

离体马尾松胚萌发过程中 IAA 及其氧化酶 和生物大分子合成的变化*

吕成群, 黄宝灵

(广西大学林学院, 广西 南宁 530001)

摘要: 离体马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 胚萌发过程中, 过氧化物酶活性逐步增强, 10 h 和 40 h 出现两个剧增期。IAA 氧化酶活性逐渐降低, 10 h 和 40 h 出现两个剧降期。IAA 含量则一直维持上升趋势。同位素前体标记检测表明, 蛋白质合成速率在 5 h 明显提高, 15 h 速率加快, 30~40 h 出现一个平缓阶段, 40 h 后剧增; RNA 合成速率, 在 15 h 以前处于低水平, 15 h 开始加快, 25~30 h 出现一个平缓阶段, 30 h 后速度提高; DNA 合成速率在 40 h 才明显加快。

关键词: 离体马尾松胚; 过氧化物酶; 吲哚乙酸氧化酶; 吲哚乙酸; 生物大分子

中图分类号: Q 945 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700(2002)06-0769-06

Changes of the Biosynthesis of IAA and Its Oxidase and Macromolecules in *Pinus massoniana* Embryos Cultured *in Vitro* during Germination

LU Cheng-Qun, HUANG Bao-Ling

(Forestry College, Guangxi University, Nanning 530001, China)

Abstract: During germination of *Pinus massoniana* embryos cultured *in vitro*, the activity of peroxidase was increased drastically in 10 h and 40 h. The activity of IAA oxidase was decreased drastically in 10 h and 40 h during germination. The experimental results of radioactive isotopes showed: The synthesis rate of protein was evidently raised in 5 h and was quickly raised in 15 h, then the rate was drastically raised after 40 h. The synthesis rate of RNA was lower before 15 h and was quickly raised in 15 h, then the rate was drastically raised after 30 h. The synthesis rate of DNA was evidently raised after 40 h.

Key words: *Pinus massoniana* embryos culture *in vitro*; Peroxidase; IAA oxidase; IAA; Biosynthesis of macromolecule

植物种子的萌发可看作是胚恢复活跃生长的过程。它是胚细胞由休止状态向新的发育过程过渡。在种子胚萌发过程中, 既有成熟种子胚内含贮藏的 mRNA 在萌发前期转录活力尚未恢复时就开始蛋白质合成以及胚内原有的转录产物 RNA 信息的表达和胚细胞基因的重新活化启动, 又有通过新合成 DNA 的转录合成 RNA 和通过 mRNA 的翻译合成新的蛋白质。而

* 收稿日期: 2002-04-15, 2002-07-18 接受发表

作者简介: 吕成群 (1957-) 男, 副教授, 在职博士研究生, 主要从事植物生理生化和分子生物学研究。

IAA 在其中的作用及与这些生物大分子之间的关系如何,尚不清楚。研究种子胚萌发过程中 IAA 和 DNA、RNA 及蛋白质合成的变化规律及相互关系,对于揭示 IAA 的作用机理及种子萌发的调控机理,都有重要意义。本文以木本植物马尾松种胚为材料,研究其萌发过程中 IAA 和 DNA、RNA 及蛋白质的合成动态,探索它们的作用机理、相互关系及变化规律。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 种子由我院造林教研室提供,选取大小、色泽基本一致的种子供实验用。

1.2 离体胚培养

剥取种胚,用 0.1% HgCl_2 消毒 5 min,无菌水冲洗 4 次,于液体培养基中培养。培养基为 1/2MS 的无机成分和有机成分,在黑暗、25℃ 震荡培养,按规定时间分别取出供同位素测定用。为了尽量减少测定放射性的污染和废物,尽量提高测定效率和适当减少工作量,选择的培养时间分别为 0 h, 5 h, 10 h, 15 h, 20 h, 25 h, 30 h, 40 h, 50 h, 60 h。

1.3 过氧化物酶和 IAA 氧化酶活性的测定

将材料迅速放在 0~4℃ 低温冰箱内冰冻,按 1:3 (W/V) 加入 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH6.5) 在冰浴中研磨成匀浆,四层纱布过滤,3 500 r/min 离心 15 min,上清液即为酶粗提取液。

过氧化物酶活性测定参照 Evans (1965) 和 Wittenbach 等 (1975) 的方法。取酶液 200 μl , 分别加入 0.3% H_2O_2 600 μl 和 0.3% 愈疮木酚 2.2 ml, 摇匀,470 nm 处比色,以 1 min 的 OD 值变化作为酶的活性。

IAA 氧化酶活性测定参照 Lee (1971) 的方法。1 ml 酶液加 2 ml 试剂 (1) (198 μg MnCl_2 , 163 μg 二氯酚, 200 μg IAA), 25℃ 暗中保温 30 min 后,加入 2 ml 试剂 (2) (又名 Salkowski reagent), 在于 25℃ 暗中放置 30 min, 530 nm 处比色,以透光率作为酶相对活性。

1.4 IAA 的提取和测定按照华东师范大学 (1980) 的方法。

1.5 DNA, RNA 及蛋白质合成实验

参照孟祥栋等 (1992), Abdul-Baki 等 (1975), Dell 'Auquila 等 (1986) 实验方法。收集分别按规定培养时间的马尾松胚,经洗净消毒后,分别置于 1 ml 不同的处理液中,在培养箱中于 25℃ 下暗中保温,蛋白质合成处理液含 $^3\text{H}\text{-Leu}$ 9 $\mu\text{Ci/ml}$,青霉素 50 $\mu\text{g/ml}$,硫酸链霉素 50 $\mu\text{g/ml}$,保温 5 h,间断摇动通气;DNA 合成处理液含 $^3\text{H}\text{-T}$ 2 $\mu\text{Ci/ml}$,其余同上,保温 3 h;RNA 合成处理液含 $^3\text{H}\text{-U}$ 2 $\mu\text{Ci/ml}$,其余同上,保温 3 h。取出保温一定时间的胚,用自来水冲洗,再分别用冰冷的 10% TCA 和 80% 乙醇冲洗,吸干置于 -20℃ 冰箱中 24 h,然后分别用 10% TCA (蛋白质合成) 和 80% 乙醇 (DNA 和 RNA 合成) 研磨,提取,定容。各提取液都在 3 500 r/min 下离心 15 min。取上清液 0.4 ml,加入 5 ml 闪烁液 (50 g 萘, 4 g PPO, 0.4 g POPOP, 溶于 1 l 二氧六环),于 LKB 液体闪烁计数仪上测定,用 Bq 值表示蛋白质、DNA 及 RNA 合成前体的吸收量。沉淀部分用提取液反复多次冲洗、离心,直至游离标记物冲洗干净。TCA 沉淀加 0.5 mol/L KOH 0.5 ml 于 80℃ 水浴中水解 30 min,加 HCl 中和,取上清液 0.5 ml 加闪烁液测定 $^3\text{H}\text{-Leu}$ 掺入量,表示蛋白质合成量。RNA 合成:沉淀加 0.5 ml 0.5 mol/L 的 KOH 于 50℃ 水浴中水解过夜,加 HCl 中和,取 0.3 ml 水解液加闪烁液测定 $^3\text{H}\text{-U}$ 掺入量,表示 RNA 合成量。DNA 合成:沉淀加 1 ml 5% 高氯酸,70℃ 水解 40 min,50℃ 水解过夜,再加碱中和,取上清液测定 $^3\text{H}\text{-T}$ 掺入量,表示 DNA 合成量。实验均重复 3 次,结果数据为 3 次平均值。

2 结果

2.1 离体马尾松胚萌发过程中过氧化物酶活性、IAA 氧化酶活性和 IAA 含量的变化

从图 1 可以看出,离体马尾松胚萌发过程中过氧化物酶活性和 IAA 氧化酶活性的动态

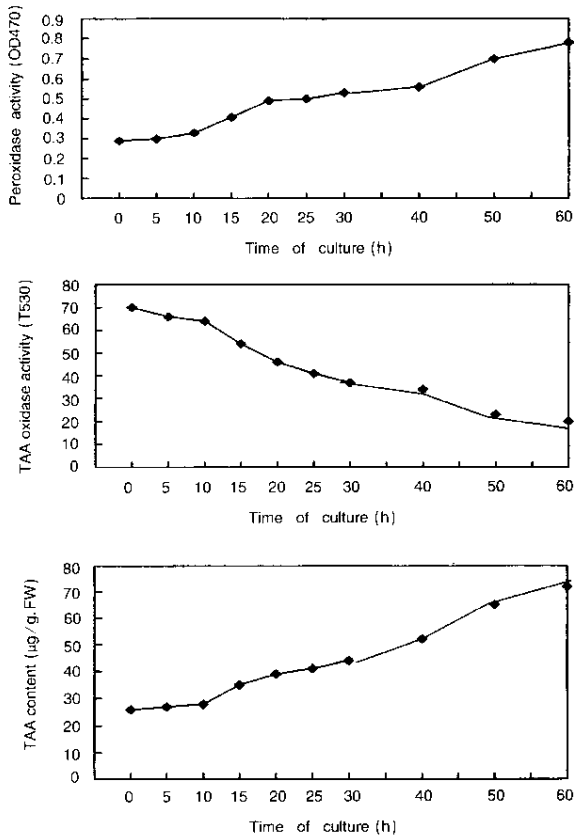


图 1 离体马尾松胚萌发过程中过氧化物酶活性、IAA 氧化酶活性和 IAA 含量的动态变化

Fig. 1 Kinetic changes in the activity of peroxidase and IAA oxidase and the content of IAA during germination of *Pinus massoniana* embryos culture *in vitro*

变化可分为 3 个阶段，第 1 阶段 0~10 h，第 2 阶段 10~40 h，第 3 阶段 40 h 以后。过氧化物酶活性在胚萌发过程中呈上升趋势，但在 10 h 前活性很低，变化较小，10 h 和 40 h 分别出现两个酶活性的剧增期。有趣的是，IAA 氧化酶活性的变化趋势与过氧化物酶活性的刚好相反，萌发过程中呈下降趋势，下降曲线的转折时间与过氧化物酶活性曲线转折时间相吻合，在 10 h 前酶活性变化较小，10 h 和 40 h 分别出现两个酶活性剧降的转折点。IAA 含量的变化则与 IAA 氧化酶活性相反，与过氧化物酶活性变化相似，从萌发一开始，就呈上升趋势，而且随着时间的进程，上升呈不断加快的趋势。

2.2 离体马尾松胚萌发过程中蛋白质合成的变化

由图 2 可见，离体马尾松胚在萌发过程中对蛋白质合成前体³H-Leu 的吸收量，随时间延长不断增加，特别 40 h 后增加较快。前 40 h 吸收较慢可能是种胚吸水吸胀引起的被动吸收（木本种子所需的吸水吸胀期相对较长），40 h 后的吸收较快，增加的部分可能是与吸胀萌发及生长有关的主动吸收引起的。从³H-Leu 对蛋白质的掺入曲线看，萌发一开始就能检测出掺入活性，5 h 时蛋白质合成速率即明显提高，15 h 合成加快。这表明在离体马

尾松胚的萌发过程中，蛋白质合成的启动是非常迅速的。³H-Leu 掺入量在 30 ~ 40 h 出现一个平缓阶段，40 h 后又出现一个剧增。

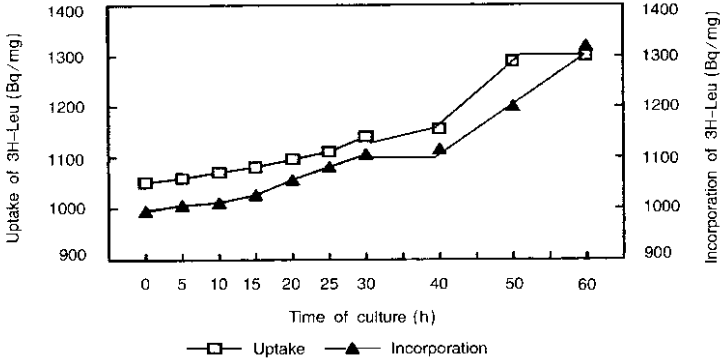


图 2 离体马尾松胚萌发过程中蛋白质合成的动态变化

Fig. 2 Kinetic changes in the synthesis of protein during germination of *Pinus massoniana* embryos culture *in vitro*

2.3 离体马尾松胚萌发过程中 RNA 合成的变化

从图 3 可以看出，离体马尾松胚在萌发过程中，对 RNA 合成前体³H-U 的吸收量和³H-U 对 RNA 的掺入量都呈相似的动力学变化。15 h 以前，一直处于较低水平，15 h 可检测到 RNA 合成前体³H-U 的吸收，表明此时已开始有部分 RNA 合成，25 ~ 30 h 出现一个平缓时期，30 h 后 RNA 合成速率又迅速提高。这表明，马尾松种胚萌发过程中前的 15 h，合成蛋白质所需的各种 RNA 组分主要来源于胚中贮藏 RNA，15 h 时开始既有贮藏 RNA 的表达又有新 RNA 的合成，而 25 ~ 30 h 时出现的平缓期，则是贮藏 RNA 逐渐消失，贮藏 RNA 与新合成 RNA 的转换时期，这种转换完成后，RNA 的合成迅速加快。

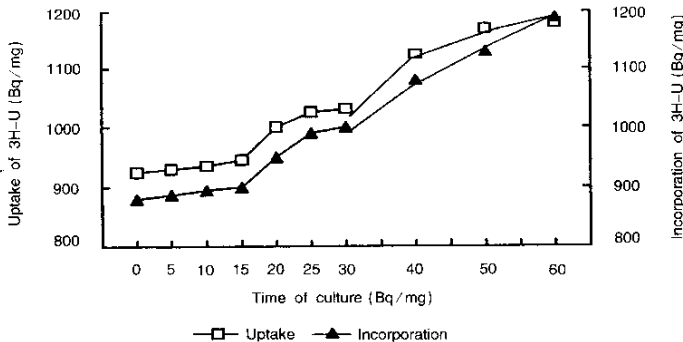


图 3 离体马尾松胚萌发过程中 RNA 合成的动态变化

Fig. 3 Kinetic changes in the synthesis of RNA during germination of *Pinus massoniana* embryos culture *in vitro*

2.4 离体马尾松胚萌发过程中 DNA 的变化

由图 4 可见，离体马尾松胚萌发过程中，对 DNA 合成前体³H-T 的吸收量和³H-T 对 DNA 的掺入量是在 40 h 才明显增快，此前一直维持在较低而平缓的水平。这表明在萌发

到 40 h，离体胚才出现 DNA 合成活性，在这过程中，DNA 恢复复制活性来得较晚。

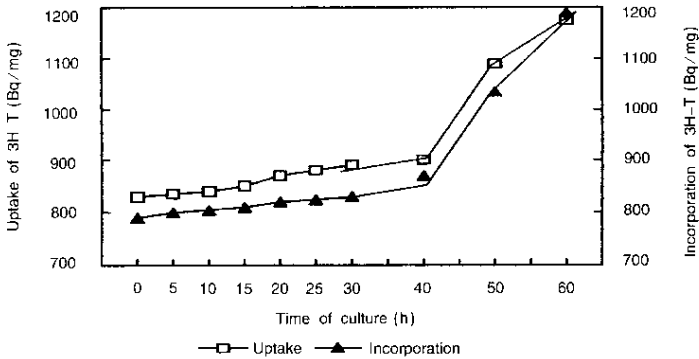


图 4 离体马尾松胚萌发过程中 DNA 合成的动态变化

Fig. 4 Kinetic changes in the synthesis of DNA during germination of *Pinus massoniana* embryos culture *in vitro*

3 讨论

过氧化物酶普遍存在于高等植物中，并在植物的生长发育中起着重要的作用（王定祥，1986；吴登如和赵毓橘，1991），但在植物生长调节中的作用方式尚有争议（徐如涓和赵毓橘，1989；李宗霆，1985；吴登如和赵毓橘，1991），有的认为过氧化物酶具有 IAA 氧化酶的活性，而有的认为它只有过氧化物酶活性而无 IAA 氧化酶活性，或认为它同时具有过氧化物酶和 IAA 氧化酶的活性。本实验结果中，过氧化物酶在离体马尾松胚的萌发一开始就有较高的活性，而且与 IAA 含量呈相反趋势。表明过氧化物酶在离体马尾松胚的萌发过程中只有过氧化物酶活性而无 IAA 氧化酶活性，而 IAA 氧化酶活性降低是 IAA 含量增加的原因。

过氧化物是遗传信息表达较好的标志，它的合成和表达受细胞内外许多因子和一系列基因所调控（唐锡华和潘国桢，1983；Greppin 等，1986；Everse 等，1991；廖祥瑞等，1999），生长素影响基因表达是一个基本的问题。现在普遍认为，IAA 促进生长与 RNA 的关系最大，IAA 促进生长需要蛋白质的合成，也需要 mRNA 的合成。本实验中，离体马尾松胚萌发过程中蛋白质合成在 5 h 即明显提高，15 h 非常迅速，新 RNA 的合成起始于 15 h，IAA 含量和过氧化物酶活性则是 10 h 迅速增加（图 1）。这样的时间顺序关系表明，象其它种子一样，马尾松种胚内也具备完整的蛋白质合成系统和成熟的 mRNA，由于贮藏 mRNA 的存在，使得种胚能在萌发初期转录活力尚未恢复时就开始依靠这些模板进行合成蛋白质。

随着种子吸胀、萌发，生命活动逐渐加强，并伴随着生物大分子的合成，其中 DNA、RNA 和蛋白质的合成是种子萌发的基础。IAA 在促进生长的同时，仅依靠植物体本身现有的蛋白质和 mRNA 是不能维持长久的。IAA 能够导致 mRNA 的合成（曹宗巽和吴相钰，1980），新的 mRNA 翻译为新的蛋白质，从而促进生长。从我们的实验结果（图 2，3）可以看出，RNA 和蛋白质的合成出现一个平缓阶段（RNA 合成在 25~30 h，蛋白质合成在 30~40 h），这个阶段可看作是新旧 mRNA、蛋白质合成的转换时期，贮藏 mRNA 被新的 mRNA 取代仅用 5~10 h，说明这种周转是非常迅速的，这种快速转换可能是 IAA 的作用导致，因为这时的 IAA 仍维持上升的趋势。

离体马尾松胚 DNA 合成的启动晚于蛋白质和 RNA 合成活性的出现，40 h 才明显出现

DNA 的合成, 这与对稻胚 (张兴海和唐锡华, 1986)、小麦胚 (Castroviejo, 1979)、豌豆 (Bray 和 Chow, 1976) 和蚕豆 (Fukuei 等, 1977) 种子等的萌发实验结果是一致的。种子萌发初期的蛋白质合成和 RNA 转录可能具有恢复细胞活力, 激发各种生理生化过程的作用, 为 DNA 复制与细胞分裂提供物质基础。而 DNA 合成一旦开始, 它的速度在短时间内就会迅速增加。此时的过氧化物酶活性出现一个与 DNA 迅速增加的相似的曲线, 随 DNA 合成迅速增加, 活性迅速增加, 这说明过氧化物酶的合成受到某一基因的控制, 当这一基因得到表达后, 过氧化物酶的合成受到促进。

〔参 考 文 献〕

- 华东师范大学生物系植物生理教研组主编, 1980. 植物生理实验指导 [M]. 北京: 人民教育出版社, 184—185
- 李宗霆, 1985. 植物生长物质 [M]. 广州: 华南师范大学出版社, 20—22
- 曹宗翼, 吴相钰, 1980. 植物生理学 [M]. 北京: 人民教育出版社, 280
- Abdul-Baki AA, Chandra GR, 1975. Effect of rapid ageing on nucleic acid protein synthesis by embryonic axes during germination [J]. *Seed Sci Technol*, **5**: 689—698
- Bray CM, Chow TY, 1976. Lesions in post-ribosomal supernatant fractions associated with loss of viability in pea (*Pisum arvense*) seed [J]. *Biochem Biophys Acta*, **442**: 1—13
- Castroviejo M, Tharaud D, Mocquot B, *et al*, 1979. Factors affecting the onset of deoxyribonucleic acid synthesis during wheat embryo germination, Study of the changes in DNA polymerases A, B and C and the pool of DNA precursors [J]. *Biochem J*, **181**: 193—199
- Dell Aquila A, Taranto G, 1986. Cell division and DNA synthesis during osmo-priming treatment and following germination in aged wheat embryos [J]. *Seed Sci Technol*, **14**: 333—341
- Evans JJ, 1965. The distribution of peroxidase in extreme dwarf and normal tomato [J]. *Phytochemistry*, **4**: 499—503
- Everse J, Everse KE, Grisham MB, 1991. Peroxidases in Chemistry and Biology. Vol. 2 [M]. FL, Boca Ration: CRC Press
- Fukuei K, Sakamaki T, Takahashi N, *et al*, 1977. RNA synthesis required for DNA replication in *Vicia* seed embryos [J]. *Plant Cell Physiol*, **18**: 173—180
- Greppin H, Penel C, Gaspar T, 1986. Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases [M]. Geneva: University of Geneva
- Lee TT, 1971. Cytokinin controlled indole acetic acid oxidase isoenzymes in tobacco callus cultures [J]. *Plant Physiol*, **47**: 181
- Liao XR (廖祥瑞), Zhu XC (朱新产), Wan YZ (万怡震), *et al*, 1999. A 6-benzylaminopurine induced cationic peroxidase in grape leaves [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **25** (1): 87—92
- Meng XD (孟祥栋), Li SX (李曙轩), 1992. The relation between vegetable soybean seed vigor and DNA, RNA and perotein synthesis [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **18** (2): 121—125
- Tang XH (唐锡华), Pang GZ (潘国桢), 1983. Studies on the developmental biology of embryogenesis in higher plant. Peroxidase activity, localization, and isozyme patterns in the developing embryo of rice (*Oryza sativa* L. Subsp. Indica) [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **9** (4): 357—365
- Wang DX (王定祥) 1986. Changes in protein content, peroxidase and polyphenol oxidase isozyme pattern during development of pear seedling (*Pyrus bretschneideri* Rehd × *P. Pyrifolia* Burm) [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **12** (1): 40—47
- Wittenbach VA, Bukavc MJ, 1975. Cherry fruit abscission: peroxidase activity in relation to separation [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, **100**: 387—389
- Wu DR (吴登如), Zhao YJ (赵毓橘), 1991. Effect of epibrassinolide on endogenous IAA and Its oxidase in epicotyls of mung bean seedling [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **17** (4): 327—332
- Xu RJ (徐如润), Zhao YJ (赵毓橘), 1989. Effects of epibrassinolide on the activities of peroxidase and IAA oxidase in hypocotyl of cucumber seedlings [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **15** (3): 263—267
- Zhang XH (张兴海), Tang XH (唐锡华), 1986. Sequential activation of the biosynthesis of macromolecules in rice embryos [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **12** (1): 58—64