

生长调节剂对离体银杏叶 苯丙氨酸解氨酶活性的影响

程水源^{1,2}, 王 燕^{1,①}, 刘卫红¹, 杜何为¹, 陈昆松²

(1. 长江大学园艺园林学院, 湖北 荆州 434025; 2. 浙江大学果树研究所, 浙江 杭州 310000)

摘要: 用6种生长调节剂诱导离体银杏 (*Ginkgo biloba* Linn.) 叶苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性, 结果表明: 300 mg · L⁻¹ ETP 诱导作用最强, 其动态诱导在处理4 h后最高; 40 mg · L⁻¹ 2,4-D 诱导效果最强, 并有2个明显的诱导高峰; 200 mg · L⁻¹ CCC 诱导作用最强, 在处理8 h后出现诱导高峰; 除100 mg · L⁻¹ IAA 处理组的酶活性比对照低外, 其他浓度的 IAA 处理均比对照高, 诱导作用最强的是70 mg · L⁻¹ IAA 处理; 除了100 mg · L⁻¹ ABA 处理使酶活性略有降低外, 其他浓度的 ABA 处理都能诱导酶活性升高, 以75 mg · L⁻¹ ABA 诱导能力最强, 在处理4 h后酶活性最大; 4个浓度的 GA 处理中, 仅75 mg · L⁻¹ GA 处理组的酶活性高于对照, 处理8 h后酶活性达到最大。结果说明诱导效果从高至低依次为: 乙烯利 (ETP)、2,4-D、矮壮素 (CCC)、吲哚乙酸 (IAA)、脱落酸 (ABA)、赤霉素 (GA)。

关键词: 生长调节剂; 叶片; 银杏; 苯丙氨酸解氨酶活性

中图分类号: Q945; Q949.64 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2005)01-0020-03

Effects of plant growth regulators on phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activities in leaves of *Ginkgo biloba* in vitro CHENG Shui-yuan^{1,2}, WANG Yan^{1,①}, LIU Wei-hong¹, DU He-wei¹, CHEN Kun-song² (1. College of Horticulture and Garden, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 2. Fruit Science Institute of Zhejiang University, Hangzhou 310000, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2005, 14(1): 20-22

Abstract: The effects of six plant growth regulators on PAL activities in *in vitro* leaves from *Ginkgo biloba* Linn. were studied. The results showed that 300 mg · L⁻¹ ethephon (ETP) had the strongest effect, and the PAL activities were the highest after 4 h. 40 mg · L⁻¹ 2,4-D had the strongest effect with two obvious inducing peaks. 200 mg · L⁻¹ chlorocholine chloride (CCC) had the strongest effect with one inducing peak after 8 h. The PAL activities of IAA treatments except 100 mg · L⁻¹ were higher than that of the contrast (CK), and 70 mg · L⁻¹ IAA had the greatest effect. ABA except 100 mg · L⁻¹ treatment enhanced PAL activities, and 75 mg · L⁻¹ ABA was the optimum treatment. After 75 mg · L⁻¹ ABA treatment 4 h, the PAL activities reached zenith. The PAL activities with GA treatments were lower than that of CK but 75 mg · L⁻¹ treatment, which presented one inducing peak after 8 h. The inducing influences ranked from high to low are ETP, 2,4-D, CCC, IAA, ABA, GA.

Key words: plant growth regulator; leaf; *Ginkgo biloba* Linn.; PAL activity

类黄酮在植物体内合成代谢受多种因子的调节, 酶和内源激素是最主要的调控因子, 其内源激素的调控机理主要是通过调控有关酶活性或者是调控成熟进程来完成的^[1]。苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 是银杏 (*Ginkgo biloba* Linn.) 叶中类黄酮合成代谢的关键酶之一, 植物生长调节剂是如何调控 PAL 活性进而影响银杏叶中类黄酮合成代谢的? 这方面的研究至今未见报道^[1]。因此, 本实验选择银杏叶片为实验材料,

探讨生长调节剂对银杏叶 PAL 活性的影响, 为通过生长调节剂调控银杏叶 PAL 活性从而提高银杏叶黄酮含量提供理论资料。

收稿日期: 2004-03-15

基金资助: 中国教育部科技攻关计划(02095)、湖北省科技重点攻关计划(991P1004)、湖北省自然科学基金(2002AB094)和湖北省青年杰出人才基金(2003AB014)资助项目

作者简介: 程水源(1965-), 男, 湖北天门人, 浙江大学在站博士后, 教授, 主要从事特种植物资源分子生理学研究。

① 通讯作者

1 材料和方法

1.1 材料和处理

银杏叶采自长江大学银杏科技园, 品种为10年生‘家佛手’, 土、肥、水管理水平一致。2002年9月上旬在树冠各方向的极短枝上随机采摘健康的银杏叶片, 取样后迅速用蒸馏水洗净, 并用滤纸吸干水分, 然后浸入盛有不同浓度生长调节剂的培养皿中, 每个处理重复3次(3个培养皿), 每个培养皿放5~6张银杏叶片。

1.2 PAL 提取

采用改进的 Koukol 和 Conn^[2]方法: 叶片用蒸馏水清洗并擦干, 每处理每次取样约0.5 g, 剪碎, 加少许石英砂研碎, 加5 mL 提取液(含PVP、EDTA、巯基乙醇、甘油、0.1 mL·L⁻¹ 硼酸缓冲液, pH 8.8), 继续研磨成匀浆, 4层纱布过滤(以上操作均在低温下进行)。0℃条件下, 滤液于14 000 r·min⁻¹ 冷冻离心20 min, 取上清液(粗酶液)待测定。

1.3 PAL 活性测定^[1]

检测液组成: 3 mL 苯丙氨酸缓冲液, 加0.1 mL 提取液, 对照则不加苯丙氨酸缓冲液。40℃水浴中反应30 min后, 用Jasco V-530紫外可见分光光度计于290 nm下测定光密度值, 以1 h 1 mL 酶液光密度值变化0.01为1个酶活性单位(U)。

2 结果和分析

2.1 离体银杏叶中 PAL 活性的变化

离体银杏叶中 PAL 活性全天变化有3个高峰(图1): 15 min、4 h 和 12 h。PAL 活性最低点在60 min, 仅为最大值的50%。

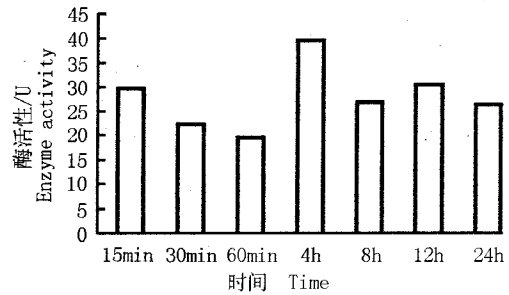


图1 全天离体银杏叶中苯丙氨酸解氨酶活性变化
Fig. 1 The PAL activity changes of *in vitro* leaf of *Ginkgo biloba* Linn. during 24 h

2.2 各种生长调节剂处理对 PAL 活性的影响

离体银杏叶中 PAL 活性在4 h 时最大, 据此, 各种生长调节剂处理对 PAL 活性的影响均定位于4 h 这个时间点与对照进行比较。从表1可知, 不同浓度的各种生长调节剂处理对 PAL 活性的影响各异。除100 mg·L⁻¹ ABA 处理使酶活性略微降低外, 其他3个浓度的 ABA 处理都能诱导酶活性上升, 其中75 mg·L⁻¹ ABA 处理诱导作用最强。4个浓度 CCC 处理均能诱导酶活性上升, 并且随着浓度的升高, 诱导能力也升高: 25 mg·L⁻¹ 处理的酶活性比 CK 增加12.51 U; 浓度增加到200 mg·L⁻¹ 时, 酶活性比 CK 增加33.24 U。4个浓度 ETP 处理均不同程度的诱导酶活性, 其中300 mg·L⁻¹ ETP 诱导作用最强, 酶活性为107.58 U。4个浓度的 GA 处理中, 仅75 mg·L⁻¹ 处理组的酶活性比 CK 高7.10 U。4个浓度的 IAA 处理, 除了100 mg·L⁻¹ 处理组酶活性比 CK 小4.32 U 外, 其他3个浓度 IAA 处理组的酶活性均比 CK 高, 其中70 mg·L⁻¹ 处理组酶活性达63.20 U, 比 CK 增加了23.13 U。2,4-D 的4个处理组都能诱导酶活性, 其中40 mg·L⁻¹ 处理组的酶活性最高。

表1 不同浓度生长调节剂处理4 h 时离体银杏叶中苯丙氨酸解氨酶活性的比较¹⁾

Table 1 Comparison of PAL activities in leaves of *Ginkgo biloba* Linn. *in vitro* treated by different concentrations of six plant growth regulators for 4 h¹⁾

处理组 Treatment	不同处理组的 PAL 活性/U						PAL activities of different treatment groups
	ABA	CCC	ETP	GA	IAA	2,4-D	
1	37.42(100)	72.69(200)	72.48(400)	31.27(100)	35.13(100)	64.00(100)	39.45
2	52.20(75)	61.18(100)	107.58(300)	46.55(75)	63.20(70)	67.37(70)	39.45
3	40.77(50)	58.03(50)	53.35(200)	30.73(50)	43.47(40)	73.42(40)	39.45
4	49.04(25)	51.85(25)	49.36(100)	13.40(25)	55.33(10)	44.18(10)	39.45

¹⁾ 括号内数字表示生长调节剂的浓度 The numbers in parenthesis indicate concentrations of plant growth regulators (mg·L⁻¹).

2.3 各种生长调节剂的最佳浓度对 PAL 活性影响的动态分析

各种生长调节剂的最佳处理浓度对 PAL 活性的动态影响如表 2。从表 2 可知, 75 mg · L⁻¹ ABA 处理后 15 min 的酶活性比 CK 小 14.42 U; 1 h 后, 酶活性上升, 在 4 h 时达到最大(52.20 U); 12 h 后, 酶活性降低, 比 CK 低 2.50 U; 24 h 时酶活性又高于 CK。200 mg · L⁻¹ CCC 处理后 15 min, 酶活性高于 CK; 处理后 1 h、4 h、8 h, PAL 活性均处于较高水平, 分别比 CK 增加 52.60 U、33.24 U、53.06 U; 处理后 12 h 和 24 h 后诱导能力急剧下降, 但仍比 CK 分别高 2.90 U 和 5.45 U。从 300 mg · L⁻¹ ETP 诱导动态来看, ETP 并非一直促进酶活性的上升, 相反, 在大多数情况下, 酶活性比 CK 小。75 mg · L⁻¹ GA 处理前 30 min 内酶活性比 CK 小, 1 h 后酶活性高于 CK, 处理 8 h 酶活性达最高值 52.08 U。70 mg · L⁻¹ IAA 处理诱导酶活性一直处于较高水平, 最高峰出现在处理后 4 h。从 40 mg · L⁻¹ 2,4-D 诱导动态来看, PAL 活性在 30 min 时达到最高值 81.00 U。

表 2 最佳浓度生长调节剂对离体银杏叶片苯丙氨酸解氨酶活性的动态影响
Table 2 The dynamic effects of optimum concentration of plant growth regulators on PAL activities in leaf of *Ginkgo biloba* Linn. *in vitro*

生长调节剂 Growth regulator	浓度/ mg · L ⁻¹ Conc.	不同时间的 PAL 活性/U PAL activities at different time						
		15 min	30 min	60 min	4 h	8 h	12 h	24 h
CK		29.75	22.43	19.50	39.45	26.61	30.20	26.05
ABA	75	15.33	16.10	34.33	52.20	29.93	27.20	28.40
CCC	200	30.32	30.18	72.10	72.69	79.67	33.10	31.50
ETP	300	14.62	26.66	15.40	107.58	24.94	8.80	22.45
GA	75	11.75	19.45	39.30	46.55	52.08	43.38	26.30
IAA	70	48.20	46.24	40.80	63.20	63.00	35.03	38.20
2,4-D	40	63.93	81.00	33.00	73.42	26.98	24.40	36.23

3 讨 论

离体银杏叶中 PAL 活性在 4 h 时有 1 个活性高峰, 用 6 种生长调节剂诱导离体银杏叶片, 其 PAL 活性在 4 h 时也都有 1 个较为明显的诱导峰。按诱导后 4 h 的酶活性最大值为指标, 诱导效果从高至低依次为: ETP、2,4-D、CCC、IAA、ABA、GA, 这与 Montero 的研究结果相似^[3]。乙烯可能是植物 PAL 诱导表

达的内源信号分子, 所以 ETP 表现最为活跃, 有人甚至认为乙烯可能是植物中的第二信使^[4]。2,4-D、CCC、IAA 和 ABA 均能诱导 PAL 活性, GA 效果不明显, 甚至使酶活性降低, 这和前人的报道类似^[3,5,6]。ABA 能诱导 ETP 的合成, 这与 ABA 促进器官脱落和加速衰老等生理功能有关, 并且这种作用在植物幼嫩组织、成熟组织和衰老组织中是不同的, 本实验中 ABA 诱导作用不强, 可能与叶片的采集时间及叶龄有关。

从动态影响来看, 各种生长调节剂处理的效果受时间影响较大。如 GA 处理 8 h 后, 酶活性比 CK 高 25.47 U, 因此, 不能简单认为 GA 没有诱导效果或者说效果不明显。同时, 可观察到在 60 min 内, 大多数处理组的 PAL 活性已产生了比较明显的波动效果, 反应时间很短, 这说明生长调节剂处理可能在转录水平影响酶活性。所用的 6 种生长调节剂对离体银杏叶中 PAL 活性的影响与其处理浓度和作用时间都有很大的关系, 这可能与离体叶片的营养水平、内源激素的丰亏与平衡有关, 也可能与内源激素之间的相互作用有关^[1,7]。

参考文献:

- [1] 程水源. 影响银杏叶黄酮形成的主要因子及调控技术的研究 [D]. 泰安: 山东农业大学园艺学院, 2001.
- [2] Koukol J, Conn E E. The metabolism of aromatic compounds in high plant IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Herdeum vulgare* [J]. *Journal of Biology and Chemistry*, 1961, 236: 2692-2698.
- [3] Montero T. Effects of gibberellic acid on strawberry PAL (phenylalanine ammonia-lyase) and TAL (tyrosine ammonia-lyase) enzyme activities [J]. *Journal of the Science of food and Agriculture*, 1998, 77(2): 230-234.
- [4] Hughes R K, Dickerson A G. The effect of ethylene on phenylalanine ammonia-lyase (PAL) induction by a fungal elicitor in *Phaseolus vulgaris* [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1989, 34(4): 361-378.
- [5] Max C. External control of anthocyanin formation in apple [J]. *Scientia Horticulture*, 1990, 42: 181-218.
- [6] 王永章, 张大鹏. 乙烯对成熟期红星苹果果实碳水化合物代谢的调控 [J]. *园艺学报*, 2000, 27(6): 391-395.
- [7] 程水源, 陈昆松, 刘卫红, 等. 植物苯丙氨酸解氨酶基因的表达调控与研究展望 [J]. *果树学报*, 2003, 20(5): 351-357.

(责任编辑: 张垂胜)