

文章编号: 1001-411X(2002)01-0045-04

萘乙酸处理桉树插条后多酚氧化酶活性及同工酶变化与插条生根的关系

李 明¹, 黄卓烈¹, 谭绍满², 林绍湘¹, 龙 腾³, 杨国清³

(1 华南农业大学生命科学学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学林学院, 广东 广州 510642;

3 国家林业局雷州林科所, 广东 湛江 524348)

摘要: 尾叶桉 MLA 无性系(简称 MLA)为难生根植物, 尾叶桉 U₆ 无性系(简称 U₆)和刚果 12 号桉 W₅ 无性系(简称 W₅)为相对易生根植物. MLA 插条内的 PPO 活性比 U₆、W₅ 的低. 用萘乙酸(NAA)处理桉树的插条后, 在扦插生根的不同阶段, 插条内的 PPO 活性呈现规律性的变化. 蛋白质含量呈上升趋势. 文章讨论了多酚氧化酶与桉树插条生根的关系.

关键词: 多酚氧化酶; 桉树; 扦插生根

中图分类号: Q946

文献标识码: A

多酚氧化酶(PPO)是广泛分布在植物体内的重要酶类, 在植物体的代谢中起着非常重要的作用. 关于 PPO 与植物生根关系的研究有一些报道, 但说法各异. 杜鹃(*Rhododendron ponticum*)的发根与其体内的 PPO 活性有非常密切的关系^[1]. Al Barazi 等^[2]研究发现, PPO 主要分布在不定根起源部位的附近. 在绿豆(*Phaseolus mungo*)的插条发根时, 其体内的 PPO 活性发生了相应的变化^[3]. 凤仙花(*Impatiens balsamina*)的插条发根时, 随着根原基的形成, PPO 活性大大升高^[4]. 由此认为植物不定根的形成与 PPO 有关.

桉树是我国重要的造林树种. 对于桉树扦插生根的生理学和生物化学的研究, 国内外的研究并不多. 针对这种情况, 本试验研究不同桉树在用萘乙酸(NAA)处理后扦插生根过程中, 插条体内 PPO 的活性及同工酶的变化, 以揭示 PPO 与桉树扦插生根的关系, 为桉树生产和更深一步研究桉树的扦插生根机理提供一定的理论依据.

1 材料与方法

1.1 供试材料和处理方法

供试树种为尾叶桉(*Eucalyptus urophylla*)MLA 无性系(简称为 MLA)和 U₆ 无性系(简称为 U₆)、刚果 12 号桉(*Eucalyptus* ABL. 12)W₅ 无性系(简称为 W₅). 其中, MLA 是难生根无性系, 而 U₆ 和 W₅ 是相对容易生根无性系^[5]. 扦插基质和插条的采集按李明等^[3]的

方法. 经消毒的插条基部浸入 0.1 g·L⁻¹ 的 α -萘乙酸(NAA)溶液(该浓度是经系列浓度试验后确定的)中 3 min 后取出扦插. 扦插和管理按李明等^[5]的方法. 定期取基部 3 cm 茎样进行酶活性和同工酶分析. 试验均重复 3 次. 由于桉树是难生根植物, 不用激素处理的插条在扦插后 5 d 就死亡, 因此本试验无法具有完整的空白对照.

1.2 生化测定方法

PPO 活性测定用李明等^[3]的方法. 以每毫克蛋白质每分钟使在 525 nm 波长处的光密度改变 0.1 为一个酶活力单位(U). 可溶性蛋白质含量采用 Bradford^[6]的方法测定. 同工酶的提取和聚丙烯酰胺凝胶电泳采用李明等^[5]所述的方法.

2 结果与分析

2.1 NAA 处理 MLA 插条在生根期间 PPO 活性变化

用 NAA 处理 MLA 的插条后, 体内的 PPO 活性变化见表 1. 在不同时期中, PPO 活性呈现有规律的变化. 在愈伤组织诱导期(0~20 d), 酶的活性上升. 在不定根形成期(20~25 d), PPO 活性继续保持上升趋势. 在进入根伸长期(25~35 d), PPO 活性则趋于下降. 相关性分析结果(表 2)表明, 在生根期间, PPO 活性的上升与处理的时间呈正相关. 显著性测定结果, 相关极显著. 此外, 由于活性变化的决定系数是

收稿日期: 2001-10-12

作者简介: 李明(1964-), 女, 副教授, 博士, 现在甘肃中医学院工作.

基金项目: 广东省重点攻关项目(99M04201G); 雷州林业局资助项目的部分内容

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

0.698 4,说明在本试验中,PPO 活性变化有 69.84%的可能性是由 NAA 处理不同时间决定的,其他因素影响酶活性的可能性只有 30.16%.这证明在 MLA 中,不定根的发生和发展与 PPO 活性的变化有密切的联系.

2.2 NAA 处理 U₆ 的 PPO 活性变化

NAA 处理 U₆ 插条后,在整个生根期间 PPO 活性连续上升(表 1).相关性分析结果(表 2)表明,在 U₆

中,酶活性变化与处理时间呈正相关.显著性测定结果表明,相关性极显著.此外,由于 PPO 的决定系数是 0.986 1,表明在本试验中 PPO 活性的变化有 98.61%的可能性是由 NAA 处理决定的.其他原因造成酶活性升高的可能性只有 1.39%.这说明在 U₆ 中,不定根的发生和发展与 PPO 的活性变化有密切的关系.

表 1 用 NAA 处理桉树插条在生根期间的 PPO 活性(U)¹⁾

树种 species	t(扦插后 after cuttage)/d							
	0	5	10	15	20	25	30	35
MLA	2.20	2.37	3.17	4.01	6.02	7.06	6.29	5.06
U ₆	3.93	4.27	4.77	5.99	6.63	7.30	7.77	8.45
W ₅	4.30	4.66	5.37	7.02	6.79	6.88	7.32	8.37

1) 表中数据为 3 次重复的平均值

表 2 NAA 处理各树种 PPO 活性变化的相关性分析

Tab. 2 Correlation analysis of the changes of PPO in species after treatment with NAA						
树种 species	相关系数 correlation coefficient	决定系数 determination coefficient	S	t	t _{0.05}	t _{0.01}
MLA	0.835 7	0.698 4	0.224 2	3.727 **	2.365	3.499
U ₆	0.993 0	0.986 1	0.048 0	20.688 **	2.365	3.499
W ₅	0.951 6	0.905 6	0.125 4	7.589 **	2.365	3.499

2.3 NAA 处理 W₅ 生根期间的 PPO 活性变化

用 NAA 处理 W₅ 后,PPO 活性的变化见表 1.在愈伤组织诱导期,PPO 活性相继上升,在不定根形成期,活性稍有下降,进入新根伸长期,活性又回升.相关性分析结果(表 2)表明,PPO 活性变化与 NAA 处理时间呈正相关.显著性测验结果,正相关极显著.由于 PPO 的决定系数为 0.905 6,说明在本试验中,酶活性变化有 90.56%的可能性是由 NAA 处理决定的,其他因素造成 PPO 活性变化的可能性只有

9.44%.这又充分说明在 W₅ 中,不定根的发生和发展与 PPO 活性有非常密切的联系.

2.4 3 种桉树扦插生根期间 PPO 活性变化比较

为了便于比较不同桉树插条在扦插生根期间的 PPO 活性变化,将表 1 所列的数据进行方差分析.分析结果见表 3.结果显示,在供试的 3 个树种之间的 PPO 活性差异极显著,说明易生根树种 U₆ 和 W₅ 的 PPO 活性非常显著地高于难生根的 MLA.这从一个侧面揭示了难生根树种和易生根树种的重要区别.

表 3 NAA 处理各树种后 PPO 活性变化的方差分析

Table 3 Variance analysis of PPO activity in Eucalyptus species treated with NAA						
变异来源 variant source	FD	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
天数间 among days	7	52.067	7.438	17.46 **	2.77	4.28
树种间 among species	2	15.869	7.935	18.63 **	3.74	6.51
误差 error	14	5.968	0.426			
总变异 total variant	23	73.905				

2.5 NAA 处理 3 种桉树插条生根期间的 PPO 同工酶的变化

(1) NAA 处理 MLA 插条后 PPO 同工酶的变化:
NAA 处理 MLA 插条后,PPO 的酶峰数有变化(图 1).扦插当天的酶峰数为 7,以后有上升趋势.到第 30 d

时,同工酶数又降到 7,但其酶谱与扦插当天不同.
(2) NAA 处理 U₆ 插条后 PPO 同工酶的变化:从图 2 中可看出,NAA 处理后 U₆ 的 PPO 同工酶峰数有变化.处理当天的酶峰数为 6,第 30 d 时,酶峰数增至 8.说明 NAA 对 U₆ 的 PPO 同工酶有显著影响.

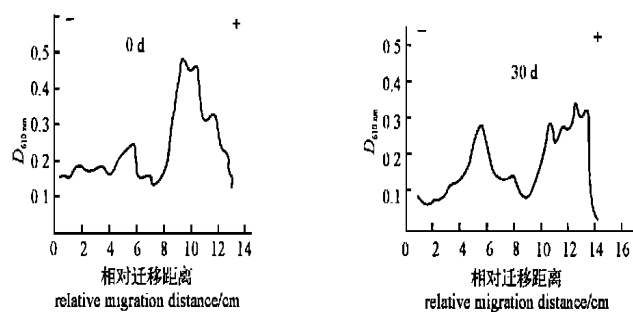


图 1 NAA 处理 MLA 插条后生根期间 PPO 同工酶变化扫描图

Fig. 1 Scan diagram of PPO isoenzymes during rooting stages in MLA treated with NAA

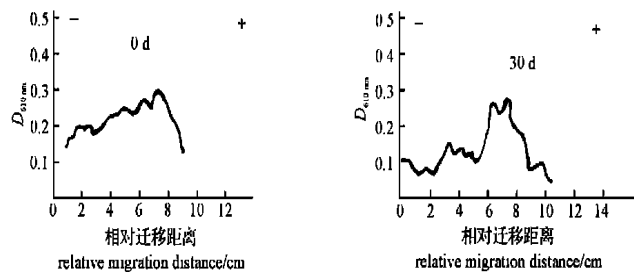


图 2 NAA 处理 U₆ 插条后生根期间 PPO 同工酶变化扫描图

Fig. 2 Scan diagram of PPO isoenzymes during rooting stages in U₆ cuttings treated with NAA

(3) NAA 处理 W₅ 插条后 PPO 同工酶的变化: 从图 3 可见, NAA 处理 W₅ 后, PPO 同工酶峰有变

化. 处理当天的酶峰数是 6, 到第 30 d 的酶峰数为 9, 随着生根天数的增加酶峰数增加.

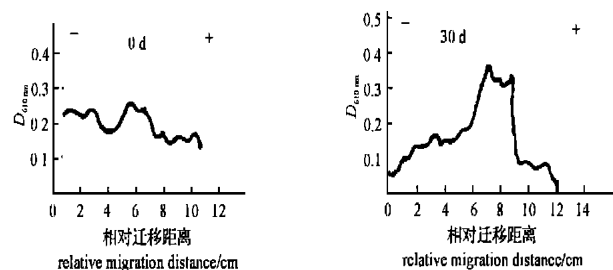


图 3 NAA 处理 W₅ 插条后生根期间 PPO 同工酶变化扫描图

Fig 3 Scan diagram of PPO isoenzymes during rooting stages in W₅ treated with NAA

3 讨论与结论

据报道, PPO 对不定根的形成有重要作用. 在体内, 酚类物质对不定根的起源和发育有促进. 用酚类化合物处理菜豆的插条可大幅度提高发根量^[7]. 有证据表明, 高浓度的酚类物质在枝条内积累可以大大地促进愈伤组织的分化. 这是因为 PPO 催化酚类物质与吲哚乙酸 (IAA) 缩合成 “IAA—酚酸复合物”^[8], 此复合物是一种生根辅助因子, 具有促进不定根形成的活性. 有人发现, 难生根的枝条含有较少的酚类物质, 而容易生根的枝条含有较多的酚类物质^[1]. 在易生根的杜鹃 (*Rhododendron ponticum*) 体内的 PPO 活性就较高, 而在难生根的赤杜鹃 (*R. Jan*

cv. dkens) 中 PPO 活性就要低得多^[1]. 用胡萝卜的愈伤组织进行培养时, 伴随着根点的出现, PPO 活性也急剧上升. 用多效唑处理菜豆的插条时, 发现在其生根量大大升高的同时, 体内的 PPO 活性也大幅度上升. 本实验的结果表明, 难生根植物 MLA 插条内 PPO 活性较低, 因而可能催化形成的 IAA—酚类复合物较少, 导致对生根不利. 而 U₆ 和 W₅ 体内的 PPO 活性较高, 可以推测其合成的这种复合物较多, 因而就较大幅度地提高扦插生根率.

NAA 是一种生长素. 外源 NAA 进入体内后迅速转变为 IAA. NAA 和 IAA 都能促进基因的表达, 促进 DNA 和 RNA 的合成, 进而促进蛋白质的合成. 本试验用生长素处理后, 在酶活性提高的同时, 体内的蛋

白质含量也明显上升,而且 PPO 同工酶数也增加.说明这些生长素确实促进了基因表达. Bhattacharya^[9] 就曾经证明 PPO 催化生长素代谢,促进不定根的起源与发育.在 *Hydrangen macrophylla* 的茎组织产生不定根时,体内的 PPO 活性剧烈地上升.因此,用 NAA 处理桉树插条后,首先促进基因表达,合成新的 PPO,提高 PPO 活性;然后 PPO 催化生长素和酚类物质形成 IAA—酚类复合物,进而促进不定根的形成.这可能就是 NAA 促进桉树不定根形成的机理,但还需深入研究.

参考文献:

[1] FOONG T W, BARNES M F. The levels of reserve metabolites and oxidative enzymes in the cuttings of easy-to-root and difficult-to-root rhododendrons [J] . Biochem Physiol Pflanzen, 1981, 176: 206—216.

[2] ALBARAZI Z, SCHWABE W W. The possible involvement of polyphenol oxidase and the auxin-oxidase system in root formation and development in cuttings of *Pistacia vera* [J] . J Hort Sci, 1984, 59(3): 453—456.

[3] BHATTACHARYA S, NANDA K K. Promotive effect of purine and pyrimidine bases and their role in the mediation of auxin ac-

tion through the regulation of oxidases and phosphatases in rooting cuttings of *Phaseolus mungo* [J] . J Exp Biol, 1979 17(1): 40—45.

[4] DHAWAN R S, NANDA K K. Stimulation of root formation on *Impatiens balsamina* L. cuttings by coumarin and the associated biochemical changes [J] . Biol Plant, 1982, 24(3): 177—182.

[5] 李 明, 黄卓烈, 谭绍满, 等. 难易生根桉树多酚氧化酶、吲哚乙酸氧化酶活性及其同工酶的比较研究[J] . 林业科学研究, 2000, 13(5): 493—500.

[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] POAPST P A, DURKEE A B. Root differentiating properties of some simple aromatic substances of the apple and pear fruit [J] . J Hort Sci, 1967, 42: 429—438.

[8] HAISSIG B E. Influence of auxins and synergists on adventitious root primordium in initiation and development [J] . New Zealand J For Sci, 1974, 4: 311—323.

[9] BHATTACHARYA N C. Enzyme activities during adventitious rooting [A] . DAVIS T D, HAISSIG B E, SANKHLA N. Adventitious root formation on cutting [C] . Dioscorides, Portland, 1989. 88—101.

Relationship Between the Changes of Activities and Isoenzymes of Polyphenol Oxidase and the Rooting of *Eucalyptus* Cuttings After Treatment with Naphthylacetic Acid

LI Ming¹, HUANG Zhuo-lie¹, TAN Shao-man², LIN Shao-xiang¹, LONG Teng³, YANG Guo-qing³
(1 College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;
2 College of Forestry, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;
3 Leizhou Forestry Institute of National Forestry Bureau, Zhanjiang 524348, China)

Abstract: *Eucalyptus urophylla* Blade MLA clone (MLA) was a difficult-to-root species. *E. urophylla* Blade U₆ clone (U₆) and *E. ABL 12 W5* clone (W₅) were relatively easy-to-root species. The activity of polyphenol oxidase (PPO) in MLA was lower than that in U₆ and W₅. After the cuttings of *Eucalyptus* were treated with naphthylacetic acid (NAA), the activities of PPO increased regularly in different stages of rooting. The relationship between the oxidase and rooting of *Eucalyptus* cuttings was discussed.

Key words: polyphenol oxidase; *Eucalyptus*; rooting of cuttings

【责任编辑 柴 焰】