

研究报告 Original Papers

蕨藻红素促进大豆插条不定根的形成

吴伦秀¹, 何庭玉¹, 谷文祥^{1,*}, 王金祥^{2,3,*}华南农业大学¹理学院, ²资源与环境学院, ³根系生物研究中心, 广州 510642

摘要: 对蕨藻红素影响大豆下胚轴插条不定根形成的研究表明: 蕨藻红素促进大豆插条不定根的形成, 其最适浓度为 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 最适处理时间为2 d。0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蕨藻红素处理大豆插条后, 不定根诱导阶段(0~24 h)的POD、CAT、IAAox活性较低; 而不定根形成生长阶段(24~72 h)的CAT和IAAox活性较高, POD活性低于未作处理的。试验推测蕨藻红素促进大豆插条不定根形成的生理基础可能与其影响POD、CAT和IAAox活性有关。

关键词: 蕨藻红素; 不定根; 大豆插条; 酶活性

Caulerpin Stimulating Adventitious Rooting in Soybean Hypocotyl Cuttings

WU Lun-Xiu¹, HE Ting-Yu¹, GU Wen-Xiang^{1,*}, WANG Jin-Xiang^{2,3,*}

¹College of Science; ²College of Resources and Environment; ³Root Biology Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: Effect of caulerpin on adventitious rooting of soybean hypocotyl cuttings and the physiological basis of its effect on rooting was explored in this study. The results indicated that application of caulerpin stimulated adventitious rooting of soybean cuttings. The optimal concentration of caulerpin is $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and the optimal application time period is 2 days. Compared to the control, peroxidase (POD), catalase (CAT) and IAA oxidase (IAAox) activities of soybean cuttings treated with $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ caulerpin were at lower level in induction stage of rooting, CAT and IAAox activities were higher but POD activity was lower in growth stage (24–72 h). Taken together, it is proposed that caulerpin promotes adventitious rooting possibly through mediating activities of POD, CAT and IAAox.

Key words: caulerpin; adventitious root; soybean cuttings; enzyme activity

蕨藻红素(caulerpin)是从蕨藻属海藻中提取的次生代谢物质, Aguilar-Santos 和 Doty (1968)最早从蕨藻属(*Caulerpa*)总状蕨藻棒状变种(*Caulerpa racemosa* var. *clarifera*)、棒叶蕨藻(*Caulerpa sertularioides*)和齿形蕨藻(*Caulerpa serrulata*)中分离得到蕨藻红素。杨宜婷等(2002)报道蕨藻红素具有一定的抗肿瘤活性, 但有关其植物生理作用的报道较少。吕扬等(1994)研究蕨藻红素结构发现, 蕨藻红素的分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$ 。吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA)含AB环, 而蕨藻红素同时含有2个AB环(图1), 与吲哚乙酸在结构上具有相似性, 可能具有与吲哚乙酸类似的生理作用。广为人知的是, 在众多的次生代谢化合物中, 生长素类物质可以促进植物特别是根系生长发育(黄丽波等 2000; 王乔春 1992)。为此本文以大豆为供试材料, 研究了蕨藻红素对大豆插条不定根形成和生长的影响及其生

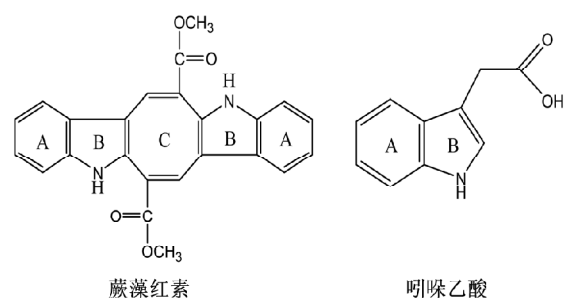


图1 蕨藻红素及吲哚乙酸分子结构式

Fig.1 The structure of caulerpin and indole acetic acid

收稿 2010-03-22 修定 2010-06-23
 资助 国家自然科学基金(30600380; 20872039)和广东省自然科学基金(039213)。
 致谢 * 暨南大学生命科学技术学院岑颖洲教授提供蕨藻红素药品。
 * 共同通讯作者 (E-mail: jinxwang@scau.edu.cn, wenxgu@scau.edu.cn; Tel: 020-85280156)。

理基础, 为将来在农业生产上利用藻藻红素调节作物根系生长发育提供参考。

材料与方 法

大豆 [*Glycine max* (L.) Merr] 品种为‘本地二号’。藻藻红素由暨南大学化学系提供; 二甲基亚砜(DMSO)、IAA、牛血清蛋白、考马斯亮蓝 G-250 均为 Sigma 公司产品, 其他均为国产分析纯。

大豆(水培)培养液的母液配方如下。母液 1: 2 500 mmol·L⁻¹ KNO₃、2 500 mmol·L⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O、82 mmol·L⁻¹ Fe-EDTA (Na)、4.57 mmol·L⁻¹ MnCl₂·4H₂O。母液 2: 250 mmol·L⁻¹ K₂SO₄、1 000 mmol·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O、0.38 mmol·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O、1.57 mmol·L⁻¹ CuSO₄·5H₂O、0.09 mmol·L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂·4H₂O、23.13 mmol·L⁻¹ H₃BO₃。母液 3: 0.5 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄。

分别取 1 mL 母液 1、1 mL 母液 2 和 1 mL 母液 3 依次加入 500 mL 蒸馏水中, 再用蒸馏水定容至 1 000 mL, 用 1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 和 HCl 调节 pH 值为 6.0, 得到空白大豆培养液, 自然条件下配制, 无需灭菌。

大豆用卷纸培法培养 6 d, 选取长势、子叶大小、下胚轴粗细一致、苗高 67 mm 的大豆幼苗, 切去距子叶 60 mm 以下部分得到大豆插条。

因藻藻红素难溶于水, 首先用 DMSO 配制 1 mmol·L⁻¹ 藻藻红素母液, 然后用大豆培养液配制成 0.01、0.05、0.1、0.25、0.5 和 1 μmol·L⁻¹ 的藻藻红素处理溶液, 以空白大豆培养液(不含藻藻红素但含与处理相同浓度 DMSO, 下同)作对照, 每个浓度 3 组, 每组 4 个插条。培养条件: 光/暗周期为 16 h (光)/8 h (暗)、光照强度为 150 μmol·m⁻²·s⁻¹、温度为 22 °C (光)/20 °C (暗), 相对湿度为 80%, 处理 2 d, 再换用不含藻藻红素、其他成分完全相同的空白大豆培养液培养, 第 3 天测量上下胚轴长度, 第 6 天测量不定根数目、总长、生根范围及干重, 确定最适浓度。

在同样的培养条件下, 用最适浓度的藻藻红素分别处理大豆插条 0、0.1、0.5、1、2、24 和 48 h 后换用大豆营养液培养, 第 3 天测量上下胚轴长度, 第 6 天测量不定根数目, 确定最佳处理时间。

用以上试验得到的最适浓度藻藻红素以最佳

处理时间处理大豆插条后换用大豆培养液培养, 同时以空白大豆培养液培养相同时间作对照, 在不同时间点(以插条离体后开始计时), 即 0、2、12、24、36、48、60 和 72 h 收集插条下胚轴(长 4 cm)各约 1 g。分别用比色法测试过氧化物酶(peroxidase, POD) (李忠光和龚明 2008; 李玲 2009)、过氧化氢酶(catalase, CAT)(刘家豪 1957; 王春台等 1987)和吲哚乙酸氧化酶(IAA oxidase, IAAox) (李玲 2009) 的活性; 用考马斯亮蓝 G-250 法测定提取液总蛋白质的含量。

POD 以 1 min 内 OD 值减少 0.01 的酶量为 1 个酶活性单位(U), POD 活性[U·mg⁻¹ (蛋白)·min⁻¹]= $(\Delta A_{470} \times V_T) / (W_0 \times V_s \times 0.01 \times t)$, 其中 ΔA_{470} 为反应时间内吸光值的变化, V_T 为提取液体积(mL), V_s 为测定时取用酶液体积(mL), W_0 为酶反应的蛋白质重量(mg), t 为反应时间(min), 下同。CAT 活性[OD·mg⁻¹ (蛋白)·min⁻¹]= $(\Delta A_{240} \times V) / (W_0 \times V_s \times t)$, 其中 ΔA_{240} 为反应时间内吸光度的变化。IAAox 活性[mg·g⁻¹ (蛋白)·min⁻¹]= $(C_2 - C_1) \times V_1 / (1/V_T \times V \times W \times t)$, 其中 C_1 为反应液中残留的 IAA 值, C_2 为无酶提取液中 IAA 值, V 为反应液中初提取液体积(mL), V_1 为反应液体积(mL)。

对藻藻红素不同浓度和不同处理时间的不定根数目、根长、生根范围长度(定义为下胚轴形态学下端至上端的生根区域长度)及酶活性数据等用 SAS6.2 软件作单因素方差分析的 Duncan 法多重比较, 所有试验均重复 3 次。

结果与讨论

1 藻藻红素促进大豆插条不定根的形成

用 0~1 μmol·L⁻¹ 藻藻红素处理大豆下胚轴插条 2 d 后继续用大豆培养液培养 4 d。试验发现藻藻红素在 0.01~0.5 μmol·L⁻¹ 浓度范围内, 促进大豆插条不定根形成; 随着藻藻红素浓度的增加, 不定根数增加; 当浓度为 0.5 μmol·L⁻¹ 时, 不定根数量显著增多, 和未处理相比, 增加 97.3%; 当浓度达到 1.0 μmol·L⁻¹ 时插条萎缩, 不定根数目为 0 (图 2)。表明藻藻红素促进不定根形成的效果取决于浓度, 浓度过高, 对插条造成伤害。

从表 1 可见, 不同浓度藻藻红素对大豆生根范围长度影响不明显; 和未作处理相比, 0.01~0.50

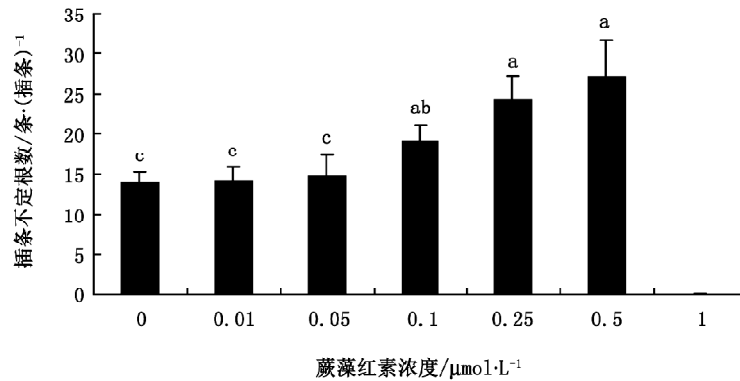


图2 蕨藻红素对大豆插条不定根形成的影响

Fig.2 Effect of caulerpin on adventitious rooting in soybean hypocotyl cuttings
不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 下图同。

表1 蕨藻红素对大豆插条生根范围长度及上下胚轴长度的影响

Table 1 Effect of caulerpin on adventitious rooting range and hypocotyl length in soybean hypocotyl cuttings

蕨藻红素浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	生根范围长度 /mm	插条上胚轴长度 /cm	插条下胚轴长度 /cm
0	0.99 ± 0.236 6 ^a	4.03 ± 0.423 3 ^{ab}	6.83 ± 0.123 6 ^a
0.01	0.90 ± 0.163 1 ^a	4.58 ± 0.399 6 ^a	6.50 ± 0.177 2 ^a
0.05	1.08 ± 0.390 0 ^a	4.43 ± 0.587 1 ^a	6.66 ± 0.120 3 ^a
0.10	0.71 ± 0.117 3 ^a	4.06 ± 0.426 6 ^{ab}	6.54 ± 0.118 0 ^a
0.25	0.84 ± 0.158 7 ^a	2.96 ± 0.609 4 ^{ab}	6.76 ± 0.160 8 ^a
0.50	1.25 ± 0.210 6 ^a	2.54 ± 0.656 8 ^b	6.49 ± 0.123 0 ^a

表中数据为3次重复实验的平均数和标准误, 不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$), 下表同。

表2 蕨藻红素对大豆切条不定根鲜重和干重的影响

Table 2 Effect of caulerpin on fresh and dry weight of adventitious roots in soybean hypocotyl cuttings

蕨藻红素浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	不定根鲜重 / mg·(插条) ⁻¹	不定根干重 / mg·(插条) ⁻¹
0	102.5 ± 2.500 0 ^d	58.0 ± 1.322 9 ^d
0.01	137.5 ± 3.818 8 ^a	75.6 ± 0.288 7 ^a
0.05	135.0 ± 2.886 7 ^a	67.0 ± 1.181 5 ^c
0.10	140.8 ± 0.833 3 ^a	70.8 ± 1.010 4 ^b
0.25	107.5 ± 1.443 4 ^c	57.4 ± 0.982 5 ^d
0.50	117.5 ± 5.204 2 ^b	58.0 ± 1.607 3 ^d

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蕨藻红素对插条上胚轴生长影响不明显(差异未达显著水平); 和未作处理相比, 0.01~0.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蕨藻红素对大豆插条下胚轴生长影响不明显(差异不显著)。

对插条不定根鲜重和干重分析(表2)可知, 和未作处理的相比, 0.01~0.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蕨藻红素处

理的大豆插条, 不定根鲜重均明显增加, 浓度为0.01、0.05和0.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时增加最明显; 0.01、0.05和0.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蕨藻红素处理明显促进不定根干重, 但处理浓度过高不能显著提高干重。

2 0.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蕨藻红素处理不同时间对大豆插条生根效果的影响

由于0.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蕨藻红素促进大豆插条不定根形成效果最好。所以用0.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蕨藻红素分别处理大豆插条不同时间, 观察促进作用与处理时间的相关性。结果表明, 0.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蕨藻红素处理大豆, 短时间处理(0.1、0.5和1 h)促进生根的效果不明显; 而长时间处理(2 h和48 h)均促进不定根的形成, 和对照比差异显著, 其适宜处理时间为48 h(图3)。

对不定根总长度分析(图4)表明, 当蕨藻红素处理时间为2 h时, 不定根总长度最大, 和未作处理相比, 促进率达58.3%, 其他处理也明显增加插

条不定根总长度; 和未作处理相比, 不同时间蕨藻红素处理明显增加不定根总面积。综合考虑不定

根数目、不定根总长度和面积(图3和图4), 蕨藻红素处理大豆插条最适时间为48 h。

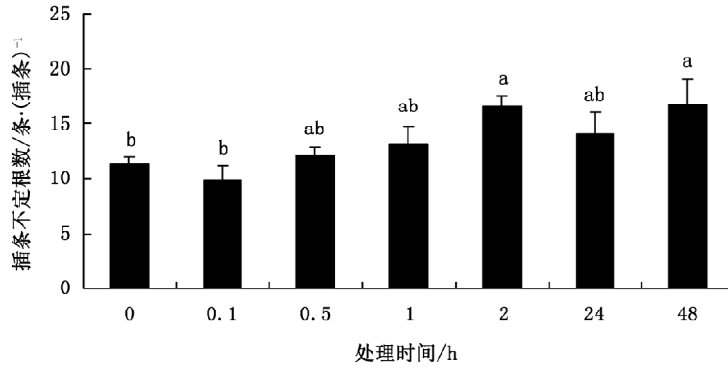


图3 0.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蕨藻红素处理不同时间对不定根形成的影响

Fig.3 Effect of 0.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ caulerpin treatment at different time periods on adventitious root formation

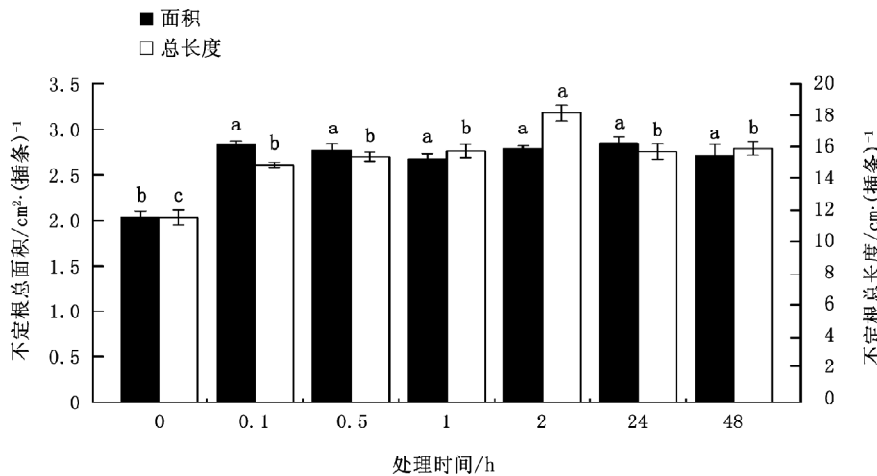


图4 0.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蕨藻红素处理不同时间对不定根总长度和总面积的影响

Fig.4 Effect of 0.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ caulerpin treatment at different time periods on total length and area of adventitious roots in soybean cuttings

3 0.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蕨藻红素处理大豆插条对 POD、CAT 和 IAAox 活性的影响

已有研究表明: POD、CAT 和 IAAox 与不定根的形成有密切关系(Pan 和 Tian 1999; 王金祥等 2005; Li 等 2007); IAAox 与内源 IAA 的代谢有关, CAT 与 POD 可调节植物体内 H_2O_2 的水平; POD 活性高的植物插条生根快(Fekete 等 2002)。 H_2O_2 是生长素诱导幼苗外植体不定根形成过程中的信号因子, 可能作为下游信号参与生长素诱导的不定根形成(李建华等 2006)。因此为了探究蕨藻红素促进

大豆插条不定根形成的生理基础, 测定了蕨藻红素对大豆插条 POD、CAT 和 IAAox 活性的影响。

从图 5 可知, 在插条切后 0~60 h, 未作处理和蕨藻红素处理的大豆插条 POD 活性总体都呈上升趋势, 其中在 2 h 和 12 h, 蕨藻红素处理的比未作处理的略低, 但差异不显著; 而在 24~48 h, 蕨藻红素处理的 POD 活性略高于未作处理的(差异未达显著水平); 在 60 h 蕨藻红素处理的 POD 活性略低于未作处理的(差异未达显著水平); 72 h 蕨藻红素处理的与未处理的插条 POD 活性相当。插条离体后 24

h内是不定根形成的诱导期, IAA诱导 H_2O_2 合成(李建华等 2006), 此时高水平的活性氧有利于不定根原基的启动。黄瓜插条离体后48 h, 高水平的POD可促进木质素的合成, 加快细胞分裂和新细胞壁的形成(董玉等 2007)。结果表明: 插条离体后24~48 h期间, 尽管未达显著水平, 但蕨藻红素处理的POD活性还是比未作处理的略高, 这可能是蕨藻红素处理插条2 d生根效果较好的原因之一; 大豆插条离体后72 h, 可观察到不定根原基突破表皮, 此时较

低水平的POD活性, 可能有利于不定根生长。

关于CAT活性影响不定根形成的报道较少。从图6可以看出, 蕨藻红素处理的大豆插条和未处理的CAT活性变化趋势不相同。在0~24 h, 都是呈现短期下降随后上升的趋势, 但蕨藻红素处理的CAT活性较未处理的低, 特别是在2 h时, 差异达到显著水平; 可能原因是主根切离插条对植物是伤害, 而伤害可诱导合成 H_2O_2 作为第二信使物质启动系列反应(Li等 2007), 此时低水平的CAT有利于

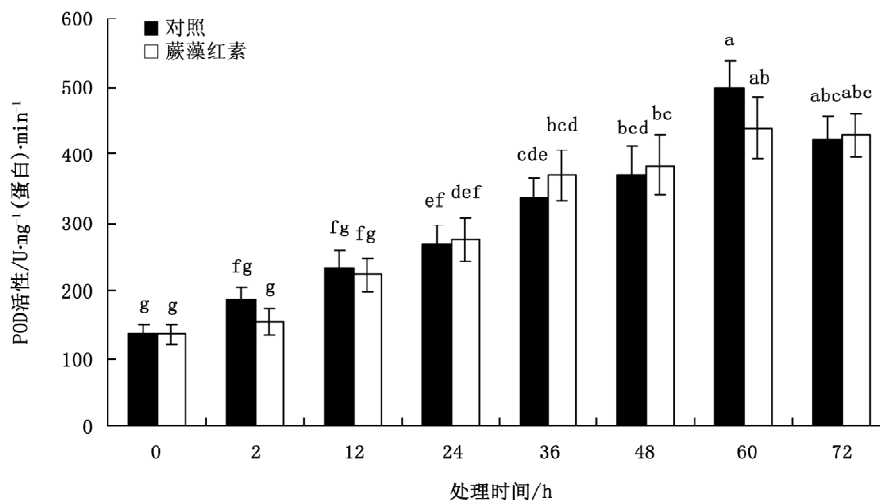


图5 $0.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蕨藻红素对大豆插条 POD 活性的影响

Fig.5 Effect of $0.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ caulerpin treatment on POD activity of soybean cuttings

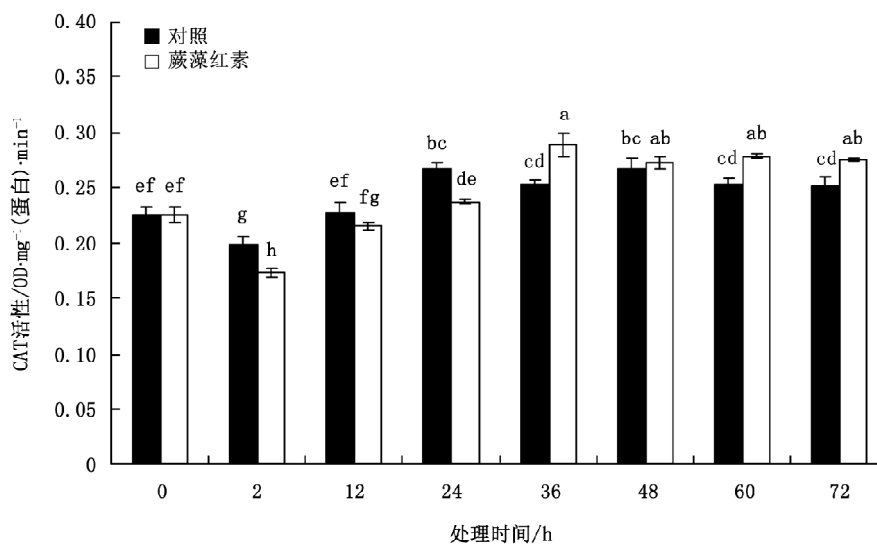


图6 $0.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蕨藻红素处理对大豆插条 CAT 活性的影响

Fig.6 Effect of $0.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ caulerpin treatment on CAT activity of soybean cuttings

H₂O₂ 产生而促进不定根原基的诱导。在 36~72 h 期间, 蕨藻红素处理的 CAT 水平高于未作处理的, 其中在 36、60 和 72 h, 蕨藻红素处理的 CAT 活性均高于未作处理的, 差异达显著水平, 而在 48 h, 蕨藻红素处理的和未处理的差异不明显。以上结果说明蕨藻红素可影响 CAT 活性, 插条离体后 36~72 h 是不定根原基发育壮大并突破表皮阶段, 此时高水平的 H₂O₂ 可能不利于不定根生长发育, 而蕨藻红素处理导致 CAT 活性在此阶段高可以促进不定根的生长; 因此蕨藻红素处理的不定根数目和总长度均比对照高(图 3 和图 4)。

不定根形成早期阶段需较高浓度的 IAA(张昉和郭素娟 2006)。从图 7 可知, 在 0~24 h, 未处理的大豆插条 IAAox 活性变化不明显; 而蕨藻红素处理的是先下降后上升, 但各时间点差异不明显。在

2 h 和 12 h, 未处理的 IAAox 活性略高于蕨藻红素处理的, 表明此时低水平的 IAAox 可能使内源 IAA 含量高, 从而促进早期的细胞分裂。在 24~72 h 期间, 未作处理的 IAAox 活性是下降的趋势, 而蕨藻红素处理的是上升的趋势; 在 36、48 和 60 h, 蕨藻红素处理的 IAAox 活性略高于未作处理的, 但差异未达显著水平, 而在 72 h, 蕨藻红素处理的酶活性显著高于对照的。推测可能原因是蕨藻红素处理大豆插条后, 插条吸收蕨藻红素后在体内通过目前还未知的代谢途径转化为 IAA, 从而增加内源 IAA 的含量, 而过高的 IAA 含量不利于不定根原基的后期发育和生长, 后期高水平的 IAAox 活性可促进 IAA 的降解; 插条离体后 72 h 是大豆不定根原基突破表皮生长的阶段, 此时高水平 IAAox 活性可能有利于维持插条体内低水平 IAA。

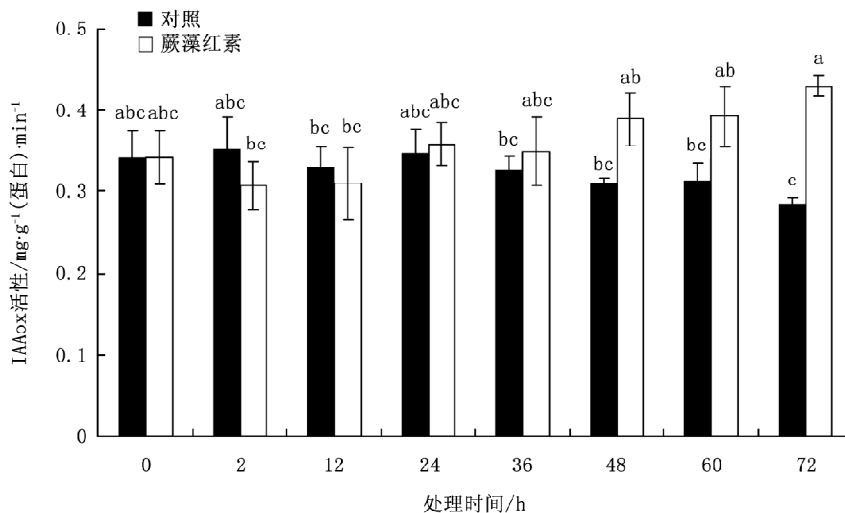


图 7 0.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蕨藻红素处理对大豆插条 IAAox 活性的影响
Fig.7 Effect of 0.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ caulerpin on IAAox activity of soybean cuttings

总之, 蕨藻红素是一种能从海藻中提取的次生代谢物质, 本研究证明蕨藻红素能有效促进大豆不定根的生长和发育, 且有效浓度很低。蕨藻红素促进大豆离体插条生根的原因可能是: 外施蕨藻红素降低插条离体后早期(0~24 h, 即不定根诱导阶段) POD、CAT 和 IAAox 活性以及提高后期(24~72 h) CAT 和 IAAox 活性, 尤其是蕨藻红素处理对 CAT 和 IAAox 活性影响较大; 插条离体后 0~2 h 是一个关键的时间窗口, 此时蕨藻红素处理的插条 CAT 活性

明显低于对照(图6); 试验提示蕨藻红素促进生根可能是通过调节 H₂O₂ 和 IAA 水平来实现的, 但很多细节还需要深入研究。将来蕨藻红素可能作为生长素的替代品而促进农作物根系发育, 在农业生产上得到广泛应用。

参考文献

- 董玉, 孟宁, 李师翁(2007). H₂O₂ 对黄瓜不定根形成中抗氧化酶活性的影响. 兰州交通大学学报(自然科学版), 26 (6): 140~144
黄丽波, 岑颖洲, 徐石海, 李药兰, 许少玉, 伍秋明(2000). 海藻中

- 植物生长激素 Caulerpin 的研究进展. 天然产物研究与开发, 13 (2): 74~78
- 李玲(2009). 植物生理学模块实验指导. 北京: 科学出版社, 95~98
- 李建华, 刘银谦, 吕品, 李洋, 杜静, 陈玉玲(2006). H_2O_2 在黄瓜和绿豆下胚轴不定根形成中的作用. 西北植物学报, 26 (12): 2506~2510
- 李忠光, 龚明(2008). 愈创木酚法测定植物过氧化物酶活性的改进. 植物生理学通讯, 44 (2): 323~324
- 刘家豪(1957). 在测定过氧化氢酶活动度时, 对酶提取液和过氧化氢液适当用量的确定. 植物生理学通讯, (6): 43~44
- 吕扬, 卢多, 郑启泰, 廉斌, 苏镜娱, 岑颖洲(1994). 蕨藻红素 (Caulerpin) 的结构分析. 结构化学, 13 (6): 472~476
- 王春台, 徐同, 刘学群(1987). 紫外分光光度法测定过氧化氢酶的活性. 华中农业大学学报, 6 (1): 77~81
- 王金祥, 严小龙, 潘瑞焱(2005). 不定根形成与植物激素的关系. 植物生理学通讯, 41 (2): 133~142
- 王乔春(1992). 植物激素与插条不定根的形成. 四川农业大学学报, 10 (1): 33~39
- 杨宜婷, 岑颖洲, 肇静娴, 狄静芳(2002). 麒麟菜中蕨藻红素抗肿瘤活性研究. 中国病理生理杂志, 18 (7): 851~852
- 张昉, 郭素娟(2006). 不定根发生机理的研究进展. 广东林业科技, 22 (3): 91~95
- Aguilar-Santos G, Doty MS (1968). Chemical studies on three species of the marine algal genus Caulerpa. Drug Sea Trans Symp, 173~176
- Fekete S, Mandy A, Stefanovits-Banyai E (2002). Change of peroxidase enzyme activities in annual cuttings during rooting. Acta Biol Szeged, 46 (3-4): 29~31
- Li SW, Xue LG, Xu SJ, Feng HY, An SZ (2007). Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber. Plant Growth Regul, 52: 173~180
- Pan RC, Tian XS (1999). Comparative effect of IBA, BSAA and 5,6-Cl₂-IAA-Me on the rooting of hypocotyl in mung bean. Plant Growth Regul, 27: 91~98