

椪柑体细胞胚诱导过程中生理生化研究

刘玉玲*, 缪星辰*, 顾铭洲, 徐小勇

扬州大学, 园艺与植物保护学院, 江苏 扬州
Email: xyxu@yzu.edu.cn

收稿日期: 2021年4月6日; 录用日期: 2021年5月10日; 发布日期: 2021年5月18日

摘要

体细胞胚胎发生技术在植物快繁、种质资源保存、遗传转化、基因工程等领域具有广阔的应用前景和经济价值。迄今, 椪柑体细胞胚胎发生的生理变化尚不清楚。本研究以椪柑胚性愈伤组织为起始材料进行体细胞胚的诱导, 选取椪柑体细胞胚诱导过程中四个阶段的培养物: 即刚接种的胚性愈伤组织(EI0)、转成黄色的胚性愈伤组织(EI1)、肉眼可见的胚状体(EI2)和出现50%以上的胚状体(EI3), 进行可溶性蛋白含量、 H_2O_2 水平及抗氧化酶[过氧化物酶(Peroxidase, POD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)]活力的测定。结果表明: 可溶性蛋白含量先下降后逐渐升高; 过氧化氢含量先逐渐上升后下降; 从EI0到EI2过程三种酶活力都表现出先升高后下降的变化规律, 但在EI2到EI3过程, POD、CAT活力下降, SOD活力则升高。

关键词

椪柑, 体细胞胚胎发生, H_2O_2

The Physiological and Biochemical Changes during Induction of Somatic Embryogenesis in Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco)

Yuling Liu*, Xingchen Miao*, Mingzhou Gu, Xiaoyong Xu

School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu
Email: xyxu@yzu.edu.cn

Received: Apr. 6th, 2021; accepted: May 10th, 2021; published: May 18th, 2021

*共同第一作者。

文章引用: 刘玉玲, 缪星辰, 顾铭洲, 徐小勇. 椪柑体细胞胚诱导过程中生理生化研究[J]. 植物学研究, 2021, 10(3): 239-245. DOI: 10.12677/br.2021.103034

Abstract

Somatic embryogenesis technique has already been widely applied in rapid clonal propagation of plant, preservation of germplasm resources, genetic transformation, genetic engineering, and other fields. The physiological of somatic embryogenesis in citrus is unclear to date. Embryonic calli of Ponkan were used for induction of somatic embryogenesis. The four materials during induction of somatic embryogenesis in the Ponkan were selected: inoculated embryonic calli (E10), yellow embryonic calli (E11), the embryos that can be seen with the naked eye (E12) and more than 50% of the embryos (E13). The content of soluble protein first declined and then increased gradually; the content of hydrogen peroxide gradually increased and then decreased; during E10 to E12, three types of enzyme activity increased and then decreased; but during E12 to E13, the activity of POD and CAT decreased, and the activity of SOD increased.

Keywords

Ponkan, Somatic Embryogenesis, H₂O₂

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

体细胞胚胎发生(Somatic Embryogenesis), 简称体胚发生, 是指体细胞在特定条件下, 未经性细胞融合而通过与合子胚类似发育途径形成新个体的形态发生过程。在离体培养条件下, 体胚发生途径有两种, 直接与间接发生途径[1]。直接发生途径指从外植体上直接分化出来, 不经过愈伤组织这一阶段, 如山茶、咖啡、茄子等。间接发生途径指外植体首先脱分化形成愈伤组织再分化出体胚, 如胡萝卜、枸杞、龙眼、石刁柏等。目前, 体胚发生技术已广泛地应用于植物快繁、种质资源保存、遗传转化、基因工程等领域[1]。

植物体胚发生过程实质上就是细胞分化过程, 在分化的过程中必然发生有氧代谢, 而活性氧是有氧代谢过程中的一种副产品。因此, 体胚发生过程中也会发生活性氧变化及应激响应[2] [3]。在许多植物上已开展了这方面的研究, 其中包括蛋白含量、活性氧含量、酶活力等变化研究。例如, 在伏令夏橙、石刁柏、大蒜、滇楸、苜蓿等多数植物中, 可溶性蛋白含量呈现单峰变化趋势, 其变化是先上升后下降[4] [5] [6] [7] [8]。在花烛、刺五加等少数植物中, 其体胚发生过程中可溶性蛋白含量呈现双峰的变化趋势, 即先上升后下降再上升[9] [10] [11]。一般而言, 活性氧含量在体胚诱导早期上升, 而在体胚发育后期下降。例如, Ma 等[12]在香蕉的研究中发现, H₂O₂含量在愈伤组织发育至球形胚时上升, 但在球形胚直至成熟胚时下降; Dhir 等[8]发现在苜蓿愈伤组织诱导体胚过程中, H₂O₂含量表现出同样的变化规律。但在花榈木的研究中, 活性氧只在子叶胚阶段显著上升[13]。在植物体胚发生过程中, 不同抗氧化酶活力变化差异较大, 且无特定变化规律。

虽然在不少植物上已开展体胚发生相关工作, 但椴柑体细胞胚胎发生的生理变化尚不清楚。基于此, 本论文以椴柑胚性愈伤组织为起始材料进行体细胞胚的诱导, 分析该过程中其可溶性蛋白含量、三种抗氧化酶活力和活性氧水平的动态变化, 以期了解抗氧化系统在柑橘体细胞胚胎发生中的作用。

2. 材料与方法

2.1. 植物材料

供试材料取自华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室的椪柑(*Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan) 胚性愈伤组织(郭文武教授惠赠)。胚性愈伤组织由珠心胚诱导产生, 保存于 MT 基本培养基中, 每 20 d 继代一次。

2.2. 椪柑体细胞胚的诱导方法

参照付春华[14]的方法并做适当修改。取 MT 培养基上继代培养 20 d 的椪柑胚性愈伤组织接种于体细胞胚诱导培养基(MT + 2%甘油 + 0.7%琼脂); 置于光照培养室进行培养(光照周期为 16 h/8 h, 温度为 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 3000 lux); 观察椪柑愈伤组织变化并做好记录。

2.3. 生理生化指标的测定及数据分析

植物组织样本准备: 于超净工作台内, 称取样品, 加入 10 ml 磷酸缓冲液, 加适量石英砂于冰上研磨, 将组织溶液于振荡机上充分混匀后, 取 2 ml 溶液, 12,000 转/分, 4°C 下离心 20 min, 取上清液用于生理生化指标的测定。

可溶性蛋白含量、SOD、POD 的测定参照李合生[15]的方法。可溶性蛋白含量测定以牛血清蛋白做标准曲线, 采用考马斯亮蓝比色法, 结果以 mg/g 表示; SOD 活力测定采用 NBT 光还原法, SOD 活力单位以抑制 NBT 光化还原的 50% 为一个酶活力单位; POD 活力测定采用愈创木酚法, 以每分钟 A 值增加 0.01 为 1 个活力单位, 结果以 U/mgprot 表示。

过氧化氢含量、CAT 活力均采用南京建成试剂盒测定。过氧化氢含量测定主要步骤为: 准备空白管、标准管和测定管; 在各管中分别加入试剂一, 之后在各管中分别加入蒸馏水、163 mmol/L 过氧化氢标准品应用液以及样本; 混匀, 37°C 准确反应 1 分钟后, 再分别加入试剂二; 于 405 nm 处, 1 cm 光径, 蒸馏水调零, 测各管吸光度值。CAT 活力测定原理: CAT 分解过氧化氢的反应可通过加入钼酸铵而迅速中止, 剩余的过氧化氢与钼酸铵作用产生一种淡黄色的络合物, 在 405 nm 处测定其生成量, 可计算出结果 CAT 的活力, 结果以 U/mgprot 表示。

每个试验进行了 6 次独立重复, 测定的数据采用 SPASS16.0 软件进行统计分析, 用 EXCEL 软件绘制图形。

3. 结果与分析

3.1. 椪柑体细胞胚的诱导

将椪柑胚性愈伤组织(图 1A)接种于含 2% 甘油的 MT 培养基上培养, 15 天后胚性愈伤组织已大量增殖, 且颜色都转为黄色(图 1B); 30 天后胚性愈伤组织开始分化出肉眼可见的球形胚状体(图 1C); 45 天后球形胚状体增加至 50% 以上(图 1D)。根据椪柑体胚发育进程, 我们选用上述四个阶段的培养物(EI0、EI1、EI2 和 EI3)进行后续的生理和分子试验。

3.2. 椪柑体细胞胚诱导过程中生理生化指标的变化

3.2.1. 椪柑体细胞胚诱导过程中可溶性蛋白含量的变化

如图 2 所示, 在椪柑体细胞胚诱导过程中可溶性蛋白含量先下降后逐渐升高。其中 EI3 的可溶性蛋白含量最高, 达 55.43 mg/g; EI1 的最低, 为 9.99 mg/g。四个时间点的培养物其可溶性蛋白含量存在显著差异。在 EI1~EI3 阶段, 可溶性蛋白含量逐渐上升, 且在 EI3 时达到最高, 这说明胚状体形成初期需要大量的蛋白质。

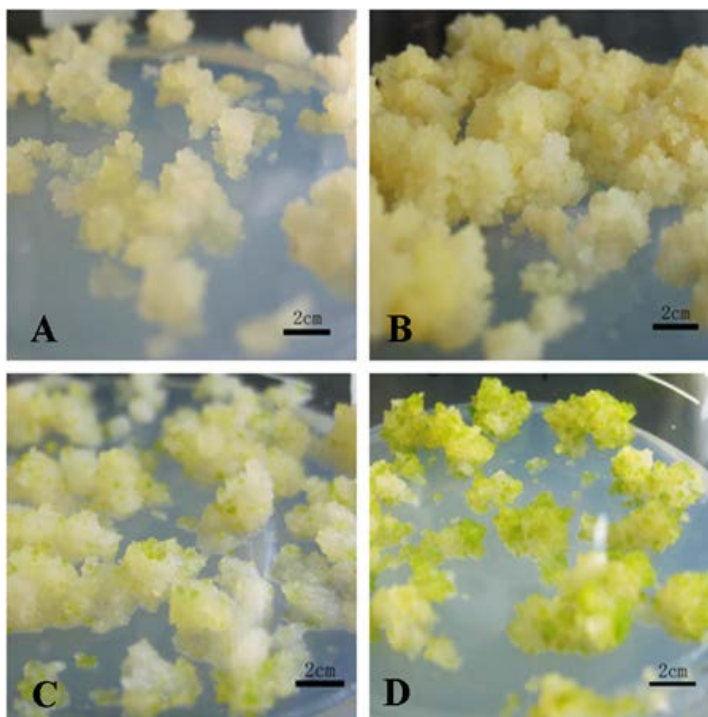


Figure 1. The induction of somatic embryogenesis of Ponkan. Note: (A) Inoculated embryonic calli (EI0); (B) Yellow embryonic calli (EI1); (C) Embryos that can be seen with the naked eye (EI2); (D) More than 50% of the embryos (EI3)

图1. 椴柑体细胞胚的诱导。(A) 刚接种的胚性愈伤组织(EI0);(B) 转成黄色的胚性愈伤组织(EI1);(C) 肉眼可见的胚状体(EI2); (D) 出现 50%以上的胚状体(EI3)

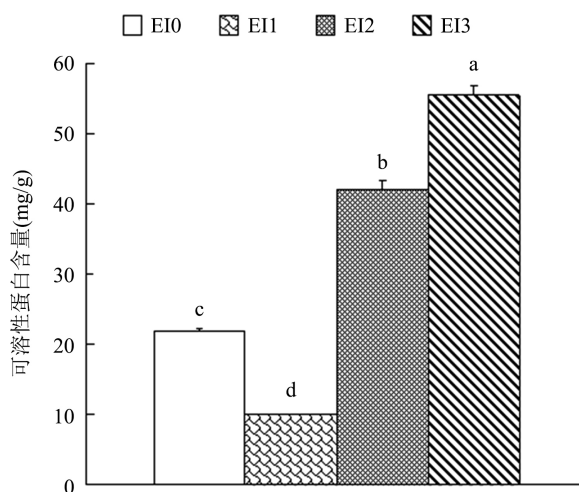


Figure 2. The change of soluble protein contents during the induction of somatic embryogenesis of Ponkan. Note: different letters represent significant differences ($P < 0.05$)

图2. 椴柑体细胞胚诱导过程中可溶性蛋白含量的变化。注：不同字母代表在 0.05 水平差异显著

3.2.2. 椴柑体细胞胚诱导过程中过氧化氢含量的变化

如图 3 所示，在椴柑体细胞胚诱导过程中过氧化氢含量先逐渐上升后下降。其中 EI2 的过氧化氢含量最高，达 12.28 mmol/gprot；EI0 的最低，为 3.05 mmol/gprot。这暗示着胚状体形成的早期阶段需要较高的活性氧含量。

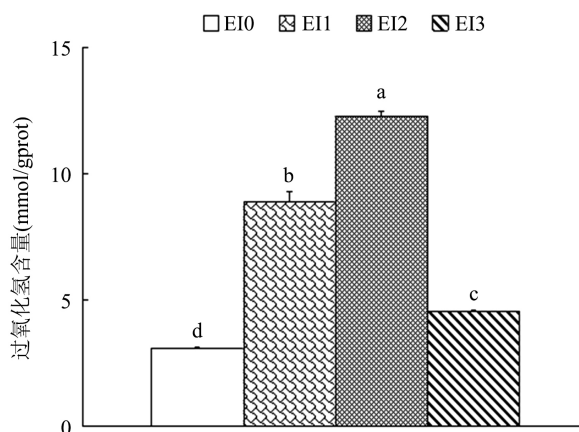


Figure 3. The change of hydrogen peroxide contents during the induction of somatic embryogenesis of Ponkan. Note: different letters represent significant differences ($P < 0.05$)

图 3. 椴柑体细胞胚诱导过程中过氧化氢含量的变化。注：不同字母代表在 0.05 水平差异显著

3.2.3. 椴柑体细胞胚诱导过程中 SOD、POD、CAT 活力的变化

如图 4 所示，在椴柑体细胞胚诱导过程中，从 EI0 到 EI2 阶段三种酶活力都表现出先升高后下降的变化规律。其中，在椴柑愈伤组织转入含甘油的诱导培养基 15 天后，三种抗氧化酶活力都显著上升。这表明愈伤组织分化形成体胚的起始阶段可能存在氧化胁迫(EI1 的活性氧含量是 EI0 的 2.91 倍)，激活了体内抗氧化系统。而在 EI2 到 EI3 阶段，POD、CAT 活力下降，SOD 活力则升高。说明 SOD 活力上升可能对胚状体进一步发育有促进作用。

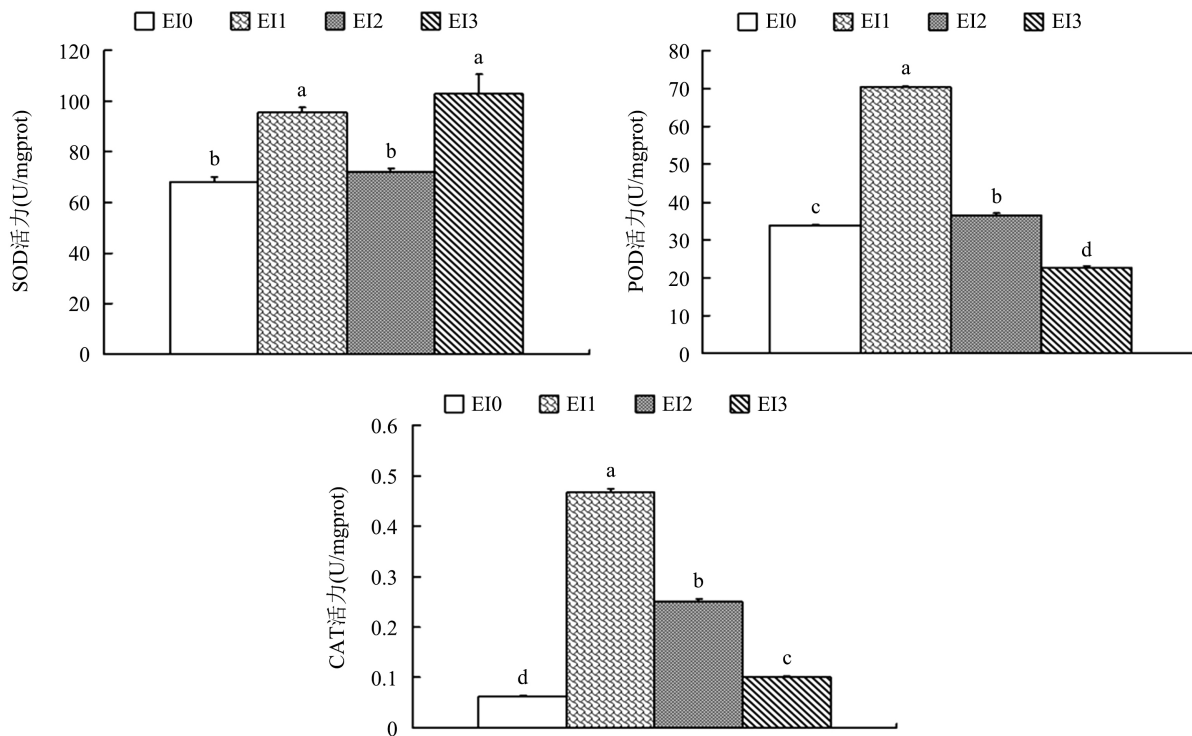


Figure 4. The change of SOD, POD, CAT activity during the induction of somatic embryogenesis of Ponkan. Note: different letters represent significant differences ($P < 0.05$)

图 4. 椴柑体细胞胚诱导过程中 SOD、POD、CAT 活力的变化。注：不同字母代表在 0.05 水平差异显著

4. 讨论

蛋白质是生命活动的物质基础和重要调节物质,蛋白质数量和种类反映出植物代谢水平和发育阶段。因此,体胚发生过程中必然伴随着蛋白质含量的变化。已有研究表明,体胚发生与蛋白质含量的变化有密切关系,蛋白质在体胚发生的重要转折时期为其提供物质与能量[16]。通过对不同植物体胚发生过程中蛋白质含量分析发现多数植物表现出相似的变化趋势[5] [6] [7] [8] [9],可以分为以下两个阶段。第一阶段指胚性愈伤组织至形成球形胚时,蛋白质含量呈现上升变化趋势,可见蛋白质为体胚的发生提供了物质基础;第二阶段指球形胚至成熟胚时,蛋白质含量出现持续下降,可能是细胞内蛋白质被转化成糖类或其他物质以供体胚发生所需。本研究中,可溶性蛋白含量在椴柑愈伤组织至体胚发育初期整体出现上涨,但在诱导早期可溶性蛋白含量出现下降。这可能因为愈伤组织长期继代于 MT 培养基中,转到甘油培养基后由于生长环境的改变而引起蛋白含量的变化。刘华英[4]采用不同处理条件来诱导柑橘体胚时,发现细胞生长环境的变化也会引起蛋白质含量的变化。

活性氧不仅在有氧代谢过程中产生,当植物受到各种胁迫时也会导致活性氧的增加。活性氧对于植物来说是一把双刃剑,因为植物的生长发育离不开活性氧,但是当植物体内活性氧超过细胞所能承受的阈值时则会造成细胞膜损伤甚至细胞死亡。已有研究表明,在植物体胚发生过程中,活性氧含量和抗氧化酶活力会发生显著变化[7] [8] [10] [12] [13] [17] [18] [19]。本研究结果表明,在 EI0 到 EI1 时,过氧化氢含量及 SOD、POD、CAT 三种酶活力都增加;在 EI2 时, H₂O₂ 含量达到最大值,但三种酶活力都下降;在 EI3 时, H₂O₂ 含量、CAT、POD 活力下降,但 SOD 上升。所以,我们推测细胞内保持较高水平的活性氧有利于细胞的增殖和体胚的诱导[8] [12] [13] [20]。然而产生的活性氧来自何处目前尚不清楚,如能借助有效的活性氧探针揭示活性氧来源将有助于调控体胚发生。另外,值得注意的是,本研究中这三种酶活力变化趋势不一样,其中 POD 与 CAT 活力变化一致。可见,这三种酶在椴柑体细胞胚诱导中起着不同的作用,其具体调控机制还有待进一步研究。

基金项目

江苏省自然科学基金(BK20181454);扬州大学科技创新培育基金(2019CXJ120)。

参考文献

- [1] 唐丽苹,李兴国,张宪省,苏英华.体细胞胚胎发生:植物体细胞命运的重塑[J].植物生理学报,2020,56(8):1664-1680.
- [2] Fehér, A. (2015) Somatic Embryogenesis—Stress-Induced Remodeling of Plant Cell Fate. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, **1849**, 385-402. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>
- [3] Mendez-Hernandez, H.A., Ledezma-Rodriguez, M., Avilez-Montalvo, R.N., Juárez-Gómez, Y.L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., et al. (2019) Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, **10**, Article No. 77. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>
- [4] 刘华英.柑橘体细胞胚发生的细胞学及生理生化特性研究[D]:[博士学位论文].长沙:湖南农业大学,2003.
- [5] 鲁旭东,石刁柏 UC800 体细胞胚发生系统的建立及其生理生化机理研究[D]:[博士学位论文].长沙:湖南农业大学,2004.
- [6] 詹园凤,吴震,金潇潇,王广东.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.
- [7] 江荣翠.滇楸体细胞胚胎发生及其机理研究[D]:[博士学位论文].南京:南京林业大学,2010.
- [8] Dhir, R., Shekhawat, G.S. and Alam, A. (2014) Improved Protocol for Somatic Embryogenesis and Calcium Alginate Encapsulation in *Anethum graveolens* L.: A Medicinal Herb. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **173**, 2267-2278. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1032-x>
- [9] 辛伟杰.花烛体细胞胚胎发生及相关生理生化研究[D]:[硕士学位论文].南京:南京农业大学,2006.

- [10] 陶雷. 刺五加体细胞胚发生机制的初步研究[D]: [博士学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2013.
- [11] 娜苏勒玛. 沙地云杉体细胞胚胎不同发育时期生理生化特性研究[D]: [硕士学位论文]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
- [12] Ma, L., Xie, L., Lin, G., Jiang, S., Chen, H., Li, H., *et al.* (2012) Histological Changes and Differences in Activities of Some Antioxidant Enzymes and Hydrogen Peroxide Content during Somatic Embryogenesis of *Musa AAA cv. Yueyoukang 1*. *Scientia Horticulturae*, **144**, 87-92. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.06.039>
- [13] Wu, G., Wei, X., Wang, X. and Wei, Y. (2021) Changes in Biochemistry and Histochemical Characteristics during Somatic Embryogenesis in *Ormosia henryi* Prain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, **144**, 505-517. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01973-5>
- [14] 付春华. 原生质体融合创造柑橘新材料及其遗传分析[D]: [博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2003.
- [15] 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.
- [16] 盛德策, 李凤兰, 刘忠华. 植物体细胞胚发生的细胞生物学研究进展[J]. 西北植物学报, 2008, 28(1): 204-215.
- [17] Cui, K.R., Xing, G.S., Liu, X.M., Xing, G.M. and Wang, Y.F. (1999) Effect of Hydrogen Peroxide on Somatic Embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Science*, **146**, 9-16. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00087-4)
- [18] 孙倩. 外源酶和 H₂O₂ 处理对水曲柳合子胚外植体的褐化及体胚发生的影响[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012.
- [19] 贺丹, 毛仓仓, 陈颖, 王政, 何松林. H₂O₂ 对牡丹愈伤组织分化及抗氧化酶活性的影响[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(1): 122-125.
- [20] Yang, S., Su, X., Prasad, K.N., Yang, B., Cheng, G., Chen, Y., *et al.* (2018) Oxidation and Peroxidation of Postharvest Banana Fruit during Softening. *Pakistan Journal of Botany*, **40**, 2023-2029.