

## 沙田柚花粉发育过程中同工酶的变化研究 Q945.62

薛妙男, 颜承, 杨继华

(广西师范大学生物系, 广西桂林 541004)

**摘要:** 分析了沙田柚花粉在发育过程中3种酶的同工酶的活力及类型的变化。结果表明, 过氧化物酶活力在单核期达到最大, 在四分体期与单核期所具有的一条染色较深的快速酶带在双核期消失。 $\alpha$ -淀粉酶活力在成熟期达到最大, 谱带上也表现出在成熟期有酶带的增多。分析酯酶酶谱, 可见其在各个发育时期均有明显的特征带, 这些特征带可作为花粉发育各时期的生化指标。

**关键词:** 沙田柚; 花粉; 同工酶; 发育; 生化指标

中图分类号: Q945.6<sup>+</sup>2 文献标识码: A

## Study on varieties of isozymes during development of pollen of *Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort

XUE Miao-nan, YAN Cheng, YANG Ji-hua

(Biological Department, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

**Abstract:** The varieties of activity and type of three isozymes of shatinyu pollen during the pollen development were analyzed. The results show the activity of peroxidase reach the maximum in its mononuclear stage, A dark dyeing and fast speed enzyme band in the tetrad stage and mononuclear stage disappeared at binuclear stage.  $\alpha$ -amylase activity reached maximum during the mature stage. The diagram indicated the bands increased at mature. We discovered esterase had an obvious character band at the different phase of development of pollen, which can be served as biochemical symbol of the different development phase of shatinyu pollen.

**Key words:** Shatinyu; pollen; isozymes

沙田柚为广西名优果品, 1990年以来, 我们对沙田柚自交不亲和性的细胞学和生物化学基础进行了一系列研究, 积累了不少实验证据<sup>(1~3)</sup>。在此基础上, 对沙田柚花粉在不同发育时期的3种酶的同工酶的变化进行比较研究, 以加深对花粉发育过程中生化过程的认识。

收稿日期: 1999-06-30

基金项目: 国家自然科学基金(项目编号: 3976007)、广西自然科学基金资助项目。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

沙田柚花粉采自桂林广西柑桔研究所实验地, 为 10~15 a 酸砧结果树。分别于 1997、1998 年 4 月盛花期, 收集不同发育时期花粉, 保存于 -80 °C 冰箱中备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 花粉各发育时期同工酶电泳分析

根据花粉发育的 4 个时期: 四分体期、单核期、双核期和成熟期, 分别收集花粉, 保存于 -80 °C 冰箱中, 同时进行电泳分析, 多次重复。

样品制备: 200 mg 样品加提取液<sup>[4]</sup> 1 ml。冰浴中研磨, 离心 (12 000 rpm, 10 min), 上清液作电泳样品。

电泳: 采用聚丙烯酰胺凝胶平板电泳, 不连续系统。凝胶大小为 13 cm × 11 cm × 0.1 cm。分离胶浓度 T=7.5%, 交联度 C=2.6%, pH=8.9, 浓缩胶 T=3%, pH=6.7。电极缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液 (pH=8.3), 稳流 (15 mA) 直至电泳结束。

染色: 过氧化物酶染色用醋酸联苯胺法<sup>[5]</sup>。酯酶染色参考文献<sup>[6]</sup>。淀粉酶染色参考文献<sup>[5]</sup>。

#### 1.2.2 花粉各发育时期酶活力及蛋白质含量分析

样品制备: 方法同电泳分析

过氧化物酶活力测定参考文献<sup>[7]</sup>。淀粉酶活力测定采用 Yoo 改良法<sup>[8]</sup>。

蛋白质含量测定用考马斯亮兰法<sup>[7]</sup>。

## 2 结果

从表 1 可以看出, 随着花粉的发育, 蛋白质的含量呈现上升的趋势, 且在双核期达到最大值 (12.17 单位)。在花粉发育的 4 个时期中, 过氧化物酶和淀粉酶的活力表现出极为明显的变化 (表 1, 图 1)。这两种酶相互之间的活力变化趋势并不表现出正相关, 而且它们与蛋白质含量的变化之间也不表现出正相关。过氧化物酶表现为单核期活力最大 (10.598 单位), 淀粉酶活力整体上呈上升趋势, 在成熟期达到最大值 (1.771 单位)。

在对酯酶、过氧化物酶及  $\alpha$ -淀粉酶的同工酶酶谱的比较中, 可以看出, 随着花粉的发育, 这 3 种酶在不同发育时期表现出酶带上的差异。

其中酯酶同工酶 (图 2), 在发育的 4 个时期均出现了特征酶带, 四分体期  $E_a$  (RF=0.32), 单核期  $E_b$  (RF=0.38) 和  $E_c$  (RF=0.44), 双核期  $E_d$  (RF=0.50), 成熟期  $E_e$  (RF=0.46)。过氧化物酶同工酶 (图 3), 在四分体期和单核期所特有的一条快速酶带  $P_a$  (RF=0.96), 随着花粉发育进入双核期而消失, 在过氧化物酶活力最强的单核期有一条特征酶带  $P_b$  (RF=0.69)。淀粉酶同工酶 (图 4), 酶带  $A_a$  (RF=0.52) 在单核期开始出现直至成熟期, 而且在成熟期又新出现了另一特征酶带  $A_b$  (RF=0.92),

表 1 蛋白质含量及  $\alpha$ -淀粉酶、过氧化物酶活力  
Table 1 The content of protein, the activity of  $\alpha$ -amylase and peroxidase

	四分体期 Tetrad stage	单核期 Mononuclear stage	双核期 Binuclear stage	成熟期 Mature stage
蛋白质含量 Content of protein ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	9.646 4	11.803 8	12.170 5	11.025 9
过氧化物酶活力 Activity of peroxidase ( $\Delta\text{OD}/60 \text{ s} \cdot \text{mg}$ )	9.310	10.598	9.401	6.940
$\alpha$ -淀粉酶活力 Activity of $\alpha$ -amylase ( $\Delta\text{OD}/5 \text{ min} \cdot \text{mg}$ )	0.883	1.203	1.286	1.771

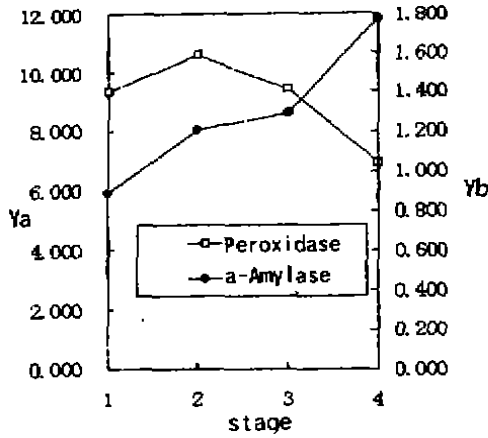


图1 过氧化物酶、淀粉酶活力

Fig. 1 The activity of peroxidase and  $\alpha$ -amylase Ya. The activity of peroxidase ( $\Delta OD / 60 s, mg \text{ protein}$ ) Yb. The activity of  $\alpha$ -amylase ( $\Delta OD / 5 \text{ min}, mg \text{ protein}$ )  
 1. Tetrad stage 四分体期; 2. Mononuclear stage 单核期;  
 3. Binuclear stage 双核期; 4. Mature stage 成熟期.

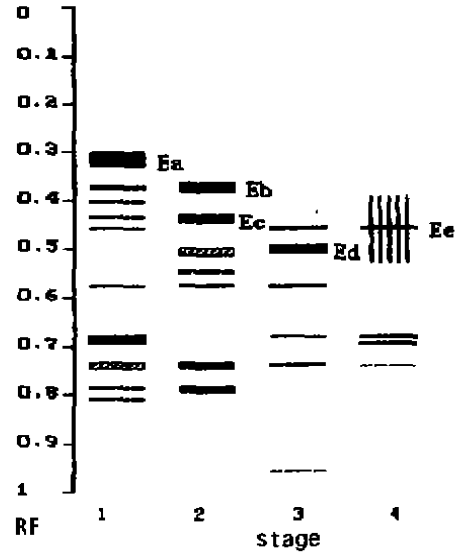


图2 酯酶同工酶谱

Fig. 2 The diagram of esterase isozymes  
 1. Tetrad stage 四分体期; 2. Mononuclear stage 单核期;  
 3. Binuclear stage 双核期; 4. Mature stage 成熟期.

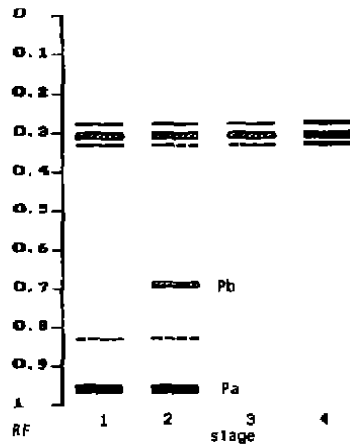


图3 过氧化物酶同工酶谱

Fig. 3 The diagram of peroxidase isozymes  
 1. Tetrad stage 四分体期; 2. Mononuclear stage 单核期;  
 3. Binuclear stage 双核期; 4. Mature stage 成熟期.

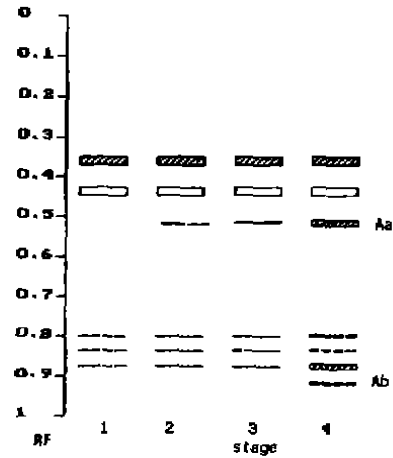


图4 淀粉酶同工酶谱

Fig. 4 The diagram of  $\alpha$ -amylase isozymes  
 1. Tetrad stage 四分体期; 2. Mononuclear stage 单核期;  
 3. Binuclear stage 双核期; 4. Mature stage 成熟期.

### 3 讨论

(1) 过氧化物酶参与了细胞壁中许多结构成分的聚合作用, 在形成复杂的细胞壁结构中起着十分关键的作用<sup>(9)</sup>。本实验结果表明, 在花粉发育的单核期, 过氧化物酶的活力达到最大值, 随后则出现下

降趋势,并且在这一时期,同工酶酶带数最多,出现了一条特征酶带  $P_b$ 。在四分体期和单核期所具有的一条快速酶带  $P_a$  在双核期及成熟期时消失。四分体期和单核期正是花粉壁形成的主要时期,说明花粉中的过氧化物酶至少参与了花粉壁的形成,双核期之后,过氧化物酶活力明显减弱,酶带减少,应与花粉壁在这一时期已基本形成有关。遗传信息在花粉发育过程中顺序表达的现象极为明显。

(2)  $\alpha$ -淀粉酶在植物体内主要催化淀粉的水解。沙田柚花粉发育过程中,淀粉酶的活力在前期处于相对较低的水平,直到成熟时才表现出较强的活性。同工酶酶谱也反映出各酶带含量的增加,  $A_a$  带的量明显高于单、双核期,而且出现了  $A_b$  新酶带。一般认为花粉在发育过程中主要是营养物质的积累,为花粉萌发打基础。实验表明,在花粉的发育前期淀粉酶一直没有高效表达,直到成熟时,淀粉酶活力增强,各同工酶含量增加而且还出现了一条新酶带  $A_b$ 。说明  $\alpha$ -淀粉酶的活力增强,同工酶数量的增加,已经为花粉的萌发,花粉管的生长作好准备。

(3) 酯酶同工酶存在于植物各部位和不同发育时期的细胞中,一般作为研究发育时期基因表达调控的一种标志酶。实验表明,在沙田柚花粉发育过程中酯酶同工酶酶谱变化较大,各个时期均有其特征性的酶带,如四分体期的  $E_a$ , 单核期的  $E_b$  和  $E_c$ , 双核期的  $E_d$  等都可以作为区分花粉发育时期的生化指标。

### 参考文献:

- (1) 薛妙男,陈腾土,杨继华.沙田柚自交和异交亲和性观察[J].园艺学报,1995,2:127~129
- (2) 杨继华,薛妙男,陆景峰.沙田柚自交、异交花柱蛋白的比较分析[J].植物学通报,1996,13(专辑):45
- (3) 杨继华,聂磊,颜承等.沙田柚花粉蛋白的电泳和免疫化学分析[J].生物化学杂志,1997,(专辑):22
- (4) 孙新立,才宏伟,王象坤.水稻同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳方法探索[J].中国水稻科学,1996,10(1):43~50
- (5) 胡能书,万晋国.同工酶技术及其应用[M].湖南:湖南科技出版社,1985.104~110,112~117
- (6) 刘东旭,李子先.不同染色剂对水稻酯酶同工酶电泳显色相对强度差异的影响[J].北京:北京农业大学学报,1992,18(3):251~255
- (7) 张志良主编.植物生理实验指导(第二版)[M].北京:高等教育出版社,1990.154~157,184~186
- (8) 史永昶,姜浦明.五种 $\alpha$ -淀粉酶测活方法的比较研究[J].微生物学通报,1996,23(6):371~373
- (9) 李雄彪,吴琦.植物细胞壁[M].北京:北京大学出版社,1993.57~60