

# 受粉和阻止受粉的番茄子房 中的几种同工酶分析\*

张相岐

(东北师范大学生物系)

## 摘 要

本实验应用连续浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳和分光光度法对番茄子房受粉前后和阻止受粉情况下3种同工酶的变化进行了比较分析。结果表明,在适时受粉的子房中,苹果酸脱氢酶同工酶和谷氨酸脱氢酶同工酶活性升高且酶带增多;而在阻止受粉的子房中,则过氧化物酶同工酶活性升高,酶带增多,同时苹果酸脱氢酶活性降低。本文就这3种酶与番茄的受粉、受精及子房的衰老脱落的关系进行了初步的讨论。

关于同工酶在某些生理过程中的变化及与某些生理现象的关系已有大量报道。许多研究都表明植物组织的生长、发育和衰老伴随有同工酶活性及多型性的变化;某些同工酶(如过氧化物酶同工酶)与某些植物激素(如生长激素、乙烯等)的代谢有密切关系。例如:Alvarez(1968)发现受粉后的兰花(*Encyclia tampensis*)在果实发育过程中过氧化物酶活性增加,这种增加与果实的直径和鲜重呈线性关系<sup>[8]</sup>。Sheen(1973)在烟草(*Nicotiana tabacum*)上也获得了相似的实验结果<sup>[15]</sup>。Bredemeijer(1984)曾提到烟草(*N. glauca*)的花粉管生长穿过花柱期间,花柱中的某些过氧化物酶同工酶活性逐渐升高,当花粉管到达子房时,过氧化物酶活性升高更强烈,并诱导出几条新的同工酶带。未受粉的子房在老化过程中,有些过氧化物酶同工酶的活性也表现出升高<sup>[8]</sup>。

在番茄上,王海廷等(1981)、刘珠耀等(1983)和张相岐等(1987)分别对番茄(*Lycopersicon*)发育过程中的过氧化物酶同工酶和苹果酸脱氢酶同工酶的变化及分布规律进行了分析,发现在植株的幼嫩部位苹果酸脱氢酶活性高,酶带较多。在植株的衰老部位过氧化物酶活性高,酶带较多<sup>[1,4,5]</sup>。Ku等(1977)、Hobson(1974)和刘存德等(1979)分别对番茄果实发育及成熟过程中同工酶的变化情况进行了分析,并探讨了同工酶与激素代谢的关系<sup>[3,11,12]</sup>。

本文报告了番茄子房在受粉前后及阻止受粉情况下3种同工酶——过氧化物酶同工酶、苹果酸脱氢酶同工酶和谷氨酸脱氢酶同工酶的分析结果,并对这几种同工酶与受粉、受精及衰老等生理过程的关系进行了一些初步的讨论。

## 材 料 和 方 法

**取材:**以番茄栽培品种迈球(Marglobe)为试材,栽培于正常管理的田间。在蕾后期去雄后套袋并分成两组:一组在花盛开时受粉并准确记录受粉时间,然后分别在受粉后

\* 本实验是在哈尔滨师范大学王海廷教授指导下完成的,并得到黄永芬副教授和汪清胤副教授的帮助,谨致谢忱。

20小时、55小时和100小时取子房；另一组只记录开花时间，不受粉，也分别在开花后20小时、55小时和100小时取子房，同时取蕾后期和花盛开期子房。所取子房均去掉花柱。

**样品制备：**所取子房每克鲜重加2ml磷酸缓冲液(0.05M, pH7.2)，冰浴下研磨成匀浆，置2℃冰箱中沉淀24小时，取上清液进行同工酶的电泳分离和过氧化物酶的总活性测定。

**同工酶的分和染色：**同工酶的分采用双层双垂直板型连续浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳。凝胶规格为130×180×0.625mm<sup>3</sup>。分离胶浓度范围为7.5—15%，浓缩胶浓度为3.1%。配方见参考文献<sup>[5]</sup>。点样量为过氧化物酶每样格20μl，苹果酸脱氢酶每样格40μl，谷氨酸脱氢酶每样格60μl。电极缓冲液为Tris—甘氨酸系统(Tris, 0.46g/L, 甘氨酸3g/L)，pH8.3。电泳在2℃冰箱中进行，电压300V，电流强度约15mA/板，电泳时间约4小时。

过氧化物酶同工酶染色参照黄寿松等介绍的方法<sup>[6]</sup>。苹果酸脱氢酶同工酶染色基本按照Siciliano等(1981)的方法<sup>[8]</sup>进行，只是底物苹果酸为DL型。谷氨酸脱氢酶同工酶染色基本按照Shaw等(1970)的方法<sup>[13]</sup>进行，只是PMS浓度增加至5mg/100ml。

同工酶酶谱采用照相或绘制模式图的方法记录。同时酶谱凝胶用玻璃纸包好，制成干板，永久保存，以备分析。

**同工酶的活性测定：**过氧化物酶总活性的测定在室温下(约20℃)进行。测定程序见参考文献<sup>[5]</sup>。活性单位用每毫升酶液每分钟的消光值来表示(O.D./ml·min)。苹果酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶的活性变化是根据酶谱的着色程度直观估计的。

## 结 果

**过氧化物酶(POD)：**以前的实验<sup>[5]</sup>表明利用上述电泳系统，普通番茄(L. esculentum)过氧化物酶同工酶的酶谱有23条正极酶带(图1)。本实验表明，子房的过氧化物酶同工酶主要显现AⅡ区和AⅢ区带，AⅠ区只有较弱的AⅠ-5带。B区和C区酶带较少，只有B-1和B-5带清晰(图2)。从酶谱及活性变化情况来看，从蕾后期一

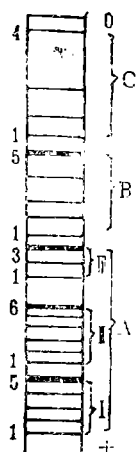


图1 普通番茄过氧化物酶同工酶基本谱型

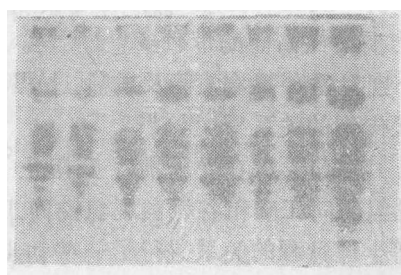


图2 受粉和阻止受粉的番茄子房中过氧化物酶同工酶电泳图谱

左起顺序为蕾后期、开花期、受粉20小时、55小时、100小时、阻止受粉20小时、55小时、100小时。

直到受粉后100小时的子房，过氧化物酶同工酶谱型及活性都没有发生明显的变化，活性变化曲线基本与时间轴平行（图2，表1和图3曲线I）。

在阻止受粉的子房中，开花后20小时，过氧化物酶活性及同工酶酶谱都无明显变化，到55小时，同工酶酶谱仍无明显变化，但活性已明显升高，到100小时，活性更加升高，同时同工酶酶谱也发生了明显的变化，在AI区出现两条新的酶带，AI-2和AI-4带。这时酶活性是开花期子房的2.76倍和同期受粉子房的3.12倍（表1，图2和图3曲线II）。

**苹果酸脱氢酶（MDH）：**据电泳图谱观察，从蕾后期一直到受粉后100小时的子房苹果酸脱氢酶着色逐渐加深，说明活性逐渐升高。而在阻止受粉的子房中，开花后20

表1 受粉和阻止受粉的子房POD活性  
(O.D./ml·min)

时期	活性子房	人工受粉的子房	阻止受粉的子房
1. 蕾后期			0.204
2. 开花期			0.234
3. 受粉(或开花)20hr.	0.215	0.228	
4. 受粉(或开花)55hr.	0.220	0.510	
5. 受粉(或开花)100hr.	0.207	0.646	

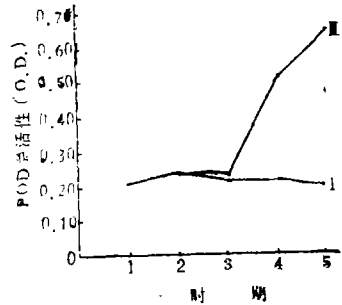


图3 受粉及阻止受粉子房中POD活性变化曲线

I. 受粉的子房 II. 阻止受粉的子房

小时和55小时，苹果酸脱氢酶活性没观察到明显变化。开花后100小时，据酶谱观察，活性已明显降低（图4）。从酶谱变化来看，在受粉后100小时的子房中，至少有两条新的酶带出现（图4箭头所示）。由于子房苹果酸脱氢酶同工酶带脱尾较重（在相同的电泳系统中，根、茎、叶等其他器官的苹果酸脱氢酶同工酶带分离较好），故未全面分析酶带的变化。

**谷氨酸脱氢酶（GDH）：**从蕾后期到受粉后55小时的子房中，谷氨酸脱氢酶只显现一条带。着色较淡，各时期之间无明显差别。在受粉后100小时的子房中，谷氨酸脱氢酶同工酶带增至7条，从着色上判断，活性也升高了。在阻止受粉的子房中，谷氨酸脱氢酶

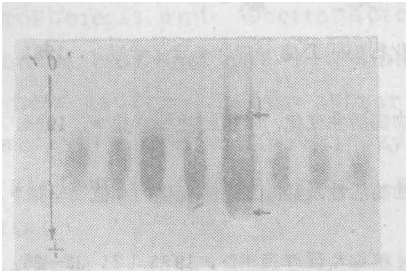


图4 受粉和阻止受粉的番茄子房

MDH同工酶电泳图谱。

顺序同图2。

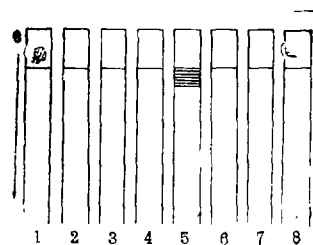


图5 受粉及阻止受粉子房GDH同工酶图谱模式图

1. 蕾后期；2. 开花期；3、4、5分别为受粉后20小时、55小时和100小时；6、7、8分别为阻止受粉20小时、55小时和100小时。

活性及同工酶谱始终无明显的变化,只显现一条着色较淡的酶带,与蕾期到受粉后55小时所显示的酶带相似。GDH同工酶带的形态特点是窄而密集。

## 讨 论

根据史密斯的研究结果,番茄在受粉后,正常情况下花粉管伸长到达胚囊需要20至40小时,受粉后50小时完成受精。合子经过短暂的休眠,在受粉后约94小时开始第一次分裂<sup>(7)</sup>。由此可知,我们在受粉后20小时、55小时和100小时所取的子房分别处于没受精、完成受精和合子分裂期。

以上实验结果表明,苹果酸脱氢酶同工酶和谷氨酸脱氢酶同工酶在受粉后,尤其在合子开始分裂时,活性明显升高并酶带数目增加。说明这两个酶系统在受精和合子分裂等一系列生理过程中可能具有特殊的功能。据报道,番茄的子房细胞在卵细胞完成受精后的一个短暂时期内生长缓慢,随后进入果实细胞的迅速膨大期,细胞质急剧增加,增加的成份除水份外,大部分是新合成的蛋白质和脂类<sup>(7)</sup>。我们知道,谷氨酸脱氢酶的生理功能是参与合成蛋白质的原料的氨基酸的代谢。苹果酸脱氢酶与能量代谢有密切关系。所以这两种酶在果实细胞快速膨大期活性升高和产生新的酶带是与细胞质的旺盛合成相适应的。过氧化物酶同工酶在番茄的受粉、受精及合子分裂等一系列过程中始终保持活性及同工酶谱基本不变,可能暗示过氧化物酶在这一系列生理过程中无特殊作用。

另一方面,受粉之后,由于花粉里的少量生长激素的刺激作用,使子房中的生长激素含量增加,从而保证胚的正常发育。在种子形成过程中,又形成并向外释放大量生长激素,其中一部分沿花梗向下运输,抑制离层的形成,避免落果<sup>(7)</sup>。本实验结果表明,在开花后阻止受粉55小时的番茄子房中,过氧化物酶活性已明显升高,到100小时,活性更高,并产生两条新的同工酶带。这可能是由于没有花粉中生长激素的刺激以及种子形成过程向外释放的大量生长激素的存在,造成子房的提前衰老和脱落。关于过氧化物酶活性与生长激素的代谢及衰老的关系已有许多报道<sup>(10、14)</sup>。刘文燕等(1984)曾观察到,在阻止受精或乙烯诱导脱铃的棉花胚珠中,在棉铃脱落前夕过氧化物酶活性升高<sup>(2)</sup>。可见番茄与棉花中过氧化物酶的表现是相似的。可以作为过氧化物酶参与衰老过程的一个佐证。

## 参 考 文 献

- (1) 王海廷等:番茄不同生育期和不同部位过氧化物酶同工酶分析,《园艺学报》,1981, 3(4), 29—35。
- (2) 刘文燕等:棉铃脱落过程中铃柄离区过氧化物酶活性变化,《植物生理学报》,1984, 10(2), 169—173。
- (3) 刘存德等:番茄成熟时乙烯的产生、过氧化物酶活性及其同工酶的变化,《植物学报》,1979, 21(2), 163—170。
- (4) 刘珠耀等:番茄苹果酸脱氢酶同工酶分析,《植物生理学通讯》,1983, 2, 23—26。
- (5) 张相歧等:番茄属四个种的过氧化物酶同工酶分析,《植物研究》,1987, 7(4), 133—152。
- (6) 黄寿松等:几种植物中的过氧化物酶同工酶分析,《遗传》,1980, 2(3), 7—10。
- (7) 齐藤隆等:番茄生理基础(王海廷译),上海科学技术出版社。
- (8) Siciliano, M.J.: 凝胶上酶分离和显现(沈全光译),《植物生理学通讯》,1980(4), 59—70。

(9) Alvarez, M.R.: 1968, Temporal and spatial changes in Peroxidase activity during fruit development in *Encyclia tampensis* (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 55, 619-625.

(10) Bredemeijer, G.M. M.: 1984, The role of peroxidases in Pistilpollen interactions. *Theor. Appl. Genet.* 68, 193-206.

(11) Hobson, G.E.: 1974, Electrophoretic investigation of enzymes from developing *Lycopersicon esculentum* fruit. *Phytochemistry* 13, 1383-1390.

(12) Ku, H.S. et al.: 1970, Ethylene production and peroxidase activity during tomato fruits ripening. *Plant and Cell Physiol.* 11, 214-245.

(13) Shaw, C.R. et al.: 1979, Starch gel electrophoresis of enzymes—a compilation of recipes. *Biochemical Genetics*, 4, 297-320.

(14) Soressi, G.P.: 1974, Leaf peroxidase activities in tomato mutants affecting plant morphology. *Biochemical Genetics* 12, 181-198.

(15) Sheen, S.J.: 1973, Changes in amounts of polyphenols and activity of related enzymes during growth of tobacco flower and capsule. *Plant Physiol.* 51, 839-844.

## ANALYSIS OF SEVERAL ISOZYMES IN TOMATO OVARIA POLLENED AND PREVENTED

### POLLENATION

Zhang Xiangqi

(Department of Biology, Northeastern Normal University)

### ABSTRACT

Analytical results are reported in this paper on peroxidase isozyme, malic dehydrogenase isozyme and glutamate dehydrogenase isozyme in *Lycopersicon esculentum* var. Marglobe ovaria pollened and prevented pollination by means of continuous concentration gradient polyacrylamide gel electrophoresis and spectrophotometer. The results indicate that malic dehydrogenase isozyme and glutamate dehydrogenase isozyme activities rise and new isozyme bands appear in pollened ovaria and peroxidase isozyme activity rise and new isozyme bands appear and malic dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities lower in prevented pollination ovaria.

In the last part of the paper, relations between the three isozymes and pollination, fertilization and senescence of tomato are discussed preliminarily.