

内源激素动态变化与马尾松优良种源抗寒性的关系*

Relationships between Dynamic Changes of Endogenous Hormones and Cold-resistance of Improved Provenance of *Pinus massoniana*

杨章旗, 颜培栋, 舒文波

YANG Zhang-qi, YAN Pei-dong, SHU Wen-bo

(广西林业科学研究院, 国家林业局中南速生材繁育重点实验室, 广西南宁 530001)

(Guangxi Forestry Science Academy, State Forestry Bureau Laboratory of Fast-Growing Tree Breeding and Cultivation in Central South of China, Nanning, Guangxi, 530001, China)

摘要:以广西桐棉和广西古蓬马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 种源叶片为材料, 应用间接酶联免疫法 (ELISA) 测定内源激素脱落酸 (ABA)、赤霉素 (GA_3)、吲哚乙酸 (IAA)、玉米核苷 (ZR) 含量, 分析不同种源苗期的抗寒性与内源激素含量的关系。结果表明, 马尾松抗寒力的评价指标为内源 GA_3 含量、ABA/ GA_3 (k 值) 和 ZR/ABA 值, 内源 GA_3 含量越高, 抗性越差; k 值越大, 抗寒力越强; ZR/ABA 值越大, 抗寒力越强。

关键词: 马尾松 种源 内源激素 抗寒性

中图分类号: S791.248.04 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2009)01-0087-05

Abstract The leaves of two improved provenances of *Pinus massoniana* were taken as experimental materials of which the four endogenous hormones such as ABA, GA_3 , IAA, ZR were measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA). And the relationships between cold-resistance and endogenous hormones contents of seedlings from different provenances were analyzed combining with their growth traits. The research result indicates that the cold-resistance of Gupeng provenance is better than that of Tongmian provenance. Meanwhile, the cold-resistance indices of *P. massoniana* include the content of endogenous GA_3 , k , the ratio of ZR/ABA. And the higher the endogenous GA_3 is, the worse the resistance is; the cold-resistance increases with the ascending of k ; furthermore, the increasing value of the rate of ZR/ABA can show the better cold-resistance.

Key words *Pinus massoniana*, provenance, endogenous hormone, cold-resistance

马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 作为我国南方造林的先锋树种与重要的工业用材树种, 其遗传改良经国家“六五”至“九五”科技攻关, 已经取得较大的成就。“七五”期间在马尾松全分布区内开展马尾松地理种源的试验结果表明, 广西桐棉和广西古蓬种源 (以下分别简称桐棉种源和古蓬种源) 在全国的多点多年度种源试验中生长表现最优, 其中桐棉种源每年抽梢 2~3 次, 在原产地基本上无休眠期。

由于该种源的巨大生产潜力, 南方各省均对桐棉种源进行了引种推广, 至 2006 年底, 广西已向福建、江西、湖南、广东等省推广广西优良种源或优良家系数十万公顷^[1]。马尾松不同地理种源存在显著遗传差异, 低纬度的种源向北引种时虽然生长快, 但是不耐雪压和冻害^[2]。马尾松优良种源的自然分布区多处在北热带和南亚热带地区, 这些种源的共同特点是生长期长, 冬季休眠期短, 封顶迟, 一旦北移, 低温成为这些优良种源向北推广的首要限制因子。本文选择抗寒性较强的古蓬种源和抗寒性较弱的桐棉种源做为试验材料, 采用人工控制低温方法, 测定系列低温梯度条件下叶片的内源激素动态变化的规律, 以期对马尾松低温伤害和抗寒性的研究提供参考依

收稿日期: 2008-11-08

修回日期: 2009-01-10

作者简介: 杨章旗 (1964-), 男, 教授级高级工程师, 主要从事松类树种遗传改良研究。

* 广西科学基金项目 (桂科基 0236036), 广西科技厅项目 (桂科能 0443001-9) 资助。

据,同时为马尾松进一步的遗传改良及良种的推广应用奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验于 2006年 12月 20日至 2007年 1月 16日在国家林业局中南速生材繁育重点实验室的人工培养箱内进行。种源采用全国马尾松优良种源桐棉种源和古蓬种源。广西桐棉种源地处北纬 22°10',东经 107°24'属亚热带季风气候,年平均气温 20.8℃,年最低气温 0.4℃,年最高气温 38.2℃ ≥ 10℃积温 6919℃,年平均有霜期 7d,年降雨量 1366mm,海拔 500m左右。广西古蓬种源地处北纬 24°06',东经 108°66'属亚热带季风气候,年平均气温 20.5℃,年最低气温 - 2.3℃,年最高气温 39.7℃ ≥ 10℃积温 6591℃,年平均有霜期 13d,年降雨量 1453mm,海拔 185m左右。2个种源的种子分别采集于广西南明桐棉乡和广西忻城古蓬镇,育苗点设置在地处广西南宁市的广西林业科学研究院试验苗圃内。各种源选择生长一致的营养杯苗 30株,营养杯规格为 8cm×12cm,营养土为黄心土,苗龄 1a,苗高 50~ 55cm,地径 0.8cm

1.2 方 法

1.2.1 低温处理方法

试验前 3天每天浇足水,将苗木在实验室内放置 3d,营养杯不滴水时放入托盆置于人工培养箱内。人工培养箱中每天 7:00~ 19:00光照强度设置 5700lx, 19:00~ 7:00为黑暗。相对湿度 65%~ 85%。试验前实验室内的平均气温为 9~ 15℃,以 10℃为对照,人工降温程序如下:设 (10± 2)℃、(4± 2)℃、(0± 2)℃、(- 5± 2)℃、(- 10± 2)℃ 5种温度梯度,(梯度的设定依据前期预备试验中对两个种源的低温半致死温度的测定,该内容另文发表),见表 1 不同种源降温过程中内源激素含量多重比较

Table 1 Post Hot test of variance on leaf traits among different young plantation

温度 Temperature(℃)	ABA			GA ₃			IAA			ZR		
	GP	TM	F	GP	TM	F	GP	TM	F	GP	TM	F
10	1389.1b	1377.1b	0.01	1328.7a	1915.8a	5.05	25571.5b	15284.7a	10.60	3269.9a	1490.4a	16.35
4	3316.0d	2288.9c	22.01*	7328.3d	7447.2bc	0.02	24883.8b	79098.8b	2.92	6331.5c	3937.4b	12.41
0	2709.2c	1967.0c	9.28	5332.7c	6598.2b	10.05	27668.8b	14814.9a	5.43	5759.8bc	5234.8bc	2.76
- 5	1382.0b	2975.3d	1054.74*	6396.9c	9502.9c	15.29	19862.6b	133389.5c	50.97*	5638.1bc	5872.4c	0.07
- 10	248.9a	708.3a	9.34	2580.4b	7695.2bc	19.94	1588.2a	2327.6a	50.99*	4779.3b	4838.7bc	0.02

TM 表示桐棉种源,GP表示古蓬种源。不同字母表示在 0.05水平差异显著,*表示在 5%水平上差异达显著水平,**表示在 1%水平上差异达显著水平。TM mean TongMian provenance, GP mean Gupeng provenance. The different letters mean significant difference at the 0.05 level.* Significant at 5% lever,** Significant at 1% lever.

度降到该设定温度时保持 48h,混合取样,采样后恒温 24h,然后按照温度梯度继续降温。

1.2.2 测定项目及方法

采用间接酶联免疫法(ELISA)测定内源激素脱落酸(ABA)、赤霉素(GA₃)、吲哚乙酸(IAA)、玉米核苷(ZR)含量^[3]。试剂盒购于中国农业大学,其含量以每克鲜重中含激素的纳克计算。以上生理指标的测定均重复 3次,剔除异常。

1.2.3 数据处理

分别对不同处理的 ABA含量、GA₃含量、IAA含量、ZR含量与不同温度间进行双因素方差分析。方差分析采用计算机 SPSS软件进行。

2 结果与分析

不同种源的内源激素含量差异除对照外均达显著或极显著水平,同一种源不同温度胁迫下内源激素含量差异见表 1

2.1 降温过程中不同种源的内源 ABA含量变化

不同种源叶片的内源 ABA含量随着温度的降低变化趋势大体相似,内源 ABA含量呈先上升后下降的变化规律,但是达到最高点的温度不同(图 1),桐棉种源内源 ABA含量在降温过程中不断升高,至 - 5℃时达到最高,之后迅速下降,而古蓬种源内源 ABA含量在 4℃时达到最高值,之后缓慢下降。2个种源在 10℃时 ABA含量基本相同,古蓬种源稍高,古蓬种源在 4℃时达最高值,之后不断下降,桐棉种源在降温过程中呈双峰变化趋势,峰值分别出现在 4℃和 - 5℃,- 5℃时达到最高值。2个种源的内源 ABA含量最低值均出现在 - 10℃。古蓬种源和桐棉种源的内源 ABA含量最高值分别比对照提高 138.72%和 116.01%,最低值分别比对照降低 82.08%和 59.29%。2个种源的内源 ABA含量按高低排列为:古蓬种源 > 桐棉种源

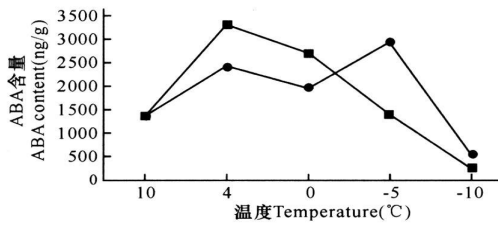


图 1 不同种源降温过程中的 ABA 含量

Fig. 1 ABA content in different provenance during decreasing of temperature

- : 桐棉种源; ■: 古蓬种源
- : Tongmian provenance; ■: Gupeng provenance.

2.2 降温过程中不同种源的内源 GA₃ 含量变化

不同种源叶片的内源 GA₃ 含量随着温度的降低变化趋势大体相似,内源 GA₃ 含量呈先上升后下降再上升再下降的变化规律,2个种源的内源 GA₃ 含量在降温过程中均出现双峰趋势,第 1 次出现在 4°C,第 2 次出现在 -5°C,桐棉种源在 -5°C 时达到最高值,古蓬种源在 4°C 时达到最高值(图 2)。2 种源在 10°C 时 GA₃ 含量古蓬种源低于桐棉种源,2 个种源的内源 GA₃ 含量最低值均出现在 10°C。古蓬种源和桐棉种源的内源 GA₃ 含量最高值分别比对照提高 475.15% 和 339.36%。2 个种源的内源 GA₃ 含量按高低排列为:桐棉种源 > 古蓬种源

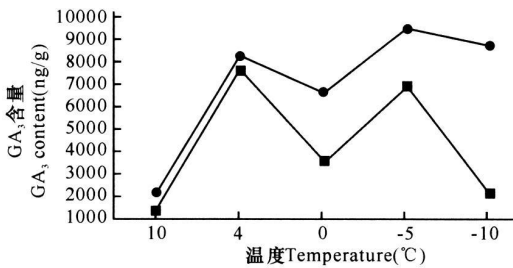


图 2 不同种源降温过程中的 GA₃ 含量

Fig. 2 GA₃ content in different provenance during decreasing of temperature

- : 桐棉种源; ■: 古蓬种源
- : Tongmian provenance; ■: Gupeng provenance.

2.3 降温过程中不同种源的内源 IAA 含量变化

不同种源叶片的内源 IAA 含量随着温度的降低变化趋势相差很大,桐棉种源的内源 IAA 含量呈先上升后下降再上升再下降的变化规律,且升降幅度很大,为 2.327~108.227 μg/g,古蓬种源在降温过程中出现先下降再升高再下降的趋势,升降幅度较小,为 1.659~24.592 μg/g(图 3)。2 种源在 10°C 时 IAA 含量古蓬种源高于桐棉种源,古蓬种源在 0°C 时达最高值,之后不断下降,桐棉种源在降温过程中出现双峰趋势,第 1 次出现在 4°C,第 2 次出现

在 -5°C,0°C 时达到最高值。2 个种源的内源 IAA 含量最低值均出现在 -10°C。古蓬种源和桐棉种源的内源 IAA 含量最高值分别比对照提高 6.46% 和 608.08%,最低值分别比对照降低 92.82% 和 84.77%。2 个种源的内源 IAA 含量按高低排列为:桐棉种源 > 古蓬种源。

2.4 降温过程中不同种源的内源 ZR 含量变化

不同种源叶片的内源 ZR 含量随着温度的降低变化趋势大体相同,都呈先上升后下降的变化规律,但是达到最高值的温度不同,古蓬种源在 4°C 达最高值,之后不断下降,而桐棉种源在 -5°C 时达最高值,之后缓慢下降(图 4)。2 种源在 10°C 时 ZR 含量古蓬种源高于桐棉种源,2 个种源的内源 ZR 含量最低值出现的温度不同,古蓬种源最低值出现在 -10°C,桐棉种源的最低值出现在 10°C(对照)。古蓬种源和桐棉种源的内源 ZR 含量最高值分别比对照提高 129.76% 和 248.60%,古蓬种源最低值比对照降低 23.86%。2 个种源的内源 ZR 含量按高低排列为:古蓬种源 > 桐棉种源。

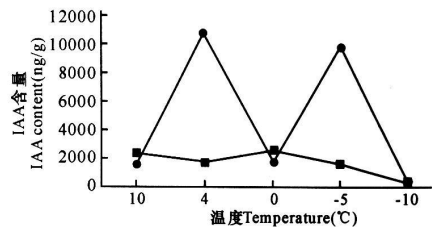


图 3 不同种源降温过程中的 IAA 含量

Fig. 3 IAA content in different provenance during decreasing of temperature

- : 桐棉种源; ■: 古蓬种源。
- : Tongmian provenance; ■: Gupeng provenance.

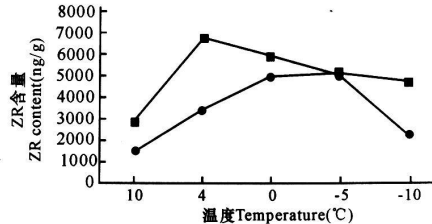


图 4 不同种源降温过程中的 ZR 含量

Fig. 4 ZR content in different provenance during decreasing of temperature

- : 桐棉种源; ■: 古蓬种源。
- : Tongmian provenance; ■: Gupeng provenance.

2.5 降温过程中不同种源的内源激素配比变化

表 2 显示降温过程中不同种源的内源激素配比变化趋势不同。内源激素配比随温度变化呈规律变

化的是 ABA/GA₃ ABA/ZR 与 IAA 有关的其它配比均无规律性变化。内源 ABA/GA₃ 值随着温度的降低呈不断下降的趋势,桐棉种源和古蓬种源在 -10℃ 时 ABA/GA₃ 值分别比对照下降 89.95% 和 88.02%,古蓬种源的 ABA/GA₃ 值较大且变化幅度相对较大。2 个种源的内源 ABA/GA₃ 值按高低排列为:古蓬种源>桐棉种源。

表 2 降温过程中不同种源的内源激素配比

Table 2 Ratio of endogenous hormone of different provenances under cool down

种源 Provenance	温度 Temperature (°C)	ABA/GA ₃	ABA/IAA	ABA/ZR	GA ₃ /IAA	GA ₃ /ZR	IAA/ZR
TM	10	0.637	0.090	0.924	0.142	1.451	10.255
	4	0.327	0.023	0.712	0.069	2.178	14.533
	0	0.316	0.112	0.392	0.355	1.241	2.814
	-5	0.310	0.022	0.567	0.071	1.829	25.673
	-10	0.064	0.241	0.111	3.737	1.716	0.459
GP	10	0.993	0.060	0.472	0.061	0.475	7.842
	4	0.434	0.188	0.489	0.434	1.129	2.602
	0	0.510	0.084	0.453	0.165	0.888	5.393
	-5	0.199	0.086	0.270	0.433	1.356	3.129
	-10	0.119	0.150	0.111	1.260	0.932	0.794

TM 表示桐棉种源,GP 表示古蓬种源。TM mean Tongmian provenance, GP mean Gupeng provenance.

内源 ABA/ZR 值随着温度的降低呈不断上升的趋势,桐棉种源和古蓬种源在 -10℃ 时的 ABA/ZR 值分别比对照高出 88.9% 和 76.48%,古蓬种源的 ABA/ZR 值较低且变化幅度相对较小。2 个种源的内源 ABA/ZR 值按高低排列为:古蓬种源>桐棉种源。

3 讨论

植物激素是控制植物生长发育的最重要物质之一,它影响植物的一切关键生物过程,如胚胎、根、花的发育、维管分化、顶端优势、向性反应等^[4]。近年来,内源激素的研究多集中于无性繁殖方面^[5-9]。植物对干旱、低温、盐渍、高温、营养胁迫等逆境的适应受遗传性和内源激素控制,内源激素与植物抗性研究的较一致的结论是逆境胁迫下内源 ABA 含量增加^[10,11],这些研究对象多为农作物,利用内源激素研究林木的抗性国内少有报道,本研究以全国生长表现最优良的马尾松种源为研究对象,旨在揭示马尾松抗寒性的生理生化机理,为马尾松低温抗性的分子调控机理以及遗传转化研究奠定基础。

ABA 是一类抑制生长的植物激素,调控部分器官(果实、花、叶片等)的脱落,停止生长,进入休眠。一般认为,ABA 是一种胁迫激素,它调节植物对胁迫

环境的适应。大量研究表明,植物在逆境环境下内源 ABA 含量会显著增加,但是 ABA 影响抗寒力的机理尚不明了,总结前人的研究可分以下几种解释:一是低温会增加叶绿体膜对 ABA 的透性^[12,13],触发系统大量合成 ABA;二是 ABA 能减缓超氧歧化酶活性的降低,提高过氧化物酶的活性,使植物体内超氧自由基处于较低水平,最终减轻低温对膜的伤害^[14,15];三是 ABA 可促进气孔关闭^[16],增加低温体内的水分平衡能力^[17,18];四是促进某些抗冷物质的合成^[17];五是 ABA 能促使根部合成的 ABA 运到叶片^[12]。还有研究表明,同一作物不同品种中,抗性强的品种在逆境情况下,ABA 含量高于不抗逆性的品种^[11]。本研究表明,内源 ABA 含量呈先上升后下降的变化规律,抗冷性较强的古蓬种源在 4℃ 时内源 ABA 含量呈直线上升并达到最高值,抗冷性较弱的桐棉种源内源 ABA 含量上升速度较慢,在 -5℃ 时达到最高值,也就是说,古蓬种源在低温来临前已启动内源 ABA,并协调体内的平衡以获得较强的抗寒力。桐棉种源内源 ABA 在 0℃ 时出现下降,-5℃ 再上升,是否体内已造成伤害,有待进一步研究。2 个种源内源 ABA 含量在升高到最高点后均出现下降,这与多数作物的研究结论不同^[10,11,18],作者认为多数作物的研究以室外冬季自然降温为对比条件,取样时间多以月或季节来计算,而本研究采用的是人工控制低温方法,可能与胁迫温度的下降速度和持续时间等因素有关,这有待进一步研究。

GA 是一类能显著促进生长的植物激素,被认为与抗寒性有关,但其作用没有 ABA 显著。多数研究结果认为体内 GA 含量高的抗寒性较弱^[11]。罗正荣^[13]认为逆境下引起 GA 含量下降一是抑制生长,二是调节以下的生理生化效应:(1)改变体内水分的利用,促进气孔关闭,减少蒸腾;(2)增强并维持叶绿素、蛋白质和核酸的含量。本研究表明,内源 GA₃ 含量在降温过程出现先升高再下降再升高再下降的趋势,抗寒性较强的古蓬种源内源 GA₃ 含量一直处于较低水平,因此,内源 GA₃ 含量可以作为马尾松抗寒力的评价指标,含量越高抗性越差。

IAA 是植物体最普遍的生长素类物质,促进细胞的分裂、伸长和分化,促进 RNA 和蛋白质的合成。生长素早在 1940 年就被用于调控植物抗寒性,许多证据表明外源生长素是降低植物抗寒性的因素^[19]。内源 IAA 含量用于评价植物的抗寒性少有报道,谢吉容^[20]认为红豆杉内源 IAA 含量与抗寒性成负相关($R = -0.6807$)。本研究表明,抗寒力较强的

古蓬种源在降温过程中升降幅度较小,而抗寒力较弱的桐棉种源在降温过程中升降幅度较大,且2个种源变化趋势无规律性,因此,内源 IAA 含量不宜作为马尾松抗寒力的评价指标

ZR是一种细胞分裂素,主要的生理作用是促进细胞分裂。用内源 ZR含量评价植物的抗寒性的研究很少。本研究表明,在降温过程中内源 ZR含量呈先升高再下降的趋势,与内源 ABA含量的变化趋势大体相似,古蓬种源在 4℃后细胞分裂速度开始减慢,进入休眠,有利于抗寒力的提高,桐棉种源在 -5℃后内源 ZR开始下降,低温下细胞分裂速度不断增加对抵抗寒冷不利。

多种内源激素的相对含量对植物的抗逆性更为重要^[17]。ABA和 GA是从甲羟戊酸通过光敏素系统转化而成,在长日照下产生 GA,在短日照下产生 ABA,虽然两者的生理作用完全不同,但是却相互联系。本研究表明,ABA/GA₃(k值)在降温过程中呈不断下降的趋势,这与多数前人的研究结论相反,但是k值越大,抗寒力越强,这与前人的研究结果一致^[21]。出现上述原因,作者认为可能受温度梯度的设计或不同树种的影响。因此,k值可以作为抗寒力强弱的评价指标,k值越大,抗寒力越强。ZR/ABA值在降温过程中不断升高,且抗寒力强的种源 ZR/ABA值大于抗寒力弱的种源,ZR/ABA值也可以作为抗寒力强弱的评价指标,ZR/ABA值越大,抗寒力越强,ZR/ABA值的变化趋势没有k值明显,建议作为补充选择的指标。

综合以上分析,叶片内源激素含量和内源激素间的平衡关系可以作为马尾松种源抗寒能力的评价指标,不同种源的内源 GA₃含量、k值和 ZR/ABA值等3个指标在不同温度间均具有显著差异,可以较准确、稳定地反映马尾松的抗寒力。内源 GA₃含量越高,马尾松的抗寒力越差;k值越大,抗寒力越强;ZR/ABA值越大,抗寒力越强。

致谢:冯夏莲、李校雨、陈英之、谭健晖等参加试验设计和室内测定工作,谨此一并致谢。

参考文献:

[1] 杨章旗,丘小军.马尾松良种及速生丰产配套技术推广应用[J].广西林业科学,2003,32(1):1-6.
[2] 周志春,傅玉狮,吴天林.马尾松生长和材性的地理遗传变异及最优种源区的划定[J].林业科学研究,1993,6(5):556-564.
[3] 吴颂如,陈婉芳,周燮.酶联免疫法(ELISA)测定内源

植物激素[J].植物生理学通讯,1988,25(5):53-56.
[4] 葛辛.高级植物分子生物学[M].北京:科学出版社,2004:123-145.
[5] 谭健晖.桉树无性繁殖衰退过程中的生理变化[J].北京林业大学学报,2007,27(3):15-24.
[6] 谭健晖.插条母株年龄对巨尾桉幼林抗氧化生理的影响[J].林业科学,2007,43(5):43-51.
[7] 韩碧文,李颖章.植物组织培养中器官建成的生理生化基础[J].植物学通报,1993,10(2):1-6.
[8] 刘华英,萧浪涛,何长征.植物体细胞胚发生与内源激素的关系研究进展[J].湖南农业大学学报,2002,28(4):349-354.
[9] Jimenez V M, Bangerth F. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot[J]. Physiol Plant, 2001, 111(3): 389-395.
[10] 兰小中,阳义健,陈敏,等.水分胁迫下中华芦荟内源激素的变化研究[J].种子,2006,25(8):1-3.
[11] 赵春江,康书江,王纪华,等.植物内源激素与不同基因型小麦抗寒性关系的研究[J].华北农学报,2000,15(3):51-54.
[12] 潘瑞焯,董愚得.植物生理学[M].北京:高等教育出版社,1995:318-333.
[13] 罗正荣.植物激素与抗寒力的关系[J].植物生理学通讯,1989(3):1-5.
[14] 林定波,刘祖祺.冷驯化和ABA对桉桔柑橘膜稳定性的影响及膜特异性蛋白质的诱导[J].南京农业大学学报,1994,17(1):1-5.
[15] 蔡世英.ABA对咖啡幼苗抗冷性的效应[J].热带作物学报,1990,11(2):69-77.
[16] Letham D S, Goodwin P B, Higgings T J S. Phytohormones and related compounds comprehensive treatise[M]. New York: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1978: 457-537.
[17] 刘祖祺,张石诚.植物抗性生理学[M].北京:中国农业出版社,1994:50-66.
[18] 郝建军,康宗利.植物生理学[M].北京:化学工业出版社,2005:250-265.
[19] 严寒静,谈锋.自然降温过程中椴子叶片脱落酸、赤霉素与低温半致死温度的关系[J].西南师范大学学报,2001,26(2):195-199.
[20] Howell G S, Dennis F G. Analyses and unprevent of plant cold hardness[M]. NY: CRC Press, 1981: 175-176.
[21] 谢吉容,向邓云,梅虎,等.南方红豆杉抗寒性的变化与内源激素的关系[J].西南师范大学学报,2002,27(2):231-234.

(责任编辑:韦廷宗 邓大玉)