

杉木转化酶活力的研究*

周国璋 苏梦云

关键词 杉木、生长速率、转化酶活力

在高等植物器官中有转化酶(E. C. 3. 2. 1. 26)的存在已有很多报道,早在 60 年代不少学者已注意到植物体内的转化酶与细胞伸长有密切关系。Hellehust 等^[1]从玉米胚根的研究中发现:细胞在分化时期,转化酶的活力很低;当细胞开始延长时,酶的活性便增加;当细胞停止延长进入成熟期时,酶活力再度下降。李立人等^[2]发现,转化酶活力与竹笋的生长速度呈正相关。在短叶果松(*Pinus edulis* Engelm.)种子萌发期,转化酶活力与胚根、胚轴和子叶的生长呈显著正相关^[3]。在甘蔗幼嫩的节间组织中,转化酶活性与节间的延长速度也存在直接的相关性^[4]。

杉木(*Cunninghamia lanceolata* (Lanb.) Hook)是我国南方的重要速生用材树种,从生长与代谢关系方面来研究杉木速生的生理生化基础报道极少。本文主要对杉木转化酶的活力及其与生长之间的关系作初步研究,试图从碳水化合物代谢方面探索杉木速生性的生理生化基础,以探讨将转化酶活力作为杉木早期生化预测指标的可能性。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

杉木试验苗取自本所试验苗圃,为已鉴定过的速生型和慢生型无性系苗(1年生和2年生)。在生长季节(7月28日至8月9日)取当年抽生的顶梢、主干上当年生未分枝的侧枝、具有分生枝的侧枝顶梢和分生枝、及其着生在中部叶片,分别制样,用于转化酶活力测定。两类型比较试验采用单株测定,每类型无性系各测3株(1年生苗)。

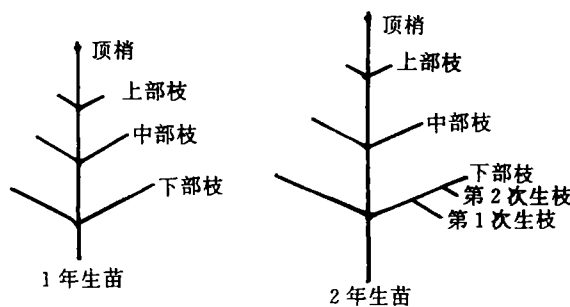


图1 当年抽生主梢上侧枝示意图

转化酶活力分布试验的取样部位见图1,枝叶的质地状况见表1。

1.2 酶的制备

样品以1:6(W/V)加入磷酸-柠檬酸缓冲液(0.05 mol/L, pH5.0)研磨成匀浆,在低温下

1994-08-09 收稿。

周国璋副研究员,苏梦云(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江富阳 311400)。

* 本文为1994~1996年中国林业科学研究院基金项目“杉木无性系早期预测生化指标及其评定标准的研究”内容之一。

表 1 杉木试样的质地状况

部 位	1 年 生 苗 木		2 年 生 苗 木	
	小 枝	叶 片	小 枝	叶 片
顶梢	—	幼叶,黄绿色	—	—
上部枝	未木质化	嫩叶,淡绿色	未木质化	嫩叶,绿色
中部枝	木质化	成龄叶,绿色	木质化	成龄叶,绿色
下部枝	木质化	成龄叶,绿色	半木质化	嫩叶,绿色
第一次生枝	—	—	半木质化	嫩叶,绿色
第二次生枝	—	—	未木质化	嫩叶,淡绿色

静置提取 30 min, 用 2 层纱布挤压过滤, 再经脱脂棉过滤即为粗酶液, pH 和底物浓度对转化酶活力影响试验以 1 年生苗的嫩叶作试材。粗酶液加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至饱和度达 80%, 在 0 °C 下静置 1 h, 以 4 500 rpm/min 离心 10 min, 沉淀物加入 3 倍体积的冷丙酮, 立即抽滤, 吹干后即得丙酮粉。丙酮粉再用 0.01 mol/L 磷酸-柠檬酸缓冲液 (pH 5.0) 提取后作酶活力测定。

1.3 酶活力测定方法

在试管中加入 0.05 mol/L 磷酸-柠檬酸缓冲液 (pH 5.0) 2 mL, 0.3 mol/L 蔗糖溶液 2 mL, 加 2 滴甲苯, 于 35 °C 水浴中预热 10 min, 再加入 1 mL 酶液开始反应, 保温 60 min 后吸取 1 mL 反应液, 立即加入到煮沸的 Somogyi 溶液中, 按 Somogyi 法^[5]测定还原糖。另外用煮沸酶液进行同样处理作对照。酶活力以每克鲜重(或每毫克蛋白质)每小时水解蔗糖的微克分子数表示。

1.4 还原糖含量测定

新鲜叶片经 110 °C 杀青 5 min 后, 于 60 °C 烘干至恒重, 粉碎过 60 目筛。用 80% 乙醇提取, 按二硝基水杨酸法测定还原糖含量。

1.5 蛋白质含量测定

按 Folin-phenol 试剂方法进行测定。

2 试验结果

2.1 杉木转化酶的性质

2.1.1 贮藏对转化酶活力的影响 将酶提取液贮藏在 4 °C 下, 对转化酶活力的影响较大。贮藏 1 d 后, 嫩叶中的转化酶活力丧失 55.6%, 嫩枝中的转化酶稳定性更差, 贮藏 1 d 后, 其活力丧失 86.3% (表 2)。

表 2 贮藏对杉木转化酶活力的影响

材料	贮藏温度 (°C)	贮藏天数 (d)	转化酶相对活力 (%)
嫩叶	4	0	100
		1	44.4
嫩枝	4	0	100
		1	13.7

2.1.2 pH 对转化酶活力的影响 各 pH 条件下测得的杉木叶片转化酶活力见图 2, 最

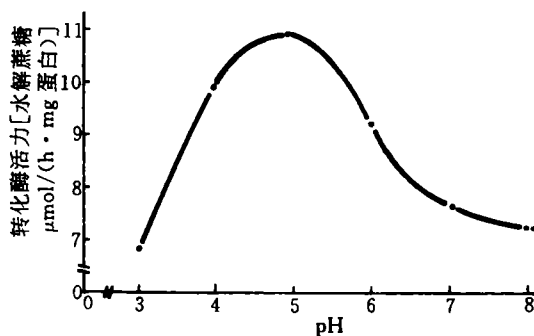


图 2 不同 pH 对杉木叶片转化酶活力的影响

适 pH 为 5.0。

2.1.3 底物浓度对酶活力的影响 底物浓度对酶活力的影响是酶性质的重要特征。在 35 ℃ 和 pH 5.0 条件下,测定了不同底物浓度(0~0.3 mol/L)对杉木叶片转化酶活力的影响,以 Lineweaver-Burk 作图法得杉木叶片转化酶米氏常数 K_m 为 9.3×10^{-2} mol(图 3)。

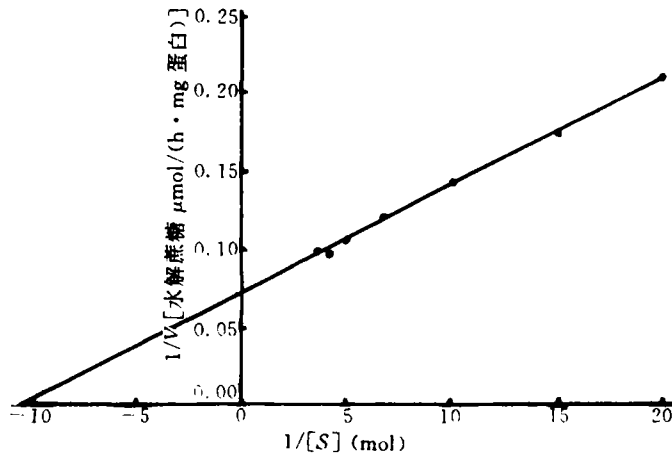


图 3 底物浓度对杉木叶片转化酶活力的影响

2.2 转化酶在不同部位叶片中的活力分布

当年生主梢上不同部位的叶片转化酶活力存在明显差异。叶片越幼嫩转化酶活力越高。在 1 年生苗中,以顶梢幼叶酶活力最高,从上到下逐渐减弱(表 3)。从表 3 可以看出,2 年生苗当年主梢上侧枝叶片的转化酶活力,一般要低于 1 年生苗上相应部位叶片的酶活力。在 2 年生苗下部枝条上的次生枝间,以第 2 次生枝叶片的转化酶活力最高。

表 3 杉木当年主干上不同部位叶片转化酶活力比较

叶片着生部位	转化酶活力 [单位:水解蔗糖 $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{gFW})$]	
	1 年生苗	2 年生苗
顶梢	11.50	—
上部枝	3.11	1.85
中部枝	1.83	1.59
下部枝	1.57	1.57
第 1 次生枝	—	1.57
第 2 次生枝	—	2.08

2.3 不同生长速率的两类杉木无性系苗转化酶活力比较

在生长速率不同的超₂₂和开₄两类杉木无性系间,超₂₂(速生型)无性系苗的转化酶活力要高于开₄(慢生型)无性系苗,尤其以嫩枝间的酶活力差异最大,速生型无性系是慢生型无性系的 5 倍多。顶梢叶片间的酶活力差异略大于上部枝条叶片间的酶活力差异(表 4)。

表 4 两类生长速率类型无性系苗转化酶活力差异

苗木类型	苗高 (cm)	转化酶活力[水解蔗糖 $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{gFW})$]		
		幼叶	嫩叶	嫩枝
超 ₂₂ (速生型)	69	11.57 ± 0.03	5.20 ± 0.10	22.66 ± 0.03
开 ₄ (慢生型)	45	7.96 ± 0.02	4.17 ± 0.08	4.20 ± 0.06

从两类不同生长类型的无性系苗叶片的还原糖含量来看,速生型无性系苗叶片中的还原糖含量低于慢生型叶片中的含量(表 5)。

表 5 两类生长速率类型无性系苗叶片还原糖含量比较

苗木类型	还原糖含量 (mg/gFw)	
	顶梢叶片	嫩枝叶片
超 ₂₂ (速生型)	31.43±0.02	35.85±0.07
开 ₄ (慢生型)	47.42±0.03	46.75±0.09

3 讨 论

(1)在本实验条件下,杉木叶片转化酶活力在 pH5.0 时最强,这与大多数植物中的转化酶性质相似。但在有些植物中,如甘蔗茎中不同幼嫩或老化的组织存在着两种最适 pH 不同的转化酶^[4],在大豆根尖不同分化程度的细胞中也存在着两种性质不同的转化酶^[6]。不过在玉米胚根的不同成熟程度细胞中的转化酶性质没有特征性变化^[1]。在杉木不同成熟度叶片中,以及叶片与嫩枝中的转化酶究竟是一种还是两种,有待进一步研究。

(2)杉木叶片转化酶的 K_m 值为 9.3×10^{-2} mol。它略高于竹笋转化酶的 K_m 值 6.6×10^{-2} mol,比玉米胚根中转化酶的 K_m 值 6.0×10^{-3} mol 却要高得多。这表明杉木叶片转化酶对蔗糖的亲和力比上述两种植物中的转化酶要低。

(3)Robinson 和 Brown^[6]曾指出:细胞生长与代谢状况的变化有密切关系。不少研究报道了转化酶活力与组织扩大生长的相关性^[7~9],本研究也清楚地说明了这一点;幼嫩叶片的细胞仍处于生长状态,而成龄叶片基本定型,细胞趋于成熟,所以幼嫩叶片的转化酶活力高于成龄叶片。从超₂₂和开₄两类不同生长速率的无性系苗比较来看,超₂₂(速生型)苗幼嫩叶片转化酶活力比开₄(慢生型)苗要高。这说明前者的叶片处于较活跃的生理状态,有利于抽枝发叶及其生长;而后者叶片转化酶活力较低。幼叶生长较缓慢,影响着进一步萌发新枝新叶,可能也影响着生长速率。可以认为转化酶活力与相对生长速率具有一定的相关性。

(4)超₂₂(速生型)无性系苗叶片中的还原糖含量没有开₄(慢生型)苗叶片中高。表现出转化酶活力与还原糖含量呈负相关,这与竹笋中的结果相一致^[2],但在豌豆^[10]和食松^[3]中,转化酶活力与还原糖含量呈正相关。Sacher 等^[11]认为:转化酶催化反应的产物能抑制转化酶本身的合成,形成一个反馈的控制系统。本试验的结果似乎与此论点相吻合,但是否是一个因果关系还不清楚。

转化酶将 1 分子蔗糖水解为 2 分子单糖,因而能降低细胞的渗透势(ψ_s),从而促进细胞从外界吸收水分,利于迅速生长。而生成的还原糖可作为呼吸的基质和用于细胞的多糖合成^[2]。此外,从赤霉素促进转化酶合成^[12]的证据来看,也可说明转化酶活力与生长的相关性。

参 考 文 献

- 1 Hellebust J A, Forward D F. The invertase of corn radicle and its activity in successive stages of growth. Can. J. Bot., 1962, 40: 113~126.
- 2 李立人,包慈华,蔡静娟,等.竹笋的转化酶及其与笋体生长速度的关系.植物生理学报,1979,5(1):65~70.
- 3 Murphy J B, Rutter M R, Hammer M F. Activity of sucrose synthase and soluble acid invertase following germination of pinyon (*Pinus edulis*) seed. Can. J. For. Res., 1992, 22(4): 442~446.

- 4 Hatch M D, Glasziou K T. The sugar accumulation cycle in sugar cone. I. Relationship of invertase activity to sugar content and growth rate in storage tissue of grown in controlled environments. *Plant Physiol.*, 1963, 38: 344~348.
- 5 Somogyi M. Notes on sugar deterrent. *J. Biol. Chem.*, 1952, 195: 19~23.
- 6 Robison E, Brown R. Enzyme changes in relation to cell growth in exised root tissues. *J. Exptl. Bot.*, 1959, 9: 430~435.
- 7 Morris D A, Arthur E D. An association between acid invertase activity and cell growth during leaf expansion in *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.*, 1984, 35: 1369~1379.
- 8 Sung S-J, S. Xu D-P, Galloway C M, et al. A reassessment of glycolysis and gluconeogenesis in higher Plants. *Physiol. Plant.*, 1988, 72: 650~654.
- 9 Chapleo S, Hall J L. Sugar unloading in roots of *Ricinus communis* L. I. The characteristics of enzymes concerned with sucrose catabolism and a comparison of their distribution in root and shoot tissues. *New Phytol.*, 1989, 111: 369~379.
- 10 MacLachlan G A, Datko A H, Rollit J, et al. Sugar levels in the pea epicotyl; regulation by invertase and sucrose synthase. *Phytochemistry*, 1970, 9: 1023~1030.
- 11 Sacher J A, Hatch M D, Glasziou K T. Regulation of invertase synthesis in sugar cone by an auxin-sugar-mediated control system. *Plant Physiol.*, 1963, 16: 836~842.
- 12 Kantman P B, Ghosheh Najati, Ikuma Hiroshi. Promotion of growth and invertase activity by gibberellic acid in developing *Avena* internodes. *Plant Physiol.*, 1968, 43: 29.

Study on Invertase Activity in Seedlings of Chinese Fir

Zhou Guozhang Su Mengyun

Abstract This paper reports the study of invertase activity in seedlings of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*). Results obtained from several determinations indicated that the enzyme activity was the highest during pH 5.0 and Michaelis constant was 9.3×10^{-2} mol. When the enzyme extracts were stored at 4 °C for 24 h, invertase activity in leaves and shoots decreased by 55.6 and 86.3 percent, respectively. There were differences of invertase activity among the leaf at the top, young leaf and mature leaf. The enzyme was most active in the leaves at the top of the seedlings and the enzyme activity in mature leaves was the lowest. They were 11.50, 3.11 and 1.57 sucrose hydrazed $\mu\text{mol/h} \cdot \text{g}$ of fresh weight respectively. But invertase activity in young branchlet was five times as high as that in young leaves on the branchlet. Higher invertase activity was found in the fast growing clone seedlings than that in the slow growing clone seedlings. Correlation between invertase activity and seedling growth rate, and the possibility of determinating seedling growth potential by level of invertase activity were discussed.

Key words Chinese fir, growth rate, invertase activity

Zhou Guozhang, Associate Professor, Su Mengyun (The Research Institute of Subtropical Forestry, CAF Fuyang, Zhejiang 311400).