

黄波罗不同年龄材料微繁殖苗内源激素的比较分析

李超峰^{1,2}, 王力华¹, 赵望峰^{1,2}, 何晓刚³, 邱建³

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁沈阳 110016; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 新宾县陡岭林场, 辽宁新宾 113200)

摘要:不同年龄植物材料的植株再生能力不同, 繁殖质量也不同, 要提高繁殖效率和再生苗木的质量, 就要深入了解初始材料的生理生化状态, 以便为具有优良遗传特性的适龄材料选择提供依据。文章检测了不同年龄黄波罗组培苗的脱落酸、生长素、赤霉素、玉米素型细胞分裂素型和异戊烯基型细胞分裂素含量并做了统计学差异分析, 结果表明: 随试材年龄增长, 黄波罗微繁殖苗的 iP - type CKs/总 Cks 降低, 而 Z - type CKs/ iP - type CKs 和 GAs 含量增加且有显著的统计学差异, 可作为选择适龄微繁殖材料的生理指标之一。

关键词:黄波罗; 组织培养; 内源激素

中图分类号: Q946.885; S792.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001 - 1714(2007)01 - 0016 - 04

Analysis of Phase - change Related Endogenous Hormone Changes in Juvenile and Mature of *Phellodendron amurense*LI Chao - feng^{1,2}, WANG Li - hua¹, ZHAO Wang - feng^{1,2}, HE Xiao - gang³, QIU Jian

(1. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Xinbin County Douling Forestry Farm, Xinbin 113200, China)

Abstract: The ability to propagation of woody plants with different age is different, whose quantitative indicies, could be used as a definite theoretical foundation of the selected material with age optimum and to choose optimal conditions in order to improve forest programs and make them more profitable. In order to determine these hormonal indices, the contents of ABA, IAA, GAs, iP - type CKs and Z - type CKs were identified in cultured seedling of *phellodendron amurense* with different ages and analysed the statistical difference. The results showed that the ratio of iP - type CKs/total Cks decreased and Z - type CKs/ iP - type Cks and GAs increased throughout the whole developmental processes and had significantly statistical difference. The fact allowed us to consider the ratio of iP - type CKs/total Cks decreased and Z - type CKs/ iP - type Cks and GAs as the indices of the selected material with age optimum.

Key words: *phellodendron amurense*; tissue culture

乔木树种的生长周期较长, 如依靠有性繁殖进行林木改良, 改良进程会过于漫长。与之相对应的无性繁殖不仅可以获得加性遗传增益, 而且繁殖周期短、速度快, 特别是利用组织培养手段进行的无性繁殖, 繁殖系数能够成倍提高, 并且繁殖不受季节限制, 因而具有很大的发展潜力。

然而, 无性繁殖后代是母株取样部位发育状态的继续。当优良植株的目的性状比较充分地表现出来时, 进行无性繁殖常会遇到成熟效应的影响, 导致

植株再生困难, 这几乎是组织培养中的普遍现象; 另一方面, 植物的内源物质(如内源激素)动态是调控植株器官发生的重要因素, 了解不同发育阶段繁殖材料的内源激素含量对选择适生繁殖材料具有十分重要的意义, 为此结合黄波罗(*Phellodendron amurense*)的组培繁殖进行了相关探讨。

1 材料和方法

1.1 植物材料

不同年龄黄波罗材料由中国科学院沈阳应用生

态研究所树木园提供。早春取回带有饱满腋芽 1 年生枝条水培,待腋芽萌发即接种于 MS + BA $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + NAA $0.3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 值 6.0 的培养基上,在光照度 1 500 ~ 2 000lx、光周期 14/10h、温周期 20/18℃ 条件下培养。其中, No1 是从种子胚组培成功的再生苗; No2、No3 和 No4 分别为源自 5~6 年生、10~20 年和大于 30 年生植株的腋芽组培形成的 1 代再生苗。继代前收集植物材料并立即贮藏在 -20°C 冰箱中,用于植物激素的提取及测定。

1.2 植物激素的提取

新鲜叶片 1.0g 于冰浴中研磨,研磨过程中加入少量的 PVP(聚乙烯吡咯烷酮),以去除酚类等非激素物质。匀浆后立即转入 4ml 80% 的冷甲醇提取液中, 4°C 下提取 4h, 10 000 r/min 离心 10min, 取上清液。余物中再加入 1ml 冷甲醇提取液,充分混匀,同上处理,然后合并上清液。

Z 型细胞分裂素(Z-type CKs)、异戊烯基型细胞分裂素(iP-type CKs)、生长素(IAA)、赤霉素类(GAs)和脱落酸(ABA)的测定采用间接酶联免疫吸附法(ELISA)(何钟佩, 1993), ELISA 试剂盒由中国农业大学作物化控室提供,程序按其说明书进行。样品重复 3 次,多重比较用 SPSS11.0 计算。

2 结果与分析

2.1 不同年龄试材外植体的诱导培养

No1 经过 5 个月的培养,愈伤组织已经大量形成,并有比较多的诱导芽产生,繁殖系数可达 5.0~6.0,经生根诱导能发育成再生植株;培养约 20d 后, No2 外植体的伤口处愈伤组织较少; No3 的诱导效果不是很明显,仅有细微分化; No4 基本上没有变化,但在后续继代培养过程中各种材料一般经过 5~8 次继代,可以部分解除由于年龄差异造成的诱导和分化差异,其生长势也逐渐与幼龄材料接近相同,并最终形成再生植株。

2.2 不同年龄试材的 5 种内源激素含量变化

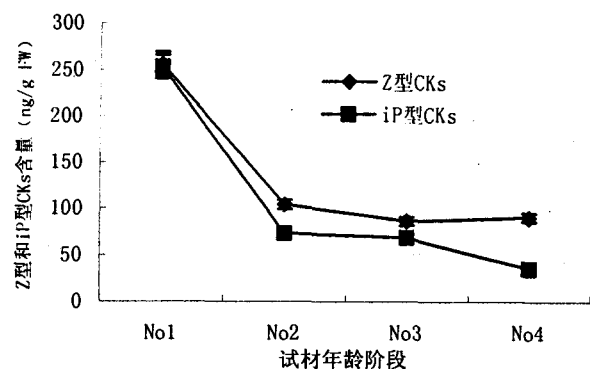


图 1 不同年龄黄波罗微繁体内源 Z-CKs 与 iP-CKs 的含量

通过对不同年龄材料微繁产生的 1 代组培苗体内 5 种激素含量的变化分析,可以发现 Z-type CKs 和 iP-type CKs 表现出相似的变化趋势(图 1)。No1 的这两种激素含量最高, No4 最低;随试材起源年龄增长,这两种激素含量呈下降趋势。

不同发育阶段材料的微繁材料中 GAs 和 IAA 含量测定结果分别如图 2 和图 3。

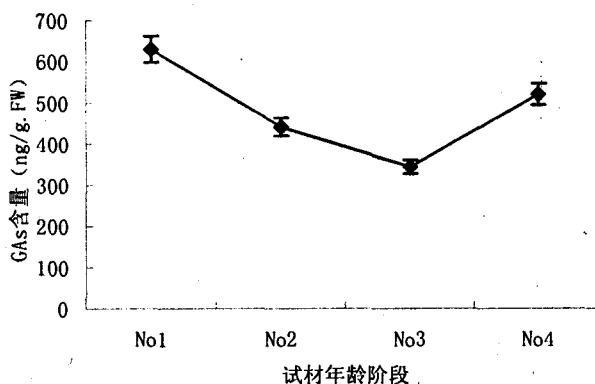


图 2 不同年龄黄波罗微繁体内源 GAs 含量

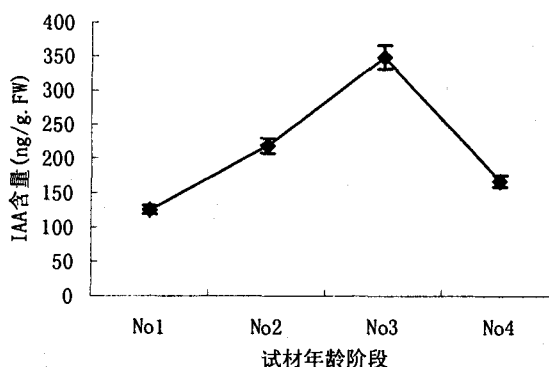


图 3 不同年龄黄波罗微繁体内源 IAA 含量

No1 中 GAs 含量最高, No3 最低,即在 4 个发育阶段微繁材料中, GAs 含量呈正“V”形,与外植体年龄相关;而 IAA,则是在 No3 中含量最高,在 No1 中最低,呈倒“V”形,与外植体发育阶段相关。相对于 GAs 含量, IAA 含量相对较低,且二者在不同发育阶段微繁材料中成相对的变化趋势。结合不同发育阶段外植体诱导过程中的形态学变化,二者相异的变化趋势说明 IAA 与 GAs 均能增进细胞分裂和细胞分化,但是具有不同的作用途径或方式。在不定芽诱导过程中,随起始外植体年龄的增加,微繁物细胞的分裂(或分化)速率和能力都逐渐降低,在组织培养中表现为愈伤组织或不定芽的诱导能力逐渐降低,说明不同发育阶段的微繁体在培养期间外观形态的变化不能作为其是否具有较高繁殖能力的指标,而试材的内源代谢状况才是适龄材料选择的可靠途径。另外, GAs 含量的变化趋势也可能说明不同发育阶段微繁材料中所含的 GAs 种类不同,而不

同类型的 GAs 刺激细胞分化的能力不同^[6],从而导致其外植体无性繁殖能力的不同。1996年,李宗霆曾报道适量 IAA 促进燕麦 (*Avena fatua*) 幼茎伸长生长,但有效期较短,必须持续供应才能保持生长速率;而适量的 GAs 促进伸长生长的有效期长。此外, GAs 对整株植物有明显的促进生长效果,而 IAA 的作用却很难表现在整株植物。依据上述结论可以推断出,4个年龄梯度的微繁材料中内源 GAs 和 IAA 含量正是通过这种相互协调和拮抗的方式来调节微繁材料的生长和发育。同时, GAs 含量差异显著,而 IAA 无显著差异,表明 GAs 是造成不同发育阶段微繁体无性繁殖能力差异的主要因素,相应地也促使了发育阶段间的转化,并可能使部分优良遗传特性产生差异表达。

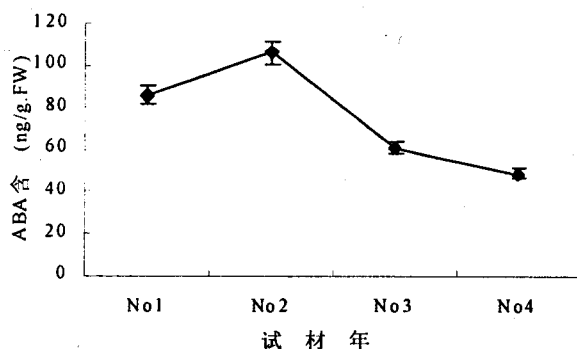


图4 不同年龄黄波罗微繁体内源 ABA 含量

不同发育阶段黄波罗微繁材料中 ABA 含量的变化见图 4,其中 No2 含量最高, No3、No4 含量依次降低。分析这种现象产生的原因,主要是在培养初期这样一种特定环境中,细胞正处于活跃的代谢阶段,末端代谢产物还没有形成积累的原因是 ABA 的主要生理功能是促进成熟和抑制生长,那么在这个阶段 ABA 含量没有统计学上的差异也就可以理解了。当然,ABA 在后续继代过程中的变化规律是否如此,还有待于进一步研究。

2.3 不同年龄试材的 5 种内源激素含量比值分析

为了解与黄波罗发育阶段转化相关的生物物质代谢差异,并依此确定外植体选择的适龄期,对有关试材的内源激素含量比例做了分析,结果见表 1。

其中, GAs/Z - type CKs、GAs/iP - type CKs、Z - type CKs/iP - type CKs、ABA/总 CKs、Z - type CKs/总 CKs、GAs/总 CKs 和 ABA/iP - type CKs 随试材年龄的增长基本成升高的趋势(No3 处略有降低,但高于 No1),其中 GAs/Z - type CKs、GAs/iP - type CKs 和 Z - type CKs/iP - type CKs 比值都大于 1,这与黄亚辉(2002)在茶树 (*Camellia sinensis*) 春梢萌动期发现的结果是一致的。结合诱导过程中外植体的形态学分

表 1 不同年龄试材的 5 种内源激素含量比值分析

比值类型	No1	No2	No3	No4
GAs/Z - CKs	2.45	4.22	3.96	5.72
ABA/Z - CKs	0.34	1.02	0.70	0.54
Z - CKs/iP - CKs	1.01	1.42	1.26	2.54
GAs/iP - CKs	2.49	5.98	4.97	14.54
ABA/iP - CKs	0.34	1.45	0.88	1.36
GAs/总 CKs	0.24	2.47	2.20	4.10
ABA/总 CKs	0.17	0.60	0.39	0.38
Z - CKs/总 CKs	0.50	0.58	0.57	0.71
iP - CKs/总 CKs	0.50	0.41	0.44	0.28
IAA/Z - CKs	4.88×10^{-6}	2.09×10^{-5}	4.03×10^{-5}	1.84×10^{-5}
IAA/GAs	1.99×10^{-6}	4.97×10^{-6}	1.02×10^{-5}	3.23×10^{-6}
IAA/总 CKs	2.45×10^{-6}	1.23×10^{-5}	2.24×10^{-5}	1.32×10^{-5}
IAA/ABA	1.46×10^{-5}	2.05×10^{-5}	5.72×10^{-5}	3.44×10^{-5}
IAA/iP - CKs	4.94×10^{-6}	2.97×10^{-5}	5.06×10^{-5}	4.69×10^{-5}
ABA/GAs	0.14	0.24	0.18	0.09

析,可以推测出 GAs 和两种 CKs 在促进细胞分裂分化过程中具相互拮抗作用,即试材的初始发育年龄增长,其比值升高,二者共同作用的结果逐渐减弱了外植体诱导细胞分裂(或分化)的促进能力。比较 IAA/Z - type CKs、IAA/GAs、IAA/iP - type CKs、IAA/ABA 和 IAA/总 CKs 的变化, No1 为最低,至 No3 阶段逐渐升高,但均小于 1,即不同发育阶段各微繁材料中 IAA 含量相对于其它激素(iP - type CKs、Z - type CKs、ABA 和总 CKs)均较低,这可能正好说明适量 IAA 促进生长发育的有效期较短,或者对较成熟的生长发育阶段试材的生理效应较小;另一方面,通过单因素方差分析,可以看到 Z - type CKs/iP - type CKs 和 iP - type CKs/总 CKs 都存在显著差异(Z - type CKs/iP - type CKs, $F = 37.677^{**}$; iP - type CKs/总 CKs, $F = 37.68^{**}$),但前者的各阶段比值均大于 1,后者则小于 1,说明 iP - type CKs 和 Z - type CKs 对外植体的增殖能力有着不同的调控作用;从表 1 中还可看出,幼龄材料的细胞分裂(或分化)需要一个相对较高水平的 iP - type CKs 和相对较低水平 Z - type CKs 的环境,即 iP - type CKs 正向生理效应高于 Z - type CKs,但随着外植体生长发育状态的不断成熟, iP - type CKs 主导的调控过程逐渐向 Z - type CKs 主导的调控过程转化,两者此消彼长的变化趋势可以作为生长发育阶段转化的指证,当然在不同发育阶段,两者是通过叠加或协调方式来共同调控外植体的器官发生的。

3 讨论和结论

外植体经诱导产生的微繁体是母体材料的继承和发展,植物组织培养的目的之一就是获得大规模

的优良苗木,而供体材料遗传特征是在生长发育阶段逐渐表现的,这样供体材料的发育阶段往往就接近或已经成熟,与幼嫩供体材料相比就相对难于繁殖,但为了获得优良苗木,适龄材料的选择就显得尤为重要。本实验正是通过对不同发育阶段外植体在无性繁殖过程中的内源代谢状态与外观形态学观察相结合来对适龄材料做出选择,结果发现不同发育阶段的供体材料经多次继代后,无性繁殖能力和生长势的增加,与具有相似繁殖能力和生长势的幼嫩材料相比,充分表现遗传特征的成熟材料正是无性繁殖试材选择所必须的。同时,发育阶段间具显著差异的 iP - type CKs/total Cks、Z - type CKs/ iP - type Cks 和 GAs 可作为选择适龄微繁供体的指标。这与 Ana Elisa Valdés 和胡虹等(2002, 2004 和 1993)分别在不同年龄的辐射松、伞状石松和云南山植发现的结果相一致。

参 考 文 献:

- [1] 何钟佩. 农作物化学控制实验指导[M]. 北京:北京农业大学出版社,1993. 60 - 68.
- [2] 胡虹,季本仁,段金玉,等. 云南山植中吲哚乙酸、脱落酸、玉米素和玉米素核苷的内源水平及其生根率[J]. 云南植物研究,1993,15(3):278 - 284.
- [3] 李宗霆,周燮. 植物激素及其免疫检测技术[M]. 南京:江苏科学技术出版社,1996. 177 - 196.
- [4] Ana Elisa Valdés, María Luz Centeno, Santiago Espinel, Belén Fernández. Could plant hormones be the basis of maturation indices in *Pinus adiate* [J]. *Plant Physiol. Biochem*, 2002, 40(3):211 - 216.
- [5] Ana Elisa Valdés, Belén Fernández, María Luz Centeno. Hormonal changes throughout maturation and ageing in *Pinus pinea* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, 42(4):335 - 340.
- [6] 马焕普,刘志民. 赤霉素与果树的生长发育[J]. 植物学通报,1998,15(1):27 - 36.

(责任编辑:韩素梅)

(上接第 8 页)

表 3 不同处理时间山杏花模拟方程及 LT_{50} 值

处理时间(h)	模拟方程	半致死温度	相关系数	纠正系数	F 值	$F_{0.01}(1,3)$
2	$Y_2 = \frac{47.53927}{1 + 14.61349^{0.4484535x}}$	-5.9804	0.9818	1.50	80.0591	34.1
4	$Y_4 = \frac{49.30997}{1 + 15.76226^{0.469209.3x}}$	-5.8772	0.9716	1.50	50.6677	
6	$Y_6 = \frac{50.24738}{1 + 15.76083^{0.4684881x}}$	-5.8860	0.9755	1.50	58.8594	
8	$Y_8 = \frac{52.82482}{1 + 15.19982^{0.4693619x}}$	-5.7978	0.9776	1.50	64.6735	

3 结果与讨论

3.1 不同温度山杏花相对电导率差异显著,在 0 ~ -8℃,随温度的降低,山杏花相对电导率有渐增的趋势,呈 S 形曲线变化。从 -4℃ ~ -6℃ 为电解质渗出率急剧增加期。山杏花期冻害的主导因子是温度,低温持续的时间只有在临界温度时才起作用。

3.2 利用 Logistic 方程编程求解 2h、4h、6h、8h 山杏花 LT_{50} 值分别为 -5.9804℃、-5.8772℃、-5.8860℃和 -5.7978℃,与形态指标褐变率相吻合,表明利用此程序求解山杏花期冻害的 LT_{50} 值是准确可行的。

3.3 对致死低温临界值求解的方法很多,但都过于复杂,不方便,因此利用 Logistic 方程编程求解,只要输入相应的温度及相对电导率,则可求出模拟方程和致死低温临界值,从本实验的结果看,效果极佳。对于方程的模拟,K 值的赋予是求得该植物组织致死低温临界值的核心,通过计算机的数次模拟试验,取得一个最合适的 K 值,是方程模拟极显著的前提。

参 考 文 献:

- [1] 刘桂森,张立斌,王同坤,等. 山杏花芽分化及开花物候期观察[J]. 沈阳农业大学学报,1996,27(1):95 - 96.
- [2] 卢振宇. 山杏生产现状与发展对策[J]. 北方果树,1998, (4):28 - 29.
- [3] Rolf N, Rune B. Freeze injury to strawberry plants as evaluated by crown tissue browning regrowth and yield parameters[J]. *Scientia Horticulturae*, 1999, 81(3):321 - 329.
- [4] 苏金明,傅荣华. 统计软件 SPSS for Windows 实用指南[M]. 北京:电子工业出版社,2000.
- [5] 张宪政,等. 植物生理学实验技术[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1989. 329 - 333.
- [6] 朱根海,刘祖祺,等. 应用 Logistic 方程确定植物组织低温半致死温度的研究[J]. 南京农业大学学报,1986, (3):9 - 16.
- [7] 蔡贤如,高聿清. Logistic 方程参数优化估计方法的研究[J]. 沈阳农业大学学报,1995,26(1):64 - 67.

(责任编辑:韩素梅)