

# 生长素对红叶石楠组培苗 过氧化物酶和多酚氧化酶活性的影响<sup>①</sup>

刘秀莲, 吴月燕, 汪财生

浙江万里学院, 宁波 315100

**摘要:** 试验对红叶石楠组培苗根诱导分化过程中过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)活性的变化进行了研究。结果表明, 在使用 IBA 和 NAA 后, 过氧化物酶活性在 0~15 d 先迅速下降, 然后急剧上升, 在根开始伸长时, 活性又开始下降; 多酚氧化酶活性在 0~15 d 内逐步上升, 在根开始伸长时, 活性也开始下降。而在不使用任何生长调节剂的情况下则不生根, 过氧化物酶活性在 0~15 d 内逐步上升, 15 d 后开始下降; 多酚氧化酶活性在整个根诱导过程中都维持在较低水平。同时还发现, 在生根过程中, 处理与对照相比, 各酶的活性差异达极显著水平, 表明红叶石楠组培苗的不定根发生和发育与过氧化物酶、多酚氧化酶的活性密切相关。

**关键词:** 红叶石楠; 过氧化物酶; 多酚氧化酶; 根分化

**中图分类号:** Q813.1; S722.3<sup>+</sup>7

**文献标识码:** A

木本植物离体快繁技术虽有很大的发展, 但生根难仍是其主要的限制因子。近年来, 对根分化、发育的研究日益受到重视。过氧化物酶(POD)是普遍存在高等植物体内的一类含铁卟啉辅基的酶, 亦是木质素合成的主导酶, 在根的起源和生长过程中主要通过氧化 IAA 而起作用。多酚氧化酶(PPO)是一种含铜的能催化各种酚类氧化的酶, 它能催化酚类物质与 IAA 缩合而形成一种“IAA-酚酸复合物”, 这种复合物是一种生根辅助因子, 可促进不定根的形成<sup>[1]</sup>, 如桉树插条在生根过程中 PPO 活性提高<sup>[2]</sup>。而有关 POD, PPO 活性变化与红叶石楠不定根发生之间的关系在国内外尚未见报道。为此, 本试验以红叶石楠(*Photinia fraseri*)组培苗为材料, 探讨生根过程中 POD 和 PPO 活性的变化, 以揭示 POD 和 PPO 活性与红叶石楠组培苗生根间的内在关系, 为红叶石楠的生产实践及进一步的研究开发提供科学的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

取生长健壮的红叶石楠幼嫩枝条进行组织离体培养, 经过 2~3 代增殖培养后获得丛生芽, 以丛生芽作为本次实验的材料。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 IBA 及 NAA 对生根的影响

选取长势一致的丛生芽分成单株, 转至培养基上诱导生根。试验分成处理组和对照组。处理组培养基分别为: (1)1/2MS + IBA 0.5 mg/L + 蔗糖 2%, (2)1/2MS + NAA 0.5 mg/L + 蔗糖 2%; 对照组培养基为: (3)1/2MS + 蔗糖 2%。分别取诱导 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 d 的根培养材料, 用于酶活性测定。

<sup>①</sup> 收稿日期: 2007-01-22

基金项目: 浙江万里学院重点项目。

作者简介: 刘秀莲(1964-), 女, 浙江嵊州人, 浙江万里学院实验师, 主要从事生物技术研究。

### 1.2.2 POD 活性测定

POD 活性测定, 参照孙文全的方法<sup>[3]</sup>, 并作适当修改. 操作步骤如下: 称取材料 1 g, 加入 20 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液 5 mL, 于研钵中研磨成浆, 4 000 r/min 下离心 15 min. 取上清液定容到 25 mL 作为酶液, 于 4 °C 下保存备用.

测定时, 取 2 只 1 cm 的比色杯, 于 1 只中加入已混匀的反应混合液[100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.0) 50 mL, 加入愈创木酚 28 mL, 于磁力搅拌器上加热搅拌, 愈创木酚溶解后, 冷却, 加入 30% 过氧化氢 19 mL, 混匀]3 mL, 加 1 mL 失活的酶液作为参比液; 而另 1 只中加入反应混合液 3 mL, 酶液 1 mL, 立即计时并置于紫外分光光度计中, 在波长 470 nm 下测定 OD 值, 每 1 min 读数 1 次, 连续测 30 min. 重复 3 次. 以每克样每分钟 OD 值 0.01 表示酶活性大小.

### 1.2.3 PPO 活性测定

PPO 活性测定, 参照 Archer 等的方法<sup>[4]</sup>, 并进行适当修改. 操作步骤如下: 取材料 1 g, 加入 0.15 g 聚乙烯吡咯烷酮-K30, 用 pH6.4 的磷酸缓冲液溶解、浸泡, 在冰浴下研磨成匀浆. 取研磨液定容至 50 mL, 在 4 °C, 12 000 r/min 下离心 30 min. 取上清液并过滤收集. 取 1 mL 酶液, 用磷酸缓冲液稀释 10 倍, 保存备用.

取酶液 0.1 mL, 加 0.5 mol/L 的邻苯二酚(2.752 8 g 邻苯二酚 pH6.4 的磷酸缓冲液制成 0.5 mol/L 的邻苯二酚 50 mL)3 mL, 于波长 398 nm 下测定 OD 值. 以蒸馏水为参比液. 重复 3 次. 以每克样每分钟 OD 值 0.1 表示酶活性大小.

### 1.2.4 数据处理方法

各酶活性的数据用双因素方差分析进行统计, 确定差异显著性. 过程参照黄卓烈的方法进行<sup>[5]</sup>.

## 2 结果与分析

### 2.1 IBA 及 NAA 对生根的影响

在处理组(1)、(2)中, 单苗第 12 d 基部开始膨大, 第 15 d 开始出现白色根点, 一直到第 25 d 根基本出齐. 而对照组 CK 中没有生根. 不同生长素处理对根诱导的影响见表 1. 由表 1 可见, IBA 和 NAA 对红叶石楠生根具有较大的促进作用, 在添加 IBA 的生根培养基上, 其生根率为 78%, 平均根数有 4 条, 根较粗壮; 在添加 NAA 的生根培养基上, 生根率为 70%, 平均根数为 3 条, 根生长一般. 2 种处理在出根时间上无明显差异, 均为 20~25 d.

表 1 IBA 及 NAA 对红叶石楠组培苗生根的影响

处 理	培养基(mg · L <sup>-1</sup> )	生根率/%	根数/条
(1)	1/2 MS+ IBA 0.5	78%	4
(2)	1/2 MS+ NAA 0.5	70%	3
CK	1/2 MS	0	0

### 2.2 根诱导过程中 POD 活性的变化

在不定根分化过程中 POD 活性的变化如图 1 所示. 处理(1)、处理(2)在诱导生根初期(1~9 d)POD 活性迅速下降, 随着根的形成(第 9~15 d), POD 活性迅速提高; 当根开始伸长(15~21 d)时, POD 活性又开始下降. 而对照的过氧化物酶活性却一直上升, 直到第 15 d 后才开始下降, 无根原基形成. 方差分析结果(见表 2a)表明, 与对照相比, 处理(1)、处理(2)在不同天数内 POD 活性变化的差异达极显著水平. 由此表明, 组培苗的生根过程与 POD 活性变化密切相关.

### 2.3 根诱导过程中 PPO 活性的变化

在根分化过程中 PPO 活性的变化见图 2. 由图 2 可见, 处理(1)、(2)中 PPO 的活性随根的诱导而显著上升, 直到新根形成后才慢慢下降. 而对照中的 PPO 活性一直维持在较低水平. 方差分析结果(表 2 b)表明, 与对照相比, 处理(1)、(2)中的红叶石楠组培苗的生根过程伴随着 PPO 活性的极显著上升. 这表明红叶石楠组培苗不定根的发生与 PPO 活性有非常密切的联系.

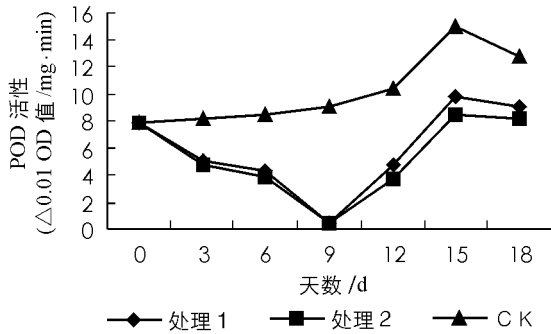


图 1 不定根分化过程中 POD 活性变化

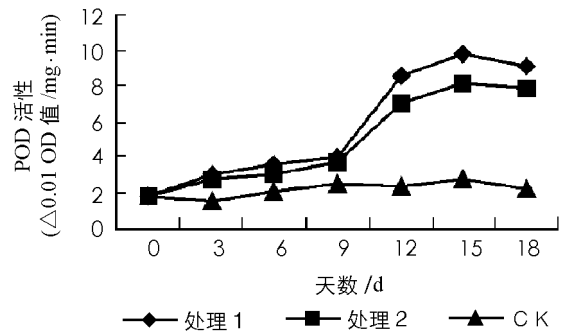


图 2 不定根分化过程中 PPO 活性变化

表 2 生长素对酶活性变化的方差分析

代号	酶	变异来源	自由度	平方和	均方	F	p
a	POD	处理间	2	100.869 5	50.434 8	20.499 **	0.000 1
		天数间	6	130.936 2	21.822 7	8.87 **	0.000 8
		误差	12	29.523 8	2.460 3		
		总变异	20	261.329 5			
b	PPO	处理间	2	47.789 5	23.894 8	9.402 **	0.003 5
		天数间	6	78.285 7	13.047 6	5.134 **	0.007 9
		误差	12	30.497 1	2.541 4		
		总变异	20	156.572 4			

### 3 讨论

黄卓烈<sup>[5]</sup>在桉树插穗生根试验中认为,难生根植物 POD 活性高,降解 IAA 的能力较强,对诱导生根不利;反之,易生根植物 POD 活性低,降解 IAA 的能力较弱,对诱导根原基形成有利. Mato<sup>[6]</sup>等发现,在不定根出现期,体内 POD 活性下降.而黑松苗的胚用 IAA 处理后,随着生根进程 POD 活性升高<sup>[7]</sup>. POD 活性变化趋势在不同植物中有所差异.在本实验中发现,IBA 和 NAA 对红叶石楠根诱导分化有显著影响,而在处理(1)和处理(2)之间红叶石楠生根率和生根数无显著差异,从 POD 活性变化曲线上看也是如此.同时还发现,在没有添加任何生长素的对照中则不生根,POD 活性也一直比较高.由此表明 POD 活性与红叶石楠的根诱导分化有关.初步推测外源生长素可能是通过影响 POD 的活性而对内源 IAA 起作用.

李明等<sup>[8]</sup>在桉树扦插生根试验中,发现在易生根的 *Eucalyptus* ABL. 12 W<sub>5</sub> 无性系体内的 PPO 活性比较高,而难生根的 *Eucalyptus urophylla* S. T. Blade MLA 无性系体内 PPO 活性就低得多. Molnar 和 La-Croix<sup>[9]</sup>曾经发现,在 *Hydrangen macrophylla* 的茎组织产生不定根时,体内的 PPO 活性急剧上升. Habaguchi<sup>[10]</sup>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. Upadhyaya 等<sup>[11]</sup>用多效唑处理菜豆的插条时,发现在其生根量增加的同时,体内的 PPO 活性也大幅度上升. Bhattacharya<sup>[12]</sup>利用试验证实了 PPO 能催化生长素代谢,促进不定根的发生与发育.本试验的结果也发现,处理(1)和处理(2)的 PPO 活性较高,而对照中红叶石楠的 PPO 活性较低.由此表明 PPO 活性的高低确实与不定根的发生有关.本试验结果也支持了上述观点.

### 参考文献:

- [1] Bassuk N L, Hunter L D, Howard B H. The apparent of olyphenol xidase and phioridzin in the production of apple rooting cofactors[J]. J Hort Sci, 1981, 56(4): 313 - 322.
- [2] 黄卓烈, 李明, 谭绍满, 等. 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[J]. 广西植物, 2003, 23(1): 77 - 82.
- [3] 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): 105 - 108.
- [4] Archer M C, Palner J K. An experiment in enzyme characterization; Bona polyphenol oxidase[J]. Biochem Educ, 1975,

- 3 (3) : 50 - 52.
- [5] 黄卓烈, 李明, 詹福建, 等. 不同生长素处理对桉树无性系插条氧化物酶活性影响的比较研究[J]. 林业科学, 2002, 38(4): 46 - 52.
- [6] Mato M C. Changes in levels of peroxidase and phenolics during root formation in vitic cultured in vitro[J]. *physiol-plant*, 1998, 72: 84 - 88.
- [7] Kieliszewska-Rokicha B. Effect of treating scots pine seedlings with phytohormone on the growth of the root system and on the peroxidase and IAA oxidase enzyme activities in roots[J]. *Arboretum-Kornckie*, 1989, 32: 207 - 219.
- [8] 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.
- [9] Molnar J M, LaCroix L J. Studies of the rooting of cuttings of *Hydrangea macrophylla* : enzyme changes[J]. *Can J Bot*, 1972, 50: 315 - 322.
- [10] Habaguchi K. Alterations in polyphenol oxidase activity during organ redifferentiation from carrot calluses cultured in vitro[J]. *Plant Cell Physiol*, 1977, 18: 181 - 189.
- [11] Upadhyaya A, Davis T D, Sankhla N. Some biochemical change associated with paclobutrazol-induced adventitious root formation on bean hypocotyls cuttings[J]. *Ann Bot*, 1986, 57: 309 - 315.
- [12] Bhattacharya N C. Enzyme activities during adventitious rooting[M]. In: Davis T D, Haissig B E, Sankhla N (eds). *Adventitious Root Formation on Cutting*. Dioscorides: Portland, 1989: 88 - 101.

## Effects on POD and PPO Activities during the Induction of Adventitious Root of *Photinia fraseri* Treated with Different Auxins

LIU Xiu-lian, WU Yue-yan, Wang Cai-sheng

*Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100*

**Abstract:** The activities of peroxidase and polyphenol oxidase during the induction of adventitious root of *Photinia fraseri* were investigated. The results showed that the peroxidase activity during the development of adventitious root decreased and then increased rapidly in 0~15 days; when roots began elongation, the decrease of peroxidase activity was observed. The polyphenol oxidase activity in adventitious root development increased in 0~15 days, then decreased after roots began elongation. Meanwhile, the peroxidase activity during the development of the adventitious root in 0~15 days increased and then decreased at no any auxin treatment, while the polyphenol oxidase activity was very low during the whole development of the adventitious root. Compared with the control, the differences of both enzymes activities in rooting were very significant. Therefore, it indicated that the induction and development of the adventitious roots in *Photinia fraseri* were relative to the activities of peroxidase and polyphenol oxidase.

**Key words:** *Photinia fraseri*; peroxidase; polyphenol oxidase; root development

责任编辑 陈绍兰