

白皮松胚性和非胚性愈伤组织生理生化特性研究

李 茜¹,张存旭²,秦 萍¹

(1 宁夏大学 新技术应用研究开发中心,宁夏 银川 750021;2 西北农林科技大学 林学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】探讨白皮松体细胞胚胎发生过程中各项生理生化指标与体细胞胚胎发生、发育的关系。【方法】以白皮松体细胞胚发生诱导阶段不同发育时期的胚性愈伤组织(EC)和非胚性愈伤组织(N-EC)为材料,对其不同培养时间(5,15,25 和 35 d)的可溶性蛋白质、可溶性糖和淀粉含量及抗氧化酶(POD,SOD,CAT)活性进行研究。【结果】EC 中可溶性蛋白质和可溶性糖含量均在培养 25 d 时达到峰值,N-EC 中可溶性蛋白和可溶性糖含量在培养 15 d 时达到峰值;EC 中淀粉含量呈现先上升后下降再上升的变化趋势,N-EC 淀粉含量一直呈下降趋势。EC 中抗氧化酶活性明显高于 N-EC,SOD 活性在培养 15 d 时达到峰值,表明 SOD 在体细胞胚诱导初期起主导作用;EC 的 CAT 和 POD 活性均在培养 25 d 时达到峰值,说明 CAT 和 POD 在体细胞胚发生过程中对胚性细胞的进一步分化和发育起主导作用。【结论】白皮松体细胞胚胎发生诱导阶段,EC 的生理生化代谢活性高于 N-EC。

【关键词】 白皮松;体细胞胚胎发生;胚性愈伤组织;非胚性愈伤组织;生理生化特性

【中图分类号】 S791.243 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)08-0151-05

Physiological and biochemical characteristics of Embryogenic Callus and Non-embryogenic Callus in *Pinus bungeana*

LI Qian¹,ZHANG Cun-xu²,Qin Ping¹

(1 Development Center of New Technique Application and Research ,Ningxia University,Yinchuan ,Ningxia 750021,China;
2 College of Forestry,Northwest A&F University,Yanglinging ,Shaanxi 712100,China)

Abstract: 【Objective】 The study investigated the correlation between physiological and biochemical characteristics and somatic embryogenesis in *Pinus bungeana*. 【Method】 Different developmental stages of Callus were induced from immature zygotic embryos. The contents of soluble protein, soluble sugar and starch,the different activities of antioxidant enzymes between embryogenic callus (EC) and non-embryogenic callus (N-EC) were examined. 【Result】 The soluble protein and soluble sugar content of EC reached maximum on 25th d,and those of N-EC reached maximum on 15th d. The starch content of EC presented to rise first and then drop,and reached its maximum on 15th d. while N-EC presented the drop tendency. All antioxidants enzyme activities of EC were much higher than those of N-EC. The SOD activity peak value achieved on 15th d of EC,so SOD played a dominant role in the induction of somatic embryos. The peak value achieved on 25th d for CAT and POD,playing an dominating role in the differentiation and development of somatic embryos. 【Conclusion】 Physiological biochemistry metabolic activity of EC is much higher than N-EC during the process of inducing somatic embryos in *Pinus bungeana*.

Key words: *Pinus bungeana* ; embryogenic callus; ono-embryogenic callus; Somatic embryogenesis; Physiological and biochemical characteristic

* [收稿日期] 2007-09-07
[基金项目] 宁夏大学青年教师科研启动项目(QNZ0618);陕西省科技发展计划项目(2003K02-G8-03)
[作者简介] 李 茜(1981—),女,陕西汉中,助理研究员,硕士,主要从事林木遗传育种研究。E-mail:li_q@nxu.edu.cn

白皮松(*Pinus bungeana* Zucc. ex Endl.)又名白骨松,为松科松属常绿乔木,是我国特有乡土树种,也是我国北方和西部地区园林绿化与生态工程造林的优良树种^[1]。近年来,随着植物组织培养技术的提高,对植物体细胞胚发生过程的研究,已不局限于形态学和细胞胚胎学的直观描述,而是进一步研究细胞胚胎发育过程中的生理生化机理。植物体细胞胚在发生和发育过程中,可溶性蛋白和可溶性糖含量的变化在挪威云杉^[2]和龙眼^[3]等树种中已有相关报道;抗氧化酶活性在花楸^[4]、枸杞^[5]、石刁柏^[6]、小麦^[7]和大蒜^[8]等也已有报道。但在白皮松体细胞胚发生过程中,仅见对胚性愈伤组织诱导影响因素^[9]及体胚发生^[10]的报道,而对体细胞胚发生过程中生理生化特性的研究尚属空白。为此,本试验以白皮松体细胞胚发生过程中诱导的胚性愈伤组织(EC)和非胚性愈伤组织(N-EC)为材料,分别对体细胞胚发生过程中的相关生理生化指标进行了初步研究,以期探讨体细胞胚发生的分子基础,掌握细胞分化过程中有关蛋白质和酶的动态变化规律,为优化白皮松起始诱导培养基的组成、提高 EC 的诱导率提供科学依据,为进一步揭示白皮松体细胞胚的发生机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

于 2006-06-30 在西北农林科技大学校园内选取 1 株长势健壮、无病虫害、大约 30 年树龄的白皮松为采集木,采摘球果并取未成熟种胚接种于 DCR1 培养基中暗培养(培养基中同时添加 6 mg/L 2,4-D、2 mg/L 6-BA、500 mg/L 水解酪蛋白和 500 mg/L L-谷氨酰胺)。分别采集诱导培养 5、15、25 和 35 d 的愈伤组织作为试验材料。

1.2 测定指标与方法

不同培养时间愈伤组织可溶性蛋白质含量采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定^[11];可溶性糖和淀粉含量采用蒽酮比色法测定^[12];超氧化物歧化酶(SOD)活性采用氮蓝四唑还原法测定^[13];过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚比色法测定^[14];过氧化氢酶(CAT)活性采用高俊凤的方法^[15]测定。每项指标均重复测定 3 次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 白皮松未成熟合子胚诱导形成的愈伤组织

白皮松的未成熟合子胚诱导形成的愈伤组织有

2 种类型:一种为胚性愈伤组织(EC),是具有产生胚状体能力的愈伤组织;另一种为非胚性愈伤组织(N-EC),指只具有细胞增殖能力、而没有胚胎发生能力的愈伤组织。EC 呈浅白或白色,半透明,粘质状,结构较疏松,表面常呈透明丝状,在低倍光学显微镜下观察,可见细胞较小,排列紧密,细胞核大而明显,细胞质浓厚,具有分化能力;N-EC 黄色或浅黄,透明或半透明,结构疏松,表面湿润而粗糙或呈结晶状,在低倍光学显微镜下观察,可见组织细胞排列松散而核小,近圆形,继代培养之后只发生体积上的扩增,没有胚状体的分化。

2.2 白皮松体细胞胚发生过程中可溶性蛋白质含量的变化

体胚发生需要大量的蛋白质,有研究表明 EC 的蛋白质含量远高于 N-EC^[16-18]。由图 1 可以看出,在白皮松体细胞胚胎发生过程中,EC 和 N-EC 可溶性蛋白质含量呈现出不同的变化趋势:EC 中可溶性蛋白含量明显高于 N-EC,表明前者的代谢较后者活跃;随着培养时间的延长,EC 可溶性蛋白质的合成速率明显增加,在培养 25 d 时达到最大值 5.75 mg/g,为体细胞的进一步发育提供了物质基础,之后其含量下降,但仍高于诱导初期(培养 5 d 时)。N-EC 中可溶性蛋白含量在培养 15 d 时达到峰值,之后其含量下降。

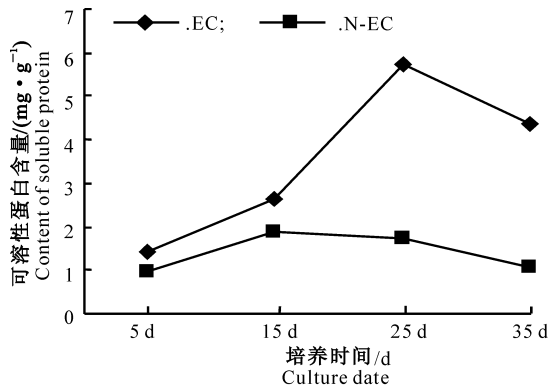


图 1 白皮松 EC 和 N-EC 中可溶性蛋白质含量的变化

Fig. 1 Changes of soluble protein in EC and N-EC of *Pinus bungeana*

2.3 白皮松体细胞胚发生过程中可溶性糖含量的变化

从图 2 中可以看出,不同愈伤组织其可溶性糖含量呈现出不同的变化趋势,EC 中可溶性糖含量随着培养时间的延长逐渐上升,并于培养 25 d 时达到峰值(36.58 mg/g),为新的发育阶段积累了物质和能量,并预示着新的发育状态即将开始;25 d 后可溶

性糖含量有所下降。N-EC 中可溶性糖含量在培养 15 d 时达到了最大值(33.21 mg/g),随后下降。N-EC 中可溶性糖含量也有一个积累高峰,说明也为细胞的分裂积累了物质和能量,但是结合细胞学观察可知,N-EC 只进行分裂生殖,并没有进一步胚性细胞的分化与发育。

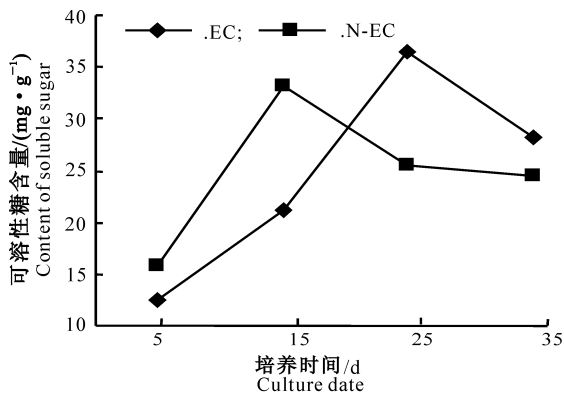


图 2 白皮松 EC 和 N-EC 中可溶性糖含量的变化

Fig. 2 Change of soluble sugar in EC and N-EC of *Pinus bungeana*

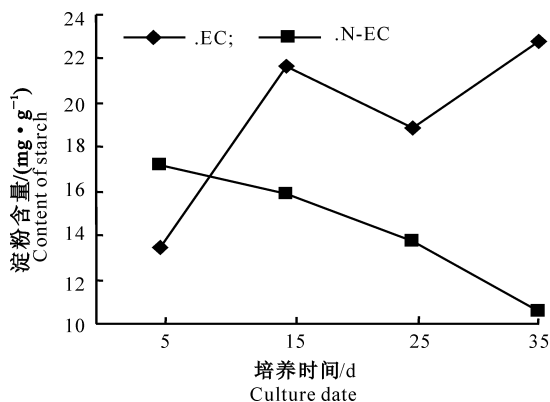


图 3 白皮松 EC 和 N-EC 中淀粉含量的变化

Fig. 3 Changes of starch in EC and N-EC of *Pinus bungeana*

2.6 白皮松体细胞胚发生过程中 CAT 活性的变化

由图 5 可以看出,EC 和 N-EC 中 CAT 活性均呈先上升后降低的趋势;EC 中 CAT 活性在培养 5~25 d 呈上升趋势,25 d 时达到峰值,25 d 后明显降低,且低于培养 5 d 时的酶活;N-EC 中 CAT 活性在培养 15 d 时达到峰值,随后逐渐下降,但变化幅度不大,CAT 活性水平较平稳。在培养过程中,胚性细胞的分化会产生大量的 H_2O_2 ,EC 中的 CAT

2.4 白皮松体细胞胚发生过程中淀粉含量的变化

不同愈伤组织中淀粉含量的变化如图 3 所示。从图 3 可以看出,在白皮松体细胞胚发生过程中,EC 和 N-EC 淀粉含量呈现出完全不同的变化趋势:EC 淀粉含量随培养时间的延长呈现出先升后降再上升的变化趋势,培养 15 d 时出现第 1 个高峰(21.70 mg/g),到 25 d 时淀粉含量下降到 18.84 mg/g,35 d 时又达第 2 个高峰(22.78 mg/g);N-EC 中淀粉含量一直呈下降趋势,其含量从 17.15 mg/g 下降到 10.60 mg/g。

2.5 白皮松体细胞胚发生过程中 SOD 活性的变化

氧胁迫与细胞分化有关,SOD 活性的增加与细胞分化频率成正比,对胚性细胞的分化及早期胚胎发育有促进作用^[19-20]。图 4 表明,在 EC 和 N-EC 中,SOD 活性的变化趋势基本一致,均在诱导培养 15 d 时出现峰值,然后酶活性下降;EC 中 SOD 酶活性明显高于 N-EC;在培养的 5~15 d,EC 的 SOD 活性明显上升,此时可能是胚性细胞分裂形成早期原胚的时期,随着早期原胚的进一步分裂、发育,酶活性又开始下降,说明 SOD 参与了白皮松胚性细胞早期分化和发育的调节。

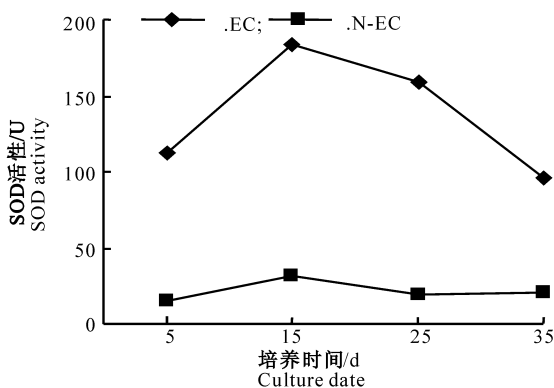


图 4 白皮松 EC 和 N-EC 中 SOD 活性的变化

Fig. 4 Changes of SOD activity in EC and N-EC of *Pinus bungeana*

活性的升高,可以防止 H_2O_2 浓度过高对胚性细胞形成和体细胞胚发育产生的抑制作用。

2.7 白皮松体细胞胚发生过程中 POD 活性的变化

POD 是与能量和呼吸代谢密切相关的酶。由图 6 可以看出,EC 的 POD 活性随着培养时间的延长呈先上升后降低的变化趋势,在培养 25 d 时活性达到峰值,表明此时物质代谢和呼吸作用都十分旺盛;N-EC 中 POD 活性的变化幅度很小,基本保持在一个水平。由此推测,POD 在体细胞胚发生过程

中起着重要的调节作用。

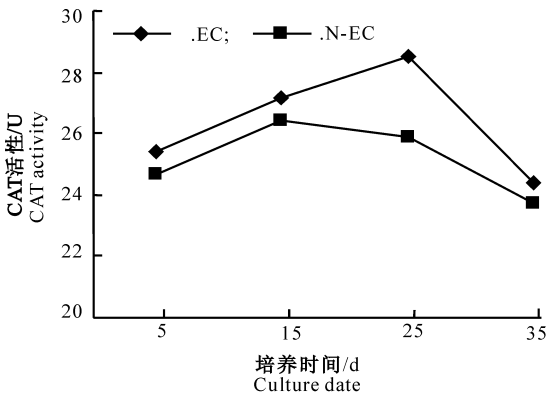


图 5 白皮松 EC 和 N-EC 中 CAT 活性的变化

Fig. 5 Changes of CAT activity in EC and N-EC of *Pinus bungeana*

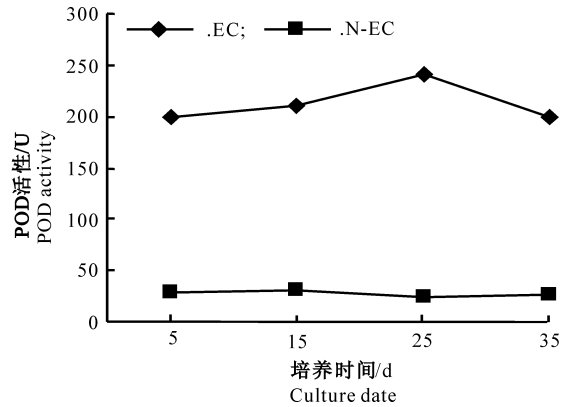


图 6 白皮松 EC 和 N-EC 中 POD 活性的变化

Fig. 6 Changes of POD activity in EC and N-EC of *Pinus bungeana*

3 讨论与结论

植物体细胞胚的发生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。胚性细胞的分化和发育是一个及其复杂的过程,受基因的调控,是基因顺序表达的结果^[21]。本研究发现,在白皮松体细胞胚发生过程中,EC 的可溶性蛋白质含量远高于 N-EC,这与对栓皮栎^[22]、棉花^[23]的体细胞胚研究结果相同;EC 细胞内可溶性蛋白质含量明显提高,表明 EC 代谢旺盛,将从培养基中获得的有机与无机成分转变成能量和细胞组成物质,并大量积累蛋白质,以备细胞分化之用。

在植物的体细胞胚胎发生中,碳水化合物作为渗透调节剂对体细胞胚的诱导和发育具有重要作用。可溶性糖作为一种能源消耗物质,将为新陈代谢活跃的胚性细胞提供充足的能源^[24]。本研究结果表明,在白皮松体细胞胚诱导过程中,EC 的可溶性糖出现一个积累高峰,随后含量下降,表明当胚性细胞形成以后,糖类物质转化成可溶性蛋白质,为体胚的进一步发育准备物质基础。

淀粉等物质的积累与植物胚状体发生潜能的实现密切相关。淀粉经淀粉酶水解成葡萄糖后,参与细胞内各种生理、生化反应,以直接或间接的方式影响胚状体的发生^[25]。本研究中,在白皮松体细胞胚诱导培养的 15~35 d,EC 中淀粉含量高于 N-EC,且出现 2 次积累高峰,表明淀粉是一种在体细胞胚胎发生过程中积极参与形态建成的代谢物质;EC 淀粉含量在培养 15 d 时有一个积累高峰,这与高述民等^[26]对大蒜的研究结果一致。

所有需氧生物都必须依赖氧才能获得能量和维持生命,体胚发生必然也有活性氧的参与。SOD、POD 和 CAT 是植物重要的抗氧化酶类,其能清除植物体内因受外界损伤而产生的活性氧。在体细胞胚胎诱导初期,SOD 活性升高,产生较多的 H_2O_2 ,低浓度的 H_2O_2 可促进体细胞胚发生,而高浓度 H_2O_2 则有毒害作用^[22]。外源 H_2O_2 处理可以诱导细胞内 CAT、POD 基因的转录^[27],因而 POD 活性增加可加快对 H_2O_2 的清除,以维持细胞内活性氧的平衡。本研究结果显示,白皮松体细胞胚发生过程中,EC 的 SOD、POD 和 CAT 活性均高于 N-EC,二者活性的高低反映了其生理状态的不同,说明 EC 细胞的适应性、抗逆性较 N-EC 强。EC 中的 3 种抗氧化酶活性高,对蛋白质、核酸、酶、脂膜的稳定以及胚性细胞的进一步分化,有着极其重要的调节作用。

[参考文献]

- [1] 树木志. 中国主要树种造林技术 [M]. 北京:中国林业出版社, 1983.
Trees will Editorial Board, The major species afforestation technology of China [M]. Beijing: China Forestry Publishing company, 1983. (in Chinese)
- [2] 张建瑛, 杨 玲, 沈海龙. 花椒体细胞胚发生过程中抗氧化酶活性的变化 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(2): 264-268.
Zhang Jian-ying, Yang Ling, Shen Hai-long. Changes of antioxidative enzyme activity in somatic embryogenesis of *Sorbus pohuashanensis* Hedl [J]. Plant Physiology Communications, 2007, 43(2): 264-268. (in Chinese)
- [3] Lipavska H, Svobodova H, Albrechtova J. Carbohydrate status during somatic embryo maturation in Norway spruce [J]. In *Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 2000, 36: 260-

- 267.
- [4] 李冬梅. 龙眼体细胞胚胎成熟机理的研究 [D]. 福建:福建农林大学,2003.
- Li D M. Mechanism of the somatic embryo maturation in Longan [D]. Fujian: Fujian Agriculture And Forestry Univeisity, 2003. (in Chinese)
- [5] Cui K, Xing G, Wang Y. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barum* L [J]. *Plant Science*, 1999, 146: 9-16.
- [6] Yang H P, Cheng J ZH, Zhou J Y. Changes in protein and during embryogenesis of *Asparagus of ficinalis* L [J]. *Acta Biol Exp Sin*, 1992, 25(1): 17-23.
- [7] 王亚馥, 崔凯荣, 汪丽虹. 小麦体细胞胚胎发生的蛋白质组分和过氧化物酶同工酶的变化 [J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 1993, 29(3): 189-193.
- Wang Y F, Cui K R, Wang L H. Changes in protein pattern and peroxidase isozyme during embryogenesis of *triticum aestivum* L [J]. *Journal of Lanzhou University: Naturural Science Edition*, 1993, 29(3): 189-193. (in Chinese)
- [8] 詹园凤, 吴 震, 金潇潇, 等. 大蒜体细胞胚胎发生过程中抗氧化酶活性变化及某些生理特征 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(9): 1799-1802.
- Zhan Y F, Wu Zh, Jin X X, et al. Anti-oxidative enzymes and some physiological features in somatic embryogenesis of garlic [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, 26(9): 1799-1802. (in Chinese)
- [9] 李 茜, 张存旭, 郑瑞杰. 白皮松胚性愈伤组织诱导因素的研究 [J]. 西北林学院学报, 2006, 21(2): 80-83.
- Li Q, Zhang C X, Zheng R J. Factors influencing the initiation of embryogenic callus in *Pinus bungeana* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2006, 21(2): 80-83. (in Chinese)
- [10] Zhang C X, Li Q, Li S K. Induction, development and maturation of somatic embryos in Bunge's pine [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2007, 19: 273-280.
- [11] 杨光彩. 生物化学实验指导 [M]. 广东广州: 华南理工大学出版社, 2005.
- Yang G C. Biochemical experiments guidance [M]. Guangzhou, Guangdong: South China University of Technology Press, 2005. (in Chinese)
- [12] 华东师范大学生物系植物生理教研组. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1983.
- East China Normal University, Department of Biology, Plant Physiology office. Experimental Plant Physiology guidance [M]. Beijing: People's Education Press, 1983. (in Chinese)
- [13] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- Li H S. Experiment principle and technology of plant Physiology and Biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Publishing Company, 2000. (in Chinese)
- [14] 龚富生, 张嘉宝. 植物生理学实验 [M]. 北京: 气象出版社, 1995.
- Gong F S, Zhang J B. Plant physiology experiment [M]. Beijing: Meteorological Press, 1995. (in Chinese)
- [15] 高俊凤. 植物生理学实验技术 [M]. 陕西西安: 世界图书出版公司, 2000.
- Gao J F. Plant physiology experimental technology [M]. Xi'an, Shaanxi: World Books Publication Company, 2000. (in Chinese)
- [16] 崔凯荣, 王晓哲, 陈 雄, 等. 小麦体细胞胚发生中 DNA, RNA 和蛋白质的合成动态 [J]. 核农学报, 1997, 11(4): 209-214.
- Cui K R, Wang X Z, Chen X, et al. Change in synthesis of DNA, RNA and protein during somatic embryogenesis in wheat [J]. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 1997, 11(4): 209-214. (in Chinese)
- [17] 杨和平, 程井辰, 周吉源, 等. 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]. 实验生物学报, 1992, 25(1): 16-22.
- Yang H P, Cheng J C, Zhou J Y, et al. Studies on the changes of soluble protein and isoenzymes during somatic embryogenesis of *asparagus officinalis* [J]. *Acta Biologiae Experiment Sinica*, 1992, 25(1): 16-22. (in Chinese)
- [18] Fujimira T, Kommie A, Matsiomo H. Aspects of DNA, RNA and protein synthesis during somatic embryogenesis in the carrot cell suspension culture [J]. *Plant Physiol*, 1980, 49: 255-260.
- [19] 崔凯荣, 任红旭, 邢更妹, 等. 枸杞组织培养中抗氧化酶活体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.
- Cui Kai-rong, Ren Hong-xu, Xing Geng-mei, et al. The positive correlations between the activities of antioxidant enzymes and somatic embryogenesis during the period of tissue culture in *Lyciumbarbarum* L [J]. *Journal of Lan Zhou University: Natural Sciences Edition*, 1998, 34(3): 93-99. (in Chinese)
- [20] Coppens L, Gillis E. Isoenzyme electrofocusing as a biochemical marker system of embryogenesis and organgensis in callus tissues of *Hordeum vulgare* L [J]. *J Plant Physiol*, 1987, 127: 153-158.
- [21] 邢更生, 崔凯荣, 山 仑, 等. 植物体细胞胚发生的分子基础 [J]. 遗传, 1999, 21(1): 30-34.
- Xing G S, Cui K R, Shan L, et al. Molecular foundation in plant somatic embryogenesis [J]. *Hereditas*, 1999, 21(1): 30-34. (in Chinese)
- [22] 张存旭. 栓皮栎体细胞胚胎发生及生化特性的研究 [D]. 陕西: 西北农林科技大学, 2007.
- Zhang C X. Somatic embryogenesis and biochemical characteristics in *Quercus Variabilis* Bl [D]. Shaanxi: Northwest A&F University, 2007. (in Chinese)
- [23] 李付广, 李秀兰, 李凤莲. 棉花体细胞胚胎发生及主要物质生化代谢机制 [J]. 河南农业大学学报, 1994, 28(3): 313-316.
- Li F G, Li X L, Li F L. Changes of major biochemical metabolites in somatic embryogenesis of cotton [J]. *Acta Agriculture University Henanensis*, 1994, 28(3): 313-316. (in Chinese)