

组培平贝母形态转变过程中同工酶变化的研究

孙 丹¹, 朴炫春², 刁艳玲¹, 于 洋³, 钱春荣³, 廉美兰²

(1. 黑龙江省农业科学院 作物育种研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 延边大学 长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 吉林 延吉 133002; 3. 黑龙江省农业科学院 耕作栽培研究所, 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同工酶的变化。结果表明:在发育过程中各培养体的酯酶同工酶的酶带较丰富,共检测出 11 条酶带,且形成小鳞茎后酶谱的酶带数都明显多于愈伤组织和胚状体时期,且愈伤组织在 $R_f = 0.708$ 处产生了特异性酶带。过氧化氢酶在愈伤组织、胚状体和刚形成小鳞茎时都有表达,且酶谱仅有 1 条带, $R_f = 0.042$,而在鳞茎膨大时没有该酶的表达。

关键词:平贝母;培养体;酯酶;过氧化氢酶

中图分类号:S567.23⁺1

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)02-0001-02

贝母为百合科贝母属(*Fritillaria* L.)的多年生草本植物,是重要的中药材^[1],在我国已有 2 000 多年的药用历史,早在汉代《神农本草经》中就有记载。中国贝母可分为浙贝母、川贝母、平贝母和伊贝母四大类^[2]。平贝母(*Fritillaria ussuriensis* Maxim.)在临床上与川贝、浙贝同样具有镇咳、祛痰、平喘、抗菌消炎等功效,又因其无性繁殖系数高于其它贝母,而在东北地区常用其代替川贝母、浙贝母。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研究较少。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同工酶的变化,可为进一步深入研究贝母器官发生的机理和今后的分子研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

2005 年春季购自吉林省敦化市江源镇生长健壮的四年生新鲜平贝母(约 1.0 g)鳞茎,经过消毒,剥去外鳞片后在双筒解剖镜无菌条件下取茎尖约 0.2 mm,接种于培养基 MS + 萘乙酸(NAA) $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-苄基腺嘌呤(6-BA) $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $7.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 调节为 5.8。当接种的茎尖上形成愈伤组织后,将其接种于 MS +

NAA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $7.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 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 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $50.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $7.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 5.8)的培养基中。培养温度 $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度 70%,利用日光灯将光照强度调节为 1 600 lx,每天光照 16 h,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)作为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 称取平贝母供试样品 0.30 g,加入 0.600 mL 提取缓冲液($0.100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液,其中含 $0.500 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $0.060 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸, $0.006 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇)^[3],加液氮研磨充分后,放入小样品管中, $0 \sim 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液,加入 1/4 倍(v/v)的 50%甘油,即为酶粗提取液,于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,用于聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.2.2 聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)同工酶电泳 酯酶同工酶电泳方法参考文献^[4],过氧化氢酶同工酶电泳方法参考文献^[5]。

2 结果与分析

2.1 酯酶(EST)同工酶电泳的分析

由图 1 和表 1 可知,在不同发育时期 EST 同工酶谱带表现出明显的差异性,整个酶谱出现 3~10 条不等的酶带,差异较大,酶带总类型为 11 条,表现出较丰富的酶谱类型,其中在 $R_f = 0.767$ 处的酶带是组培平贝母不同发育阶段培养体所共有的酶带,但在着色强度上略有不同,小鳞茎-1 的着色深度明

收稿日期:2009-11-04

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)

第一作者简介:孙丹(1983-),女,吉林省白山市人,硕士,研究实习员,从事植物细胞工程研究。E-mail: sundan227318@163.com。

通讯作者:廉美兰(1963-),女,吉林省龙井市人,博士,教授,从事生物技术方面的研究。

显强于其它各时期,愈伤组织其次,可认为这条酶带为平贝母鳞茎发育阶段 EST 同工酶的基础酶带。从整体上看,形成鳞茎后酶谱的酶带数都明显多于愈伤组织和胚状体时期;Rf 为 0.342、0.375 和 0.658 (酶带较宽)的 3 条酶带在形成鳞茎后有所表达,表明其参与了鳞茎的发育。在愈伤组织时期虽然整个酶谱只有 5 条酶带,但颜色都较深,且在 Rf = 0.708 产生了特异性酶带;而在胚状体时期,酶带不仅少,而且颜色也较浅。

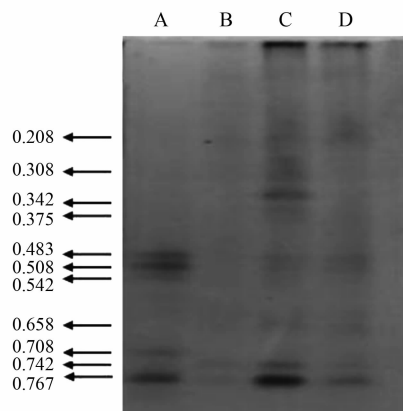


图 1 组培过程中平贝母不同阶段培养体酯酶同工酶电泳图谱
A:愈伤组织,B:胚状体,C:小鳞茎-1,D:小鳞茎-2

表 1 组培过程中平贝母不同阶段培养体酯酶同工酶的相对迁移率(Rf)比较

酶 带	供 试 材 料			
	愈伤组织	胚状体	小鳞茎-1	小鳞茎-2
I	—	0.208	0.208	0.208
II	—	—	0.308	—
III	—	—	0.342	0.342
IV	—	—	0.375	0.375
V	0.483	—	0.483	0.483
VI	0.508	—	0.508	0.508
VII	0.542	—	0.542	0.542
VIII	—	—	0.658	0.658
IX	0.708	—	—	—
X	—	0.742	0.742	0.742
XI	0.767	0.767	0.767	0.767

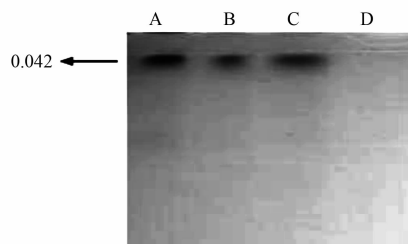


图 2 组培过程中平贝母不同阶段培养体过氧化氢酶同工酶电泳图谱
A:愈伤组织,B:胚状体,C:小鳞茎-1,D:小鳞茎-2

2.2 过氧化氢酶(CAT)同工酶电泳的分析

几乎所有的生物机体都存在过氧化氢酶,其酶促活性为机体提供了抗氧化防御机理。CAT 可以促使 H_2O_2 分解为分子氧和水,和 POD 相同有清除细胞中 H_2O_2 毒害的作用。在平贝母组织培养过程中对不同发育阶段培养体进行了 CAT 同工酶电泳分析,从图 2 和表 2 可知,整个酶谱中仅在 Rf 为 0.042 处具有 1 条带,且酶带颜色逐渐变浅。该酶在愈伤组织、胚状体和刚形成小鳞茎-1 时都有表达,而在膨大的小鳞茎-2 中没有。

表 2 组培过程中平贝母不同阶段培养体过氧化氢酶同工酶的相对迁移率(Rf)比较

酶 带	供 试 材 料			
	愈伤组织	胚状体	小鳞茎-1	小鳞茎-2
I	0.042	0.042	0.042	—

3 结论与讨论

酯酶主要参与植物异化作用,是与磷代谢有关的酶,酯酶含量的增加预示着磷代谢的加强,它对生物体的生长发育起着重要的调节功能^[6],业已证明,蒲圻贝母^[7]、茶薪菇^[8]、党参^[9]的酯酶与生长阶段有密切关系。该试验中平贝母培养体不同时期的酯酶有各自的酶带类型,各种带型(除共有带外)还各具特点。不同发育时期的酯酶同工酶酶谱表现出数量的差异,从 3~10 条不等的酶带,差异较大,而且强度也不同,表明酯酶同工酶调节了不同发育时期的磷代谢途径。从整体酶谱来看,形成鳞茎后,酯酶同工酶的表达量较多,说明鳞茎时期磷代谢旺盛。在 Rf = 0.708 时产生了愈伤组织的特异性酶带,说明该条酶带可能为愈伤组织发育时期基因表达所产生的特征性酶带,在愈伤组织时期整个酶谱虽然只有 5 条酶带,但颜色都较深,说明酯酶同工酶在此时期活性较高。

试验结果表明,过氧化氢酶酶谱仅在相对迁移率为 0.042 处有一条带,这与李强等^[5]在川贝母研究中该酶酶带表达的结果相同,说明其分子量较大,且在组培大鳞茎时期没有表达,表明过氧化氢酶在贝母中的活性非常弱。

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.
- [2] 王文杰. 贝母[M]. 北京:中国医药科技出版社,1990:219-220.
- [3] 蔡朝晖,高山林,李萍. 组培蒲圻贝母鳞茎形成中的同工酶电泳分析[J]. 中国中药杂志,1999,24(1):16-18.
- [4] 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,1985:102-104.
- [5] 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工酶分析[J]. 应用与环境生物学报,2002,8(6):610-613.

骨碎补愈伤组织的诱导及无性系建立的研究

文 伟

(铁岭师范高等专科学校, 辽宁 铁岭 112001)

摘要:以骨碎补根茎、叶片、叶柄为外植体,进行了愈伤组织诱导与分化、试管苗的生根、移栽、移植的研究,建立起骨碎补的无性系。结果表明:1/2 MS+NH₄H₂PO₄ 150 mg·L⁻¹+BA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.6 mg·L⁻¹+2,4-D 0.6 mg·L⁻¹是诱导根茎形成愈伤组织和愈伤组织继代培养的理想培养基;1/2 MS+BA 0.1 mg·L⁻¹+IAA 0.05~0.1 mg·L⁻¹是诱导骨碎补根茎愈伤组织分化培养的理想培养基;1/2 MS+NAA 0.1 mg·L⁻¹是骨碎补生根培养的理想培养基;生根试管苗能形成根茎,容易移栽成活。移栽的试管苗保持了骨碎补的所有植物学性状。

关键词:骨碎补;组织培养;无性系

中图分类号:R282.71

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)02-0003-04

骨碎补(*Davallia marieslii* Moor ex Baker)属于骨碎补科骨碎补属多年生草本植物,附生于海拔500~700 m的岩石上^[1-2],在我国的辽宁、山东、江苏

和台湾有分布。作为中草药使用,具有行血活络、祛风止痛、补肾坚骨等功效,能治跌打损伤、风湿痹疼、肾虚、牙疼、腰疼、久泻等疾病^[3]。虽然骨碎补具有重要的药用价值,但其分布和数量相对较少,加上近年来生态环境的变化和骨碎补的大量被采挖,使该植物的种类和数量越来越少,在辽宁地区骨碎补濒危灭绝,现已成为辽宁省的保护植物^[4]。为了保护

收稿日期:2009-10-14

作者简介:文伟(1960-),男,满族,辽宁鞍山人,副教授,从事生物学教学和组织培养研究。E-mail:wenw60927@sina.com。

- [6] 朱婉华,魏水清,刘崇汉,等.电聚焦电泳技术用于真菌同工酶研究[J].食用菌,1988,10(2):35-36.
- [7] 蔡朝晖,高山林,李萍.组培蒲圻贝母鳞茎形成中的同工酶电泳分析[J].中国中药杂志,1999,24(1):16-18.
- [8] 毛慧玲,樊棠怀.茶薪菇不同发育期酯酶同工酶的研究[J].南昌大学学报(理科版),2002,26(4):375-376.

- [9] 潘有福,王仑山, Tiwari R K,等.党参的体细胞胚发生及不同发育阶段几种同工酶的分析[J].西北植物学报,2005,25(1):1-7.

Study on the Isozyme Changes of *Fritillaria ussuriensis* during Morphogenesis

SUN Dan¹, PIAO Xuan-chun², DIAO Yan-ling¹, YU Yang³, QIAN Chun-rong³, 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 of Yanbian University, Ministry of Education, Yanji, Jilin 133002; 3. Crop Tillage and Cultivation Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Taking *Fritillaria ussuriensis* Maxim. as experiment material, the isozyme changes in different stage of tissue culture during culturing of *Fritillaria ussuriensis* Maxim. were studied. The results showed that enzyme bands of esterase isozyme were abundant and examined 11 bars; Enzyme bands were obviously more than callus and embryoid after forming small bulblet and callus presented differential band at $R_f = 0.708$. Catalase isozyme expressed and had only one bar during calluse, embryoid and small bulblet formation, R_f was 0.042, while the catalase isozyme was not expressed in bulblet expanding.

Key words: *Fritillaria ussuriensis* Maxim.; culture; esterase; catalase