

组培平贝母形态转变过程中过氧化物酶同工酶变化的研究

孙 丹, 朴炫春², 刁艳玲¹, 高 日², 于 洋³, 廉美兰²

(1. 黑龙江省农业科学院 作物育种所, 黑龙江 哈尔滨 150086 2. 长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室(延边大学), 吉林 延吉 133002;
3. 黑龙江省农业科学院 耕作栽培所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要:以平贝母为供试材料,研究了组培平贝母培养过程中培养体不同发育时期的过氧化物酶同工酶的变化。结果表明:在发育过程中各培养体的过氧化物酶同工酶在形成小鳞茎后酶带比较稳定,且酶带数最多,达到8条,愈伤组织在 $R_f=0.275$ 处出现了颜色较浅且细的特异性带,而其它时期的培养体则没有此带,其活性也在刚形成小鳞茎时达最高。

关键词:平贝母;培养体;过氧化物酶
中图分类号:S 567.23⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)07-0185-03

贝母为百合科(Liliaceae)贝母属(*Fritillaria* L.)的多年生草本植物,在我国已有2 000多年的药用历史,是重要的中药材^[1]。中国贝母可分为浙贝母、川贝母、平贝母和伊贝母四大类^[2]。其中平贝母(*Fritillaria ussuriensis* Maxim.)为我国东北长白山区特有的药用贝母,国家药典中记载的中药材。记载其药效与川贝母近似,味甘而补肺,治虚寒咳嗽,是目前国内四大药用商品贝母之一。目前川贝母、浙贝母是国内细胞工程研究较多的主流品种,而经常代替川贝母入药的平贝母的研究还处于基础阶段,对平贝母形态发生和发育时期的生理学的研究还较少。因此,该试验研究了组培平贝母培养过程中培养体不同发育时期的过氧化物酶同工酶的变化,为进一步深入研究贝母器官发生的机理和分子研究提供生理方面的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

平贝母(*Fritillaria ussuriensis* Maxim.)于2005年春季购自吉林省敦化市江源镇生长健壮的4 a生新鲜平贝母(约1.0 g)鳞茎,消毒后剥去外鳞片后在双筒解剖镜无菌条件下取茎尖约0.2 mm,接种于 2.5×10^3 (Φ×h)的

试管中,培养基为MS+萘乙酸(NAA) 0.5 mg/L+6-苄基腺嘌呤(6-BA) 2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L, pH 值为5.8。当接种的茎尖上形成愈伤组织后,将其接种于MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L, pH 5.8培养基中进行继代增殖培养。当形成小鳞茎后,接种于MS+KT 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 50 g/L+琼脂 7 g/L(pH 5.8)的培养基中培养,培养条件为温度(25±2)℃,相对湿度70%,利用日光灯将光照强度调节为1 600 lx,光照16 h/d,每隔4周继代1次。将组培平贝母按照培养的不同发育阶段可分为愈伤组织、胚状体、小鳞茎-1(约0.1 g)和小鳞茎-2(约0.5 g)。

1.2 试验方法

1.2.1 过氧化物酶(POD)活力的测定 POD活性测定采用愈创木酚法^[3]。

1.2.2 聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)同工酶电泳 样品制备。称取平贝母供试样品0.3 g左右,加入0.6 mL提取缓冲液(0.1 mol/L pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,其中含0.5 mol/L蔗糖,0.06 mol/L抗坏血酸,0.006 mol/Lβ巯基乙醇)^[4],加液氮研磨成细末后,放入小样品管中,提取同工酶。将样品混匀的提取液在0~4℃条件下经10 000 rpm离心15 min,然后取上清液加入1/4倍(v/v)的50%甘油,即为酶粗提取液,并于-20℃冰箱中保存,用于聚丙烯酰胺凝胶电泳。同工酶电泳。过氧化物酶同工酶电泳采用胡能书^[5]的方法。

2 结果与分析

2.1 过氧化物酶(POD)同工酶电泳的分析

POD是一种常见的氧化酶,广泛分布于植物的各器

第一作者简介:孙丹(1983-),女,硕士,研究实习员,现从事植物细胞工程的研究工作。E-mail: sundan227318@163.com。
通讯作者:廉美兰(1963-),女,博士,教授,现从事植物组织培养和生物反应器的研究工作。
基金项目:延边大学科技发展计划资助项目(延大科合字(2008)第05号)。
收稿日期:2009-11-20

官组织中,与体内许多生理代谢过程有关。从 POD 电泳结果来看,不同发育阶段培养体的 POD 同工酶电泳在谱带总数、分布和强度等方面都表现出一定的差异性(图 1)。

不同阶段培养体 POD 均表现出较强的酶活性(表 1)。整个酶谱出现 6~8 条酶带,酶带总类型为 9 条。在相对迁移率(R_f)0.142、0.341、0.375 和 0.433 处为共有的酶带,即平贝母组培过程中的 POD 的特征酶带,说明平贝母组培的不同发育阶段具有某些相似的生理活性,表现出组培平贝母的共性,但 3 处的酶活性强弱又不相同。在 R_f 为 0.142 时,所有的酶带颜色都较深且宽,该处酶活性较强,说明在鳞茎生长发育的各阶段都需要该酶的参与,而且不受环境的影响,编码它的结构基因在整个过程中处于活跃的表达状态^[4,9]。而 R_f 为 0.433 时,所有酶带颜色都较浅且窄,酶活性较弱(图 1)。

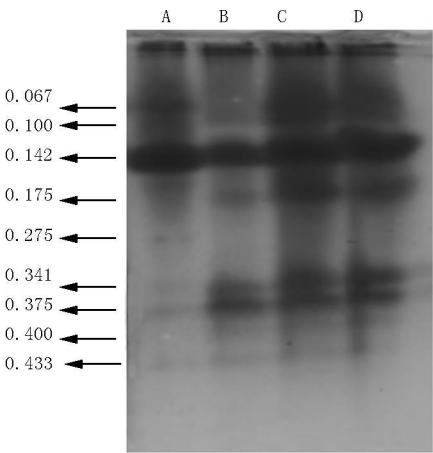


图 1 组培过程中平贝母不同阶段培养体 POD 同工酶电泳图谱
注: A: 愈伤组织 B: 胚状体 C: 小鳞茎-1; D: 小鳞茎-2。

不同发育阶段的培养体间,酶谱的酶带数量和类型有差异。在 $R_f=0.275$ 处,愈伤组织中出现了颜色较浅且细的特异性带,而其它时期的培养体则没有此带,说

明此酶带为组培愈伤组织生理代谢所必需的特征性酶带;而在形成鳞茎后酶带就比较稳定。

2.2 过氧化物酶(POD)活力的分析

通过测定组培平贝母不同发育阶段培养体的 POD 活力(图 2),发现从愈伤组织到胚状体转变过程中,培养体内 POD 活性无明显差异,但从胚状体到刚形成小鳞茎阶段迅速上升,而从鳞茎-1 到膨大的鳞茎-2 的过程中 POD 活性有所下降,代谢活动降低。在形成小鳞茎阶段酶活性达到最高值,这与上述的同工酶电泳结果相似。

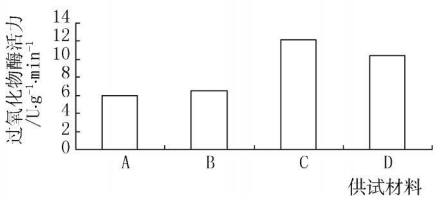


图 2 组培过程中平贝母不同阶段培养体 POD 活性变化
注: A: 愈伤组织 B: 胚状体 C: 小鳞茎-1; D: 小鳞茎-2。

3 讨论

在组培平贝母培养体不同的发育过程中发现,不同的发育时期酶带的强弱和出现位置不尽相同。从试验的结果可以看出,平贝母不同时期的 POD 带较丰富,因此 POD 可以成为鉴定贝母品种的一种酶。而愈伤组织在相对迁移率(R_f)0.275 处出现了其它时期没有的特异性酶带,说明此酶带为愈伤组织生理代谢所必需的特征性酶带,所以某种同工酶可作为器官发生的特异性指标。从胚状体到膨大的小鳞茎的形成过程中酶带主要集中在 $R_f=0.142\sim0.175$ 和 $R_f=0.341\sim0.433$ 区域,发育成小鳞茎后酶带就比较稳定,没有变化,说明鳞茎的器官已经形成,POD 不再参与器官分化。POD 活性变化在刚形成小鳞茎时达到最高值,这可能与此时细胞代谢活动旺盛有关,这与同工酶电泳结果相似。这种规律的变化进一步说明了 POD 参与了鳞茎的形成与发育。

参考文献

[1] 朱四易. 中国贝母属植物研究[M]. 西安: 西北大学出版社, 1995, 15.
[2] 王文杰. 贝母[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1990, 219-220.
[3] 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, 2003, 164-165.
[4] 蔡朝晖, 高山林, 李萍. 组培蒲析贝母鳞茎形成中的同功酶电泳分析[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(1): 16-18.
[5] 胡能书, 万国贤. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学出版社, 1985, 106-110.
[9] 李强, 傅华龙, 卿人韦, 等. 组培川贝母鳞茎形成和发育过程中的同功酶分析[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(6): 610-613.

表 1 组培过程中平贝母不同阶段培养体 POD 同工酶的相对迁移率(R_f)

酶带	发育时期			
	愈伤组织	胚状体	小鳞茎-1	小鳞茎-2
I	0.067	—	0.067	0.067
II	0.100	—	0.100	0.100
III	0.142	0.142	0.142	0.142
IV	—	0.175	0.175	0.175
V	0.275	—	—	—
VI	0.341	0.341	0.341	0.341
VII	0.375	0.375	0.375	0.375
VIII	—	0.400	0.400	0.400
IX	0.433	0.433	0.433	0.433

珍稀濒危黑桫欏的孢子繁殖技术初探

张祖荣¹, 张绍彬^{1,3}

(1.重庆文理学院 生命科学系 重庆 永川 402168; 2. 西南大学 生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715;
3.重庆高校园林花卉工程研究中心, 重庆 永川 402160)

摘 要:从重庆缙云山采集的华南黑桫欏和齿叶黑桫欏孢子, 消毒处理后, 分别播种于未经消毒和经过消毒处理的 3 种培养土上, 在保证水分条件的情况下, 对温度和光照条件进行单因素、三水平的分组试验。结果表明:2 种黑桫欏的孢子繁殖对培养土和培养条件的要求非常一致, 培养土以未经消毒的原生境土为最好, 光照条件以自然散射光照为最好, 温度条件则以当地的自然变温为最好; 从配子体的受精到孢子体的形成是整个孢子繁殖过程的关键。

关键词: 华南黑桫欏; 齿叶黑桫欏; 孢子繁殖
中图分类号: S 567.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)07—0187—04

华南黑桫欏(*Gymnosphaera metteniana*)和齿叶黑桫欏(*Gymnosphaera denticulata*)为桫欏科(*Gyaetheaceae*)黑桫欏属(*Gymnosphaera*)的 2 种蕨类植物, 主要分布于我国的西南和华南山区。作为第四纪冰川的子遗植物, 它们同桫欏一样被称为植物界的活化石^[1]。它们不仅在研究植物进化以及古代自然地理环境方面有着极其重要的地位, 而且还具有祛风除湿、活血化瘀、清热止咳等药用价值^[2], 同时也是 2 种极具观赏价值的大型珍稀树

状蕨类^[3]。由于人们对其赖以生存的森林环境的严重破坏, 使其本来就不多的植株数量更是逐渐减少, 再加上人们为了取其药用和引种观赏而对野生植株进行私挖乱采, 从而导致本来就十分稀少的野生资源已经处于濒危状态^[4], 因此, 这 2 种黑桫欏都被列入了国家二级保护植物和限制出口物种名录^[5]。

目前, 有关这 2 种黑桫欏的研究较少, 且主要集中在资源现状与保护对策方面^[6]。为了进一步做好这 2 种黑桫欏的资源保护和合理利用工作, 如何利用人工手段来迅速增大其个体数量是当务之急。根据报道^[7], 对蕨类植物的孢子进行人工繁殖, 具有繁殖系数大、繁殖成本低、变异性小等特点, 是人工快速繁殖育苗的有效途径, 因此, 课题组对这 2 种黑桫欏的孢子进行了人工繁殖试验, 并取得了初步成果。

1 材料与方法

第一作者简介: 张祖荣(1966-), 男, 硕士, 重庆江津人, 副教授, 主要从事植物种植类基础学科的教学与研究工作。E-mail: yuxixu-eyuan12@163.com。
基金项目: 重庆市教委自然科学基金资助项目(kj071204); 三峡库区生态环。
收稿日期: 2009—11—20

Study on the Isozyme Changes of Peroxidase of *Fritillaria ussuriensis* During Morphogenesis

SUN Dan¹, PIAO Xuan-chun², DIAO Yan-ling¹, GAO Ri², YU Yang³, LIAN Mei-lan²

(1. Grop Breeding Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain and Functional Molecules(Yanbian University), Ministry of Education, Yanji, Jilin 133002; 3. Grop Cultivation Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: The current study taking *Fritillaria ussuriensis* Maxim. as experiment material, and the research objective were measuring peroxidase isozyme changes in cultures of *Fritillaria ussuriensis* Maxim. during different stage of tissue culture. The results showed that POD isozyme bands were stable and got highest of 8 bars and callus presented light colour and thin band at Rf=0.275 after forming small buldlet, while other period cultures did not have the band in cultures during different stage of tissue culture. POD activity maximized at forming small buldlet.

Key words: *Fritillaria ussuriensis* Maxim. ; cultures; POD