

菘蓝试管苗玻璃化过程中抗氧化物酶活性的变化

客绍英^{1,2}, 张胜珍², 刘玉军¹

(1. 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 唐山师范学院 生命科学系, 河北 唐山 063000)

摘要:为明确植物体内抗氧化酶活性变化与组培玻璃苗发生的关系,以菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)正常试管苗和玻璃苗为研究材料,对其抗氧化物酶活性和膜脂质过氧化水平进行了比较分析。结果表明:正常苗和玻璃苗中过氧化物酶(POD)活性随培养时间的延长先降低后升高,过氧化氢酶(CAT)活性先升高后降低,过氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量始终呈上升趋势。同一培养时期,玻璃苗中CAT、SOD活性均低于正常苗,而MDA水平远远高于正常苗。表明组培过程中有氧自由基的胁迫,而玻璃苗细胞内保护酶的调节功能紊乱,从而发生了更严重的脂质过氧化。此外,与正常苗相比,玻璃苗中POD同工酶电泳谱带出现增加、缺失等异常现象,表明玻璃苗中酶的表达失常,遗传稳定性改变。

关键词:菘蓝; 玻璃化; 抗氧化物酶; 丙二醛

中图分类号: S682.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)03-0154-05

The Changes of Antioxidant Enzymes Activity of *Isatis indigotica* Fort. during Vitrification *in vitro*

KE Shao-ying^{1,2}, ZHANG Sheng-zhen², LIU Yu-jun¹

(1. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. Department of Life Sciences, Tangshan Teachers College, Tangshan 063000, China)

Abstract: The normal and vitrified plantlets of *Isatis indigotica* Fort. cultured *in vitro* were experiment materials, the changes of activities of antioxidant enzyme and stress by oxygen free radicals were investigated. The results showed that: in the course of culture of *Isatis indigotica* Fort. shoots, the activity of Peroxidase (POD) in both normal and vitrified shoots increased at first and then decreased. The activity of Catalase (CAT) decreased at first and then increased. The activity of Superoxide dismutase (SOD) and Malondialdehyde (MDA) content were gradually increased. The activities of CAT and SOD in vitrified shoots were lower than those in normal shoots, but MDA levels in vitrified shoots was higher than that in normal shoots. It can be inferred that the function of protective enzymes of vitrified shoots was abnormal, so the vitrified shoots were stressed and destroyed by oxygen free radicals more heavily than normal shoots. In addition, the belts of Peroxidase isozymes of vitrified shoots lost or added compared with normal shoots. This result indicated that the expression of isozymes was abnormal and the hereditary stability of vitrified shoots have changed.

Key words: *Isatis indigotica* Fort.; Vitrification; Antioxidant enzymes; Malondialdehyde

菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)为大青叶、板蓝根的主要来源,有清热解毒、凉血利咽、抗菌抗病毒作用,是一种重要的药用植物^[1],药用量较大,市场紧缺。利用组织培养技术可在短期内快速获得大量可利用的材料,但笔者在对菘蓝进行组培时发现其玻璃化比例较高,给组培快繁带来很大影响。

试管苗玻璃化是组培过程中普遍发生的一种生理病变,其症状为试管苗矮小、茎叶肿胀畸形、组织半透明水浸状。试管苗玻璃化后分化能力低下,难以增殖生根成苗,严重影响组培苗的繁殖率^[2,3]。由于试管苗玻璃化现象的普遍性及危害性,玻璃化发生的原因和防止措施逐渐受到较多的注意和研

收稿日期: 2009-02-02

基金项目: 河北省科技攻关项目(05276416); 唐山市科技攻关项目(03132001A)

作者简介: 客绍英(1968-),女,河北迁安人,教授,硕士,主要从事药用植物学与生物技术方面的研究。

通讯作者: 刘玉军(1962-),男,山东诸城人,教授,博士,博士生导师,主要从事生物技术研究。

究。玻璃苗的解剖学特点、生理生化变化也逐渐被揭示^[4,5]。有证据表明,玻璃苗细胞含水量及丙二醛(MDA)含量均远高于正常苗^[6]。MDA是活性氧自由基攻击生物膜发生膜脂质过氧化的产物之一,可以引起细胞膜的严重破坏,使膜失去正常膨压,造成组织过度吸水,引发玻璃苗的发生^[7]。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等是生物体防御活性氧毒害的保护性酶。王纪方等^[8]对丝石竹玻璃苗生理生化特性进行了研究,认为玻璃化现象的引发与等保护酶的失常密切相关。谢芝馨等^[9]对大葱玻璃苗中抗氧化酶的活性进行了研究,发现SOD、POD、CAT活性均存在异常。但由于材料不同,玻璃苗中抗氧化酶活性变化趋势并不相同,甚至出现相反的结果。本试验对菘蓝正常苗与玻璃苗中SOD、POD、CAT的活性变化进行了研究比较,旨在进一步明确植物体内抗氧化酶活性变化与玻璃苗发生的关系,为玻璃苗的防治提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料及试材培养

以菘蓝种子为外植体接种于1/2MS培养基中。培养7~10 d,在超净工作台上切取上胚轴,转接入继代培养基中,继代培养基为:MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5.5 g/L,pH 5.8。组培苗在培养温度(25±2)℃,光照时间 12

h/d,光照强度 1 500~2 500 lx 的条件下培养。根据菘蓝组培苗外部形态进行分类,共分为正常苗、轻度玻璃化苗、重度玻璃化苗等3类^[10]。

1.2 试验方法

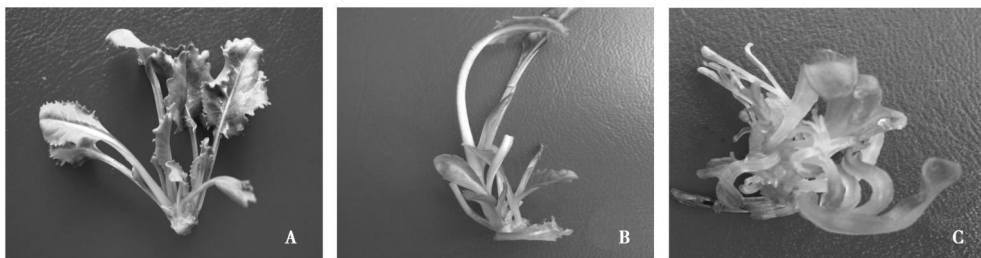
1.2.1 SOD、POD、CAT活性及MDA含量的测定 SOD活性采用氮蓝四唑(NBT)法^[11]测定,POD活性采用愈创木酚法^[11]测定,CAT活性采用紫外吸收法^[11]测定。MDA含量采用硫代巴比妥酸显色法测定^[12]。

1.2.2 POD同工酶的测定 取正常苗、轻度玻璃苗、重度玻璃苗各1.0 g,分别加0.05 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.8,含1%的聚乙烯吡咯烷酮和0.2%乙二醇四乙酸)5 mL,冰浴研磨成匀浆后,13 000 r/min 4℃离心20 min,吸取上清液贮于冰箱备用。采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶(pH 8.9),浓度为7.5%,100 V电压,浓度胶(pH 6.7),浓度为2.5%,150 V电压,醋酸联苯胺染色后观察^[11]。

2 结果与分析

2.1 菘蓝正常苗与玻璃苗主要形态特征

菘蓝正常试管苗生长健壮,茎节间明显,叶片绿色,薄而平展(图1A)。轻度玻璃化苗茎肥大、半透明水浸状,叶片狭小,边缘卷曲半透明,叶色黄绿、白绿或墨绿,茎叶均脆弱易碎(图1B)。重度玻璃化苗植株矮小,茎透明肿胀,无明显的节间,叶片肥厚、扭曲、透明,叶色墨绿,茎叶均脆弱易碎(图1C)。



A. 正常苗; B. 轻度玻璃化苗; C. 重度玻璃化苗。

A. Normal shoots; B. Low-grade vitreous shoots of *Isatis indigotica* Fort.; C. High-grade vitreous shoots.

图1 菘蓝正常试管苗与玻璃苗形态比较

Fig. 1 Comparison of morphology between vitreous shoots and normal shoots of *Isatis indigotica* Fort. cultured in vitro

2.2 菘蓝正常组培苗与不同程度玻璃苗MDA含量的比较

MDA作为氧自由基攻击生物膜,发生脂质过氧化反应的产物之一,是膜脂质过氧化伤害的内在生理指标。由图2A可见,无论正常的组培苗还是玻璃苗,MDA水平都随培养时间的延长而升高,而且玻璃苗的MDA含量(以鲜质量计)远远高于正常苗。说明菘蓝组培苗在培养条件下有过量的氧自由基的胁迫,发生了脂质过氧化伤害,而且玻璃苗的脂质过

氧化伤害程度远比正常苗严重。

2.3 菘蓝正常苗和玻璃苗中SOD、POD、CAT活性的差异

SOD是植物体内清除自由基最关键的保护酶之一,主要催化超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)发生歧化作用生成分子氧和 H_2O_2 ,以消除毒性较大的自由基 $\cdot\text{O}_2^-$ 的毒害^[13]。由图2B可以看出,无论在正常苗还是玻璃苗中SOD活性(以鲜质量计)都随着培养时间的延长而呈上升趋势,升高幅度依次为:重度玻

璃化苗> 轻度玻璃化苗正常苗,表明在组培过程中有某种胁迫因素存在,使试管苗的氧自由基代谢不平衡而积累了过量氧自由基,激发了SOD活性的升高,与正常苗相比,玻璃苗SOD活性升幅较大,表明

玻璃苗受到了更严重的胁迫。此外,在同一培养时间下,正常苗SOD活性远高于轻度玻璃化苗和重度玻璃化苗,表明正常试管苗清除自由基能力远远高于玻璃化苗,因而尚能维持氧自由基代谢的平衡。

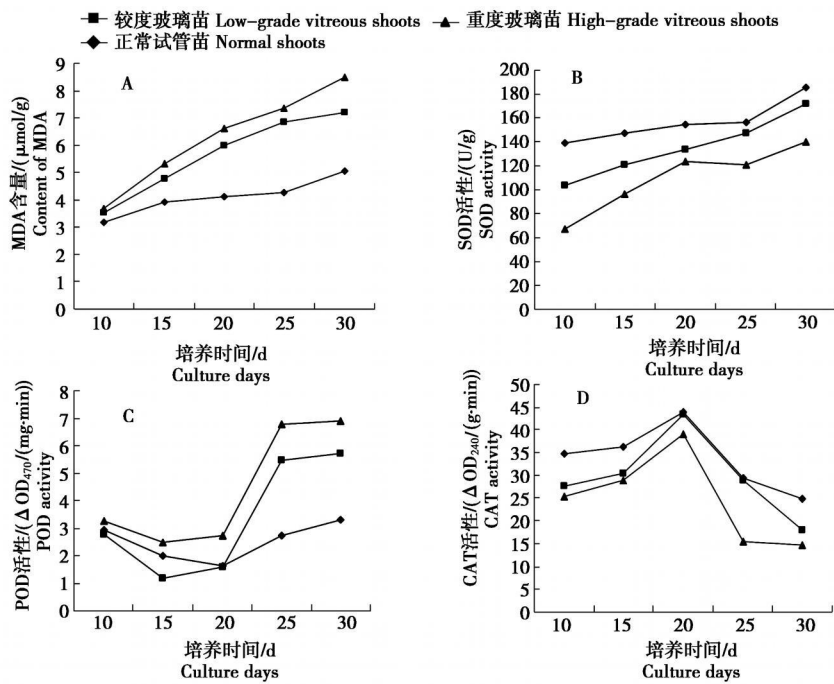


图2 菰蓝正常苗与玻璃苗不同培养时期MDA含量(A)与SOD(B)、POD(C)、CAT活性(D)的变化
Fig. 2 The change of MDA contents(A) and activities of SOD(B), POD(C), CAT(D) in vitrified and normal shoots during micropropagation of *Isatis indigotica* Fort

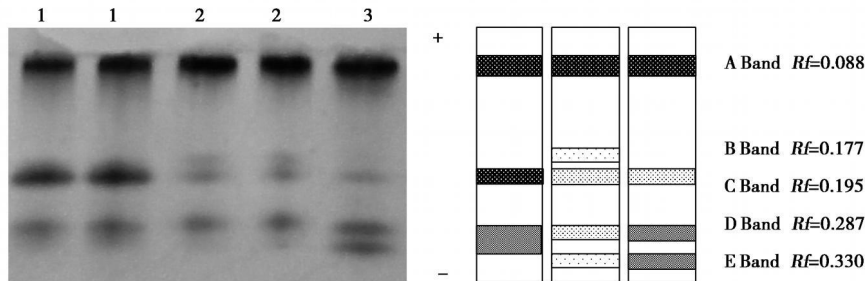
POD和CAT可以清除H₂O₂使之转化为H₂O,另外还具有减少氧化力更强的·OH生成的作用,因而在抗氧化胁迫中具有重要作用。由图2-C可知,随培养时间的延长,菰蓝正常苗、轻度玻璃苗和重度玻璃苗中POD活性(以鲜质量计)均大致呈现先降低后升高的趋势,但正常苗POD活性前后变化不大,而轻度玻璃苗和重度玻璃苗POD活性则表现为先小幅下降,而后大幅上升。在同一培养时期,POD活性大致为玻璃苗>正常苗。

计)呈先升高而后降低的趋势,与POD活性变化趋势完全相反。三种材料中,正常苗CAT活性升降幅度最小,轻度玻璃苗次之,重度玻璃苗变化最大。在同一培养时期,CAT活性表现为正常苗>玻璃苗,与POD活性变化也呈相反趋势。玻璃苗中POD、CAT活性剧烈变化,且变化趋势相反,表明玻璃苗中保护酶系统的调节功能可能已发生紊乱。

2.4 过氧化物酶同工酶谱的分析

由图2-D可知,随培养时间的延长,菰蓝正常苗、轻度玻璃苗和重度玻璃苗CAT活性(以鲜质量

量)可以看出,正常苗、轻度玻璃化苗和重度玻璃化苗在酶带数量、带型宽窄、酶带颜色深浅等方面均存在明显差异。菰蓝正常苗有A、C、D、E 4条酶



1. 轻度玻璃化苗; 2. 重度玻璃化苗; 3. 正常苗。
1. Low-grade vitreous shoots; 2. High-grade vitreous shoots; 3. Normal shoots.
图3 菰蓝正常组培苗与玻璃苗POD同工酶电泳比较
Fig. 3 Comparison of POD isozyme between normal and vitrified shoots of *Isatis indigotica* Fort. cultured in vitro

带,其 R_f 分别 0.088, 0.195, 0.287 和 0.330。轻度玻璃化苗与正常苗相比, E 谱带缺失, 此外 C, D 酶带较宽, 且 C 谱带颜色明显深于正常苗中相应谱带。重度玻璃化苗除 A 酶带与正常苗相似外, 其余酶带均出现较大差异, 即 C, D, E 酶带的减弱及 B 酶带($R_f = 0.177$)的增加。

3 讨论

3.1 玻璃化现象与 POD、SOD、CAT 活性的关系

植物能通过多种途径产生各种活性氧。在正常生理条件下, 植物体内的活性氧不足以使植物受到伤害, 因为植物在长期进化过程中形成了一个完善的清除活性氧的保护酶系统(主要包括 CAT、POD 和 SOD), 使活性氧的产生与清除维持在一个动态平衡状态^[13]。而当植物遇到胁迫等逆境及衰老时, 这种平衡即遭到破坏, 活性氧产生加快, 清除系统的功能降低, 这些都致使活性氧在体内积累从而导致生理代谢功能紊乱, 产生一些不适于植物生长的因子, 影响植物细胞和组织形态发生的进行^[14]。在植物组织培养过程中常有一些不符合植物生长要求的因素, 例如激素浓度、水分状况、光照及温度等条件的不适, 从而使组培苗处于各种不适合的“微环境”因子的胁迫中, 其体内活性氧的产生不可避免。如果试管苗保护酶系统活性较强, 能把试管苗体内的活性氧及时清除, 则组培苗的外部形态及内部代谢不会受到影响, 仍表现为正常苗。但当活性氧的积累量过多, 超过生物体内在的防御能力时, 氧自由基就会进攻膜系统而发生膜脂质过氧化, 使生物膜受到伤害, 并伴随乙烯、MDA 等有害物质的产生, 这些物质反过来又加重膜损伤, 导致生物膜透性增加, 蛋白质、核酸等生物大分子失活, 最终使试管苗畸形生长, 产生玻璃化现象^[15]。

SOD、POD、CAT 在活性氧清除过程中虽然各自的作用不同, 但三者协调一致使植物氧自由基维持在一个低水平上, 才能防止自由基对植物细胞的伤害^[16]。而本试验菘蓝组培苗在培养过程中 SOD、POD、CAT 活性变化并不一致。随培养时间的延长, 正常组培苗和玻璃化组培苗中 SOD 活性均呈上升趋势; POD 活性先降低后大幅升高, 而 CAT 活性变化与 POD 趋势相反, 呈先升高后降低的趋势。对于同一培养时期的试管苗来说, 玻璃苗中 POD 活性高于正常苗而 SOD、CAT 活性却低于正常苗。这说明细胞内保护酶活性的调节出现了不同步的现象, 而细胞内保护酶调节的不同步通常是细胞调节功能紊乱的表现。说明玻璃苗虽然表面上仍然没有死亡的

迹象, 但其细胞内保护系统的调节功能已经发生了紊乱^[17]。

就组培过程中正常苗与玻璃苗 SOD、POD、CAT 活性变化幅度来看, 正常苗变化幅度均较小, 而玻璃苗中酶活性均发生了剧烈变化。已有研究表明 SOD、POD、CAT 均为诱导酶, 逆境条件下自由基的产生可诱导其活性的升高^[18], 正常苗中 SOD、POD、CAT 活性变化幅度均较小, 而玻璃苗中酶活性变化幅度大, 表明玻璃苗在组培过程中受到的胁迫程度要远远高于正常苗, 有更多的自由基的产生。MDA 作为氧自由基攻击生物膜、发生膜脂质过氧化反应的产物之一, 可作为膜脂质过氧化伤害的内在生理指标。本试验对 MDA 检测结果为: 重度玻璃化苗 MDA 含量高于轻度玻璃化苗, 轻度玻璃化苗又高于正常苗。此结果进一步证明了玻璃苗中确实发生了严重的膜脂质过氧化伤害, 并引起了生物膜的严重破坏, 使膜失去正常膨压, 组织吸水失控, 从而使玻璃苗表现茎叶肿胀现象。这与赵剑等^[7]的研究结果是一致的。

3.2 玻璃化现象与 POD 同工酶的关系

同工酶是催化相同反应而结构及理化性质不同的酶分子, POD 同工酶则是一族充当 H_2O_2 氧化供氧体的同工酶。在高等植物体内编码 POD 同工酶的基因有 40 多个, 而各种内因(激素、离子调控)和外因(胁迫、衰老)均可作用于同工酶基因的表达, 基因表达产物的差异最终反映在化学组成和功能各异的各种同工酶的形成上^[19]。本试验结果表明菘蓝正常组培苗和玻璃苗的 POD 同工酶种类存在明显不同。其他植物中也有类似现象。例如谢芝馨等^[9]发现大葱玻璃苗中 POD 和酯酶同工酶谱带均出现了增加、缺失等现象。贾炜珑等^[6]也发现康乃馨玻璃苗酯酶同工酶谱带比正常苗丢失 4~5 条。分析以上现象产生的原因可能为: 玻璃化现象是生长因子不平衡的产物。在一定范围内植物可以适应培养条件的不适宜状况, 但超过一定范围, 则可引起基因功能活动的改造即关闭一个基因位点或打开另一个基因位点, 发生或加强一种同工酶的合成, 完全或局部停止另一种同工酶的合成^[20]。玻璃苗与正常苗中同工酶数量及种类的差别表明玻璃苗在基因的表达和调控上出现了异常^[8]。

参考文献:

- [1] 崔树玉, 薛原, 杨建莉. 板蓝根研究进展[J]. 中草药, 2001, 32(7): 670-671.
- [2] 梁海曼, 周菊华. 试管苗玻璃化现象的生理生化和机理探讨[J]. 武汉植物学研究, 1994, 12(3): 281-286.

- [3] 李娅莉,张 健,潘远智. 观赏植物组织培养过程中玻璃化现象与解决措施进展[J]. 四川农业大学学报, 2004, 22(3) : 278– 280.
- [4] 韦梅琴,唐 蓉,沈宁东,等. 香石竹试管正常苗和玻璃化苗茎叶的解剖特征比较[J]. 青海大学学报: 自然科学版, 1997, 15(1) : 18– 21.
- [5] 李 云,田砚亭,罗小芳. 玻璃苗中纤维素、木素及元素含量变化的研究[J]. 农业学报, 1997, 11(1) : 103– 111.
- [6] 贾炜琰,周小梅,杨丽莉,等. 康乃馨玻璃苗生理生化探讨[J]. 山西大学学报: 自然科学版, 1997, 20(2) : 228– 231.
- [7] 赵 剑,杨文杰. 梨芽离体快繁过程中玻璃苗的发生与氧自由基胁迫的关系[J]. 西北植物学报, 1998, 18(2) : 183– 189.
- [8] 王纪方,李锡香,贾春兰. 丝石竹玻璃苗生理特性和形成机理初探[J]. 农业生物技术学报, 1997, 1(5) : 72– 78.
- [9] 谢芝馨,张玉喜,于元杰,等. 大葱试管苗玻璃化机理的探讨[J]. 分子植物育种, 2004, 2(1) : 71– 75.
- [10] 李 云,田砚挺,罗晓芳. 珠美海棠试管苗玻璃化发生机理的初步研究[J]. 北京林业大学学报, 1996, 18(1) : 52– 58.
- [11] 王学奎,张文华,郝再彬. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 167– 182, 270– 271.
- [12] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 260– 261.
- [13] Chen Zhe-liang, Zhu Yong-guan. Capillary gel electrophoretic separation of superoxide dismutase in leaf extracts of *Triticum aestivum* L [J]. Phytochemical Analysis, 2000, 11: 362– 365.
- [14] Veneta Kapchina-Toteva, Elena Yakimova. Effect of purine and phenylurea cytokinins on peroxidase activity in relation to apical dominance of *in vitro* cultivated *Rosa hybrida* L. [J]. Bulg J Plant Physiol, 1997, 23(1– 2) : 40– 48.
- [15] 李 胜,李 唯,杨德龙,等. 植物试管苗玻璃化现象研究进展[J]. 甘肃农业大学学报, 2003, 3(1) : 1– 16.
- [16] 孙国荣,彭永臻,阎秀峰,等. 干旱胁迫对白桦实生苗保护酶活性及脂质过氧化作用的影响[J]. 林业科学, 2003, 39(1) : 165– 167.
- [17] 宋关玲,侯文华,汪群慧,等. 低温对青萍生长及保护酶活性影响的研究[J]. 环境科学研究, 2004, 17(增刊) : 45– 48.
- [18] 武敬亮,田桂香,孙 敏. 盐碱胁迫和 SNP 对黄连膜脂过氧化及保护酶活性的影响[J]. 浙江林业科技, 2006, 26(5) : 5– 10.
- [19] 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.
- [20] 张淑改,齐力旺,时宝凌,等. 满天星玻璃苗的酯酶和过氧化物酶研究[J]. 山西农业科学, 1999, 27(2) : 68– 70.