

甘草不同来源愈伤组织过氧化物酶分析

曹君迈, 祁金涛, 刘建利, 闫兴富, 李 满

(北方民族大学生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要: 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法和分光光度法, 对乌拉尔甘草的根状茎、芽、叶诱导的愈伤组织中过氧化物酶同工酶进行电泳和活性分析。结果得出: 不同来源的愈伤组织中过氧化物酶同工酶谱分为 A、B、C 三个区域, 其中活性最强的是 A 区和 C 区, 所有供试样品出现 3 种酶谱谱型, 6 种酶谱谱带; 在进行酶活性测定时, 叶的愈伤组织中过氧化物酶活性最高, 芽的次之, 根状茎的最低, 过氧化物酶活性过高不利于愈伤组织生长。确立的 2 种特征酶谱带 (P2 和 P6), 4 种差异酶谱谱带 (P1、P3、P4 和 P5), 为乌拉尔甘草种的鉴别及脱分化与再分化的细胞生物学机制研究提供了一定的参考依据。

关键词: 甘草; 愈伤组织; 过氧化物酶

中图分类号: Q554+.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2010)04-0123-05

甘草 (*Glycyrriza Uralensis*) 是豆科多年生草本植物, 它不仅具有极高的医用价值, 而且还可以作为食品、化妆品、烟草及饲料的添加剂^[1], 用途非常广泛。

国内对甘草组织培养研究较多^[2-7], 并建立了再生系统, 但再生系统的外植体来源有限, 只有以芽作为外植体形成的愈伤组织能够进行再分化, 其它外植体有的不能进行再分化^[4]或再分化能力有待提高^[7], 那么它们的行为表现与其生理生化特征有何关系。关于甘草过氧化物同工酶的研究在用来判断不同甘草品种间亲缘关系^[8,9]和用同工酶的活性变化来反映甘草生长过程中生理生化的情况^[10-12]已有文献报道, 而利用同种甘草不同来源愈伤组织作为试验材料分析脱分化过程中过氧化物同工酶及活性的研究尚未见文献报道。通过本文的研究建立乌拉尔甘草的特征酶谱谱带及差异酶谱谱带, 为甘草不同来源愈伤组织差异性蛋白质的筛选提供依据, 对进一步阐明甘草再分化的细胞生物学机制具有十分重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

宁夏乌拉尔甘草的叶、芽、根状茎采自北方民族大学校园内。

1.2 愈伤组织的诱导

将甘草的叶、芽、根状茎按文献^[4]中的方法进行消毒, 消毒后分别接入 MS + 6-BA 2 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L 培养基上, 并放入人工气候培养箱内

黑暗培养, 培养温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 诱导愈伤组织。

1.3 愈伤组织的继代培养

对初代培养愈伤组织进行扩繁, 将三种不同来源的愈伤组织切成约 0.5 cm^3 的外植体, 每瓶接 4 块外植体, 每种不同来源的愈伤组织转接 7 瓶, 继代 3 次。然后利用继代 3 次、培养 24 d 的愈伤组织作为测试材料。培养条件为温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 光照强度为 2 000 lx, 光照 12 h/d。

1.4 过氧化物同工酶电泳酶谱分析

培养 24 d 时, 分别选取不同外植体来源的愈伤组织, 用滤纸吸去周围多余水分后, 放入冰浴上的培养皿内按四分法纵向切取愈伤组织, 每瓶切 4 块, 用手术刀将其切成碎块后, 转入预先冷却的研钵中, 按 1:10 比例加入预冷的 0.02 mol/L 的 KH_2PO_4 溶液, 再加入占材料质量 10% 的聚乙烯吡咯烷酮 (PVPP)。在冰浴中研磨成匀浆。匀浆倒入烧杯中, 放入 4°C 冰箱中浸提 1 h, 用 4 层纱布过滤, 滤液以 3 000 r/min 离心 10 min, 取其上清液, 为酶的粗提液, 低温下保存备用。试验重复 3 次。过氧化物同工酶电泳技术采用萧浪涛、王三根编著的《植物生理学实验技术》^[13]中方法。

1.5 过氧化物同工酶活性的测定

1.5.1 标准母液 (Engelhardt) 的配制 吸取 5% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1.2 mL 和纯化的 10% $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 溶液 50 mL, 混匀后加蒸馏水稀释 7 倍, 既为每 mL 相当于 $6.75\text{ }\mu\text{g}$ 4-邻甲氧基苯酚的标准母液。精密量取 0、1.25、2.5、5.0、7.5、10 mL 标准母液, 在 470 nm 波长

收稿日期: 2009-10-19

基金项目: 宁夏自然科学基金“甘草脱分化过程中细胞结构及生理变化的研究”(NZ0953)。

作者简介: 曹君迈 (1964—), 女, 宁夏银川市人, 教授, 本科, 硕士生导师, 从事细胞工程和细胞生物教学与科研工作。E-mail: junmaicao@163.com。

下测定不同浓度的标准母液的吸光值。以 4-邻甲氧基苯酚溶液浓度(x)对吸光度(y)进行回归,方程为: $y=0.0063x+0.0001, r=0.9999^{**}$,经检验 $P<0.01$,因此可用此方程进行定量测定。

1.5.2 愈伤组织过氧化物同工酶活性的测定 培养 24 d 时,分别选取不同外植体来源的愈伤组织,用滤纸吸去周围多余水分后,放入冰浴上的培养皿内按四分法纵向切取愈伤组织,每瓶切 4 块,迅速称取 1 g 愈伤组织。转入预先冷却的研钵中,用手术刀将其切成碎块后,加入石英砂,滴入几滴蒸馏水,研磨至浆,用蒸馏水定容至 10 ml,并在 4℃,15 000 rad/min 下离心 15 min,取上清液在 4℃冰箱中保存备用。取酶上清液 1 ml 至 10 ml 具塞试管中,加 0.1%愈创木酚 1 ml,摇匀后加蒸馏水 6.9 ml,最后加 0.18%双氧水 1 ml,立即计时并摇匀,25℃下反应 10 min,加 5%偏磷酸 0.1 ml 终止反应,在 470 nm,测定吸光值,计算出过氧化物酶活性^[14]。上述操作重复 3 次。

1.6 采集照片和计算结果

使用 OLYMPUS C-5060 White Zoom 型号数码相机拍下叶、芽、根状茎的愈伤组织过氧化物同工酶

酶带,并在 UVP GDS-8000System 凝胶成像系统下拍出电泳酶带,并使用 Labworks 软件捕捉酶带的迁移率 R_f 。由公式:相对迁移率(R_f)=酶带移动距离/指示剂移动距离^[15]。

根据吸光度按回归方程计算出 4-邻甲氧基苯酚的含量 $X(\mu\text{g/ml})$ 。由公式:POD 活性($\mu\text{g/gFW}$)= $X/\text{FW}(\text{g})$ ^[16](FW:样品鲜重)。并对 POD 活性进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 甘草愈伤组织的诱导

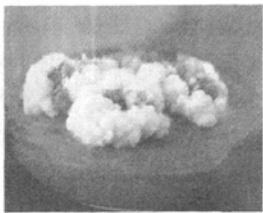
将外植体于 2008 年 5 月 8 日接于 MS+6-BA 2 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L 培养基,每 7 d 观察一次外植体的愈伤组织发生状况,结果见表 1。

不同外植体愈伤组织诱导率不同(表 1),芽的愈伤组织诱导率最高,为 100%,其次为叶,根状茎相对较差,为 90.3%。来源于芽的比来源于根状茎的愈伤组织形成时间相对早 15 d,芽和叶的愈组形成时间基本相同。根状茎和芽的愈组长势要优于叶的愈组长势(图 1)。

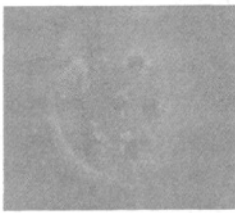
表 1 甘草不同外植体愈伤组织诱导

Table 1 Induction callus from different explants of *Glycyrrhiza uralensis*

外植体 Explant	接种数(块) Number of explants	愈组形成(d) Time of induction callus	愈组发生(块) Number of callus	愈组颜色 Color of callus	愈组程度 Degree of tightness	愈组诱导率(%) Percentage of induction callus
芽 Bud	28	23	28	黄绿色 Yellow green	较疏松 Looser	100
叶 Leaf	31	24	29	绿色 Green	较紧密 Tighter	93.9
根状茎 Rhizome	31	38	28	黄白 Yellow white	较疏松 Looser	90.3



芽 Bud



叶 Leaf



根状茎 Rhizome

图 1 甘草不同外植体诱导的愈伤组织

Fig.1 Callus from different explants of *Glycyrrhiza uralensis*

2.2 甘草不同来源愈伤组织过氧化物同工酶酶谱分析

甘草不同来源愈伤组织过氧化物同工酶酶谱见图 2。结果显示,3 种来源愈伤组织过氧化物同工酶谱型,除共有的酶带和酶带颜色深浅存在差异外,均具有各自差异性谱带,表现出具有一定的遗传相似

性和变异性。将谱带由负极向正极分为 A、B、C 三个区,呈现出各自的酶带数及特异酶带数目不同,叶形成的愈伤组织过氧化物酶在 A 区存在极强的活性酶带,且具有 P1、P2、P6 三条酶带;芽形成的愈伤组织过氧化物酶在 A 和 C 区存在极强的活性酶带,且具有 P1、P2、P3、P4 和 P6 五条酶带;根状茎形成的

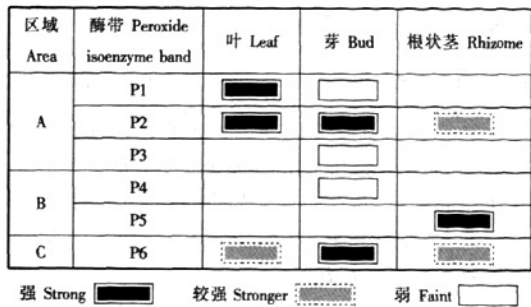


图 2 甘草不同来源愈伤组织过氧化物同工酶谱示意图

Fig.2 Electrophoretic patterns of peroxide isoenzymes from different callus

愈伤组织过氧化物酶在 B 区存在极强的活性酶带,且具有 P2、P5 和 P6 三条酶带。3 种来源愈伤组织的共有谱带为 P2 和 P6, P1 为叶和芽形成的愈伤组

织的共有谱带, P3、P4 和 P5 则为 3 种来源愈伤组织的差异谱带, 因此, P2 和 P6 谱带, 不具有组织特异性, 可以初步认为是鉴别乌拉尔甘草的特征谱带。P3、P4 和 P5 为 3 种来源愈伤组织过氧化物同工酶的差异谱带, 其充分表现出组织特异性。尤其芽愈伤组织的 P3 和 P4 谱带, 可能是进行再分化的差异谱带。因此, 选材时要注意组织特异性和位置效应对再分化的影响。因而 P3 和 P4 谱带的过氧化物同工酶差异性酶带, 可作为鉴别乌拉尔甘草再分化的参考依据之一。

2.3 过氧化物同工酶 R_f 值的比较分析

对电泳结果, 经 labworks 软件测定, 获得的甘草三种外植体产生的愈伤组织过氧化物酶酶带的迁移率见表 2。

表 2 甘草不同来源愈伤组织过氧化物酶酶带的相对迁移率 (R_f)

Table 2 The R_f of peroxide isoenzymes from different callus

外植体 Explant	P1	P2	P3	P4	P5	P6
根 Root	—	0.202	—	—	0.456	0.631
芽 Bud	0.122	0.191	0.280	0.404	—	0.620
叶 Leaf	0.126	0.191	—	—	—	0.620

不同来源愈伤组织过氧化物同工酶谱迁移率各不相同, 在供试样品中共显现 3 种谱型, 6 条酶带, 最多者 5 条, 最少者 3 条, 酶带迁移率 R_f 在 0.191~0.631 之间变化。叶、根状茎、芽愈伤组织的过氧化物同工酶谱带数分别为 3 条、3 条、5 条, 其中 3 个不同外植体之间有 2 条谱带的 R_f 基本相同, 为 P2 和 P6, 其 R_f 分别为 0.191 和 0.620 左右。芽和叶之间还有一条差异谱带, 为 P1, 其 R_f 为 0.122, 说明二者组织差异性较小。根状茎有一条差异谱带, 为 P5, 其 R_f 为 0.456; 芽有 3 条差异谱带, 分别为 P1、P3 和 P4, 其 R_f 分别为 0.122、0.280 和 0.404; 叶有 1 条差异谱带, 为 P1, 其 R_f 为 0.126。

2.4 甘草不同来源愈伤组织过氧化物同工酶活性的差异

对甘草根状茎、芽和叶的愈伤组织中过氧化物酶进行提取, 由于其浓度比较高, 故将其稀释 7 倍后, 用分光光度计测定其 470 nm 吸光值, 由方程 $y = 0.0063x + 0.0001$ ($R^2 = 0.9999$) 得: 稀释 7 倍后的根状茎的过氧化物酶浓度 $X = 8.079 \mu\text{g/ml}$, 未稀释的根状茎过氧化物酶浓度 $X = 8.079 \times 7 = 56.556 \mu\text{g/ml}$, 由公式 $\text{POD 活性}(\mu\text{g/gFW}) = X/\text{FW}(\text{g})$ 得出: 甘草根状茎过氧化物酶活性 = $56.556 \mu\text{g/ml} / (1\text{g} \times 1\text{ml}) = 56.556 \mu\text{g/g}$ 。同理, 可得出未稀释的甘草根状茎、芽、叶愈伤组织中的过氧化物酶活性(表 3)。

表 3 甘草愈伤组织过氧化物酶活分析

Table 3 Activity of peroxidase in callus from different explants of Glycyrrhiza uralensis

外植体 Explant	重复 Duplicate			平均值 $\pm S$ Average $\pm S$	酶活性 ($\mu\text{g/gFW}$) Activity of peroxidase
	I	II	III		
根状茎 Rhizome	0.053	0.050	0.051	0.051 ± 0.002	56.56 c
芽 Bud	0.094	0.088	0.089	0.090 ± 0.003	99.89 b
叶 Leaf	0.827	0.809	0.816	0.817 ± 0.009	907.67 a

3 种外植体愈伤组织过氧化物酶活性差异显著, 其中叶来源愈伤组织中过氧化物酶活性最高, 其

次为芽来源愈伤组织中过氧化物酶, 根状茎来源愈伤组织中过氧化物酶活性最弱。由此说明, 过氧化

物酶活性的差异也表现出组织特异性。

3 讨 论

1) MS + 6-BA 2 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L 培养基很适合诱导甘草愈伤组织,而且对根状茎、芽和叶这三种外植体的诱导效果都很好,这与作者在甘草愈伤组织再分化的研究中得出的愈伤组织诱导培养基结果一致^[4]。

2) 为了确保实验质量,愈伤组织取材是关键。在实验中对每个不同外植体来源的愈伤组织均接种 7 瓶,剔除感染后,选择生长健壮的愈伤组织 3 瓶,即:3 次重复。按 1.4 和 1.5.2 中的实验方法,获得的酶带重现性好,酶活性标准误差低,在 0.002 ~ 0.009。

3) 本实验得出芽的愈伤组织中过氧化物酶的活性高于根状茎的愈伤组织中过氧化物酶的活性,这种差异与在甘草愈伤组织再分化的研究中,以芽作为外植体形成的愈伤组织能够进行再分化,也就是形成再生植株,而以根段形成的愈伤组织不出现再分化现象的结论^[4]有吻合之处。3 种外植体来源的愈伤组织在脱分化过程中表现出酶活性的差异也可能是导致再分化产生差异的原因之一。

4) 据徐丽萍等^[17]在研究秤锤树插穗过氧化物酶活性及其同工酶的变化时认为,POD 同工酶的活性增加时,染色加深或条带增多,据此可以推导出叶或芽的愈伤组织中过氧化物酶活性比较高,根状茎次之,与本实验在酶活性测定时得出的叶来源的愈伤组织的活性最高,芽次之,根状茎最低这一结果一致。

5) 甘草根状茎和芽的愈伤组织长势优于叶的愈伤组织的长势,而在测定过氧化物酶活性时发现,叶来源的愈伤组织中过氧化物酶活性显著高于其它 2 种来源的愈伤组织中酶活性。植物组织有创伤时,组织结构的破坏导致膜质过氧化作用而抑制脱分化的进行,而 POD 活性的上升却可以解除膜质过氧化而导致的生长抑制,使脱分化顺利进行,过氧化物酶的另一个生理作用是作为吡啶乙酸氧化酶来发生作用,分解生长素从而抑制细胞的生长^[11]。我们认为,甘草叶的愈伤组织长势差的原因与其过氧化物酶活性过高有一定关系,很可能是因为过氧化物酶发生了吡啶乙酸氧化酶的作用。这与过氧化物酶活性过高,对生长表现出一定的抑制作用的结论相吻合^[18]。在进行植物过氧化物同工酶的研究时应考虑这两种作用,过氧化物同工酶与植物生长过程之间的关联比较复杂,过氧化物酶这两种作用之间

的关系还有待进一步研究。

4 结 论

1) 乌拉尔甘草不同来源的愈伤组织中过氧化物酶酶谱分为 A、B、C、三个区域,其中活性最强的是 A 区和 C 区,所有供试样品出现 3 种酶谱谱型,6 种酶谱谱带,P2 和 P6 为本品种的特征酶谱谱带,其余 4 种为差异酶谱谱带。

2) 叶的愈伤组织中过氧化物酶活性最高,芽的次之,根状茎的最低。过氧化物酶活性过高时不利于愈伤组织生长。

3) 乌拉尔甘草过氧化物酶特征酶谱谱带(P2 和 P6)及差异酶谱谱带(P3、P4 和 P5)的建立,为乌拉尔甘草种的鉴别及脱分化与再分化的细胞生物学机制研究提供了一定的参考依据。

参 考 文 献:

- [1] 付玉杰,祖元刚,Cunter Schwarz,等.甘草组织培养研究进展[J].ITCM,2001,18(3):22.
- [2] 芮和恺,忻晓君,顾惠芬,等.甘草的组织培养[J].植物生理学通讯,1986,(4):54.18(3):22.
- [3] 于清林,何茂泰,王照兰.甘草组织培养快速繁殖技术研究[J].中国草地,1999,1:12—14.
- [4] 曹君迈,陈彦云,任 贤.甘草愈伤组织再分化的研究[J].作物杂志,2003,(3):24—26.
- [5] 邹翠霞,王京刚,佟少明,等.刺果甘草的组织培养及植株再生[J].植物生理学通报,2006,42(6):1129—1130.
- [6] 曹君迈,陈彦云,任 贤,等.甘草组培快繁技术优化的研究[J].作物杂志,2006,(6):14—16.
- [7] 葛淑俊,李广敏,马靖英,等.乌拉尔甘草组培再生体系的研究[J].草业学报,2007,16(6):107—112.
- [8] 莫 庸,沈军队,肖 璐,等.新疆甘草属植物过氧化物酶同工酶分析[J].石河子农学院学报,1990,(3):52—54.
- [9] 朱 俭,蔡武城,俞 伟,等.甘草属过氧化物酶同工酶和配酶同功的的分析[J].复旦大学学报(自然科学版),1990,29(2):225—229.
- [10] 高文远,李志亮,肖培根.甘草种子萌发初期过氧化物酶的研究[J].中国中药杂志,1998,23(4):212—213.
- [11] 董相军,张影霞.抗生素在调控甘草脱分化过程中过氧化物酶活性的变化[J].安徽农业科学,2007,35(29):9169—9170.
- [12] 葛淑俊,李秀凤,谭冰海,等.不同处理对乌拉尔甘草种子发芽率及过氧化物酶活性的影响[J].种子,2008,27(9):42—45.
- [13] 萧浪涛,王三根.植物生理学实验技术[M].北京:中国农业出版社,2005:192—195.
- [14] 王 熊,罗士伟.烟草组织培养过程中过氧化物同工酶的变化[J].植物生理学报,1981,7(1):77—82.
- [15] 吉前华,郭雁君,梁广坚.德庆贡柑果实品质相关的同工酶分析[J].四川农业大学学报,2007,25(4):425—429.
- [16] 高俊凤.植物生理学实验技术[M].西安:世界图书出版公司,2000:192—193.

- [17] 徐丽萍,喻方园,上官新展. 秤锤树插穗过氧化物酶活性及其同工酶的变化[J]. 南京林业大学学报, 2008, 32(4): 143—146.
- [18] 王同坤,余凤鸣,刘庆香. 板栗叶片过氧化物酶活性与植株大

小及新梢生长量关系的探讨[J]. 河北农业技术师范学院学报, 1991, 5(4): 28—32.

Analysis of peroxidase isoenzymes from different callus of *Glycyrrhiza uralensis*

CAO Jun-mai, QI Jin-tao, LIU Jian-li, YAN Xing-fu, LI Man

(College of Biological Science and Engineering, North University for Nationalities, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: The electrophoretic patterns of peroxidase isoenzymes and peroxidase activity of callus induced from the rhizome, bud and leaf of *Glycyrrhiza uralensis* were analyzed with PAGE and spectrophotometry. The results demonstrated that the electrophoretic patterns of peroxidase isoenzymes from different callus were divided into A, B and C regions, in which the regions of A and C were the most active. All had 3 kinds of patterns and 6 bands. Meanwhile, the order of peroxidase activity from different callus were leaf > buds > rhizome. But too high peroxidase activity was not beneficial to the development of callus. P2 and P6 were common bands in 3 kinds of explants, while P1, P3, P4 and P5 were different bands. These could be used to identify *Glycyrrhiza uralensis* from other species and to study the differentiation and redifferentiation of *Glycyrrhiza uralensis*.

Keywords: *Glycyrrhiza uralensis*; callus; peroxidase isoenzyme

(上接第 122 页)

Study on senescence and chlorophyll fluorescence traits of stay-green leaf in wheat

WU Yong-sheng, XUE Hui, LIU Yang, GONG Yue-hua

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

Abstract: In order to investigate thoroughly the senescence and chlorophyll fluorescence traits of stay-green leaf in wheat, and to provide some theoretical base to screen for high yield wheat varieties in Northwest China, the green leaf area, pigment content, MDA content and the chlorophyll fluorescence parameters after anthesis were measured in 4 winter wheat varieties. The result showed that: (1) The green leaf area of stay-green wheat was obviously higher than non stay-green wheat, it decreased slowly at the late grain filling stage. (2) The pigment content of leaf in stay-green wheat decreased more slowly at the late grain filling stage. (3) The MDA content of leaves in wheat showed an increasing trend, but the MDA content of stay-green wheat increased more slowly and kept a lower level than non stay-green wheat. (4) During the late grain filling, the F_v/F_m , F_v/F_o , qP , $\phi PS II$ and ETR of stay-green wheat were obviously higher than the non stay-green wheat, but the qN of stay-green wheat was obviously lower than the non stay-green wheat. (5) The grain yield of stay-green wheat was high. All these suggested that the slower leaf senescence and longer photosynthesis period at the late grain filling stage of stay-green wheat led to a higher yield. So the stay-green wheat has better production superiority.

Keywords: stay-green; wheat; green leaf area; chlorophyll fluorescence