

掌叶木种子萌发过程中过氧化物酶和超氧化物歧化酶同工酶分析

李 磊¹, 李雪萍², 郭 松^{1,3}, 彭 健¹, 李在留^{1,4}

(1. 广西大学 林学院, 广西 南宁 530004; 2. 河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003; 3. 南京林业大学, 江苏省林业生态工程重点实验室, 江苏 南京 210037; 4. 华中农业大学 园艺林学学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要:以掌叶木种子为试材,应用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳法,对掌叶木去除种皮的种子萌发过程中过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)同工酶动态变化进行了研究。结果表明:在掌叶木种子萌发初期(0~2 d),种子吸水打破休眠而合成少数 POD、SOD 同工酶;萌发中期(3~5 d),种子开始萌动,胚根逐渐伸长,SOD 和 POD 2 类同工酶均有新酶带合成,2 类酶的种类、含量迅速增加,标志着种子开始萌发;萌发后期(6~9 d),胚根继续伸长,子叶逐渐展开,胚芽开始生长,SOD、POD 2 类同工酶含量有所减弱,但各同工酶的种类不减,仍有新酶合成。不同萌发时期同工酶的变化可作为掌叶木种子萌发各阶段的重要标志。

关键词:掌叶木;过氧化物酶同工酶(POD);超氧化物歧化酶同工酶(SOD);种子萌发

中图分类号:Q 949.755.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)17-0102-04

掌叶木(*Handeliendron bodinieri* (Lévl.) Rehd.) 属无患子科(Sapindaceae)掌叶木属(*Handeliendron* Rehd.),是第三纪孑遗古老植物,属于中国特有的珍稀濒危野生物种,主要分布于贵州南部和广西西北部海拔 500~900 m 的石灰岩山地^[1]。掌叶木分布区狭小,分布的石灰岩地区由于受到严重的破坏,使生境改变,植被难以恢复,加之种子富含油脂、易被动物觅食、结子率低等原因,天然更新极为困难,目前已濒临灭绝,1999 年被国务院公布为国家 I 级重点保护野生植物^[2]。掌叶木属于木本油脂植物,可以为生物柴油工业化生产提供原料^[3];其根系发达,常见于裸露的岩石上生长,是一种优良的耐瘠薄、水土保持树种,可用于石漠化治理;它的树形优美,叶色浓绿,掌状对生,花果颜色鲜艳、特别,可用于园林绿化、园艺观赏;种仁含油量高达 52.6%,不饱和脂肪酸含量高,是优良的生物质能源物种^[4],近年来逐渐引起人们的关注。目前,国内外学者已对掌叶木花发育^[5-6]、种子生态特征^[7]、遗传多样性^[8-9]等方面进行过研

究报道,但对其种子萌发过程中同工酶研究尚鲜见报道。该试验针对掌叶木种子萌发困难的问题,通过对其种子萌发过程中过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)同工酶的分析,探索掌叶木种子萌发过程中的一些机理,以期为其保护、引种驯化和繁育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

掌叶木种子于 2013 年 8 月底采自广西凤山县巴蜡猴山,除去果皮和假种皮后,于 4℃ 冰箱中贮藏备用。种子千粒重为 171.993 g。

1.2 试验方法

1.2.1 种子的萌发和取样 将 4℃ 贮藏备用种子在 0.5% 的高锰酸钾溶液消毒 15 min,蒸馏水洗净,于室温下浸泡吸水 24 h,在超菌台上去除种壳后,用 0.5% 的高锰酸钾溶液消毒 20 s,再用无菌水清洗干净后放在铺有 2 层滤纸的培养皿中,每个培养皿放置 20 粒种子。置于恒温 25℃,光照 12 h 条件下的光照培养箱中萌发,保持滤纸湿润,从培养当天开始,取不同萌发时期的种子,每天 1 次,每次 2 粒,直至完全萌发(0~9 d),种子样品按萌发时期分别标记为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9,分别装入离心管,于-70℃ 下冷冻保存。

1.2.2 POD、SOD 同工酶样品制备 POD 同工酶的制备,称取-70℃ 下保存的不同萌发时期的种子样品各 0.2 g,加入适量液氮充分研磨,成粉末状后立即转移到离心管中,加入 1 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH

第一作者简介:李磊(1986-),男,硕士,研究方向为种苗繁育理论与技术。E-mail:494620426@qq.com.

责任作者:李在留(1979-),女,博士,副教授,现主要从事濒危植物保护与利用等研究工作。E-mail:lizailiu666@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31060053);广西自然科学基金资助项目(2011GXNSFB018016);河南省自然科学基金资助项目(62580021)。

收稿日期:2014-04-29

6.8),充分混匀后 4℃ 浸提 2 h,12 000 r/min 下离心 20 min,上清液即为酶提液,取上清液置于 4℃ 下待用。SOD 同工酶提取时,提取液换为 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.8)。

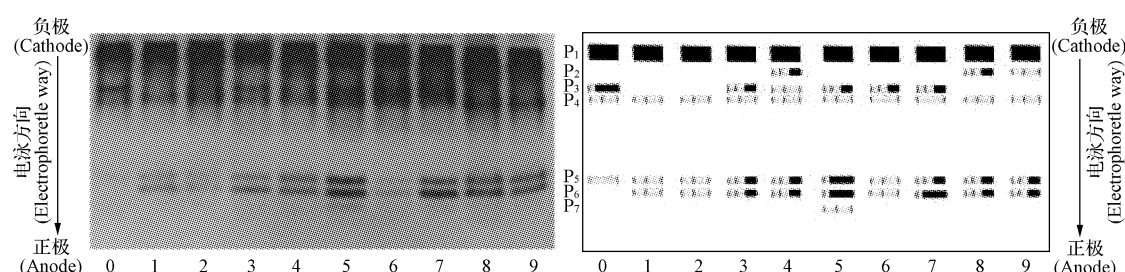
1.2.3 POD、SOD 同工酶电泳 采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳技术测定。凝胶制备以及电泳参考胡能书等^[10]及罗广华等^[11]的方法。POD 同工酶染色采用醋酸联苯胺法,参照吴少伯^[12]的方法,SOD 同工酶染色参照罗广华等^[11]的方法。

2 结果与分析

2.1 掌叶木种子萌发过程中 POD 同工酶的变化

从图 1 掌叶木种子萌发过程中 POD 同工酶电泳结果可以看出,共有 7 条酶带,从负极到正极依次为 P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7。其中 P1、P3、P4、P5 在种子萌发前

就存在,P1、P4、P5 稳定地出现在种子萌发的整个过程中,说明这 3 条酶带是掌叶木种子萌发的共有酶带;P1 酶带宽且颜色深,是萌发过程中的特征酶带;P2、P6、P7 酶带是萌发过程中新增的 3 种新酶带,P2 仅在萌发的第 4、8、9 天出现,P7 仅在第 5 天出现,而 P6 自第 1 天开始出现后一直存于萌发过程中,但其含量随着萌发时间的延长产生一定的波动。从整个萌芽过程来看,POD 同工酶呈现先增强后减弱再增强后趋于稳定的趋势,在萌发的第 3~5 天,POD 同工酶酶带增多,颜色加深,表明其种类及含量增加,说明此时过氧化物酶控制的代谢活动强;在实际的萌发过程中,第 1~2 天种子充分吸胀,第 3 天开始萌动,第 4 天胚根伸长约 0.2 cm,第 5 天胚根伸长约 0.5 cm,第 6~7 天胚根继续伸长,第 8~9 天子叶逐渐展开,胚芽开始生长,胚根伸长生长至 2 cm 左右。



注: 强带, 次强带, 次弱带, 弱带, 极弱带; 0~9 为萌发天数,下同。

Note: , , , and stand for strong, sub-strong, weak and very weak bands respectively; 0~9 stands for germination days, the same below.

图 1 掌叶木种子萌发过程中 POD 同工酶电泳图谱(左)及示意图(右)

Fig. 1 Electrophoretogram peroxidase isozyme pattern(left)and sketch map(right) of *H. bodinieri* seed in PAGE

2.2 掌叶木种子萌发过程中 SOD 同工酶的变化

从图 2 可以看出,掌叶木种子萌发过程中 SOD 同工酶一共出现 5 条,按照分子量由小到大的顺序依次为 S1、S2、S3、S4、S5。其中酶带 S2、S3、S4 出现在种子萌发的整个过程中,是种子萌发的共有酶带,也是掌叶木种子内 SOD 同工酶特征酶带;S2 在种子萌发后期酶带变窄,说明随着种子的萌发其含量降低;S3、S4 在萌发中期

酶带变宽颜色加深,表明其含量增加;S1、S5 是萌发中期和后期新增的新酶带,S1 只在萌发的第 2~5 天出现,S5 在萌发的第 6~9 天出现。从整个萌发过程看,SOD 同工酶在萌发中期不但有新的酶合成,同时所有酶带加宽颜色加深,说明其种类和含量增加,所控制的代谢明显增强;萌发初期酶带种类和数量最少,萌发后期酶带颜色变浅,但有一种新酶合成。

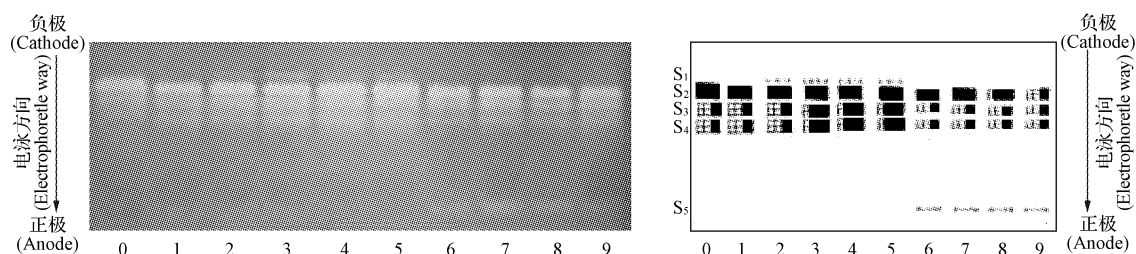


图 2 掌叶木种子萌发过程中的 SOD 同工酶电泳图谱(左)及示意图(右)

Fig. 2 Electrophoretogram superoxide dismutase isozyme pattern(left)and sketch map(right) of *H. bodinieri* seed in PAGE

3 结论与讨论

掌叶木种子萌发过程中易霉变,难萌发,该研究通

过去除种皮进行恒温培养可使掌叶木种子成功萌发。对其萌发过程中的 POD、SOD 同工酶活性的动态变化研

究表明,在掌叶木种子萌发初期,因种子吸水打破种子休眠而合成一定量的 POD 和 SOD 同工酶;萌发中期,胚根逐渐伸长,SOD 和 POD 2 类同工酶均有新酶合成,2 类酶的种类、含量迅速增加,是萌发的关键时期;萌发后期,胚根继续伸长,子叶逐渐展开,胚芽开始生长,SOD、POD 2 类同工酶含量有所减弱,但酶种类不减,仍有新酶合成。这与银鹊树种子^[13]和巴东木莲种子^[14]萌发过程中的同工酶变化结果类似,说明种子在萌发的中后期细胞膜受到活性氧自由基的影响较大,而此时 POD 和 SOD 的种类增多、表达增强减少了自由基对细胞的伤害,促进了种子的萌发。

同工酶是指存在于相同有机体具有相同催化活性而分子结构不同的酶,具有明显的发育阶段特异性和组织器官特异性。因此,掌叶木种子发芽过程中 POD 和 SOD 同工酶电泳谱带的变化形式代表了种子萌发相应阶段。

种子在萌发过程中要对贮藏过程中产生的有害物质进行清除,修复裂变的细胞结构,这些过程均需要抗氧化酶的参与,因此抗氧化酶活性对种子萌发及形成正常的幼苗至关重要^[15]。POD 同工酶是一类氧化还原酶,能催化很多生化反应,具有消除过氧化氢和酚类、胺类毒性的双重作用^[16]。POD 是植物细胞生长和植物体发育的生化标志之一,也是萌发的重要原因^[17]。SOD 作为防御系统的组成成员之一,在细胞保护酶系统中的作用是清除氧化物自由基,同时产生歧化产物 H_2O_2 ,因此,SOD 可以避免超氧化物自由基对膜的过氧化作用^[18]。

掌叶木种子不同萌发时期 POD 和 SOD 2 类同工酶的动态变化特征可作为掌叶木种子萌发的检验指标,为进一步研究掌叶木种子的萌发机理及解决掌叶木种子难萌发的问题积累科学依据。

参考文献

[1] 傅立国,金鉴明. 中国植物红皮书:稀有濒危植物(第 1 册)[M]. 北

京:科学出版社,1992:590-591.

[2] 贵州省林业厅. 贵州野生珍贵植物资源[M]. 北京:中国林业科学出版社,2000.

[3] 陈波涛,陈润生,邓伯龙,等. 贵州生物柴油原料林树种的选择[J]. 贵州农业科学,2010,38(5):173-176.

[4] 张菁林,林昌虎. 掌叶木异地引种保护研究[J]. 贵州科学,2006,24(4):45-48.

[5] 曹丽敏,夏念和,邓云飞. 掌叶木的花器官发生及其系统学意义[J]. 植物分类学报,2006,44(4):393-400.

[6] Cao L M, Xia N H, Deng Y F. Embryology of *Handeliendendron bodinieri* (Sapindaceae) and its systematic value; development of male and female gametophytes[J]. Plant Systematics and Evolution, 2008, 274: 17-23.

[7] 熊志斌,冉景丞,谭成江,等. 濒危植物掌叶木种子生态特征[J]. 生态学报,2003,23(4):820-825.

[8] He R K, Wang J, Huang H W. Long-distance gene dispersal inferred from spatial genetic structure in *Handeliendendron bodinieri*, an endangered tree from karst forest in southwest China[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2012, 44: 295-302.

[9] 李雪萍,苗昌盛,朱恩作,等. 野生濒危掌叶木 SRAP-PCR 体系的建立与优化[J]. 中南林业科技大学学报,2013,33(9):18-21.

[10] 胡能书,万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1985.

[11] 罗广华,王爱国. 植物 SOD 的凝胶电泳及活性的显示[J]. 植物生理学通讯,1983,19(6):44-45.

[12] 吴少伯. 植物组织中蛋白质及同工酶的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳[J]. 植物生理学通讯,1979,11(1):30-33.

[13] 梁宏伟,刘姝,陈发菊,等. 银鹊树种子萌发过程中的过氧化物酶和酯酶同工酶的变化[J]. 种子,2006,25(5):38-40.

[14] 张德春,张博,刘曦,等. 巴东木莲种子贮藏和萌发过程中同工酶分析[J]. 西北植物学报,2011,31(7):1453-1457.

[15] 伍贤进,宋松泉,田向荣,等. 玉米种子吸胀萌发过程中抗氧化酶活性的变化[J]. 吉林农业大学学报,2004,26(1):6-9.

[16] 陈惠黎,李文杰. 分子酶学[M]. 北京:人民卫生出版社,1983:370-372.

[17] McDonald M B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment[J]. Seed Science and Technology, 1999, 27: 177-237.

[18] Crafts-Brandner S J. Phosphorus nutrition influence on leaf senescence in soybean[J]. Plant Physiol, 1992, 98(3): 1128-1132.

Analyse of Peroxidase and Superoxide Dismutase Isozymes During Seed Germination on *Handeliendendron bodinieri* (Lévl.) Rehd.

LI Lei¹, LI Xue-ping², GUO Song^{1,3}, PENG Jian¹, LI Zai-liu^{1,4}

(1. College of Forestry, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004; 2. College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003; 3. Jiangsu Key Laboratory of Forestry Ecological Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037; 4. College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

Abstract: Taking the seeds of *Handeliendendron bodinieri* (Lévl.) Rehd. as materials, vertical slab polyacrylamide gel electrophoresis method was used to study the dynamic change of peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) during the germination of *Handeliendendron bodinieri* seeds which had removed the seed coat. The results showed that, in the early seed germination period (0~2 d), the dormant state of seeds was broken and absorbed water to synthesize a few POD and SOD enzymes. In the middle (3~5 d), seeds began to germinate, radicle elongated, new bands of SOD and POD

拟南芥 *NCED4* 基因的克隆及初步功能鉴定

郭 涛^{1,2}, 晁 跃 辉², 杨 青 川², 金 洪¹, 张 铁 军², 康 俊 梅²

(1. 内蒙古农业大学 生态环境学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘 要:以拟南芥为试材, 采用 PCR 及 DNA 重组技术, 从野生型拟南芥中克隆出 *NCED4* 基因, 并构建植物表达载体 pBI-*NCED4*, 最终获得具有卡那霉素抗性的转基因拟南芥植株, 研究 *NCED4* 基因超表达对植物体的影响, 并对其中 4 个再生植株进行 PCR 和荧光定量 RT-PCR 分析。结果表明: 目的基因转入拟南芥基因组中, 并在转基因拟南芥中成功过量表达; *NCED4* 基因受外源激素的影响较为敏感, 其作用可能与激素的调控有关。

关键词:拟南芥; *NCED4*; 脱落酸; 转化

中图分类号:Q 943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)17-0105-06

脱落酸(Absciscic acid, ABA)作为植物的五大激素之一, 广泛分布于高等植物中, 其功能众多, 不仅可以抑制种子萌发, 还能促进果实贮藏物质的积累, 提高植物的抗旱力和耐冻力^[1-5], 在农业生产上有广阔的应用前景, 能产生巨大的经济效益和社会效益。ABA 的合成与 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, *NCED*)有着密切的关系^[6]。*NCED* 在 ABA 的合成途径中, 充当整个合成反应的限速酶。

NCED 基因以基因家族的形式存在于植物体中^[7], 表达的部位和功能也有所不同^[8], 如: 拟南芥 *NCED3* 基因的高表达提高了内源 ABA 的水平^[9]; 拟南芥 *NCED6* 可以被不同浓度的葡萄糖上调表达, 且突变体的种子对葡萄糖不敏感^[10]; 根据 *NCED6*、*NCED5*、*NCED9* 三种突变体植株在特定时间和组织的表型分析, 显示 *NCED5* 与 *NCED6*、*NCED9* 共同作用于诱导种子休

眠^[11]。而关于 *NCED4* 基因的专项研究相对较少。拟南芥中的 *NCED4* 基因全长 1 785 bp, 编码 595 氨基酸, 且不受干旱胁迫的诱导^[12]。最新的研究表明, 在生菜中, *NECE4* 的沉默改变了与 ABA、赤霉素、乙烯合成有关的基因的表达, 改变了相关的信号途径^[13]。该试验以拟南芥为试材, 通过 PCR 方法克隆了 *NCED4* 基因, 并将其插入到植物表达载体 pBI121 上, 构建了超表达 *NCED4* 基因的表达载体 pBI-*NCED4*, 再通过农杆菌花序浸泡法转化拟南芥获得转化植株; 通过实时定量的方法研究该基因在激素诱导下的基因表达水平, 为该基因更深入的功能分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

该试验所用拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型种子由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所提供。克隆载体 pEASY-T1、DNA Marker 购自北京全式金生物科技有限公司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、Primescrip 反转录酶、RNase 酶购自 TaKaRa 公司, RNApure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒、基因组 DNA 快速提取试剂盒和凝胶电泳 DNA 回收试剂盒等购自博迈德公司; 大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 α 、实时定量染料 UltraSYBR Mixture 购自康为世纪生物科技有限公司; 农杆菌 GV3101 以及载体 pBI121 为该实验室保存; 其它试剂采用进口分装或国产分析纯。

第一作者简介:郭涛(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物资源利用与保护。E-mail: yushen0002008@126.com.

责任作者:金洪(1958-), 男, 博士, 教授, 研究方向为草业科学。E-mail: jinhong915@163.com.

基金来源:国家“十二五”科技支撑子课题资助项目(2011BAD17B01-01-3); 国家牧草产业体系资助项目(CARS-35-04, 201); 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所基本科研业务费资助项目(2014ywf-zd-2)。

收稿日期:2014-03-25

isozymes were synthesized, content increased rapidly, marked the seeds begin to germinate. In the later stage(6~9 d), radicle continued elongating, cotyledon unfolded gradually, embryo began to grew, SOD and POD isozymes content decreased, but the type of each isozyme unabated, new enzyme was synthesized. The changes of those isozymes could be used as an important sign in each stage of *Handeliendendron bodinieri* seed germination.

Keywords: *Handeliendendron bodinieri* (Lévl.) Rehd.; peroxidase isozymes; superoxide dismutase isozymes; seed germination