

青花菜组培中过氧化物酶及吲哚乙酸氧化酶与形态发生的关系

杨 艳 丽

(北京蔬菜研究中心, 北京 100081)

摘 要

青花菜在脱分化及分化过程中其过氧化物酶活性升高; 脱分化培养的第12天该酶活性的大幅度增加与愈伤组织的明显发生相对应; 分化培养的第21天该酶活性的大幅度增加与真正的芽发生相关。脱分化时过氧化物酶同工酶的c带、e带发生在愈伤组织产生以前, 可能是脱分化的原因; 分化时c带在芽点出现以前的重新出现可能与分化的启动有关。在脱分化过程中吲哚乙酸氧化酶活性略有升高; 在分化过程中该酶活性基本保持稳定。

关键词 青花菜 过氧化物酶同工酶 吲哚乙酸氧化酶 脱分化 分化

引 言

青花菜 (*Brassica oleracea* var. *italica*) 亦称为绿菜花, 茎椰菜, 为甘蓝类的一个变种, 是一种主要的西洋蔬菜。它不但风味好, 而且营养价值很高〔4〕, 但由于我国目前生产用种主要是从国外进口的F₁代种子, 从而限制了它的生产及市场供应, 因而对其进行理论及应用研究很有意义。

近40年的研究已经表明, 过氧化物酶与生长的抑制及分生活力的启动有关〔9〕。自从Galston (1967) 最早用烟草髓诱导的愈伤组织研究分化与过氧化物酶的关系以来, Bajaj (1973)、Thorpe (1978)、Ravial (1982) 等人根据各自的研究认为, 过氧化物酶同工酶的变化发生在形态变化之前, 不同的分化状态变化不同, 可以作为分化的指标。崔澂〔1〕则认为, 过氧化物酶同工酶的变化可能与分化无直接关系。可见, 虽然对过氧化物酶的研究很多, 但对它是否可以作为分化的指标意见并不一致。而且还有人认为〔7〕, 过氧化物酶同工酶反映组织降解吲哚乙酸的能力。吲哚乙酸氧化酶是植物体内普遍存在的一种酶, 它的含量或活性与植物组织内的吲哚乙酸含量及过氧化物酶活性密切相关。

本文以青花菜为材料, 探讨过氧化物酶活性、过氧化物酶同工酶以及吲哚乙酸氧化酶活

性在外植体脱分化及愈伤组织分化过程中的变化及其作用, 从而为青花菜的快速繁殖和理论研究提供依据。

材料和方法

一、试验材料

所用品种为日本进口的“绿岭”(Green valient)。花蕾及叶片取自田间的植株。将花蕾及叶片经75%乙醇和3%的过氧乙酸分别消毒1分钟和3分钟, 再用无菌水冲洗3遍后, 剪下花柄(紧接花蕾处5mm)及叶片(5mm的方块), 接种在B₅培养基上, 附加KT1.0

(mg/L), 2, 4-D 0.25, 蔗糖2%, 琼脂粉6.5‰的培养基上。诱导愈伤组织芽分化的培养基为MS基本培养基, 附加NAA 0.2, 6-BA 4.0, 蔗糖3%, 琼脂粉6.5‰。

二、酶液的制备

用4倍于材料体积的稀释4倍的浓缩胶缓冲液(pH 6.1)将外植体或愈伤组织(10块以上)在冰浴中研磨细, 在10000rpm下离心10分钟, 上清液即为酶液。

三、过氧化物酶活性的测定

在光径为1cm的比色杯中加入3ml反应混合液(50ml 0.2M 磷酸缓冲液pH6.0 + 0.028ml 30%过氧化氢 + 0.019ml愈创木酚)及一定量的酶液, 用提取缓冲液将反应体系的总体积补至4ml, 以pH6.0的0.1M的磷酸缓冲液作为校零对照, 于岛津UV-240分光光度计上测定470nm波长下反应3分钟或2.5分钟的光密度变化值。

四、过氧化物酶同工酶的电泳分离、染色及相对泳动率计算

过氧化物酶同工酶的分离, 采用垂直板不连续系统的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离胶和浓缩胶缓冲液的pH分别为8.9和6.8。分离胶和浓缩胶的浓度分别为7.5%和3.0%, 点样酶液为上述酶液与40%蔗糖溶液的等体积混合液。每槽加样30μl, 先以7mA恒流电泳, 待溴酚兰指示剂进入分离胶时, 再将电流加大到13mA, 电泳时间约为4小时。同工酶的染色, 采用醋酸联苯胺法。同工酶的相对泳动率计算, 参照Kuhus介绍的方法, 即 $R_f = \text{酶带迁移距离} / \text{溴酚兰迁移距离}$ 。

五、吲哚乙酸氧化酶活性的测定

反应体系为1ml 10^{-3} M 二氯化锰 + 1ml 10^{-3} M 2, 4-二氯酚 + 2ml 10^{-3} M 吲哚乙酸 + 5ml 0.02M 磷酸缓冲液pH6.0 + 1ml 酶稀释液, 在25~28℃恒温水浴中保温30分钟, 然后取此反应液2ml, 加入4ml B试剂(50ml 35%过氯酸 + 1ml 0.5M 三氯化铁), 于45~50℃恒温箱中保温30分钟以上, 而后于岛津UV-240分光光度计上测定530nm波长下的OD值, 以第一次反应中加入1ml提取缓冲液代替酶液, 2ml蒸馏水代替吲哚乙酸的反应体系作为校零对照。

结果和分析

一、花柄脱分化成愈伤组织、叶片愈伤组织分化出芽过程中过氧化物酶活性的变化

对花柄培养不同时间过氧化物酶活性的测定结果如表1。由表1可以看出, 在花柄脱分化过程中, 过氧化物酶活性增强。在培养的第12天, 酶活性有一大幅度的升高, 是第9天的

2.3倍。接种前的花柄比培养3到9天的酶活性大。

表1 花柄脱分化过程中过氧化物酶活性的变化

材 料	$\Delta OD/3$ 分钟
培养前的花柄 (对照)	0.577
培养3天的花柄 (花柄已膨大)	0.273
培养6天的花柄	0.447
培养9天的花柄	0.559
培养12天的花柄 (愈伤组织已明显发生)	1.260
培养15天的花柄	1.712
培养17天的花柄	1.773
继2代的愈伤组织	1.776

注: 结果为三次重复的平均值 (下同)

将继代若干次的叶片愈伤组织转移至分化培养基后, 测定不同分化阶段愈伤组织的过氧化物酶活性, 结果如表2。由表2可以看出: 愈伤组织在分化过程中过氧化物酶活性增加。在分化培养的第21天酶活性增加较大, 是第18天的1.6倍, 但在愈伤组织转移前过氧化物酶活性比转移后18天的大。

表2 愈伤组织分化过程中过氧化物酶活性的变化

材 料	$\Delta OD/2.5$ 分钟
分化培养前的愈伤组织 (乳黄色、较致密)	0.650
分化培养第3天的愈伤组织	0.349
分化培养第6天的愈伤组织 (愈伤组织变绿)	0.431
分化培养第9天的愈伤组织	0.494
分化培养第12天的愈伤组织	0.515
分化培养第15天的愈伤组织 (有深绿色的芽点出现)	0.539
分化培养第18天的愈伤组织	0.597
分化培养第21天的愈伤组织 (芽长出)	0.937
分化培养第24天的愈伤组织 (小叶展开)	1.013

二、花柄脱分化成愈伤组织、愈伤组织分化出芽过程中过氧化物酶同工酶谱的变化

对这两个过程中的酶提取液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结果如图1、图2。由图1可以看出, 花柄在脱分化培养的第9天b带出现, 培养的第12天c带、e带消失, h带、i带在培养开始后一直存在。由图2可以看出, 愈伤组织在分化培养的第18天b带消失, c带在第6天、e带在第18天时又重新出现。

三、花柄脱分化成愈伤组织、愈伤组织分化出芽过程中吲哚乙酸氧化酶活性的变化

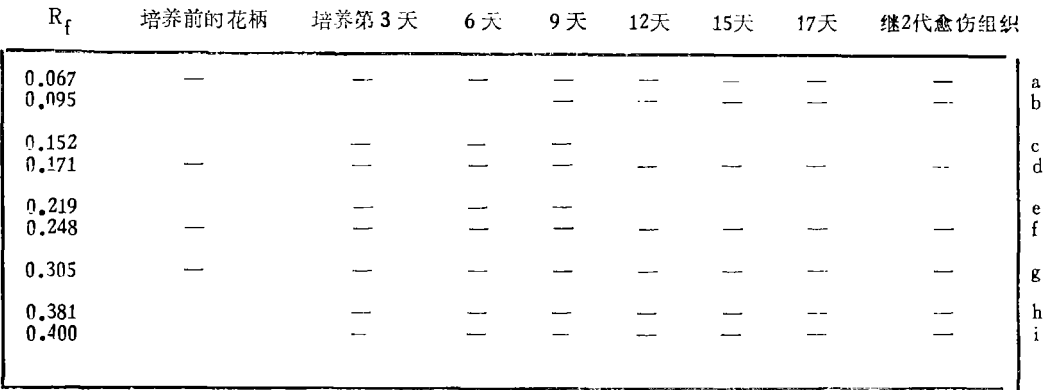


图1 花柄脱分化过程中过氧化物酶同工酶的变化（电泳模式图）

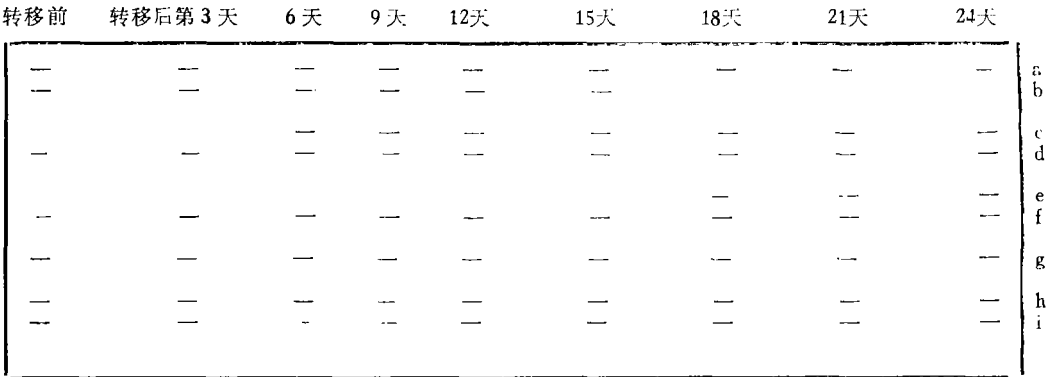


图2 愈伤组织分化过程中过氧化物酶同工酶的变化

在这两个过程中吲哚乙酸氧化酶活性的测定结果如表3、表4。由表3、表4可以看出，花柄脱分化过程中吲哚乙酸氧化酶活性总的来说有增大的趋势。愈伤组织分化出芽过程中，该酶活性基本保持稳定。

表3 花柄脱分化过程中吲哚乙酸氧化酶活性的变化

花柄培养天数	0	3	6	9	12	15	17	继2代愈伤组织
花柄分解的IAA μ g/50 μ l \cdot 30分钟	22.03	22.72	26.68	26.39	31.11	31.55	31.35	31.19

表4 愈伤组织分化过程中吲哚乙酸氧化酶活性的变化

培养天数	0	3	6	9	12	15	18	21	24
愈伤组织分解的IAA μ g数/50 μ l \cdot 30分	24.64	23.13	25.62	25.73	26.82	27.78	27.63	27.47	27.56

讨 论

一、过氧化物酶及其同工酶与青花菜形态发生的关系

本研究对过氧化物酶活性的测定结果与Thorpe〔10〕在烟草、Kochba〔8〕在柑桔、王亚馥〔2〕在枸杞、柯善强〔3〕在油菜中的测定结果基本一致。我们认为花柄接种到脱分化培养基上12天以前该酶活性比接种前低,可能是由花柄吸水膨大导致的单位体积干物质含量降低引起的。在脱分化培养的第12天,该酶活性突然大幅度增加正好与愈伤组织的大量发生相对应,而且对经过继代生长15天左右的愈伤组织过氧化物酶活性测定结果表明,继代后的愈伤组织过氧化物酶活性与继代前一致。这表明生长旺盛的愈伤组织过氧化物酶活性有一定的稳定性,这也与继代后的过氧化物酶同工酶谱表现一致。将愈伤组织转移到分化培养基上后,愈伤组织过氧化物酶活性的降低可能是由于培养基因素使得愈伤组织暂时的生活力降低引起的。在分化培养到第21天时,酶活性的大幅度增加与真正的芽发生相关。

对于脱分化过程中过氧化物酶活性的升高,Galston (1969)提出是由于损伤使合成该酶的基因去抑制的结果;Ridge (1970)也认为机械切割可使该酶合成的抑制物渗漏;Thorpe (1980)根据对烟草的研究提出,过氧化物酶活性的升高不一定是脱分化过程自身的反应。在我们的实验结果中可以看出,过氧化物酶活性与一定的形态发生密切相关。因而认为,它在脱分化及分化过程中的作用并不是消极的。它在愈伤组织继代前后的稳定性提醒我们,过氧化物酶有可能作为判断愈伤组织生活力的一个指标。

关于过氧化物酶同工酶谱的变化与形态发生的关系,一些作者在烟草、柑桔、豌豆等的研究中都曾作过分析。他们认为这些变化反映了发育过程中相应的基因在时间和空间上的顺序表达,并证实了这种酶可作为植物对外界刺激反应的标记。从本实验的结果可以看出,在花柄脱分化过程中,c带、e带发生在愈伤组织形成以前,而在愈伤组织开始形成后又消失。这种形态变化之前的同工酶的变化使我们想到它可能作为脱分化的灵敏指标,它们在尔后的消失表明,很可能该同工酶只是与脱分化的启动有关。b带发生在愈伤组织形成以后,推测它更可能是脱分化的结果。h带、i带在接种以后就一直存在,它们有可能是外植体对培养基中激素等因素的反应或者由机械切割引起的。在愈伤组织分化出芽的过程中,c带发生在愈伤组织明显变绿后,芽分化出以前,它可能作为分化的指标。e带发生在芽点分化出以后,可能是分化的结果。b带的消失可能是由于整个愈伤组织块中愈伤组织薄壁细胞所占比例相对减少的缘故,因为在芽形成以前,愈伤组织中就已经有旺盛的维管组织在活动。

虽然本试验研究脱分化与分化所用材料的来源不同,不能比较这两个过程中过氧化物酶的活性大小。但试验结果表明,在这两个过程中过氧化物酶同工酶谱的变化很有规律,即脱分化过程中酶带减少,分化过程中酶带增多,而且脱分化过程减少的带正是分化过程增加的带,也就是脱分化培养3天的花柄与已有芽发生的愈伤组织的酶带完全相同,是在青花菜中过氧化物酶同工酶的组织特异性差还是完全无组织特异性,还有待于进一步研究。

二、吲哚乙酸氧化酶在青花菜形态发生中的意义

早在1979年, 张静兰、徐桂芳等〔5〕通过对吲哚乙酸、吲哚乙酸氧化酶和几种愈伤组织生长关系的研究已经发现, 愈伤组织内的吲哚乙酸氧化酶除了破坏愈伤组织吸收的吲哚乙酸外, 在一定的条件下, 还可以破坏外源的吲哚乙酸。破坏的程度与各种愈伤组织的吲哚乙酸氧化酶活性有关。而且认为有些植物的愈伤组织在含吲哚乙酸的培养基上生长的好坏与它所含的吲哚乙酸氧化酶活性有密切的关系。吲哚乙酸氧化酶的活性若高, 它破坏培养基中的吲哚乙酸就快, 愈伤组织的生长速度则慢, 而且持续时间也短。反之, 吲哚乙酸氧化酶的活性若低, 它破坏培养基中的吲哚乙酸就慢, 愈伤组织的生长速度则快, 持续时间也长。徐桂芳等〔6〕也曾对愈伤组织中吲哚乙酸氧化酶和过氧化物酶的关系进行过研究, 结果没有发现二者之间直接的相关性。到目前为止, 对植物组织中吲哚乙酸氧化酶的研究还很少, 还没有见到研究脱分化及分化与吲哚乙酸氧化酶关系的报道。本试验研究这两个过程的培养基中都不含吲哚乙酸, 那么, 外植体或愈伤组织中吲哚乙酸氧化酶的作用在于分解组织内的吲哚乙酸。本研究曾用高效液相色谱测定这两个过程中吲哚乙酸含量的变化, 结果表明这两个过程中吲哚乙酸含量保持稳定, 都很低。从而可以推测, 脱分化过程本身可能合成吲哚乙酸的能力略有升高; 分化过程合成吲哚乙酸的能力保持稳定。本文的结果首次发现吲哚乙酸氧化酶与脱分化及分化的相关性, 但未发现过氧化物酶与吲哚乙酸氧化酶之间的相关性, 这可能是由于二者之间虽然有一定的关系, 但是因为过氧化物酶还具有其它的生理功能, 二者的活性不一定简单地呈正相关或负相关。

参 考 文 献

- 〔1〕 崔淼: 山新杨器官分化激素调节及过氧化物酶同工酶的变化, 《植物学集刊》, 第一集, 1983: 143—147
- 〔2〕 王亚酸等: 枸杞组织培养中过氧化物酶和可溶性蛋白质的变化, 《实验生物学报》, 22 (1) 1939: 1—7
- 〔3〕 柯善强, 陈海芸等: 裂叶悬钩子组织培养研究II: 叶外直体培养不定芽发生过程中过氧化物酶同工酶的变化, 《武汉植物研究》, 7 (1) 1939: 59—64
- 〔4〕 李曙轩, 刘维姑: 《青花菜的栽培生理》, 浙江农业大学出版社, 1936: 4—5
- 〔5〕 张静兰, 徐桂芳等: 吲哚乙酸、吲哚乙酸氧化酶和几种愈伤组织生长的关系, 《植物生理学报》, 5 (3) 1979: 193—198
- 〔6〕 徐桂芳: 四种愈伤组织中吲哚乙酸氧化酶和过氧化物酶的活性与同工酶的关系, 《植物学报》, 25 (6) 1983: 552—557
- 〔7〕 Galston, A. W. and P. J. Davies: Hormonal regulation in higher plants, *Plant Science*, 16 (3) 1969: 1283—1297
- 〔8〕 Kochba: Differences in peroxidase activity and isozymes in embryogenic 'shamouti' range ovalar callus lines, *Plant Cell Physiol.*, 18 (1) 1977: 463—467
- 〔9〕 Leu Ellen Kay, et al: Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis, *Plant Physiol.*, 84 (2) 1937: 99—105
- 〔10〕 Thorpe, T. A.: Perspectives in plant cell and tissue culture, Ed. I. K. Vasil, Academic Press, New York, 1980: 71—111

Peroxidase and IAA-Oxidase on Morphogenesis of *Brassica oleracea* var. *italic*

Yang Yanli

(*Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100081*)

Abstract

The peroxidase activity increases during the processes of both dedifferentiation and differentiation of *Brassica oleracea* var. *italic*. The emergence of calli 12 days after the initiation of dedifferentiation culture, coincides with the abrupt increase of the enzyme activity. The appearance of buds 21 days after the initiation of differentiation on culture is accompanied by an apparent increase of peroxidase activity. The isoperoxidase band c and band c appear before the callus, indicating that they must be part of the reason for dedifferentiation. The reappearance of band c before the emergence of buds indicates that it must be related to the trigger-on of differentiation. The IAA-oxidase activity increases during dedifferentiation, but shows no significant changes during differentiation.

Key words: *Brassica oleracea* var. *italic*; Peroxidase; Isoperoxidase; IAA-oxidase; Differentiation; Dedifferentiation