

PGR-1 [3-(2-吡啶基)丙醇] 对槟榔植株酯酶同工酶的影响

何和明

梁弦强

(海南师范学院生物系, 琼山)

(华南师范大学生物系, 广州)

提要 本试验采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 测定与分析槟榔不同器官、不同品种酯酶同工酶酶谱、酶量、酶带活性和分布状况, 结果表明: 经PGR-1处理后, 槟榔酯酶同工酶带数目、着色程度、酶带活性都比对照的显著增多、加深、提高。

通过检测, 清楚地看到槟榔酶带总共有17条, 分为三大酶区, I区带有酶谱6条, II区带有酶谱7条, III区带有酶谱4条。各酶区出现新酶带比对照的增多11条, 带幅从狭变宽, 带色由浅变深, 带位迁移从慢变快, 酶带活性由弱变强, 这是与用药浓度有相关联的。

关键词 PGR-1; 槟榔; 酯酶同工酶

引言

槟榔 (*Areca catechu* L.) 是热带地区多年生木本药用植物, 以PGR-1 [3-(2-吡啶基)丙醇] 处理之后, 植株各器官外部形态、同化物质累积和转化都有程度不同的变化, 有利于植株生长, 防止生理落花落果, 增效作用也比较明显^[1-2]。这些变化与植株各器官中的酯酶有何关系呢? 到目前为止, 尚未见报道, 1986年以来我们采用不同浓度的PGR-1对槟榔各器官进行喷布, 随机定位取样检测、分析酯酶同工酶, 比较不同发育期间, 根、茎、叶和青果此酶同工酶谱变化动态, 以便与其形态特征相互印证, 为深入研究槟榔体内生理生化变化与进一步推广应用PGR-1提供一些可靠的依据。

材料与 方法

一、供试材料

以海南药材场第五作业区1972年定植的实生结果树与1985年培育的苗株, 随机取植株的根、茎、叶和青果为试材。

PGR-1是山东大学生物系馈赠的, 纯度为 $\geq 80\%$ 乳剂油状液体, 有效成份为[1-(α -吡啶)丙醇-2]。

二、样品的制备

准确称取根、茎、叶和青果鲜样2克, 用蒸馏水洗净后, 以滤纸擦干剪碎并放入预冷的研钵中, 按每克样品分别加入2ml 0.1M的(pH7.5) KH_2PO_4 缓冲液, 在低温水浴中研磨成匀浆, 以3000—4000转/分的速度离心10分钟, 取其上清液用于酶的分析。

三、同工酶的测定分析

依据酶分子的带电性、形状和大小的不同特点, 以及在电场中迁移速度的差异, 便于在介质上把各个酶分子分离开来测定分析酯酶同工酶, 然后用酶谱技术染色, 使该酶催化反应的底物与各个酶分子同时起作用, 在短暂时间内显示出酶活性区带, 进而从酶带数目和染色程

度深浅, 鉴别其同工酶的活性强弱、酶带数量多少。

本研究采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 是在pH8.7的碱性系统中进行的, 其分离胶和浓缩胶的浓度分别为7%和4%, 电极缓冲液为Tris—甘氨酸。稳定电压25V/cm, 电流强度2mA/cm, 每槽加样60微升, 加0.01%溴酚蓝3滴于上槽以示前沿。电泳试验在0—4℃的冰箱内进行, 时间为3小时, 重复3次。电泳完毕, 取出的凝胶经蒸馏水漂洗后, 置于瓷盘中染色。染色底物用30mg α-醋酸萘酯和30mg β-醋酸萘酯, 溶于3ml的丙酮中, 再加入60mg 坚牢蓝RR盐, 以0.1M pH6.5的磷酸缓冲液稀释至90ml显色液, 在30—35℃下保温30—40分钟, 待酶带呈现出红、紫、褐色后, 即用自来水冲洗, 再用7%乙酸溶液固定, 记录、照相, 并作永久干板保存。

四、同工酶区带的相对泳动率(Rf)计算参照 Kuhus^[3] 介绍的方法

$$R_f = \text{酶带迁移距离} / \text{溴酚蓝迁移距离}$$

实验结果

一、槟榔植株生长发育过程中酯酶同工酶的基本酶谱类型

通过测试分析, 显示出槟榔植株不同器官不同发育期间酯酶同工酶谱和酶活性变化是不相同的。观测结果, 看到酶谱区带总共有10条(图1)。各酶谱带在7%聚丙烯酰胺凝胶电泳的相对迁移率(R_f)详见表1。而这10条酯酶同工酶谱带, 从负极至正极, 按其谱带聚集程度及显示的顺序, 可将整个酶谱划分为A、B、C三大区域。其中A₁、B₄、C₇、C₉等酶带着色深, 酶活性最强, B₈、C₁₀酶带次之, 其他酶带着色较浅, 酶活性也较弱。A区带的迁移率为0.142~0.292, 有3条酶带, A₁酶带深红色, 其余2条显色微弱。B区带的迁移率为0.478~0.673, 有5条红紫色酶带, B₄带显深红色, B₈、B₉却显紫色, 余者均显紫色较弱。C区带的迁移率为0.867—0.938, 有2条紫红色带, 其中以C₉显深红色。

表1 槟榔植(苗)株酯酶同工酶谱与谱带迁移率的比较

酶 区	A			B					C	
区 带	1	2	3	4	5	6	7	8	9*	10
迁移率(R _f)	0.142	0.221	0.292	0.478	0.513	0.558	0.593	0.673	0.867	0.938

* C₉酶带为根、茎、叶和青果共有的酶带

二、PGR-1对槟榔不同器官酯酶同工酶影响的状况

从图2—(D)中可以看出, 不经PGR-1处理的根、茎、叶对照组, 仅有酶谱带6条

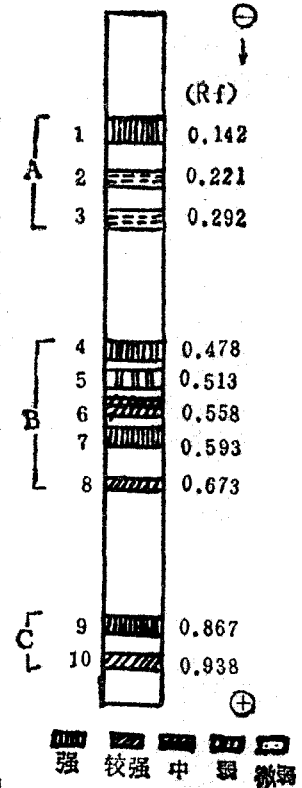


图1 槟榔植(苗)株酯酶同工酶模式示意图附各区带相对泳动率(R_f)

(根、茎、叶=2:4:4)

其中活性强的酶带有1条,活性中等的酶带有3条;经PGR-1处理后的试材,电泳检测结果,初步确定它们呈现出的酯酶同工酶谱带总共有17条,主要分为三大酶区(图2)。由负极向正极方向泳动速度较慢的第I酶区内,可以看到酶谱带有6条,其相对泳动率范围($R_f=0.01\sim 0.044$);泳动中等的第II酶区内,可以看到酶带有7条(其中13P区带一般较宽,着色深,活性强,这可能是多条酶带组成的缘故),这一酶区的泳动迁移率 $R_f = 0.059 -$

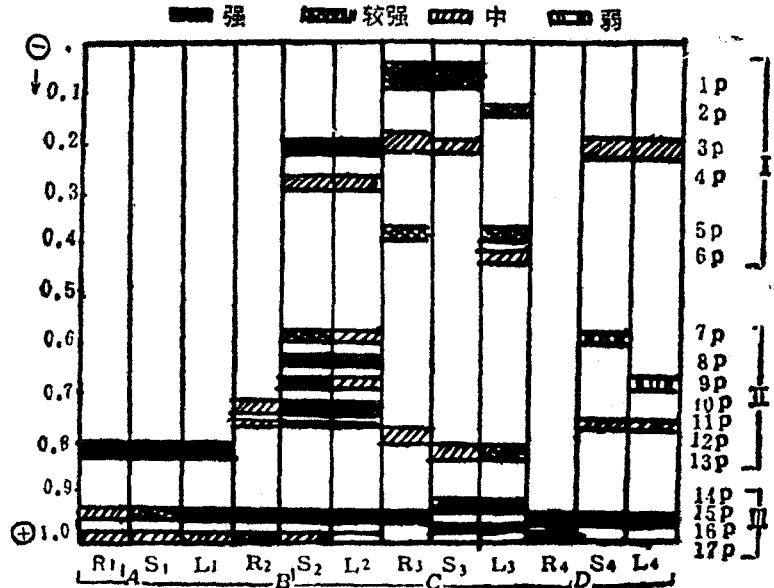


图2 PGR-1对槟榔植株根、茎、叶酯酶同工酶酶谱的影响

种类: 根(R), 茎(S), 叶(L)。

处理: A. 50ppm ($R_1S_1L_1$); B. 100ppm ($R_2S_2L_2$);

C. 150ppm ($R_3S_3L_3$); D. CK ($R_4S_4L_4$)。

0.084; 第III酶区内有酶带4条,其迁移率 $R_f=0.093\sim 0.10$; 在第I和第II酶区之间有一段较宽且明显的空白区段($0.044 < R_f < 0.059$); 在第II、III酶区之间的空白区段较窄($0.084 < R_f < 0.093$), 而在 $R_f < 0.009$ 及 $R_f > 0.10$ 的两端也都未检测到酶活性区带。

上述测定反映出,供试材料从负极到正极呈现出三大酶带区域的17条酶带中,主要酶带都集中在中带区(II)与快带区(III)范围,其中II带8—11p、III带14—16P和I带1.3p酶带面积较宽且着色深,酶活性强;在慢带区(I)内的酶带相对活性一般却呈中等,并由于泳动距离较短,相对泳动率也不甚稳定,故有实验的重复性略差的现象。现将其所获得的结果,列于表2。

表2显示出,槟榔植(苗)株不同器官,由于用药浓度不同,其酯酶同工酶谱带的变化十分明显,而该酶活性的大小,差异程度表现在:根、茎、叶的各酶区新酶带的着色深浅,分布数目可随泳动率(R_f)快慢,与对照相比依次多出2较强、1中酶带(根),5强、1较强,而减少1弱带(茎),至于叶则多出4强、1中、减少1弱酶带。

三、PGR-1对槟榔不同类型青果酯酶同工酶影响的分析

(一) 槟榔青果的酶谱特点: 电泳测得结果,槟榔青果的酶酯同工酶图谱如图3所示。分析图3得知,不同类型青果酶谱是有所差异的,但又具有一个共同的特点,那就是经用PGR-1处理的幼、青果酶带较多,带增加的数量可因用药浓度与青果类型的不同而异,观测结果一般却多出1—4条酶带。

(二) 槟榔青果酶谱的分析与比较: 大凡用PGR-1药液处理后,槟榔的幼、青果酯酶谱带数量都有明显的变化,变化程度因用药浓度不同而异。区带数增多比例分别为5:8:8

表2 槟榔植株不同器官酯酶同工酶的比较

部位	浓度 (ppm) 酶带数	CK (0)	I (50)	I (100)	II (150)
		根	1强、1中 (II 15、17p)	1强、2中 (I 13p, II 16、17p)	1强、1较强、2中 (II 15p、17p, I 16、17p)
	增带 减数	—	1中	1较强、1中	2较强、1中
茎	酶带	1强、2中、1弱 (II 15p, I 3p, I 11、7p)	1强、1较强、1中 (I 13p, II 15、17p)	5强、1较强、2中 (II 15p, I 8—11p, I 3p, I 7p, I 4p, I 17p)	1强、2较强、2中 (II 16p, II 14p, I 1p, II 3p, I 12p)
	增带 减数	—	1较强、1中、—1弱。	4强、1较强、—1弱。	2较强、—1弱。
叶	酶带	2强、2中、1弱 (II 15p, II 11p, I 3p, I 9p)	2强、1中 (I 13p, II 15p, 17p)	5强、3中 (II 15p, I 8、10、11p, I 3p, I 7、9p, I 4p)	2强、3较强、1中 (II 14、16p, I 2、5p, II 13p, I 6p)
	增带 减数	—	—1中、1弱	3强、1中、—1弱。	3较强、—1中、1弱。

(幼果)与6:8:5(青果),其中以100ppm处理的谱带着色浓、带面宽、活性增强尤为显著。而新酶带数的增多主要集中在慢带型I区和中带型II区,幼、青果新酶带的出现有6条,比对照的却多出4条,占有酶带的54.5%。

酶带的对比结果,反映出槟榔幼、青果既拥有3p、4p、10p、和11p等共同的酶带,又持有各自特有的酶带,在幼果中固有的1p、2p、6p等酶带,都是青果中和对照组未发现的。总的来说,随着槟榔青果的发育趋向,用PGR-1处理过后,酯酶同工酶数目、着色深浅和活性强弱都显示出有增多、加深、提高的变化动态。这说明PGR-1能诱导青果出现新酶带和增强酶活性,进而使机体正常的代谢强度比对照的增大,导致槟榔提高产量是一致的^[2]。因此,

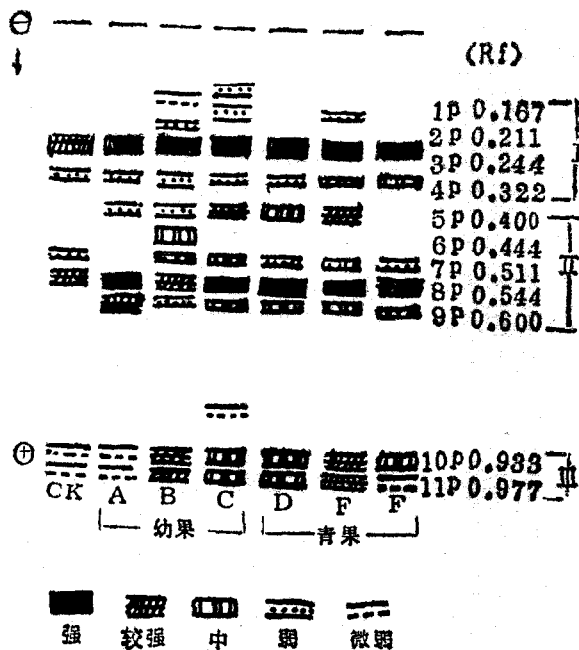


图3 PGR-1对槟榔不同类型青果酯酶同工酶酶谱的影响

种类: 幼果 青果
处理: CK (oppm)

幼果 { A. 50ppm
 B. 100ppm
 C. 150ppm } 青果 { D. 50ppm
 E. 100ppm
 F. 150ppm }

在生产中测试槟榔青果酯酶同工酶的变化,是进一步探求槟榔机体生理生化变化的一项有实用价值的指标。

四、PGR-1对槟榔不同品种青果酯酶同工酶影响的对比

图4所示与对比结果,可以看出经PGR-1处理后,不同品种青果呈现出的酯酶同工酶谱和酶活性有所不同。检测结果得知总共有酶谱带12条(图4)。按其染色显示集中程度这12条谱带可分为三种类型:(1)慢带型:有7条酶带(1a—7a),迁移率(R_f)为0.075—0.328;(2)中带型:有3条酶带(8a—10a),迁移率(R_f)为0.552—0.642;(3)快带型:有2条酶带(11a—12a),迁移率(R_f)为0.746—0.805。

图4还表明,对照的有4条酶谱带(其中I区有3条较强的酶谱带和1条痕迹)。但经PGR-1处理后,海南槟榔酶谱带的分布、数目和着色程度都有明显差异,与对照相比酶带则增多5条(其中I区有3条强酶带和2条较强酶带及1条痕迹、II区有强、较强酶带各1条、III区有强酶带1条)与此同时着色加深、活性强的有5条,活性较强的有1条,活性中等的有2条。而泰国槟榔比对照的酶带却增多6条,比海南槟榔的酶带增加2条。从着色程度与此酶活性来说,泰国槟榔青果I区带有4条着色深、活性强的酶带、2条较强和1条弱的酶带;海南槟榔青果只有3条强带、2条中等带,其余(I、II)区带数几乎没有差异,均为2条与1条,但其区带位置,带面宽度都有所不同,这说明药液诱导泰国槟榔青果酯酶同工酶的活性比海南槟榔青果强。这为槟榔不同品种的鉴别提供相应的生化测试手段,也为生产者应用推广PGR-1提供一些依据。

小结与讨论

槟榔为热带地区药用植物,属多年生常绿乔木,地处我国热带北缘的海南岛,宜于种植槟榔,惟有生理落花落果严重,管理粗放,产量较低。本试验用PGR-1药液处理,通过电泳检测手段,分析获得上述结果,反映出同一试株不同器官、不同类型的果实或不同品种青果的酯酶同工酶带数目、着色深浅、迁移率快慢和酶活性强弱与对照相比,都有明显的变化,呈现差异在于:带幅从狭变宽、带色由浅变深,种间带位和酶带数目也有差异。据测知,泰国槟榔和海南槟榔带型的递变与酶活性的增强,均比对照的提高1—1.5倍。这说明酶带增多与PGR-1的处理是有一定内在联系的。试验还表明,槟榔酯酶同工酶有带比无带、多带比少带、显带比隐带、宽带比狭带在数量、酶活性的表现程度上作用大,而且带位越低,带条越宽、带色越深、作用越大,增效反应越明显。

另外,值得指出的是,PGR-1处理后,槟榔同一植株的不同器官或者不同品种的不同器官,新酶带的出现是不同的,这是由于不同器官对同一浓度的药液,或者同一器官对不同浓度的药液,诱发生理效应存在差异的缘故。至于槟榔酯酶的生理功能如何?其酶的合成和它的

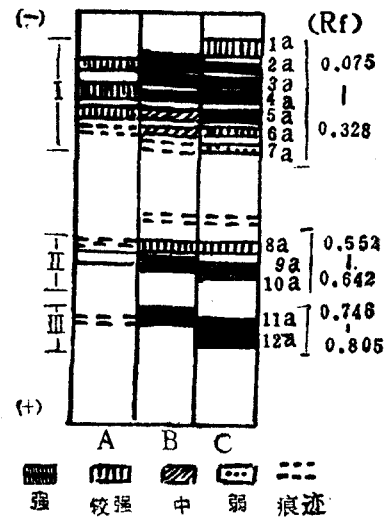


图4 PGR-1对槟榔不同品种青果酯酶同工酶谱的影响
种类: A. CK. B. 海南槟榔; C. 泰国槟榔;
处理: A. oppm; B. C均以100 ppm.

功能活性作用发生在什么水平? 仍有待于今后深入研究与探索。

参 考 文 献

- (1) 何和明: PGR-1 对槟榔叶和果实发育的影响, 中药材, 1988年第5期, p3—6。
- (2) 何和明: PGR-1 对槟榔植株某些生理过程的影响, 海南大学学报(自然科学版), 1988年, 第4期, p20—25。
- (3) Kuhus, L. J., et al. 1978, Distinguishing Rose Cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis.

EFFECTS OF PGR-1 ON THE ESTERASE ISOENZYMES IN ARECA PLANT

He, He Ming

(Department of Biology, Hainan Normal College, Qiongsan)

Liang, Xiang Qiang

(Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou)

Abstract The zymicgram, activity and situation of diploty of esterase isoenzyme in different varieties and different organs of *Areca catechu* were analyzed using technique of polyacrylamide gel-electrophoresis. The results showed that after dealt with PGR-1, the numbers, the activity and the chroma of zymic bands were more than the controlled.

It is clear that the numbers of esterase isozyme in *Areca catechu* was 17. It can be divide into three zone, the first zone has 6, the second zone has 7, and the third has 4. The new zymic bands in different zymic zone is by 11 bands than the controlled. The changing feature of zymic bands is that the width of zymic bands is from narrow to wide, the rate of flow (R. F) is from slow to fast, and the chroma is from weak to dark.

Therefore, the changing of esterase isoenzyme was related to PGR-1 solution.

Key words *Areca*; PGR-1; esterase isoenzyme