

湖北海棠阶段转变过程中几种同工酶变化研究^①

1 张才喜 2 李载龙 2 陈大明

¹(上海交通大学植物科学系 上海 201101)

²(浙江大学园艺系 杭州 310029)

摘要 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法,研究了湖北海棠 1 年生实生苗(S_1)、4 年生(S_4)、14 年生(S_{14})实生树及 4 年生成年芽嫁接树(G_4)不同高度叶片的过氧化物酶(POX)、细胞色素氧化酶(COD)、酯酶(EST)、乙醇脱氢酶(ADH)同工酶的变化。结果表明:多年生实生树随着高度的增加,POX Rf 0.56、0.60, COD Rf 0.50, EST Rf 0.09、0.15、0.75、0.77, ADH Rf 0.76 等几条酶带呈现差异,出现了童区和成年区各自特有的同工酶带,随高度变化童区特征酶带消失或成年区特征酶带出现的高度均保持在 150 ~ 200 cm 之间,同当年植株开花最低位置相同, S_4 、 S_{14} 童区与 S_1 同工酶谱带完全一致, S_4 、 S_{14} 成年区与 G_4 同工酶谱带基本保持一致, G_4 同工酶谱并未随高度增加而发生变化。四种同工酶可以作为阶段转变的指标。 S_4 、 S_{14} 童区与成年区谱带的差异是高度的结果,高度是湖北海棠阶段转变的重要因子。

关键词 湖北海棠,实生苗,阶段转变,同工酶

Dynamic of Several Isozymes of *Malus hupenhensis* in Phase Change

¹ZHANG Cai-Xi ²LI Zai-Long ²CHEN Da-Ming

¹(Department of Plant Science, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101)

²(Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract The height-associated dynamics of isozymes of peroxidase (POX), esterase (EST), cytochrome oxidase (COD) and alcohol dehydrogenase (ADH) in leaves were studied by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in 1, 4, 14-year-old seedlings and 4-year-old grafted plant, which grafted by adult-phase bud of *Malus hupenhensis*. The results showed that, the observability of some bands, such as POX Rf 0.56, 0.60, COD Rf 0.50, EST Rf 0.09, 0.15, 0.75, 0.77, ADH Rf 0.76, were age variable. Some were found only in adult-phase leaves, and others were unique to juvenile-phase leaves. The height from 150 to 200 cm, where adult- or juvenile-associated isozymes disappeared or appeared was the lowest flowering height. 1-year-old seedling displayed patterns that were identical to juvenile zone of seedlings perennial. Grafted plant has essential bands of adult zone of seedlings perennial. The study disclosed that plant height may be one of the most important factors that govern phase change of *Malus hupenhensis*. The four isozymes could be served as markers to assess characterization of phase change of perential plants.

Key words *Malus hupenhensis*, Seedling, Phase change, Isozyme

木本植物在种子萌发后要经历一段相当长的童期,处于童期的植株即使在开花诱导条件下仍难成花,随着时间推移,植株逐渐获得开花能力,进入成年期,这一过程通常被称

<https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-199-135>

① 国家自然科学基金资助项目(编号 39770630)。

作者简介 张才喜,男,湖北黄梅人,1972 年 10 月生,硕士,讲师,从事园艺事业教学及科研工作。

收稿日期 1999-11-23 接受日期 2000-09-26 责任编辑 姜联合

为阶段转变(Hackett, 1983)。过去对于童期的研究大多集中从时间角度进行探讨(Li, 1990),以从幼苗开始到植株开花,亦即童期结束成年期到达为满足。近年来,人们注意到同一株实生树上不同高度、位置、器官、组织细胞所处发育阶段不同(李载龙等, 1981 陈大明等, 1994 Korneeva, 1994)。Li (1995)认为从空间角度进行研究,不仅可以注意到植株开花前的变化动态而且把注意力更多集中在植株进入开花后植株基部依然存在的童性特征上,可以更加深入地理解童性的本质。

对于随阶段转变发生变化的性状研究,如叶形、叶序、生长习性、光合特性、不定根分化能力,花色素形成能力等,对理解阶段转变有一定意义。Hackett(1983)认为对于阶段转变过程中生化指标和细胞学特征的研究是理解阶段转变的一个重要研究领域。在植物发育过程中,随着细胞的分化,存在特异蛋白质、酶的合成与降解,与生长发育过程关系紧密的同工酶可以提供基因表达的灵敏指标。同工酶是基因表达的产物,对阶段转变过程中同工酶变化的研究可以更好地理解阶段转变的内在机理。

本试验采用无融合生殖的湖北海棠(*Malus hupehensis*),从空间角度对 POX、COD、EST、ADH 4 种同工酶变化进行研究,以期为阶段转变提供同工酶方面的证据。

1 材料和方法

1.1 材料

4 年生(250 cm)、14 年生(350 cm)湖北海棠实生树,当年最低开花位置分别在 156 cm 及 152 cm 处。4 年生成年芽嫁接树(250 cm),1992 年 3 月取成年芽嫁接于 1 年生本砧上。1996 年 3 月 25 日从下至上每隔 50 cm 取刚刚展开的嫩叶放于冰壶内带回室内,1 年生实生苗(40 cm)只取一处。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 剪取当年抽生的新鲜、健康、干净叶片 2 g,加入预冷的提取缓冲液(50 mmol/L Tris-cl pH 8.3, 1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L $MgCl_2$, 25 mmol/L 二硫苏糖醇, 3 mmol/L $NaHSO_3$, 5 mmol/L 抗坏血酸, 0.1% α -巯基乙醇, 0.1% Triton X-100) 2 ml,冰浴研磨, 12 000 rpm 4 °C 冷冻离心 30 min,取上清液加入甘油, -20 °C 保存。

1.2.2 电泳 采用 Davis(1964)的聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳。分析过氧化物酶、细胞色素氧化酶、酯酶和乙醇脱氢酶分离胶浓度分别为 12%、12%、10%、7.5%,浓缩胶浓度均为 4.0%。点样量为蛋白质 25 μ g,电泳时间 4 h,电流 50 mA。

1.2.3 显色 过氧化物酶采用醋酸联苯胺法,细胞色素氧化酶,酯酶,乙醇脱氢酶采用胡能书(1985)。

2 结果与分析

2.1 过氧化物酶同工酶

湖北海棠过氧化物酶同工酶谱如图 1 所示, S_1 、 S_4 、 S_{14} 和 G_4 在 M 区酶带差异明显。在 Rf 0.56 和 0.60 处,多年生实生树之间无差异,从 150 cm 处开始出现较弱酶带,随着高度的增加,酶活性渐增至 200 cm 且保持稳定,但在 50 cm、100 cm 高度同 1 年生实生苗一样均无酶带出现。4 年生嫁接树同多年生实生树成年区酶活性一样,且不随株高的增加而

发生变化。Rf 0.69 和 0.71 处两条较弱酶带仅出现在实生树上而嫁接树则未出现,与高度变化无关,这可能是受嫁接的影响。

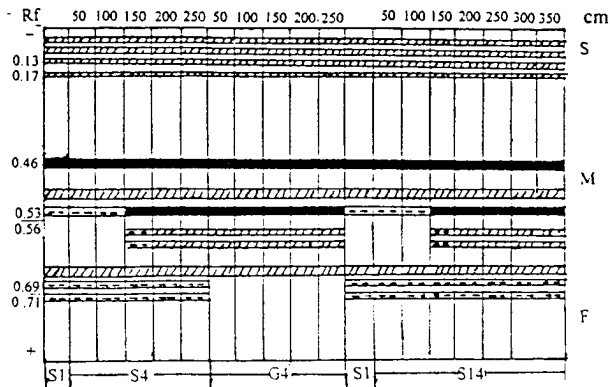


图 1 湖北海棠 S_1 、 S_4 、 G_4 和 S_{14} 不同高度过氧化物酶同工酶酶谱

Fig.1 The analysis of PAGE-peroxidase patterns of crabapple leaf at different height
 S_1 = 1 years old seedling, S_4 = 4 years old seedling, G_4 = 4 years old grafted plant, S_{14} = 14 years old seedling. F = fast, M = middle, S = slow

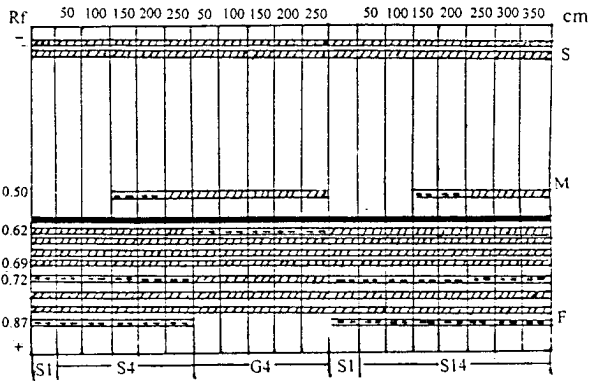


图 2 湖北海棠 S_1 、 S_4 、 G_4 和 S_{14} 不同高度细胞色素氧化酶同工酶酶谱

Fig.2 The analysis of PAGE-cytochromeoxidase patterns of crabapple leaf at different height

2.2 细胞色素氧化酶同工酶

由图 2 可知,细胞色素氧化酶同工酶谱主要差别出现在 M 区 Rf 0.50 和 F 区。在 Rf 0.50 处, S_4 和 S_{14} 在 50 cm、100 cm 高度均未有明显酶带出现,但随着高度增加酶活性增加且至 200 cm 后保持稳定, G_4 保持了同 S_4 、 S_{14} 成年区一样的稳定的酶活性,而 S_1 无酶活性显现。Rf 0.87 酶带仅出现在实生树上且与高度无关,这可能与嫁接的影响有关。

2.3 酯酶同工酶

湖北海棠酯酶同工酶谱在 S 区与 F 区均存在明显差异。Rf 0.09 和 0.15 处, S_1 同 S_4 、 S_{14} 的 50、100、150 高度均无酶带出现,随后活性增加出现较强酶带并保持稳定。而 S_4 、 S_{14} 处在 Rf 0.75 和 0.77 酶带则随高度增加酶活性减弱。 G_4 同 S_4 、 S_{14} 成年区保持一致。嫁接的影响可能导致 Rf 0.06 酶带 G_4 比 S_1 、 S_4 和 S_{14} 实生树活性强。

2.4 乙醇脱氢酶同工酶

乙醇脱氢酶同工酶谱如图 4 所示,其差异主要在 F 区。Rf 0.76 酶带随高度增加活性增加,至 150 cm 处稳定。Rf 0.82 处, S_4 、 S_{14} 自 150 cm 出现稳定 ADH 活性,而 S_1 、 G_4 酶活性则分别与 S_4 、 S_{14} 童区和成年区一致。

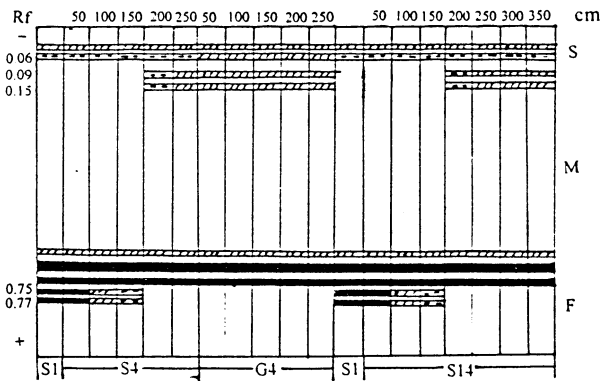


图 3 湖北海棠 S_1 、 S_4 、 G_4 和 S_{14} 不同高度酯酶同工酶酶谱

Fig.3 The analysis of PAGE-esterase patterns of crabapple leaf at different height

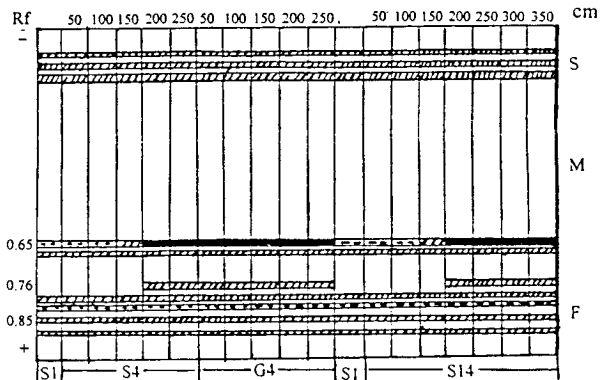


图 4 湖北海棠 S_1 、 S_4 、 G_4 和 S_{14} 不同高度乙醇脱氢酶同工酶酶谱

Fig.4 The analysis of PAGE-alcohol dehydrogenase patterns of crabapple leaf at different height

3 讨论

3.1 4 种同工酶在阶段转过程中可能的作用

通常代谢受基因(通过酶)所控制,另一方面,代谢(通过自身强度、产物等变化)亦对基因进行调节控制。细胞色素氧化酶是呼吸链末端氧化的一个重要酶,直接关系到高能化合物 ATP 的形成,其活性随高度的增加而增加,可能是为植株开花所需的蛋白质、核酸等形成提供能量。

酯酶可能同开花所必需营养物质(酯类)的合成增加和为保持童性特征而产生的酯类随发育程度提高其合成的减少相对应。随着为开花准备的营养物质的大量积累,在从营养物质由积累到更新形成新的器官。过氧化物酶普遍存在于植物组织内,参与多种生理活动(Scandalios,1983)。龙桂友(1991)也认为 POX 的增强同营养生长有关,随着进入生殖生长,营养生长减弱,酶带减弱或消失。

3.2 实生树童区与成年区在同工酶表达上的差异

特异的同工酶谱是特异的基因表达结果。Brand(1992)等发现成年白桦茎尖中有更高的 POX 含量。Sanchez(1993)在鳄梨上发现成年叶片比童年叶片具有更高的 POX 活性,某些酶随空间高度而发生变化,存在童、成年组织各自的特异酶带。Huang 等(1996)在研究 *Sequoia sempervirens* 返童过程中发现,随返童的增加存在成年特征酶带的消失和童年特征酶带的出现。湖北海棠实生树 POX、COD、EST、ADH 均出现了童区和成年区各自特有的酶带,童年植株与多年生实生树童区酶谱完全一致,成年嫁接树与多年生实生树成年区酶谱基本保持一致,嫁接并未影响带有成年区特征的酶带。这表明实生树童区与成年区分别保持了童年树和成年树的特征,童区与成年区存在翻译水平上不同和相对稳定性。其童区与成年区酶谱的差异是因为高度变化的结果,这说明四种同工酶均可以作为阶段转变的指标之一。

3.3 阶段转变同高度关系

过去的研究通常从时间角度来研究阶段转变,有些从空间角度出发,甚至深入到分子水平进行探讨(Huang *et al.*, 1995),其结果仍然免不了按时间概念观点来解释。我们实验结果显示,童年实生树从童区向成年区过度过程中,在 S_4 、 S_{14} 中过氧化物酶 Rf 0.56、0.60,细胞色素氧化酶 Rf 0.50,酯酶 Rf 0.09、0.15、0.75、0.77,乙醇脱氢酶 Rf 0.76 的几条酶带均随高度增加而发生变化,出现成年区和童区特征酶带,其消失或出现均在 150 ~ 200 cm 之间,当年植株最低开花位置亦在此范围内,而作为对照的 G_4 同工酶谱并未随高度而发生变化。Li (1995)指出梨树进入成年阶段的转折点在茎干上表现特定高度,认为植株高度方面的生长是控制梨实生苗阶段转变的最重要因子。因此,可以认为湖北海棠的实生苗高度是阶段转变的重要因子,阶段转变可能在空间某一高度发生。

大量证据表明,多细胞植物的发育是一系列基因在时空上依次顺序表达的过程,在特定时间和空间上的某些基因表达激活或阻遏决定了植物发育和分化的方向(Hackett, 1983)。植物阶段转变是基因以代谢为基础而发生的,进一步研究基因的选择表达将会更有利于对阶段转变的认识与理解。

参 考 文 献

- 龙桂友, 1991. 巨峰葡萄实生苗阶段发育过程中几种同工酶谱的变化. *果树科学*, 8(2): 91 ~ 96
- 李载龙, 沈德绪, 郑淑群, 1981. 梨实生苗的章程、结果和遗传. *浙江农业学报*, 8(3): 55 ~ 58
- 陈大明, 沈德绪, 李载龙, 1994. 梨实生树童区和成年区顶端分生组织的细胞学研究. *植物生理学通讯*, 30(5): 343 ~ 345
- 胡能书等编, 1985. 同工酶技术及其应用. 湖南科学出版社
- Brand M H, Lineberger R D, 1992. *In vitro* rejuvenation of Betula (Betulaceae): Biochemical evaluation. *Am J Bot*, 79: 626 ~ 635
- Hackett W P, 1983. Phase change and intracloal variability. *Hortscience*, 18: 840 ~ 844
- Huang H J, Yu Chen, 1996. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* in Vitro: Change in isoesterases and isoperoxidases. *Plant Cell Physiol*, 37(1): 77 ~ 80
- Huang L C, Lin L Y, 1995. Phase reversal in *Sequoia sempervirens* in relation to mtDNA. *Physiol Plant*, 94: 379 ~ 383
- Komeeva T V, 1994. Specific protein patterns of the meristems and leaves in juvenile and adult *Hedera helix* L. *Plants Russian Journal of Plant Physiology*, 41(6): 728 ~ 733
- Li Z L, 1990. Advances of pear breeding program at ZAU. *Acta Hort*, 279: 167 ~ 184
- Li Z L, 1995. Phase change related to height growth in pear seedlings. 纪念吴耕民教授诞生一百周年论文集, 中国农业科学出版社, 160 ~ 165
- Sanchez-Romero C, Garcia-Gomez M-L, Pliego-Alfaro F, 1993. Peroxidase activity and isoenzyme profiles associated with development of avocado (*persea americana*) leaves at different ontogenetic stages. *J Plant Growth Regul*, 2: 95 ~ 100
- Scandalios J G, 1974. Isozymes in development and differentiation. *Ann Rev Plant Physiol*, 25: 225 ~ 258