

## 珍稀濒危植物银鹊树体细胞胚时期同工酶分析

张博, 景丹龙, 李晓玲, 王玉兵, 张德春\*

(三峡大学 生物技术研究中心, 湖北 宜昌 443002)

**摘要:** 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对银鹊树体细胞胚发生过程中的酯酶(EST)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和淀粉酶(AMY)进行了同工酶分析。结果表明:球形胚时期的EST、POD、SOD、AMY同工酶活性最强;在体细胞胚形态建成过程中,SOD同工酶有新酶的合成,而POD同工酶则表现为活性表达增加并有新酶合成,AMY同工酶活性也表现为不断增加的趋势。说明在银鹊树体细胞胚发生过程中,EST、SOD、POD和AMY同工酶酶谱变化与其体细胞胚的发生和发育过程密切相关,这些同工酶的酶谱变化及活性的强弱可作为其体细胞胚时期生理生化阶段转变的标志。

**关键词:** 银鹊树; 体细胞胚; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 同工酶; 酶带

**中图分类号:** Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)04-0526-05

## Studies on isozymes during somatic embryogenesis of *Tapiscia sinensis*

ZHANG Bo, JING Dan-Long, LI Xiao-Ling,  
WANG Yu-Bing, ZHANG De-Chun\*

(Biotechnology Research Center and Key Laboratory of Plant Natural Products of  
Hubei, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

**Abstract:** Polyacrylamide gel electrophoresis was used as a tool to analyze isozyme patterns such as peroxidase(POD), esterase(EST), amylase(AMY) and superoxide dismutase(SOD) in somatic embryogenesis of *Tapiscia sinensis*. The results showed that a higher expression of EST, POD, AMY and SOD isoenzymes indicated that there was a higher physiological metabolic rate in the stage of globular embryos, and SOD became more which might be associated with the processes of somatic cells from the differentiation into embryonic regeneration. POD continued to change and strengthen in the process of somatic embryogenesis; At the same time, the expression of AMY also was strengthened. The activity variations of POD, EST, AMY and SOD were closely related to the induction of embryogenic callus and the development of somatic embryos in somatic embryogenesis of *T. sinensis*. These enzymes could be used as the signs during the development of somatic embryos, and would be as a reference label of the specific developmental stages.

**Key words:** *Tapiscia sinensis*; somatic embryos; Polyacrylamide gel electrophoresis; isoenzyme; enzyme bands

同工酶是来源于生物体结构不同而能催化同一反应的酶。植物的发育过程是遗传信息在时间和空间顺序表达的过程,同工酶的分析为研究有机体顺

序发育提供了手段。体细胞胚发生过程中,同工酶的变化在许多植物中已有报道,如枸杞(魏琴等, 2000)、玉米(李效宇等, 1998)、花生(肖显华等,

收稿日期: 2010-12-16 修回日期: 2011-03-08

基金项目: 国家自然科学基金(30670202); 湖北省天然产物开发与利用重点实验室开放基金(2008DP09)[Supported by National Natural Science Foundation of China(30670202); Open Foundation of Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development (China Three Gorges University) in China(2008DP09)]

作者简介: 张博(1987-), 男, 主要从事生物化学及分子生物学和濒危植物的保护与利用研究, (E-mail)zhangb123321@126.com.

\* 通讯作者: 张德春, 博士, 主要从事植物分子遗传学研究, (E-mail,)zhangdc227@163.com.

1998)、石刁柏(杨和平等,1992)。杨和平等(1992)研究表明,石刁柏体细胞胚胎发生时,酯酶(EST)活性升高,同工酶谱带增加。陈力耕等(1997)认为过氧化物酶(POD)同工酶可以作为柑桔体细胞胚胎发生早期的生化指标。Kochba 等(1977)在柑桔的研究中也观察到胚性愈伤组织中过氧化物酶同工酶的活性明显强于非胚性愈伤组织。

银鹊树自然授粉较困难,不易结实,天然更新不

易。目前,有关银鹊树的树种特性(孟承安,2006)、育苗(潘德权等,2008)及愈伤组织继代培养(陈发菊等,2007)等方面已有研究报道。但对其愈伤组织诱导过程中,体细胞胚时期的分子研究尚无报道。本试验在植物组织培养技术研究银鹊树快速繁殖的基础上,探讨银鹊树体细胞胚时期的 EST、SOD、POD 和 AMY 同工酶的变化,为在分子水平上研究银鹊树体细胞胚胎发生的机理提供依据。



图 1 银鹊树体细胞胚时期各个时期的体胚

Fig. 1 Morphological stages of somatic embryo development in *Tapiscia sinensis*

A. 球形胚; B. 鱼雷胚; C. 子叶胚。

A. Globular embryos; B. Torpedo embryos; C. Cotyledon embryos.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

试验材料为继代培养多次的银鹊树胚性愈伤组织。取黄色、质地疏松、含有球形胚的胚性愈伤组织,将其经 60 目筛过滤得到大小均一的球形胚,并转到含 6% 蔗糖和 6-BA 0.2 mg/L 和 NAA 0.05 mg/L 的 MS 液体培养基。置摇床上培养,转速为 120 r/min。每 10 d 更换新鲜培养基,观察并收集各个时期的体胚:(1)球形胚,(2)鱼雷胚,(3)子叶胚(图 1)。置于液氮中迅速冷冻,2 h 后置 -70 °C 冰箱中保存备用。

### 1.2 方法

1.2.1 酶液制备 酶液提取:分别称取置于 -70 °C 保存的球形胚、鱼雷胚和子叶胚各 0.5 g,加入 PVP 0.05 g,预冷磷酸缓冲液 2.5 mL(PBS,pH 为 7.8),冰浴研磨成匀浆,分装于 1.5 mL 离心管中。将静置后的样品液于 4 °C 离心机上,在 12 000 r/s 下,离心 20 min,取上清液,用于同工酶分析。

1.2.2 电泳与染色 同工酶电泳采用不连续垂直板

聚丙烯酰胺凝胶电泳,凝胶制备参照何忠效等(1999)的方法,分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 3%,胶厚 1.5 mm,加样 41  $\mu$ L(酶提取液:40%甘油:10%溴酚蓝=30:10:1),电极缓冲液为 Tris-甘氨酸溶液(pH8.3),4 °C 下电泳 4~5 h,初始电流强度为 20 mA,后增加至 30 mA。电泳结束后分别进行过氧化物酶(POD)、酯酶(EST)、淀粉酶(AMY)和超氧化物歧化酶(SOD)同工酶的染色。POD 采用醋酸-联苯胺染色方法(何忠效等,1999);AMY 采用淀粉-醋酸-碘染色法(何忠效等,1999);SOD 参照何忠效等(1999)介绍的 NBT 光还原法;EST 采用醋酸萘酯-坚牢蓝 RR 盐染色法(汤章城,1999)。

## 2 结果与分析

### 2.1 银鹊树体细胞胚时期酯酶的电泳结果与分析

银鹊树体细胞胚胎形态建成过程中酯酶(EST)同工酶酶谱的变化见图 2。球形胚时期酶带数目最多,有 7 条带;鱼雷胚时期酶带数目减少,有 3 条共有酶带;子叶胚时期酶带数目又增多,有 6 条酶带,但未出现新的酶带。酶带 E1、E2 和 E3 在不同时期

均有表达,为银鹊树体细胞胚胎各时期的共有酶带,表明酶带 E1、E2 和 E3 的功能作用贯穿于银鹊树体细胞胚胎发生的各个时期。E4-7 在球形胚均有出现,在鱼雷胚时期消失,而 E4-6 在子叶胚时期又重新出现,推测 E4-7 可能对体细胞的分化有重要作用:一方面与进入体细胞胚时期的分化有关,另一方面与由体细胞胚时期到再生植株的分化有关。

**2.2 银鹊树体细胞胚时期超氧化物歧化酶的电泳结果与分析**

银鹊树体细胞胚胎形态建成过程中 SOD 同工酶酶谱的变化见图 3,球形胚时期有 4 条酶带,鱼雷胚时期酶带数目减少,有 3 条共有酶带;子叶胚时期酶带数目又增多,有 4 条酶带,并出现新的酶带 S3。

酶带 S1 和 S2 在三个时期均有表达,表明酶带 S1 和 S2 是银鹊树体细胞胚胎发生过程中的共有谱带;其余谱带则随着不同发育时期发生明显的变化,同样反映了这些时期不同的生理状态。S3 在球形胚时期表达,而在体细胞胚后期未见表达,推测 S3 与进入体细胞时期的分化有关。从鱼雷胚时期开始,出现新的酶带 S4,且到达子叶胚时期 S4 表达量增强。S5 在球形胚时期有表达,在鱼雷胚时期消失,而在子叶胚时期又重新开始表达,推测 S5 可能与体细胞胚时期的分化有重要作用。从三个时期的 SOD 酶谱来看,SOD 同工酶酶谱在体细胞胚的各个时期存在显著差异,可以作为银鹊树体细胞胚胎发生过程中生理生化转变的标志。

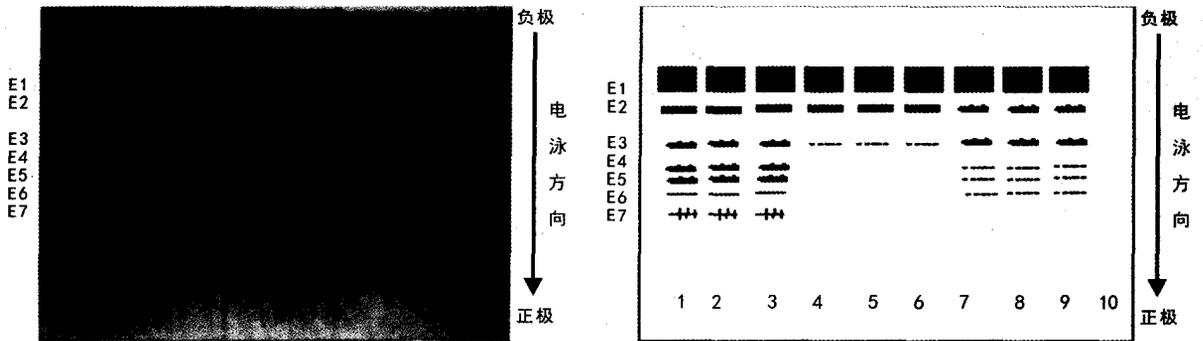


图 2 银鹊树体细胞胚时期的酯酶 PAGE 电泳图谱

Fig. 2 PAGE map and activity of esterase at various stages of *Tapiscia sinensis* somatic embryo development

1,2,3. 球形胚; 4,5,6. 鱼雷胚; 7,8,9. 子叶胚; 10. 空白对照。下同。

1,2,3. globular embryo; 4,5,6. torpedo embryo; 7,8,9. cotyledonary embryo; 10. control group; The same below.

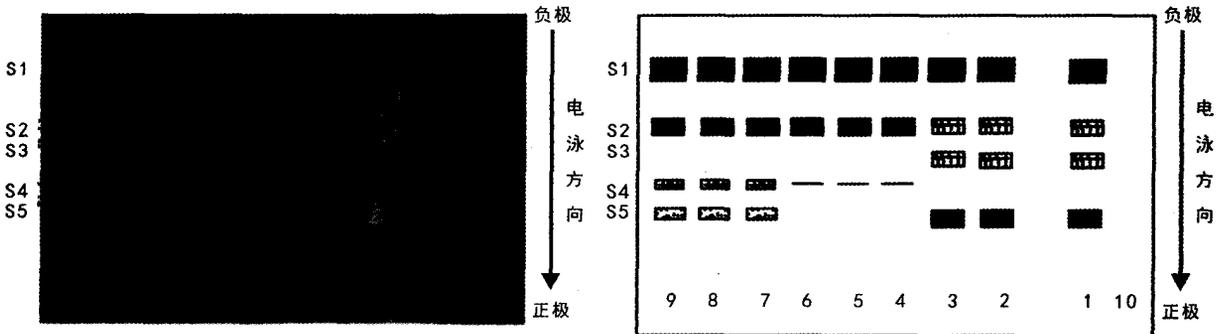


图 3 银鹊树体细胞胚时期超氧化物歧化酶 PAGE 电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis map of the superoxide dismutase of *Tapiscia sinensis* somatic embryos by PAGE

**2.3 银鹊树体细胞胚时期过氧化物酶的电泳结果与分析**

银鹊树体细胞胚胎形态建成过程中过氧化物酶

(POD)同工酶酶谱的变化见图 4,球形胚时期酶带最少,有 3 条酶带;鱼雷胚时期酶带数目增多,有 4 条共有酶带;子叶胚时期有 4 条酶带,但酶带较前两

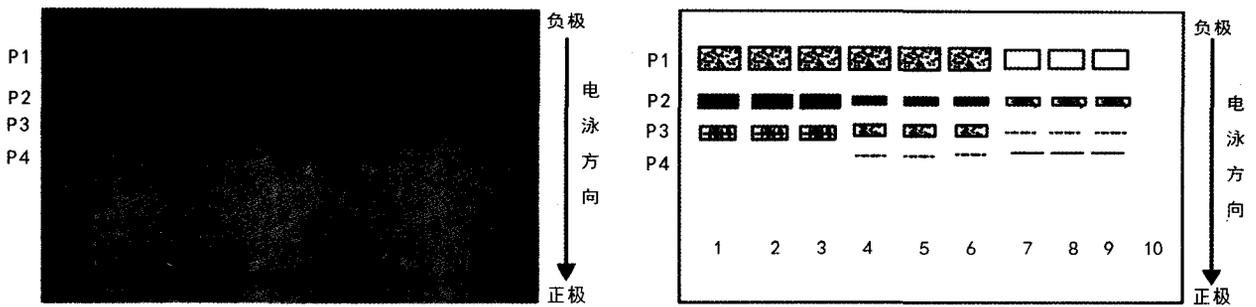


图 4 银鹊树体细胞胚时期过氧化物酶 PAGE 电泳图谱

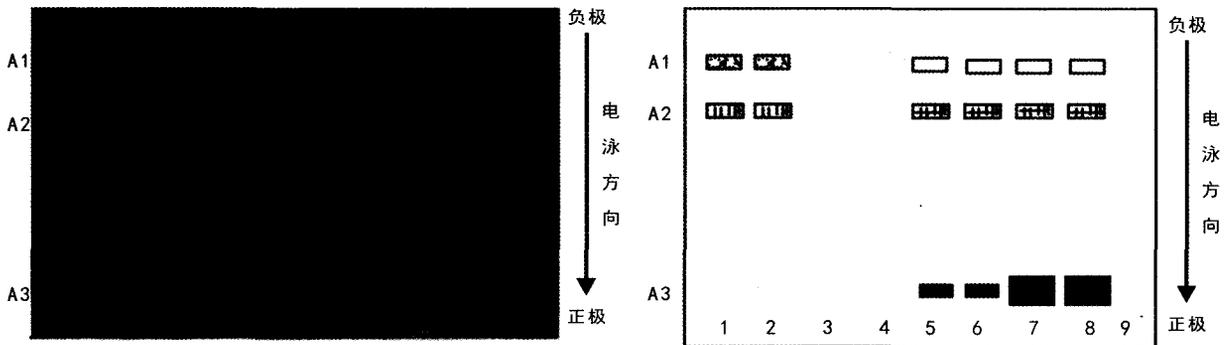
Fig. 4 The electrophoresis map of the peroxidase of *Tapiscia sinensis* somatic embryos by PAGE

图 5 银鹊树体细胞胚时期淀粉酶 PAGE 电泳图谱

Fig. 5 Electrophoresis map of the amylase of *Tapiscia sinensis* somatic embryos by PAGE

1,2. 混合胚(3种时期胚均有); 3,4. 胚性愈伤组织; 5,6. 球形胚; 7,8. 子叶胚; 9. 空白对照。

1,2. mix embryoid(the period of somatic embryos); 3,4. browning embryogenic callus; 5,6. globular embryoid; 7,8. cotyledonary embryoid; 9. control group.

个时期弱。酶带 P1, P2, P3 在 3 个时期均有表达, 且从球形胚时期到子叶胚时期酶带 P1, P2, P3 表达强度逐渐减弱, 表明酶带 P1, P2 和 P3 是银鹊树体细胞胚胎发生过程中 POD 同工酶的共有谱带。从鱼雷胚时期开始合成新的酶带 P4, 到达子叶胚时期 P4 增强, 因此, 推测 P4 为由体细胞胚时期分化为再生植株时期所需要的一种酶。

#### 2.4 银鹊树体细胞胚时期淀粉酶的电泳结果与分析

从银鹊树体细胞胚时期淀粉酶 PAGE 电泳图谱(图 5)可知, 胚性愈伤组织没有淀粉酶的表达; 混合胚时期有 2 条酶带; 球形胚、子叶胚时期酶带最多, 有 3 条酶带。比较混合胚时期和球形胚、子叶胚时期酶带, 推测 A1 和 A2 可能是银鹊树体细胞胚时期的共有酶带, 且 A2 表达量基本不变, A1 表达量从球形胚到子叶胚先增强, 后又减弱。比较银鹊树

胚性愈伤组织和体细胞胚时期的酶带, 可以推测 A3 可能为球形胚时期和子叶胚时期的特有酶带, 且在子叶胚时期表达量最大。由此推测 A3 可能与体细胞胚时期的分化有关, 参与进入体细胞胚时期的分化, 在由子叶胚到再生植株的分化中起重要作用。

### 3 讨论

同工酶是细胞内不同基因、等位基因或同一基因不同转录本 mRNA 的一组酶。同工酶的产生是细胞对环境或发育变化的适应, 具有时空特异性。因而, 同工酶酶谱变化的分析可以反映体细胞发育过程中基因表达的时空动态变化和代谢调节方式的变化(魏琴等, 2000)。

EST 在植物体内广泛存在, 它与某些酶的修

饰、激活或钝化、酯代谢、内膜系统的发育,以及体细胞胚胎形态的建成和植株的再生有关(孙丹等, 2010)。孙丹等(2010)研究表明,酯酶同工酶的酶带在平贝母形态发育过程中较丰富。另一方面,酯酶可作为鉴别双亲和杂种愈伤组织基因型的特征酶(车婧等, 2009)。本试验也表明,EST同工酶在银鹊树体细胞胚胎形态建成至植株分化过程中代谢调控较为活跃,可能在这些阶段起重要的调控作用。

细胞内氧化还原状态直接影响着细胞的生存、活化、增殖和分化等,细胞氧化还原调控是细胞内基因表达应对环境变化或发育改变的一种调节方式。SOD和POD为细胞氧化还原系统的组成酶,能通过有效地清除细胞内过量的活性氧、自由基,维持胞内活性氧水平的平衡。在七叶树愈伤组织诱导过程中,POD变化明显,可以作为愈伤组织的特征酶(李鹏丽等, 2010)。银鹊树体细胞胚胎形态建成过程中,SOD和POD同工酶在进入体细胞胚时期以及由体细胞胚时期到再生植株的分化过程中各有相应特征条带,说明SOD和POD也可以作为银鹊体细胞胚发育和分化再生时期的特征酶。

AMY是参与糖类代谢的酶,其表达强弱变化直接关系到营养物质的供应速度。熊丹等(2008)的研究发现,AMY活性与酶谱变化与体细胞发育变化明显相关。本研究也表明,AMY在银鹊体细胞胚时期有较多新酶的合成,且不同的时期有特异性表达,说明体细胞胚时期的分化可能对淀粉酶的依赖性较大。

银鹊树球形胚时期的EST、POD、SOD、AMY同工酶活性均最强,推测这一时期的生理代谢较旺盛,是体细胞胚发育的关键时期。EST、SOD和POD三种酶的酶谱差异较大,且具有一定的规律性。因此,EST、SOD和POD的酶谱变化及表达强弱可作为其体细胞时期生理生化阶段转变的标志之一。

#### 参考文献:

- 何忠效,张树政. 1999. 电泳[M]. 北京:科学出版社:37-38, 286-300
- 汤章城. 1999. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京:科学出版社:264-266
- Che J(车婧), Zhi DY(支大英), Liu FL(刘法磊), et al. 2009. Esterase isoenzyme analysis in somatic hybridization of wheat and flax(普通小麦与野生亚麻体细胞杂种愈伤组织的酯酶同工酶分析)[J]. *Plant Fiber Sci China*(中国麻业科学), 31(5): 288-290
- Chen FJ(陈发菊), Zhao ZG(赵志刚), Liang HW(梁宏伟), et al. 2007. Chromosome number variation of cells in reiterative subcultures of embryonic callus of *Tapiscia sinensis*(银鹊树胚性愈伤组织继代培养过程中的细胞染色体数目变异)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 27(8): 1 600-1 604
- Chen LG(陈力耕), Zheng ZL(郑志亮), Hu XQ(胡西琴). 1997. High frequency induction of nucellar embryogenesis invitro and a biochemical marker of early embryogenesis in citrus(柑桔珠心胚的高频离体诱导及其发生早期的生化标记研究)[J]. *Acta Agric Zhejiang*(浙江农业学报), 9(5): 256-259
- Kochba J, Lavee S, Spiegel-Roy P. 1977. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic 'Shamouti' orange ovular callus lines[J]. *Plant Cell Physiol*, 18(2): 463-467
- Li PL(李鹏丽), Mu HM(穆红梅), Shi MZ(时明芝). 2010. Callus induction on *Aesculus chinensis* and the determination of peroxidase isozyme(七叶树愈伤组织诱导及过氧化物同工酶的测定)[J]. *China Fore Sci Tech*(林业科技开发), 24(4): 38-41
- Li XY(李效宇), Lu LD(卢龙斗), Zhang GF(张根发). 1998. Studies on the histocytological structure and isoenzymes of calli derived from young inflorescences of maize(玉米幼穗两种愈伤组织的比较研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 18(1): 62-64
- Meng CA(孟承安). 2006. Research on characteristics of *Tapiscia sinensis*(银鹊树的树种特性研究)[J]. *J Huangshan Univ*(黄山学院学报), 8(3): 70-71
- Pan DQ(潘德权), Luo ZQ(罗在荣), Chen JY(陈景艳). 2008. Research on the growth rhythm of silver magpie sapling(银鹊树幼苗年生长节律研究)[J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 36(28): 12 241-12 242
- Sun D(孙丹), Piao XC(朴炫春), Diao YL(刁艳玲), et al. 2010. Study on the isozyme changes of *Fritillaria ussuriensis* during morphogenesis(组培平贝母形态转变过程中同工酶变化的研究)[J]. *Heilongjiang Agric Sci*(黑龙江农业科学)(2): 1-2
- Wei Q(魏琴), Cao YL(曹有龙), Chen F(陈放), et al. 2000. Observation of somatic embryogenesis and analyses of peroxidase isozymes in culture of the pith of *Lycium barbarum*(枸杞髓组织培养中体细胞胚胎发生与过氧化物酶同工酶分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), 20(2): 168-171
- Xiao XH(肖显华), Wang SZ(王顺珍), Lin RS(林荣双), et al. 1998. Study on peroxidase isozymes during somatic embryogenesis from leaflets of mature peanut(*Arachis hypogaea*) Embryos(花生成熟胚叶体细胞胚形成过程中的过氧化物酶同工酶研究)[J]. *J Yantai Univ: Nat Sci Engineering*(烟台大学学报·自然科学与工程版), 11(1): 57-59
- Xiong D(熊丹), Chen FJ(陈发菊), Liang HW(梁宏伟), et al. 2008. Studies on four kinds of isozymes during somatic embryogenesis of *Ennenopteris henryi*(香果树体细胞胚胎发生过程中4种同工酶的研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 28(10): 2 011-2 016
- Yang HP(杨和平), Cheng JC(程井辰), Zhou JY(周吉源), et al. 1992. Studies on the changes of soluble protein and isoenzymes during somatic embryogenesis of *Asparagus officinalis*(石刁柏体细胞胚胎发生过程中蛋白质及同工酶变化的研究)[J]. *Acta Biol Exp Sin*(实验生物学报), 25(1): 17-23