

黄瓜雌核发育早期过氧化物同工酶活性的变化

王晓云¹, 杜胜利², 曹翠玲¹, 魏爱民², 韩毅科², 张桂华²

(1. 西北农林科技大学, 陕西 杨凌 712100; 2. 天津科润黄瓜研究所, 天津 300192)

摘要:以离体培养的黄瓜未受精子房为试材, 测定了黄瓜离体雌核发育早期过氧化物酶及其同工酶的活性。结果表明, 在培养的 0~9 d, 总的过氧化物酶(POD)、NADH 氧化酶(NADHPOD)和生长素氧化酶(IAAO)活性均呈上升趋势; 细胞色素氧化酶(COX)、抗坏血酸氧化酶(ASP)活性均呈下降趋势; 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)则先升后降。雌核发育早期过氧化物酶及其同工酶活性, 尤其是 NADHPOD 和 GSH-Px 活性的急剧升高是雌核发育的重要标志。

关键词: 黄瓜; 雌核发育; 过氧化物酶; 同工酶; 离体培养

中图分类号: Q554.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2004)04-0055-04

Activities of Peroxidase and Its Isoenzymes in Early Stage of Cucumber Gynogenesis

WANG Xiao-yun¹, DU Sheng-li², CAO Cui-ling¹, WEI Ai-min², HAN Yi-ke², ZHANG Gui-hua²

(1. Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China;

2. Tianjin Kernel Cucumber Research Institute, Tianjin 300192, China)

Abstract: Peroxidase and its isoenzymes activities were measured in gynogenesis of cucumber ovary cultured for 0-9 days. The results showed that the activities of total peroxidase (POD), NADH peroxidase (NADH-POD), indole-3-acetic acid peroxidase (IAAO) were all increasing markedly. While cytochrome peroxidase (COX) and ascorbate peroxidase (ASP) always decreased. And glutathione peroxidase (GSH-Px) increased first, then decreased. These results indicated that it was signs of cucumber gynogenesis that activities of total peroxidase and its isoenzymes, especially NADHPOD and GSH-Px increased surprisingly.

Key words: Cucumber; Gynogenesis; Peroxidase; Isoenzymes; Isolated culture

离体雌核发育是指通过子房或胚珠的离体培养, 诱导大孢子或雌配子体产生单倍体植株的过程。在育种上, 可以通过该途径在短期内产生绝对纯合的自交系, 大大缩短育种时间; 还可以用来固定亲本性, 获得更稳定、均一的亲本。国内外对子房或胚珠的离体培养进行了大量研究^[1], 主要集中在诱导技术体系的建立和优化上, 如培养基成分和培养方法等, 进一步的深入研究也主要涉及雌核发育的细胞形态学变化, 而有关离体雌核发育机制的生理生化变化则研究较少。杜胜利等^[2]对黄瓜离体雌核

发育过程的形态学和生理生化机制进行了大量的研究, 发现在 M99 培养基上的黄瓜未受精子房发生着典型的雌核发育, 显微观察发现在培养 6 d 时就有 20% 的胚囊内形成致密的团状结构, 是由胚囊内细胞多次分裂形成, 形成植株后通过染色体倍性鉴定发现为单倍体植株; 总的过氧化物酶(POD)活性在培养的前 6 d 急剧上升。植物体细胞胚胎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]。关于黄瓜离体雌核发育中过氧化物同工酶, 如生长素氧化酶(IAAO)、NADH 氧化酶(NADH-

收稿日期: 2004-03-10

基金项目: 天津市农业生物技术研究中心科技(攻关)计划项目(003122011)

作者简介: 王晓云(1975-), 女, 山东菏泽人, 在读硕士, 主要从事植物生理研究; 杜胜利为通讯作者。

POD)、细胞色素氧化酶(COX)、抗坏血酸氧化酶(ASP)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等酶的活性变化尚未见报道。本试验通过测定黄瓜离体雌核发育和非雌核发育培养前9 d的过氧化物酶及其同工酶活性,探讨过氧化物酶及其同工酶在雌核发育早期的作用,进一步研究雌核发育的发生机制。

1 材料和方法

1.1 材料

试验于2003年春季在天津科润黄瓜研究所进行。选用雌核发育频率较好的黄瓜三号品系种植于温室,取开花前1~2 d的子房,经表面灭菌后纵切,接种在能诱导黄瓜未受精子房进行雌核发育的M99培养基上,25℃,黑暗培养7 d,然后转至16 h光照、8 h黑暗条件下继续培养。分别取培养0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 d的外植体,用预冷的蒸馏水清洗,吸干表面的水分,切碎,混匀,准确称取1 g,用塑料小袋包装后迅速置于-70℃保存,供提取粗酶液之用。

1.2 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(50 mmol/L磷酸缓冲液),冰浴研磨至匀浆,4℃条件下10 000 g离心30 min后,取上清液,保存于4℃冰箱中,供酶活性测定。

1.2.2 酶活性测定 POD和IAAO活性测定参照张志良的方法^[4],NADHPOD活性测定参照曹翠玲的方法^[5],COX活性测定参照王异星的方法^[6],ASP活性测定采用沈文飏的方法^[7],GSH-Px测定采用黄爱纛的方法^[8]。

2 结果与分析

2.1 POD活性的变化

本试验表明,在培养基上培养的黄瓜未受精子房内,POD活性(图1)在前2 d上升较慢,2 d后急剧上升,说明较高的POD活性有利于雌核发育的启动,至第6 d开始下降。这可能与POD在植物细胞内参与木质化、IAA分解及能量代谢、呼吸代谢等多种生理功能密切相关。这一结果与杜胜利等^[2]的研究结果一致。

2.2 NADHPOD活性的变化

在培养的前4 d,NADHPOD活性变化一直呈急剧上升趋势,4 d后上升缓慢,6 d后又迅速上升(图2)。NADHPOD是与氧自由基的产生、呼吸和

能量代谢有关的一类过氧化物同工酶,NADHPOD活性的急剧升高,一方面可能会导致组织细胞内大量的氧自由基产生,直接启动脂质过氧化,使质膜透性增大,损伤细胞的结构;另一方面也会抑制糖酵解产生能量,降低外植体的生理活动强度,从而导致组织衰老,对胚囊形成生理隔离,因此有利于雌核发育。

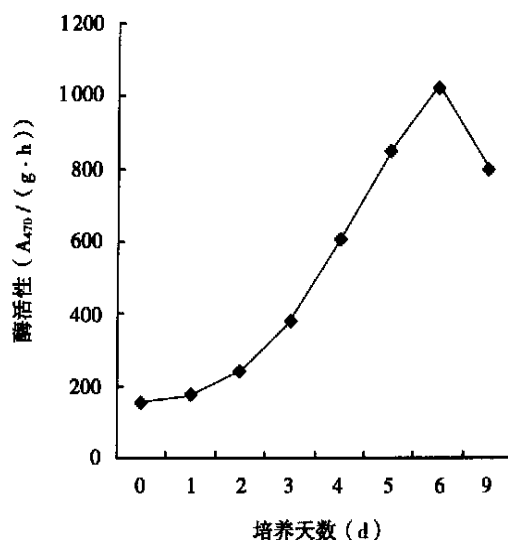


图1 POD活性变化

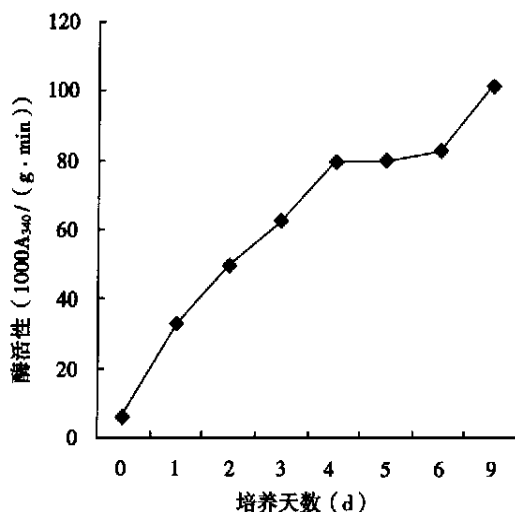


图2 NADHPOD活性变化

2.3 GSH-Px活性变化

GSH-Px活性(图3)在培养1 d后迅速上升,第3 d达到最高峰后稍有下降,在第5 d后一直呈迅速下降趋势。GSH-Px作为过氧化物酶的一种同工酶,具有清除细胞内自由基和保护细胞膜及大分子结构的功能,在黄瓜雌核发育过程中,GSH-Px活性变化可能与外植体的 H_2O_2 含量有关。

2.4 IAAO活性变化

IAAO活性(图4)在培养的前2 d迅速升高,至

第 9 d IAAO 活性一直保持明显高于初始水平。IAAO 的主要作用是氧化分解 IAA, 降低 IAA 含量, 由此推测较高的 IAAO 活性有利于雌核发育的发生。这与韩碧文^[13]认为生长素往往对细胞的胚胎发生起抑制作用的观点相一致。杜胜利等^[2]测定了雌核发育与非雌核发育过程中的内源 IAA 含量, 其变化趋势同样说明离体雌核发育的发生不需要太多的 IAA, 而较高的 IAA 含量反而会刺激珠被细胞的增生。

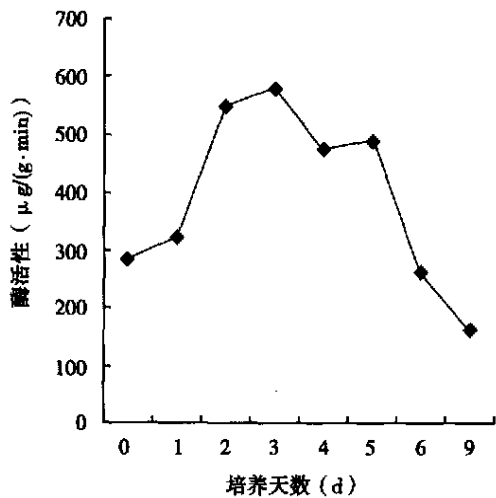


图 3 GSH-Px 活性变化

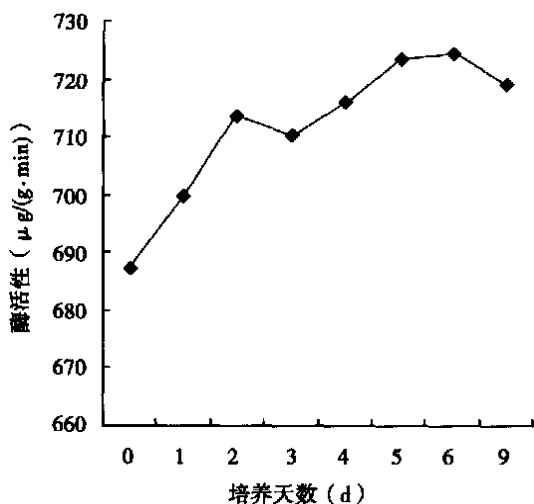


图 4 IAAO 活性变化

2.5 COX 活性变化

COX 存在于线粒体中, 是植物体内最重要的末端氧化酶, 其活性强弱可以反应外植体呼吸代谢的变化。在 9 d 的培养期内, 黄瓜未受精子房的 COX 活性呈波动式下降趋势 (图 5), 说明供试外植体的呼吸代谢强度减弱。

2.6 ASP 活性变化

ASP 是存在于叶绿体和细胞质中的另一种末

端氧化酶, 其活性不仅反应了外植体呼吸代谢状况, 还与植物受精过程有关, 有利于胚珠发育。测定结果表明, ASP 活性 (图 6) 在外植体培养第 1 d 即急剧下降至最低点, 后趋于平缓。ASP 活性降低, 一方面可能是由于叶绿体数量下降, 不再进行光合作用; 一方面可能因为黄瓜子房脱分化, 胚珠没有受精作用, 胚珠不再继续原来的发育方向。

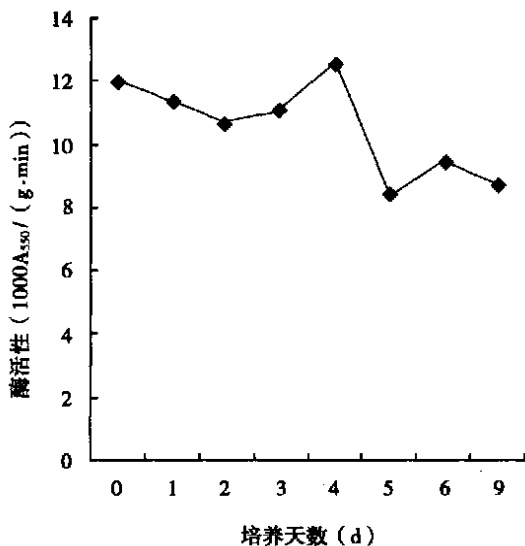


图 5 COX 活性变化

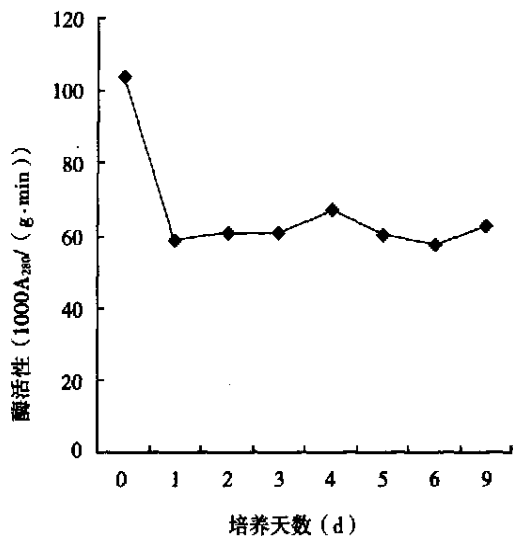


图 6 ASP 活性变化

3 讨论

过氧化物酶是植物细胞内的重要组成成分, 具有成分和结构的复杂性、同工酶的多样性以及多基因编码等特点, 在植物的生长发育中具有多种非常重要的生理功能。庄东红^[9]等研究发现, 在大白菜子叶离体培养脱分化、再分化过程中, 过氧化物酶活性呈上升趋势, 过氧化物酶同工酶带增多, 表明外植

体的形态变化与生理变化紧密相关。我们的试验结果表明,在雌核发育的外植体内的 POD 和 NADH-POD, GSH-Px 两种同工酶活性均高于非雌核发育的外植体。在培养的 1~5 d 是雌核发育的启动和决定时期,在这期间,由于诱导培养基的差异导致外植体内各种代谢活动的差异,尤其在培养的前 3 d,过氧化物同工酶活性特别是 NADH-POD 和 GSH-Px 活性的急剧升高是雌核发育的重要标志。

关于过氧化物同工酶的作用机制,崔凯荣等^[3]认为,较高水平的氧胁迫可诱导植物体细胞胚发生相关基因的表达,从而促进细胞的分化。质膜上的氧化还原酶类可以经电子传递产生氧化剂或还原剂提供给特殊的细胞功能。位于质膜外侧的过氧化物酶、NADH 氧化酶及多胺氧化酶等都可以产生 H_2O_2 。过多的活性氧对细胞是有害的,细胞对活性氧的反应是受其促进还是被其抑制,取决于细胞的氧自由基防御系统,如谷胱甘肽过氧化物酶的水平^[10]。因此,过氧化物同工酶既有产生活性氧的作用,又有清除氧自由基的功能。笔者认为 POD 活性通过调节外植体内活性氧的含量,诱导雌核发育相关基因的表达, NADH-POD 和 GSH-Px 在活性氧的生成和清除中发挥了重要作用。对于雌核发育的启动和决定与 H_2O_2 浓度的关系有待于进一步的研究。

越来越多的研究表明,过氧化物酶活性与组织的衰老呈正相关^[1]。POD 在木质素合成的最后一步中,通过催化 H_2O_2 分解而使木质素单体发生聚和反应形成木质素,提高组织木质化程度,从而促进组织的衰老。我们的研究也发现,在培养的前 9 d,外植体内胚珠周围的薄壁组织中过氧化物酶增多,随着胚囊内的性细胞分裂形成原胚的发生过程,周围组织木质化加深,走向衰老。Steward^[12]研究了胡萝卜体细胞胚胎发生过程,认为生理隔离是分化的前提条件。韩碧文^[13]总结体细胞胚胎发生的研究结果,认为细胞要表现出胚胎发生的潜力,与其邻近细胞隔离开,保持相对独立是必要的,至少在胚状体发育早期是如此。但这种生理隔离只是相对的,

在体细胞胚发生与发育过程中,必须从周围的细胞中取得营养、能量和激素等^[3]。由此看来,离体雌核发育和体细胞胚胎的发生与发育具有相似的生理生化机制。

参考文献:

- [1] 杨弘远,周 嫦. 植物有性生殖实验研究四十年[M]. 武汉: 武汉大学出版社,2000. 195- 285.
- [2] 杜胜利,韩毅科,魏爱民,等. 黄瓜雌核发育的过程及其早期生化变化研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2003, 36(2): 27- 30.
- [3] 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.
- [4] 张志良. 过氧化物酶活性测定(比色法)[A]. 见: 张志良. 植物生理学实验指导[M]. (第二版). 北京: 高等教育出版社, 1991. 154- 155.
- [5] 曹翠玲,高俊凤. 小麦根质膜氧化还原系统及其对水分胁迫的反映(简报)[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(2): 106- 110.
- [6] 王异星,李明启. 光对豌豆细胞色素氧化酶活性的影响(简报)[J]. 热带亚热带植物学报, 1998, 6(1): 78- 80.
- [7] 沈文飏,徐朗莱,叶茂柄. 抗坏血酸过氧化物酶活性测定的探讨[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(3): 203- 205.
- [8] 黄爱纍,吴珍龄. 水稻谷胱甘肽过氧化物酶的测定法[J]. 西南农业大学学报, 1999, 21(4): 324- 327.
- [9] 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.
- [10] 孙 玉,陈 枷. 植物细胞质膜氧化还原系统与信号转导[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(3): 161- 167.
- [11] 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.
- [12] Steward F C, Mapes M O, Mears K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells[J]. Amer J Botany, 1958, 45: 705- 708.
- [13] 韩碧文. 胚状体发生的细胞学和生理生化研究[J]. 植物学通报, 1989, 6(1): 1- 4.