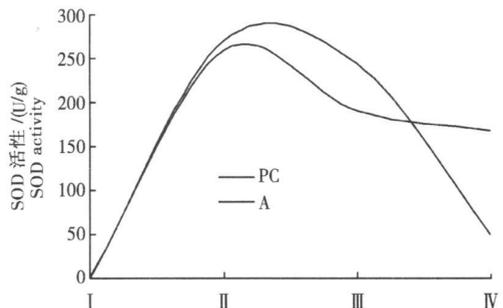


图 2 离体培养不同阶段 SOD 活性的变化

Fig. 2 The change of SOD activity at different stages

2.3 可溶性蛋白质含量的变化

由图 3 可看出, 虽然 2 个品种间在不同培养阶段的可溶性蛋白质含量存在较明显差异, 但随组培

过程的延伸,也基本上呈现出低—高一低的变化趋势。在愈伤组织诱导阶段,可溶性蛋白质含量增加,达到最高峰值,特别是亚历桑娜的可溶性蛋白质含量增加迅猛,相当于幼嫩叶含量的2倍多;到再生植株分化阶段,粉冠军的可溶性蛋白质含量轻微降低,而亚历桑娜则是猛烈下降,其含量仅相当于愈伤组织阶段的30%左右;再生植株移栽后,亚历桑娜含量又轻微回升,粉冠军继续轻微下降至最低水平,并且2个品种的含量都未达到母株幼叶的水平。此外,在整个离体培养阶段,粉冠军的可溶性蛋白质含量变化平缓,幅度很小,含量偏低,特别在愈伤组织阶段仅相当于亚历桑娜含量的1/3。

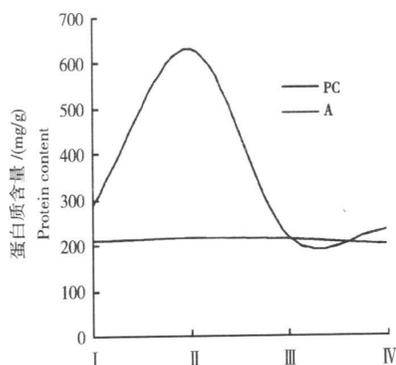


图3 离体培养不同阶段可溶性蛋白质含量的变化

Fig. 3 The change of soluble protein content at different stages

2.4 SOD活性、POD活性、可溶性蛋白质含量间的相关分析

从试验结果还可看出,幼嫩叶片的POD活性与SOD活性之间,除植株再生阶段变化趋势略有不一致外,在其余3个阶段的变化趋势完全一致,POD活性高时,SOD活性也高。

POD活性与可溶性蛋白质含量之间除在愈伤组织诱导阶段变化趋势一致外,其余3个阶段的变化趋势则完全相反,即可溶性蛋白质含量高时,POD活性就低。这可能与脱分化阶段在外源激素的胁迫下,POD活性增强,可溶性蛋白质大量形成;而其余3个阶段POD活性减弱,可溶性蛋白质却并未大量减少有密切关系。

SOD活性与可溶性蛋白质含量之间在愈伤组织诱导和植株再生阶段变化趋势一致,当SOD活性较高时,可溶性蛋白质含量也高。而在幼嫩叶片和移栽成活小植株中,SOD活性与可溶性蛋白质含量间的变化趋势相反。

3 讨论

红掌的幼嫩叶片在离体培养前,体内POD,SOD

活性较弱,可溶性蛋白质含量相对较低。表明在没有外源激素影响下,其生理活动处于较低而稳定的状态。

本研究首次报道了红掌叶片诱导产生愈伤组织时,体内POD,SOD活性和可溶性蛋白质含量均显著上升,达到最高峰值,这可能与脱分化过程中外源激素的胁迫与内源激素的消耗有密切关系,特别是亚历桑娜品种愈伤组织中,不仅含有较多的内源IAA和ABA,ZR,且酶活性和可溶性蛋白质含量也很高,表明脱分化时的生理生化反应十分强烈,不仅需要较高的外源细胞分裂素和生长素,还需较多前提物,才能较好地脱分化获得愈伤组织^[10]。

愈伤组织分化再生植株时,POD,SOD活性和可溶性蛋白质含量开始下降,粉冠军的POD活性高于亚历桑娜,而SOD活性低于亚历桑娜。表明粉冠军在分化培养基中只需保持少量的细胞分裂素和极少量的生长素即可获得较多的植株;而亚历桑娜则需要保持较高的细胞分裂素,这也与作者先前的研究结果是吻合的^[10]。

小苗移栽后,2种酶活性均继续下降至较低水平,尽管POD和SOD活性仍远高于幼嫩叶片,但可溶性蛋白质含量却已低于幼嫩叶片的水平。在品种上,亚历桑娜的POD,SOD活性较低,而可溶性蛋白质含量较高。在近年的试验和大规模生产中,也发现亚历桑娜在移栽前和移栽后的根系特别多;而粉冠军根系相对较少,这可能与其植株内POD,SOD活性较高、可溶性蛋白质含量较低有一定关系,其原因和作用机理尚待进一步研究。

植株内POD,SOD活性较高时,可溶性蛋白质含量就较低,且内源激素也较低。外植体的脱分化和再分化时,不同品种对外源激素要求不同,显然与其内源激素含量、酶活性及可溶性蛋白质含量有密切关系。内源激素含量及其与外源激素的合理调控与平衡,直接影响和调控着植株内POD,SOD活性及可溶性蛋白质含量以及植物生长与发育的方向。

由于红掌在愈伤组织诱导、继代增殖、植株再生的不同阶段,内源激素与植株内POD,SOD活性和可溶性蛋白质含量变化差异很大,品种间也有较明显的差异,因此,应深入地研究植物内源激素和POD,SOD活性和可溶性蛋白质含量在外植体脱分化和分化过程中的动态变化,针对具体品种及不同阶段的需求进行外源激素的调控,以便较快较好地进行脱分化和再分化。

参考文献:

- [1] Pierik R L M. Planflot fomation in callus tissues *Athurium Andraeaonum lind* [J]. *Scientia Horticulturae*, 1974, 2: 193–198.
- [2] Pierik R L M. *Anthurium andraeanum* plantlet proauztd from cultivated *in vitro* [J]. *Physiology Plant*, 1976, 37: 80– 82.
- [3] 林顺权. 细胞工程原理[M] // 林顺权. 园艺植物生物技术, 北京: 高等教育出版社, 2005: 24– 48.
- [4] 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: 92– 101.
- [5] 田国忠, 李怀方, 裘维蕃. 植物过氧化物酶研究进展[J]. *武汉植物学研究*, 2001, 19(4): 332– 344.
- [6] 庄东红, 杜虹. 大白菜子叶培养过程中 POD 同工酶和可溶性蛋白质含量的变化[J]. *汕头大学学报(自然科学版)*, 2002, 17(1): 64– 68.
- [7] 王雨华, 王隆华. 棉胚珠愈伤组织诱导纤维分化初探[J]. *植物生理学通讯*, 1996, 32(3): 186– 188.
- [8] 张志良. 过氧化物酶活性测定(比色法) [M] // 张志良. 植物生理学实验指导, 第2版, 北京: 高等教育出版社, 1991: 154– 155.
- [9] 王爱国, 罗广华. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究[J]. *植物生理学报*, 1983(1): 77– 83.
- [10] 李琳, 焦新之. 应用蛋白染色剂考马斯亮蓝 G-250 测定蛋白质含量的方法[J]. *植物生理学通讯*, 1980, 16(6): 52.
- [11] 夏时云, 麦瑜玲, 许继勇, 等. 红掌叶片离体培养过程中内源激素的变化[J]. *华北农学报*, 2006, 21(3): 16– 18.