

吲哚丁酸对石楠组培苗多酚氧化酶的影响及其与生根的关系

刘秀莲¹, 吴月燕¹, 陈德恩²

(1.浙江万里学院, 宁波 315100; 2.宁波市园林公司, 宁波 315100)

摘要:紫叶石楠为难生根植物,红罗宾和红唇比较容易生根.紫叶石楠组培苗内的PPO活性比红罗宾、红唇的低.用吲哚丁酸(IBA)处理石楠组培苗后,在生根的不同阶段,组培苗内的PPO活性呈现规律性变化.蛋白质含量呈上升趋势.文章讨论了多酚氧化酶与石楠组培苗生根的关系.

关键词:多酚氧化酶; 石楠; 组培苗; 吲哚丁酸

中图分类号: S 686

文献标识码: A

文章编号: 1671-2250(2007)05-0063-04

收稿日期: 2006-12-15

作者简介:刘秀莲,浙江万里学院设计艺术与建筑学院实验师;吴月燕,浙江万里学院生物与环境学院教授;陈德恩,宁波市园林公司工程师.

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、发育中有重要的作用,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.

红叶石楠(主要有红罗宾、红唇两种)和紫叶石楠均属蔷薇科石楠属,为常绿灌木或小乔木. 红叶石楠其叶片红色,具有很高的观赏价值. 其生长速度快,萌芽性强,耐修剪,可根据园林需要栽培成不同的树形,在园林绿化上有广泛的用途. 在我国,红叶石楠目前刚处于品种引进和种苗繁育阶段,仅有少量成苗供应市场. 紫叶石楠的新生嫩枝、幼叶色泽光亮鲜红,成熟叶片叶色浓绿,果实紫红,鲜艳夺目. 有较强的抗毒气能力,可在大气污染较严重地区栽植. 树势强健,耐干旱,能在瘠薄土壤上生长,是优良的园林绿化树种. 红叶石楠和紫叶石楠常规繁殖的繁殖率低,用植物组织培养是快繁的重要手段.

对于石楠组培苗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活性变化与石楠组培苗不定根发生的关系的研究在国内外很少见. 针对这种情况,本试验试图研究不同石楠在用吲哚丁酸(IBA)处理后,在生根过程中组培苗体内 PPO活性的变化,以揭示 PPO与石楠不定根发生的关系,为石楠生产和更进一步研究其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

红罗宾、红唇和紫叶石楠组织培养诱导的丛生芽.

1.2 方 法

取盆栽3年生石楠幼嫩枝条,剪成约4~5cm带腋芽茎段,先在加有洗衣粉的洗涤液中浸泡5min,再用自来水冲洗2~3h后剪去展开的叶片,剪成1.5cm左右带芽茎段. 在超净工作台上,用75%酒精溶液浸20s,然

后转入 0.1% 升汞溶液中灭菌 8min, 并用无菌水冲洗 5~6 次. 将灭菌的红罗宾、红唇和紫叶石楠茎段分别接到 MS+KT 1.0mg·L⁻¹ (单位以下相同)+IBA0.1+蔗糖 3%、MS+BA2.0+NAA0.2 和 MS+BA2.0+NAA0.05 的启动培养基上培养 40~50d 后, 将分化出芽的茎段分别接到 MS+BA1.0+KT0.5+NAA0.05+蔗糖 3%、MS+BA1.5+NAA0.2 与 MS+BA1.5+NAA0.2 的增殖培养基上, 经过 2~3 代培养后出现丛生芽. 选取长势一致的丛生芽分成单株, 转至培养基上诱导生根, 培养基为 1/2MS+IBA0.5. 分别取诱导 0、3、6、9、12、15、18d 的根培养材料, 用于酶活性测定.

1.3 PPO 活性的测定

称取植物材料 1g, 加入 0.15g 聚乙烯吡咯烷酮-K30, 用 pH6.4 的磷酸缓冲液溶解、浸泡, 然后在冰浴下研磨成匀浆. 取研磨液用上述缓冲液定容至 50mL, 在 4℃、12 000 r·min⁻¹ 下离心 30min. 取上清液并过滤收集. 取 1mL 酶液, 用 pH6.4 的磷酸缓冲液稀释 10 倍, 于 4℃ 下保存. 取酶液 0.1mL, 加 0.5mol·L⁻¹ 的邻苯二酚 (2.7528g 邻苯二酚用 pH6.4 的磷酸缓冲液制成 0.5mol·L⁻¹ 的邻苯二酚 50mL) 3mL, 用 1cm 比色杯, 在紫外分光光度计中比色, 读数于波长 398nm 下进行. 参比液中用蒸馏水代替酶液, 重复 3 次, 以每克样每分钟光度变化值 0.1 表示酶活性大小.

1.4 可溶性蛋白质含量的测定

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 对石楠组培苗生根的影响

由表 1 可知, 以红唇组培苗的生根情况为最好, 生根率达 95%, 组培苗培养 7d 就有红色根生成, 到第 15d 根已出齐; 其次为红罗宾组培苗的生根, 生根率为 78%, 根原基在第 7d 开始形成, 第 12d 可见白色的根, 直到第 20d 组培苗不再生根; 紫叶石楠的生根情况最差, 生根率为 58%, 15d 后才有根原基形成, 25d 左右根基本出齐.

表 1 IBA 对石楠组培苗生根的影响

树种	生根率/%	根量/根	根生长情况
罗红宾	78	2~5	均匀生长, 较粗
红唇	95	3~6	红色, 均匀生长, 长而粗
紫叶石楠	58	1~2	均匀生长, 较细长

注: 组培苗生根培训 25d 统计生根情况.

2.2 IBA 处理石楠组培苗生根期间的 PPO 活性及可溶性蛋白质含量比较

用 IBA 处理红罗宾组培苗后, 在生根过程中 PPO 活性的变化见表 2. 在不同时期, PPO 活性呈现有规律的变化. 组培苗在 0~15d PPO 活性显著上升, 15~20d PPO 活性慢慢下降, 20d 又恢复上升, 但幅度不大. 表 3 列出了酶活性变化与处理时间的相关性分析. 结果表明, PPO 活性的上升与

IBA 处理后发根的时间呈正相关. 显著性测定结果, 相关极显著. 此外, 因 PPO 的决定系数是 0.8813, 表明在本试验中, PPO 活性的上升有 88.13% 的可能性是由 IBA 处理后不同发根时间决定的. 其他原因造成 PPO 活性变化的可能性只有 11.87%. 这说明在红罗宾中, 不定根的发生与发展与 PPO 活性变化有密切的联系.

2.3 IBA 处理红唇组培苗生根期间 PPO 活性及可溶性蛋白质含量的比较

由表 2 结果可得出, 在 0~12d PPO 活性显著上升, 12~15d PPO 活性慢慢下降, 15~18d 继续下降. 相关性分析结果 (表 3) 表明, 在红唇中, 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 0.8026, 表明在本试验中, PPO 活性的变化有 80.26% 的可能性是由 IBA 处理后不同发根时间决定的. 其他原因造成酶活性升高的可能性只有 19.74%, 表明在红唇中, 组培苗不定根的发生和发展与 PPO 的活性变化有密切的关系.

2.4 IBA 处理紫叶石楠组培苗生根期间 PPO 活性及可溶性蛋白质含量比较

当用 IBA 处理紫叶石楠组培苗后的 PPO 活性的变化见表 2. 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 3) 表明, 酶活性变化与 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 0.9301, 说明在本试验中, PPO 活性变化有 93.01% 的可能性是由 IBA 处理后不同发根时间决定的, 其他因素造成 PPO 活性变化的可能性只有 6.99%. IBA 处理后的

紫叶石楠组培苗在生根过程中其 PPO 活性变化及可溶性蛋白质含量变化规律基本一致。

2.5 不同树种组培苗生根期间 PPO 的活性变化比较

为了便于比较不同石楠组培苗在生根期间 PPO 的活性变化,将表 2 所列的数据按照不同树种进行方差分析. 分析结果见表 4. 结果显示,供试的 3 种石楠之间差异极显著,说明了易生根红唇的 PPO 活性非常显著地高于难生根的紫叶石楠和罗红宾. 这从一个侧面揭示了难生根石楠和易生根石楠的重要区别。

表 2 IBA 处理石楠组培苗生根期间的 PPO 活性变化

处理	活性变化等	接种后天数(d)						
		0	3	6	9	12	15	18
罗红宾	PPO 活性	1.8	3.1	3.6	4.0	8.5	9.8	9.1
	可溶性蛋白质含量	3.7	4.6	5.8	7.1	10.3	11.5	12.2
红唇	PPO 活性	5.1	7.9	9.8	13.1	15.9	14.8	13.9
	可溶性蛋白质含量	8.1	10.2	12.5	15.5	17.0	17.9	18.6
紫叶石楠	PPO 活性	1.6	2.1	2.7	3.5	6.8	7.6	8.3
	可溶性蛋白质含量	3.7	4.6	5.2	6.1	8.5	9.2	10.1

注:数字为 3 次重复的平均值。

表 3 IBA 处理各树种 PPO 活性变化的相关性分析

处理	相关系数	决定系数	Sr	t	$t_{0.05}$	$t_{0.01}$
罗红宾	0.9388	0.8813	0.1539	6.100**	2.571	4.032
红唇	0.8959	0.8026	0.1987	4.508**	2.571	4.032
紫叶石楠	0.9644	0.9301	0.1182	8.159**	2.571	4.032

表 4 IBA 处理各树种后 PPO 活性变化的方差分析

变异来源	自由度	平方和	均方	F	$F_{0.01}$
天数间	6	191.0857	31.8476	22.0250	0.0001
处理间	2	190.2886	95.1443	65.8000	0.0001
误差	12	17.3514	1.4460		
总变异	20	398.7257			

3 讨论与结论

据报道,PPO 对不定根的发生有重要作用^[6]. 在体内,酚类物质对不定根的起源和发育有促进作用. 外源的酚类物质可以使菜豆的插条大幅度提高发根量^[7]. 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”^[8],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. 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^[9]. 李明等^[10]在桉树扦插生根试验中,发现在易生根的 *Eucalyptus ABL* 12 体内的 PPO 活性比较高,而难生根的 *Eucalyptus urophylla* S.T. Blade 体内 PPO 活性就低得多. 本实验的结果表明,难生根植物紫叶石楠、红罗宾组培苗内 PPO 活性较低,可能是催化形成的 IAA-酚类复合物较少,导致对生根不利. 而红唇体内的 PPO 活性较高,推测其合成的这种复合物较多,因而就能提高组培苗的生根率.事实上,MOLNAR^[11],BHATTACHARYA^[12],BASAK 等^[13]也证明了在 *Hydrangen macrophylla*,*Bruguieraparvif lora* 和 *Thespesia populnea* 植物体内 PPO 活性的急剧上升有利于促进植物不定根的起源和发育. 在本试验中,利用石楠组培苗作为研究材料也同样证实石楠不定根的发生和发展与 PPO 的密切联系。

IBA 对石楠组培苗的作用,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

[14]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,组培苗内的蛋白质含量上升就可证明这一点.基因表达被促进后,PPO 活性提高,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,这可能就是不定根形成的机理,但还需深入研究.

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.HortSci*,1984,59(3):453-461.
- [2]Bassuk N L,Hunter L D,Howard B H.The apparent of polyphenol oxidase and phloridzin in the pro-duction 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]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.
- [6]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.
- [7]Balakrishnamurthy G,Madhava R V N.Changes in phenols during rhizogenesis in rose(*Rosa bourboniana* esp).*Curr.Sci.*,1988,57(17):960-962.
- [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]Hartnan T,Kester D E.Plant propagation principle and practices.3rd edn[M].New Delhi:Prentice Hall of India,1976.
- [10]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.
- [11]Molnar J M,La Croix L J.Studies of the rooting of cuttings of *Hydrangea macrophylla*:enzyme changesi,[J].*Can J.Bot.*,1972,50:315-322.
- [12]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.
- [13]BASAKU C,DASA B,DAS P.Metabolic changes during rooting in stem cuttings of five mangrove species[J].*Plant Growth Regulation*,1995,17:141-148.
- [14]Balakrishnamurthy G,Madhava Rao V N.Changes in phenols during rhizogenesis in rose (*Rosa bourboniana*Desp)[J].*Curr Sci*,1988,57(17):960-962.

Study on the Relationship between the Changes of Activities and Isoenzymes of Polyphenol Oxidase and the Rooting of *Ph.serrulata* in Vitro after Treatment with Indolebutyric Acid

LIU Xiu-lian¹, WU Yue-yan¹, CHEN De-en²

(1.Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100; 2.Forestry Bureau of Ningbo, Ningbo 315100)

Abstract: *Photinia fraseri* and *Red Robin* in Vitro are plants whose rootings were difficult.*Red Tip* is a relatively easy-to-root plant.The activity of polyphenol oxidase (PPO) in *Photinia fraseri* and *Red Robin* is lower than that of in *Red Tip*.After *Ph.serrulatas* in vitro were treated with indolebutyric acid (IBA),the activities of PPO and the content of protein increased regularly in different stages of rooting.The relationship between PPO and rooting of *Ph.serrulatas* in vitro was discussed.

Key words: polyphenol oxidase; *Ph.serrulatas*; in vitro; indolebutyric acid