

睡莲不同器官和不同生长阶段的过氧化物酶 和酯酶同工酶比较

张海平¹, 房伟民¹, 陈发棣¹, 丁跃生², 杨雪萌¹

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095; 2. 江浦艺莲苑花卉有限公司, 江苏南京 211800)

摘要: 利用聚丙烯酰胺垂直板电泳技术对 3 个睡莲 *Nymphaea* 品种 ‘彼得’ ‘Peter Slocum’, ‘玛珊姑娘’ ‘Masaniello’ 和 ‘得克萨斯’ ‘Texas Dawn’ 不同器官(未展开的幼叶、展开的幼叶、老叶、花瓣、花蕾、叶柄)和未展开的幼叶在营养生长阶段和生殖生长阶段的过氧化物酶(POD)和酯酶(EST)同工酶进行了研究。结果表明: ①3 个品种共有 12 种过氧化物酶酶带, 6 种酯酶酶带。②睡莲的过氧化物酶和酯酶具有组织特异性, 其中未展开嫩叶和展开嫩叶的酶带最多, 叶柄和花蕾次之, 花瓣和老叶最少。未展开幼叶为较适用于睡莲同工酶分析。③与生殖生长阶段相比, 3 个睡莲品种未展开幼叶在营养生长阶段的酯酶表达量更大, 条带更多; 而过氧化物酶同工酶表达量则是生殖生长阶段的表达量大, 但 3 个品种的酶条带变化不一致, 其中 ‘彼得’ 和 ‘玛珊姑娘’ 在生殖生长阶段的过氧化物酶同工酶阶段条带多 ‘得克萨斯’ 则相反。图 4 表 3 参 15

关键字: 植物学; 睡莲; 组织特异性; 过氧化物酶(POD); 酯酶(EST)

中图分类号: Q946.5; S682.32 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2010)02-0246-05

Isozyme analysis for different organs and growth stages of water lily

ZHANG Hai-ping¹, FANG Wei-min¹, CHEN Fa-di¹, DING Yue-sheng², YANG Xue-meng¹

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China; 2. Nanjing Yileen Water Garden Co., Ltd., Nanjing 211800, Jiangsu, China)

Abstract: Peroxidase isozyme (POD) and esterase isozyme (EST) of three water lily cultivars, *Nymphaea* ‘Peter Slocum’, *N.* ‘Masaniello’, and *N.* ‘Texas Dawn’, were studied using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in different organs (closed young leaf, open young leaf, old leaf, petal, flower bud and petiole) and growth stages of a closed young leaf. Results showed (1) 12 POD bands and 6 EST bands. Also, (2) POD and EST were tissue specific for the closed young leaf, open young leaf, old leaf, petal, bud, and petiole. The most isozyme bands were observed in the closed young leaf and the open young leaf with the least in the old leaf and petal. (3) In addition, compared to the reproductive growth stage, the closed leaf in the vegetative growth stage had more EST and EST bands. Meanwhile, there was more POD during the reproductive stage. However, during the reproductive growth stage more POD bands of *N.* ‘Peter Slocum’ and *N.* ‘Masaniello’ were found with more POD bands of *N.* ‘Texas Dawn’ noted during the vegetative growth stage. [Ch, 4 fig. 3 tab. 15 ref.]

Key words: botany; water lily; tissue specificity; peroxidase isozyme (POD); esterase isozyme (EST)

同工酶在一些植物上表现出阶段特异性和器官特异性, 且不同同工酶种类其特异性不同。

收稿日期: 2009-06-11; 修回日期: 2009-09-22

基金项目: 上海市农业科技成果及高新技术产业化项目(2004 第 3 号); 上海市农业科技攻关项目[沪农科攻字(2006) 第 4-2 号]

作者简介: 张海平, 硕士, 从事花卉遗传育种研究。E-mail: hai05381982@163.com。通信作者: 房伟民, 副教授, 从事花卉遗传育种研究。E-mail: fangwm@njau.edu.cn

Brewbaker 等^[1]在对玉米 *Zea mays* 的 21 个不同组织和器官过氧化物酶(POD)同工酶分析时发现了组织多型现象, 此后, 关于植物不同组织器官在不同生长发育阶段的同工酶差异研究已有许多报道^[2-7], 同工酶的阶段和组织特异性可以反映植物生长发育过程的基因表达情况, 同工酶酶谱还可以作为植物发育的指标用于植物分类、亲缘关系等方面研究。过氧化物酶广泛存在于高等植物的组织, 参与各种生理活动, 具有多种分子形式的阶段特异性和组织特异性, 在植物不同生长发育时期其同工酶酶谱构成及酶活性均存在差异, 表现为多型现象, 其变化与植物组织器官的分化、形成和生理状态等密切相关, 且酶谱变化先于形态分化^[8-10]。酯酶是催化酯类化合物水解的酶系, 它催化羧酸酯类的酯键的水解或合成, 在植物不同的生长发育时期表现出器官特异性和阶段的特异性^[11]。目前, 关于睡莲 *Nymphaea* 不同生长发育阶段及不同组织器官的同工酶分析尚未见报道。本研究拟对 3 个睡莲品种不同组织器官及不同阶段过氧化物酶和酯酶同工酶变化进行比较, 探讨 2 种同工酶在睡莲中的组织和阶段特异性, 为进一步对睡莲同工酶研究时的取材提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 不同组织器官同工酶分析的材料 供试材料为取自江浦艺莲苑花卉有限公司的 3 个睡莲品种: ‘彼得’ ‘Peter Slocum’, ‘玛珊姑娘’ ‘Masaniello’, ‘得克萨斯’ ‘Texas Dawn’, 同时期分别取其初花期未展开的幼叶(水下初出土幼叶)、展开的幼叶(水面初展开幼叶)、老叶(展开并呈暗绿色的成熟叶)、花瓣(当天盛开的花瓣)、花蕾(水下初出土花蕾)和叶柄(幼叶叶基 0.5 cm 处叶柄)用于同工酶分析(表 1)。

1.1.2 不同生长阶段同工酶分析材料 供试材料为以上 3 个睡莲品种, 分别在营养生长阶段(花蕾出土前)和生殖生长阶段(花期)取其未展开的幼叶, 每个品种取 5 片幼叶, 混合取样。

1.2 试验方法

参照何忠效等^[12]的方法, 并做适当调整。过氧化物酶和酯酶用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳, 过氧化物酶采用改良联苯胺法染色, 酯酶用 α -萘酚、坚牢蓝染色。在凝胶成像系统(上海培清科技有限公司, JS380 型)上观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 不同组织器官同工酶的酶谱分析

研究了 3 个睡莲品种未展开嫩叶、展开嫩叶、老叶、花瓣、花蕾和叶柄共 18 份材料在营养生长阶段的过氧化物酶和酯酶同工酶(图 1~2)。参照王中仁^[13]的等位酶分析方法, 确定了 8 个同工酶基因位点, 即 POD-1~6 和 EST-1 ~ EST-2。18 份材料共获得 12 种过氧化物酶条带, 6 种酯酶条带。POD-1 的 C 带为 3 个品种不同组织器官的共有带谱, POD-6 的 K 和 L 带为 ‘玛珊姑娘’ 的展开幼叶的特异带, 可以作为品种鉴定的指标。

2.2 不同组织器官同工酶的分析

3 个睡莲品种不同组织器官的过氧化物酶和酯酶酶谱表现组织特异性。酶带统计结果显示(图 1 ~ 2 和表 2), 以未展开的幼叶的酶带数最多, 共有 19 条过氧化物酶同工酶带, 13 条酯酶同工酶带; 其次为展开的嫩叶, 共 23 条过氧化物酶带, 7 条酯酶带; 再次为叶柄和花蕾; 花瓣和老叶的酶带最少, 分别为 11 和 6 条过氧化物酶带, 2 和 7 条酯酶带。叶片的过氧化物酶同工酶表达量比花瓣、花

表 1 供试材料

Table 1 Materials used in this study

编号	品种	器官	编号	品种	器官
1	彼得	未展开幼叶	10	玛珊姑娘	花瓣
2	彼得	展开幼叶	11	玛珊姑娘	花蕾
3	彼得	老叶	12	玛珊姑娘	叶柄
4	彼得	花瓣	13	得克萨斯	未展开幼叶
5	彼得	花蕾	14	得克萨斯	展开幼叶
6	彼得	叶柄	15	得克萨斯	老叶
7	玛珊姑娘	未展开幼叶	16	得克萨斯	花瓣
8	玛珊姑娘	展开幼叶	17	得克萨斯	花蕾
9	玛珊姑娘	老叶	18	得克萨斯	叶柄

蕾、叶柄的大，其中展开的幼叶的过氧化物酶同工酶表达量比其他5个组织均大，老叶的过氧化物酶同工酶条带表达量虽较大，但条带不清晰，花蕾和叶柄过氧化物酶条带较清晰，但条带较少。未展开幼叶酯酶同工酶表达量最大，且条带最清晰。3个品种均显示随着叶片的叶龄增大，酯酶同工酶表达量减弱，条带数减少，老叶中的酯酶同工酶几乎没有表达，‘彼得’和‘得克萨斯’老叶的没有酯酶同工酶条带。

3个睡莲品种不同器官的过氧化物酶同工酶酶带数变化趋势基本相同，表现为展开幼叶叶>未展开幼叶>叶柄>花蕾>老叶>花瓣。但3个品种不同器官的酯酶同工酶酶带数变化趋势与过氧化物酶同工酶酶带数变化趋势不太一致，表现为未展开幼叶>花蕾>叶柄>展开幼叶和花瓣>老叶。总体上，未展开幼叶条带最多，为较适宜的取样部位。

2.3 不同生长阶段未展开幼叶的同工酶分析

由图3~4和表3分析可知，3个睡莲品种的过氧化物酶和酯酶同工酶表现阶段特异性。营养生长阶段的酯酶同工酶比生殖生长阶段酯酶同工酶表达量大，且条带清晰，3个品种的酯酶同工酶总条带数由14条减少至9条，说明生殖生长阶段的酯酶同工酶活性较弱，部分酶带不表达。而营养生长阶段的过氧化物酶同工酶表达量不如生殖生长阶段的表达量大，并且其酶带条带变化不一致。‘彼得’和‘玛珊姑娘’营养生长阶段的过氧化物酶同工酶条带分别由2条和3条增加至生殖生长阶段的5条和4条，‘得克萨斯’营养生长阶段的6条过氧化物酶同工酶条带减少至生殖生长阶段的3条。

3 讨论

本研究对3个睡莲品种6个不同器官的过氧化物酶和酯酶同工酶分析发现，不同器官的酶带数和强弱差异较大，以幼叶的过氧化物酶和酯酶同工酶条带数目最多，条带最清晰，花蕾和叶柄次之，老叶和花瓣最少，这与陆佩洪^[14]对睡莲植物过氧化物酶同工酶谱分析较为一致，表明了睡莲的组织特异性。本研究结

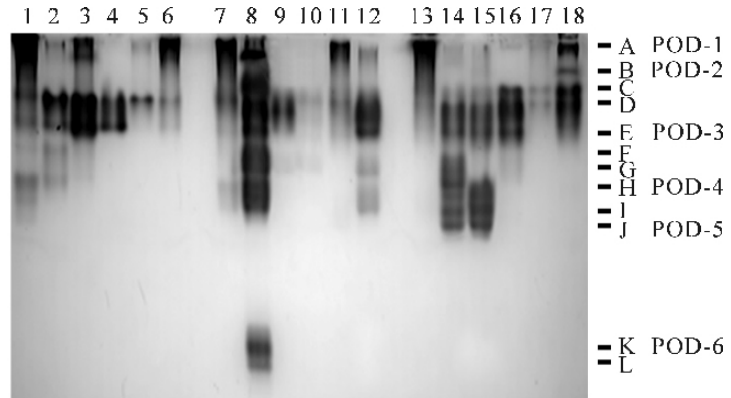


图1 睡莲不同组织器官的过氧化物酶同工酶酶谱

Figure 1 Peroxidase isozyme among the different organs of water lily

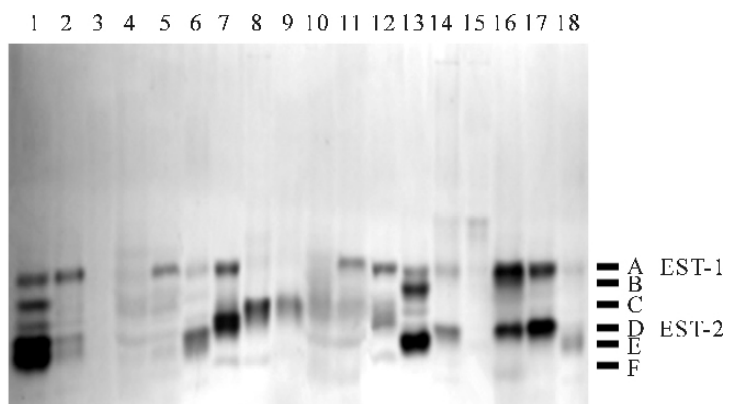


图2 睡莲不同组织器官的酯酶同工酶酶谱

Figure 2 Esterase isozyme among the different organs of water lily

表2 睡莲不同组织器官的同工酶条带数统计

Table 2 Total bands of POD and EST in water lily among different organs

同工酶	器官	品种			总计
		彼得	玛珊姑娘	得克萨斯	
过氧化物酶 (POD)	未展开幼叶	8	7	4	19
	展开幼叶	4	12	7	23
	老叶	3	2	6	11
	花瓣	2	1	3	6
	花蕾	2	3	5	10
	叶柄	2	6	5	13
酯酶 (EST)	未展开幼叶	6	3	4	13
	展开幼叶	3	2	2	7
	老叶	0	1	1	2
	花瓣	5	0	2	7
	花蕾	4	3	3	10
	叶柄	4	3	2	9

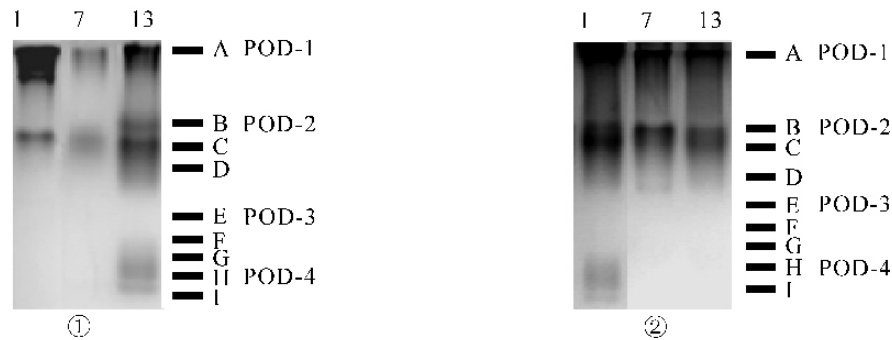


图 3 睡莲营养生长阶段(①)生殖生长阶段(②)未展开幼叶的过氧化物酶同工酶酶谱

Figure 3 Peroxidase isozyme in unexpanded spires of water lily during vegetative (①) and reproductive (②) growth stages

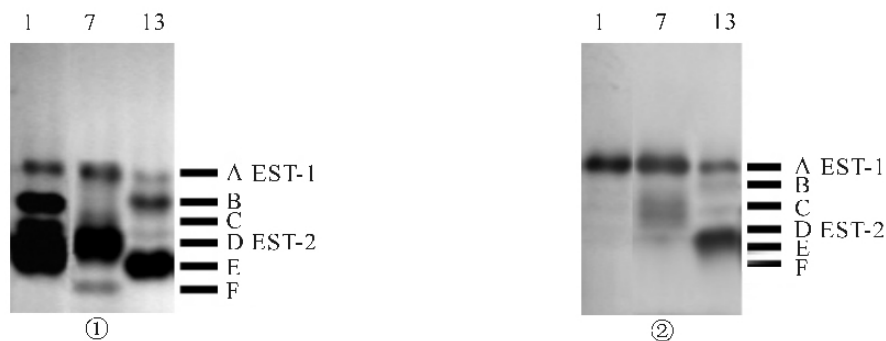


图 4 睡莲营养生长阶段(①)生殖生长阶段(②)未展开幼叶的酯酶同工酶酶谱

Figure 4 Esterase isozyme in unexpanded spires of water lily during vegetative (①) and reproductive (②) growth stages

果与前人对粟 *Setaria italica* var. *germanica* [15], 菊花 *Chrysanthemum × morifolium* [7] 及葡萄 *Vitis vinifera* [2] 的研究结果也基本一致, 即叶片过氧化物酶和酯酶酶带数均比茎多。但在大白菜 *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* [5] 研究中发现, 花蕾酶带数最多, 花茎酶带数最少, 各生长发育阶段叶片的酶谱都很模糊, 且酶带数较少, 说明不同种类植物同工酶器官特异性表现存在差异。

随着植物的生长发育, 器官或组织的生理特性和一系列代谢过程会发生深刻变化, 同工酶的类型也随之变化。关于同工酶阶段特异性的研究迄今已有许多报道, 多数研究认为同工酶的发育阶段特异性是普遍存在的。

本研究通过对 3 个睡莲品种的不同生长阶段过氧化物酶和酯酶同工酶分析发现, 营养生长阶段的酯酶同工酶条带较多, 酶谱清晰, 条带较强, 分离效果好, 而在生殖生长阶段, 条带明显较少, 显色较弱, 酶谱也不够清晰; 而过氧化物酶同工酶的阶段特异性则在不同品种上并不一致, 品种‘彼得’和‘玛珊姑娘’在生殖生长阶段的过氧化物酶同工酶比营养生长阶段条带多, 酶谱更清晰, ‘得克萨斯’则相反。这与前人 [1-7] 在其他作物上的研究不完全相同。由于不同种类植物其植株的具体组成器官不同, 各种器官有其特定的功能, 而根据植物的种类其具体的生长发育阶段划分又有所区别, 这就导致了同工酶在不同植物上的研究结果的不一致。

参考文献:

- [1] BREWHAKER J L, HASEGAWA Y. Polymorphism of the major peroxidases of maize [M]//MARKERT C L. *Isozymes*: 3. New York: Academic Press, 1975: 659 - 673.

表 3 不同生长阶段睡莲的同工酶条带数统计

Table 3 Total bands of POD and EST of water lily during vegetative and reproductive growth stages

品种	营养生长阶段		生殖生长阶段	
	POD/条	EST/条	POD/条	EST/条
彼得	2	5	5	1
玛珊姑娘	3	5	4	4
得克萨斯	6	4	3	4
总计	11	14	12	9

- [2] COLLET S, COLLET M A, MACHADO M. Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae)[J]. *Biochem Syst & Ecol*, 2005, **33**: 691 – 703.
- [3] TAUREILLES C, ROBIN J P, FLANZY C. Grape (*Vitis vinifera* L.) malate dehydrogenase: partial purification and isoelectric heterogeneity [J]. *Sci Aliments*, 1992, **12**: 649 – 663.
- [4] ETTI O R, BAYBIK J, SADKA A, *et al.* Isolation of mitochondrial malate dehydrogenase and phosphoenolpyruvate carboxylase cDNA clones from grape berries and analysis of their expression pattern throughout berry development [J]. *J Plant Physiol*, 2000, **157** (5): 527 – 534.
- [5] 张成合, 刘世雄, 贾力. 大白菜不同生育期和不同部位的过氧化物酶同工酶分析[J]. 中国蔬菜, 1994 (1): 12 – 14.
ZHANG Chenghe, LIU Shixiong, JIA Li. The research on the different organs of Chinese cabbage during the different growth stages by peroxide isozyme [J]. *China Veg*, 1994 (1): 12 – 14.
- [6] 崔西辰, 张清, 邓志瑞. 辣椒不同发育时期的同工酶研究[J]. 上海大学学报: 自然科学版, 2005, **11** (6): 645 – 651.
CUI Xichen, ZHANG Qing, DENG Zhirui. Isoenzymes of capsicums in different development stages [J]. *J Shanghai Univ Nat Sci Ed*, 2005, **11** (6): 645 – 651.
- [7] 丁玲, 陈发棣, 滕年军, 等. 菊花不同生长阶段不同器官 POD 和 EST 同工酶比较[J]. 西北植物学报, 2007, **27** (10): 2029 – 2034.
DING Ling, CHEN Fadi, TENG Nianjun, *et al.* Isozyme analysis of stem and leaf in chrysanthemum during vegetative and reproductive growth stages [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2007, **27** (10): 2029 – 2034.
- [8] 林植芳, 李双顺, 林桂林, 等. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系[J]. 植物学报, 1984, **26** (6): 605 – 615.
LIN Zhifang, LI Shuangshun, LIN Guilin, *et al.* Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in relation to senescence of rice leaves [J]. *Acta Bot Sin*, 1984, **26** (6): 605 – 615.
- [9] 王海廷, 黄永芳, 王清胤. 番茄不同生育期和不同部位过氧化物同工酶分析[J]. 园艺学报, 1981, **8** (4): 29 – 35.
WANG Haiting, HUANG Yongfang, WANG Qingyin. Analysis of peroxidase isozyme in various organs and developmental stages of tomato plant [J]. *Acta Horti Sin*, 1981, **8** (4): 29 – 35.
- [10] 梁艳荣, 胡晓红, 张颖力. 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.
LIANG Yanrong, HU Xiaohong, ZHANG Yingli. Process on physiological function research of plant peroxidase [J]. *J Inner Mongolia Agric Univ Nat Sci Ed*, 2003, **24** (2): 110 – 113.
- [11] 林亨芳, 王金英, 江川. 水稻不同部位酯酶同工酶酶带和酶谱分析[J]. 福建农业大学学报: 自然科学版, 1994, **23** (3): 262 – 265.
LIN Hengfang, WANG Jinying, JIANG Chuan. Analysis on bands and zymograms of esterase isozymes in different organs of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *J Fujian Agric Univ Nat Sci Ed*, 1994, **23** (3): 262 – 265.
- [12] 何忠效, 张树政. 电泳[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 258 – 305.
- [13] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 25 – 180.
- [14] 陆佩洪, 陈维培. 睡莲科植物过氧化物酶同工酶的排序分析[J]. 南京师范大学学报: 自然科学版, 1993, **16** (2): 52 – 56.
LU Peihong, CHEN Weipei. Study on the peroxidase isozymes of Nymphaeaceae with analysis of polar ordination [J]. *J Nanjing Norm Univ Nat Sci Ed*, 1993, **16** (2): 52 – 56.
- [15] 马建萍, 古世禄, 独俊娥, 等. 谷子(粟)生育过程中 POD 同工酶的分析[J]. 作物学报, 2002, **28** (3): 406 – 410.
MA Jianping, GU Shilu, DU Jun'e, *et al.* The behaviour of peroxidase isoenzyme in growing-development process of foxtail millet [J]. *Acta Agron Sin*, 2002, **28** (3): 406 – 410.