

3 种配方处理对吉贝插穗生根及保护酶系统的影响

高柱^{1,2}, 严毅¹, 伍建榕¹, 马焕成^{1*}, 郑元¹

(1.西南林业大学 西南地区生物多样性保育国家林业局重点实验室, 云南 昆明 650224; 2.江西省科学院 生物资源研究所, 江西 南昌 330029)

摘要: 为揭示植物逆境保护酶系统变化与生根的关系, 取吉贝 2 a 生采穗圃中当年生枝条为插穗, 比较 3 种配方处理插穗生根质量及不同生根阶段中保护酶系统超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性变化规律。结果显示: (1) 3 种配方处理插穗后, 愈伤组织出现时间、第 1 条根出现时间、生根高峰期较对照分别提早 0.80 d、1.30 d 及 2.60 d 以上; (2) 较好促根配方对吉贝插穗生根效果也不同, 1# 处理生根系数高于其它处理, 方差分析差异达显著; (3) SOD、POD 在生根过程中均呈现“升高—下降”趋势, 且均在根源基诱导期达到峰值, 活性值与对照差异显著, 生根进程中酶活值达极显著; (4) CAT 活性呈“升高—下降—升高”趋势, 峰值同样出现在根源基诱导期, 酶活值与扦插起始期或 CK 差异显著; (5) 逆境下自由基通过 SOD 活性增加歧化后, H₂O₂ 产物由 POD、CAT 增活共同清除, 从而降低氧化胁迫。研究表明, 1# 配方生根质量高于其它配方, 且配方处理能够促进逆境下保护酶活性的升高, 有效清除自由基积累, 并维持一定的动态平衡促进生根。

关键词: 吉贝; 配方处理; 插穗生根; 保护酶系统

中图分类号: S572 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)03-0528-05

Effects of Three Rooting Formula on Rooting Rate and Protective Enzyme Activities in *Ceiba Pentandra* Cutting

GAO Zhu^{1,2}, YAN Yi¹, WU Jian-rong¹, MA Huan-cheng^{1*}, ZHENG Yuan¹

(1.Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China of State Forestry Administration, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2.Institute of Biological Resources, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330029, China)

Abstract: To reveal the protective enzyme system change and the relationship between plant roots, annual stiff branches in 2-year-old cutting orchard of *Ceiba pentandra* were taken as materials in this experiment. The effects of three formulations on dealing with root cuttings in terms of root quality and the changes of SOD, POD and CAT activities in different were compared. The result showed: (1) The callus emergence time, first bar emergence time, rooting peak were 0.80 d, 1.30 d and 2.60 d earlier than those of CK. (2) Better root formula had different effects on rooting of *Ceiba pentandra*. The 1# treatment had higher root coefficient than other treatments, and the difference was significant. (3) During the rooting process, SOD, POD activity showed a tendency of “higher-lower”. The base peak appeared in the root primordial induction period, and the activity values were of significant difference. It was of extremely significant difference during the rooting process. (4) CAT activity showed a tendency of “higher-down -increasing” during the rooting process. The base peak also

收稿日期: 2011-11-29 修回日期: 2012-03-31

基金项目: 国家林业局林业公益性行业科研专项(2011104034)、国家林业局林业科学技术推广项目(2011-35号)和云南省高校科技创新团队建设项目

作者简介: 高柱(1981—), 男, 助理研究员, 硕士, 主要从事植物栽培及育种研究, E-mail: jxaugz2008@126.com;
*通讯作者: 马焕成, 教授, E-mail: mahuancheng@yahoo.com.cn。

appeared in the root primordial induction period, whose activity value was significantly different from that in the starting cutting period or that of CK. (5) SOD activity under stress, by increasing free radical, was disproportionated. POD, CAT activities increased and cleared product of H₂O₂, thereby reduced oxidative stress.

Key word: *Ceiba pentandra*; formula treatment; rooting of cutting; protective enzyme system

吉贝[*Ceiba pentandra* (Linn.) Gaertn.]又叫美洲木棉、爪哇木棉,为木棉科吉贝属半落叶大乔木^[1]。木材轻软,可制箱板、玩具,种子油可做润滑剂、制肥皂^[2];木棉纤维中空率达86%以上,是天然纤维中最细、最轻、最保暖的材料,具有光洁、抗菌、轻柔等优良特性,随着纺织技术的突破,现已能进行2~40S气流纺、40~80S混纺纱线,满足不同纺织产品需求^[3];吉贝适宜在光热充足的干热河谷地区生长,是该地区脆弱生态恢复及石漠化整治先锋树种,经济、生态效益显著,已成为云南林业产业重要组成部分。生产上主要采用播种繁殖^[2,4],种子繁殖变异大,不利于优良种源推广,林秀香^[5]在福建引种试种中发现扦插繁殖也能表现出较好效果。扦插育苗繁殖系数高,便于工厂化育苗,是无性系林业和良种扩繁常用技术,开展吉贝扦插生根机理研究,可为优质种苗培育技术奠定理论基础。

SOD、POD、CAT 3种酶被称为保护酶系统,通过三者协同作用,使自由基维持在一定水平,从而防止自由基伤害^[6]。在植物不定根发生和生长过程中,SOD能催化体内O₂^{·-}转化为H₂O₂,从而减轻自由基毒害,体内SOD同工酶活性表现不同而与插穗生根密切相关^[7];POD是植物生根重要指标性物质之一^[8];CAT酶能清除H₂O₂而保护细胞免受损伤^[9],有关3种酶与生根关系的报道很多^[8,10-15],但有关逆境下的保护机理鲜有报道。本试验探讨了3种配方对吉贝扦插生根的影响,分析了不同处理对SOD、POD、CAT 3种保护酶活性变化的影响及与生根的关系,为进一步阐明植物逆境生根机理积累基础。

1 材料与方法

1.1 苗床建立及扦插试验

试验设在西南林业大学林学院教学试验大棚内。2011年3月上旬进行,采用配有全光照自动间歇喷雾装置的温室育苗池育苗,插床长6 m,宽1.0 m,深40 cm,双面砌墙水泥面,床底铺1层10 cm厚的大鹅卵石,上层铺30 cm纯净河沙。用50%多菌灵可湿性粉剂1 000倍液消毒后,用薄膜覆盖,1周后扦插。

供试材料采自采穗圃地2 a生母树的当年生枝条。从距顶梢10 cm开始取穗,穗长20~25 cm,去除叶片及叶柄,上切口离芽1.0 cm平切,下切口离节0.5 cm处斜切。用石蜡封上切口,每20根1捆,用1 000倍多菌灵溶液浸泡20 min,晾干切口后,分别采用配方1#、2#、3#处理(3种配方均为不同生长素筛选出的较佳配方)插穗1 h。采用随机区组设计,每个处理100根插穗,3次重复,清水处理为对照。扦插深度为穗长2/3,密度100根/m²。保持河沙湿润,每周用800倍多菌灵或甲基托布津消毒1次,及时清除枯穗,新叶完全展开后每隔15 d喷1次2‰尿素。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 生根指标及取样 每隔7 d进行1次插穗形态观察,第40天调查小区生根情况,分别测定生根量、根长、根粗,分区统计生根率,以小区平均值做方差分析,生根指数计算方法参照扈红军^[10]的方法。

$$\text{生根指数} = \text{生根率} \times \text{平均根数} \times \text{平均根长} \quad (1)$$

分别在扦插起始期(I)、愈伤组织诱导期(II)、根源基诱导期(III)、不定根表达与生长期(IV)取样^[11],每次随机抽取5根插穗为1组,3次重复,迅速剥取插穗基部2 cm内韧皮部,液氮处理后保存于-80 ℃超低温冰箱备用。

1.2.2 保护酶测定方法 (1) SOD活性:采用刘萍^[16]所述法略有改进,称取样品0.1 g,加少量液氮和石英砂研磨,待材料研细后加入0.05 mol/L pH 7.8磷酸缓冲液2 mL研磨成匀浆,转入5 mL离心管,再分别用1 mL磷酸缓冲液冲洗研钵并入离心管,在2~4 ℃下10 000 r/min离心10 min,上清液为酶液。取0.5 mL酶液于560 nm比色测定A值,酶活以U/g表示。

(2) POD活性:采用张治安和陈展宇^[17]实验书所述法改进测定,称取样品0.1 g,加少量液氮和石英砂将材料研细,加入0.01 mol/L pH 6.0磷酸缓冲液2 mL研磨成匀浆,转入5 mL离心管,再分别用

1 mL 磷酸缓冲液冲洗研钵并入离心管，在10 000 r/min 下冷冻离心15 min，上清液为酶液。取0.1 mL 酶液于470 nm下比色，以每分钟内 A_{470} 变化0.01为1个过氧化物酶活性单位[U/(g·min)]。

(3) CAT活性:参照朱丽丽^[6]测定法略有改进，称取样品0.1 g，加少量液氮和石英砂将材料研细，加入0.2 mol/L pH 7.8 磷酸缓冲液2 mL(内含1% PVP)研磨成匀浆，转入5 mL离心管，再分别用1 mL 磷酸缓冲液冲洗研钵并入离心管，在10 000 r/min下冷冻离心15 min，上清液为酶液。以灭活的酶液为空白，采用紫外吸收法于240 nm下测定，以每分钟内 A_{240} 每下降0.1为1个酶活单位[U/(g·min)]。

1.3 数据分析

所有数据处理在Microsoft Excel 2007 和 SPSS 16.0 for Windows 软件下完成，图在SigmaPlot 10.0 软件下完成。采用LSD法分析差异显著性、Duncan多重比较，其中百分数经反正弦转换。

2 结果与分析

2.1 不同配方处理吉贝插穗生根特性

从表1可以看出，3种配方处理插穗后，随生根进程表现出不同的变化。1#处理、2#处理、3#处理插穗愈伤出现时间分别较CK提前0.90 d、1.00 d和0.80 d，第1条根出现时间分别提前2.20 d、1.30 d和2.60 d，生根高峰时间依次提前4.43 d、2.86 d和3.70 d，3种配方处理均能有效促进吉贝生根进程，2#处理对愈伤诱导效果最佳，3#处理对第1根出现时间影响较显著，而1#处理能明显提早生根高峰时间。40 d后测定统计的平均根数、平均根粗变化范围分别为3.27~6.87条和0.84~1.52 mm，且大小顺序依次为1#、3#、2#、CK，3#处理对吉贝插穗根长效果最好，分别较1#、2#、CK根长2.09 cm、4.98 cm和9.40 cm。生根率大小顺序依次为1#(82.05%)、3#(73.81%)、2#(70.83%)、CK(4.00%)。扦插苗根系数量与移栽成活率紧密相关，而生根指数能够有效反应处理的生根质量。生根指数从高到低的顺序依次为1#、3#、2#、CK。进一步方差分析和Duncan比较显示，3种配方处理生根率与对照差异显著($P<0.05$)，生根指数与CK差异极显著($P<0.01$)，1#处理、3#处理与2#差异显著，而1#处理与3#处理间差异不显著；3种配方处理平均生根数与CK处理差异极显著，3种处理间差异不显著($P<0.05$)。因此，3种配方处理吉贝插穗生根质量均较高，体现在生根进程提前和生根效率提高，生根质量以1#处理最佳。

表1 3种配方处理吉贝插穗生根表现

Tab.1 The stem rooting of *Ceiba pentandra* with three kinds of formula

处理 Soaking	愈伤出现时 间/d Callus appear time	第1条根出现 时间/d First root appear time	生根高峰时间 /d Rooting peak time	平均生根数/条 No. of roots	平均根长/cm Length of root	平均根粗/mm Diameter of the root	生根率/% Rooting rate	生根指数 Rooting index
1#	7.10±0.15	10.50±0.46	14.20±0.58	6.87±0.79Aa	21.85±2.74	1.52±0.15	82.05±2.31a	123.22±9.13Aa
2#	7.00±0.12	12.40±0.98	15.87±0.83	5.00±0.46ABa	18.96±0.75	1.16±0.16	70.83±4.79b	67.14±7.97Bb
3#	7.20±0.21	11.10±0.67	14.93±0.64	5.87±0.94Aa	23.94±3.43	1.47±0.28	73.81±4.21b	103.65±16.64ABa
CK	8.00±0.17	13.70±0.87	18.63±0.92	3.27±0.55Bb	14.54±2.36	0.84±0.13	4.00±0.91c	1.90±1.085Cc

表中统计数据均为3次重复的平均值；同列不同大写和小写字母分别表示差异达 $P<0.01$ 和 $P<0.05$ 显著性水平，相同字母表示差异不显著。

The data in table is the average of three replications; The different capital letters and small letters mean significant at $P<0.01$ and $P<0.05$ levels, and the same letters represent no significant difference.

2.2 不同配方处理吉贝插穗生根过程相关酶活性变化

2.2.1 扦插过程中SOD活性变化 吉贝扦插初期，离体插穗失去原有的生长动态平衡，处于逆境状态，SOD活性升高，随不定根的形成和伸长，这种不利状态逐渐改善，新的动态平衡形成，SOD活性趋于稳定。在扦插过程的不同阶段，SOD活性呈现先升高后降低的趋势(图1)。处理插穗SOD活性始终高于对照，峰值出现在根源基诱导期，活性值高低依次为1#(139.15 U/g)>2#(128.39 U/g)>3#(109.10 U/g)>CK(73.20 U/g)，不定根表达与伸长期SOD活性高于愈伤组织诱导期。方差分析显示，生根过程中不同生根阶段SOD活性差异达极显著($P<0.01$)，其中根源基诱导期与愈伤诱导期、扦插起始期差异极显著，3#处理不定根表达与伸长期与愈伤诱导期、扦插起始期SOD活性差异不显著($P>0.05$)；愈伤诱导期、根源基诱导期不同处理间SOD活性差异显著($P<0.05$)，不定根表达与伸长期不同处理间SOD活性差异极显著($P<0.01$)。

2.2.2 扦插过程中POD活性变化 POD在植物逆境胁迫下起到酶促降解H₂O₂，调节自由基、活性氧浓

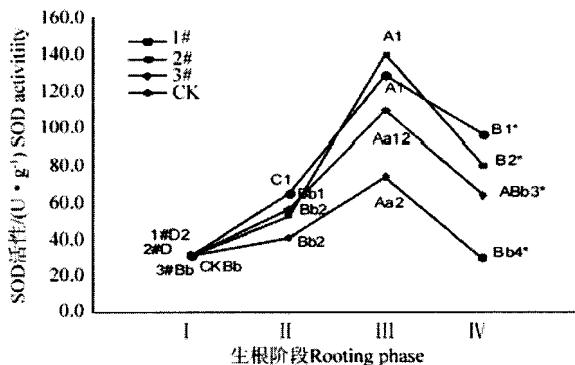


图1 吉贝插穗生根过程中 SOD 活性变化

Fig.1 The changes of SOD activities in cutting of *Ceiba pentandra* during rooting process

度而防防止膜脂过氧化, 是一种重要的防御保护酶^[18]。在离体植物生根过程中, POD 酶促产物是不定根发生和发展必须的辅助因子, 不定根诱导期活性升高促进生根^[19-20]。图 2 显示, 吉贝插穗生根过程中 POD 活性均呈现“升高一下降”趋势, 3 种配方处理愈伤组织诱导期和根源基诱导期活性上升较快, 较扦插起始期活性值[10.58 U/(g·min)]分别增加 116.67%、325.01% 及以上, 而 CK 较起始期分别增加 86.75%、126.36%; 峰值出现在根源基诱导期, POD 活性大小依次为 3#[55.39 U/(g·min)]、1#[52.29 U/(g·min)]、2#[44.99 U/(g·min)]、CK[23.96 U/(g·min)]; 不定根表达与伸长期不同处理 POD 活性均下降, 1#、2# 处理 POD 活性下降到与 CK 相似水平; 配方处理 POD 活性均呈现明显的峰值, 且显著高于 CK, 而 CK 的 POD 活性变化趋势不明显。方差分析及多重比较表明, 生根不同时间期间 POD 活性差异均达极显著 ($P<0.01$), 其中配方处理根源基诱导期与愈伤诱导、扦插初始期差异极显著, CK 根源基诱导期与愈伤诱导期差异不显著 ($P>0.05$); 根源基诱导期和不定根表达与伸长期处理间 POD 活性差异极显著 ($P<0.01$), 愈伤诱导期处理间差异显著 ($P<0.05$), 其中根源基诱导期 3 种配方处理 POD 活性与 CK 差异极显著, 而配方处理间差异不显著, 不定根表达与伸长期 3# 处理 POD 活性与 1#、2#、CK 差异极显著, 而其余处理间差异不显著, 愈伤诱导期 2# 处理 POD 活性与 CK 差异显著, 其余处理间差异不显著。

2.2.3 扦插过程中 CAT 活性变化 采用不同处理吉贝插穗的生根进程中, CAT 活性呈现“降低一升高一降低”趋势(图 3), 而对照呈现先降低后升高的趋势, 且处理降低和升高的幅度均较对照大; 最低值出现在愈伤组织诱导期, 依次为 1#[6.118 U/(g·min)]、3#[7.94 U/(g·min)]、2#[8.77 U/(g·min)]、CK[10.769 U/(g·min)]; 峰值出现在根源基诱导期, 高低顺序依次为 1#[30.29 U/(g·min)]、3#[27.39 U/(g·min)]、2#[24.99 U/(g·min)]、CK[18.96 U/(g·min)]。方差分析表明, 生根进程中 CAT 活性差异极显著 ($P<0.01$), 其中根源基诱导期与扦插起始期、愈伤组织诱导期差异极显著, 3# 处理、CK 根源基诱导期与不定根形成与伸长期差异不显著 ($P>0.05$); 愈伤诱导期处理与对照 CAT 活性差异极显著 ($P<0.01$), 根源基诱导期 CAT 活性差异显著 ($P<0.05$), 而不定根形成与伸长期 CAT 活性差异不显著 ($P>0.05$)。

3 结论与讨论

3.1 配方处理与吉贝插穗生根的关系

吉贝属愈伤组织生根类型, 采用不同外源激素处理插穗能够有效促进生根。生长素的种类和浓度影响扦插苗的质量, 体现在生根率、生根速度、生根条数、根系长度和根粗上^[11,21]。经筛选出的配方 1#、2#、3# 均为吉贝扦插的较佳配方, 生根率均在 70% 以上, 但在生根进程和生根效果上存在差别。本实验结果显示, 3 种配方处理能够有效提早生根进程, 愈伤出现时间较 CK 早 0.80 d 以上, 第 2 条根

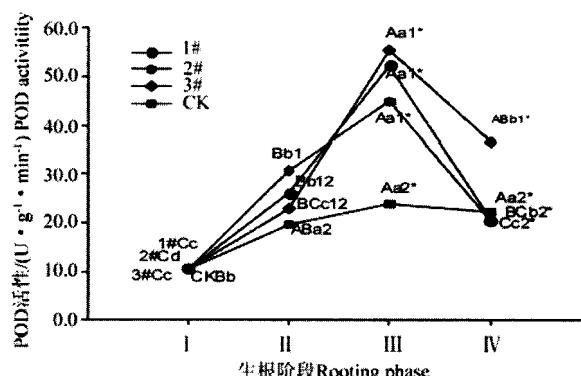


图2 吉贝插穗生根过程中 POD 活性变化

Fig.2 The changes of POD activities in cutting of *Ceiba pentandra* during rooting process

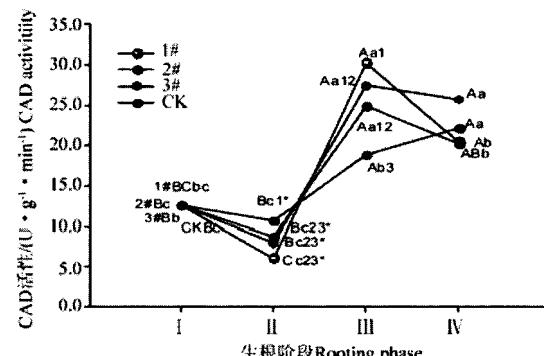


图3 吉贝插穗生根过程中 CAT 活性变化

Fig.3 The changes of CAT activities in cutting of *Ceiba pentandra* during rooting process

出现时间提前 1.30 d 以上, 生根高峰提前 2.86 d; 1#处理插穗生根苗根数最多、根也较粗, 而 3#处理插穗生根苗根最长。采用生根指数能够综合判断配方的生根质量, 试验生根指数 1#>3#>2#>CK, 方差分析显示, 3 种配方处理插穗平均生根指数与对照差异显著, 但 3#处理与 2#处理差异不显著, 1#处理插穗生根质量最佳。

3.2 配方处理对插穗保护酶系统的影响

插穗从扦插开始到生根结束, 一直受到很多逆境的胁迫, 细胞自由基产生和清除平衡遭到破坏, 构成氧化胁迫, 轻度氧化胁迫能激发酶促和非酶促清除活性氧系统的能力^[7]。生物体通过 SOD、POD 和 CAT 协同作用, 维持自由基水平使需氧生物得以生存。可经 SOD 酶歧化为 O₂ 与 H₂O₂, 再由 POD 酶促 H₂O₂ 分解为 H₂O 和 O₂^[16], 或直接由 CAT 分解 H₂O₂, 从而减轻自由基对植物的毒害。在不同发育阶段植物体内, SOD 同工酶活性表现不同而影响着植物的发育过程, 与植物生根密切相关^[7]; POD 作用的某些产物是不定根发生和发展所必须的辅助因子, 能促进不定根的形成^[13]; CAT 酶在保护体系中同样重要。试验结果表明, 吉贝插穗逆境下产生自由基, 原有的动态平衡遭到破坏, SOD 活性随即升高并将自由基歧化, 歧化产物通过 POD 活性增加分解为 H₂O 和 O₂, 从而降低膜脂的氧化胁迫。在根源基诱导期, SOD 活性增加到最高, 歧化产生的 H₂O₂ 也最多, 此时通过 POD、CAT 两种酶的高活性, 共同清除 H₂O₂, 将插穗体内自由基维持在较低水平, 从而保护细胞膜免除过氧化胁迫。当生根进入不定根表达与伸长期时, 插穗的逆境胁迫逐渐解除, SOD、POD、CAT 酶活性均开始恢复到正常状态, 建立新的动态平衡。愈伤组织形成期 CAT 活性下降, 推测与起初歧化产物较少有关, 而 POD 同工酶具有吲哚乙酸氧化酶或多酚氧化酶活性^[22-23], 起到调节 IAA 含量促进生根而应激反应快。对照 3 种保护酶变化均较小, 对自由基的清除能力也较低, 形成的毒害也较大, 生根效果也差, 但有关自由基变化情况有待进一步测定, 将更加直观有效。

参考文献:

- [1] 高柱,王小玲,马焕成,等.木棉栽培技术研究进展[J].江西科学,2009,27(5):761-766.
- [2] 全吉文,罗建华,易观路,等.爪哇木棉育苗技术[J].林业实用技术,2005,48(5):18.
- [3] 李文华,熊定国.木棉产业导引:首届中国木棉产业发展研讨会议文集[C].北京:中国纺织出版社,2009:10.
- [4] 郑翊旻,陈颖.木棉科的四种观赏树木[J].广东园林,2006,28(5):42.
- [5] 林秀香.青皮木棉引种试种初报[J].热带林业科学,2007,27(1):12-14.
- [6] 朱丽丽.柑橘应答低温胁迫的生理生化变化[D].武汉:华中农业大学,2008.
- [7] Camp W V, Inza D, Montagu M V. The regulation and function tobacco superoxide dismutases [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1997, 23:515-520.
- [8] Gaspar T. Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoot [J]. Agronomic, 1992(12):757-765.
- [9] 张强,李建龙,晏箭,等.温度胁迫对亚热带常用草坪草活性氧代谢相关酶的影响[J].草业科学,2004,21(10):83-86.
- [10] 刘红军,曹邦华,尹伟伦.榛子嫩枝扦插生根相关酶活性变化及繁殖技术[J].林业科学,2008,44(6):59-65.
- [11] 王小玲,赵忠,权金娥,等.外源激素对四倍体刺槐硬枝扦插生根及其关联酶活性的影响[J].西北植物学报,2011,31(1):116-122.
- [12] 高柱,王小玲,余发新,等.金边瑞香插穗形态、POD 与可溶性蛋白含量变化研究[J].东北农业大学学报,2010,41(4):33-37.
- [13] 宋丽红,曹帮华.光叶楮扦插生根的吲哚乙酸氧化酶、多酚氧化物、过氧化物酶活性变化研究[J].武汉植物学研究,2005,23(4):347-350.
- [14] 徐丽萍,上官新晨,喻方圆.秤锤树嫩枝扦插过程中几种酶活性变化研究[J].江西农业大学学报,2009,152(2):274-277.
- [15] 郭春兰,杨武英,胡冬南,等.青钱柳嫩枝扦插育苗的研究[J].江西农业大学学报,2006,136(2):254-257.
- [16] 刘萍.植物生理学实验技术[M].北京:科学出版社,2007:147-148.
- [17] 张治安,陈展宇.植物生理学实验技术[M].长春:吉林大学出版社,2008,7:182-183.
- [18] 刘磊,陈立波,李志勇,等.晚秋温度对苜蓿地上部分游离脯氨酸、可溶性糖和 POD 活性的影响[J].草业科学,2009,26(10):89-93.
- [19] Moncousin C H. Peroxidase as a marker for rooting improvement of clones of Vitis cultured in vitro [C]//Greppin H, Penel C, Gespar T. Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. Geneva: University of Geneva, 1986:579-385.
- [20] Nordstrom A C, Eliasson J. Levels of endogenous indole-3-acetic acid and indole-3-acetylaspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings[J]. Plant Physiology, 1991, 82:599-605.
- [21] 高柱,王小玲,杨向娜,等.生长刺激素对金边瑞香扦插生根的效应研究[J].江西科学,2008,26(2):231-233,294.
- [22] Shinshi H, Noguchi M. Relationship between peroxidase, IAA oxidase and polyphenol oxidase [J]. Phytochemistry, 1975, 14:1255-1258.
- [23] Galston A W, Binner J, Baker R S. Flavoprotein and peroxidase as components of the indole acetic oxidase system of pea[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1953, 49:456-470.