

栓皮栎胚性和非胚性愈伤组织生化特性研究

孟 姣,张存旭*,孙 琳,戎旭旭

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

摘 要:植物体细胞胚胎发生是一个复杂的过程,为进一步揭示胚性愈伤组织诱导的潜在能力,以栓皮栎未成熟合子胚诱导产生的胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织为材料,通过对可溶性糖、淀粉、可溶性蛋白、游离脯氨酸、总酚含量和蛋白酶活性的测定,研究体细胞胚胎发生过程中2种愈伤组织生化特性的差异。结果表明,胚性愈伤组织中可溶性糖、淀粉、可溶性蛋白质及脯氨酸含量分别为97.6、25.3、28.3 mg·g⁻¹和202.8 mg·g⁻¹,均高于非胚性愈伤组织;两者的蛋白酶活性无显著性差异;但非胚性愈伤组织中多酚类化合物的含量显著高于胚性愈伤组织。

关键词:体细胞胚胎发生;胚性能力;碳水化合物;蛋白质;多酚类物质

中图分类号:S792.18 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2015)05-0106-05

Biochemical Characteristic Variations of Embryogenic and Non-embryogenic
Callus of *Quercus variabilis*

MENG Jiao, ZHANG Cun-xu*, SUN Lin, RONG Xu-xu

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

Abstract: Somatic embryogenesis is a complex process. In order to reveal the regeneration potential of embryogenic callus, this paper investigated the difference of some biochemical characteristics, including soluble sugars, soluble proteins, starch, free proline, phenolics and proteolytic activity in embryogenic and non-embryogenic callus induced by immature zygotic embryos of *Quercus variabilis*. The contents of soluble sugars, soluble proteins, starch, free proline in embryogenic callus were 97.6, 25.3, 28.3, and 202.8 mg·g⁻¹, respectively, more than those in non-embryogenic callus; while proteolytic activity in two calli had no significant difference. However, non-embryogenic callus had a higher phenolics level compared with embryogenic callus.

Key words: somatic embryogenesis; embryogenic competence; carbohydrate; protein; phenolics

植物体细胞胚胎发生是指体细胞获得胚状体的过程,这一过程包括胚性愈伤组织的诱导、胚性组织的增值及保持、成熟培养和体胚植株的转化及萌发几个不同阶段。在诱导阶段,通常需要将植物材料置于控制条件下进行培养,促使细胞分化,形成胚性细胞。然而,在诱导过程中会出现2种不同类型的愈伤组织:一种为胚性愈伤组织,这种愈伤组织具有产生胚状体的能力,生长较快,可通过体胚发生途径再生植株;另一种为非胚性愈伤组织,它是具分生能

力的一团不规则细胞,生长较慢,可通过器官发生途径形成芽或根^[1]。尽管这2种类型的愈伤组织通常根据其形态、颜色可加以区别,但在体胚发生中人们更关心的是体细胞如何转变为具胚性能力的细胞。为此,前人在生理生化机理方面进行了探讨。研究发现胚性和非胚性愈伤组织在内源游离氨基酸、多胺、蛋白质、同工酶、淀粉含量及ADP-焦磷酸化酶等方面均存在差异^[2]。Nieves对甘蔗胚性和非胚性愈伤组织的研究发现,胚性组织中腐胺/(亚精胺

收稿日期:2014-11-09 修回日期:2015-01-09

基金项目:西北农林科技大学唐仲英育种专项。

作者简介:孟姣,女,在读硕士,研究方向:林木遗传育种。E-mail:jiaomeng2012@163.com

* 通信作者:张存旭,男,副教授,研究方向:林木遗传育种。E-mail:cxzhang@nwsuaf.edu.cn

十精胺)的比值比非胚性的高^[1]。对银杉的研究发现,胚性组织中谷氨酸脱氢酶的活性显著高于非胚性组织^[3]。幸福梅^[4]等人在对栓皮栎胚性和非胚性愈伤组织抗氧化酶活性的研究中发现,胚性组织中抗氧化酶活性均明显高于非胚性组织。以栓皮栎的胚性和非胚性愈伤组织为试验材料,通过对碳水化合物和酶活性的比较研究,分析 2 种愈伤组织的不同生化特性,以期为进一步建立愈伤组织的胚性发生能力与生化代谢间的关系提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

采集未成熟坚果,剥去壳斗,表面消毒后在无菌条件下剥取合子胚,撕掉膜质种皮,将裸露的合子胚以全胚胚根向下接种于诱导培养基上(MS 基本培

养基,附加 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA,0.5 mg · L⁻¹ 2,4-D 和 0.5 mg · L⁻¹ PVP^[5]),于(25 ± 1)℃ 暗培养。1 个月后,将诱导出的愈伤组织转接于增殖培养基上(MS 基本培养基,附加 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA,0.25 mg · L⁻¹ NAA,200 mg · L⁻¹ 水解酪蛋白和 400 mg · L⁻¹ 谷氨酰胺^[5]),16 h 光照条件下继续培养 1 个月。在体视显微镜下,根据颜色、形态、质地特征,分别选取胚性和非胚性愈伤组织,作为研究的材料(图 1)。

1.2 测定指标

1.2.1 可溶性糖含量 胚性和非胚性愈伤组织 65℃ 烘干,分别称取 100 mg,加入 80% 乙醇溶液,80℃ 水浴 30 min,3 500 g 离心 10 min,浸提 3 次,采用蒽酮比色法测定^[6]。

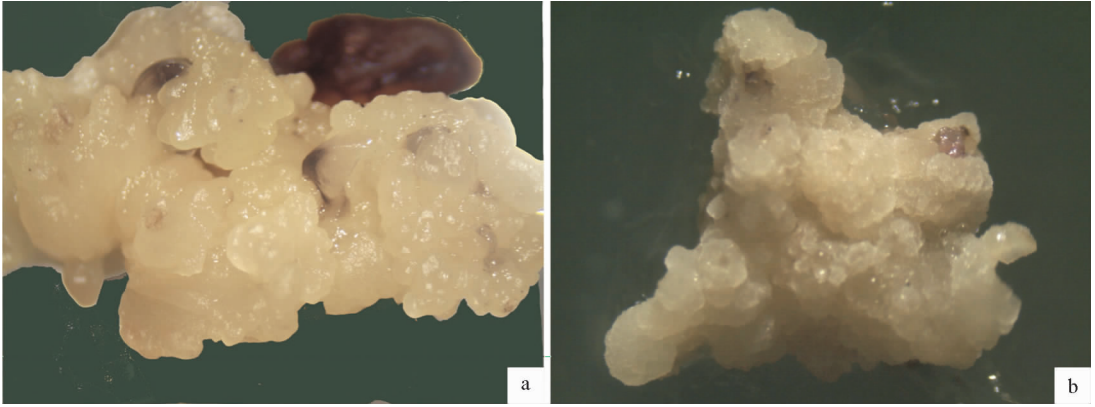


图 1 (a)栓皮栎胚性愈伤组织(色泽浅黄,质地较疏松,表面光滑,呈有光泽的颗粒状或块状)
(b) 非胚性愈伤组织(米白色或淡绿色,质地较坚硬,表面粗糙干燥,呈无光泽的瘤状)

Fig. 1 (a)embryogenic callus (pale yellow, loose texture, smooth surface, shiny, granule or block)and
(b) non-embryogenic callus (beige or light green, hard texture, rough surface, dull, nodule) of *Quercus variabilis*

1.2.2 淀粉含量 向以上提取过可溶性糖的沉淀中加入 2 mL 蒸馏水,沸水浴糊化 15 min,冷却后加入 2 mL 9.2 mol · L⁻¹ HClO₄,4 000 g 离心 10 min,浸提 2 次,采用蒽酮比色法测定^[6]。

1.2.3 可溶性蛋白含量 胚性和非胚性愈伤组织 65℃ 烘干,分别称取 100 mg,加入少许石英砂和蒸馏水研磨,5 000 g 离心 10 min。上清液即为蛋白质提取液,采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定^[6]。

1.2.4 水溶性蛋白分子量 分别称取胚性和非胚性愈伤组织鲜重 50 mg,加入 pH7.5 的 0.05M 的磷酸钠缓冲液 300 μL,研磨,15 000 g 离心 10 min,上清液即为水溶性蛋白提取液^[7-8]。

电泳采用 SDS-PAGE,10% 的分离胶与 5% 的浓缩胶制板。进样量每孔 20 μL,以溴酚兰作为指示剂。恒压电泳,当溴酚蓝指示剂距胶底部 2 cm 时,停止电泳,剥下胶片后,固定液中固定,考马斯亮

蓝 R-250 染色过夜,脱色液中脱色并照相。

1.2.5 蛋白酶活性 分别称取胚性和非胚性愈伤组织鲜重 2 000 mg。按 1 : 4 比例加入 pH7.0 的磷酸缓冲液,研磨。4 000 g 离心 10 min,上清液为待测酶液。酶活力的测定采用福林-酚法^[9]。

1.2.6 游离脯氨酸含量 分别称取胚性和非胚性愈伤组织鲜重 500 mg,加入 5 mL 3% 的磺基水杨酸溶液,沸水浴中提取 15 min,过滤。采用磺基水杨酸法测定^[6]。

1.2.7 总多酚含量 参考李焕秀^[10]的研究方法,并进行改进。分别称取胚性和非胚性愈伤组织鲜重 200 mg,剪碎后进行研磨提取,提取液为 50% 的乙醇(pH=3.0),充分提取后过滤,滤液用于测定总多酚的含量。检测波长为 270 nm,以邻苯二酚作标准曲线,计算每克鲜样中总酚的毫克数。

1.3 统计分析

所有试验均重复 3 次,在 SPSS 17.0 中对数据进行统计处理。采用 t 检验对 2 种类型愈伤组织生化指标含量进行差异性分析。

2 结果与分析

2.1 可溶性糖含量的差异

糖是高等植物物质转化的一种重要形式,在植物体内的含量和种类极其丰富,对植物的生长发育具有重要作用。可溶性糖不仅作为渗透调节剂影响体细胞胚胎的诱导和发育,而且作为一种能源物质为细胞代谢提供能量。

栓皮栎胚性和非胚性愈伤组织可溶性糖含量测定结果见表 1,结果显示栓皮栎胚性愈伤组织可溶性糖含量为 $97.6\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,显著高于非胚性愈伤组织可溶性糖含量。

表 1 栓皮栎胚性和非胚性愈伤组织生化特性及 t 测验

Table 1 Mean values of biochemical character and t -test of embryogenic and non-embryogenic calli

指标	胚性愈伤组织	非胚性愈伤组织
可溶性糖含量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	97.6 a	70.0 b
淀粉含量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	25.3 a	19.1 b
可溶性蛋白质含量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	28.3 a	15.1 b
蛋白酶酶活/($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	0.231 a	0.228 a
游离脯氨酸含量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	202.8 a	143.3 b
总多酚含量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	2.4 b	3.3 a

注:同行数据后字母相同表示差异不显著($p<0.05$)。

2.2 淀粉含量的差异

淀粉是一种天然多糖化合物,以淀粉颗粒的形式广泛存在于植物的果实、根、茎、叶中。作为植物体内最普遍的一类储藏物质,积极参与组织培养过程和形态建成,其消长与组织分化及器官形成具有密切的关系。从表 1 可以看出,栓皮栎胚性愈伤组织的淀粉含量为 $25.3\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,显著大于非胚性愈伤组织。

2.3 可溶性蛋白含量的差异和谱型分析

蛋白质是生命的物质基础,在细胞和生物体的生命活动过程中,起着十分重要的作用。可溶性蛋白质作为重要的储藏物质,在体细胞胚胎发生过程中具有重要的研究意义。从表 1 可以看出,栓皮栎胚性愈伤组织可溶性蛋白质的含量显著大于非胚性愈伤组织,两者相差约 1 倍。

从 SDS-PAGE 电泳图谱分析可知(图 2),胚性愈伤组织中蛋白条带数比非胚性的多,且染色较深。两者共有的条带分子量分别为 122、69、62.5、53.1 KD 和 33.7 KD,但分子量为 66.2、43.1 KD 和 41.1 KD 的蛋白条带仅出现在胚性愈伤组织,在非胚性

愈伤组织未发现特有蛋白条带。

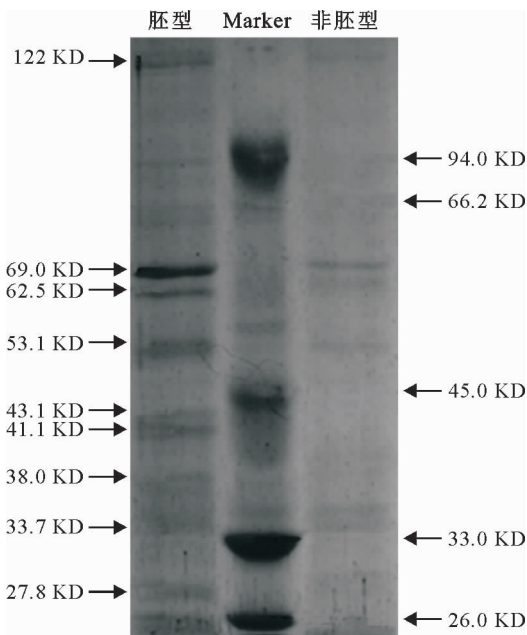


图 2 可溶性蛋白电泳图谱

Fig. 2 Electrophoretogram of soluble protein

2.4 蛋白酶酶活的差异

蛋白酶广泛存在于植物中,蛋白酶中含有多种不同蛋白水解酶组分,对多种蛋白质及多肽具有催化水解活性,蛋白酶酶活是细胞代谢活动的一个重要指标。

栓皮栎胚性和非胚性愈伤组织蛋白酶酶活的测定结果(表 1)显示,栓皮栎胚性组织中蛋白酶酶活为 $0.231\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$,非胚性的蛋白酶酶活为 $0.228\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。可见,栓皮栎胚性组织的蛋白酶酶活高于非胚性,但是未达到显著水平。

2.5 游离脯氨酸含量的差异

脯氨酸是植物体内重要的渗透性调节物质,可以作为活性氧的清除剂,还具有降低细胞内酸度、调节氧化还原电势以及作为细胞内酶的保护剂等作用。由表 1 可以看出,栓皮栎胚性组织中游离脯氨酸含量显著高于非胚性。

2.6 总多酚含量的差异

多酚类物质包括酚酸、黄酮、花青素、单宁、儿茶素等,是植物的酚类次生代谢产物。由表 1 可知,栓皮栎非胚性愈伤组织的总多酚含量为 $3.3\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,显著高于胚性愈伤组织。

3 结论与讨论

植物体细胞胚胎的发生需要经过几个不同的阶段,每个阶段都伴随着一系列生理生化变化,这些变化在形态转变之前即已发生。栓皮栎胚性和非胚性愈伤组织在颜色、质地、形态方面的差异与其组织内

部物质变化有密切的联系。

体胚中可溶性糖含量水平标志着源端的同化物供应能力和库端对同化物的转化、利用能力。因此可溶性糖在植物的体细胞胚胎发生中具有重要作用。栓皮栎胚性组织可溶性糖含量显著高于非胚性组织说明:胚性组织新陈代谢速率高于非胚型愈伤组织,高含量的可溶性糖为胚型愈伤组织分化产生胚胎提供物质和能量基础。本研究结果与 Nieves 等人在甘蔗中的报道一致^[2],但与张献龙^[11]等在陆地棉中的研究结果不相符。张献龙^[11]等研究显示陆地棉胚性组织的可溶性糖含量低于非胚性,但胚性组织的蛋白质和 RNA 含量高于非胚性。该结果说明胚性愈伤组织代谢旺盛,能及时把从培养基获得的糖分转化成细胞分裂和分化所必需的 RNA 和蛋白质。这 2 种不同结果的可能原因是取样的时间不同。本试验和 Nieves 的试验都是在诱导 2 个月 后取样,而张献龙^[11]等人是在 3 个月 后取样。李茜^[12]等人对白皮松愈伤组织生理生化特性的研究表明,在体细胞诱导过程中,胚性组织可溶性糖的含量会在一段时间后出现一个高峰,随后含量会下降而低于非胚性组织,因此取样时间对试验结果有重要的影响。

研究表明淀粉含量与胚胎发生能力呈正相关^[13]。栓皮栎胚性组织的淀粉含量显著大于非胚性,说明胚性细胞胚胎发生能力强。对马唐愈伤组织的组织学观察表明,胚性组织中淀粉粒多,非胚性中淀粉粒很少,两者相差 10~40 倍^[2]。此外,对马唐淀粉酶的研究表明胚性组织中淀粉酶种类多、活力高,则能催化较多的淀粉水解,以保证糖代谢的底物供应,为胚胎发生提供物质和能量基础。这与本研究中栓皮栎胚性组织的淀粉含量高于非胚性的结果相符。

栓皮栎胚性组织可溶性蛋白质的含量约为非胚性组织的 2 倍。表明胚性组织中蛋白质合成较旺盛,非胚性中蛋白质合成较少。

分子量为 122、69、62.5、53.1 KD 和 33.7 KD 等的蛋白质条带在 2 种愈伤组织中均有出现,说明这些蛋白可能是对细胞结构建成很重要的蛋白。分子量为 66.2、43.1 KD 和 41.1 KD 等的蛋白质只在胚性组织中出现或在非胚性中含量很低,说明这部分蛋白与体胚发生过程密切相关,可能是催过该过程的重要酶类。齐力旺^[14]等研究表明胚性组织中游离氨基酸含量低于非胚性,胚性组织中游离氨基酸库较小,非胚性的游离氨基酸库较大,说明胚性组织能将大量的游离氨基酸转变为蛋白质以备细胞分化之用。

栓皮栎 2 种愈伤组织蛋白酶活的测定结果与 Nieves^[2]等在甘蔗中的报道一致,甘蔗胚性愈伤组织蛋白水解酶酶活为 0.3 U·mg⁻¹,非胚性的蛋白水解酶酶活为 0.2 U·mg⁻¹,未达到显著差异水平。胚性组织中高活性的蛋白酶有利于蛋白质的降解,为新蛋白质的合成提供氨基酸,为愈伤组织的快速生长和体胚发生提供物质条件。

H₂O₂ 作为活性氧的一种重要形式,是细胞有氧代谢的产物。微量的 H₂O₂ 可在生物体的生理过程中发挥重要的调控作用,特别是在细胞内信号转导方面,但过量的 H₂O₂ 具有损伤生物大分子、毒害细胞的效应。渗透性调节物脯氨酸作为活性氧的清除剂是植物对逆境胁迫的一种适应和保护措施。胚性组织游离脯氨酸含量显著高于非胚性,说明胚性细胞的蛋白质、核酸、酶、脂膜的稳定性高于非胚性,适应性、抗逆性较非胚性强,为下一步体细胞胚胎的产生创造了有利条件。研究表明作为另一类活性氧的清除剂,栓皮栎胚性组织中过氧化氢酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶的活性也显著高于非胚性^[4]。

多酚的主要功能是抗氧化,清除自由基。A. M. Maira^[15]等进行花卉组培时发现酚类物质的含量与其褐变率成正相关,而褐变会抑制愈伤组织的生长甚至导致死亡。相关研究表明多酚氧化酶在非胚性愈伤组织中表现出较高的活性^[12],多酚类化合物氧化产生的醌类物质使非胚性组织代谢减弱、膜透性增加,从而抑制细胞分化、导致生长缓慢、胚胎发生能力弱。N. Nieves^[1]等研究表明没食子酸是 2 种类型愈伤组织中最主要的酚酸,而且没食子酸在非胚性组织中的含量显著高于胚性,这与本试验结果一致。

本研究通过对栓皮栎胚性和非胚性组织生理生化特性的比较发现胚性愈伤组织的物质代谢活性远高于非胚性组织,为体胚的发生提供物质和能量基础。本试验初步揭示了植物体细胞胚胎发生的生化基础,为建立愈伤组织的胚性发生能力与生化代谢间的关系提供了依据。但要进一步揭示植物体细胞胚胎发生的机理需要探讨其分子基础,掌握细胞分化过程中有关蛋白质和酶的动态变化规律。

参考文献:

[1] NIEVES N, SEGURA-NIETO M, BLANCO M A, *et al.* Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2003, 39(3):343-345.

[2] 杨和平. 马唐胚性与非胚性愈伤组织生理差异的初步研究[J]. *植物生理学通讯*, 1991, 27(5):337-340.

YANG H P. Physiological differences between embryogenic

and non-embryogenic callus of *Digitaria sanguinalis*[J]. Plant Physiology Communication, 1991, 27(5):337-340. (in Chinese)

[3] KORMUTAK A, VOOKOVA B. Biochemical variation between non-embryogenic and embryogenic calli of silver fir [J]. Biologic Plantarum, 1997, 39(1):125-130.

[4] 幸福梅, 张存旭. 栓皮栎胚性和非胚性愈伤组织抗氧化酶酶的研究[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(3):67-70.

XIN F M, ZHANG C X. Antioxides characteristics of embryogenic callus and non-embryogenic callus in *Quercus variabilis* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2007, 22(3):67-70. (in Chinese)

[5] 张存旭, 姚增玉. 栎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.

ZHANG C X, YAO Z Y. Recently research situation of somatic embryogenesis in oak[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2004, 24(2):356-362. (in Chinese)

[6] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 2006.

[7] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京:科学出版社, 2002.

[8] KLIMASZEWSKA K, MORENCY F, JONES C, *et al.* Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobus* and in somatic embryos from different maturation treatments[J]. Physiological Plantarum, 2004, 121(4):682-690.

[9] 李斌, 彭志英. 剑麻组织培养诱导产蛋白酶研究[J]. 华南理工大学学报, 1998, 26(8):58-62.

[10] 李焕秀, 王乔春, 李春秀. 梨芽和茎尖多酚氧化酶活性和总酚含量的初步研究[J]. 四川农业大学学报, 1994, 2(2):218-222.

[11] 张献龙, 孙济中. 陆地棉品种珂字“201”胚性与非胚性愈伤组织生化代谢产物的比较研究[J]. 作物学报, 1992, 18(3):176-181.

[12] 李茜, 张存旭. 白皮松胚性和非胚性愈伤组织生理生化特性研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2008, 36(8):151-154.

LI Q, ZHANG C X. Physiological and biochemical characteristics of embryogenic callus and non-embryogenic callus in *Pinus bungeana* [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat. Sci. Edi., 2008, 36(8):151-154. (in Chinese)

[13] WURTELE E S. Comparison of starch and ADP-glucose pyrophosphorylase levels in non-embryogenic cells and developing embryos from induced carrot cultures [J]. Plant Physiology, 1988, 86(2):451-456.

[14] 齐力旺, 李玲. 落叶松不同类型胚性和非胚性愈伤组织的生理生化差异[J]. 林业科学, 2011, 37(3):20-29.

QI L W, LI L. Physiological and biochemical changes in different kinds of embryogenic callus and non-embryogenic callus of *Larix principis-rupprechtii* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2011, 37(3):20-29. (in Chinese)

[15] MAYER A M, HAREL E. Polyphenol oxidases in plants [J]. Phytochemistry, 1979, 18(2):193-215.

[16] PARK S Y, LEE W Y, KIM Y W, *et al.* Characterization of metabolic differences between embryogenic and non-embryogenic cells in forest trees[J]. BMC Proceedings, 2011, 5 (Suppl. 7):146.

(上接第 59 页)

[14] 吕晓男, 陆允甫, 王人潮. 土壤肥力综合评价初步研究[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版, 1999, 25(4):378-382.

LV X N, LU Y F, WANG R C. Preliminary studies on the integrated evaluation of soil nutrient fertility [J]. Journal of Zhejiang University: Agric. & Life Sci., 1999, 25(4):378-382. (in Chinese)

[15] 杨晓娟, 王海燕, 刘玲, 等. 东北过伐林区不同林分类型土壤肥力质量评价研究[J]. 生态环境学报, 2012, 21(9):1553-1560.

YANG X J, WANG H Y, LIU L, *et al.* Evaluation of soil fertility quality under different forest stands in over-logged forest region, Northeast China[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2012, 21(9):1553-1560. (in Chinese)

[16] 刘敬珣, 刘晓晖, 陈长清. 湘西烟区土壤肥力状况分析与综合评价[J]. 中国农学通报, 2009, 25(2):46-50.

LIU J X, LIU X H, CHEN C Q. Analysis and comprehensive evaluation of soil fertility status for tobacco-growing areas in the Northwest of Hu’nan province[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(2):46-50. (in Chinese)

[17] 胡国松, 郑伟, 王震东, 等. 烤烟营养原理[M]. 北京:科学出版社, 2000.

[18] 骆东奇, 白洁, 谢德体. 论土壤肥力评价指标和方法[J]. 土壤与环境, 2002, 11(2):202-205.

LUO D Q, BAI J, XIE D T. Research on evaluation norm and method of soil fertility[J]. Soil and Environmental Sciences, 2002, 11(2):202-205. (in Chinese)