

‘金娃娃’萱草花芽分化前期内源激素动态变化的研究

仲文晶^{1,2}, 孙国峰², 李晓东², 张金政², 刘洪章¹

(1. 吉林农业大学 生命科学院, 吉林 长春 130118; 2. 中国科学院 植物研究所, 北京 100093)

摘要:以‘金娃娃’萱草为试材,采用石蜡切片法,观察其花芽分化进程,并结合花芽形态分化过程,用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定其顶芽的内源激素的动态变化。结果表明:形态分化过程的前期分为3个阶段:未分化期、花序原基分化期和外轮花被分化期;玉米素核苷(ZRs)含量由低到高,吲哚乙酸(IAA)和脱落酸(ABA)含量下降,赤霉素(GA)含量基本无变化。

关键词:‘金娃娃’萱草;花芽分化;内源激素

中图分类号:S 682.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)12-0134-04

‘金娃娃’萱草(*Hemerocallis* ‘Stella de Oro’)为百合科萱草属多年生草本植物,颜色多为金黄色,花色鲜艳,群体效果佳,是当前一种重要的地被绿化及庭园观赏植物。‘金娃娃’萱草抗旱、耐寒,对土壤适应性强,成花率低且花期不一致^[1-4],其花芽分化特性至今尚未见研究。前人研究结果表明,植物花芽分化过程中起主导作用的是植物内源激素^[5-7]。现通过对‘金娃娃’萱草花芽形态分化的观察,以及顶芽内源激素(GA、IAA、ZRs、ABA)的动态变化研究,以期揭示‘金娃娃’萱草花芽分化前期不同阶段内源激素变化规律,为揭示萱草属植物花芽分化内在机制及其花期调控提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于中国科学院植物研究所植物园进行。以‘金娃娃’萱草为试验材料,于2010年5月露天试验田定植,正常施肥浇灌管理;从2011年6月中上旬至2011年11月末(花芽进入休眠期),每7~10 d取样1次。

1.2 试验方法

1.2.1 花芽形态分化观察 采用石蜡切片法进行花芽形态分化观察。每次取10个新鲜花芽于FAA固定液(70%乙醇:冰乙酸:甲醛=18:1:1)中固定,然后依次放入85%-95%-100%-100%乙醇中脱水,每级放置2 h,之后放在1/2二甲苯+1/2乙醇中过夜;次日加入

2次二甲苯,4 h换1次;而后在二甲苯中加入碎蜡,放在45℃烘箱中直至饱和;转入纯蜡中,4 h后包埋。将切好的蜡块放在石蜡切片机(Leica RM 2235)上切片(切片厚度为5 μm),展片,番红-固绿染色,加拿大树胶封片,显微照相(显微镜 Nikon Eclipse E600+成像系统 Nikon Dxm1 200F)。

1.2.2 内源激素含量测定 分别取相应时期的花芽0.2 g,每次3次重复。将取完的材料用锡箔纸包好放在塑料瓶中,标注好日期,放在液氮中保存。采用酶联免疫法进行‘金娃娃’萱草顶芽内源激素(GA、IAA、ZRs、ABA)含量测定。在称量好的花芽中加2 mL样品提取液,在冰浴下研磨成匀浆,转入10 mL试管,再用2 mL提取液分次将研钵冲洗干净,一并转入试管中,摇匀后放置在4℃冰箱中。4℃下提取4 h,3 500 r/min离心8 min,取上清液。沉淀中加1 mL提取液,搅匀,置4℃下再提取1 h,离心,合并上清液并记录体积,残渣弃去。上清液过C-18固相萃取柱。将过柱后的样品转入5 mL塑料离心管中,用氮气吹干,除去提取液中的甲醇,用样品稀释液(500 mL PBS中加0.5 mL Tween-20,0.5 g明胶定容),之后加标准物、待测样和抗体(在5 mL稀释倍数是1:2 000的样品稀释液中加入2.5 μL抗体,混匀后每孔加50 μL,然后将酶标板加入湿盒内开始竞争。竞争条件37℃左右0.5 h)、洗板、加酶标二抗、洗板、加底物显色(称取10 mg邻苯二胺溶于10 mL底物缓冲液中,完全溶解后加4 μL 30% H₂O₂)。混匀,在每孔中加100 μL,然后放入湿盒内,当显色适当后,每孔加入50 μL 2 mol/L硫酸终止反应)、比色(在酶联免疫分光光度计上依次测定标准物各浓度和各样品490 nm处的OD值)、用Logit曲线计算。

第一作者简介:仲文晶(1987-),女,硕士,研究方向为植物生理生化。E-mail:251583460@qq.com。

责任作者:刘洪章(1957-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为作物资源。E-mail:lhzc@163.com。

基金项目:中国科学院知识创新工程重要方向资助项目(KSCX2-EW-B-05)。

收稿日期:2012-03-15

2 结果与分析

2.1 花芽形态分化观察

2.1.1 未分化期 此阶段为6月下旬至7月中上旬,是‘金娃娃’萱草花芽的营养生长期(图1-A、B)。此期根状茎形式为合轴分枝式。随着营养生长锥的不断发育与生长,产生新的分裂分化能力很强的叶原基,叶原基在刚形成时呈高圆丘状突起。从茎尖生长点的正中纵切面上看,叶原基发生于茎尖生长锥的侧面,由表面的几层细胞分裂形成突起。由于叶原基基部不断产生新的叶原基,所以生长锥的形状和体积也发生一定的变化。

2.1.2 花原基分化期 此阶段为7月下旬至9月初(图1-C、D)。此阶段顶芽开始生长到花原基出现,较营养生长期显著隆起并较大。花序原基是由顶芽生长锥分化的,顶芽生长锥开始分化花原基时和叶芽刚发育时比较,在形态上的差异并不十分明显。花原基出现最早在7月20日左右。这时其生长锥呈一个半球形。此时,顶芽从外形上已变为扁而平的饱满芽了。

2.1.3 外轮花被分化期 此阶段为9月中旬至10月末(图1-E、F)。生长点进一步发育升高,在中央及下部周沿隆起,并渐渐分离,形成的突起即是外轮花被原基。‘金娃娃’萱草在花原基分化后40 d左右开始出现外轮花被原基,并且出现了多个花芽一起分化的现象。

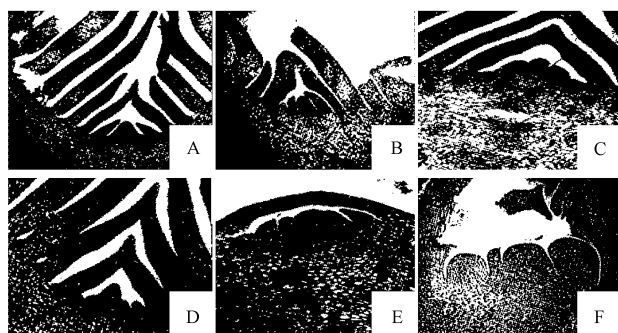


图1 ‘金娃娃’萱草花芽分化前期过程

注:A、B:未分化期;C、D:花原基分化期;E、F:外轮花被分化期。

Fig. 1 Process of flower bud differentiation in *Hemerocallis* ‘Stella de Oro’

Note: A, B: undifferentiation; C, D: inflorescence initiation; E, F: outer-perianth initiation.

2.2 芽内源激素的动态变化

2.2.1 ZRs 含量变化 由图2可知,‘金娃娃’萱草在花芽分化初期顶芽中ZRs含量变化较大,在营养生长期剧烈下降,进入花原基分化期时又逐步上升,可见高浓度的ZRs对形态分化是有促进作用的。

2.2.2 ABA 含量变化 由图3可知,‘金娃娃’萱草在未分化期时,ABA在植株内的总量开始的时候趋于平稳,之后逐步上升,在积累到一定程度后达到一个峰值,其后处于下降趋势,并维持在一定水平。由此可见,低

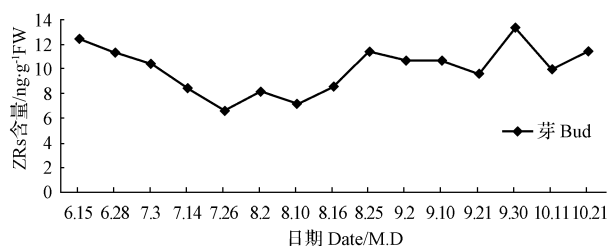


图2 内源激素 ZRs 含量的变化

Fig. 2 The content of ZRs endogenous hormones

浓度的ABA对形态分化有利。王玉华等^[8]在大櫻桃花芽分化中证明ABA在未分化期有短期的迅速积累,当花芽进入花原基分化期后ABA含量又迅速降低。

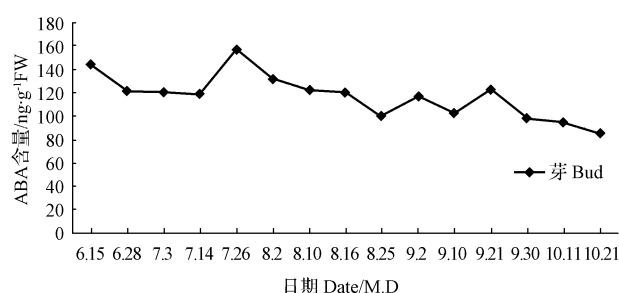


图3 内源激素 ABA 含量的变化

Fig. 3 The content of ABA endogenous hormones

2.2.3 IAA 含量变化 由图4可知,‘金娃娃’萱草芽中的内源激素在未分化期时处于上升趋势,达到一个峰值之后保持平稳状态,直至进入花原基分化期,IAA含量迅速下降,直至外轮花被分化期结束。因此,表明IAA含量的降低有利于‘金娃娃’萱草的花芽分化。

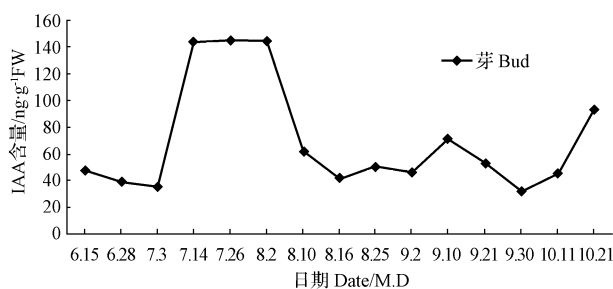


图4 内源激素 IAA 含量的变化

Fig. 4 The content of IAA endogenous hormones

2.2.4 GA 含量变化 由图5可知,‘金娃娃’萱草内源激素GA在芽中未分化期中的变化是先上升后下降,进入花原基分化期时,达到一个峰值之后又下降。因此,低浓度的GA对其未分化时期是有利的,在进入花原基分化期后,GA含量的变化对‘金娃娃’萱草花芽分化的影响不是很大,变幅较小,直至外轮花被分化期,一直维持在一个水平。

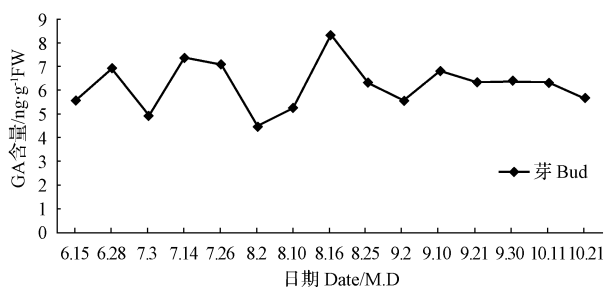


图5 内源激素 GA 含量的变化

Fig. 5 The content of GA endogenous hormones

2.3 芽内源激素比值动态变化

2.3.1 ZRs/GA 变化 由图 6 可知, ZRs/GA 在‘金娃娃’萱草未分化期有个迅速积累过程, 之后逐渐下降, 在花原基分化一直保持在一个水平线上, 直至外轮花被分化期又逐步升高, 因此, ZRs/GA 的比值在花芽分化的不同阶段作用也不同, 在未分化期 ZRs 的含量越高或 GA 的含量越低, 越有利于营养物质的积累, 而在形态分化初期比值越低越有促进作用。

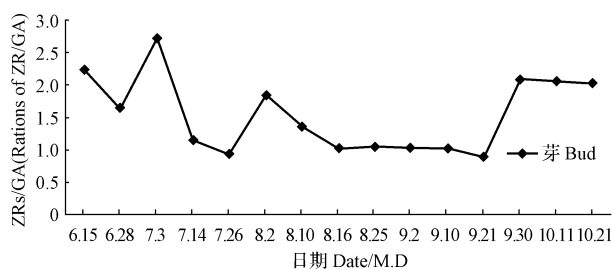


图6 内源激素 ZRs/GA 含量的变化

Fig. 6 The content of ZRs/GA endogenous hormones

2.3.2 ABA/IAA 变化 由图 7 可知, 从总体来看, 在芽中 ABA/IAA 的比值变化比较激烈, 在未分化期处于先上升后下降的趋势, 在花原基分化期其比值又逐渐升高, 达到一个峰值。因此, 低浓度的 ABA 或高浓度的 IAA 对‘金娃娃’萱草未分化期时的营养积累有促进作用。

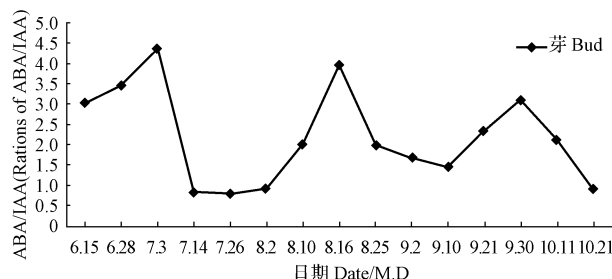


图7 内源激素 ABA/IAA 含量的变化

Fig. 7 The content of ABA/IAA endogenous hormones

3 结论与讨论

该试验结果表明, ‘金娃娃’萱草在 6 月至 10 月末经历了 3 个时期, 分别是未分化期(6 月中旬至 7 月中

旬)、花原基分化期(7 月下旬至 9 月上旬)、外轮花被分化期(9 月中下旬至 11 月初), 之后‘金娃娃’萱草进入休眠期。因此, ‘金娃娃’萱草具有跨年分化这一特性, 与王开贞等^[9]所提出的同样是萱草属的黄花菜具有跨年分化的特性相符。

植物花芽分化阶段内源激素的变化对花芽分化具有重要意义, 是影响植物花芽形态分化过程中极其关键的因素。之前很多关于植物各阶段花芽分化内源激素变化^[10-11]的研究报道, 对各种激素对花芽分化的作用观点不一, 对于‘金娃娃’萱草研究得出, 高浓度的 ZRs 对其形态分化是有促进作用的; 低浓度的 ABA 对其花芽分化形态分化有利; GA 含量的变化对‘金娃娃’萱草花芽分化前期的影响不是很大; 内源激素 IAA 含量在营养生长期先上升后下降, 在形态分化前期处于上升状态, 而在外轮花被分化期基本处于下降趋势, 所以 IAA 含量的降低有利于‘金娃娃’萱草的花芽分化。因此认为植物内源激素在花芽分化不同阶段所表现的作用不同, 应在特定的时期内探讨内源激素的作用。

前人在长期研究花芽分化同激素的关系时发现, 花芽分化的调控并不是由单一的激素决定的, 而是各种激素相互作用产生的综合效应^[12]。Luckwill L C^[13]首次提出了激素平衡调控假说。因此, 通过该试验可以得出, ABA/IAA 值对花芽分化的营养生长期有促进作用, 但对形态分化可能有阻碍作用; ZR/GA 的值在形态分化初期比值越低越有促进作用。从‘金娃娃’萱草的花芽分化前期过程及其 4 种内源激素含量动态变化规律分析, 提高“金娃娃”萱草的花芽分化率应在花原基分化期。

参考文献

- [1] 陈心启. 中国植物志·萱草属[M]. 北京: 科学出版社, 1980: 57-59.
- [2] Tomkins J P, Wood T C, Barnes L S, et al. Evaluation of genetic variation in the daylily (*Heimerocallis* spp.) using AFLP markers[J]. Theor Appl Genet, 2001(102): 489-496.
- [3] 熊治廷, 陈心启, 洪德元. 中国萱草属数量分类研究[J]. 植物分类学报, 1997, 35(4): 311-316.
- [4] 刘志洋, 李海涛, 朱祥春, 等. 大花萱草组织培养研究[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(1): 43-45.
- [5] 林晓东. 激素调节花芽分化的研究进展[J]. 果树科学, 1997, 14(4): 269-274.
- [6] 任桂杰, 陈永哲, 董合忠, 等. 棉花花芽分化及部分内源激素变化规律的研究[J]. 西北植物学报, 2000, 20(5): 847-851.
- [7] Monselise S P, Goren R. The role of internal factors and exogenous control in flowering, peel growth and abscission in *Citrus* [J]. Horticultural Science, 1978, 13: 134-139.
- [8] 王玉华, 范崇辉, 沈向, 等. 大樱桃花芽分化期内源激素含量的变化[J]. 西北农业学报, 2002, 11(1): 64-67.
- [9] 程沛霖, 王开贞. 黄花菜花芽分化的初步研究[J]. 中国蔬菜, 1983(3): 19-21.
- [10] Sachs R M. Nutrient diversion: an hypothesis to explain the chemical

control of flowering[J]. Horticultural Science, 1977, 12(3): 220-222.

[11] Du E(杜蛾), Zhang Z(张志国), Ma L(马力). Studies on the classification of *Hemerocallis hybridus* cultivars [J]. Jour. of Northwest Sci-Tech Univ. of Agri. and For. (Nat. Sci. Ed.) (西北农业科学大学学报·自然科学版), 2005, 33(10): 85.

[12] 赵普庆, 於维维, 汪俏梅. 生长素与其他信号之间的相互作用[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(2): 246-250.

[13] Luckwill L C. The control of growth and fruitfulness of apple trees, Physiology of Tree Crops[M]. London: Academic Press, 1970: 237-254.

Study on the Endogenous Hormones at Pre-stage of Flower Bud Differentiation of *Hemerocallis* 'Stella de Oro'

ZHONG Wen-jing^{1,2}, SUN Guo-feng², LI Xiao-dong², ZHANG Jin-zheng², LIU Hong-zhang¹

(1. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

Abstract: Taking *Hemerocallis* 'Stella de Oro' as test material, by paraffin-cut section method were observed; the process of morphological differentiation were combined with, content changes of endogenous hormones by using Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) method in the buds of it were studied. The results showed that the morphological differentiation of the three pre-stages were undifferentiation, inflorescence initiation, outer perianth initiation, ZRs content from low to high, IAA and ABA content declined, and there was no change in GA content.

Key words: *Hemerocallis* 'Stella de Oro'; flower bud differentiation; endogenous hormones

农业部开展蔬菜水果茶叶禁限用高毒农药专项整治

农博网 2012 年 2 月 28 日, 种植业管理司会同农药检定所在湖南长沙召开了“全国农药管理工作座谈会暨农药检定工作会议”, 提出 2012 年在全国蔬菜水果茶叶主产县和农药生产使用大省开展禁限用高毒农药专项整治。通过强化高毒农药管理、加大执法检查力度、规范农药使用行为、推进专业化统防统治、加强安全用药知识宣传培训、鼓励使用低毒和生物农药等措施, 提高蔬菜水果茶叶质量安全水平。

种植业管理司副司长周普国总结了农药市场监管年活动取得的成效, 通过连续 3 a 的农药市场监管年活动, 农药产品结构明显优化, 农药市场秩序显著好转, 农药产品质量大幅提升, 违法制售甲胺磷等 5 种禁用高毒农药行为基本杜绝。2011 年农药质量合格率达到 86.9%, 蔬菜农药残留例行监测合格率达到 97.4%, 分别比 2008 年提高了 15.9 和 1.1 个百分点。农药管理为保障粮食产量“八连增”、持续提高农产品质量安全水平做出了重要贡献。

周普国指出, “农药是影响农产品质量安全的重要因素之一, 目前我国农药管理取得了显著成效, 但面对现代农业对农药“保产量、保安全”的新要求, 还存在一定的差距。”2012 年要全面贯彻落实全国农业工作会议和全国农产品质量安全监管会议精神, 强化种植业产品专项整治, 以蔬菜生产违规使用高毒农药问题为重点, 以新《农药管理条例》出台为契机, 大力推进农药市场执法监管和农药管理法制建设。

农业部农药检定所所长隋鹏飞在会议上表示, 农药管理要始终紧密围绕农业和农村的工作大局, 坚持以服务农业生产、维护农民利益为出发点, 强化登记审批的权威性和引导性, 提高监管和信息服务能力。“针对当前蔬菜用药缺乏、使用不规范等突出问题, 农业部农药检定所将组织开展蔬菜用药专项治理工作, 通过联合试验、扩作登记、强化使用指导等措施, 计划用 5 a 时间, 系统解决蔬菜生产无药可用问题。”

会议明确提出了 2012 年的几项重点工作: 以完善新《条例》相关配套规章为抓手, 大力推进农药管理制度建设; 以农药经营许可为抓手, 全面推行农药市场秩序整顿工作; 以加强农药残留标准体系建设为抓手, 制定一批农药合理使用规程, 继续实施低毒生物农药补贴示范推广项目, 从源头上提升农产品质量安全水平; 以蔬菜安全用药为抓手, 切实解决农药安全使用问题。在蔬菜优势区域重点县和水果、茶叶等经济作物优势区, 全面推行高毒农药定点经营。

(文章来源: 农博网)