

· 研究简报 ·

长春花愈伤组织培养过氧化物酶 同工酶等电点聚焦研究*

邹韵霞 邓钧华
(生物学系)

关键词 等电点聚焦, 过氧化物酶, 同工酶, 长春花, 组织培养

Riicker, W. 等(1971)进行了组织培养过氧化物酶等电点聚焦研究^[1], 此法反应灵敏, 重复性好。我们用红花长春花叶为外植体, 进行脱分化培养, 诱导产生愈伤组织, 并结合用不同激素、r射线等因素处理。同时, 在不同培养时间取样, 用聚丙烯酰胺圆盘电泳, 进行过氧化物酶同工酶等电点聚焦研究, 发现在各种因素作用下, 过氧化物酶同工酶均有不同的变化, 用等电点分离同工酶是植物发育、细胞分化的灵敏指标, 为比较研究提供了重要手段。

1. 材料和方法

(1) 组织培养及样品制备 选取健壮的长春花叶片为材料, 以MS为基本培养基, 参考Ahmed, A.等人的方法^[3], 按激素与生长素成分的不同, 设计了如下几种培养基:

- ① MS+6-BA(0.5mg/l)+2.4-D(1mg/l)+水解酪蛋白(300mg/l)+蔗糖(3%)。
- ② MS+玉米素(0.5mg/l)+IAA(0.1mg/l)+蔗糖(3%)。
- ③ MS+6-BA(0.5mg/l)+GA₃(0.1mg/l)+蔗糖(3%)。
- ④ MS+Ki(2mg/l)+IBA(0.2mg/l)+蔗糖(3%)。
- ⑤ MS+Ki(0.03mg/l)+IAA(2mg/l)+蔗糖(3%)。

叶片按常规方法消毒后, 用无菌水冲洗3—4次, 然后将叶剪成一平方厘米大小, 置①号脱分化培养基上, 室温24—26℃培养, 每天以800—1000Lux光照8—10小时, 两星期内, 外植体产生原代白色愈伤组织。将原代愈伤组织转移至②、③、④、⑤号培养基上, 培养41天、48天、55天后分别取样进行过氧化物酶同工酶等电点聚焦研究。

再取两组继代培养150天、230天的愈伤组织(简称150dc、230dc)经多次转移分化, 从已经老化的愈伤组织中选取少量有生活力的细胞团, 将230dc转移至②号培养基,

本文1985年5月收到

● 丘泉发、陈婉萌参加部分工作

150dc转移至③号培养基,培养48天、55天后供试。

r射线辐照处理是采用了经两次转移培养47天的愈伤组织,连同培养基经8403red、16806red、25210red辐照,剂量率分别为274red/分,546red/分,546red/分,辐照后在原培养基光照下培养10天供试。

我们还在长春花幼苗期(苗龄30天)、壮苗期(盛花期,苗龄150天),老苗期(苗龄317天)选取健壮根、茎、叶为材料。各组材料每次取样600mg,在冰浴内做成匀浆,低温保存两小时后,在4500g低温下离心15分钟,每管加上清液100 μ l作聚焦电泳,每个组合重复试验3—4次。

(2)电泳及等电点测定 两性载体电解质 Ampholine (LKB、Bromma、Sweden)的pH为3.5—10。聚丙烯酰胺凝胶浓度T=7.5%,交联度C=2.6%,两性电解质浓度2%,电极溶液上槽(正极)为0.02M HCl,下槽(负极)为0.02M 乙二胺,电泳2.5小时,电压200V。

过氧化物酶同工酶用黄寿松等^[2]的方法染色,在5分钟内开始变为蓝色,以后渐变为褐色酶带,完全显色后,用蒸馏水冲洗,拍照绘图,胶条置水保存两天后用721型一分光光度计扫描。

等电点测定。将不点样的胶条与样品胶条同时电泳,用无离子水冲洗30分钟,取两胶条依次切成0.5厘米小段,加煮沸过的无离子水3毫升,放冰箱过夜,用PHS—29A酸度计测pI梯度。

2. 结果分析

(1)愈伤组织酶谱分析 在各组培养基内培养产生的愈伤组织,表现不同程度的分化,其中大部分为质地紧密而带脆性的绿色愈伤组织,仅⑤号培养基的愈伤组织是白色,质地疏松,培养到55天开始变褐老化。其它组愈伤组织随培养时间的延长,颜色变淡,生长加速,组织变得越来越疏松,但②号培养基的愈伤组织一直保持绿色。

随培养时间的延长酶谱有明显变化,从4个培养基组合3个不同时间取样,进行过氧化物酶同工酶聚焦电泳的结果可看出,其中培养到41天的酶谱变化较大(图1),各组酶谱均有6条酶带,除pI6.5处均有一条酶带外,其它酶带的等电点均不相等,pI值不同且酶带深浅不一致。培养48天的酶谱B、C、D三组差别不大,pI8.5为特征性酶带,颜色很深。值得注意的是B、C、D酶谱与原代有8条相同的酶带(图10A),都具有pI7.0的深酶带。培养到55天的愈伤组织已老化,4组酶谱已基本一致(图3),但A组酶活力仍较高,D组酶活力下降。

继代培养的愈伤组织对激素反应与原代愈伤组织相同,在培养基和培养天数相同时,它们的酶谱基本一致(图4、5),可以从图4酶谱与图2中A、B组相似以及图5酶谱与图3中A、B组比较相似所证实。

r射线辐照后的愈伤组织,其酶谱扫描图与原代基本相似(图10B、C、D),25210red辐照后出现pI9.2的新酶带(图10D箭头所示)。愈伤组织的细胞成分与原代愈伤组织一致(图9),细胞能正常繁殖。

(2)长春花植株根、茎、叶同工酶谱分析 图6—图8表明,长春花植株根、

茎、叶的酶谱有较大差别，叶具有9—11条酶带，茎具有7—11条酶带，根具有8—11条酶带，而各自幼苗期与老苗期的酶谱基本一致，壮苗期的酶谱则较特殊，根、茎、叶在pI8—9.5均有2—3条深的酶带，根还在pI3.7处有深酶带。

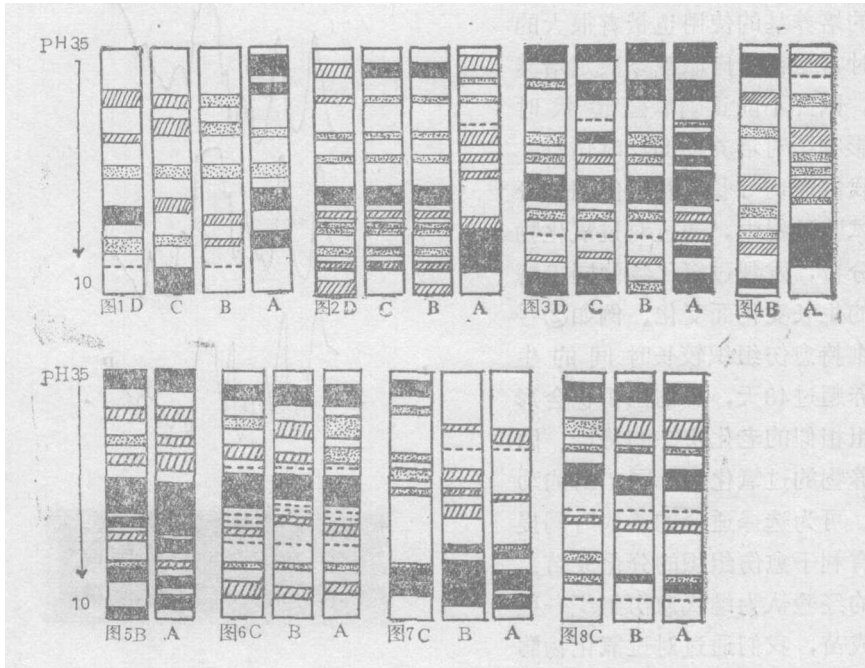


图 版

- 图1 培养41天愈伤组织过氧化物酶同工酶谱：A为②号培养基，B为③号培养基，C为④号培养基，D为⑤号培养基。
- 图2 培养48天愈伤组织过氧化物酶同工酶谱：A、B、C、D说明同图1。
- 图3 培养55天愈伤组织过氧化物酶同工酶谱：A、B、C、D说明同上。
- 图4 A.230dc转移至②号培养基48天酶谱，B.150dc转移至③号培养基培养48天酶谱。
- 图5 A.230dc转移至②号培养基55天酶谱，B.150dc转移至③号培养基55天酶谱。
- 图6 幼苗期过氧化物酶同工酶谱：A（根），B（茎），C（叶）。
- 图7 壮苗期过氧化物酶同工酶谱：A（叶），B（茎），C（根）。
- 图8 老苗期过氧化物酶同工酶谱：A（根），B（茎），C（叶）。

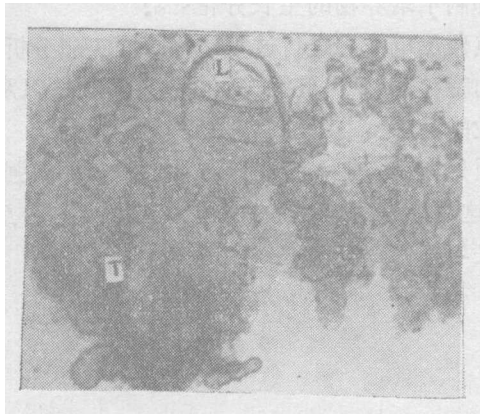


图9 愈伤组织的细胞组成(×400)
T示管状细胞，
L示巨型细胞

3. 讨 论

目前对一种新材料进行组织培养时,首先要花较多的时间筛选培养基,对被选择的培养基的使用也带有很大的盲目性,时常是根据肉眼观察决定培养物的转移,因此不能正确掌握传代时间,以致影响了对培养物的及时诱导。近年来,我们在诱导长春花愈伤组织分化成苗的试验过程中,通过对过氧化物酶同工酶分析,发现过氧化物酶同工酶随培养物的生长变化而变化。例如②号培养基能维持愈伤组织较长时间的生长,但培养超过48天,愈伤组织也会形成与其它组相似的老化状态的酶谱。因此,对培养物的过氧化物酶同工酶的动态的了解,可为选择适合的传代时间提供依据,有利于愈伤组织的分化成苗。

以往的经验认为继代愈伤组织一般难以分化成苗,我们通过对过氧化物酶同工酶研究,证明继代愈伤组织对激素反应灵敏,产生与原代愈伤组织一样的酶谱。已有实验证明,要使继代愈伤组织分化成苗,必须对愈伤组织进行连续诱导,45天更换一次培养基,能促进长春花愈伤组织分化成苗^[3]。经常更换

培养基的目的,是对培养物提供有活性的外源激素,以免培养基内积累代谢产物。因为在组织培养过程,培养基成分,特别是激素的活性处在一个由高到低,培养物代谢产物分泌到培养基内由少到多的积累过程,抑制了培养物的生长分化^[4]。

以聚丙烯酰胺凝胶为支持物的等电点聚焦电泳,进行过氧化物酶同工酶分析结果证明,过氧化物酶同工酶具有组织和器官的特异性^[5],植物的不同发育阶段,以及激素对培养物的作用程度、培养时间都有灵敏的反应。

长春花叶愈伤组织经1—3万伦辐照处理后,在一定光照条件下培养有较强的忍受能力,同工酶活力增强,出现新的酶带,这可能是对 γ 射线的一种保卫反应^[6]。至于 γ 射线辐照后激素、光照条件影响细胞的生长与分化,有待进一步研究。

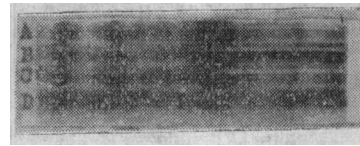
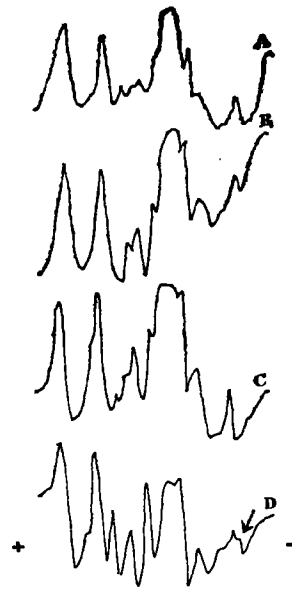


图10 γ 射线照射愈伤组织后过氧化物酶同工酶谱扫描($\lambda = 520\text{nm}$)

- A. 原代培养14天,
- B. 8403red照射,
- C. 16806red照射,
- D. 25210red照射, 箭头示出现的新酶带。

参 考 文 献

- [1] Riicker, W. and Radola, B. J., *Planta* (Berlin), 99(1971), 192—198.
[2] 黄寿松等, *遗传*, 2(1979), 3, 7—10.
[3] Ahmed, A. et al., *Z Pflanzenphysiol Bd.*, 91(1979), S.83—88.
[4] 黄维南等, *植物生理学报*, 1(1964), 增刊, 304—314.
[5] Farkas, G. L., *Phytopathology*, 56(1966), 669.
[6] Siegel, B. Z., Galston, A. W., *Plant Physiol.*, 42(1967), 221—226.

Isoelectric Patterns of Peroxidase Isozymes from *Vinca rosea* Tissue Cultures

Zou Yunxia Deng Junhua

Abstract

Peroxidases from *Vinca rosea* tissue cultures have been separated by polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing into 6-13 isozymes. The isozyme pattern of callus tissues and those of plants at different development stages have been compared. The callus was obviously responsive to exogenous hormones.

The isozyme pattern of the calluses cultured with different exogenous hormones was significantly changed. The subcultural and original callus had basically similar isozyme patterns when they were cultured under the same hormones condition.

^{60}Co irradiation of callus with dose of 25210 rad did not inhibit cellular growth and produced a new isozyme band.

At different developmental stages of the plants, the isozyme patterns of their roots, stems and leaves were not similar, the healthy seedling's have changed much than the young seedling's and those of the old seedlings has three new isozyme bands at pI8-9.5

Keywords Isoelectric pattern, Peroxidase, Isozyme, *Vinca rosea*, Tissue culture