

难生根桉树的过氧化物酶活性及其同工酶多型性比较研究

李明¹, 黄卓烈¹, 谭绍满², 林韶湘¹, 莫晓勇³, 林海球³, 龙腾³

(1 华南农业大学生物技术学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学林学院, 广东 广州 510642; 3 国家林业局雷州林业科学研究所, 广东 湛江 524348)

摘要: 尾叶桉 MLA 无性系(简称 MLA)、尾叶桉 U₆ 无性系(简称 U₆)、刚果 12 号桉 W₅ 无性系(简称 W₅)3 个桉树树种中, MLA 是难生根树种, U₆、W₅ 是易生根树种. 难生根树种的各器官过氧化物酶(POD)活性均高于易生根树种, 同一树种不同器官的 POD 活性及其同工酶不同, 不同树种同一器官的 POD 活性及其同工酶也不同. 同一器官的 POD 活性随组织成熟度的增加而升高. 该文讨论了桉树不定根形成与 POD 的关系.

关键词: 桉树; 扦插生根; 过氧化物酶活性; 过氧化物酶同工酶

中图分类号: Q946

文献标识码: A

过氧化物酶(peroxidase, POD)(EC. 1. 11. 1. 7)是普遍存在于植物体内的一类酶, 在植物的生长、发育中起重要的作用. 植物 POD 是一类含铁卟啉辅基的酶^[1]. POD 参与植物体内多种生理生化过程, 在植物体内其同工酶存在发育阶段特异性和组织特异性^[2]. 玉米的叶、茎、鞘、花、种子等 21 个不同组织和器官的 POD 同工酶的酶谱差异很大, 而大多数组织有其特征同工酶带. 甘蔗的同一品种不同器官及不同品种同一器官的过氧化物酶活性均有较大差异^[3]. 有研究结果表明, 植物的不定根的发生和发展与 POD 的作用有密切的关系. Mato 等^[4]发现, 在不定根出现期, 体内的 POD 活性下降.

桉树是我国南方的重要经济树种. 由于桉树是异花传粉植物, 其有性繁殖的后代分化严重, 难以保持原种的优良性状. 因此, 生产上需用无性方法繁殖. 但扦插繁殖时, 插条往往难以生根. 对于桉树的生根机理研究甚少. 有关桉树的扦插生根与体内 POD 的关系少见报导. 本文研究了桉树的难生根树种 POD 活性及其同工酶在不同器官中的分布情况, 探讨 POD 与桉树插条生根的关系, 为进一步研究桉树的生根机理提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 供试材料

本试验的供试桉树树种为尾叶桉(*Eucalyptus urophylla* S. T. Blade) MLA 无性系(以下简称为 MLA), 尾叶桉(*Eucalyptus urophylla* S. T. Blade) U₆ 无性系(以下简称为 U₆), 刚果 12 号桉(*Eucalyptus ABL*,

12) W₅ 无性系(以下简称为 W₅). 均为国家林业局雷州林业科学研究所提供.

1.2 不同桉树的扦插生根难易比较试验

以各种供试树种组培苗的萌芽条嫩梢作插条. 插条长 8~12 cm, 保留 2 对健康叶, 剪取后立即浸入水中保湿, 分别用 $\rho=1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的吲哚丁酸(IBA)溶液浸其基部 2 cm, 浸泡 1 min, 处理好插条直接插于已消毒的育苗基质上, 深度为 2~3 cm. 随采随处理随扦插. 扦插基质是用黄心土和泥炭土混合, 体积比为 2:1, 用 $\rho=1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 KMnO₄ 消毒. 插后 1 周内频繁喷雾, 保持插条叶面常有水珠, 1 周后适当减少喷雾次数, 延长每次喷雾相隔时间. 每隔 10 d 喷 $\rho=1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的百菌清或敌克松杀菌剂 1 次, 以预防病害的发生. 插后 20 d 开始调查, 统计生根数和根长度.

1.3 POD 同工酶分离

POD 同工酶提取液为 Tris-Gly 缓冲液($C=0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8.3), 内含 $\rho=0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的二巯基苏糖醇和 $\rho=200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蔗糖. 取样时分别以插条的根(新根、老根混合)、茎上部(0~3 节)、茎中部(3~6 节)、茎下部(6~10 节)、叶(叶肉组织)作为测定位点. 样品用自来水冲洗后再用蒸馏水冲洗, 用滤纸吸干, 称其质量. 制样: 根 0.5 g 加酶提取液 3 mL; 茎(上段)1 g 加酶提取液 3.5 mL; 茎(中段)1 g 加酶提取液 4 mL; 茎(下段)1 g 加酶提取液 4.5 mL; 叶 1 g 加酶提取液 3 mL; 分别于冰浴上研磨, 匀浆于 4~5 °C 离心 15 min (10 000 r·min⁻¹), 取上清液作为电泳样品液. 采用聚丙烯酰胺不连续凝胶缓冲系统垂直板电泳方法. 分离胶的 $\rho=75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 浓缩胶的 $\rho=30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,

电极缓冲液 $C=0.005\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris—Gly (pH 8.3) 溶液. 每样品孔点样 $50\text{ }\mu\text{L}$, 以 $\rho=0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溴酚蓝为指示剂. 电泳开始 30 min 内, 溴酚蓝前沿在浓缩胶位置时, 用 100 V 电压; 当溴酚蓝前沿进入分离胶时, 改用 150 V 恒压. 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 电泳 5 h. 每个样品重复分析 3 次. 电泳结束取下凝胶板, 放入 POD 显色液中染色, 采用醋酸—联苯胺染色法. 显色后用蒸馏水冲洗, 拍照.

1.4 POD 活性测定

POD 提取液与同工酶提取液相同, 但不含蔗糖. 取 0.5 g 样品, 加适量提取液, 在 $0\sim4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下研制成匀浆, 在 $4\sim5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min. 取上清液定容到 10 mL 作为酶液. 用以测定 POD 活性. POD 活性的测定参考孙文全^[5]的方法作适当修改. 吸取 1 mL 稀释 100 倍的酶液加 2 mL 联苯胺醋酸—醋酸钠缓冲液 (pH 7.1), 在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 3 min, 加入 1 mL $\rho=0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 , 立即摇匀, 快速转入比色皿中, 在 580 nm 波长下测光密度 (D) 变化值. 从加入 H_2O_2 起计时, 每 15 s 读数 1 次. 经测定, 在反应的 60 s 内, 光密度成直线上升, 取第 $15\sim45\text{ s}$ 之间的光密度变化值 (ΔD) 计算酶活性. 酶活性单位用每分钟每毫克蛋白质使 580 nm 的光密度变化值 ($\Delta D_{580}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) 表示, 即每毫克蛋白质每分钟改变 1 个 $D_{580\text{nm}}$ 值单位为 1 个酶活性单位.

1.5 可溶性蛋白质含量的测定

采用 Bradford^[6] 的方法.

2 结果与分析

2.1 3 种桉树扦插生根能力比较

本试验于 1998 年 11 月进行, 试验结果 (表 1) 表

明, MLA 的扦插发根能力最低, 而 U_6 和 W_5 的插条发根能力较高, 分别比 89.33% 和 90.00% , 分别比 MLA 高出 219.0% 和 221.4% . 由此结果表明, MLA 是较难生根的树种, U_6 和 W_5 是较易生根树种. MLA 的根长度分别比 U_6 和 W_5 高 191.6% 和 196.2% , 由此可看出, 难生根的 MLA 的根生长速度较易生根的 U_6 和 W_5 的快.

表 1 3 种桉树扦插生根能力比较¹⁾

Tab. 1 Comparison of rooting capacity of 3 *Eucalyptus* species

树种 species	平均发根率/% mean rooting percentage	平均根长/(cm·株 ⁻¹) mean root length
MLA	28.00b	11.20a
U_6	89.33a	3.84a
W_5	90.00a	3.78b

1) 表中数据为 3 次重复的平均值, 每重复用插条 50 枝. 同列数据的末尾的字母是邓肯氏新复极差检验结果, 具有相同字母表示差异不显著, 具有不同字母表示差异显著 ($P=0.05$).

2.2 3 种桉树不同器官 POD 活性比较

表 2 结果表明, 3 种桉树根、茎、叶各器官的 POD 活性均不同. 说明 POD 活性存在器官的特异性. 从同一树种来看, 茎的上、中、下各段的 POD 活性也各异, 从上至下 POD 活性依次升高, 即随组织的成熟度提高, POD 活性上升. 难生根的 MLA 的各种器官体内的 POD 活性均比易生根的 U_6 和 W_5 高, 其中 MLA 叶的 POD 活性分别比较易生根的 U_6 、 W_5 叶的 POD 活性高出 155.0% 和 140.1% . 表 3 对表 2 的数据进行了方差分析, 结果表明, 同一树种不同器官间 POD 活性差异显著, 不同树种的相同器官间 POD 活性的差异也显著.

表 2 3 种桉树不同器官 POD 活性比较¹⁾

Tab. 2 Comparison of POD activities in different organs of 3 *Eucalyptus* species ($\Delta D_{580}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)

树种 species	根 root	叶 leaf	茎(上) stem(up)	茎(中) stem(middle)	茎(下) stem(down)
MLA	8.692 ± 0.004	9.192 ± 0.001	6.012 ± 0.006	6.745 ± 0.010	7.769 ± 0.010
U_6	6.890 ± 0.002	3.605 ± 0.003	5.018 ± 0.008	5.349 ± 0.020	5.942 ± 0.020
W_5	7.251 ± 0.001	3.829 ± 0.004	4.713 ± 0.005	5.022 ± 0.009	5.420 ± 0.010

1) 取样部位: 茎(上)为 0~3 节段; 茎(中)为 3~6 节段; 茎(下)为 6~10 节段. 测定时间为 5 月, 数字是 3 次重复的平均值.

表 3 桉树不同器官 POD 活性方差分析

Tab. 3 Variance analysis of POD activities in different organs of *Eucalyptus* species

变异来源 source of variance	FD	SS	MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
器官间 organs	4	18.884	4.721	4.85*	3.84	7.01
树种间 species	2	11.452	5.726	5.88*	4.46	8.65
误差 error	8	7.791	0.973			
总变异 total variance	14	38.127				

2.3 3 种桉树插条中 POD 活性比较

插条的酶活性是指插条茎上、中、下各部分混合后测定的结果. 表 4 结果表明, 难生根植物 MLA 插条内的 POD 活性较易生根植物 U₆、W₅ 的高. POD 活性高, 分解 IAA 能力强, 对插条生根不利; 反之, POD 活性低, 分解 IAA 能力弱, 插条内 IAA 浓度可达到诱导根原基形成的要求, 故有利于生根.

表 4 3 种桉树插条的 POD 活性¹⁾

Tab. 4 POD activities in cuttings of 3 *Eucalyptus* species

($\Delta D \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)

树种 species	POD 活性 POD activity
MLA	7.808a
U ₆	5.916b
W ₅	4.819c

1) 表中数据为 3 次重复的平均值, 数据后小写英文字母不同者表示差异显著 ($P=0.05$)

2.4 MLA 不同器官的 POD 同工酶图谱分析

图 1 是 MLA 不同器官的 POD 同工酶谱图. 由图中可见, MLA 不同器官的 POD 同工酶数不同. 在根中 4 条清晰的谱带, 但在叶中只隐约见到 2 条弱带. 而在茎的不同茎段的 POD 谱带数一样, 只是 POD 同工酶强弱不同. 说明 MLA 不同器官的 POD 同工酶存在器官的特异性, 同一器官有其 POD 特征谱带.

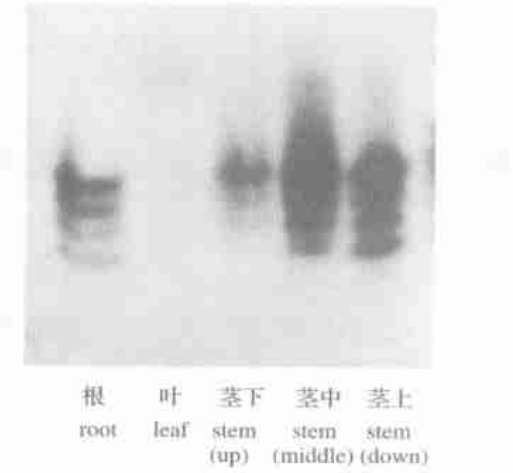


图 1 MLA 各器官 POD 同工酶图谱

Fig. 1 Diagram of POD isoenzymes in different organs of MLA

2.5 U₆ 的不同器官 POD 同工酶图谱分析

由图 2 可看出, U₆ 不同器官 POD 同工酶图谱也同样存在器官的特异性. 各器官也有各自的谱带. 其中根的同工酶带最多, 共有 7 条. 其次是叶, 有 6 条酶带, 而茎内酶带也有 5 条, 但在茎内不同部位酶带强弱

稍有差异, 茎下部的较清晰, 而茎上部的酶带较弱.

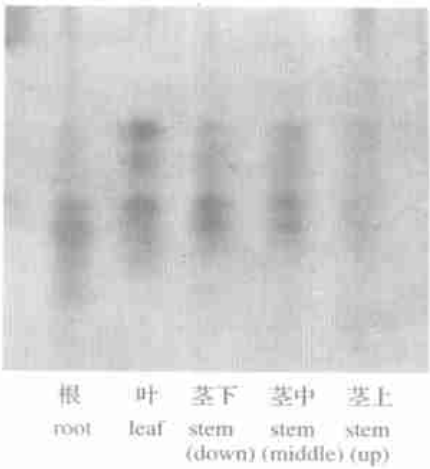


图 2 U₆ 各器官 POD 同工酶图谱

Fig. 2 Diagram of POD isoenzymes in different organs of U₆

2.6 W₅ 的不同器官 POD 同工酶图谱分析

图 3 为 W₅ 各器官 POD 的同工酶谱. 从图中也可看出, POD 同工酶也存在器官的特异性. 其中以根的酶带最多, 共有 6 条. 其次是茎, 有 4 条. 叶的酶带只有 2 条.

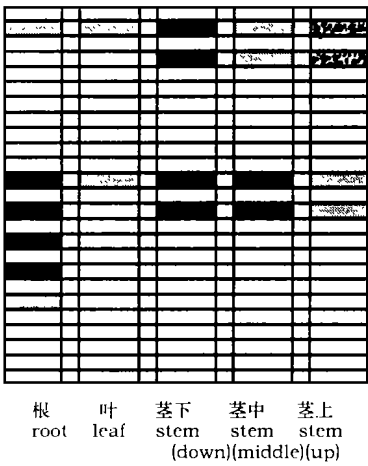


图 3 W₅ 各器官 POD 同工酶图谱

Fig. 3 Diagram of POD isoenzymes in different organs of W₅

以上分析结果表明, MLA、U₆、W₅ 3 种桉树的不同器官 POD 同工酶均存在器官特异性. 证实了前人关于不同器官有各自特征性 POD 同工酶的结论, 表明了 POD 同工酶的多型性.

3 讨论

POD 是普遍存在于植物体内的酶. 在植物体内这些酶的分布和活性高低随器官组织的不同而不同^[3]. 本试验通过测定 MLA、U₆ 和 W₅ 根、茎、叶的

POD 活性, 发现在不同器官内 POD 的活性也不同. 这可能与不同器官的生理功能和代谢方式不同有关. 本试验结果还表明, 在植物茎的不同部位 POD 也呈现不同的活性, 随着茎的成熟度的提高而活性上升. 这可能与 POD 参与木质素的合成有密切关系, POD 可能是参与木质素合成的主导酶. Gonzalez 等^[7]研究表明在榛子子叶的组织培养中, 木质部的形成与 POD 活性增加相联系, 他们认为这种酶被用作木质素合成的标志. 本试验结果从一个侧面支持这个观点.

难生根的 MLA 的各器官的 POD 活性均比易生根的 U₆、W₅ 的 POD 活性高, 而在叶中这种差异表现更为明显. 嫩枝扦插时插条带有叶子, 因为叶是制造营养的器官, 同时又能合成吲哚乙酸 (IAA) 等激素. 已知 IAA 的一个非常重要的生理功能就是促进不定根的形成. 而 POD 能氧化 IAA^[8~12]. 难生根植物叶的 POD 活性高, 降解 IAA 的作用强, 叶中 IAA 被破坏较多, 向下输送的 IAA 含量就会很少, 这对诱导生根不利. 反之, 易生根植物叶 U₆ 和 W₅ 中 POD 活性低, 其降解 IAA 能力较低, 而输送到茎基部的 IAA 就应该较多, 对诱导根原基的形成有利. 这或许是 POD 活性高低与生根难易的本质联系. 从这点来说, 根据植物叶的 POD 活性高低也许可作为判定植物生根难易的指标之一. 当然, 不能简单地根据植物叶的 POD 活性高低判定植物生根的难易, 因为生根还受植物体内激素之间的相对比例^[13]、生长抑制剂的存在与否^[14]等因素的综合影响. IAA 的存在对不定根的起源和生长的作用是无可否定的. 因此, 任何影响 IAA 含量变化的因素存在势必影响不定根的发生与发展. POD 的活性高低能影响 IAA 的含量水平, 因而 POD 活性高低直接影响不定根的形成是可以理解的.

本试验结果表明, 难生根的植物其插条内的 POD 活性比易生根植物的高, 同一植物不同器官的 POD 同工酶谱不同, 同一器官不同树种的 POD 同工酶的不同. 说明 POD 同工酶存在器官和植物种类的特异性. 这与不同器官、不同植物的生理功能差异有关. 同工酶是在更精细的程度上调节代谢, 由此控制分化与形态建成. 容易生根的 U₆ 和 W₅ 根的 POD 同工酶数比难生根的 MLA 多, 也许是 U₆ 和 W₅ 的根形

态建成比 MLA 更容易的原因.

参考文献:

- [1] 彭永康, 崔世民. 植物过氧化物酶的结构、催化反应及生理功能[J]. 天津师大学报(自然科学版), 1993, 22(2): 65—72.
- [2] 胡能书, 石贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985, 18—76.
- [3] 黄卓烈, 潘 涛. 几个甘蔗品种的过氧化物酶活性及其同工酶多样性的比较研究[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(4): 72—76.
- [4] Mato M C; Rua M L; Ferro E. Changes in levels of peroxidase and phenolics during root formation in vitic cultured *in vitro*[J]. Physiol Plant. 1998, 72: 84—88.
- [5] 孙文全. 联苯胺比色法测定果树过氧化物酶活性的研究[J]. 果树科学, 1988, 5(3): 106—107.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem. 1977, 72(2): 248—254.
- [7] Gonzalez A; Tames S R; Rodriguez R. Ethylene in relation to protein, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rooting in hazelnut cotyledons[J]. Physiol Plant. 1991, 83: 611—620.
- [8] Barman T E. Enzyme Handbook[M]. V. 1. Berlin: Springer-Verlag. 1969. 139—247.
- [9] Gaspar T. Rooting and flowering, two antagonistic phenomena from a normal point of view[A]. Jeffcoat B Aspects and Prospects of Plant Growth Regulators[C]. Britain. 1980, 34—49.
- [10] Gaspar T, Penel C, Thorpe J, et al. Peroxidase[M]. Geneve: Universite' de Geneve'. 1982, 89—103.
- [11] Gebhardt K. Activation of indole-3-acetic acid oxidase from horseradish and prunus by phenols and hydrogen peroxide[J]. Plant Growth Regul. 1982, 1(2): 73—84.
- [12] Haissig B E. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings[A]. Jackson M B. New Root Formation in Plant and Cuttings[C]. Lancaster: Martinus Nijhoff. 1986, 141—189.
- [13] 郑均宝, 刘玉军, 裴保华, 等. 几种木本植物插穗生根与内源 IAA、ABA 的关系[J]. 植物生理学报, 1991, 17(3): 313—316.
- [14] 黄卓烈, 林韶湘, 谭绍满, 等. 桉树体内的生根抑制物质研究综述[J]. 林业科学研究, 1994, 7(3): 319—323.

(下转第 93 页)

3 结论

本文基于精密冲裁工艺的过程, 对平面六连杆冲压机构进行了优化设计, 可较好地实现冲裁工艺要求, 降低了生产成本. 本方法简化了设计中的大量计算工作, 也为其他机构再现函数设计提供了可

行的方法.

参考文献:

[1] 华大年, 华志洪, 吕静萍. 连杆机构设计[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995. 70—75, 399—440.
[2] 韩 峰, 孙 进. 一种新的精冲工艺——工件压紧冲裁法[J]. 锻压机械, 1992 (2): 37—59.

Design of Plane Six-Bar Optimal Punchs Mechanism for Fine-Blanking Technology

XU Feng-ying, LI De-wei, CHEN Zhen
(College of Polytechnic, South China Agric. Univ ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this paper, to meet the need of precise fine-blanking technology, the movement pattern of the plane six-bar puncher was analyzed. The restriction equations were inferred also. By using restriction punish function, the trail optimal mode of the puncher was built and the optimal structural dimension design was determined.

Key words: fine-blanking technology; six-bar mechanism ; optimal design

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 59 页)

Comparative Study on the Activity and Isoenzymes of Peroxidase
in Difficult-and Easy-to-Root *Eucalyptus* Species

LI Ming¹, HUANG Zhuo-lie¹, TAN Shao-man², LIN Shao-xiang¹,
MO Xiao-yong³, LIN Hao-qiu³, LONG Teng³

(1 College of Biotechnology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
3 Leizhou Forestry Institute of National Forestry Bureau, Zhanjiang, Guangdong 524348, China)

Abstract: *Eucalyptus urophylla* S.T. Blade MLA clone (MLA) was difficult-to-root species. *E. urophylla* S.T. Blade U₆ clone (U₆) and *E. ABL* 12 W₅ clone (W₅) were relatively easy-to-root species. The activity of peroxidase in every organ of MLA was higher than that in U₆ and W₅. The activity and isoenzymes of peroxidase were quite different both in different organs of the same species and in the same organs of different species. The peroxidase activity turned higher with the increasing maturity of the organs. The relationship between the peroxidase and rooting of *Eucalyptus* cuttings was discussed.

Key words: *Eucalyptus*; rooting of cutting; peroxidase; isoperoxidase

【责任编辑 李 玲】