

几种植物组织及其原生质体过氧化物酶 同工酶的比较研究

何若天

(广西农学院林学系)

摘要 对马尾松幼苗子叶和胚轴、甘蔗、小麦、烟草、黄花菜等幼叶及其原生质体的过氧化物酶同工酶(POI)分别作比较研究。观察到凡经纤维素酶处理的各植物组织 POI 酶带数均多于未经纤维素酶处理的组织的酶带数; 除个别例外, 后者一般又比无壁原生质体的酶带数多。此种差异随植株生长年龄而增大, 表明植物组织内大部分 POI 主要存于质外体中。

植物过氧化物酶(E. C. 1.11.1.7)不仅存在于原生质体内, 且有相当数量呈游离态或以离子键和共价键与胞壁结合而存在于质外体中^[1,4,9,13,14]。Birecka 和 Miller (1974) 及 Birecka 和 Catalfamo (1975) 认为原生质体和胞壁的过氧化物酶同工酶(POI)是不同的^[7,8]。本文报告我们对经过和未经过纤维素酶处理的组织及用酶法脱壁后的原生质体的 POI 比较研究的初步结果。

材料与 方法

一、植物材料

1. 烟草 (*Nicotiana tabacum*) 在砾石加沙子中盆栽, 每周加 1—2 次合成培养液, 生长在自然漫射光下。生长 2—3 个月后, 取上部第 2—3 片全伸展叶为材料。
2. 甘蔗 (*Saccharum officinarum* L. 品种为粤蔗 7 号 57/423) 为田间栽培。从株高达 0.5 米开始分期取样, 切取茎梢内层幼叶为材料。
3. 黄花菜 (*Hermerocallis fulva*) 盆栽在自然漫射光下, 取幼叶为材料。
4. 小麦 (*Triticum aestivum* L.) 播于砾石中盆栽, 自然漫射光下萌发生长, 苗高 14 厘米左右取上部已充分伸展的第 1 片叶为材料。
5. 马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 播于砾石中盆栽, 自然漫射光下萌发生长, 当出现子叶、苗高 5—6 厘米时, 分别切取子叶和胚轴为材料。

二、酶液处理和原生质体制备

(一) 酶液配制: 1 或 3% 纤维素酶(提取自绿色木霉 EA3—87, 含有果胶酶, 上海酒精二厂产品)溶于 0.5(或 0.6) M 甘露醇和 100mg% CaCl_2 混合溶(含抗坏血酸和半胱氨酸)中, 调 pH 为 5.6~5.8。

(二) 酶液处理和原生质体的分离及 POI 的提取

1. 取烟草叶片冲洗干净后, 用吸水纸吸干表面水分, 切取半叶挂于室内令萎蔫 1.5—2 小时。另半叶置冰箱内冷存供作不经酶处理的鲜组织测定用。把前者置 70% 酒精中 0.5 分钟

我系覃伟同志参加部分技术工作。

后转至0.1% HgCl_2 溶液(含约万分之一吐温80)内灭菌15分钟,用无菌蒸馏水冲洗4~5遍,于超净工作台中用无菌吸水纸吸干表面水分。用镊子撕去下表皮,切取已撕掉下表皮的叶肉部分浸没于酶液中。酶液盛于15毫升三角瓶内,于30℃中保温3—4小时。

黄花菜幼叶作同样处理,一半冷存外,另一半横切成厚约1毫米薄片,置酶液内,于相同条件下保温3—4小时。

2. 甘蔗梢部被剥去外层老叶鞘,然后切去两端,选取只含柔软幼叶的切段。置70%酒精中1分钟后,用无菌蒸馏水冲洗3—4遍。切去两端切口,再剥掉外层较老叶片,露出内部黄白色柔软叶段。用手术刀纵切成三份。其中一份置冰箱内保存,供作不经处理的鲜组织测定用;另一份经研碎后置酶液中保温酶解;第三份横切成厚约1毫米薄片,置30℃中保温1.5~2小时。

3. 每次从约15株小麦苗上选取上部第一片全伸展叶,马尾松则每次取20株幼苗。如上法表面灭菌后各分成三份,其中一份冷存供鲜组织测定用;另一份研碎后置酶液内保温酶解;第三份横切或厚约0.5毫米薄片,置酶液内于30℃中保温3—4小时。

上述各植物组织保温酶解结束后,分别将其中供分离原生质体用的那份用细玻璃棒轻压碎片促使原生质体尽量解离出来。于80r.p.m转速下离心3—5分钟,去上清液。用0.5(或0.6)M甘露醇和100mg% CaCl_2 混合液洗涤原生质沉淀物,再离心3—5分钟。如此反复洗涤二遍。第三遍改用不含 CaCl_2 的0.5(或0.6)M甘露醇溶液洗一遍。最后将沉于离心管底的原生质体团(经显微镜检查,98%以上为已去壁的球状原生质体)悬浮于冷的0.4—0.5毫升含抗坏血酸和半胱氨酸的0.1MTris-HCl缓冲液(pH8.0)中,用胶头吸管予以机械冲击,原生质体因受渗透和机械冲击而迅速破碎,释出全部内含物。于4000r.p.m转速下离心15分钟,吸取上清液加入2—3滴浓蔗糖液,作为原生质体POI粗提取液。

供作酶处理的那份材料经进一步磨碎成浆后,于4000r.p.m下离心15分钟,上清液作为原生质体和存于质外体的全部POI组份粗提取液,调pH为8.0。

三、未经酶处理的组织过氧化物酶的提取 按吴少柏(1979)介绍的方法^[2]。分别将经冰冻2—4小时后的植物的另一份材料切碎后,置预冷的研钵中加适量预冷的含蔗糖、抗坏血酸和半胱氨酸的0.1MTris-HCl缓冲液(pH8.0),研磨成匀浆。于4000r.p.m转速下离心10分钟,吸取上清液作适度稀释,以便使所得粗酶浓度尽量和原生质体提取液中酶浓接近。后者用双缩尿法检定。

四、过氧化物酶同工酶谱的测定 按吴少柏(1979)法^[2],用不连续盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离POI。分离胶浓度为7.2%,成层胶为2.5%。每管电流1.7或2毫安。用抗坏血酸—联苯胺显色液显色。

试验结果

一、马尾松幼苗子叶和胚轴组织及其游离原生质体的POI酶谱 马尾松幼苗子叶和胚轴组织及其无壁的自由原生质体内POI酶谱均呈现明显差别(图1)。经纤维素酶处理的子叶组织(图1:CA)计有8条酶带,未经酶处理的子叶组织(图1:CB)有5条酶带,缺 C_{1-3} 酶带,而其无壁的原生质体(图1:CC)只具3条酶带,即 C_4 、 C_6 和 C_7 。经纤维素酶处理的胚轴组织(图1:PA)有10条酶带,未经酶处理的胚轴组织(图1:PB)有8条酶带,缺 P_7 和 P_{10} 酶带,

其无壁的原生质体(图1: PC) 酶谱与未经酶处理者相同, 唯显色稍弱。

二、小麦苗叶组织及其游离原生质体的POI酶谱 经纤维素酶处理的小麦幼苗叶组织(图2:A)有9条酶带, 而未经酶处理的叶组织(图2:B)及其无壁原生质体(图2:C)均只有4条酶带, 后二者谱酶完全相同, 均缺 $t_4, 8$ 等酶带。

三、甘蔗梢部幼叶组织及其游离原生质体的POI酶谱 在甘蔗不同生长期取样, 所得幼叶组织的POI酶谱很不相同。9月27日取样的, 经过和未经过纤维素酶处理的叶组织(图:A₁和 B₁)均有3条酶带。唯无壁的

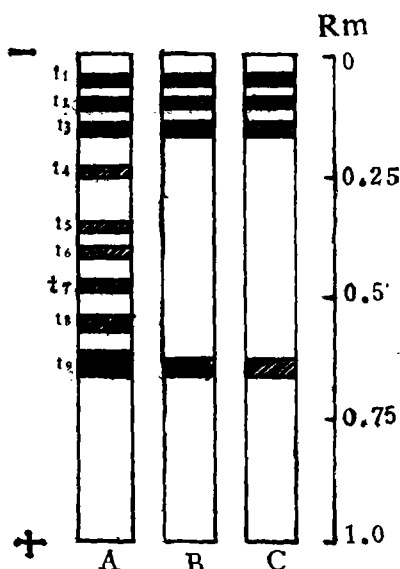


图2 小麦幼苗叶组织及其游离原生质体内过氧化物同工酶谱

A → 经纤维素酶处理后的组织;
B → 未经纤维素酶处理的组织;
C 无壁的原生质体。

Fig. 2 Peroxidase isozyme patterns in the leaf tissues and their isolated protoplasts of wheat seedling.

A → digested by cellulase;
B → not digested by cellulase;
C → isolated protoplasts

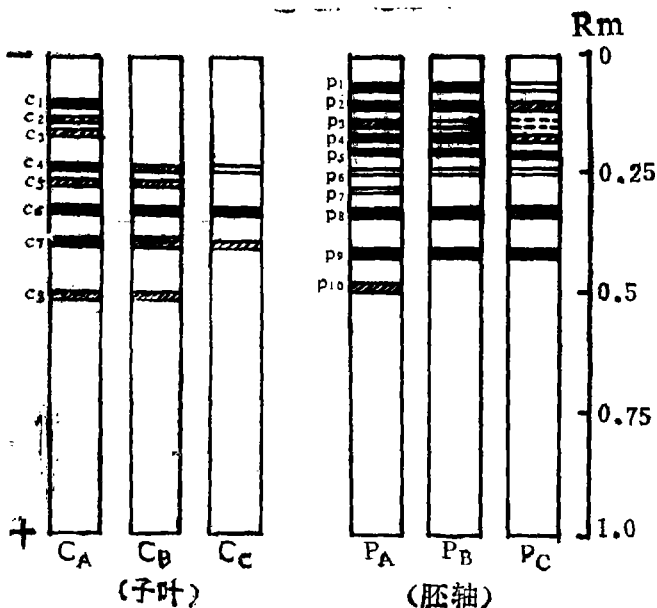


图1 马尾松幼苗子叶和胚轴组织及其游离原生质体内过氧化物同工酶谱

CA和PA → 经纤维素酶处理的组织;
CB和PB → 未经纤维素酶处理的组织;
CC和PC → 无壁的原生质体。

Fig. 1 Peroxidase isozyme patterns in the cotyledon and plumular axis tissues and their isolated protoplasts of masson-pine

CA, PA → digested by cellulase;
CB, PB → not digested by cellulase;
CC, PC → isolated protoplasts

原生质体(图3:C₁)只有1条酶带, 缺S₂和S₃酶带。11月14日取样的各处理的酶带增多, 彼此呈现较大差别。经纤维素酶处理的叶组织(3:A₂)有6条酶带, 未经酶处理者(3B₂)有5条酶带, 缺S₆酶带, 而其无壁原生质体(图3:C₂)只有S₁₋₃3条酶带。12月4日取样时, 酶带数增加更多。经纤维素酶处理的叶组织(图3:A₃)9条酶带, 未经酶处理者(图3:B₃)有7条酶带, 缺S₅和S₆, 而无壁原生质体(图3:C₃)只有4条酶带。可见, S₁, S₂和S₃酶带先出现, 其余迁移较快的酶带是后产生的。

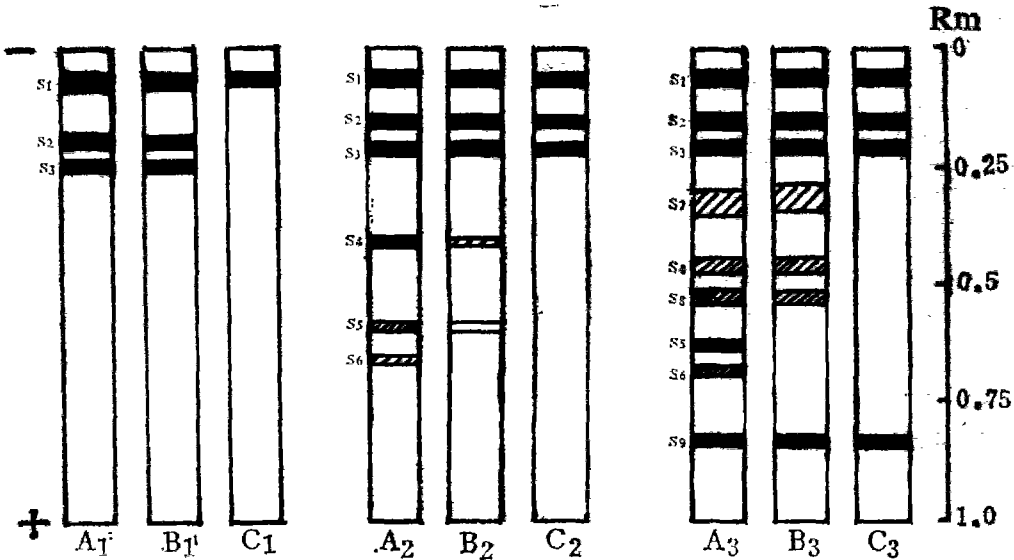


图3 不同生长期的甘蔗梢部幼叶组织及其游离原生质体内过氧化物酶同工酶谱
 A₁、A₂、A₃ → 经纤维素酶处理后的组织；
 B₁、B₂、B₃ → 未经纤维素酶处理的组织；
 C₁、C₂、C₃ → 已脱壁的原生质体。

Fig. 3 Peoxidase isozyme patterns in the young leaf tissues and their isolated protoplasts of Sugar-cane at different growth phase.
 A₁, A₂, A₃ — digested by cellulase; B₁, B₂, B₃ — not digested by cellulase;
 C₁, C₂, C₃ — isolated protoplasts

四、烟草和黄花菜叶组织及其游离原生质体的POI酶谱 烟草叶和黄花菜幼叶未经纤维素酶处理的组织 POI 酶带均比其无壁原生质体的酶带多(图4和5)。其中烟草叶组织(图4:B)具9条酶带，唯n₁₋₃等带不太明显，而其无壁原生质体(图4:C)只有n₆、n₇和n₈3条酶带。黄花菜叶组织(图:5B)有7条酶带，其无壁原生质体(图:5C)亦只有3条酶带(h₂，h₃和h₄)。

讨 论

1. 按 Birecka 和 Miller (1974) 的看法，经纤维素酶处理后的组织，可将与胞壁结合(包括以离子键和共价键结合)的 POI 分离出来，而未经酶处理的鲜组织提取物只含原生质体 POI^[7]。我们试验结果表明，除马尾松幼苗的胚轴和小麦幼苗叶组织的新鲜组织提取物与其无壁原生质体的 POI 相同外，其余所测材料均有明显差异。一般是经纤维素酶处理后的组织 POI 酶带数多于未经酶处理的组织，后者又比无壁原生质体的多。这表明细胞内有一部分 POI 存于质外体，而共质体内一般所含 POI 较少。考虑到我们处理组织和分离原生质体用的纤维素酶制剂很不纯，可能混有一些外来 POI。但经多次电泳检查均未见有可见的酶带，不存在外来干扰。对分离的原生质体进行三次洗涤，残存的纤维素酶和从胞壁和释出的过氧化物酶均可全部清除，所得原生质体 POI 基本上属于共质体的。

Birecka 和 Catalfamo (1975) 用他们的方法测得烟草幼茎髓部原生质体过氧化物酶只

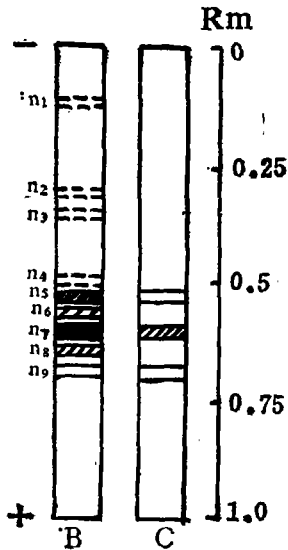


图4 烟草叶组织及其游离原生质体内过氧的物酶同工酶谱

B → 未经纤维素酶处理的组织;
C → 无壁的原生质体。

Eig. 4 Peroxidase isozyme patterns in the leaf tissues and their isolated protoplasts of tobacco.

B — digested by cellulase;
C — isolated protoplasts

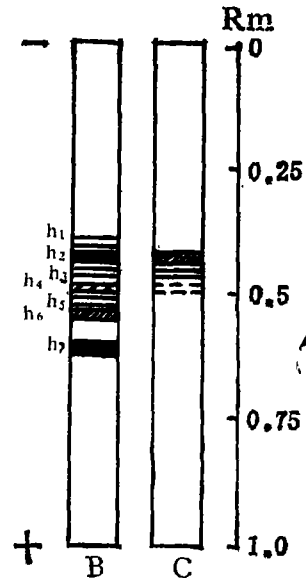


图5 黄花菜幼叶组织及其游离原生质体过氧化物酶同工酶谱

B → 未经纤维素酶处理的组织;
C → 无壁的原生质体。

Eig. 5 Peroxidase isozyme patterns in the young leaf tissues and their isolated protoplasts of daylily.

B — digested by cellulase;
C — isolated protoplasts

占细胞过氧化物酶总活性的10%，胞壁内占90%^[8]。胡萝卜根原生质体过氧化物酶活性只占细胞过氧化物酶总活性的5%^[8]。我们所得的POI比较结果亦可助证。但他们未见原生质体内和细胞壁的酶带有实质性差异。主要原因是他们没有把原生质体分离出来单独测定，而仅把未经纤维素酶处理的组织提取物代表原生质体组分，这就难免可能有部分胞壁的可溶性组分包括在内。我们的结果表明测定无壁原生质体的POI才能真正代表原生质体(或共质体)的POI组分。

2. 不少试验证明植物的POI具有明显的组织多型现象^[3,18]。尤其在植物生长发育过程中，其POI酶谱会发生很大变化^[4,15]。本试验从甘蔗不同生长期取样所测结果亦可助证。不论是原生质体或完整组织内POI酶带数均随生长进程而增多。

3. Birecka和Miller(1974)认为原生质体内POI大都呈游离态而不是与膜结合的，细胞质膜对POI是高度可透的^[7]。因此，胞壁中的POI显然是从原生质体内释放出来的。胞壁和那么多的同工酶是在原生质体内转录后直接释放出来的原始形式抑是转录后的原始形式经次生修饰^[19]或与细胞内的不同酚化合物发生结合而形成的不同复合物^[18]而出现的腐品？因为这些变化均会改变同工酶的R_m值。而留于原生质体内的POI是否为翻译后的原始形式？均值得进一步阐明。

4. 由于POI多型现象的存在及原生质体与具壁细胞的POI有较大差异，那么育种工

作者常用 POI 变化看作不同基因活动的标志就很值得商榷。倘不考虑多型现象, 只从常用 POI 提取方法来看, 所得提取物到底能代表那部分 POI 组分? 以共价键与胞壁结合的 POI 是不易释离出来的。因此所得 POI 没有包括这些组分在内, 如果胞壁 POI 组分亦能代表基因活动的标志, 所得结果岂非很不可靠! 倘若只有原生质体内 POI 组分才是基因活动的原始形式, 其余均属次生修饰或人为膺品, 那么用一般提取法所得 POI 制备物就不一定能代表原生质体内的 POI 组分。故我们认为在没有弄清各酶带的基因位点之前, 以 POI 作为不同基因活动的生化指标未免有点冒险。

5. 有关胞壁中 POI 的生理功能已有一些研究, 认为它与胞壁木质化有密切关系^[10]^[12]^[6], 它可能是木质素形成的媒介^[10], 在木质素聚合中起催化作用^[6]。它还能催化体内 IAA 的氧化^[11], 从而在胞壁生长、分化中起重要调节作用^[17]。丁宝莲等(1982)观察到烟草叶片质外体中过氧化物酶活性随叶片老化而增强^[1]。我们也观察到油茶幼苗 POI 酶带数随组织老化而增多, 组织愈老, 靠近阳极的酶带出现得愈多^[4]。本试验所见甘蔗生育期愈晚的幼叶亦是迁移较快的近阳极酶带出现得愈多, 这意味着近阳极的酶带可能与植株和组织老化有密切关系。这些事实是否意味着过氧化物酶调节细胞生长、分化的作用机理与胞壁变化有直接关系? 即过氧化物酶通过调控胞壁形成、增厚和木质化等速度与程度从而调控细胞生长与分化进程? 这尚待大量实验证明。为阐明有关机理, 利用完整组织和无壁的原生质体对比研究, 尤其是追踪培养的原生质体再生胞壁过程中 POI 的变化无疑是很有帮助的。有关试验, 我们仍在进行中。

参 考 文 献

- [1] 丁宝莲等, 1982: 烟草叶肉细胞壁过氧化物酶同工酶的研究, 植物生理学报 8: 127—133。
- [2] 吴少柏, 1979: 植物组织中的蛋白质及同工酶—聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳, 植物生理学通讯, (1): 30—33。
- [3] 梅慧生, 1981: 植物同工酶研究的某些进展, 植物生理学通讯, (3): 1—7。
- [4] 何若天等, 1984: 油茶幼苗生长早期过氧化物酶同工酶的多型现象及某些因子对其影响的研究, 广西农学院学报(1): 103—108。
- [5] Alldridge, N. A. and Gordon, A. R. 1968: Studies on the characteristics, distribution, and ultrastructural localization of tomato Cell wall peroxidases, J. Cell Biol. 39:5a
- [6] Alibert, G. Ranjeva, R. et Boudet, A. M. 1977: Organization subcellulaire des voies de synthese de composés phenoliques, Physiol. Vég. 15: 279—301.
- [7] Birecka, H. et Miller, A. 1974: Cell wall and protoplast isoperoxidases in relation to injury, indoleacetic acid, and ethylene effects, Plant physiol. 53: 569—574.
- [8] Birecka, H. et Catalfamo, J. L. 1975: Cell wall and protoplast isoperoxidases of Corn leaves in relation to cut injury and infection with *Helminthosporium maydis*, Plant phsiol. 55: 607—610.
- [9] De Jong, D. W. 1967: An investigation of the role of plant peroxidase in cell wall development by the histochemical method, J. Histochem. and Cytochem. 15: 335—346.
- [10] Harkin, J. M. et Obst, J. R. 1973: Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation, Science 180: 296—298.
- [11] Hinnman, R. L. et Lang, J. 1965: Peroxidase catalyzed oxidation of indole 3-acetic acid, Biochemistry 4: 144—158.
- [12] Lipetz, J. et Garro, A. J. 1965: Ionic effects on lignification and peroxidase in tissue cultures,

- J. Cell Biol. 25: 109—116.
- (13) Moore, T. 1973: An extracellular macromolecular complex from the surface of soybean suspension cultures, *Plant physiol.* 51: 529—536.
- (14) Ridge, L. et Osborne, D. J. 1970: Hydroxyproline and peroxidases, in cell walls of *Pisum sativum*: regulation by ethylene, *J. Exp. Bot.* 21: 943—856.
- (15) Scandalios, John G. 1974: Isozymes in development and differentiation, *Ann. Rev. Plant physiol.* 25: 225—258.
- (16) Siegel, S. M. 1954: Studies on the biosynthesis of lignins, *Physiol. Plant.* 7: 41—50.
- (17) Siegel, B. Z. et Galston, A. W. 1967: The isoperoxidases of *Pisum sativum*, *Plant physiol.* 42: 221—226.
- (18) Srivastava, O. P. et van Huystee, R. B. 1977: Interactions among phenolics and peroxidase isozymes, *Bot. Gaz.* 138: 357—464.
- (19) van Huystee, R. B. et Gairns, W. L. 1980: Appraisal of studies on induction of peroxidase and associated porphyrin metabolism, *The Bot. Rev* 46: 429—446.

COMPARATIVE STUDIES ON PEROXIDASE ISOZYME PATTERNS IN THE TISSUES AND PROTOPLASTS OF FIVE SPECIES

He Rao-tian

(Department of Forest Guangxi College of Agriculture)

By using polyacrylamide gel electrophoresis method, peroxidase isozyme (POI) from the leaf tissues and protoplasts of five species, i.e., cotyledon and plumular axis of masson-pine (*Pinus massoniana* Lamb.) and leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.), sugar-cane (*Saccharum officinarum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*) and daylily (*Hemerocallis fulva*) were obtained:

POI of cotyledon tissues of masson-pine that are digested and that are not digested by cellulase had 8 and 5 bands respectively, but their isolated protoplasts had 3 bands. POI of plumular axis of masson-pine that are digested by cellulase had 10 bands, but the POI patterns of that are not digested by cellulase and their isolated protoplasts are identical and all had 8 bands.

POI of leaf tissues of wheat seedling that are digested cellulase had 9 bands, but the POI patterns of that are not digested by cellulase and their isolated protoplasts are identical and all had 4 bands.

POI patterns of young leaf tissues of sugar-cane at different growth phase are difference. POI of leaf tissues that are digested and that are not digested by cellulase all had 3 bands, but their isolated protoplasts had only 1 bands on September the twenty-seventh, POI of leaf tissues that are

digested and that are not digested by cellulase had 6 and 5 bands respectively, and their isolated protoplasts had 3 bands on November the fourteenth, POI of leaf tissues that are digested and that are not digested by cellulase had 9 and 7 bands respectively, and their isolated protoplasts had 4 bands on December the fourth.

POI of leaf tissues of tobacco that are not digested by cellulase and their isolated protoplasts had 9 and 3 bands respectively.

POI of young leaf tissues of daylily that are not digested by cellulase and their isolated protoplasts had 7 and 3 bands respectively.

The above mentioned results showed most of POI were located on the apoplast, and POI isolated from non-cell wall protoplasts are only represent components of POI in the symplast.