

云南山楂中吲哚乙酸、脱落酸、玉米素和玉米素核苷的内源水平及其生根率*

胡虹 季本仁 段金玉 罗桂芬

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要 以云南山楂(*Crataegus scabrifolia* (Franch.) Rchd.)几个株系的成年树和实生苗的离体培养芽条为材料, 用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定了它们的叶片中吲哚乙酸(IAA), 脱落酸(ABA), 玉米素和玉米素核苷(Z+ZR)的内源水平, 探讨了这三种激素及其之间的平衡与生根率的相关性。结果发现: 1. IAA 内源水平之差异存在于株系间。2. 内源(Z+ZR)在株系间无显著差异, 而幼树发育至成年树的过程中, 与 IAA 的平衡是多样的, 同成年树的生根率似有以下相关性, 当 IAA 水平降低, 同时(Z+ZR)水平升高, 有利于生根, 反之则抑制生根。3. ABA 内源水平无论成年或幼年树都呈低水平且无显著差异。

关键词 云南山楂; 组织培养; 生根率; 内源激素; 吲哚乙酸; 脱落酸; 玉米素和玉米素核苷

THE ENDOGENOUS LEVELS OF INDOLE-3-ACETIC ACID, ABSCISIC ACID, AND ZEATIN PLUS ZEATIN-RIBOSIDE IN CULTURAL SHOOTS OF CRATEGUS SCABRIFOLIA AND THEIR ROOTING RATIO

HU Hong, JI Ben-Ren, DUAN Jin-Yu, LUO Gui-Fen

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

Abstract Cultural shoots derived from adult and their seedlings plant of *C. scabrifolia* were used as experimental material. Endogenous levels of IAA, ABA and Z+ZR were determined by method of enzymelinked immunosorbend assay(ELISA). We also probed into relation among the plant hormones mentioned above and different rooting ratio in cultured shoots derived from seedlings and adult plants of *C. scabrifolia*. The experimental results show: The endogenous level of IAA depends upon individual line. The balance of IAA and Z+ZR during the course from seeding to adult plant is multiform, when endogenous levels of IAA increase and Z+ZR decrease, it is of benefit to induce root in cultural shoots derived from adult plant. Conversely, it is disadvantageous to induce root. The endogenous level of ABA in all shoots is at lower level, and no remarkable difference between the one derived from seedlings or adult plant was observed.

Key words *Crataegus scabrifolia*; Tissue culture; Rooting ratio; Endogenous of phytohormone; Indole-3-acetic acid; Abscisic acid; Zeatin plus zeatin-riboside

在组织培养研究的实践中, 为了诱导组织和器官的脱分化和再分化, 外源施加不同种类和浓度配比的植物激素已成为一种常规的实验手段。但是人们对于植物材料本身的内源激素水平及激素间的平衡状况往往知之甚少。一种常见的现象是当诱导木本植物材料离体培养条件下生根时, 幼年树比成年树有多得多的诱导生根率。究竟它们之间在内源激素水平上是否存在某种差异, 这种差异是否与生根的难易相关, 对此我们颇感兴趣, 但这方面的报道极少。这种状况无疑是与植物内源激素含量甚微, 测定工作困难有关。而这个问题的澄清, 无论是对植物阶段发育、细胞全能性表达调控机理的进一步认识、木本果树的栽培选育、组培外植体的选择以及与外源激素的关系都有积极的意义。本实验室近几年来相继建立起来的 IAA, ABA⁽¹⁾, ZR⁽²⁾ 的酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 具有高灵敏度, 高特异性, 快速、经济等优点, 为定量研究植物内源激素提供了方法上的保证。

云南山楂 (*C. scabrifolia*) 有幼年型与成年型的差异⁽³⁾。本文报道了由云南山楂不同树龄的四株成年树茎尖及相同株系的实生苗为外植体, 诱导其组培苗生根并观察生根能力的差异; 间接 ELISA 测定了这两种植株中 IAA、(Z+ZR)、ABA 内源水平。

材料和方法

植物材料 云南山楂 (*C. scabrifolia*) 选用分布在昆明附近、地域上相互隔绝、树龄上有一定差异的 4 个单株。分别是 K 号 (禄丰县, 20—30 年), H 号 (禄丰县, 40—50 年), C 号 (禄丰县, 80—90 年), I 号 (玉溪地区, 100 年以上)。

1. 取这 4 株成年树茎尖诱导休眠芽萌发、经培养得到这些单株的无性系: (1) 取生长旺盛 2cm 左右的芽条做生根实验; (2) 取培养基以上植株的全部叶片作测定内源激素的供试材料。

2. 取上述 4 株树所结种子得到的实生苗为外植体, 培养得到相应株系的无性系。与源于成年树的无性系做平行实验, 故取相应的芽条和叶片。

植物材料的提取和纯化 取 1g 鲜重的植物材料经液氮冷冻, 粉碎, 以含有 1mg/mL 丁羟基甲苯 (BHT) 的 80% 甲醇提取 3 次, 每次 10mL/g.FW 1 小时, 低温、避光。80% 甲醇提取物过 Sep-Pak C 反相柱后, 50℃ 减压蒸去甲醇。将此含水提取物均匀地分为 2 份 (每份含 0.5g 鲜重植物材料), 它们还须进一步纯化: ① 检测 (Z+ZR) 的纯化: 按 0.2g/g.FW 加入水不溶性聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), 吸出上清液, 冰浴条件下加入 KH_2PO_4 (0.1g/mL 上清) 和 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.92g/mL 上清), 待其溶解后, 乙酸乙酯等量分配 3 次。50℃ 减压蒸干乙酸乙酯分级部分, 以 0.15mol/L 的磷酸缓冲液 pH7.2 (PBS) 定容, 待测。② 检测 IAA 和 ABA 的纯化: 调整含水提取物 pH 至 2—3, 二氯甲烷等量分配 3 次, 减压蒸干后, 用重氮甲烷脂化, 使 IAA, ABA 甲酯化为 IAA-Me, ABA-Me, 蒸干。以 PBS 定容。待测。

免疫试剂 (1) 包埋抗原: 本实验用重楼属 (*Paris* L.) 植物中提取的水溶性重楼蛋白 (PP) 作为载体, 分别与 IAA、ABA、ZR 偶联⁽²⁾, 得到 IAA-PP, ABA-PP, ZR-PP。作为包埋抗原包被 40 孔酶标板。(2) 第一抗体: 多克隆抗体兔抗 IAA-IgG, 兔抗 ABA-IgG, 兔抗 ZR-IgG。电泳纯。本实验室制备。(3) 酶标二抗: 合成物山羊兔抗 IgG-HRP 由本实验室合成。

表 1 提取过程中 IAA, ABA, ZR 的总回收率

Table 1 The overall recovery of extraction procedures for IAA, ABA and ZR

内标物 internal standard	总回收率 overall recovery (%)	变异系数 C. V (%)
IAA-Me	89	6
ABA-Me	100	0.5
ZR	90	4

间接 ELISA 按季本仁、段金玉⁽¹⁾报道的方法和步骤进行测定。光密度检测改进用 DG-3022 酶联免疫检测仪(华东电子管厂)。

抗体检测灵敏度 用间接 ELISA 分别测定了兔抗 IAA-IgG、ABA-IgG、ZR-IgG 分别对 IAA-Me, ABA-Me, 和 ZR 的检测灵敏度。并绘制出 3 种激素的标准曲线。见图 1、2、3。由图 1、2、3 所示 3 种激素的检测极限为 0.1pmol, 线性检测范围达 0.1—50pmol。测定方法已达到所要求的灵敏度。

激素提取过程的回收率 用内标法分别测定了激素提取过程中 IAA、ABA 和 ZR 的总回收率, 见表 1。

提取液的梯度稀释分析 在一系列内标激素浓度中加入不同稀释度的提取液, 分别测定 IAA, Z+ZR, ABA 的含量。结果表明: 3 种激素的提取液浓度稀释曲线与未加样的本底浓度绘制的曲线有较好的平行关系。见图 4—6。说明样品的粗纯化已去除干扰物, 测定结果是可靠的。

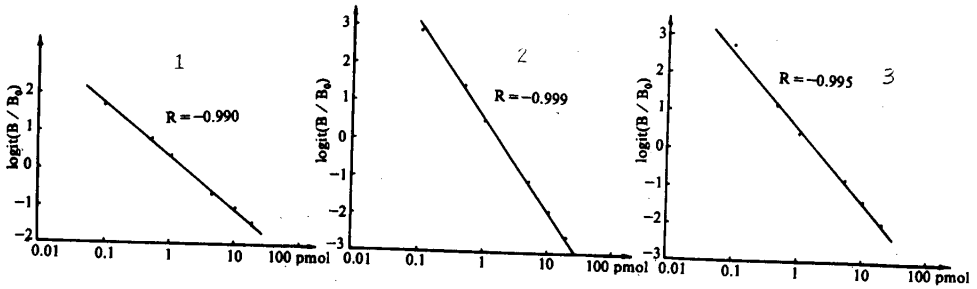


图 1 IAA 酶标免疫测定线性标准曲线; 图 2 ABA 酶标免疫测定线性标准曲线; 图 3 ZR 酶标免疫测定线性标准曲线

Fig. 1 Standard curve for IAA ELISA in the Linearised form.; Fig. 2 Standard curve for ABA ELISA in the Linearised form.; Fig. 3 Standard curve for ZR ELISA in the Linearised form.

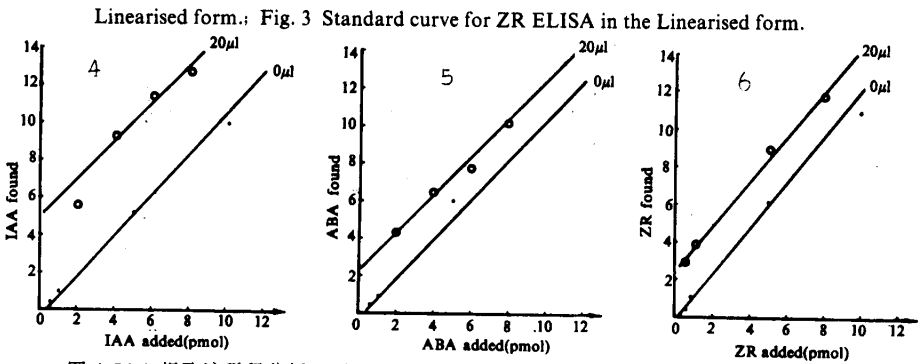


图 4 IAA 提取液稀释分析; 图 5 ABA 提取液稀释分析; 图 6 ZR 提取液稀释分析

Fig. 4 Dilution analysis of IAA extraction; Fig. 5 Dilution analysis of ABA extraction; Fig. 6 Dilution analysis of ZR extraction

结果与讨论

1. 生根率的比较

按照前文⁽³⁾报道的方法, 诱导芽条生根, 结果见表 2。正如表 2 所列, 我们观察到, 源于实生苗的芽条, 4 个株系都能生根。但源于成年树的芽条, 4 个株系间的生根率差异较大。其中 H 号生根率最高, 达到 60%。在我们采集这棵树时观察到其外部形态特征, 如叶缘呈细锯齿、茎多刺等, 还保持一些

幼年树的特征。I号, 树龄最长, 生根率仅为4%; 而K号、C号则介于H号和I号之间的生根率。

表2 云南山楂4个株系不同芽条的生根率(接种20天后观察)

Table 2 Rooting rate in different culture shoots from four age adult and seeding plant of *C.scabrifolia* (20 day inoculation)

材料 Material	外植体树龄 Age of adult plant (a)	芽条来源 Origin of shoots	供试芽条数 Tested No. of shoots	生根数 Rooting No. of shoots (plant)	生根率 Rooting rate(%)
K号	20—30	幼(j)	50	50	100
		成(a)	62	19	31
H号	40—50	幼(j)	50	50	100
		成(a)	156	92	60
C号	80	幼(j)	50	50	100
		成(a)	66	22	33
I号	100年以上	幼(j)	50	50	100
		成(a)	56	2	4

a: adult 成年树, j: juvenile 幼年树

2. ELISA 检测结果

将相同株系的幼年树与成年树组培苗编为一组, 在同一时间对样品提取、纯化、测定全过程进行平行处理, 以消除系统误差。经3次重复处理测定, 得到了4个株系、3种激素的内源水平, 结果见表3—5。

表3 云南山楂4个株系不同芽条的内源 IAA 水平(接种20天后测定)

Table 3 Endogenous levels of IAA in different culture shoots from four age adult and seeding plant of *C.scabrifolia* (20 day inoculation)

材料 Material	芽条来源 Origin of shoots	IAA 含量 pmol / 50 μ L (3次测定值) IAA levels (Values from three assays)	平均测定值 pmol / 50 μ L Average levels	平均值 pmol / g.FW Average levels	项目内 T 分析 T analysis of items	
					T 值 T Value	显著性分析
K号 20—30年(a)	幼(j)	1.7 2.3 2.8	2.3	46	0.81 T=4.303	不显著
	成(a)	2.8 2.5 2.6	2.6	52		
H号 40—50年(a)	幼(j)	4.2 3.5 4.6	4.1	82	4.98 T=4.303	显著
	成(a)	1 1.3 3	1.76	35.2		
C号 80年(a)	幼(j)	7.3 8.8 6.9	7.6	152	0.67 T=4.303	不显著
	成(a)	9.8 7.7 7.4	8.3	166		
I号 100年以上(a)	幼(j)	6.8 5.6 7.2	6.5	130	6.07 T=4.303	显著
	成(a)	8.1 7.8 8.6	8.2	164		

分析表3, 我们注意到, 内源 IAA 水平有一个很明显的趋势, 即相同株系内如果幼年树有较高 IAA 水平, 成年树也有相应的高水平, 反之, 如果幼年树 IAA 水平较低, 成年树也随之较低; 以 n=4 作统计分析, 在4个株系中, IAA 内源水平的绝对值, 主要反映株系之间的特异性。因此, 单从 IAA 的绝对水平上找不出与生根的难易有什么关系。因为幼年树中 IAA 绝对量虽然有高有低, 却都能生根; 而成年树中 IAA 绝对量也有高有低, 但是各株系生根率却不尽相同。不过, 当避开 IAA 的绝对水平, 从各株系间 IAA 的内源水平有株系个性的角度, 再来看幼年树与成年树之间的显著性分析, 发现有显著差异的 H 号, I 号在生根上的差异也最大。H 号的成年树与幼年树相比, IAA 水平显著降低, 生根率最高; I

号的成年树与幼年树相比, IAA 水平显著升高, 生根率最低。K 号, C 号成年树与幼年树之间 IAA 水平无显著差异, 生根率中等。

表 4 云南山楂 4 个株系不同芽条的内源 Z+ZR 水平(接种 20 天后测定)

Table 4 Endogenous levels of Z+ZR in different culture shoots from four age adult and seeding plant of *C.scabrifolia* (20 day inocultion)

材料 Material	芽条来源 Origin of shoots	Z+ZR 含量 pmol / 50 μ L (3 次测定值) Z+ZR levels (Values from three assays)	平均测定值 pmol / 50 μ L Average levels	平均值 pmol / g.FW Average levels	项目内 T 分析 T analysis of items	
		T 值 T Value	显著性分析			
K 号 20—30 年(a)	幼(j)	1.1 1.3 1.6	1.3	26	6.4 T=4.303	显著
	成(a)	4.2 3.2 4.1	3.8	76		
H 号 40—50 年(a)	幼(j)	1.6 0.8 1.0	1.13	22.6	1.63 T=4.303	不显著
	成(a)	2.0 1.0 2.7	1.9	38		
C 号 80 年(a)	幼(j)	2.6 1.8 2.2	2.2	44	2.9 T=4.303	不显著
	成(a)	1.59 1.1 1.8	1.5	30		
I 号 100 年以上(a)	幼(j)	4.8 4.0 —	4.4	88	7.5 T=4.303	显著
	成(a)	1.0 1.3 1.9	1.4	28		

表 5 云南山楂 4 个株系不同芽条的内源 ABA 水平(接种 20 天后测定)

Table 5 Endogenous levels of ABA in different culture shoots from four age adult and seeding plant of *C.scabrifolia* (20 day inocultion)

材料 Material	芽条来源 Origin of shoots	ABA 含量 pmol / 50 μ L (3 次测定值) ABA levels (Values from three assays)	平均测定值 pmol / 50 μ L Average levels	平均值 pmol / g.FW Average levels	项目内 T 分析 T analysis of items	
		T 值 T Value	显著性分析			
K 号 20—30 年(a)	幼(j)	0.6 0.5 1.0	0.7	14	3.44 T=4.303	不显著
	成(a)	0.1 0.2 0.15	0.15	3		
H 号 40—50 年(a)	幼(j)	1.2 1.2 1.8	1.4	28	1.3 T=4.303	不显著
	成(a)	0.2 0.7 2.0	1.0	20		
C 号 80 年(a)	幼(j)	0.8 0.94 1.06	0.93	18.6	3.25 T=4.303	不显著
	成(a)	0.6 0.83 1.0	0.8	16		
I 号 100 年以上(a)	幼(j)	1.2 1.1 1.3	1.2	24	0.26 T=4.303	不显著
	成(a)	0.9 1.8 0.6	1.1	22		

表 4 所示的 ZR 水平实际上是 Z+ZR 的总贡献, 因为本实验使用多克隆抗体, Z 与 ZR 的交叉反应为 44%, 故内源 ZR 测定水平应以 Z+ZR 表示。与 IAA 不同, Z+ZR 在株系间无明显差异, 幼年树与成年树相比较, 幼成之间也无明显差异, 故绝对水平上找不出与生根有什么相关。

由表 5 看到, 4 个株系内源 ABA 绝对水平都处于一个低水平, 分析这种现象, 我们认为由于供试材料是试管苗, 正在旺盛生长, 且处于一个湿度饱和、温度适中, 这样一种特定的环境中, 没有 ABA 的积累和株系间幼年树与成年树的差异是容易理解的, 同时也说明, ABA 可能没有参与生根这一生理过程。考虑到各激素之间协同作用的重要性, 将表 2—5 综合分析, 得表 6。

表6 内源 IAA 与 Z+ZR 的关系

Table 6 Relationship between Endogenous levels of IAA and Z+ZR

材料 material	IAA_a / IAA_j	$(Z+ZR)_a / (Z+ZR)_j$	$IAA_j / (Z+ZR)_j$	$IAA_a / (Z+ZR)_a$
K 号	1.12	2.94	1.80	0.7
H 号	0.43	1.67	3.6	0.9
C 号	1.11	0.68	3.5	5.5
I 号	1.26	0.33	1.5	5.9

表7 内源 IAA、Z+ZR 与云南山楂成年树芽条生根的关系

Table 7 Relationship between endogenous IAA, Z+ZR and rooting of culture shoots from adult plant of *C. scabrifolia*

材料 material	项目内 T 分析 T analysis of items		生根率 Rooting rate(%)
	IAA_a / IAA_j	$(Z+ZR)_a / (Z+ZR)_j$	
K 号	0	+	31
H 号	—	0	60
C 号	0	0	33
I 号	+	—	4

0: 成年树与幼年树之间内源激素无显著差异; —: 成年树内源激素比幼年树显著减少; +: 成年树内源激素比幼年树显著增高 0: shows: there is no remarkable difference between seedings and adult plant.—: shows: endogenous levels of plant hormone decrease remarkably from seeding to adult plant.+ : shows: endogenous levels of plant hormone increase remarkably from seeding to adult plant.

归纳表 6, 我们注意到, 最有规律的一组数据是 $IAA_j / (Z+ZR)_j$ 的比值都大于 1。是否说明生根需要一个 IAA 相对高水平, Z+ZR 相对低水平的内源激素环境? 但这种关系在成年树中不成立, 甚至有相反的数据。对表 3 的分析我们特别注意了 H 号、I 号中 IAA 水平的升降与生根的关系。用 IAA_a / IAA_j , $(Z+ZR)_a / (Z+ZR)_j$ 的比值来说明与生根的关系。根据表 3、4 中 T 值分析的结果, 设定成年树与幼年树的比值作为一种指标, 激素水平显著升高为“+”, 显著降低为“-”, 无显著差异为“0”的话, 与生根联系起来分析, 情况就变得明朗一些, 见表 7。

从表 7 看出, IAA, Z+ZR 这两种激素与成年树生根的难易似乎有下列关系。当幼年树向成年树转化过程中, 若 IAA 水平显著升高, ZR 水平显著降低, 这种情况不利于诱导生根, 如 I 号。若 IAA 水平显著降低, Z+ZR 水平相对稳定, 则利于诱导生根, 如 H 号。C 号中 IAA, Z+ZR 都没有显著变化, 而 K 号虽然 Z+ZR 有显著增高, 但 IAA 无明显变化, C 号, K 号都有中等的生根能力, 可见 Z+ZR 虽然起重要的协调作用, 但 IAA 似乎是更强的控制因子。

以上分析, 仅是对我们所测定的 4 个株系中观察到的现象和初步结果的讨论, 是否具有普遍意义, 还有待更多的实验加以验证和研究。我们也还应该从多种角度来考虑、完善这一研究。

参 考 文 献

[1] 季本仁, 段金玉. 脱落酸的酶标免疫测定. 云南植物研究 1986; 8(2): 193—200

- [2] 徐茹娟, 季本仁, 段金玉. 玉米素核苷的酶标免疫测定法. 云南植物研究 1986; 8(3): 333—342
- [3] 胡虹, 黄仕周, 段金玉. 云南山楂基尖的离体培养及其无性系快速繁殖. 云南植物研究 1987; 9(3): 353—358
- [4] 克累默尔 D J, 考兹洛夫斯基 T T 著, 汪振儒译. 《木本植物生理学》. 北京: 中国林业出版社, 1985: 180—183
- [5] 季本仁, 李恒, 冯唯诚等. 重楼属植物的免疫血清学研究. 云南植物研究 1986; 8(3) 323—332
- [6] Weiler E W, Eberle J, Mertens R et al. Immunology in plant science. Cambridge: Cambridge University press, 1986; 27

* * * * *

云南植物研究 1993; 15(3): 284

Acta Botanica Yunnanica

杉木属一新栽培变种

冉启森

鄢棣

(昭通地区林科所, 昭通 657000)

(云南省林业调查规划院, 昆明 650021)

A NEW CULTIVAR OF THE GENES CUNNINGHAMIA

RAN Qi-Sen¹, YAN Di

(¹ Forestry Sciences Institute of Zhaotong District, Zhaotong 657000)

(Yunnan Forestry Investigation and Plan Institute, Kunming 650021)

昭通杉木 (新栽培变种)

Cunninghamia laceolata (Lamb.) Hook. cv. *zhaotongensis*, cv. nov.

Truncus infra mdeium nodis valde incrassatis; folia breviora, 1.3—3.0 cm longa; strobili et semina minores.

云南鲁甸新街乡, 海拔 2200 m, 冉启森 92233(Typus)。分布于昭通地区的永善、鲁甸、绥江、奕良等县, 海拔 1300—2300 m。

本栽培变种主要特征是: 树干中部以下具膨大隆起的节; 叶较短, 长 1.5—3 cm; 球果、种子均偏小。

致谢 本文承徐永椿、冯国楣教授指导。