

同源四倍体玫瑰香葡萄嫩枝扦插不定根发生过程中内源激素的变化

齐永顺^{1,2}, 张志华^{1*}, 王同坤², 杜国强¹, 张京政²

(¹河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001; ²河北科技师范学院园艺园林系, 河北昌黎 066600)

摘要: 以葡萄同源四倍体玫瑰香和其二倍体玫瑰香母株的嫩枝插条为试材, 研究了扦插生根过程中 (0~18 d) 生根部位皮层的内源激素含量变化。结果表明: 玫瑰香葡萄同源加倍以后, 不仅改变了不同时期插条生根部位皮层的内源激素水平, 也改变了该部位对外施 NAA 的反应。在不定根诱导期 (0~3 d), 促进生根的生长素水平下降, 抑制生根的脱落酸和赤霉素含量上升, 生长素与脱落酸和赤霉素的比值下降; 应用 NAA 处理以后, 在根原基诱导期 (0~3 d), 赤霉素、玉米素和玉米素核苷含量不降反升, 改变了内源激素的整体变化态势。分析认为, 同源加倍后嫩枝插条生根部位内源激素的代谢变化是造成其生根能力降低的主要原因之一。

关键词: 葡萄; 同源四倍体; 嫩枝扦插; 内源激素; 不定根

中图分类号: S 663.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2009) 04-0565-06

Changes of Endogenous Hormones in Adventitious Root Formation in Softwood Cuttings of Autotetraploid Grape Muscat Hamburg

Q I Yong-shun^{1,2}, ZHANG Zhi-hua^{1*}, WANG Tong-kun², DU Guo-qiang¹, and ZHANG Jing-zheng²

(¹Department of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China; ²Department of Horticulture & Landscape Architecture, Hebei Normal University of Science & Technology, Changli, Hebei 066600, China)

Abstract: The changes of endogenous hormones in adventitious root formation in softwood cuttings of autotetraploid grape Muscat Hamburg were studied. The results showed that endogenous hormones levels of cortex in rooting portions were not only changed, but also the response to exogenous NAA was changed after Muscat Hamburg was doubled. It showed as follows: In adventitious root induction period (0 - 3 d), the auxin levels which can promote rooting were decreased, the abscisic acid and gibberellin which can inhibit rooting were increased, then the ratio of auxin/abscisic acid and gibberellin decreased. In root primary period, a rising of the content of gibberellin, zeatin and zeatin riboside instead of decreasing after exogenous auxin applied. The overall change of endogenous hormones was changed. In conclusion, it was one of the main reasons for the decreased rooting ability of softwood cuttings of grape Muscat Hamburg that homologous doubling changed the metabolism of endogenous hormones in rooting portions.

Key words: grape; autotetraploid; softwood cuttings; endogenous hormone; adventitious root

同源四倍体玫瑰香葡萄是河北农业大学与河北科技师范学院合作, 于 1984 年利用秋水仙素进行玫瑰香茎尖诱变获得的四倍体新品种 (罗耀武等, 1997)。该品种果实大, 成熟早 (提早 10 d 左右), 具有玫瑰香风味, 生长旺盛。但研究发现, 同源四倍体玫瑰香在生根特性上发生了较大变化, 表现为嫩枝插条不定根数量少, 根系长度短, 生根率低等 (齐永顺等, 2008)。

内源激素在扦插生根过程中具有重要作用, 围绕内源植物激素与生根的关系, 已有了大量的研究

收稿日期: 2008 - 11 - 21; 修回日期: 2009 - 03 - 02

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zzhy@tom.com)

工作 (郑均宝等, 1991; 刘桂丰等, 2001; 敖红等, 2002; 李亦凡和曹福亮, 2004; 张芹等, 2007), 但同源四倍体葡萄嫩枝扦插过程中的内源激素变化尚未见报道。本试验中以同源四倍体玫瑰香和其二倍体玫瑰香母株的嫩枝插条为试材, 测定了扦插生根过程中生根部位皮层的内源激素变化, 以及对外源植物生长调节剂的应答反应, 旨在为探讨同源四倍体玫瑰香葡萄的生根生理机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2007年 7月 7—25日在河北科技师范学院实习基地的全光照自动喷雾扦插育苗床进行。材料为同源四倍体玫瑰香葡萄和其同龄的二倍体玫瑰香母株上采集的半木质化嫩枝插条。选择健壮、粗细一致、无病虫害的枝段作插穗, 将其剪截成两个芽段的插条, 疏除下部的叶片并将上部的叶片剪掉 $1/4 \sim 1/3$ 叶面积。

1.2 方法

试验设 4 个处理, 即同源四倍体玫瑰香和二倍体玫瑰香插条直接扦插, 用 $1\ 000\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 萘乙酸速蘸同源四倍体玫瑰香和二倍体玫瑰香插条基部 (0~5 cm 处) 3 s, 晾干后扦插。采用洁净过筛的细河砂为基质, 扦插前用清水洗净并用 800 倍的多菌灵消毒。扦插深度 5 cm, 每插箱 (小区) 30 个插条, 重复 3 次, 随机排列。为满足设计 7 次采样的要求, 每个处理扦插 21 箱, 共计 84 箱。

从扦插当天开始, 每 3 d 取 1 次样品, 剪取扦插基质内的插条基部茎段, 用蒸馏水洗净, 剥取该部分韧皮部, 充分剪碎、混匀, 保存于 $-60\ ^\circ\text{C}$ 低温冷柜中备用。

称取 2 g 左右的样品放入小瓶中, 放入真空冷冻干燥机内冷冻干燥 48 h, 取出样品粉碎、研磨成粉末状并过筛, 称 50 mg 放入 10 mL 离心管中, 加入 80% 甲醇 (含 1% 的冰醋酸), 在 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中浸提 12 h, 取出震荡 0.5 min, 4 $^\circ\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、离心 10 min, 取出上清液 1 mL 加 7 mL 蒸馏水, 过已经用含 1% 冰醋酸 (体积比) 的异丙醇 (3 mL), 100% 甲醇 (3 mL), 含 1% 冰醋酸的 10% 甲醇 (体积比 3 mL) 活化、稀释好的 ^{18}C 柱, 用含 1% 冰醋酸的 10% 甲醇 (体积比) 清洗杂质, 含 1% 冰醋酸的 80% 甲醇 (体积比 1 mL) 洗脱, 用 1.5 mL 离心管收集洗脱液, 上机测试。测定条件: 流速 $0.7\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 波长 254 nm; 柱温 $30\ ^\circ\text{C}$ 。

试验数据采用 DPS 软件分析。

2 结果与分析

2.1 同源四倍体玫瑰香和二倍体玫瑰香扦插生根的情况

形态观察结果显示: 在扦插 18 d 时, 同源四倍体玫瑰香嫩枝扦插不定根率仅为 51.4%, 平均每个插条的不定根数量仅为 4.3 条, 不定根总长度仅为 2.4 cm, 均显著低于其二倍体母株 (79.8%, 7.2 条和 19.4 cm), 表现同源四倍体玫瑰香的生根能力较其二倍体母株显著下降。1 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的萘乙酸处理不同程度地提高了同源四倍体玫瑰香和原二倍体母株嫩枝扦插的生根能力 (齐永顺等, 2008); 形态解剖结果显示: 各处理不定根的发育时期均可划分为 3 个时期, 即根原基诱导期 (扦插后 0~3 d), 根原基发育期 (扦插后 6~9 d) 和不定根发育期 (扦插后 12~18 d)。

2.2 生根过程中的激素含量的变化

2.2.1 生长素 (IAA)

如图 1, A 所示, 二倍体玫瑰香两个处理各时期的吲哚乙酸含量变化幅度较大。其中, 生根最好的二倍体玫瑰香加 NAA ($2x + \text{NAA}$) 处理峰值出现在扦插当天, 生根较好的二倍体玫瑰香 ($2x$) 处理峰值出现在扦插后 3 d (根原基发育期); 四倍体玫瑰香的两个处理各期含量变化幅度较小, 没有出现明显的高峰。

同时期各处理生长素含量比较，差异较大的时期出现在扦插后 3 d ($F > F_{0.01}$, 根原基诱导期)和扦插后 15 d ($F > F_{0.01}$, 不定根发育期)。由此可见，根原基诱导期(扦插后 0~3 d)高水平的吲哚乙酸含量可能利于生根。

2.2.2 玉米素 (ZT)

生根最差的四倍体玫瑰香 (4x) 处理在根原基诱导期、根原基发育期和不定根发育期，其玉米素含量均表现缓慢上升的趋势；生根性状较差的四倍体玫瑰香加 NAA (4x+NAA) 处理则围绕 4x 的含量曲线上下波动；生根性状较好的 2x 处理在扦插的 0~9 d 含量缓慢上升，其后逐渐下降；生根最好的 2x+NAA 处理在扦插后的 0~6 d 缓慢上升，其后逐渐下降。NAA 处理降低了二倍体玫瑰香嫩枝插条内的玉米素含量，且在扦插后 0~3 d 改变了其含量的变化趋势；但对四倍体玫瑰香嫩枝扦插部位皮层内玉米素含量的影响则表现提高和降低的交替现象 (图 1, B)。

2.2.3 玉米素核苷 (ZR)

由图 1, C 可见，未经萘乙酸处理的二倍体玫瑰香和四倍体玫瑰香玉米素核苷含量的变化趋势在扦插后 3~15 d 基本相同，2x 处理的含量水平较低；且在扦插后 0~3 d 和 15~18 d 二者的变化趋势相反。

经 NAA 处理后，降低了二倍体玫瑰香嫩枝扦插部位皮层内的玉米素核苷含量，且扦插后 0~3 d 的下降趋势明显；但同源四倍体材料内的含量表现与玉米素相似的趋势，即围绕 4x 处理的曲线上下交替变化。

同时期各处理之间，其含量有两个具有显著差异的时期：一个是在根原基诱导期(扦插后 3 d)，4x 处理极显著高于 2x+NAA 处理 ($F > F_{0.01}$)；一个是根原基发育期(扦插后 9 d)，4x+NAA 处理极显著高于 2x+NAA 处理 ($F > F_{0.01}$)。

2.2.4 赤霉素 (GA)

在根原基诱导期(扦插后 0~3 d)，生根性能最差的 4x 处理和生根较差的 4x+NAA 处理的赤霉素含量上升，其变化趋势与生根较好的 2x 和 2x+NAA 两个处理完全相反，生根最好的 2x+NAA 处

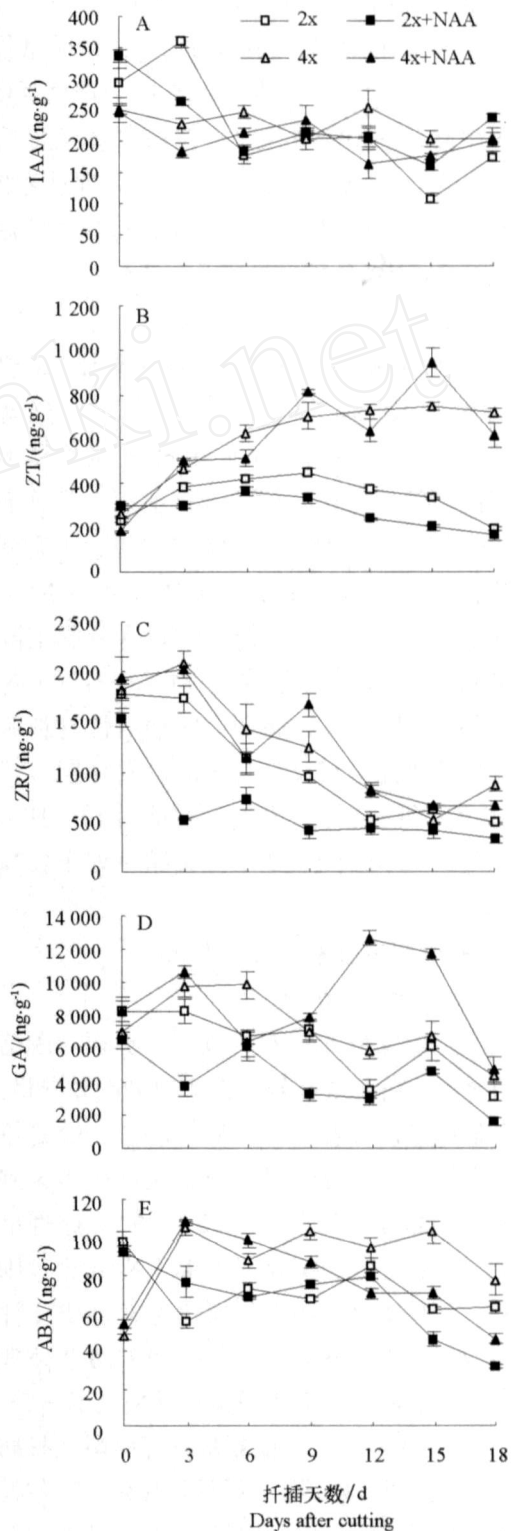


图 1 同源四倍体玫瑰香 (4x) 和二倍体玫瑰香 (2x) 葡萄扦插生根过程中内源激素含量变化

Fig. 1 Changes of endogenous hormones content in adventitious root formation in cuttings of autotetraploid Muscat Hamburg (4x) and Muscat Hamburg (2x)

理的含量极显著低于 $4x$ 和 $4x+NAA$ 处理 ($F > F_{0.01}$, 且各时期始终处于最低水平); 在根原基发育前期 (扦插后 6 d) 最难生根的 $4x$ 处理显著高于其余 3 个处理 (含量相近); 在根原基发育后期 (扦插后 9 d), 生根最好的 $2x+NAA$ 处理显著低于其余各处理 (含量相近); 在不定根迅速生长后期 (扦插后 18 d) 各处理含量接近 (图 1, D)。

2.2.5 脱落酸含量变化 (ABA)

在扦插当天, $4x$ 处理和 $4x+NAA$ 处理的 ABA 含量较低, 而 $2x$ 处理和 $2x+NAA$ 处理的 ABA 含量较高, 同倍性不同处理之间差异不显著, 但两个倍性材料之间差异极显著; 到扦插第 3 天, 同源四倍体材料的 ABA 含量迅速上升到高水平状态 ($4x$ 处理提高了 120.1%, $4x+NAA$ 处理提高了 98.5%), 而二倍体材料含量则下降到低水平状态 ($2x$ 处理下降了 74.8%, $2x+NAA$ 处理下降了 21.2%), 此期, 两种倍性材料脱落酸的变化趋势完全相反。在根原基发育期 (扦插后 6~9 d) 和不定根发育期 (扦插后 12~18 d), 生根最差的 $4x$ 处理的 ABA 含量始终处于较高水平 (图 1, E)。

2.3 生根过程中激素的比值变化

2.3.1 生长素与脱落酸

在不定根发育的不同阶段, 生长素与脱落酸的比值不同。各处理比较有两个时期的差异最大, 一是在根原基诱导期 (扦插后 3 d), 一个是不定根快速发育期 (扦插后 18 d)。在扦插当天到根原基发育开始期, $2x$ 处理和 $2x+NAA$ 处理呈现倒“V”字型变化, $4x$ 处理和 $4x+NAA$ 处理则呈现“V”字型变化; 在不定根快速发育期 (扦插后 15~18 d) $2x+NAA$ 和 $4x+NAA$ 两个处理的生长素与脱落酸比值迅速提高, 并加大了与 $2x$ 处理和 $4x$ 处理的差距; 在根原基发育前期 (扦插后 6 d) 到不定根形成初期 (扦插后 12 d), 各处理比值变化趋于平缓, 但生根最差的 $4x$ 处理的变化趋势与其余 3 个处理的变化趋势相反 (图 2, A)。

2.3.2 生长素与赤霉素

在扦插后 0~6 d, 其变化与生长素与脱落酸的比值变化相似 (图 2, B), 到扦插后 6 d 各处理比值趋同。生根最好的 $2x+NAA$ 处理始终处于最高的水平。

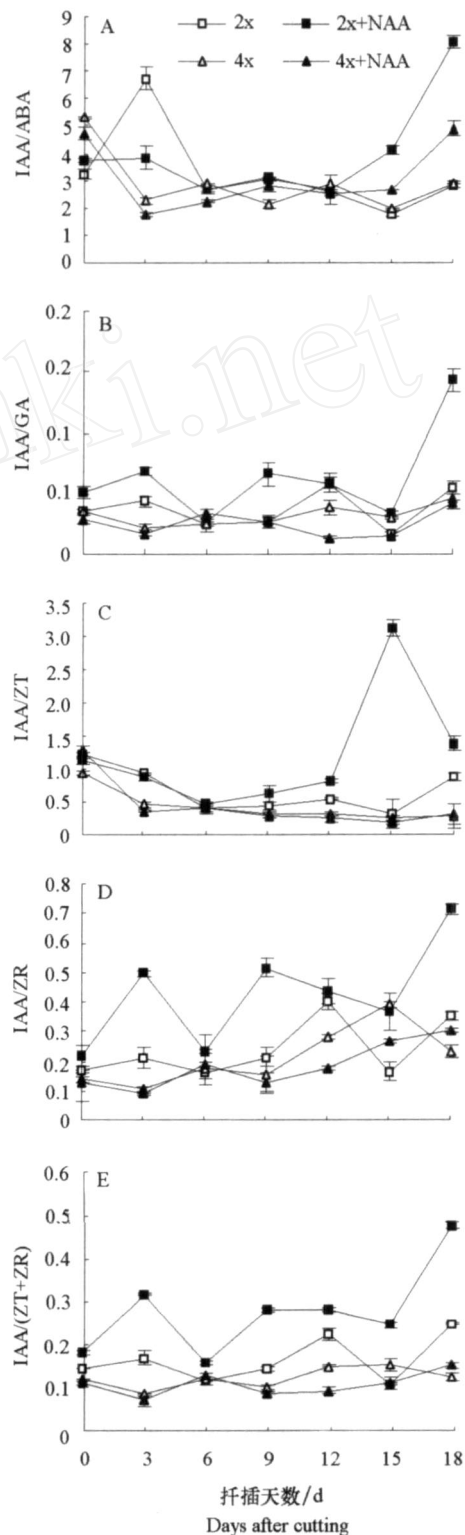


图 2 同源四倍体玫瑰香 (4x) 与二倍体玫瑰香 (2x) 葡萄扦插生根过程中激素比值的变化

Fig 2 Ratio changes of IAA/ABA, IAA/GA, IAA/ZT, IAA/ZR and IAA/(ZT+ZR) in adventitious root formation in cuttings of autotetraploid Muscat Hamburg (4x) and Muscat Hamburg (2x)

2.3.3 生长素与玉米素

各处理生长素与玉米素的比值在扦插当天相近, 到扦插后 3 d 出现明显差异, 此时 $4x+NAA$ 处理比值最小, 其次为 $4x$ 处理, 均显著低于 $2x$ 处理和 $2x+NAA$ 处理; 到根原基发育开始期 (扦插后 6 d) 各处理比值趋同, 差异消失; 在根原基发育后期和不定根发育期差异又逐渐显现并加大。各处理差异最大的时期出现在扦插后 15 d (图 2, C)。

2.3.4 生长素与玉米素核苷

生长素与玉米素核苷的比值变化如图 2, D 所示。在扦插后 0~6 d, $4x$ 处理和 $4x+NAA$ 处理呈现先降后升的“V”字型变化, 且均在扦插后 3 d (根原基诱导期) 达到最低值, $2x$ 处理和 $2x+NAA$ 处理则呈现先升后降的趋势, $2x+NAA$ 处理在扦插后 3 d 达到第 1 个高峰。到扦插后 6 d (根原基发育初期), 各处理差异消失, 随后逐渐加大; 至根原基发育后期 (扦插后 9 d) 又出现显著差异, $2x+NAA$ 处理达到第 2 个高峰。

2.3.5 生长素与玉米素和玉米素核苷

生长素与将玉米素和玉米素核苷含量累加以后的比值变化如图 2, E 所示。其变化趋势和差异情况在扦插后 0~6 d 与生长素和玉米素核苷比值变化相似。生根最好的 $2x+NAA$ 处理的比值始终高于其他各处理。

3 讨论

生长素是促进生根的激素。对此有人认为, 第一个根原细胞的分裂依赖于人工使用的或内源生长素的存在; Brunner (1978) 和 Weigel 等 (1984) 提出, 高浓度的生长素是形成根原基和不定根的有利条件; Nag 等 (2001) 指出, 在绿豆下胚轴不定根诱导期出现第一个生长素高峰。本研究中, 生根较好的二倍体玫瑰香的两个处理在根原基诱导期分别出现了生长素的峰值, 而生根性状较差的同源四倍体玫瑰香没有明显的峰值出现。

除脱落酸是目前公认的生根抑制剂以外, 赤霉素和细胞分裂素类物质在多种植物上对不定根的产生具有抑制作用 (Kato, 1958; Brian et al, 1960; Humphries, 1960; Fernqvist, 1966; Erikaen, 1974; Hartung et al, 1980; Fabijan et al, 1981)。本研究中, 同源四倍体玫瑰香嫩枝插条的扦插部位皮层内在根原基诱导期脱落酸、赤霉素、玉米素和玉米素核苷含量明显高于二倍体, 可能是导致其生根能力下降的原因。期间 NAA 处理后的四倍体玫瑰香玉米素和玉米素核苷含量出现的不规律现象, 其原因可能是试验误差, 也可能是同源加倍以后材料对外源生长素的正常反应, 有待进一步研究。

有关激素比例问题, Brian 和 Radly (1955) 与 Skoog 和 Miller (1957) 认为高水平的生长素与分裂素比例或低浓度的细胞分裂素和适宜生长素和细胞分裂素比值有利于不定根的产生 (Skoog et al, 1973)。在根原基诱导期, 同源加倍以后的二倍体玫瑰香嫩枝生根部位皮层内的生长素与脱落酸、赤霉素以及细胞分裂素类的比值降低, 可能是导致四倍体玫瑰香生根能力下降的又一原因。

本试验中发现, 各种内源激素差异最大的时期有两个。一个是根原基诱导期 (0~3 d), 一个是不定根发育期 (12~18 d); 在根原基发育期 (6~9 d) 内源激素的差异较小。因此, 可以认为, 根原基诱导期的内源激素水平对根原基的发生和后期不定根的发育具有重要作用。

References

- Ao Hong, Wang Kun, Feng Yu-long. 2002. Endogenous hormones levels in cuttings of *Larix olgensis* and their relations to rooting. Bulletin of Botanical Research, 22 (4): 190 - 195. (in Chinese)
- 敖红, 王昆, 冯玉龙. 2002. 长白落叶松插穗的内源激素水平及其与扦插生根的关系. 植物研究, 22 (4): 190 - 195.
- Brian P.W., Radley M. 1955. A physiological comparison of gibberellic acid with some auxins. Physiologia Plantarum, 8: 899 - 912.

- Brian P W, Hemming H G, Lowe D. 1960. Inhibition of rooting of cuttings by gibberellic acid. *Annals of Botany*, 24: 407 - 419.
- Brunner H. 1978. Influence of various growth substances and metabolic inhibitors on root regenerating tissue of *Phaseolus vulgaris* L. changes in the contents of growth substances and in peroxidase and IAA oxidase activities. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 88: 13 - 23.
- Erikaen E N. 1974. Root formation in pea cuttings. The influence of cytokinins at different developmental stages. *Physiologia Plantarum*, 30: 163 - 167.
- Fabjan D, Taylor J S, Reid D M. 1981. Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. Action of gibberellins, cytokinins, auxins and ethylene. *Physiologia Plantarum*, 53: 589 - 597.
- Femqvist I. 1966. Studies on factors in adventitious root formation. *Lantbrukshogskolans Annaler*, 32: 109 - 244.
- Hartung W, Ohl B, Kummer V. 1980. Abscisic acid and the rooting of runner bean cuttings. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 98: 95 - 103.
- Humphries E C. 1960. Inhibition of root development on petioles and hypocotyls of dwarf bean (*Phaseolus vulgaris*) by kinetin. *Physiologia Plantarum*, 12: 659 - 663.
- Kato J. 1958. Studies on the physiological effect of gibberellin. On the interaction of gibberellin with auxins and growth inhibitors. *Physiologia Plantarum*, 11: 10 - 15.
- Li Yi-fan, Cao Fu-liang. 2004. A study on cutting propagation techniques for male ginkgo trees. *Journal of Nanjing Forestry University*, 28 (2): 77 - 79. (in Chinese)
- 李亦凡, 曹福亮. 2004. 不同处理对银杏雄株扦插生根的影响. *南京林业大学学报*, 28 (2): 77 - 79.
- Liu Gui-feng, Yang Chuan-ping, Qu Guan-zheng, You Xiang-ling. 2001. Dynamic changes of four endogenous hormones in the larch hybrid during cuttings rooting. *Journal of Northeast Forestry University*, 29 (6): 8 - 18. (in Chinese)
- 刘桂丰, 杨传平, 曲冠正, 由香玲. 2001. 落叶松杂种插穗生根过程中4种内源激素的动态变化. *东北林业大学学报*, 29 (6): 8 - 18.
- Luo Yao-wu, Qiao Zi-jing, Zhu Zi-ying, Huangpu Zhong-si, Chang Jin-hua. 1997. Study on autotetraploid grape Muscat Hamburg with good quality. *Acta Horticulturae Sinica*, 24 (2): 125 - 128. (in Chinese)
- 罗耀武, 乔子靖, 朱子英, 黄埔中泗, 常金华. 1997. 人工诱变获得四倍体玫瑰香葡萄的研究. *园艺学报*, 24 (2): 125 - 128.
- Nag S, Saha K, Choudhuri M A. 2001. Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20: 182 - 194.
- Qi Yong-shun, Zhang Jing-zheng, Wang Tong-kun, Jia Yue-qing, Qin Zhao-jing, Yang Shuo. 2008. Studies on the morphology of adventitious root development in softwood cuttings of autotetraploid grape Muscat Hamburg. *Sino-Overseas Grapevine & Wine*, (5): 8 - 10. (in Chinese)
- 齐永顺, 张京政, 王同坤, 贾月青, 秦赵静, 杨硕. 2008. 同源四倍体玫瑰香葡萄嫩枝扦插不定根发生的外部形态变化研究. *中外葡萄与葡萄酒*, (5): 8 - 10.
- Skoog F, Miller C O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11: 118 - 131.
- Skoog F, Schmitz R Y, Bock R M, Hecht S M. 1973. Cytokinin antagonists: Synthesis and physiological effects of 7-substituted-3-methylpyrazolo [4, 3-d] pyrimidines. *Phytochemistry*, 12: 25 - 37.
- Weigel U, Hom W, Hock B. 1984. Endogenous auxin levels in terminal stem cuttings of *Chrysanthemum morifolium* during adventitious rooting. *Physiologia Plantarum*, 61: 422 - 428.
- Zhang Qin, Li Bao-hui, Duo Jian-guo, Wang Wen-feng, Liu Yun-qiang, Liang Hai-yong, Yang Jian-min. 2007. Effect of BA and *Agrobacterium rhizogenes* on the softwood cutting of *Tilia mandshurica*. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (1): 201 - 204. (in Chinese)
- 张芹, 李保会, 朵建国, 王文凤, 刘云强, 梁海永, 杨建民. 2007. BA和发根农杆菌对糠椴嫩枝扦插的影响. *园艺学报*, 34 (1): 201 - 204.
- Zheng Jun-bao, Liu Yu-jun, Pei Bao-hua, Jiang Xiang-ning. 1991. Relationship between adventitious root formation and endogenous IAA and ABA of several tree species. *Acta Photophysiological Sinica*, 17 (3): 313 - 315. (in Chinese)
- 郑均宝, 刘玉军, 裴保华, 蒋湘宁. 1991. 几种木本植物插穗生根与内源 IAA、ABA 的关系. *植物生理学与分子生物学学报*, 17 (3): 313 - 315.