

# 栓皮栎胚性和非胚性愈伤组织抗氧化酶的研究

辛福梅, 张存旭\*, 王 红

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

**摘 要:**以诱导产生的栓皮栎不同基因型的胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织为材料,对其过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)活性及同工酶谱型进行了研究。结果表明:胚性愈伤组织中抗氧化酶活性均明显高于非胚性愈伤组织。不同基因型的胚性愈伤组织或非胚性愈伤组织的抗氧化酶活性之间差异不显著,但同一基因型的胚性和非胚性愈伤组织之间均存在极显著差异。不同抗氧化酶同工酶谱具有特异性,且显示与酶活性一致的变化趋势。

**关键词:**栓皮栎;愈伤组织;抗氧化酶

**中图分类号:**S792.189

**文献标识码:**A

**文章编号:**1001-7461(2007)03-0067-04

## Antioxides Characteristics of Embryogenic Callus and Non-embryogenic Callus in *Quercus variabilis*

XIN Fu-mei, ZHANG Cun-xu WANG Hong

(College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Callus were induced from three different genotypes of immature zygotic embryos in *Quercus variabilis*. The activities and isozyme phenotypes of catalase (CAT), peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) of embryogenic callus and non-embryogenic callus were examined. The results showed that all antioxidants enzyme activities of embryogenic callus were clearly higher than those of non-embryogenic callus. Differences of the activities of embryogenic callus or non-embryogenic callus among different genotypes were not significant. However, contrary appeared in activities of same genotype in embryogenic callus and non-embryogenic callus. Different antioxidants had special isozyme phenotypes. The patterns were corresponding with their activities.

**Key words:** *Quercus variabilis*; callus; antioxidants

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)是植物中重要的抗氧化酶类,它们能够清除植物体内因受外界损伤而产生的活性氧,并在愈伤组织诱导及抗病过程中发挥作用<sup>[1]</sup>。抗氧化酶常作为植物生理代谢活动的指标酶,其活性的变化在一定程度上反映出外植体生理代谢水平的变化<sup>[2]</sup>。通过研究栓皮栎体胚诱导过程中产生的胚性愈伤组织与非胚性愈伤组织内的抗氧化酶活性及同工酶谱的差异,旨在探索栓皮栎体细胞胚胎发生的生理生化基础,为进一步揭示其再生机理、建立完善的栓皮栎体胚再生植株体系提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2005年7月上旬,在陕西省周至县楼观台镇紫云殿东侧栓皮栎天然林的同一林分中选择胸径一致,株距50 m以上的3株优树,采集未成熟果实,用塑料袋分装带回实验室,保存于4℃冰箱内,备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 愈伤组织的诱导** 接种前用修枝剪剥去壳斗,取出完整小坚果,用自来水冲洗2 h后,先放入70%的酒精中浸泡30 s,然后在0.1%氯化汞中消

收稿日期:2006-08-20 修回日期:2006-09-29

基金项目:国家林业局“948”项目(2006-4-54);西北农林科技大学植物遗传育种专项(05YZ039)

作者简介:辛福梅(1981-),女,甘肃武威人,在读硕士,主要从事林木遗传育种和林木生物技术研究工作。

\* 通讯作者:张存旭。

毒 15~20 min,最后用无菌水冲洗 3~5 次,无菌条件下用解剖刀剥取种子后,再剥去膜质的种皮,以全胚根向下接种于诱导培养基上(MS 基本培养+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PVP)<sup>[4]</sup>。每瓶接外植体 3 个,3 个基因型共接 240 瓶,遮光培养,温度  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 。培养 25 d 后,根据颜色、形态、质地特征区别胚性和非胚性愈伤组织,并进行抗氧化酶活性测定及同工酶电泳。

**1.2.2 过氧化氢酶活性测定** 采用紫外吸光法测定。称取胚性和非胚性愈伤组织各 0.1 g,放入预冷的研钵中,加入 1 mL 预冷的提取介质( $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH7.0 磷酸缓冲液),在冰浴下研磨成匀浆,再加入 0.5 mL 提取介质冲洗合并,使终体积为 1.5 mL,摇匀后在  $4^\circ\text{C}$ 、 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心 10 min,上清液即为粗提酶液,可用于过氧化氢酶活性测定。具体测定参照高俊风<sup>[6]</sup>的方法。用过氧化氢作为反应液进行活性测定,以每分钟吸光度变化值表示酶活性大小( $0.1 \Delta A \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ),质量为鲜重。

**1.2.3 过氧化物酶活性测定** 采用愈创木酚法测定。提取介质为  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾,离心条件为  $4^\circ\text{C}$ 、 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、20 min,其余粗酶液提取的方法步骤同过氧化氢酶。测定方法参照张志良愈创木酚法<sup>[5]</sup>。用愈创木酚作为反应液进行活性测定,以每分钟吸光度变化值表示酶活性大小( $0.01 \Delta A \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )。

**1.2.4 超氧化物歧化酶活性的测定** 采用紫外吸光法测定。提取介质为磷酸缓冲液( $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH7.0,含 1% PVP), $4^\circ\text{C}$  下  $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,其余粗酶液提取的方法步骤同过氧化氢酶。具体测定参照高俊风<sup>[6]</sup>的方法,用 Met、NBT、核黄素等作为反应液进行活性测定。以 NBT 的光化还原反应抑制到对照水平时所需的酶量表示酶活性大小( $\text{u} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )。

**1.2.5 同工酶电泳** 同工酶酶液提取时,将各抗氧化酶活性测定时所用提取介质与 40%蔗糖按体积比为 1:1 混合作为提取介质,取样量 0.1 g,冰浴下研磨成匀浆,在  $0^\circ\text{C}$ 、 $8\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下离心 10 min,取上清液备用。同工酶测定采用聚丙烯酰胺垂直凝胶电泳,10%的分离胶与 4%的浓缩胶制板。分离胶缓冲液为 pH8.9 的 Tris-HCl,浓缩胶缓冲液为 pH6.7 的 Tris-HCl,电极缓冲液为 pH8.3 的 Tris-甘氨酸。进样量每孔  $30 \mu\text{L}$ ,以体积分数为 0.01% 的溴酚兰作为前沿指示剂。电泳时先在 100 V 恒压下

电泳 1 h,然后在 200 V 恒压下电泳直到前沿指示剂距底部 1~2 cm 时结束。电泳时必须接通冷凝装置以保持低温,并且环境温度不超过  $15^\circ\text{C}$ 。POD 酶染色用醋酸联苯胺法;CAT 染色用过氧化氢—碘化钾染色法;SOD 染色参照罗光华的 Beauchamp 方法<sup>[7]</sup>,略有改动。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织的诱导

将未成熟的合子胚接种,3 d 后外植体萌动,2 片子叶微微分开,后逐渐膨大,胚轴伸长。一周后在伸长的胚轴上有白色半透明或无色透明早期体胚以及颗粒状愈伤组织形成。2 周后,有部分直接由体胚发育至子叶期,早期形成的透明或半透明愈伤组织逐渐变为不透明状,呈白色或黄色,生长速度较快。25 d 左右可明显区分不同类型的愈伤组织。胚性愈伤组织色泽浅黄或乳白,质地较疏松,表面光滑湿润,呈有光泽的颗粒状或块状;非胚性愈伤组织为米黄色或者淡黄绿色,质地较硬,表面粗糙干燥呈无光泽的瘤状。

### 2.2 抗氧化物活性

接种于培养基上的外植体,25 d 后产生大量可明显区分的不同类型的愈伤组织,分别基因型取具有明显胚性和非胚性愈伤组织特征的材料进行抗氧化活性测定。从表 1 可以看出,同一基因型内栓皮栎胚性愈伤组织中过氧化氢酶活性明显高于非胚性愈伤组织,其活性大小约为非胚性愈伤组织的十倍;而不同基因型的同一类愈伤组织的活性无明显差异。方差分析表明,不同基因型的愈伤组织其过氧化氢酶活性无显著差异,而同一基因型的不同愈伤组织之间差异极显著。在同一基因型内,栓皮栎胚性愈伤组织中过氧化物酶活性同样高于非胚性愈伤组织,其活性大小为非胚性愈伤组织中的 100 多倍;而不同基因型的同一类愈伤组织其活性值之间的差异依然很小。研究表明,不同基因型的愈伤组织,其过氧化氢酶活性无显著差异,而同一基因型的不同愈伤组织之间差异极显著。同一基因型内,超氧化物歧化酶活性表现为胚性愈伤组织仍明显高于非胚性愈伤组织,其活性为非胚性愈伤组织中的 2 倍多;而不同基因型的同一类愈伤组织其酶活性并无明显差异。方差分析表明,不同基因型的愈伤组织超氧化物歧化酶活性无显著差异,而同一基因型的不同愈伤组织之间差异极显著。

表 1 栓皮栎愈伤组织抗氧化酶活性特征值<sup>①</sup>  
Table 1 The mean values of antioxidants activity in *Quercus variabilis* callus

基因型	愈伤组织类型	CAT 活性值	POD 活性值	SOD 活性值
1#	胚性	0.148a±0.001	2.013a±0.002	201.34a±0.02
	非胚性	0.017b±0.002	0.018b±0.001	91.21b±0.01
2#	胚性	0.137a±0.002	2.044a±0.001	199.00a±0.01
	非胚性	0.018b±0.001	0.019b±0.003	87.75b±0.03
3#	胚性	0.145a±0.002	1.985a±0.003	203.51a±0.01
	非胚性	0.015b±0.002	0.019b±0.002	90.52b±0.02

①相同字母表示差异不显著( $P<0.05$ )。

**2.3 抗氧化酶同工酶谱分析**

取已培养 25 d 的愈伤组织作为材料,提样后进行电泳。从图 1 可以看出,栓皮栎胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织 POD 同工酶谱有明显不同,胚性愈伤组织有 3 条酶带,其  $R_f$  分别为 0.81、0.83、0.88;非胚性愈伤组织有 2 条酶带,其  $R_f$  值为 0.81、0.83。两种愈伤组织有 2 条共有酶带  $A_2$  ( $R_f=0.83$ )和  $A_3$  ( $R_f=0.81$ ),但是共有的酶带有强弱之分,胚性颜色较重,表明其活性较强。栓皮栎胚性愈伤组织的 SOD 同工酶有 2 条酶带, $R_f$  值分别为 0.85和 0.89(图 2);胚性愈伤组织的 CAT 同工酶也有 2 条酶带, $R_f$  为 0.85、0.96(图 3)。但 CAT 和 SOD 酶非胚性愈伤组织几乎不显带,可能是其活性过小所致。以上检测结果均与测定的栓皮栎胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织抗氧化酶活性一致。

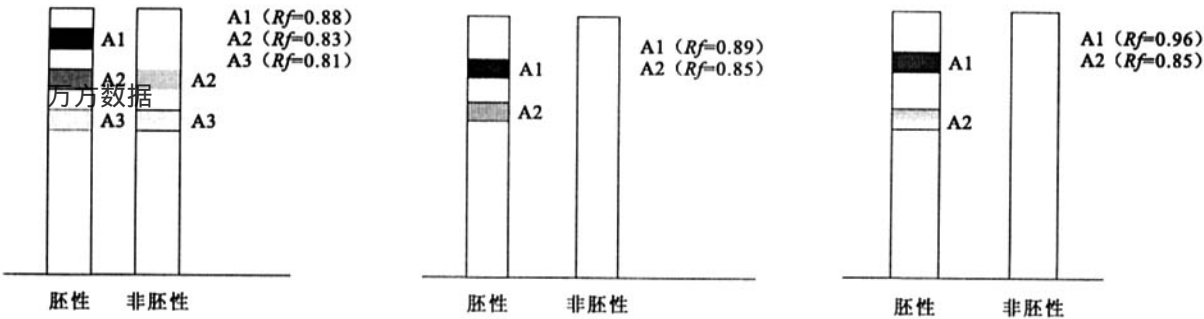


图 1 过氧化物酶同工酶谱型  
Fig. 1 The isozyme phenotypes of peroxidase

图 2 超氧化物歧化酶同工酶谱型  
Fig. 2 The isozyme phenotypes of superoxide dismutase

图 3 过氧化氢酶同工酶谱型  
Fig. 3 The isozyme phenotypes of catalase

3 结论与讨论

栓皮栎胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织在颜色、质地、形态方面有很明显的差异。进一步研究发现,胚性愈伤组织在转入无激素培养基后可以分化出大量体胚;非胚性愈伤组织一般由合子胚萌发形成的幼根膨大并愈伤化而形成,虽然增殖较快但在进一步的实验中发现这类愈伤组织中仅有少量体胚产生。两类愈伤组织形态、结构的差异可能是其组织内物质代谢变化的结果,可以直观的反映细胞分裂和分化方式的不同。

由于过氧化物酶及其同工酶与 IAA 活性、木质素的形成以及能量代谢和呼吸代谢密切相关,因此研究报道较多。在小麦和石刁柏的体细胞胚发生和发育的各个时期,过氧化物酶活性均高于对照,而且过氧化物酶同工酶谱上均有新的酶带出现<sup>[3]</sup>。推

测在体细胞胚发生过程中需要更多的能量和较大的呼吸强度,而过氧化物酶正是与能量和呼吸代谢密切相关的酶,因此认为过氧化物酶在体细胞胚发生过程中起着重要的作用。Kochba 等在柑桔的研究中已观察到胚性愈伤组织中过氧化物酶同工酶的活性强于非胚性愈伤组织<sup>[9]</sup>。一些实验证明,过氧化物酶活性越高,其抗逆性越强。过氧化氢酶属于以铁卟啉为辅基的酶类,广泛存在于植物组织中,其催化  $H_2O_2$  分解成  $H_2O$  和  $O^{-2}$ ,这样可避免  $H_2O_2$  在体内积累,具有解毒作用<sup>[2]</sup>。在枸杞的体胚发生中,还发现超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶等几种抗氧化酶活性在体胚发生和发育过程中特异性变化,表明体细胞胚发生也与活性氧的清除有关<sup>[8]</sup>。总之,过氧化氢酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶在植物体内协同作用,对植物体内氧代谢所产生的  $O^2$ 、 $H_2O_2$  进行分解,使体内自由基的产生和消除处于动

态平衡<sup>[2]</sup>。本实验结果表明,胚性愈伤组织中过氧化氢酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶的活性均高于非胚性愈伤组织,说明胚性愈伤组织细胞的适应性、抗逆性强于非胚性愈伤组织,为下一步体细胞胚胎的产生创造了有利的条件。

同工酶的多种分子形式的时间特异性和组织特异性在植物中普遍存在,植物体内各种酶的同工酶酶谱随着细胞分化、组织器官及植株的生长、成熟而发生规律性的变化。这种变化在一定程度上反映了植物在发育过程中基因表达的时空顺序性,因而同工酶的酶谱特征可以作为植物组织培养的一种生化指标。胚性和非胚性愈伤组织不但在形态及细胞学上有一定差异,在同工酶水平上也存在一定差异。同工酶电泳发现,胚性愈伤组织的过氧化氢酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶同工酶酶带较非胚性愈伤组织多且着色较深,这与各个酶活性测定结果一致。总之,胚性和非胚性愈伤组织在酶带数目或酶活性上都存在明显的差异,因此,在同工酶水平上区分两类愈伤组织,从而寻找与体细胞胚胎发生潜能有关的分子标记是可能的。

#### (上接第44页)

中大量积累则有利于叶绿素的合成<sup>[11]</sup>。在中性盐胁迫下,确实证实了这一点,但在碱性盐胁迫时脯氨酸与叶绿素的相关性并不明显。可见,在植物抗盐生理研究方面单以 NaCl 为研究对象并不是十分准确,在今后的研究中应该突出混合盐碱对植物的影响,因为植物的抗盐性状是一个由多基因控制的数量性状<sup>[18]</sup>,这也决定了抗盐机理的复杂性。

#### 参考文献:

- [1] 刘友良,汪良驹.植物对盐胁迫的反应和耐盐性[A].见:余叔文,汤章城.植物生理与分子生物学[C].第3版.北京:科学出版社,1998.752-769.
- [2] 刘友良,毛才良,汪良驹.植物耐盐性研究进展[J].植物生理学通讯,1987(4):1-7.
- [3] Cheesman J M. Mechanism of salinity tolerance in plants[J]. Plant Physiol., 1988, 87: 547-550.
- [4] 王素平,郭世荣.盐胁迫对黄瓜幼苗叶片光合色素含量的影响[J].江西农业大学学报,2006,1(2):32-37.
- [5] 王萍.中性盐和碱性盐对羊草幼苗胁迫的研究[J].草业科学,1994,3(2):37-42.
- [6] 尹尚军,石德成,颜宏.碱胁迫下星星草的主要胁迫反应[J].草业学报,2003,4(12):51-57.
- [7] 李存桢,刘小京.盐胁迫对盐地碱蓬种子萌发及幼苗生长的影响[J].中国农学通报,2005,21(5):209-212.
- [8] 李玉明.混合盐碱胁迫对高粱幼苗的影响[J].杂粮作物,2002,

#### 参考文献:

- [1] 田秀明,杜利峰.棉花对枯萎病的抗性与过氧化物酶活性的关系[J].植物病理学报,1991,21(2):94-98.
- [2] 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,2002,24(2):356-362.
- [3] 王亚馥,崔凯荣,汪丽虹.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,1993,29(3):189-193.
- [4] 张存旭,姚增玉.柃属植物体细胞胚胎发生研究现状[J].西北植物学报,2004,24(2):356-362.
- [5] 张志良.植物生理学实验指导[M].北京:科学技术出版社,1997.
- [6] 高俊凤主编.植物生理学实验技术[M].西安:世界图书出版公司,2000.
- [7] 罗光华,王爱国.植物的凝胶电泳及活性的染色[J].植物生理学通讯,1983,12(6):44-45.
- [8] 崔凯荣,任红旭,刑更妹,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.
- [9] Kochba J, Lavee S, Spiegel R P. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic 'Shamouti' orange ovular callus lines[J]. Plant Cell Physiol, 1977, 18(2): 463-467.
- [9] 曹福亮.中国南方主要造林树种耐盐耐旱机理研究[M].北京:中国林业出版社,1993.
- [10] 龚明,丁念诚,贺子义.盐胁迫下大麦和小麦叶片膜脂过氧化伤害与超微结构变化的关系[J].植物学报,1989,31(11):841-846.
- [11] 董晓霞,赵树慧,孔令安.苇状羊茅盐胁迫下生理效应的研究[J].草业科学,1998,15(5):10-13.
- [12] 吴永波,薛建辉.盐胁迫对3种白蜡幼苗生长与光合作用的影响[J].南京林业大学学报,2002,26(3):19-22.
- [13] 汪贵斌,曹福亮.盐胁迫对落羽杉生理及生长的影响[J].南京林业大学学报,2003,27(3):11-14.
- [14] 惠红霞.宁夏干旱地区盐胁迫下枸杞光合生理特性及耐盐性研究[J].中国农学通报,2002,18(5):29-34.
- [15] 马焕成,王沙生,蒋湘宁.盐胁迫下胡杨的光合和生长响应[J].西南林学院学报,1998,18(1):33-41.
- [16] Rao G G, Rao G R L. Pigment composition and chlorophyllase activity in pigment pea and Gingelly under NaCl salinity[J]. Indian Journal Experimental Biology, 1986, 19: 768-770.
- [17] Stroganov P. Structure and function of plant cells under salinity[M]. Moscow Nauka, 1970.
- [18] 许祥明,叶和春,李国凤.植物抗盐机理的研究进展[J].应用与环境生物学报,2000,6(4):379-387.
- [19] 杨淑慎,高俊凤,李学俊.高等植物叶片的衰老[M].西北植物学报,2001,21(6):1271-1277.
- [20] 赵可夫.植物抗盐生理[M].北京:中国科学技术出版社,1993.78-80.