植物学通报 2001，18（4）：496～499
Chinese Bulletin of Botany

甘露醇对小麦细胞 IAA 氧化酶、过氧化物酶及 GST 活性的影响①

[1]廖祥儒 [1]杜建芳 [2]芦春斌 [1]周艳芬 [1]王建平

[1]（河北大学生命科学学院 保定 071002）
[2]（暨南大学生殖免疫中心 广州 510632）

摘要 研究了 16 g/L 甘露醇处理对小麦细胞再分化、细胞 IAA 氧化酶、IAA 过氧化物酶、谷胱甘肽转移酶和过氧化物酶活性的影响。结果表明，甘露醇处理使小麦细胞再生能力明显降低，引起细胞蛋白质含量、IAA 过氧化物酶和 GST 活性明显降低，但使细胞 IAA 氧化酶和 POD 活性明显增高。

关键词 IAA 氧化，过氧化物酶，谷胱甘肽转移酶，细胞再分化，小麦

The Effects of Mannitol on the Activity of Indole Acetic Acid Oxidase, Peroxidase and Glutathione S-transferase in Cells of Wheat

[1] LIAO Xiang-Ru [1]DU Jian-Fang [2] LU Chun-Bin [1] ZHOU Yan-Fen [1] WANG Jian-Ping

[1]（*College of Life Science*, *Hebei University*, Baoding 071002）
[2]（*Center for Reproductive Immunology Research*, *Jinan University*, Guangzhou 510632）

Abstract The effects of mannitol on cell redifferentiation and activities of indole acetic acid oxidase and peroxidase, glutathione S-transferase, and peroxidase in cells of wheat were investigated. The results showed that 16 g/L mannitol reduced the capacity of wheat cell redifferentiation, decreased the soluble protein content and the activity of indole acetic acid peroxidase and glutathione S-transferase, enhanced the activity of indole acetic acid oxidase and peroxidase.

Key words Oxidation of indole acetic acid, Peroxidase, Glutathione S-transferase, Cell redifferentiation, Wheat

组织培养细胞的状态受环境中光、温、水分状态、营养等多种因素的影响，其中水分的减少是细胞生理状态变差的重要原因之一。小麦是最重要的粮食作物之一，小麦组织培养细胞易老化是限制小麦细胞基因转化的主要原因（陈英等，1992；Chin and Scott，1997；Maheshwari *et al*，1995）。前人已采用过小麦的根、茎、叶、幼穗、幼胚和成熟胚等为外植体，研究了其愈伤组织细胞的分化再生情况，发现幼穗和幼胚愈伤组织具有较高的再分化能力（Maheshwari *et al*，1995），但对组织培养过程中，细胞状态变化机制的研究较少。已知甘露醇处理能够改善水稻细胞生理状态，这种变化与内源 IAA 含量的变化相关（陈以峰等，1998）。IAA 氧化酶、IAA 过氧化物酶是参与 IAA 降解的主要酶类，而过氧化物酶（POD）和谷胱甘肽转移酶（GST）也是可被 IAA 调节表达的两种酶，但甘露醇处理对它们的影响还不清楚。本文以小麦愈伤组织为材料研究了甘露醇对细胞 IAA 氧化、POD 和 GST 活性的影响。

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t20-114

① 河北省教委博士基金与河北大学自然科学基金资助项目
作者简介：廖祥儒，1964 年生，男，江西南康人，博士，副研究员，主要从事植物发育的分子生物学及基因工程研究。
收稿日期：2000-08-21 接受日期：2000-11-01 责任编辑：刘 晖

1　材料与方法

1.1　实验材料

小麦(*Triticum aestivum*)‘冀麦 36’种子由河北农业大学种子中心提供，种植于河北大学校内实验区。在幼穗长度为 0.5～1.0 cm 时，从基部剪取小麦苗，在 0～4 ℃条件下处理 24 h。经 70%的酒精表面消毒后剥取幼穗，接种于 MSY 固体培养基(MS 附加 KT 0.5 mg/L，2,4-D 2 mg/L，水解酪蛋白 500 mg/L，蔗糖 30 g/L，琼脂 8 g/L)上诱导愈伤组织。将愈伤组织转至除去蔗糖但附加甘露醇(16 g/L)的 MSY，培养基上暗处理分别作为对照(CK)和甘露醇处理。并分期取样检测或接入再生培养基(MS 附加 KT 6.0 mg/L，蔗糖 30 g/L，琼脂 8 g/L)中检测再生情况。

1.2　酶活测定

各取愈伤组织 200 mg，在冰浴条件下用 50 mmol/L Tris-HCl(pH 6.8)研磨，匀浆经 12 000× *g*，4℃离心 20 min，取上清液备用。

酶活性在 30℃条件下测定。IAA 氧化酶反应液组成和终浓度分别为：IAA 0.8 mmol/L，间苯二酚 0.5 mmol/L，$MnSO_4$ 0.5 mmol/L，醋酸缓冲液 25 mmol/L(pH 4.5)，反应液总体积为 1ml。反应 60 min 后加 Salkowski 试剂显色，在 530 nm 下测定其消光值(OD)以计算反应前后 OD 值的变化(△OD)，用每小时每 mg 蛋白质的酶液引起 1 个 OD 值的变化表示 1 个酶活单位(U)。IAA 过氧化物酶反应液组成为：IAA 0.8 mmol/L，H_2O_2 1 mmol/L，缓冲液和测定方法同 IAA 氧化酶(Converso and Fernandez，1995)。GST 活性用 CDNB 法进行测定(廖祥儒等，2000)，反应液为：1 mmol/L CDNB，0.1 mmol/L GSH，50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.5)，1 mmol/L EDTA。用愈创木酚法测定 POD 活性(Amako *et al*，1994)。蛋白质含量用考马斯亮蓝法测定(Bradford，1976)。

2　实验结果

2.1　甘露醇对小麦细胞再分化的影响

甘露醇处理使‘冀麦 36’细胞再生能力明显降低，其中在处理 6 d 时其再生能力仅为对照的 49.2%(表 1)。

表 1　甘露醇对小麦‘冀麦 36’细胞再分化频率的影响

Table 1　Effect of mannitol on redifferentiation frequency of wheat‘Jimai 36’calli

Treatment	Redifferentiation frequency (%)	Relative frequency (%)
CK	25.4±6.6	100
Mannitol (16g/L)	12.5±4.3	49.2

2.2　甘露醇对小麦细胞蛋白质含量的影响

在刚接入培养基的 4 d 内，‘冀麦 36’细胞可溶蛋白质含量基本呈上升趋势(图 2)，4 d 后蛋白质含量持续下降；甘露醇处理使细胞蛋白质含量明显降低。

2.3　甘露醇对小麦细胞 IAA 过氧化物酶活性的影响

http://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTotal-ZWXB200104724/CBB-t20-114

在组织培养的 8 d 内，随着培养时间的延长‘冀麦 36’细胞 IAA 过氧化物酶活性呈下降趋势(图 2)；在 6 d 内甘露醇处理 IAA 过氧化物酶活性明显低于对照，但在 6 d 后两者

无明显差别。

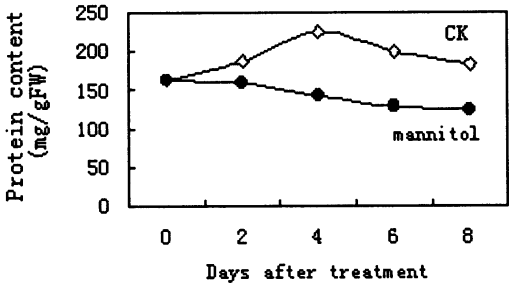


图 1 甘露醇处理对小麦细胞可溶性蛋白质含量的影响

Fig. 1 Effect of mannitol on the content of soluble protein in cells of wheat

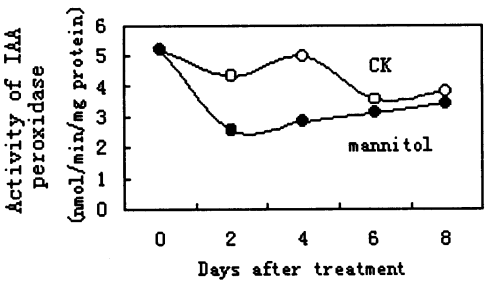


图 2 甘露醇处理对小麦细胞 IAA 过氧化物酶活性的影响

Fig. 2 Effect of mannitol on the activity of indole acetic acid peroxidase in cells of wheat

2.4 甘露醇对小麦细胞 IAA 氧化酶活性的影响

在组织培养的 8 d 内，‘冀麦 36’细胞 IAA 氧化酶活性较为稳定(图 3)，但甘露醇处理其 IAA 氧化酶活性呈上升趋势，并在 2 d 后明显高于对照。

2.5 甘露醇对小麦细胞 GST 活性的影响

在组织培养的 8 d 内，‘冀麦 36’细胞 GST 活性呈上升趋势(图 4)，但甘露醇处理 4 d 后 GST 活性逐渐降低并明显低于对照。

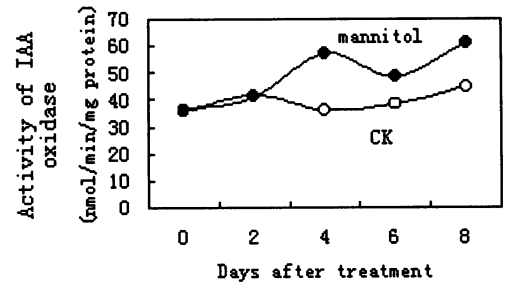


图 3 甘露醇处理对小麦细胞 IAA 氧化酶活性的影响

Fig. 3 Effect of mannitol on the activity of indole acetic acid oxidase in cells of wheat

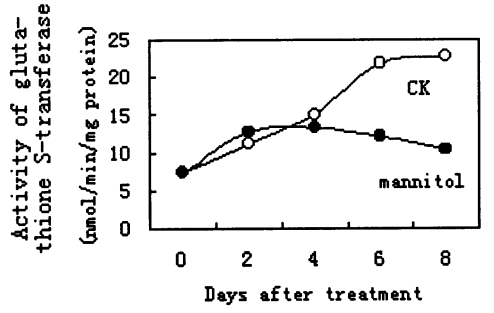


图 4 甘露醇处理对小麦细胞谷胱甘肽转移酶活性的影响

Fig. 4 Effect of mannitol on the activity of glutathione S-transferase in cells of wheat

2.6 甘露醇对小麦细胞 POD 活性的影响

在组织培养的 8 d 内，‘冀麦 36’细胞过氧化物酶活性较为稳定(图 5)，甘露醇处理使其 POD 显著上升。其中在 4 d 以后甘露醇处理细胞的 POD 活性可达到对照的两倍以上。

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t20-114

3　讨论

水分胁迫影响植物的多种代谢或生理过程(廖祥儒等,1999),其中活性氧的产生是引起植物受害的主要原因之一(Zhang and Kirkham,1996),但在轻度胁迫诱导下植物细胞也能合成 ABA 或提高其抗氧化能力(廖祥儒和朱新产,1997)、产生对水分胁迫的适应。我们的结果表明,16g/L 的甘露醇处理使冀麦 36 细胞再分化能力明显降低($P < 0.01$),这种变化与细胞可溶性蛋白质含量、GST 活性的下降相一致,但与其 IAA 氧化酶和 POD 活性的变化相反。已知一部分 POD 即具有 IAA 氧化酶的活性(Chibbar and Van Huystee, 1984)而 IAA 的降解主要由 IAA 氧化酶催化。另外,GST 的重要作用之一就是参与 IAA 等物质的运输(廖祥儒等,1996)。因此 IAA 的氧化所引起的 IAA 含量的降低或 IAA 运输速率的下降可能是细胞再生能力衰退的原因之一,这与陈以峰等认为内源 IAA 含量的增加促进体胚发生的观点基本一致(陈以峰等,1998),但与我们用 $AgNO_3$ 处理的结果不同(廖祥儒等,2000)。至于不同浓度甘露醇对小麦细胞再分化有何影响、参与甘露醇作用的具体酶的分子生物学特征如何,都还待深入研究。

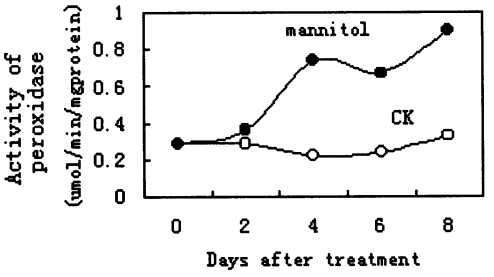


图 5　甘露醇处理对小麦细胞过氧化物酶活性的影响

Fig. 5　Effect of mannitol on the activity of peroxidase in cells of wheat

参 考 文 献

陈以峰,周燮,汤日圣,张金渝,梅传生,1998. 水稻体细胞培养中胚性细胞出现与 IAA 的关系. 植物学报,**40**: 474 ~ 477

陈英,李向辉,孙勇如,1992. 植物细胞培养与遗传操作. 长沙:湖南科学技术出版社,254 ~ 263

廖祥儒,王越,宋陆铧,王俊丽,杜建芳,陈丕铃,2000. 渗透胁迫对小麦愈伤组织 GST 活性的影响. 河北大学学报(自然科学版),**20**(2):148 ~ 150

廖祥儒,张会图,杜建芳,宋陆铧,王俊丽,陈丕铃,朱宝成,2000. 甘露醇和 $AgNO_3$ 对小麦细胞再分化的影响. 河北大学学报(自然科学版),**20**(3):263 ~ 265

廖祥儒,朱新产,1997. 种子引发提高小麦抗渗透胁迫能力的效应. 植物学通报,**14**:36 ~ 40

廖祥儒,杜建芳,王俊霞,王俊丽,宋陆铧,陈丕铃,朱宝成,1999. 预处理对小麦成熟胚愈伤组织形成的影响. 河北大学学报(自然科学版),**19**:41 ~ 44

廖祥儒,万怡震,朱新产,1996. 植物谷胱甘肽转移酶. 生命的化学,**16**(6):22 ~ 24

Amako K, Chen G X, Asada K, 1994. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiol*, **35**:497 ~ 504

Bradford M M,1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilyzing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**:248 ~ 254

Chibbar R N, Van Huystee R B, 1984. Characterization of peroxidase in plant cells. *Plant Physiol*, **75**: 956 ~ 958

Chin J C, Scott K J,1997. Studies on the formation of roots and shoots in wheat callus cultures. *Ann Bot*, **41**:473 ~ 477

Converso D A, Fernandez M E, 1995. Peroxidase isozymes from wheat germ: purification and properties. *Phytochemistry*, **40**: 1341 ~ 1345

Maheshwari N, Rajyalakshmi K, Baweja K, Dhir S K, Chowdhary C N, Maheshwari S C, 1995. *In vitro* culture of wheat and genetic transformation: Retrospect and prospect. *Critical Review Plant Sci*, **14**: 149 ~ 178

Zhang J X, Kirkham M B, 1996. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytol*, **132**: 361 ~ 373

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t20-114