

魔芋组织培养中不同生长阶段同工酶变化的研究*

李剑美¹, 谢庆华², 张云峰², 赵庆云¹, 梁艳丽¹, 杨 燕¹, 谢世清^{1**}

(1. 云南农业大学魔芋研究所, 云南 昆明 650201; 2. 云南师范大学生物研究所, 云南 昆明 650092)

摘要: 利用聚丙烯酰胺电泳分离了楚魔花1号、魔白10号和谢君魔芋和魔野14号4个种组织培养中的3个时期(苗期、生根期、结薯期)的酯酶和过氧化物酶, 分析比较了2种同工酶在4个魔芋种的3个时期酶谱数量、酶活性的变化, 得出了3个时期酶谱和酶活性变化的规律。结果表明: 酯酶酶带数以生根期最多, 苗期和结薯期的变化没有规律; 酶活性在楚魔花1号、魔白10号和谢君魔芋3个魔芋种的生根期和结薯期的变化不是很大, 都强于苗期的酶活性, 魔野14号的酶活性则是苗期和生根期的相似, 且稍大于结薯期。过氧化物酶酶带数在4个种中没有变化, 只是不同生育时期酶谱迁移率略有不同; 酶的活性除谢君魔芋外都呈现, 结薯期最强, 生根期次之, 苗期最弱。谢君魔芋的酶活性变化则是苗期最强, 生根期次之, 而结薯期最弱。结果表明2种同工酶在魔芋的不同阶段都有选择性的表达, 在一定的程度上参与了魔芋的形态建成。

关键词: 魔芋; 组织培养; 生长发育阶段; 同工酶

中图分类号: S 632.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2008)05-0603-06

Change of Isoenzyme at Different Growth and Development Stages of Tissue Culture in *Amorphophallus*

LI Jian-mei¹, XIE Qing-hua², ZHANG Yun-feng², ZHAO Qing-yun¹,
LIANG Yan-li¹, YANG Yan¹, XIE Shi-qing¹

(1. Amorphophallus Konjac Research Institute, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Institute of Biology, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China)

Abstract: The zymograms and enzymes activity of esterase isoenzymes and peroxides isoenzymes of *Amorphophallus xiei* P. Y. Liu, *Amorphophallu konjac* K. Coch, *Amorphophallus albus* P. Y. Liu, MoYe14 *Amorphophallus* sp. at 3 growth and development stages in tissue culture were studied by electrophoresis. The results were as follows: the zymograms of esterase enzymes were the most at rooting period, the change law of zymograms at seedling stage and tuber formation period were not observed; enzyme activity of esterase enzymes was the strongest at tuber formation period, the next was at rooting period, and that at seedling stage was the weakest in *A. konjac* K. Coch, *A. xiei* P. Y. Liu and *A. albus* P. Y. Liu. Enzyme activities in *Moye14 Amorphophallus* sp. at seedling stage and rooting period were similar and stronger than that at the tuber formation stage. There was no change of zymogram of peroxides enzymes in 4 species at the 3 stages; Enzyme activity was the strongest at tuber formation stage, the next was rooting period, that was the weakest at seedling stage, but *A. xiei* P. Y. was just opposite.

Key words: *Amorphophallus*; tissue culture; growth and development stage; isoenzyme

收稿日期: 2007-11-02 修回日期: 2008-05-29

* 基金项目: 云南省科技攻关计划项目资助 (2001NG59)

** 通讯作者: E-mail: notexie@163.com

作者简介: 李剑美 (1981-), 女, 云南普洱人, 硕士, 主要从事薯类作物研究。E-mail: 1981ljm@163.com

魔芋 (*Amorphallus*) 是天南星科 (Araceae) 魔芋属 (*Amorphallus* Blume) 多年生宿根性草本植物^[1]。魔芋含有具有广泛应用价值的葡甘露聚糖, 在工业、食品及医药行业等方面有着广泛的用途, 市场上对魔芋产品的需求量较大。魔芋是适宜于山区栽培的一种经济价值较高的作物, 因而魔芋的种植在近十几年得到了迅速的发展。魔芋组织培养虽然前人作过一些研究, 但大都仅限于通过一些培养成分、培养材料和培养条件的改变来改进组织培养技术^[2-5]。对组织培养过程中分子水平上的变化还没有报道。同工酶是指具有相同催化功能而结构及理化性质不同的一类酶^[29], 同工酶在植物体内的普遍存在以及与生长发育的关系是基因表达的灵敏指标, 若能在同工酶的出现与变异方面找出其与生长发育之间的关系, 就能更好地调控生长发育的进程, 可以了解魔芋组培中器官的发生和形态建成在分子水平上的变化, 更好的促进魔芋组织培养的发展。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料包括: 谢君魔芋 (*Amorphaphollu xiei* P. Y. Liu)、楚魔花 1 号 (*Amorphaphollu konjac* K. Coch)、魔白 10 号 (*Amorphaphollu albus* P. Y. Liu)、和魔野 14 号 MoYe14 *Amorphaphollus* sp.。4 个种的 3 个时期 (苗期、生根期和结薯期) 的魔芋叶片。

1.2 试验设计

从大田中挖取的魔芋球茎充分洗干净后晾干, 在超净工作台内去皮, 切成较大的组织块, 先用 75% 的酒精处理 5 s, 再用 0.1% 的升汞消毒 20 ~ 25 min, 最后用蒸馏水冲洗 4 ~ 5 次后, 将较大组织块切成 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm (约 0.1 ~ 0.2 g) 接种到分化培养基中, 期间每隔 1 个月换 1 次新鲜培养基, 经过 3 ~ 4 次的转接后, 魔芋组培苗长到 3 ~ 4 cm 时 (苗期材料); 将组培苗转接到生根培养基中, 大约 20 d 后魔芋苗开始生根 (生根期材料), 再过大约 40 d 后是魔芋试管薯的形成期 (结薯期材料)。取这 3 个时期的叶片, 进行同工酶的提取。同工酶的提取、检测、染色和保存均参照陈毓荃主编的《生物化学实验方法和技术》一书, 并稍加改进。

2 结果与分析

2.1 酯酶同工酶的检测结果

苗期、生根期、结薯期对魔野 14 号、楚魔花 1 号、魔百 10 号、谢君魔芋的叶片酯酶同工酶分析结果, 见表 1 和图 1 ~ 4。3 个时期 4 个魔芋种叶片共分离出 18 条带, 酶带依次命名 e1 ~ e18, 根据酶带集中的部位, 按迁移率 (Rf) 从负极到正极大致可分为 A 区 (Rf < 0.30), B 区 (Rf: 0.3 ~ 0.5), C 区 (Rf ≥ 0.5) 3 个酶区, 把它们分别称为慢速区、中速区和快速区。由表 1 和图 1 ~ 4 可知在不同的生长时期, 酶带数、酶的活性和酶谱迁移率都有不同的变化, 大致的规律是, 酶带数: 生根期最多, 苗期和结薯期的变化没有规律; 酶活性除魔野 14 号外 (苗期和生根期接近略大于结薯期), 其它 3 个魔芋种的酶活性均表现出生根期与结薯期相似, 且强于苗期; 中速区的大部分酶带在 3 个时期都参与了表达, 它们的活性也是 3 区中最强的; 酶谱的迁移率在不同的生育时期也有所不同, 但在快速区中酶谱的迁移率因不同时期变化更显著。在同一个种中 A 区和 B 区的酶带数变化不是很大, 只是酶的活性有所不同, 在 C 区酶带数变化较大。具体各个种的分析如下。

2.1.1 魔野 14 号酯酶同工酶检测结果

魔野 14 号, 叶片 3 个时期酯酶同工酶电泳图谱见图 1, 由图 1 和表 1 可看出, 共分离出 12 条酶带, 酶带依次命名 e1, e3, e5, e6, e9, e10, e11, e14, e15, e16, e17, e18, 迁移率分别为 0.138, 0.228, 0.251, 0.276, 0.406, 0.413, 0.448, 0.586, 0.634, 0.689, 0.841, 0.897。苗期共有 5 条带表达, 它们是 e1, e5, e10, e11, e16, 在 A 区和 B 区各分布有两条、C 区 1 条带, 其中的 B 区活性最强而又以 e10 为代表; 生根期有 9 条带带参与了表达, 分别是 e1, e3, e6, e10, e11, e14, e15, e16, e17, 其中 A 区 3 条, B 区 2 条, C 区 4 条, e10 是所有参与表达的带中活性最强的; 结薯期有 6 条带表达, 依次是 e1, e9, e10, e11, e15, e18, 分别分布于 3 个区中, 其中 A 区 1 条, B 区 3 条, C 区 2 条。e1, e10, e11 在 3 个生育时期都有表达。酶带数: 生根期的 9 条带 > 试管薯应答期的 6 条带 > 苗期的 5 条带。酶活性: 苗期和生根期接近略大于结薯期。

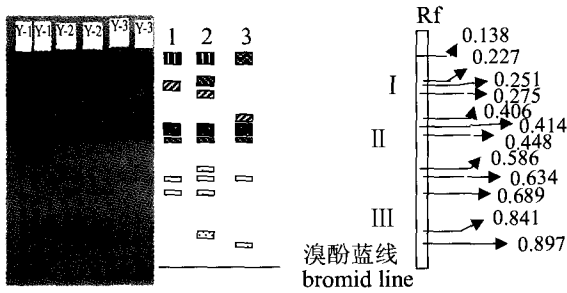


图1 魔野14号叶片3个时期的酯酶同工酶的酶谱
Fig. 1 Zymogram of esterase isoenzymes of leaves in Moye 14 *Amorphophollus* sp. at 3 stages

注: 1 苗期; 2 生根期; 3 结薯期; Rf 迁移率, 下图同。
Note: 1-seedling stage; 2-rooting stage; 3-tuber formation stage; Rf-mobility ratio; the same as below.

2.1.2 楚魔花1号酯酶同工酶检测结果

3个时期楚魔花1号叶片共分离出9条带, 酶带依次命名为 e1, e2, e6, e7, e8, e9, e10, e14, e15。迁移率分别为: 0.138, 0.188, 0.276, 0.359, 0.375, 0.406, 0.414, 0.556, 0.634。苗期 e9 酶带没有表达, 其他的8条带都参与了表达, 其中 A 区分布有2条, B 区有3条, C 区2条, e7 的活性较强; 生根期 e14 没有表达, 其余8条带都进行了表达, 其中 A 区分布有2条, B 区4条, C 区1条, e6, e7, e8 的活性较强; 结薯期比生根期少 e2 带, 其他的如酶带分布、迁移率和在各区的分布情况都和生根期相同, 酶的活性要稍大于生根期。在楚魔花1号中 e1, e6, e7, e8, e9 四条酶带在3个生育时期都有表达, 且是最强的活性区域, 主要分布于 B 区, 其中又以 e7 的活性最强。活性强弱也随不同的生育时期而发生改变: 结薯期与生根期接近且都大于苗期。酶带数: 生根期和苗期分离出来了8条带, 结薯期分离出了7条带。见图2和表1。多数的酶带都集中在 B 区, 也是酶活性最活跃的区域。

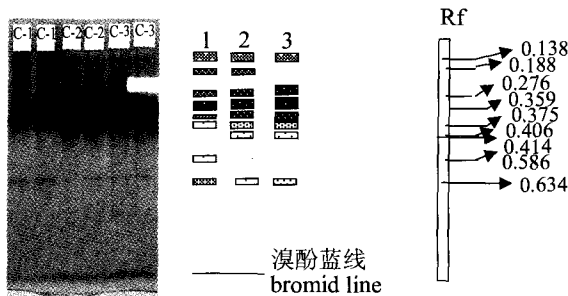


图2 楚魔花1号叶片3个时期的酯酶同工酶的酶谱
Fig. 2 Zymogram of esterase isoenzymes of leaves in *A. konjac* at 3 stages

2.1.3 魔白10号酯酶同工酶检测结果

由图3和表1可知, 3个时期魔白10号的叶片共分离出9条带, 它们是 e1, e4, e7, e9, e10, e11, e12, e14, e15。迁移率为 0.138, 0.241, 0.359, 0.408, 0.414, 0.448, 0.500, 0.586, 0.634。

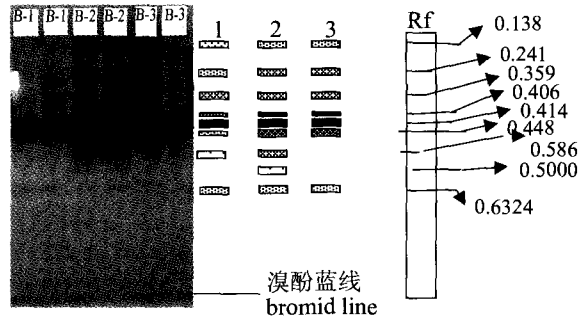


图3 魔白10号叶片3个时期的酯酶同工酶的酶谱
Fig. 3 Zymogram of esterase isoenzymes of leaves in *A. albus* at 3 stages

在魔白10号中酶的条带数在变化不明显, 只是生根期比苗期和结薯期多 e14 酶带, 苗期又比结薯期多 e12 酶带; 酶活性: 结薯期和生根期相接近, 且远大于苗期。酶带的分布大多集中在 B 区, 此区也是酶活性最活跃的区域。

2.1.4 谢君魔芋酯酶同工酶检测结果

3个时期谢君魔芋叶片的共分离出了8条带, 它们是 e2, e4, e7, e9, e10, e13, e14, e15, 迁移率依次为 0.188, 0.241, 0.359, 0.408, 0.414, 0.559, 0.586, 0.634。苗期中除了 e14 外其余的7条带参与了表达, e13, e14, e15, 迁移率依次为 0.188, 0.241, 0.359, 0.408, 0.414, 0.559, 0.586, 0.634。苗期中除了 e14 外其余的7条带参与了表达, A 区分布有2条, B

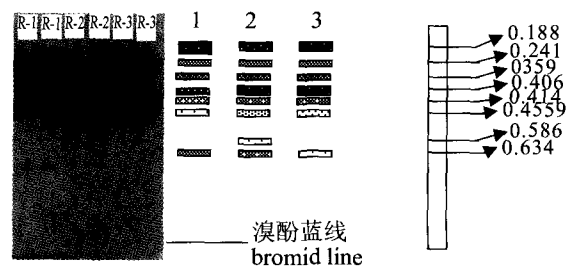


图4 谢君魔芋叶片3个时期的酯酶同工酶的酶谱
Fig. 4 Zymogram of esterase isoenzyme of leaves in *A. xiei* at 3 stages

区 4 条, C 区 1 条, 其中 e9 的活性最强,; 生根期 8 条带都参与了表达, A 区分布有 2 条, B 区 4 条, C 区 2 条, 其中 e9, e10, 的活性最强; 结薯期酶带的分布和迁移率与苗期基本上没有差别。

谢君魔芋叶片 3 个时期酶谱大致变化规律是: 酶带数以生根期最多, 结薯期和苗期相同; 酶活性: 结薯期和生根期相接近, 且大于苗期。见图 4 和表 1。

表 1 3 个时期 4 个魔芋种叶片酯酶同工酶迁移率 (Rf)

Tab. 1 The mobility ratio (Rf) of esterase isoenzyme of leaves in three stages on four species of *Amorphaphollus*

项目 item	魔野 14 号 MoYe14 <i>Amorphaphollus</i> sp.			楚魔花 1 号 <i>A. konjac</i> K. Coch			魔白 10 号 <i>A. albus</i> P. Y. Liu			谢君魔芋 <i>A. xiei</i> P. Y. Liu		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
	e1	0.138#	0.138#	0.138-	0.138#	0.138--	0.138-	0.138-	0.138-	0.138-		
e2				0.188#	0.188#					0.188#	0.188#	0.188#
e3		0.228-										
e4							0.241#	0.241#	0.241#	0.241#	0.241#	0.241#
E5	0.251#											
e6		0.276--		0.276#	0.276 *	0.276 *						
e7				0.359 *	0.359 *	0.359 *	0.359 *	0.359 *	0.359 *	0.359---	0.359---	0.359---
e8				0.375#	0.375 *	0.375 *						
e9			0.406---	0.406-	0.406#	0.406#	0.406#	0.406#	0.406#	0.406 *	0.406 *	0.406 *
E10	0.413 *	0.414 *	0.414 *		0.414---	0.414---	0.414 *	0.414 *	0.414 *	0.414-	0.414#	0.414#
e11	0.448---	0.448-	0.448-				0.448--	0.448 *	0.448 *			
e12							0.5--	0.5--				
e13										0.559-	0.559--	0.559-
e14		0.586-		0.586-					0.586-		0.586--	
e15		0.634	0.634--	0.634--	0.634--	0.634--	0.634--	0.634--	0.634--	0.634--	0.634--	0.634--
e16	0.689-	0.689-										
e17		0.841--										
e18			0.897-									
总数 gross	5	9	6	8	8	7	8	9	8	7	8	7

注: * 强带; # 较强带; ---中等带; --弱带; -痕迹

Note: *: stronger band; #: strong band; ---: middle band; --: weak band; -: trace.

2.2 过氧化酶同工酶谱分析

结果见表 2 及图 5~8, 3 个时期 4 个魔芋种叶片共分离出 8 条带依次命名 P1~P8。酶带数: 4 个魔芋种没有变化, 只是不同生育时期酶谱迁移率略有不同。酶的活性除谢君魔芋外都呈现: 结薯期最强, 生根期次之, 苗期最弱。谢君魔芋的酶活性变化则表现出苗期最强, 生根期次之, 结薯期最弱。各个种的过氧化物酶的分析结果如下。

2.2.1 魔野 14 号过氧化物酶同工酶检测结果

由图 5 和表 2 可知, 3 个时期魔野 14 号的叶片共分离出 5 条带, 依次是 P2, P3, P5, P7, P8, 迁移率为 0.12, 0.14, 0.24, 0.30, 0.34。苗期 P2, P5, P8 3 条带参与了表达, 其中 P8 的活性较强; 生根期 P2, P3, P5 表达, 3 条都是弱带。结薯期 P2, P5, P7 3 条带参与了表达, P1 和 P5 是强带, P7 是弱带。魔野 14 号过氧化物酶

同工酶酶谱带数没有发生改变, 只是活性和酶带的迁移率有所差别, 迁移率: 苗期 > 结薯期 > 生根期; 酶活性: 结薯期酶活性最强, 苗期和生根期接近。

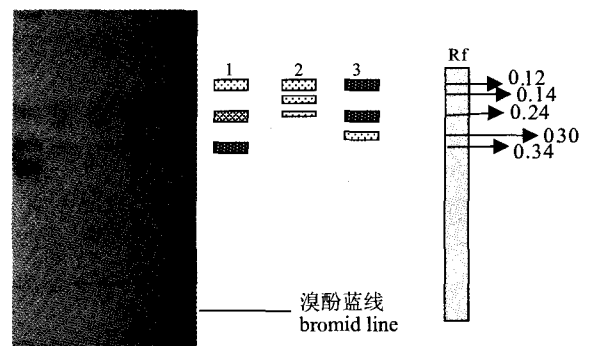


图 5 3 个时期魔野 14 号的过氧化物酶同工酶的酶谱分析

Fig. 5 Zymogram of peroxidase isoenzymes of leaves in Moye 14 *Amorphaphollus* sp. at 3 stages

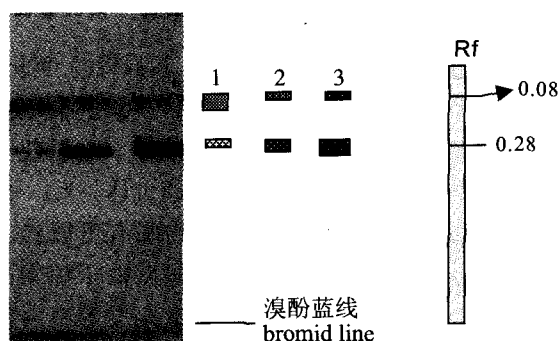


图 6 3 个时期楚魔花的过氧化物酶同工酶的酶谱分析
Fig. 6 Zymogram of peroxides isoenzymes of leaves in *A. konjac* at 3 stages

两条带, 迁移率为 0.08, 0.28。过氧化物酶的酶带数和迁移率在 3 个时期都没有变化, 只是酶的活性呈现: 结薯期最强, 生根期次之, 苗期最弱 (见图 6 和表 2)。

2.2.3 魔白 10 号过氧化物酶同工酶检测结果分析

由图 7 和表 2 可知, 魔白 10 号叶片在 3 个不同的时期有 P1, P4, P5, P6 这 4 条带参与表达, 且在 3 个时期中都有不同程度的表达, 迁移率分别为: 0.08, 0.208, 0.24, 0.28。魔白 10 号中过氧化物酶在 3 个时期的表达规律: 酶带数和迁移率基本上没有变化。但是酶活性的差异较大: 结薯期最强, 生根期次之, 苗期最弱。

2.2.2 楚魔花 1 号过氧化物酶同工酶检测结果分析

3 个时期楚魔花 1 号的叶片共分离出 P1, P6

表 2 3 个时期 4 个品种魔芋叶片过氧化物酶同工酶迁移率 (Rf)

Tab. 2 Mobility ratio of esterase isoenzyme of leaves at 3 stages in 4 species of *Amorphaphollus* sp.

项目 item	魔野 14 号 MoYe14 <i>Amorphaphollus</i> sp.			楚魔花 1 号 <i>A. konjac</i> K. Coch			魔白 10 号 <i>A. albus</i> P. Y. Liu			谢君魔芋 <i>A. xiei</i> P. Y. Liu		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
	P1				0.08-	0.08--	0.08--	0.08-	0.08-	0.08--	0.08 *	0.08--
P2	0.12-	0.12--	0.12---									
P3		0.14-										
P4							0.208-	0.208-	0.20--	0.208#	0.208--	0.208#
P5	0.24--	0.24-	0.24 *				0.24#	0.24-	0.24 *	0.24---	0.24-	0.24-
P6				0.28--	0.28#	0.28#	0.28-	0.28#	0.28#			
P7			0.30--									
P8	0.34#											
总数 gross	3	3	3	2	2	2	4	4	4	3	3	3

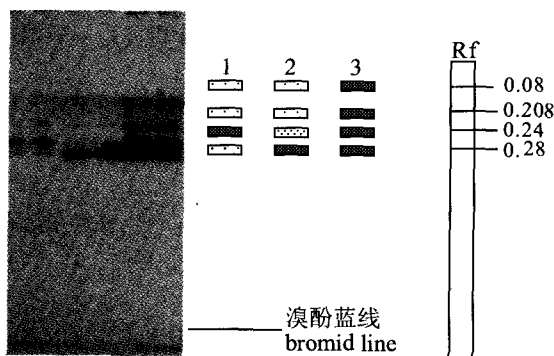


图 7 3 个时期魔白 10 号的过氧化物酶同工酶的酶谱分析
Fig. 7 Zymogram of peroxides isoenzymes of leaves in *A. albus* at 3 stages

P5 这 3 条带参与表达, 迁移率为 0.08, 0.208, 0.24。3 个时期过氧化物酶的酶带数和迁移率均没有变化, 只是酶的活性呈现: 苗期较强, 生根

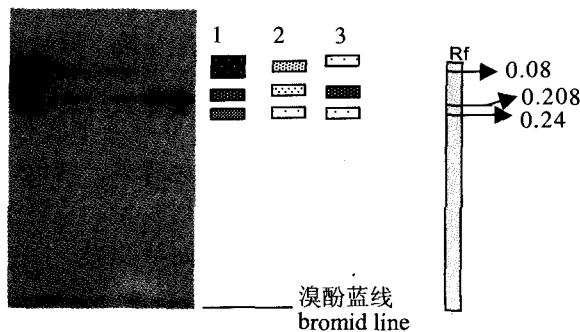


图 8 3 个时期谢君魔芋的过氧化物酶同工酶的酶谱分析
Fig. 8 Zymogram of peroxides isoenzymes of leaves in *A. xiei* at three stages

2.2.4 谢君魔芋过氧化物酶同工酶检测结果分析

谢君魔芋叶片在 3 个不同的时期有 P1, P4,

期与结薯期相似。见表 2 和图 4。谢君魔芋在过氧化物酶中所表达的酶的活性与其它 3 个魔芋种略有差异。

3 讨论与结论

(1) 酯酶在植物体内广泛存在, 它可能参与酯代谢, 与内膜系统的发育有关, 也参与若干酶类的修饰、激活或钝化^[7]。过氧化物酶是一族能利用过氧化氢 (H_2O_2) 氧化供氢体的酶, 对 H_2O_2 非常专一, 而对供氢体的要求较为广泛: 酚类、胺类化合物、某些杂环化合物和一些无机离子等都可以作为过氧化物酶的供氢体^[8], 过氧化物酶广泛存在于植物中, 清除过剩的自由基, 使体内自由基维持在一个正常的动态水平, 以提高植物的抗逆性。

(2) 酯酶和过氧化物酶在质 [酶带数目和迁移率 (Rf)] 和量 (酶活性) 上的差异。是可以了解某一植物组织或器官的某些同工酶带在一定发育时期的出现以及在另一发育时期这些酶带减弱或消失。这一现象是由于植物器官在发育进程中酶分子的重新合成或酶前提物的活化所致; 另一方面是由于酶分子发育过程中的降解, 促使酶带的消失或减弱。总之出现这样的原因主要是分化基因作用产生了生理生化差异的缘故^[9]。

(3) 研究表明: 酯酶不同的生长时期, 酶带数、酶的活性和酶谱迁移率都有不同的变化。表明酯酶同工酶酶谱的变化在一定程度上受植物器官不同生长时期的影响。植物的形态建成是基因组按一定的时空顺序选择性表达的结果。酯酶酶带数在生根期表达的最多, 苗期和结薯期, 也进行了选择性的表达, 这可能是与酯酶参与了根的形态建成有关。酶的活性除魔野 14 号外, 都呈现结薯期与生根期的酶活性较接近, 且都强于苗期, 特别是在 B 区的酶带, 酶活性与第一阶段分化好的试管苗的酶活性有明显的区别, 这可能是以某些生理代谢的变化, 诸如营养物质的转移, 和不同的激素组合和浓度水平变化有关, 这也应证了同工酶活性强弱是基因在表达时受一系列遗传调控所致, 是保证生物正常代谢活动另一不可

缺少的必需条件^[10]。

(4) 过氧化物酶, 酶带数几乎不发生变化, 只是酶的活性除谢君魔芋 (苗期最强, 生根期次之, 结薯期最弱) 外都呈现: 结薯期 > 生根期 > 苗期。这个与酯酶的酶活性变化是大体一致, 也进一步的说明了, 酯酶和过氧化物酶有可能参与了植物的形态建成, 酶活性的变化反映了植物的形态上发生的变化。研究结果与崔振辰等在对辣椒 9 个生育时期进行了过氧化物酶、超氧化物歧化酶和酯酶的研究, 发现不同发育时期 3 种同工酶均有不同程度的变化一致。

[参考文献]

- [1] 刘佩瑛. 魔芋学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [2] 谢庆华, 张云峰, 谢世清, 等. 不同外植体诱导魔芋微球茎的比较研究 [J]. 云南农业大学学报, 2005, 20 (3): 350-355.
- [3] 彭昌操. 花魔芋愈伤组织诱导研究 [J]. 湖北民族学院学报 (自然科学版), 2000, 18 (3): 1-3.
- [4] 谢庆华, 谢世清, 桑林, 等. 花魔芋不同外植体分化及生根条件研究 [J]. 云南农业大学学报, 2004, 19 (6): 696-699.
- [5] 黄丹枫, 陆文初. 细胞分裂与魔芋组织培养与植株再生研究 [J]. 西南农业大学学报, 1993, 15 (6): 522, 526.
- [6] 吴毅歆, 隋启君, 谢庆华, 等. 魔芋块茎脱毒高效快繁体系的构建 [J]. 西南农业学报, 2006, 19 (4): 722-727.
- [7] 高文远, 李志亮, 肖培根. 浙贝母种子两种低温解除休眠过程中酯酶同工酶的电泳分析 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22 (5): 233-234.
- [8] 梁艳荣, 胡晓红, 张颖力, 等. 植物过氧化物酶生理功能研究进展 [J]. 内蒙古农业大学学报, 2003, 24 (2): 110-113.
- [9] 胡志昂. 裸子植物的生化系统学 (一) 松科植物的过氧化物酶 [J]. 植物分类学报, 1983, 21 (4): 423.
- [10] 刘慧慧, 黄云, 赵淑江. 紫贻贝 SOD 和 POD 同工酶的组织特异性研究 [J]. 河北渔业, 2006, (3): 14-16.