

E物质对红叶石楠“红罗宾”组培苗生根 及相关酶活性的影响*

黄美娟¹, 黄海泉², 连芳青³, 邓小梅⁴

(1. 西南林学院园林学院, 云南 昆明 650224; 2. 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650091;
3. 江西农业大学园林与艺术学院, 江西 南昌 330045; 4. 江西省林业科学院, 江西 南昌 330032)

摘要: 通过对与生根密切相关的酶(POD, IAAO, PPO)活性的测定, 发现E物质的添加与否对红叶石楠生根苗中的POD, IAAO, PPO活性存在很大差异。在添加有E物质的培养基上, 酶活性均表现为易生根的变化规律; 而在未添加E物质的培养基上, 酶活性均表现为生根难的变化趋势。从而进一步从生理生化的角度论证了E物质添加与否, 直接影响到红叶石楠的生根率、出根时间、整齐度以及出瓶时间。

关键词: 红叶石楠“红罗宾”; 离体培养; 生根; E物质; 酶活性

中图分类号: S 686.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2006)03-0297-06

Effects of Substance E on Rooting and Activities of Correlative Enzymes of *Photinia fraseri* “Red Robin” in Vitro

HUANG Mei-juan¹, HUANG Hai-quan², LIAN Fang-qing³, DENG Xiao-mei⁴

(1. College of Landscape Architecture, Southwest Forestry College, Kunming 650224, China;
2. College of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China;
3. College of Landscape and Art, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;
4. Jiangxi Academy of Forestry Sciences, Nanchang 330032, China)

Abstract: In this study, the results showed that, whether E substance was added in the basal medium or not, it had strong influence on rooting of *Photinia fraseri* in vitro and activities of some enzymes related to rooting (POD, IAAO and PPO); the activities of all tested enzymes of *Photinia fraseri* cultured in the medium added with substance E took on the change law of rooting easily, while all the tested enzymes' activities of *Photinia fraseri* in the medium without substance E displayed the change tendency of being unfavorable to rooting, even to difficult rooting. As a result, from the point of physiological and biochemical study, it was further proved that whether substance E existed in the medium or not had direct influence on the rooting rate, rooting time and uniformity, and transplanting time of plantlets of *Photinia fraseri* in vitro.

Key words: *Photinia fraseri* “Red Robin”; in vitro; rooting; substance E; enzymes' activities

近年来,木本植物离体快速繁殖虽然有了很大的进展,但生根难问题仍然是许多重要经济植物和观赏花木工厂化育苗的主要瓶颈。根作为

植物的重要器官,对其分化、发育的研究近年来倍受人们的关注和重视。目前国内外研究表明,过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)及吲哚乙

收稿日期: 2005-09-06

*基金项目: 江西省科技厅重点攻关资助项目。

作者简介: 黄美娟(1972-),女,江西贵溪人,硕士,讲师,主要从事园林植物及观赏园艺的生物技术研究。

酸氧化酶(IAAO)与植物生根密切相关^[1-5]。迄今为止,国内外有关木本植物离体培养根分化指标方面的研究非常有限。作者在进行红叶石楠离体培养研究时发现,在影响红叶石楠生根的主要因子中,E物质(为一种人工合成混合物,粉状,在市场上可直接买到现成品,其主要成分为蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素等,主为食用)的添加与否对生根的影响最为突出,为了更深入地了解E物质对其生根的影响及其内在机理,在以前实验的基础上,通过测定与生根密切相关的酶的活性的研究,揭示其生根的再生机理,为红叶石楠工厂化育苗和更深一步的研究开发提供了科学的理论依据。目前国内外有关POD,PPO,IAAO活性变化与红叶石楠组培苗不定根发生之间关系的研究尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

荷兰引进的彩叶树种红叶石楠“红罗宾”(Photinia fraseri “Red Robin”)的组培苗。

1.2 方法

1.2.1 E物质对红叶石楠组培苗生根的影响

笔者在以前实验的基础上,选取2种最具代表性的生根培养基(W3:M_κ+NAA 0.3 mg/L(激素单位下同)为未添加E物质的最佳生根培养基,设为对照;M2:M_κ+NAA 0.3+E物质 6 g/L为添加E物质的最佳生根培养基),将增殖培养基中的组培苗切取长约1.2 cm的带顶芽茎段接入生根培养基中,并对其生根率、根系粗壮度、根量及出根时间进行观察和记载,以探寻E物质对红叶石楠组培苗的生根效果及其机理。

1.2.2 红叶石楠离体生根石蜡切片制作

将增殖苗切取长约1.2 cm的带顶芽茎段放入生根培养基W3,M2中,从第2 d开始取材,取材部位为茎基部0.5 cm左右,此后每天均在同一时间段取材。材料取好后立即放入FAA固定液中,按常规方式^[6]进行固定、脱水、透明、透蜡、包埋、修蜡片、削片、悬浮式上片和染色封片,Olympus高级生物万能显微镜观察并照相。

1.2.3 与生根相关酶活性的测定

将接入上述2种不同培养基的生根苗分别于第0 d,2 d,4 d,5 d,6 d,8 d及10 d取材,取材部位

为茎基部1 cm左右,此后每次均于同一时间段进行取材,测定其POD,PPO和IAAO活性的动态变化。

1.2.4 POD活性的测定

参照孙文全方法^[7],并作适当修改。其具体操作:将红叶石楠生根苗用自来水冲洗后再用蒸馏水冲洗,取其茎段(离基部约1 cm),用滤纸吸干,称取样品0.4 g,加入5 mL 0.1 mol/L Tris-Cl (pH=8.5),于冰浴上研磨,再加入5 mL 0.1 mol/L Tris-Cl (pH=8.5),于4 000 r/min离心15 min,取上清液备用。将提取的粗酶液稀释50倍后吸取1 mL加入2 mL 0.005 mol/L 联苯胺醋酸-醋酸钠缓冲液,于30℃恒温水浴反应5 min,测定时加入1 mL 0.1 mol/L H₂O₂,摇匀后于580 nm波长下测定光密度变化值(ΔD₅₈₀)。即从加入H₂O₂后开始计时,每15 s读数1次,经测定,在反应的60 s内,光密度呈直线上升,取第15~45 s之间的光密度变化值(ΔD₅₈₀)计算酶活性,其公式为: $E = \{ \Delta O. D. (15 \sim 45) \times 2 \times \text{总稀释倍数} \} / (1000 \times 0.4)$ (E表示酶活性,单位为ΔO. D/mg F W/min)。

1.2.5 PPO活性测定

参照Archer等方法^[8],并进行适当修改。取样品0.5 g,加入0.05 g聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和4 mL 0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH=6.5),于冰浴上研磨,过滤后于滤液中加入硫酸铵至30%饱和度,离心除去沉淀,于上清液中再加硫酸铵至60%饱和度,离心收集沉淀,最后用4 mL 0.01 mol/L磷酸缓冲液(pH=6.5)溶解沉淀。酶反应体系包括2 mL 0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH=6.0),1 mL 0.2 mol/L儿茶酚,1 mL酶液,同时以煮过失活的酶液为对照。反应体系在加入酶液后于37℃保温10 min,迅速放入冰浴,加入2 mL 20%的三氯乙酸,于4 000 r/min离心15 min,收集上清液,并适当稀释,于525 nm波长下测定其吸光度,计算其酶活性。以每毫克蛋白质每分钟改变一个OD₅₂₅单位为一个酶活力单位。

1.2.6 吲哚乙酸氧化酶(IAAO)活性的测定

参照张志良方法^[9]。

2 结果与分析

2.1 E物质对红叶石楠组培苗生根的影响

表1 E物质对红叶石楠组培苗生根的影响

Tab. 1 Effect of substance E on rooting of *Photinia fraseri* in vitro

培养基 culture media	生根率/% rooting rate	根系粗壮度 thickness and sturdiness of roots	根量/根 quantity of roots	根出齐时间/d days of totally rooting
W3 (M _基 + NAA 0.3)	65.5	细弱	1~3	20
M2 (M _基 + NAA 0.3 + E物质 6 g/L)	98.5	粗壮	6~10	8

注: M_基 为木本植物基本培养基^[10]。

由表1可知, E物质对红叶石楠生根具有巨大的促进作用, 在未添加 E物质的生根培养基上, 其生根率仅为 65.5%, 表现为根系细小且少, 出根不整齐, 出根时间长(约 20 多 d); 而在添加 E物质的同一生根培养基上, 红叶石楠的生根率急剧上升, 高达 98.5%, 而且出根快且整齐, 根量多且粗壮, 出根时间集中在第 6~8 d, 第 12 d 即可出苗进行瓶苗移栽, 大大缩短了出苗时间和周期。

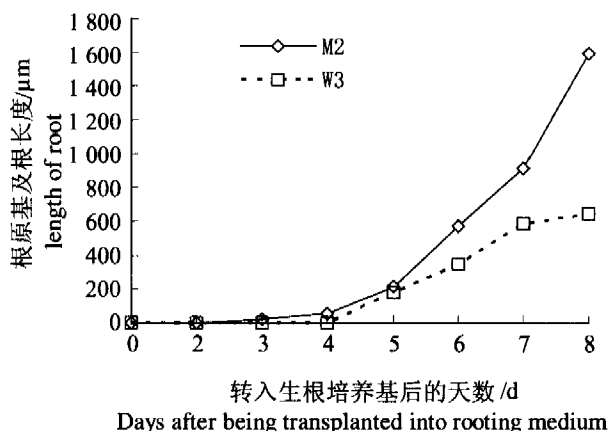


图1 E物质对红叶石楠组培苗不定根生长的影响

Fig. 1 Effect of substance E on growth of adventitious root of *Photinia fraseri* in vitro

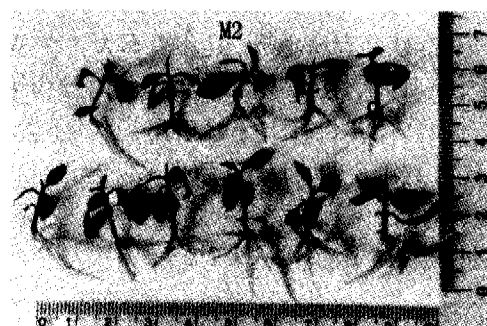
经镜检观察发现, 红叶石楠茎段在转入 M2 生根培养基的第 3 d, 已可以观察到茎基部维管束内形成层的薄壁细胞在进行有序的切向和横向分裂, 根原基正逐渐形成, 至第 6 d 根原基已基本形成, 至第 8 d 其长度已达到 1593.8 μm, 为第 3 d 的 73.1 倍。而在 W3 培养基上, 根原基直到第 5 d 才开始形成, 第 8 d 时根长度只有 644.3 μm, 仅为 M2 培养基上的 40.4%。可见 E 物质可明显的促进红叶石楠不定根的形成和生长。

2.2 E物质对红叶石楠生根苗过氧化物酶(POD)活性的影响

从图3可知, E物质对红叶石楠生根苗 POD活性的影响总体上均呈现为升-降-升的趋势。在添加 E物质的 M2 培养基上, 红叶石楠生根苗



(a)在W3培养基上红叶石楠组培苗生根情况



(b)在M2培养基上红叶石楠组培苗生根情况

图2 E物质添加与否对红叶石楠组培苗生根效果的比较

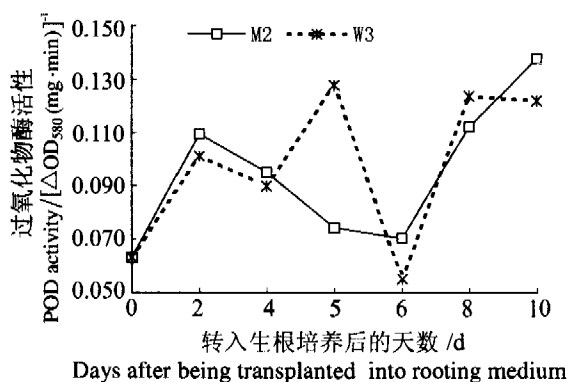
Fig. 2 Comparison of rooting effects of *Photinia fraseri* cultured in the media with substance E or not

图3 红叶石楠无根苗诱导生根期间POD活性的变化

Fig. 3 The changes of POD activity during rooting induction of rootless shoots of *Photinia fraseri*

POD 的变化规律更为突出,在第 2 d 其 POD 活性急剧上升,为第 0 d 的 1.74 倍;此后其 POD 活性迅速下降,第 6 d 时仅为第 2 d 的 0.64 倍;随后其活性再次迅速上升,第 10 d 时 POD 活性为第 0 d 的 2.2 倍。而在未添加 E 物质的培养基上,POD 活性的变化基本呈升-降-升-降-升的规律,第 5 d 时其 POD 活性达到第 1 次高峰,约为第 0 d 的 2 倍;随后开始急剧下降,第 6 d 时其 POD 活性已降至低于刚转接时的水平;此后,其活性又开始急剧上升,第 8 d 时出现第 2 次高峰,但在第 8 d 以后其活性又有所下降,但下降幅度并不是太大。

2.3 E 物质对红叶石楠生根苗吲哚乙酸氧化酶 (IAAO) 活性的影响

如图 4 所示,红叶石楠在两种不同配方的生根培养基上培养过程中,IAAO 活性均呈现升-降-升的变化规律。在 M2 培养基上,IAAO 活性于第 4 d 达到最高峰,为第 0 d 的 1.5 倍;随后迅速下降,第 8 d 时降至最低点,仅为第 4 d 的 12.5%;到第 10 d 时其活性又有所上升,但升幅不大。在 W3 培养基上,IAAO 活性在第 2 d 急剧上升,约为第 0 d 的 3 倍;而在第 4 d 有 1 个峰肩出现,其下降幅度不大;同样到第 8 d 时 IAAO 活性下降至最低值,仅为第 4 d 的 8.2%;此后又呈现上升的趋势,第 10 d 时其活性比第 0 d 提高了 9.2%。

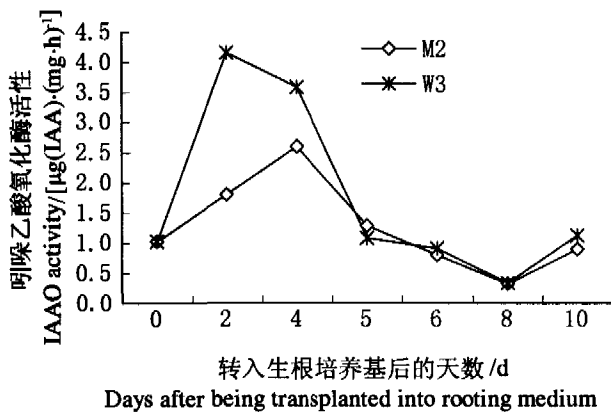


图 4 红叶石楠无根苗诱导生根期间 IAAO 活性的变化
Fig. 4 The changes of IAAO activity during rooting induction of rootless shoots of *Photinia fraseri*

2.4 E 物质对红叶石楠生根苗多酚氧化酶 (PPO) 活性的影响

从图 5 可知,红叶石楠生根苗的 PPO 活性在两种不同生根培养基培养过程中,随着培养时间的延长,其活性逐渐升高,表现为开始升幅较大,随后上升较为平缓。其中在 M2 培养基上 PPO 活性上

升幅度较大,第 5 d 时 PPO 活性为第 0 d 的 4.6 倍;其后上升幅度有所减缓,至第 10 d 时 PPO 活性约为第 0 d 的 6 倍。而在 W3 培养基上,第 10 d 时 PPO 活性约为第 0 d 的 3.6 倍,仅为在 M2 培养基上同时间的 63.2%。

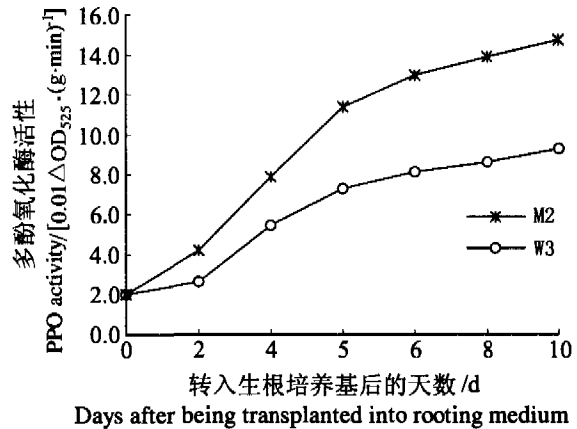


图 5 红叶石楠无根苗诱导生根期间 PPO 活性的变化
Fig. 5 The changes of PPO activity during rooting induction of rootless shoots of *Photinia fraseri*

3 讨论

笔者在以前实验的基础上,选取 2 种最具代表性的生根培养基 W3 和 M2,以探寻 E 物质对红叶石楠组培苗的生根效果及其机理的研究。结果发现, E 物质添加与否,直接影响到红叶石楠组培苗的生根率、出根时间、整齐度以及出瓶时间,大大缩短了出苗时间和周期,即 E 物质对红叶石楠生根具有巨大的促进作用。

目前普遍存在于高等植物中被认为与生根密切相关的酶(POD, PPO 及 IAAO),在植物的生长发育中起着重要的作用。其中 POD 是一类含铁卟啉辅基的酶,参与植物体内多种生理生化过程,其同工酶在植物体内存在发育阶段特异性和组织特异性,被认为是与生根有关的重要酶类, GARSPAR 等^[11]将其视为生根标志之一。PACJECO 等^[12]在蓝桉(*Eucalyptus globules Labill*)离体培养生根过程中,发现 POD 酶活性出现两个高峰,且认为第一个高峰与根的诱导有关。李明等^[13]在桉树(*Eucalyptus spp.*)插条生根过程中,也发现 POD 活性在根的愈伤组织诱导期急剧上升,而在根的形成期下降,随后在根的伸长过程中又呈上升趋势。另外, MONCOUSIN^[14], CALDERON 等^[15], 宋金耀等^[16]和 马锋旺等^[17]分别在葡萄(*Vitis vinifera L.*)、蓝桉、山海关杨(*Populus canadensis cv. shanhaiguanensis*)

和苹果(*Malus pumila* Mill.)扦插生根试验中也均得出了类似的结论。宋金耀等还认为山海关杨易生根及生根早的可能原因是 POD 酶活性高峰来得早。本实验结果表明红叶石楠在添加有 E 物质的 M2 培养基上,其 POD 活性的第 1 个高峰出现转接后的第 2 d;而在未添加 E 物质的 W3 培养基上,POD 活性的第 1 个高峰出现在第 5 d,这与 PACHECO,宋金耀等前人所得的结论一致。

IAAO 为分解吲哚乙酸(IAA)的专一性酶,其利用 O_2 而非 H_2O_2 对 IAA 进行氧化作用。李明等^[13]在对不同桉树扦插生根实验中发现,较难生根的桉树品种的 IAAO 活性比易生根桉树要高得多。其认为难生根桉树体内 IAAO 活性高,降解 IAA 的作用强,IAA 被破坏较多,致使茎基部的 IAA 含量少,对诱导生根不利,相反,易生根桉树体内 IAAO 活性低,茎基部的 IAA 较多,对诱导根原基的形成有利。BASAK 等^[18]在分析红树林几个种诱导生根时发现,IAAO 氧化酶活性低有利于 *Bruguiera parviflora* 和 *Thespesia populnea* 树种的生根。红叶石楠无根苗在 W3 培养基上的 IAAO 活性开始显著高于 M2 培养基上的 IAAO 活性,这一点与李明,BASAK 等前人的结果一致。另外有研究还发现,IAAO 具有 POD 特性,能降解 IAA,调节植物体内的 IAA 水平,从而影响植物的生根。

PPO 是一种含铜的能催化各种酚类氧化的酶,与 IAAO 被用作木质素合成的标志。PPO 的一个重要作用是催化酚类物质与 IAA 缩合形成一种“IAA-酚酸复合物”,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^[19]。FOONG 等^[20]发现,在易生根的 *Rhododendron ponticum* 体内的 PPO 活性较高,而在难生根的“*R. Jan Dekens*”中 PPO 活性就要低得多。李明等^[13]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。另外, MOLNAR^[21], BHATTACHARYA^[22], BASAK 等^[18]也证明了在 *Hydrangen macrophylla*, *Bruguiera parviflora* 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。本试验的结果也表明,红叶石楠在添加有 E 物质的 M2 培养基上其 PPO 活性较高;而在未添加 E 物质的 W3 培养基上酶活性要低得多。可见本试验结果同样支持了前人的观点。同时也表明,PPO 的

存在及其活性的大小对不定根的形成具有十分重要的意义。

红叶石楠无根苗在有无 E 物质的生根培养基上培养过程中发现,茎段的 POD,IAAO 及 PPO 活性存在很大的差异。在添加 E 物质的生根培养基上,酶活性均表现为易生根的变化规律,而在未添加 E 物质上的培养基上,酶活性均表现为难生根的变化趋势。本试验以红叶石楠组培苗为研究材料,其结果与前人大体相符,同时为揭示红叶石楠组培苗的生根机理提供了一定的科学依据。

E 物质与生长素协同作用促进红叶石楠组培苗生根,其作用机理仍是一个值得深入研究和探讨的问题。特别是 E 物质是否对其它植物的生根具有同样的促进作用,即是否具有普遍促根效应,也有待于进一步的深入研究和探讨。

[参考文献]

- [1] 肖尊安,熊红.不定根发生机理的研究进展[J].生物技术通报,2002,(3):31-34.
- [2] DEVI S R, PRASAD M N V. Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings implication in growth [J]. Biol Plant, 1996, 38(3): 387-395.
- [3] FRENKEL C, HESS C E. Isozymic changes in relation to root initiation in mung bean [J]. Can J Bot, 1973, 52:295-297.
- [4] 孙浩元,续九如.金丝小枣扦插繁殖及其生理机制研究[J].果树学报,2001,18(6):333-336.
- [5] 王任翔,高成伟,秦新民,等.两种木本植物离体培养根分化研究—过氧化物酶同工酶与内源 IAA 及根分化的关系[J].广西师范大学学报,2000,18(4):71-73.
- [6] 郑国昌.生物显微技术[M].北京:人民教育出版社,1979.
- [7] 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.
- [8] ARCHER M C, PALNER J K. An experiment in enzyme characterization: Bona polyphenol oxidase [J]. Biochem Educ, 1975, 3(3): 50-52.
- [9] 张志良.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,1990.
- [10] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社,1986.
- [11] GASPAR T, PENEL C, THORPE J, et al. Peroxidase [M]. Universite' de Geneve' Centre de Botanique,

- Geneve, 1982.
- [12] PACHECO P, CALDERON B X V, VEGA A. Flavonoids as regulators and markers of root formation by shoots of *Eucalyptus globulus* raised in vitro [J]. *Plant Perox News Lett*, 1995, 5: 9 - 12.
- [13] 李明, 黄卓烈, 谭绍满, 等. 难易生根桉树多酚氧化酶、吡啶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.
- [14] MONCOUSIN C H. Peroxidase as a marker for rooting improvement of colnes of *Vitis* cultured in Vitro. H Greppin, C Penel, Th Gaspar. *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases* [C]. Geneva; University of Genva, 1986, 378 - 385.
- [15] CALDERON B X V. Changes in Peroxidase activity during root formation by *Eucalyptus globulus* shoots raised in vitro [J]. *Plant Perox News Lett*, 1994, 4: 27 - 29.
- [16] 宋金耀, 何文林, 杜玉虎, 等. 山海关杨扦插生根过程中几种生理生化指标的变化 [J]. *河北职业技术学院学报*, 2001, 15(3): 5 - 8.
- [17] 马锋旺, 李嘉瑞. 苹果新梢离体不定根形成期间某些生理变化的研究 [J]. *西北农业学报*, 1995, 4(1): 80 - 83.
- [18] BASAK U C, DAS A B, DAS P. Metabolic changes during rooting in stem cuttings of five mangrove species [J]. *Plant Growth Regulation*, 1995, 17: 141 - 148.
- [19] HAISSIG B E. Influence of auxins and synergists on adventitious root prim ordium in initiation and development [J]. *New Zealand J For Sci*, 1974, 4: 311 - 323.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.

=====

(上接第 296 页)

- [6] CALIGARI P D S, POWELL W, LIDDELL W, et al. . Methods and strategies for detecting *Solanum tuberosum* dihaploids in interspecific crosses with *S. phureja* [J]. *Ann. Appl. Biol.*, 1988, 112: 323 - 328.
- [7] 吕文河, 李景华. 自马铃薯二倍体栽培种 (*Solanum phureja*) 自交后代中选育诱发高频率双单倍体授粉者的研究 [J]. *马铃薯杂志*, 1987, (1): 2 - 8.
- [8] HERMSEN J G T, VERDENIUS J. Selection from *Solanum tuberosum* group *Phureja* of genotypes combining high frequency haploid induction with homozygosity for embryo-spot [J]. *Euphytica*, 1973, 22: 244 - 259.
- [9] HOUGAS R W, PELOQUIN S J, GABERT A C. Effect of seed-parent and pollinator on frequency of haploids in *Solanum tuberosum* [J]. *Crop Science*, 1964, 4: 593 - 595.