

四倍体刺槐扦插生根过程中氧化酶活性的变化

马振华¹, 赵 忠¹, 张晓鹏¹, 张博勇¹, 赵 辉², 詹晓红³

(1 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100; 2 杨凌职业技术学院 林学系, 陕西 杨凌 712100;

3 中国林业科学研究院, 北京 100091)

[摘 要] 四倍体刺槐(*Robinia pseudoacacia*)属难生根树种,为了解其生根过程中氧化酶活性的变化规律,用 300, 400 和 500 mg/L 的吲哚丁酸(IBA)处理四倍体刺槐嫩枝插条,以清水浸泡为对照,测定扦插生根过程中体内吲哚乙酸氧化酶(IAAO)、多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)活性的变化。结果表明,各 IBA 处理和对照插穗 IAAO 和 POD 活性变化趋势相似,在四倍体刺槐生根过程中呈升-降-升-降的变化规律,而 PPO 酶则基本呈降-升-降-升的变化规律;不同处理间 3 种酶活性的平均值和各阶段酶活性差异均显著。说明在四倍体刺槐扦插生根过程中,不定根的发生和发展与 3 种酶活性有密切联系,不同浓度 IBA 处理对各酶活性影响显著,其中以 500 mg/L IBA 处理对四倍体刺槐扦插生根的促进效果更明显。

[关键词] 四倍体刺槐;扦插生根;吲哚乙酸氧化酶;多酚氧化酶;过氧化物酶

[中图分类号] S792.270.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)07-0085-05

Studied on the oxidation enzymes activities in the periods of making roots in the green branch of *Robinia pseudoacacia*

MA Zhen-hua¹, ZHAO Zhong¹, ZHANG Xiao-peng¹, ZHANG Bo-yong¹,
ZHAO Hui², ZHAN Xiao-hong³

(1 College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. Department of Forestry, Yangling Vocational College of Technology, Yangling, Shaanxi 712100, China; 3 Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract : The *Robinia pseudoacacia* is a kind of trees with difficult growing roots. The green branch of *Robinia pseudoacacia* rootings are treated with the indoleacetic butyric acid (IBA), then the activities of indoleacetic acid oxidase (IAAO), polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) are tested regularly. During the different periods of taking roots, the three enzymes activities vary differently; the indoleacetic acid oxidase (IAAO) and the peroxidase (POD) vary alike; the polyphenol oxidase (PPO) activities are contrary to the indoleacetic acid oxidase (IAAO) and peroxidase (POD). Besides, in the different periods of taking roots, the three enzymes activities show significant difference, and the different process of the enzymes activities also have remarkable difference, and the 500 mg/L of indoleacetic butyric acid (IBA) has the best marked improvement on the making roots of the *Robinia pseudoacacia*.

Key words : *Robinia pseudoacacia*; rooting of cuttings; indoleacetic acid oxidase; polyphenol oxidase; peroxidase

* [收稿日期] 2006-11-12

[基金项目] 国家林业局重点基础研究发展规划项目(2003-030-L30)

[作者简介] 马振华(1982-),男,宁夏吴忠人,在读硕士,主要从事林木嫩枝扦插快繁技术及其生理研究。

E-mail: hua1928@sina.com

[通讯作者] 赵 忠(1958-),男,甘肃宁县人,教授,博士生导师,主要从事森林培育理论与技术研究。

四倍体刺槐是 1997 年从韩国引进的人工诱变刺槐新品种,分为饲料型和速生型 2 个类型。由于刺槐具有较强的适应性、速生性,加之用途广泛而被许多国家引种栽培,与杨树、桉树一起被称为世界上引种最成功的三大树种之一。刺槐属于难生根树种,一般认为扦插成活困难,成活率不稳定,因而多采用嫁接、埋根的方法繁殖,但上述 2 种方法产苗量小、成本高。因此,为了提高刺槐的扦插生活率,人们一直在研究刺槐的扦插技术,但对刺槐扦插过程中插穗内部的生理生化反应、促进和抑制生根的机制、内部各种激素水平和酶水平的变化及生根过程中的解剖构造变化研究较少。吲哚乙酸氧化酶(IAAO)、多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)是高等植物体内普遍存在的 3 种酶,这些酶与植物不定根的发生和发展具有密切关系。植物不定根发生虽受多种内外因素影响,但内源和外源激素可能在根原基形成中起关键作用,特别是与内源 IAA 的含量及变化关系密切,而内源 IAA 含量的变化又受 POD、IAAO 和 PPO 等的调节^[1]。IAAO 能降解 IAA,调节植物体内 IAA 含量,从而影响植物的生长发育^[2]。本试验用吲哚丁酸浸泡四倍体刺槐嫩枝插穗后进行扦插,研究和探讨生根过程中插穗体内酶水平的变化与生根的关系,以期为提高四倍体刺槐扦插成活率奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

试验地设在甘肃省泾川县农业示范园区,试验采用全光照喷雾扦插育苗技术,自然光照充足,排水性能良好,苗床为直径 6 m 的圆形大池,四周用砖墙砌高 50 cm,床内底层铺厚 20 cm 的卵石,上层铺 25 cm 厚的干净河砂,用 3 g/L 的高锰酸钾溶液喷淋基质灭菌。

2005-08 剪取四倍体刺槐无性系嫁接苗的当年生嫩枝,插穗长度 12~15 cm,上端距上芽 1 cm 处剪成平口,下端距下芽 0.5 cm 处剪成马蹄形,留 2 个复叶,每个复叶留两片单叶。插穗基部 1~2 cm 用 IBA 浸泡处理,IBA 质量浓度分别为 300、400 和 500 mg/L,浸泡时间 2 h,以清水浸泡为空白对照,每个处理 100 株。插穗处理后插于沙床上,扦插深度 3~5 cm。扦插后全光照喷雾扦插苗床自动工作,从 8:00~18:00 夏季每隔 5 min 喷雾 1 次,每次 30 s,雨天停喷;秋季间歇 10~15 min 喷雾 1 次,使苗木叶片始终保持一层水膜,阴天减少喷水次数,

夜间停喷。生根后逐渐减少喷水次数,炼苗期为 2 周,保持扦插苗床基质湿润。

1.2 酶活性测定方法

扦插后每隔 5 d 进行一次形态观察并采样,每处理 3 个重复,每重复 3 株。采样时将每个插穗迅速用清水冲洗干净,擦去水珠,然后剥下韧皮部作为酶活性测定样品,并将采得的样品立即用液氮冷冻保存,带回实验室测定酶活性。IAAO 活性测定用比色法^[3],于 530 nm 波长下测定其吸光度,并计算酶活性,IAAO 活性以每 mg 蛋白质在 1 h 内分解破坏 IAA 的质量(μg)表示,单位为“ $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{h})$ ”。POD 活性测定也采用比色法^[3],以每分钟每 mg 蛋白质改变一个 OD₄₇₀ 值为 1 个酶活性单位(U)。PPO 活性测定参照文献[4]的方法,以每分钟每 mg 蛋白质改变一个 OD₅₂₅ 值为一个酶活力单位(U)。

2 结果与分析

2.1 四倍体刺槐扦插生根过程中愈伤组织的变化

本试验观察结果表明,四倍体刺槐扦插后 15 d 时,在插穗基部环绕韧皮部与木质部夹层有乳白色幼嫩组织形成,即为愈伤组织,此时愈伤组织面积占插穗基部面积的 1/4 左右;至扦插 20 d 时,大约 50%以上的插穗形成愈伤组织,愈伤组织形成面积占插穗基部面积的 1/3~2/3;25 d 时,有愈伤组织形成的插穗数量继续增加,愈伤组织形成面积占插穗基部的 2/3 左右;在扦插 33 d 时有不定根形成,其中 500 mg/L IBA 处理的插穗不定根形成率为 7%,其他各处理几乎为 0。此时愈伤组织已不再生长,相反有部分插穗愈伤组织出现褐化现象。李云等^[5]在四倍体刺槐组培苗不定根发育过程中,进行解剖观察发现,四倍体刺槐不定根发育可分为 3 个阶段:初生髓射线细胞的分裂与分化期,即愈伤组织诱导期;不定根原基形成期,即不定根形成期;不定根形成期,即不定根伸长期。因此,根据上述观察结果,认为扦插后 0~15 d 为四倍体刺槐愈伤组织诱导期,15~30 d 为不定根形成期,30 d 以后为不定根伸长期。

2.2 四倍体刺槐扦插生根过程中 IAAO 活性的变化

图 1 表明,用不同浓度 IBA 处理的四倍体刺槐插穗,其 IAAO 活性随扦插时间而发生规律性变化:在整个扦插生根过程中 IAAO 活性呈波动上升趋势,但在生根后期有所下降。其中各质量浓度 IBA 处理和对照插穗活性在扦插后前 15 d 呈上升

趋势,即在愈伤组织诱导期 IAAO 活性呈上升趋势。在 15~30 d 即不定根形成期,各处理 IAAO 活性变化不同,其中 300 和 500 mg/L IBA 处理的插穗,IAAO 活性在扦插后 15~20 d 时下降,在扦插后 20~30 d 时先上升后又缓慢下降;而对照和 400 mg/L IBA 处理的 IAAO 活性,在 15~25 d 时下降,25~30 d 时缓慢上升。在扦插 30 d 以后,300 和 400 mg/L IBA 处理的插穗 IAAO 活性下降,而对照和 500 mg/L IBA 处理的插穗 IAAO 活性稍有上升。可见,IAAO 活性随着扦插生根时期的不同而发生有规律的变化。方差分析结果显示,不同生根阶段的 IAAO 活性差异显著,说明 IAAO 活性变化与四倍体刺槐生根具有密切关系;不同处理之间的 IAAO 活性也存在极显著差异,说明不同浓度的 IBA 生长素对 IAAO 活性影响效果明显。另外,对各处理插穗之间平均 IAAO 活性进行比较,以 500 mg/L IAAO 活性为最高,达 242.24 $\mu\text{g}/(\text{mg}\cdot\text{h})$,其次是对照、400 和 300 mg/L IBA 处理。其中 500 mg/L IBA 处理的插穗 IAAO 活性比对照高 1.01 倍,虽然二者相差不明显,但由于外源激素处理对植

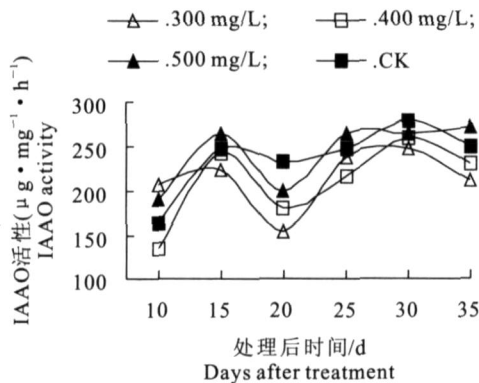


图 1 不同浓度 IBA 处理的四倍体刺槐扦插穗中 IAAO 活性的变化

Fig. 1 Changes of IAAO activity in *Robinia pseudoacacia* cuttings treated with different concentration of IBA

2.4 四倍体刺槐扦插生根过程中 POD 活性的变化

由图 3 可知,各处理的四倍体刺槐插穗中 POD 活性变化趋势基本一致,在扦插后的前 15 d 即愈伤组织诱导阶段,POD 活性均迅速上升;在 15~30 d 即不定根形成阶段,POD 活性先降低至最低点,然后升高再降低;在扦插后 30 d,300 和 400 mg/L IBA 处理的 POD 活性变化规律相同,POD 活性均下降,而对照和 500 mg/L IBA 处理活性呈上升趋势。可见,POD 活性的变化随扦插生根时期的不同

物生根具有明显效果,因此认为 500 mg/L IBA 处理对四倍体刺槐生根更有效。

2.3 四倍体刺槐扦插生根过程中 PPO 活性的变化

图 2 表明,在愈伤组织诱导期,各处理插穗中 PPO 活性变化很小;在不定根形成期,除对照插穗 PPO 活性有所下降外,其他各处理 PPO 活性均有明显升高;在不定根伸长阶段,各处理 PPO 活性均有所下降,以对照插穗 PPO 活性下降最为明显。可见,PPO 活性随着扦插生根时期的不同发生有规律的变化。对各处理间平均 PPO 活性进行比较,结果以 300 mg/L IBA 处理为最高,达 5 790 U,其次是 400,500 mg/L IBA 处理和对照。对比图 1 和图 2 可以发现,PPO 活性变化趋势与 IAAO 正好相反,这说明 IAAO 活性提高的同时 PPO 活性下降。方差分析结果显示,不同生根阶段的 PPO 酶活性差异显著,说明 PPO 酶活性变化与四倍体刺槐生根具有密切关系;不同处理之间平均 PPO 活性也存在极显著差异,说明不同浓度的 IBA 生长素对 PPO 活性影响效果明显,其中 500 mg/L IBA 处理的 PPO 活性增幅最明显,其次是 300 mg/L 的处理。

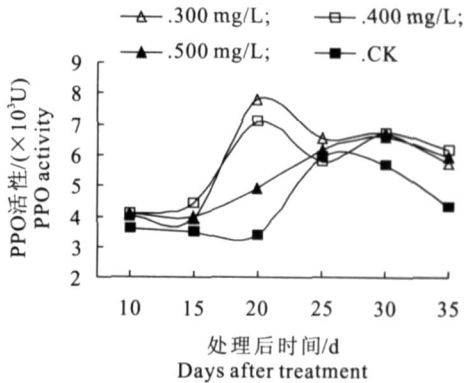


图 2 不同浓度 IBA 处理的四倍体刺槐扦插穗中 PPO 活性的变化

Fig. 2 Changes of PPO activity in *Robinia pseudoacacia* cuttings treated with different concentration of IBA

发生着有规律的变化。观察图 1 和图 3 可以发现,POD 活性的变化规律与 IAAO 活性相似。对各处理之间平均 POD 活性的比较结果表明,以 500 mg/L IBA 处理的最高,达 574.61 U,其次是对照和 400,300 mg/L IBA 处理。POD 与 IAAO 有相同的作用,均可调节植物体内 IAA 含量,从而影响植物的生长发育。500 mg/L IBA 处理以高活性的 POD 降低了体内的 IAA 含量,使 IAA 保持较低水平,从而促进了根的诱导和形成。另外,300 和 400 mg/L

IBA 处理的插穗,POD 活性总体变化呈下降趋势,而 500 mg/L IBA 处理和对照总体表现为上升趋势。方差分析结果显示,不同生根阶段的 POD 活性差异显著,说明 POD 活性变化与四倍体刺槐生根具有密切关系;不同 IBA 处理之间的 POD 活性也存在极显著差异,说明不同浓度的 IBA 生长素对 POD 活性影响效果明显。

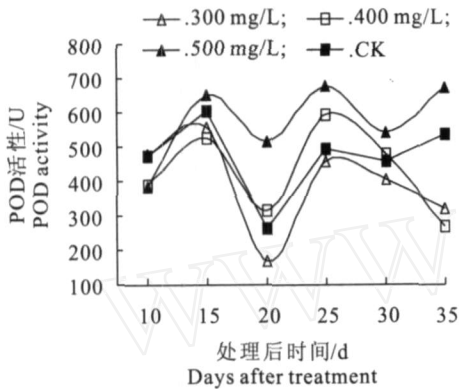


图 3 不同浓度 IBA 处理的四倍体刺槐插穗中 POD 活性的变化

Fig. 3 Changes of POD activity in *Robinia pseudoacacia* cuttings treated with different concentration of IBA

3 讨 论

IAAO 能降解 IAA,调节植物体内 IAA 含量,从而影响植物的生长发育。Kieliszewska^[6]发现,在黑松生根过程中,IAAO 活性升高。宋丽红等^[7]在光叶楸扦插生根研究中发现,愈伤组织形成期 IAAO、POD 和 PPO 3 种酶活性均呈上升趋势,在根诱导期 IAAO 和 POD 的活性达到高峰,而根伸长期 IAAO 和 POD 活性下降,PPO 活性上升。黄卓烈等^[8]在桉树扦插试验中发现,不同桉树无性系 IAAO 活性变化趋势较为一致,即呈现愈伤组织诱导期 IAAO 活性上升,不定根形成期活性稍有下降,进入根伸长期活性又复上升。本试验中,用 IBA 处理四倍体刺槐插穗,其 IAAO 活性在整个扦插生根过程中表现为上升趋势,但总体活性值上升不明显。在愈伤组织诱导期 IAAO 活性上升,说明高活性 IAAO 降低了体内 IAA 含量,符合低水平 IAA 有利于诱导生根的特点^[9],从而促进了愈伤组织的大量形成。但在不定根形成阶段,IAAO 活性是先降低,然后升高再降低,分析认为 IAAO 活性下降影响了不定根的形成。在根伸长期,不同处理 IAAO 活性有升高也有下降,同样分析认为这是影响四倍体刺槐生根率的主要原因,因为随着

IAAO 活性的降低,其调节 IAA 水平的能力下降,使得在根伸长期 IAA 含量处于较高水平,从而影响了不定根的形成和生长。

本研究还发现,四倍体刺槐插穗在生根过程中 POD 活性变化规律与 IAAO 很相似。Bagatharia 等^[10]用 NAA 处理菜豆的胚根,发现胚根生长与 POD 活性有一定的联系,且 POD 与 IAAO 活性变化呈相似规律。因此认为,IAAO 和 POD 也共同调节着四倍体刺槐插穗体内的 IAA 水平,从而影响着四倍体刺槐的生根。

在插条生根过程中,酚类物质对不定根的发生和发育起着极其重要的作用^[11],而 PPO 的一个重要生理功能就是催化酚类物质和 IAA 形成“IAA-酚酸复合物”^[12],这种复合物是一种生根的辅助因子,具有促进不定根形成的活性^[13]。本试验发现,PPO 活性与 IAAO 和 POD 活性变化趋势恰好相反。在愈伤组织诱导期 PPO 活性较低,说明此阶段 PPO 催化形成的“IAA-酚酸复合物”较少,这与愈伤组织诱导期不需要大量的生根辅助因子,从而有利于愈伤组织的形成相符合;在根形成期,PPO 活性开始升高很快,之后又迅速下降,说明 PPO 活性在此阶段很不稳定;在根伸长期,PPO 活性有所下降,这说明在根形成期和根伸长期,没有生成大量有利于生根的“IAA-酚酸复合物”,从而影响到四倍体刺槐的生根。四倍体刺槐在整个生根期间 PPO 活性呈上升趋势,但上升趋势不明显并且在生根后期下降。黄卓烈等^[14]在桉树插条试验中发现,不定根发生和发展过程中,PPO 活性大幅度提高,其扦插成活率也很高。据此推测,PPO 活性较低在很大程度上影响了四倍体刺槐的生根。

总之,IAAO、PPO 和 POD 与植物不定根的发生发展具有密切联系。这些酶在植物生根时并非独立存在和起作用的,它们之间相互作用,共同调节着植物不定根的生长。刺槐无性系扦插繁殖成功与否及效果好坏,受多因素制约,有内因也有外因,因此,采用适当的综合措施是提高扦插成活率和苗木质量的关键,所以在插穗年龄、插穗粗度、插穗长度和药物处理、消毒、覆盖、药物处理时间等措施上,都应严格注意。

[参考文献]

[1] Hassig B E. Influence of auxins and synergists on adventitious root primordium in initiation and development[J]. New Zealand J For Sci, 1974, 4:324-335.

[2] Jain M L , Kad kade P G , VanHuyse P. The effect of growth regulation chemical sonabscission and IAA-oxidizingenzyme system of dwarf bean seeding[J]. *Physiol Plant* ,1969 ,22 :1033-1042.

[3] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 1990 :210-212.

[4] 杨秀清, 闫海冰. 仁用杏树多酚氧化酶活性的年变化规律研究[J]. *林业科学研究* ,2004 ,17(3) :374-378.

[5] 李 云, 王树芝. 四倍体刺槐离体培养及其不定根发育和叶片解剖观察[J]. *中国水土保持科学* ,2003(1) :15-19.

[6] Kieliszewska-Rokicha B. Effect of treating scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings with phytohorm one on the growth of the root system and on the peroxidase and IAA oxidase enzyme activities in roots[J]. *Arbortum Kornckie* ,1989 ,32 :207-219.

[7] 宋丽红, 曹帮华. 光叶栎扦插生根的吲哚乙酸氧化酶、多酚氧化酶、过氧化物酶活性变化研究[J]. *武汉植物学研究* ,2005 ,23(4) :347-350.

[8] 黄卓烈, 李 明, 谭绍满, 等. NAA 处理桉树插条后 IAAO 活性与生根的关系[J]. *亚热带植物学报* ,2001 ,30(2) :1-5.

[9] 宋金耀, 何文林. 毛白杨嵌合体扦插生根相关理化特性分析[J]. *林业科学* ,2001 ,37(5) :64-67.

[10] Bagatharia S B , Chanda S V. Changes in peroxidase and IAA oxidase activities during cell elong ation in *Phaseolus hypocotyls*[J]. *Acta Physiol Plant* ,1998 ,20(1) :9-13.

[11] Gaspar T , Penel C , Thorpe J , et al. Peroxidase 1970 - 1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants[M]. Geneve :Universite of Geneve ,1982 :25-32.

[12] Bouillenne R , Bouillenne-Waland M. Auxines etbouturages [C] //Proc 14 Int Hort Cong. [S.l.]:[s. n.] ,1955 :231-238.

[13] Bassuk N L , Hunter L D , Howard B H. The apparent of polyphenol oxidase and phlorizin in the production of apple rooting factors[J]. *J Hort Sci* ,1981 ,56(4) :3-13.

[14] 黄卓烈, 李 明, 詹福建, 等. 不同生长素处理对桉树无性系插条氧化酶活性影响的比较研究[J]. *林业科学* ,2002 ,38(4) :46-52.

(上接第 84 页)

[9] 广西植物研究所, 广西农村发展研究中心, 广西农业大学林学院. 广西植物资源开发利用战略研究[M]. 南宁:广西科学技术出版社, 1997.

[10] 李治基. 广西森林[M]. 北京:中国林业出版社, 2001.

[11] 薛跃规. 广西生物多样性研究——广西热带植物区系[M]. 桂林:广西师范大学出版社, 2000.

[12] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(1~5 册及补编 1~2 册)[M]. 北京:科学出版社, 1980.

[13] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志(各卷)[M]. 北京:科学出版社, 1959~2005.

[14] 周厚高, 黎 桦. 广西南部蕨类植物区系研究: I. 区系特征[J]. *广西农业生物科学* ,1997 ,16(4) :23-29.

[15] 吴征镒, 王荷生. 中国自然地理·植物地理:上册[M]. 北京:科学出版社, 1983.

[16] 吴征镒. 中国种子植物属的分布区类型[J]. *云南植物研究* ,1991(增刊 IV) :1-39.

[17] 李锡文. 中国种子植物区系统计分析[J]. *云南植物研究* ,1996(4) :363-384.

[18] 吴德邻. 红水河上游地区植物调查研究报告集[M]. 北京:科学出版社, 1996.

[19] 大瑶山自然资源综合考察队. 广西大瑶山自然资源考察[M]. 北京:学林出版社, 1988.

[20] 广西花坪林区综合考察队. 广西花坪林区综合考察报告[M]. 济南:山东科学技术出版社, 1986.

[21] 应俊生, 张玉龙. 中国种子植物特有属[M]. 北京:科学出版社, 1994.

[22] 张宏达, 钟业聪. 广西苏铁植物新种[J]. *中山大学学报:自然科学版* ,1997 ,36(3) :67-71.

[23] 梁盛业. 金花茶彩色图谱[M]. 北京:中国林业出版社, 1992.

[24] 于永福. 中国野生植物保护工作的里程碑——《国家重点保护野生植物名录(第一批)》出台[J]. *植物杂志* ,1999(5) :3-11.