

白花泡桐根分化过程中过氧化物酶、 IAA氧化酶和过氧化氢酶的变化

Activities of Peroxidase IAA-oxidase and Catalase in the Development of Adventitious Root of *Paulownia fouteunei* (Seem.) Hemsl

韦素玲
Wei Suling

(广西师范大学生物系 桂林市育才路 3号 541004)
(Dept. of Biology, Guangxi Normal University, 3 Yucailu, Guilin, Guangxi, 541004)

摘要 为了解过氧化物酶、IAA氧化酶和过氧化氢酶在植物不定根分化、发育过程中的作用,在实验室内分析测定白花泡桐 [*Paulownia fouteunei* (Seem.) Hemsl] 不定根分化过程中过氧化物酶、IAA氧化酶和过氧化氢酶活性的变化。结果表明:过氧化物酶在根分化 0 d~ 2 d 的活性下降 37.6%, 随后逐步上升; IAA氧化酶活性在 0 d~ 2 d 内迅速下降了 52.6%, 随后逐步上升; 过氧化氢酶的活性在根分化过程中逐步上升, 0 d~ 4 d 酶活性从 5.1 上升到 10.5, 从第 4 天开始活性增加减慢。

关键词 白花泡桐 根分化 过氧化物酶 IAA氧化酶 过氧化氢酶

中图分类号 Q 945

Abstract The activity of peroxidase IAA oxidase and catalase of *Paulownia fouteunei* (Seem.) Hemsl were analyzed in the development of adventitious root of *Paulownia fouteunei* (Seem.) Hemsl. In zero day to 2 days of adventitious root development, peroxidase activity decreased by 37.6% and then increased steadily; IAA-oxidase activity decreased by 52.6%, and then increased progressively. Whereas catalase activity increased from 5.1% to 10.5% from zero day to four days of adventitious root development, and increased slowly in activity after four days.

Key words *Paulownia fouteunei* (Seem.) Hemsl, root development, peroxidase, IAA oxidase, catalase

根作为植物的重要器官,对其分化、发育的研究近年来受到越来越多的重视^[1~9]。植物不定根发生虽受多种内外因素影响,但内源和外源激素可能在根原基形成中起关键作用^[10~12],特别是与内源 IAA 的含量及变化关系密切^[13,14]。而内源 IAA 含量的变化又受过氧化物酶、IAA 氧化酶等的调节^[15]。为了解上述 3 种酶在植物不定根分化、发育过程中的作用,我们根据白花泡桐 [*Paulownia fouteunei* (Seem.) Hemsl] 在植物组织培养过程中,不定根分化同步性好,均一性较强的特性,选择白花泡桐作材料,测定 3 种酶在其不定根发生过程中的变化,探讨 3 种酶与材料内源 IAA 含量变化、不定根形态发生之间的关系。

1 材料与方方法

1.1 材料

白花泡桐种子。

1.2 方法

1.2.1 材料的培养

白花泡桐的果实,用 70% 乙醇擦洗表面,然后放入 0.1% HgCl₂ 中消毒 10 min, 无菌水冲洗 4 次。然后在无菌操作工作台上切开果实,将种子接到 MS 培养基中培养, 10 d 左右种子开始萌发。当苗高达 4 cm ~ 5 cm 时,把它们切成 1 cm 左右的茎段,每段带一个节,接入 MS+BA 2 mg/L 的分化培养基中培养, 7 d 左右腋芽开始萌发。当腋芽长至 2 cm ~ 3 cm 时,又按上述方法进行切割培养,得到大量材料。将芽切下转入 1/2MS+IBA 1.5 mg/L 的根分化培养基中。2 d ~ 3 d 时可见不定根产生。分别取 0 d、2 d、4 d、6 d 的培养材料,用于酶的活性测定。

1.2.2 过氧化物酶活性测定

酶活性的测定参考文献 [16, 17] 的方法,略加修改。取植物材料 1 g, 20 mmol/L K₂HPO₄ 5 ml 于研钵中研磨成匀浆, 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 于 4℃ 保存。残渣再用 5 ml K₂HPO₄ 溶液提取 1 次, 合

并 2 次上清液。于 4℃ 下保存。

取比色杯两支,一支中加入 3 ml 0.3% 愈创木酚 (0.02 mol/L, pH 值 5.6 磷酸缓冲液配置),加酶粗提液 200 μl 和 0.6% H₂O₂ 300 μl, 摇匀, 立即记时, 用 1 cm 比色皿, 于 723 型分光光度计测量吸光度, 用秒表记录时间, 每 1 min 读数 1 次, 读数于波长 470 nm 下进行。以每分钟光度变化值表示酶活性大小。对照用缓冲液代替 H₂O₂

1.2.3 过氧化氢酶活性测定

取过氧化氢磷酸缓冲液于 100 ml 碘量瓶中, 置于 25℃ 水浴中保温, 然后加入 1 ml 提取液, 准确保温 3 min 后, 立即加入 2 ml 1 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 再加入 0.5 ml 10% KI 和 1 滴钼酸铵。放置 3 min 后, 用 0.01 mol/L Na₂SO₃ 滴定, 快到终点, 溶液呈浅黄色时, 加 2~3 滴淀粉指示剂, 继续滴定到蓝色消失为止, 记录消耗的 Na₂SO₃ 毫升数 (B)。按公式 $Uc = (B - A) \times F \times N \times 1000 / 2 \times 3$ 计算酶活性。

在上述条件下, 每分钟催化分解 1 μg 分子 H₂O₂ 的酶量规定为 1 个酶活力单位。式中的 Uc 为活力单位数, F 为酶液稀释倍数, N 为 Na₂SO₃ 的当量浓度, 3 是反应时间。

1.2.4 IAA 氧化酶活性测定

参照 Tang 等^[18] 和 Lee^[19] 的方法, 略作修改。分别称取根诱导 0 d、2 d、4 d、6 d 材料 1 g, 研磨成匀浆, 加 10 ml 磷酸缓冲液稀释, 4 000 r/min 离心 20 min, 所得上清液即为粗酶液。取 2 ml 上清液, 加 4 ml 丙酮。沉淀过夜, 15 000 r/min 离心 15 min 后, 再加 3 ml 试剂 1 (198 μg MnCl₂, 163 μg 二氯酚, 200 μg IAA, 用磷酸缓冲液配制), 25℃ 黑暗下保温 1.5 h, 取 2 ml 保温液加到试剂 2 (0.135 g FeCl₃ 溶于 50 ml 35% 的 HClO₄ 中), 再于 25℃ 黑暗条件下放置 40 min, 530 nm 比色。对照除酶液用磷酸缓冲液代替外, 其余成分与之相同。

根据读数从标准曲线上查出相应 IAA 残留量 (或用直线方程计算反应液中 IAA 残留量)。用开始时加入的吲哚乙酸量减去酶作用后残留的 IAA 量, 即得被酶分解破坏的吲哚乙酸量, 以每毫升酶液 1 h 内分解破坏吲哚乙酸量 (μg) 表示酶活性大小。

2 结果

2.1 过氧化物酶活性的变化

过氧化物酶在不定根分化过程中的活性如图 1 所示。从图中可以看出其活性在 0 d~2 d 内下降了 37.6%, 随后迅速上升。当第 6 天不定根出现时, 其活性超过 0 d 材料的 38.3% 活性。

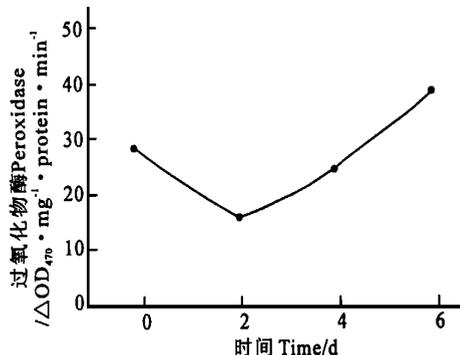


图 1 不定根分化过程中过氧化物酶活性变化

Fig. 1 Activity of peroxidase in the development of adventitious root

2.2 过氧化氢酶活性的变化

过氧化氢酶的活性在不定根发生过程中呈现出逐步上升 (图 2)。0 d~4 d 酶活性从 5.1 上升到 10.5, 增加了 1 倍多。但从第 4 天开始活性增加减慢。

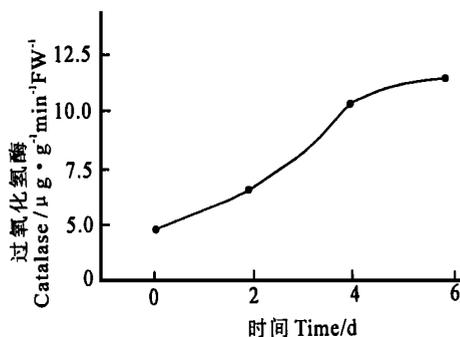


图 2 不定根分化过程中过氧化氢酶活性变化

Fig. 2 Activity of catalase in the development of adventitious root

2.3 IAA 氧化酶活性的变化

在不定根分化 0 d~2 d 内, IAA 氧化酶活性迅速下降了 52.6%, 随后逐步上升, 但其活性在第 6 天仍未达到原水平, 仅为原酶活性的 73.1% (图 3)。

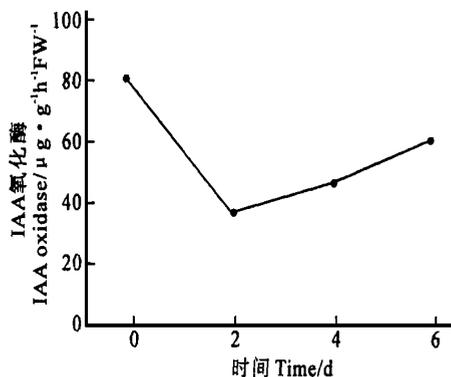


图 3 不定根分化过程中 IAA 氧化酶活性变化

Fig. 3 Activity of IAA oxidase the development of in adventitious root

3 讨论

过氧化物酶具有广泛利用各种酚类及吲哚类化

合物作为氢供体的能力,在呼吸链电子传递的多条途径中,过氧化物酶系统有重要作用,并在植物分化生长中起重要作用^[20]。梅慧生等人^[21]发现在芥菜子叶,下胚轴切段和离体根的愈伤组织在发育中的形态变化都与过氧化物酶的变化有关,并认为它可作为细胞分化的指标。且发现过氧化物酶谱的先于形态分化,由此,可以进一步理解过氧化物酶的变化在组织细胞分化中作用。王水平等人^[22]在研究棉纤维细胞与 IAA 氧化酶和过氧化物酶的关系时指出:过氧化物酶活性在早期略高,10 d~20 d 期间相对较低,20 d 后快速上升。同样,我们在分析白花泡桐不定根分化中发现,过氧化氢酶在根分化的初期(0 d~2 d)活性稍有下降,随着根原基的形成和发育,其活性迅速增长。表明过氧化物酶与不定根的分化和发育有关。

IAA 氧化酶与植物体内 IAA 的含量有密切关系,而影响组织器官的分化。秦新民等^[13]在研究白花泡桐不定根分化与内源激素变化的关系中发现,内源 IAA 含量在 0 d~2 d 内增加 3 倍,随后逐步下降,并与根原基的发生与生长一致。我们对白花泡桐不定根分化过程中 IAA 氧化酶活性变化的测定结果表明,在不定根诱导的 2 d 内 IAA 氧化酶活性迅速下降,随后逐步上升,与内源 IAA 含量的变化是一致的。由于 IAA 氧化酶活性在根原基诱导初期明显下降,造成材料内源 IAA 含量增加,为根原基的形成提供了必要条件。这也证明了 IAA 氧化酶对不定根的分化有重要的调节作用。

过氧化氢酶的功能是能分解在脂肪酸被氧化分解后产生的 H_2O_2 ,消除 H_2O_2 对植物分化,生长的影响,从而有利于植物组织器官的分化和发育。在白花泡桐的不定根分化过程中过氧化氢酶活性表现为一种上升趋势,这与其生理状态是相适应的。

以上结果表明了过氧化物酶 IAA 氧化酶和过氧化氢酶在白花泡桐不定根发生中有着重要的作用,它们通过对内源 IAA 和有关物质的代谢而影响不定根的发生和生长。

参考文献

- 1 Marler T E, Discekici H M. Root development of Red Lady papaya plants growth on a hillside. *Plant Soil*, 1997, 195: 37~42.
- 2 Verdagner D, Molinas M. Development and ultrastructure of the endodermis in the primary root of Cork oak (*Quercus suber*). *Can J Bot*, 1997, 75: 769~780.
- 3 Pressman E, Bar-Tal A, Shaked R et al. The development of tomato root system in relation to the carbohydrate status of the whole plant. *Ann Bot*, 1997, 80: 533~538.
- 4 Reed D C, Holbrook S J, Solomon E et al. Studies on germination and root development in the surfgrass *Phyl-*

- 5 Drexhage M, Chanviere M, Colin F. Development of structural roots architecture and allometry of *Quercus petraea*. *Can J For Res*, 1999, 29: 600~608.
- 6 Ballester A, San-Jose M C, Vidal N et al. Anatomical and biochemical events during in vitro rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. *Ann Bot*, 1999, 83: 619~629.
- 7 Mollier A, Pellenin S J. Maize root system and development as influenced by phosphorus deficiency. *J Exp Bot*, 1999, 50: 487~497.
- 8 Ma F, Peterson C A. Plasmodesmata in onion (*Allium cepa* L.) roots—a study enabled by improved fixation and embedding techniques. *Protoplasma*, 2000, 211: 103~115.
- 9 Lamb J F S, Samac D A, Barnes D K et al. Increased herbage yield in alfalfa associated with selection for fibrous and lateral root. *Crop Sci*, 2000, 40: 693~699.
- 10 Haissing B E. Metabolism during adventitious root primordium initiation and development. *New Zealand Forest Sci*, 1974, 4: 324~335.
- 11 Hartman H T. Plant propagation and practices. 4th USA. Prentice-Hall Inc, 1983, 246.
- 12 Hurley M B, Rowarth J S. Resistance to root growth and changes in the concentrations of ABA within the root and xylem sap during root restriction stress. *J Exp Bot*, 1999, 50: 799~804.
- 13 秦新民, 梁倩华. 白花泡桐不定根发生过程中内源激素和 RNA 的变化. *热带亚热带植物学报*, 1995, 4(1): 52~56.
- 14 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. *植物生理学报*, 1991, 17(3): 313~316.
- 15 Jain M L, Kadkade P G, Van Huysse P. The effect of growth regulation chemicals on abscission and IAA-oxidizing enzyme system of dwarf bean seedling. *Physiol Plant*, 1969, 22: 1033~1042.
- 16 Evans J J. The distribution of peroxidase in extreme dwarf and normal tomato. *Phytochemistry*, 1965, 4: 499~503.
- 17 Wittenbach V A, Bukavac M J. Cherry fruit abscission: peroxidase zone in relation to separation. *J Amer Soc Sci*, 1975, 100: 387~389.
- 18 Tang Y W, Bonner J. The enzymatic inactivation of indoleacetic acid I—some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. *Arch Biochem*, 1964, 13: 11~25.
- 19 Lee T T. Cytokinin-controlled indoleacetic acid oxidase isoenzymes in tobacco callus cultures. *Plant Physiol*, 1971, 47: 181~185.
- 20 赵可夫. 不同日照长度下菊芋块茎形成过程中植物激素和同工酶的变化. *植物生理学报*, 1984, 10(1): 11~17.
- 21 梅慧生. 植物同工酶研究的某些进展. *植物生理通讯*, 1980, (3): 1~7.
- 22 王水平, 沈曾佑, 张志良等. 棉纤维细胞生长与过氧化物酶和 IAA 氧化酶的关系. *植物生理学报*, 1985, 11(4): 409~417.

(责任编辑: 邓大玉)