

吲哚丁酸对桉树插条多酚氧化酶的影响及其与生根的关系

黄卓烈¹, 李明², 谭绍满³, 巫光宏¹, 詹福建¹, 龙腾⁴

(1. 华南农业大学生命科学学院, 广东广州 510642; 2. 兰州大学干旱生态学国家重点实验室, 甘肃兰州 730000;
3. 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)为易生根植物。MLA 插条内的 PPO 活性比 U₆、W₅ 的低。用吲哚丁酸(IBA)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。PPO 同工酶谱带也随生根的进程出现增多现象。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; 吲哚丁酸

中图分类号: Q944.54 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2003)01-0077-06

Study on the relationship between the changes of activities and isoenzymes of polyphenol oxidase and the rooting of *Eucalyptus* cuttings after treatment with indolebutyric acid

HUANG Zhuo-lie¹, LI Ming², TAN Shao-man³, WU Guang-hong¹,
ZHAN Fu-jian¹, LONG Teng⁴

(1. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. National Key Laboratory of Arid Agroecology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 3. College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 4. Leizhou Forestry Institute of National Forestry Bureau, Zhanjiang 524348, China)

Abstract: *Eucalyptus urophylla* S. T. Blade MLA clone(MLA) was one of the plants which rootings were difficult. *E. urophylla* S. T. Blade U₆ clone(U₆) and *E. ABL* 12 W₅ clone(W₅) were relatively easy-to-root plants. The activity of polyphenol oxidase (PPO) in MLA was lower than that of in U₆ and W₅. After the cuttings of *Eucalyptus* were treated with indolebutyric acid (IBA), the activities of PPO and the content of protein increased regularly in different stages of rooting. The isoenzymes of PPO increased after treatment with IBA. The relationship between PPO and rooting of *Eucalyptus* cuttings was discussed.

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

收稿日期: 2002-01-14; 修订日期: 2002-03-20

基金项目: 广东省重点攻关项目(99M04201G); 雷州林业局资助项目。

作者简介: 黄卓烈(1950-), 男, 广东廉江人, 教授, 博士研究生导师, 留学回国人员, 从事酶学和酶工程研究。

高等植物中普遍存在多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO), 这种酶不仅在植物的生长、发育中起重要的作用, 而且对植物的器官形态建成也起到非常重要的作用。Al Barazi *et al.*^[1] 用组织化学鉴定法研究发现, PPO 位于不定根的起源部位, 对根的发生和发展起重要作用。Bassuk *et al.*^[2] 发现, PPO 的作用产物可以促进苹果的插条发根。Bhattacharya *et al.*^[3] 发现 PPO 活性的变化与 *Phaseolus mungo* 插条不定根的发生有着非常一致的联系。Dhawan *et al.*^[4] (1982) 观察到凤仙花的不定根发生时, PPO 活性呈现出有规律的变化。种种迹象表明, 植物不定根的形态建成确实与 PPO 有密切的关系。

桉树是我国的主要造林树种。用桉树枝条进行扦插时, 插条一般难以生根。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。有关 PPO 活性变化与桉树插条不定根发生的关系的研究在国内外还未进行过。针对这种情况, 本试验试图研究不同桉树在用吲哚丁酸(IBA)处理后, 在扦插过程中插条体内 PPO 活性及其同工酶的变化, 以揭示 PPO 与桉树不定根发生的关系, 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 供试材料及其处理

供试树种为尾叶桉(*Eucalyptus urophylla* S. T. Blade) MLA 无性系(以下简称为 MLA)和 U₆ 无性系(以下简称为 U₆), 刚果 12 号桉(*E. ABL*. 12) W₅ 无性系(以下简称为 W₅)。其中 MLA 是难生根无性系, 而 U₆ 和 W₅ 是相对容易生根的无性系^[5]。试验使用桉树的组培苗萌芽条嫩梢作插条进行研究。扦插基质是细河砂和黄泥混合, 两种成分的体积比为 1:1, 在烘箱中以 100 °C 高温消毒 30 min, 取出待其冷却后, 拌以百菌清, 用量为 0.05 g/100 g 基质, 晾 24 h。母株为栽培于田间 8~10 个月生的桉树组培苗。插条的剪取和准备方法见李明等^[5]所述。将插条基部插入 0.1% (此浓度经系列浓度试验后确定) 的吲哚丁酸(IBA)中 3 min 后取出扦插。扦插和插后管理方法见李明等^[5]。定期取集插条基部 3 cm 茎段进行测定分析。试验处理均重复 3 次。由于桉树是难生根植物, 不用激素

处理的对照插条在扦插后 3~5 d 就死亡, 因此本试验无法得到完整的空白对照。

1.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离 PPO 同工酶

PPO 同工酶的电泳按李明等^[5]的方法进行。显色后, 用蒸馏水冲洗, 用日本产的 CS-930 型凝胶薄层扫描仪进行扫描。

1.3 PPO 活性及可溶性蛋白质含量的测定

PPO 活性的测定按李明等^[5]所述的方法进行。以每 1 min 每 1 mg 蛋白质在 525 nm 波长处改变光密度 0.1 为 1 个活力单位(U)(U/mg·min)。可溶性蛋白质含量的测定采用 Bradford^[6]的方法。以牛血清蛋白为标准蛋白。

2 结果与分析

2.1 IBA 处理 MLA 插条生根期间的 PPO 活性及可溶性蛋白质含量比较

当用 IBA 处理 MLA 插条后, 在扦插生根过程中 PPO 活性的变化见表 1。结果表明, IBA 处理的 MLA 插条在愈伤组织诱导期(0~20 d), 其 PPO 活性逐渐上升, 在生根形成期(20~25 d)稍有下降, 但在根伸长期(30~35 d)又恢复上升。表 2 列出了酶活性变化与处理时间的相关性分析。结果表明, PPO 活性与 IBA 处理后发根的时间呈正相关。此外, 由于 PPO 的决定系数是 0.9015, 表明在本试验中, MLA 插条在生根期间 PPO 活性的上升有 90.15% 的可能性是由 IBA 处理后不同发根时间决定的。其它原因造成 PPO 活性变化的可能性只有 9.85%。

2.2 IBA 处理 U₆ 插条生根期间 PPO 活性及可溶性蛋白质含量的比较

由表 1 结果可得出, PPO 活性在整个生根期间连续上升。相关性分析结果(表 2)表明, 在 U₆ 中, PPO 活性的变化与 IBA 处理后的发根时间呈正相关。显著性测定结果表明, PPO 活性的相关性极显著。此外, 由于 PPO 的决定系数是 0.9846, 表明在本试验中, PPO 活性的变化有 98.46% 的可能性是由 IBA 处理后不同发根时间决定的。其它原因造成酶活性升高的可能性只有 1.54%。这充分说明在 U₆ 中, 插条不定根的发生和发展与 PPO 的活性变化有密切的关系。IBA 处理的 U₆ 在扦插生根过程中其插条内 PPO 活性变化及可溶性蛋白质含量变化规律基本一致。

2.3 IBA 处理 W₅ 插条生根期间 PPO 活性及可溶性蛋白质含量比较

用 IBA 处理 W₅ 后插条内的 PPO 活性的变化见表 1。结果表明, PPO 活性在整个生根期间一直保持上升的趋势。相关性分析结果(表 2)表明, PPO 活性变化与 IBA 处理后的发根时间呈正相关。显著性测验结果, 其正相关性极显著。由于 PPO 的决定系数为 0.698 3, 说明在本试验中, PPO 活性变化有 69.83% 的可能性是由 IBA 处理后不同发根时间决定的, 其它因素造成 PPO 活性变化的可能性只

有 30.17%。

2.4 不同无性系扦插生根期间 PPO 的活性变化比较

为了便于比较难易生根无性系插条在扦插生根期间的 PPO 的活性变化, 将表 1 所列的数据按照不同无性系进行方差分析。结果(表 3)显示, 供试的 3 种桉树除了在生根期间的不同阶段其 PPO 活性具有极显著的变化外, 难易生根桉树的 PPO 活性差异也极显著, 说明易生根桉树 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

表 1 IBA 处理 MLA、U₆ 和 W₅ 插条生根期间的 PPO 活性变化

Table 1 Change of PPO activities during rooting stages in MLA cuttings treated with IBA

材料 Materials	扦插后天数(d) Days after cuttage	0	5	10	15	20	25	30	35
MLA	PPO 活性 PPO activity (U/mg. min)	2.02	2.35	2.75	3.67	5.02	4.76	4.88	5.30
	可溶性蛋白质含量 Content of protein(mg/g)	4.97	5.27	5.58	6.10	6.87	7.25	7.87	8.49
U ₆	PPO 活性 PPO activity(U/mg. min)	4.12	4.36	4.90	5.77	6.22	6.75	6.96	7.87
	可溶性蛋白质含量 Protein content(mg/g)	7.76	8.75	8.49	8.89	9.27	9.66	10.72	10.69
W ₅	PPO 活性 PPO activity (U/mg. min)	4.02	4.24	4.57	6.70	7.22	7.67	7.94	8.57
	可溶性蛋白质含量 Protein content(mg/g)	8.02	8.23	8.68	9.56	11.28	12.00	12.57	13.42

注: 数字为 3 次重复的平均值, 测定时间 3 月中旬~4 月下旬。

Note: Three repetitions were done in March and April.

表 2 IBA 处理各桉树无性系 PPO 活性变化的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of the changes of PPO activity in clones after treatment with IBA

无性系 Clones	相关系数 Correlation coefficient	决定系数 Determination coefficient	Sr	t	t _{0.05}	t _{0.01}
MLA	0.949 5	0.901 5	0.128 1	7.411 * *	2.365	3.499
U ₆	0.992 3	0.984 6	0.050 7	19.587 * *	2.365	3.499
W ₅	0.835 6	0.698 3	0.224 2	3.726 * *	2.365	3.499

表 3 IBA 处理各桉树后 PPO 活性变化的方差分析

Table 3 Variance analysis of PPO activity in *Eucalyptus* clones treated with IBA

变异来源 Variant source	自由度 Freedom degree	平方和 Sum squares	均方 Mean square	F	F _{0.05}	F _{0.01}
天数间 Among days	7	45.7555	6.5365	46.93 * *	2.77	4.28
无性系间 Among clones	2	28.5630	14.2815	102.53 * *	3.74	6.51
误差 Error	14	1.9500	0.1393	—	—	—
总变异 Total variant	23	76.2685	—	—	—	—

示了难生根桉树和易生根桉树的重要区别。

2.5 IBA 处理对三种桉树生根期间 PPO 同工酶的影响

2.5.1 IBA 处理 MLA 插条后扦插生根期间 PPO 同工酶的变化 IBA 处理的 MLA 插条生根期间的 PPO 同工酶有所变化(图 1)。生根当天至第 5 d 同工酶峰数相似, 第 10 d 时, 酶峰数增加, 到第 20 d 时, 酶峰数又减少, 以后一直保持到 30 d。

2.5.2 IBA 处理 U₆ 插条后扦插生根期间 PPO 同工酶的变化 从图 2 中可看出, IBA 处理 U₆ 插条后 PPO 同工酶也发生了变化。生根当天至第 5 d, 酶峰数不变, 但这两天的同工酶的峰形不同。第 10 d 时, 酶峰数增加。第 20、30 d 时, 酶峰数都比 10 d 时增加, 但第 20 d 和第 30 d 这两天的酶峰形也不同(图 2)。

2.5.3 IBA 处理 W₅ 插条后扦插生根期 PPO 同工

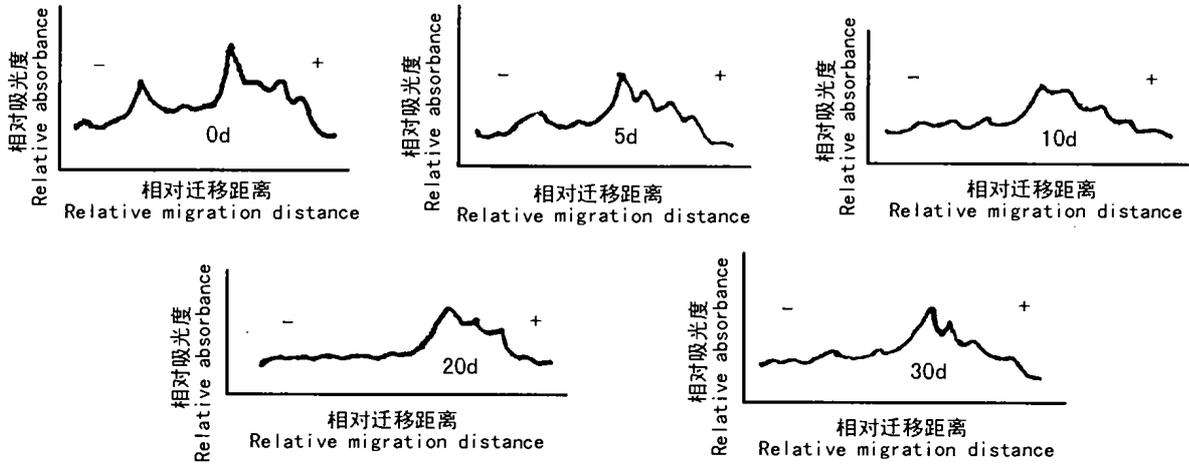


图 1 IBA 处理 MLA 插条后生根期间 PPO 同工酶变化

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

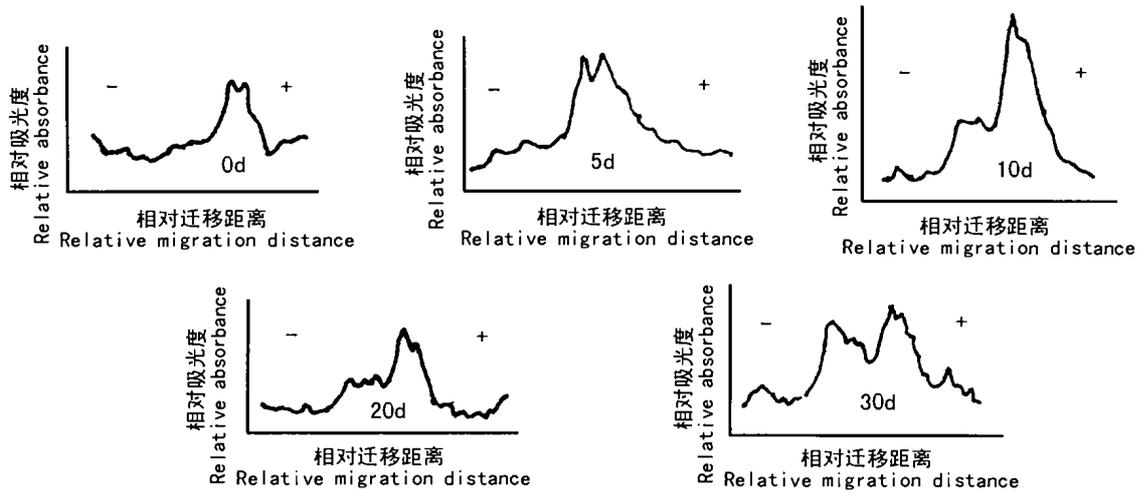


图 2 IBA 处理 U₆ 插条后生根期间 PPO 同工酶变化

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

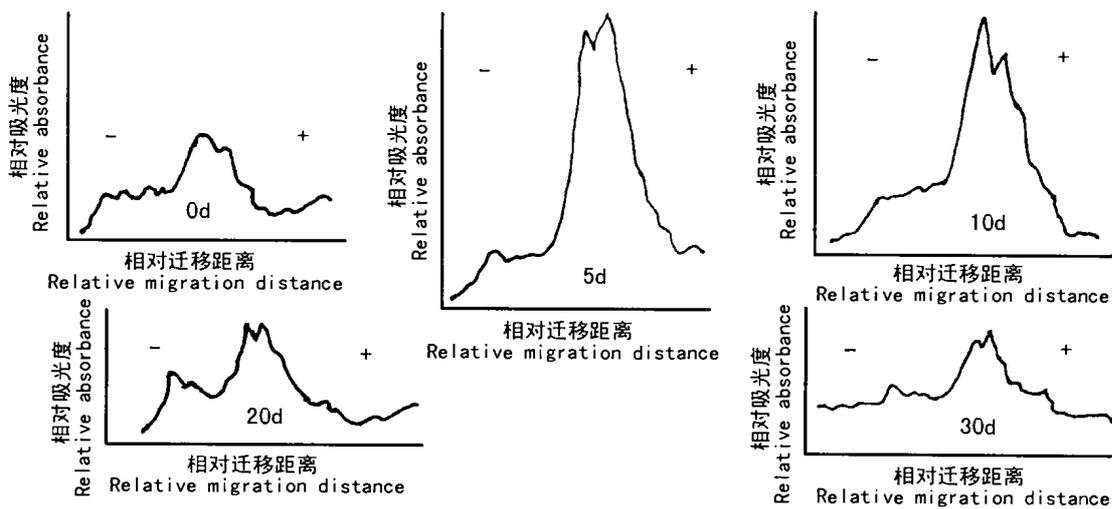


图 3 IBA 处理 W₅ 插条后生根期间 PPO 同工酶变化

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

酶的变化 从图 3 可看出, IBA 处理的 W₅ 插条在生根期间其体内的 PPO 酶峰也有所变化。扦插当天, 酶峰数与第 5 d 的一样, 但这两天的峰形不同。生根第 10、20、30 d 的酶峰数依次有所增加。可见, 随着生根的进程酶峰数有增加的趋势。

3 讨论与结论

据报道, 植物的 PPO 与不定根的发生和发展有着非常密切的联系^[1,7,8]。这主要是与酚类物质有关^[9,10]。外源的酚类物质可以使菜豆的插条大幅度增加^[11]。研究结果指出, PPO 能催化酚类物质与 IAA 缩合而形成一种“IAA-酚酸复合物”^[12], 这种复合物是一种生根的辅助因子, 具有促进不定根形成的活性^[2]。有人发现, 难生根的枝条含有较少的酚类物质, 容易生根的枝条则含有较多的酚类物质^[13]。Foong *et al.*^[14] 发现, 在易生根的 *Rhododendron ponticum* 体内的 PPO 活性就较高, 而在难生根的“*R. Jan Dekens*”中 PPO 活性就要低得多。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, 因而就能提高扦插生根率。

事实上, 很多人都证明 PPO 确实与不定根的发生有关。Bhattacharya^[15] 就曾经证明 PPO 催化生长素代谢, 促进不定根的起源与发育。*Hydrangen macrophylla* 的茎组织产生不定根时, PPO 活性剧烈地上升^[16]。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^[17]。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^[18]。在本试验中, 利用桉树插条作为研究材料也同样证实桉树不定根的发生和发展与 PPO 的密切联系。

IBA 对插条的作用, 是 IBA 刺激了形成层细胞的活性, 形成层细胞产生大量 IAA, 然后通过 IAA 而起作用的。而 IAA 能促进体内 PPO 的活性变化, 从而促进细胞的脱分化, 产生愈伤组织。Balakrishnamurthy^[10] 认为, 在 IBA 的作用下, 促进了基因的表达。本试验中随着发根进行, 插条蛋白质含量上升就可证明这一点。基因表达被促进后, 一方面 PPO 活性提高, 另一方面又改变 PPO 同工酶数, 从而将邻二羟基酚类物质与生长素结合而形成

一种生根素, 然后由生根素促进不定根的发生。

当然, 生根过程是一个复杂的代谢过程, 不能简单地认为施用某种生长素就能促进生根。特别是对难生根的植物施用生长素也未必就能生根, 而且当生长素浓度不适合时反而抑制生根。因此, 桉树的生根除了与 PPO 有联系外, 还与许多其它因素有关。要弄清楚其生根机理, 还要进行大量的研究。

参考文献:

- [1] Al Barazi 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): 453-461.
- [2] Bassuk N L, Hunter L D, Howard B H. The apparent of polyphenol oxidase and phloridzin in the production of apple rooting cofactors [J]. *J. Hort. Sci.*, 1981, **56**(4): 313-322.
- [3] Bhattacharya S, Nanda K K. Promotive effect of purine and pyrimidine bases and their role in the mediation of auxin action 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] Bagatharia S B, Chanda S V. Changes in peroxidase and IAA oxidase activities during cell elongation in *Phaseolus hypocotyls* [J]. *Acta Physiol Plant*, 1998, **20**(1): 9-13.
- [8] Frenkel C, Hess C E. Isozymic changes in relation to root initiation in mung bean [J]. *Can J. Bot.*, 1973, **52**: 295-297.
- [9] Basu R N, Mandal K, Punjabi B. Propagation of tropical and subtropical horticultural crops [M]. (ed). Bose R K, Mitra S K, and Sadhu M K. Naya Prakash, India. 1986. 87.

- [10] Balakrishnamurthy G, Madhava R V N. Changes in phenols during rhizogenesis in rose (*Rosa bourboniana* Desp)[J]. *Curr. Sci.*, 1988, **57**(17): 960—962.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Hartman T, Kester D E. Plant propagation-principle and practices. 3rd edn [M]. New Delhi: Prentice Hall of India, 1976.
- [14] 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.
- [15] Bhattacharya N C. Enzyme activities during adventitious rooting[A]. In: Davis T D, Haissig B E, Sankhla N (eds). *Adventitious Root Formation on Cutting*[M]. Dioscorides: Portland, 1989. 88—101.
- [16] Molnar J M, La Croix L J. Studies of the rooting of cuttings of *Hydrangea macrophylla*: enzyme changes[J]. *Can J. Bot.*, 1972, **50**: 315—322.
- [17] Habaguchi K. Alterations in polyphenol oxidase activity during organ redifferentiation from carrot calluses cultured *in vitro* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1977, **18**: 181—189.
- [18] Upadhyaya A, Davis T D, Sankhla N. Some biochemical changes associated with paclobutrazol-induced adventitious root formation on bean hypocotyl cuttings[J]. *Ann Bot.*, 1986, **57**: 309—315.

(上接第 76 页 Continue from page 76)

- [5] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1991.
- [6] 张忠殿, 汪沛洪, 赵会贤. 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法[J]. 植物生理学通讯, 1990, **26**(4): 62—65.
- [7] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [8] 宗会, 刘娥娥, 郭振飞, 等. 干旱、盐胁迫下 LaCl₃ 和 CP₂ 对稻苗脯氨酸积累的影响[J]. 作物学报, 2001, **27**(2): 173—177.
- [9] 杨淑贞, 高俊凤. 活性氧、自由基与植物的衰老[J]. 西北植物学报, 2001, **21**(2): 215—220.