

细毛樟实生苗同工酶的初步研究*

曾 英 程必强

(中国科学院昆明植物研究所)

关键词 细毛樟; 精油; 同工酶

细毛樟(*Cinnamomum tenuipilum* Kostern)系樟科樟属植物, 根据精油主成分的不同将细毛樟分为不同的化学型, 如细毛香樟(香叶醇 geraniol 为精油主成分)、细毛芳樟(芳樟醇 linanol 为精油主成分)等。在引种驯化的过程中发现细毛樟种子苗精油主成分变化相当大, 一般解释为遗传分离的结果。本文以细毛香樟和细毛芳樟的种子苗为材料, 研究樟叶在生化实验中的一些内源干扰问题, 探讨子代精油变异与同工酶的关系, 为系统地研究细毛樟精油的生物合成控制打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

采用西双版纳勐峇植物园, 细毛香樟和细毛芳樟母树自然授粉结实的种子苗, 经本所温室栽培, 取苗龄一年半生细毛香樟种子苗共四株(G₁、G₂、G₃、G₄), 细毛芳樟种子苗共二株(L₁、L₂)作试材。

1.2 方 法

1.2.1 精油的提取和分析 叶片经水蒸汽蒸馏、乙醚萃取得精油, 成分分析由本所植化室完成。

1.2.2 电泳样品的制备

(1) 提取缓冲液 0.1 M磷酸缓冲液(pH=6.5)内含: 0.2M蔗糖; 10 mM 偏重亚硫酸钠; 5 mM 乙二胺四乙酸二钠; 5 mM 抗坏血酸; 3 mM 二硫苏糖醇; 0.5%牛血清白蛋白。

(2) 幼芽和叶片处理 洗净吸干后称取0.5 g 剪碎, 在液N下冷冻研磨成粉, 加入预冷的提取缓冲液1 ml, 在4℃下提取30 min, 冷冻离心10 min, 转速18 000 rpm, 幼芽的上清液留做电泳, 叶片的上清液需进一步处理。

(3) 样品的酶处理 叶片提取液异常粘稠, 加入蜗牛酶(上海产)或纤维素酶(日本产)使最终酶浓度为30 μg/ml, 室温21℃放置, 一定时间后样品不再牵丝, 认为可以用作电泳, 同时将纤维素酶和蜗牛酶用提取缓冲液配成30 μg/ml 的溶液, 与酶解样品一起电泳。

(4) 组织冻融法制备酶液 叶片洗净吸干后, 剪成0.5 cm²的小方块, 液N冷冻1 min, 置于37℃保温3 min, 上述两步骤重复3次后冷冻离心(18 000 rpm, 25 min)得淡黄色组织液, 对半加入预冷的提取缓冲液, 直接上样电泳。

本文于1990年10月25日收到。

* 本文承周俊教授给予经费支持, 季本仁老师具体指导, 谨表谢意。

1.2.3 同工酶电泳 采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳^[1]，4℃水循环。浓缩胶4%，分离胶6%，脂酶同工酶电泳分离胶浓度为7%。过氧化物酶同工酶用联苯胺-过氧化氢染色法。

2 结果与讨论

2.1 子代精油变异

在分析的6个单株中，没有发现能保持亲本精油主成分的种子苗，而是以甲基丁香酚(methyl eugenol)或榄香素酯(elemicin)为主，其中G₁和G₂的精油主成分是甲基丁香酚，L₁、L₂、G₃、G₄的精油主成分是榄香素酯，这与我们先前发表的结果是一致的，即有性繁殖后代实生树叶油成分发生了很大的变化，与亲本的完全不同。就生物合成的角度看，香叶醇和芳樟醇在植物体内通过异戊二烯代谢途径合成，甲基丁香酚和榄香素酯一般认为是由另一条次生代谢途径即莽草酸途径合成的^[2]，也就是说，在亲本和子代，这两条次生代谢途径对精油合成的贡献各有主次，其中的调控机制尚不清楚。根据无性繁殖的后代都保持了亲本的化学类型，可认为亲代化学型的划分只是表型划分，不是遗传型划分，子代精油的变异可能源于有性繁殖过程中性状分离的结果。

2.2 细毛樟叶片用于酶学研究遇到的内源干扰

在以伸展的幼叶或成年叶片为材料的提取过程中，发现提取液异常粘稠。事先将材料用-20℃的丙酮抽提或提取液经硫酸铵沉淀，均不能去除样品的粘性。按Redgwell^[3]的方法抽提粘液并用氯仿-正丁醇(4:1)进一步纯化，冰冻干燥后得到白色疏松的样品，用蒽酮法^[4]和咔唑法^[5]检测到一定含量的多糖及糖醛酸，认为粘性是大分子多糖所致。由于样品很粘，电泳时无法上样，尝试用一定的多糖水解酶处理样品。经实验发现纤维素酶和蜗牛酶的效果较好，在30 μg·ml⁻¹的作用浓度下样品经6~10 h酶解后不再牵丝，能正常电泳，而且纤维素酶和蜗牛酶不干扰过氧化物酶的显色反应(图1)，认为多糖水解酶可以有效地克服细毛樟的粘性给同工酶电泳造成的困难。在其他植物如猕猴桃、芦荟等都发现有植物粘液质(plant mucilage)，粘液质属于具粘性的多糖类，与果胶质及海藻胶质都不同，用硫酸铵、重金属盐、乙醇、丙酮等蛋白质沉淀剂均不能沉淀^[6]。细毛樟叶片用于生化研究时，植物粘液质成为主要的内源干扰，就过氧化物酶同工酶来看，用纤维素酶和蜗牛酶处理样品可以消除干扰，获得满意的电泳效果。

通过组织冻融并高速离心获得的组织液用作过氧化物酶同工酶电泳，效果与酶解样品相同，均可得到丰富的酶谱带(图2)，这将是减少叶片提取物内源干扰的另一条途径。冻融处

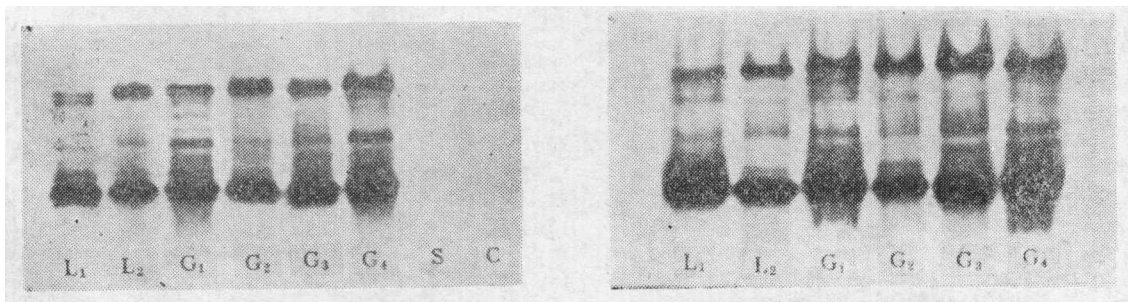


图1 叶片酶解样品的过氧化物酶同工酶谱
S: 蜗牛酶, C: 纤维素酶

图2 叶片冻融离心液的过氧化物酶同工酶谱

理植物组织,使其细胞膜系统破坏,含自由酶蛋白的组织液经高速离心收集,0.5g样品可得到0.1~0.2ml组织液。早在1974年,Rhodes等就报道了体内测定浮萍酶活性的方法^[7],即组织冻融加真空渗透酶反应底物,所得酶活性及酶动力学特征与常规无细胞提取物相当。从Wilden^[8]抽提细胞间液的实验进一步得到启示,经过反复实验认为细毛樟叶片经冻融处理加上高速离心,所得的组织液具有较高的过氧化物酶活性,样品有轻微的粘性,但不影响上样和电泳,与酶解样品比较,除有轻度拖尾外,同工酶谱带完全一致(图2)。其它活性酶特别是与膜结合的酶蛋白能否用类似的方法抽提得到,还有待研究。

2.3 同工酶与精油成分变异

幼芽和叶片过氧化物酶同工酶谱带(图1~3)可以看到,6个子代苗无论是幼芽还是叶片的同工酶谱都具有很大的相似性,如L₂与G₂的同工酶谱一致,其它的细微差异与子代的化学类型似乎没有关联,同样说明这两种细毛樟化学型的划分是表型的划分,它们原属遗传性极其相似的同一个种。至于细毛樟种子苗精油成分变异的生化基础可能是代谢途径

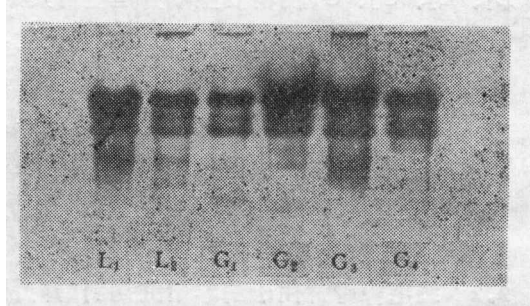


图3 幼芽的过氧化物酶同工酶谱

上的调节酶,如果我们拥有必要的酶反应物及合适的研究体系,就有可能研究两条次生代谢途径在亲本与子代间转化的酶学基础。

参 考 文 献

- [1] 张龙翔等,1981,生物化学实验方法和技术,人民出版社,94~111.
- [2] Goodwin, T. W. et al., 1983, Introduction to plant biochemistry, Oxford: Pergamon Press. 400~464.
- [3] Redgwell, R. T., 1983, Composition of *Actinidia mucilage*, *Phytochem.*, 22, 951~956.
- [4] 上海植物生理学会, 1985, 植物生理实验手册, 上海科学技术出版社, 134~138.
- [5] Bitter, T. et al, 1962, A modified uronic acid carbazole reaction, *Anal. Biochem.*, 4, 330~334.
- [6] 町田诚之, 1960, 大有机化学(第20卷), 朝令书店.
- [7] Rhodes, D. et al., 1974, A procedure for the *in vivo* determination of enzyme activity in higher plant tissue, *Planta*, 118, 133~144.
- [8] Wilden, W. et al., 1983, Cell walls of *Phaseolus vulgaris* leaves contain the azocoll-digesting proteinase, *Plant Physiol.*, 73, 576~578.

*Primary Studies on Isozymes in the Progeny of
Cinnamomum tenuipilum Kostern*

Zeng Ying Cheng biqiang

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

Abstract Two chemotypes of *Cinnamomum tenuipilum* Kostern are involved in this study. The essential oil from leaves in one type is composed principally of geraniol, and in the other, it is very rich in linanol. Their progeny was obtained by open hybridization. However the main composition of essential oil from the progeny is methyleugenol or elemicin, quite different from that of the parents. Isoperoxidase exhibited little variation among progenies. In addition, enzyme extraction and preparation available for electrophoresis are studied and discussed in this paper. Viscous extracts of the leaves treated by an enzyme give a satisfactory result for isozymes banding.

Key words *Cinnamomum tenuipilum*; essential oil; isozyme

《国外林业文摘》1992年征订启事

《国外林业文摘》是中国林科院情报所编辑、出版的林业科技情报检索刊物，收录了国外林业及有关林业的科技期刊和特种文献400余种，年报道量在3600条以上。包括各国林业概况、林业基础科学、造林、园林建设、森林经营、森林经理、森林保护和营林机械等内容，是国内唯一的检索国外林业文献的工具书，适于科研、教学和生产部门的林业工作者使用。

本刊为双月刊，16开，80页，每期15万字，单月23日出版，每册定价7.00元，全年定价42.00元。邮发代号82—128。欢迎读者到当地邮局订阅。

《中国林业文摘》编辑部