

牡丹芽自由态 IAA 的变化及其与 ARP 基因的关系

丁晓雯¹, 程洁¹, 吴玉川², 周荣全³, 劳俊峰¹, 穆平¹

(1. 青岛农业大学 农学与植保学院, 山东省旱地作物水分高效利用创新团队, 山东 青岛 266109;

2. 山东省济宁市农业局, 山东 济宁 272100; 3. 山东省定陶县冉堪镇农技站, 山东 定陶 274100)

摘要:以牡丹品种‘鲁荷红’为试材,在不同低温处理下研究 *PsARP* 基因的表达变化及花芽内源 IAA 的含量变化,以阐明牡丹花芽休眠解除期间自由态 IAA 的变化及与 *PsARP* 基因表达之间的关系。结果表明:在低温处理前期,随着低温时间的增加,自由态 IAA 的含量不断降低,达花芽休眠解除临界点时 IAA 含量最低。在低温处理的后期,随着低温时间的增加,自由态 IAA 的含量呈下降趋势,但仍保持较高的含量,12 d 和 18 d 之间是个转折点。实时荧光定量分析表明,低温处理前期,*PsARP* 基因的表达量逐渐增加,且在 12 d 时达到最高点;低温处理第二阶段,*PsARP* 基因的表达量快速下降,30 d 时快速下降至最高表达量的 50%。内源自由态 IAA 含量的变化可以反映花芽休眠解除的状态。

关键词:牡丹;休眠解除;自由态 IAA;荧光定量

中图分类号:S 685.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)03-0092-04

牡丹是中国传统十大名花之一,具有极高的观赏价值。一般条件下,花芽必须经过自然低温才能解除休眠,保证翌年正常开花。在牡丹花芽休眠解除过程中,一定程度的低温是休眠解除的重要条件^[1-2]。

低温解除花芽休眠过程中,花芽内部发生一系列生理生化变化,其中内源生长素 IAA 水平也发生变化。由于 IAA 在植物体内含量甚微,并且 IAA 存在自由态和结合态 2 种状态,导致对 IAA 在休眠解除过程中的作用不甚清楚^[3-5]。高效液相色谱法对于植物激素的分离测定具有简便、灵敏、快速等优点。曾有报道黄瓜、苹果、茶树、猕猴桃、枸杞、拟南芥等植物样品中植物激素的 HPLC 方法^[6-13]。*ARP*(Auxin-repressed protein)是生长素抑制蛋白基因,在烟草、蓝莓等植物已有分离。已有研究表明,*ARP* 基因主要通过抑制生长素的转化起到调控 IAA 水平的作用^[14]。但是关于牡丹花芽休眠解除过

第一作者简介:丁晓雯(1990-),女,山东枣庄人,硕士研究生,研究方向为植物分子育种。E-mail:709939160@qq.com.

责任作者:穆平(1971-),男,山东博兴人,博士,教授,现主要从事作物遗传育种等研究工作。E-mail:muping@qau.edu.cn.

基金项目:山东省农业良种工程资助项目;山东省抗旱节水创新团队专项资金资助项目。

收稿日期:2014-09-22

Analysis on the Landscape Form of ‘Natural Astronomical Phenomena’

LEI Fang, HU Xi-jun, LI Meng-ting, JIANG Zhe, CHENG Shi-shi

(College of Landscape Architecture, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004)

Abstract: ‘Natural astronomical phenomena’ can not be ignored in garden because of its unique landscape features of astronomical. This paper first introduced the concept and characteristic of ‘natural astronomical phenomena’, through to the analysis of ‘natural astronomical phenomena’ and landscape gardening inner link, and as a guide to discuss on the landscape form of ‘natural astronomical phenomena’ from three aspects of nominating for prominent landscape, landscape architecture doors and windows, landscape plants, explored these three aspects for forming a good landscape effect by suitable landscaping and ‘natural astronomical phenomena’, and then pointed out its important value in the landscape design.

Keywords: ‘natural astronomical phenomena’; garden landscaping; borrowing scenery; framed scenery

程中的作用尚鲜见报道。

为进一步研究牡丹花芽休眠解除与 IAA 的关系,该试验以不同休眠解除状态的牡丹花芽为研究对象,通过精确测定不同低温处理下牡丹花芽自由态 IAA 的含量变化,结合不同低温条件下 *PsARP* 基因表达量,以探索自由态 IAA 在牡丹花芽休眠解除过程中的表达变化,以为牡丹花芽休眠解除机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料来自山东菏泽市牡丹研究所 4 年生牡丹‘鲁荷红’的健壮植株。每株有 6~8 枝,每枝条有正常发育的花芽 1~2 个,花芽形态大小(纵径×横径)1.60 cm×0.6 cm 以上。

1.2 试验方法

日最低气温达 10℃ 时,以低温处理开始(0 d)作为对照 T₀。其后每隔 6 d 作为 1 个低温处理,共设置低温 6、12、18、24、30 d 5 个处理,每个低温处理结束后立即取样(花芽 40~45 个),液氮保存,用于随后的 IAA 测定及荧光定量分析。

1.3 项目测定

1.3.1 自由态 IAA 测定方法 利用 HPLC 方法测定不同低温条件下的自由态 IAA 含量^[13-18]。通过部分试验和测定 IAA 的条件,选择 80% 的甲醇作为提取牡丹花芽中自由态 IAA 的溶剂。选择甲醇-水(V/V;80%:20%)作为流动相,选择 275 nm 为检测波长。根据预备试验确定标准曲线。样品回收率计算公式:IAA 回收率(%)=(加标样品 IAA 测出量-样品原始含量)/加入标品含量×100%。

1.3.2 HPLC 方法的精密度及回收率试验 取相同处理下的牡丹花芽样品 3.0 g,液氮研磨充分后混合均匀,然后平均分成 6 份,每份 0.5 g,处理后进行 HPLC 测定。称取 T₀ 组牡丹花芽样品 4 份,每份 0.5 g,其中 3 份加入已知浓度的 IAA 标品(表 2),另 1 份用来测 IAA 原始含量。在相同条件下各测定 3 次,计算回收率。

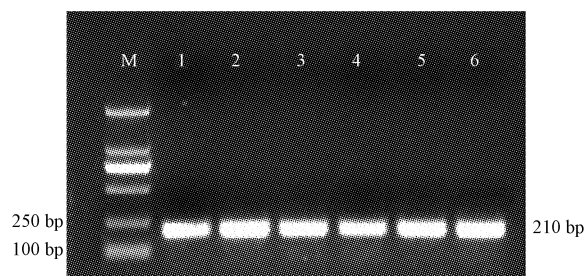
1.3.3 实时荧光定量 PCR 分析 利用 primer premier 5 设计 Real-time PCR 特异引物和管家引物:Actin-5':5'-GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG-3', Actin-3':5'-AACGACCTTAATCTTCATGCTGC-3', *PsARP*-5':5'-GAGTTGGGCTGTGGCTTG-3', *PsARP*-3':5'-AATTATACCAGAGGTGCTTTC-3',按照 TaKaRa 公司的 SYBR® Premix DimerEraser™(Perfect Real Time)试剂盒说明书制定管家基因和目的基因的标准品和标准曲线。利用双标准曲线法分析数据。利用待测样品目的基因表达量与对照样品目的基因表达量比值表示

待测目的基因相对于对照组的表达差异倍数^[19-20]。

2 结果与分析

2.1 不同处理条件下 *PsARP* 基因的表达变化

为研究 *PsARP* 基因的表达情况,首先进行实时定量引物的质粒 PCR。实时定量引物的质粒 PCR 产物电泳结果如图 1,其片段大小为 210 bp,符合设计要求,且引物特异性良好,可用于后续试验。



注:M: DL 2000 Maker, 1~6 表示 6 个重复阳性质粒 PCR 结果。

Note: M is DL 2000 Maker; 1~6 indicates the product of the positive plasmid PCR.

图 1 质粒 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 The product of the positive plasmid PCR

管家基因与目的基因的标准曲线 Real-time PCR 扩增的动力学方程复相关系数均大于等于 0.99,PCR 扩增效率=2^{-1/标准曲线斜率}-1,计算结果均在 80%~120% 的要求范围内,说明标准曲线的标准方程是理想的。管家基因与目的基因的溶解曲线都为单一吸收峰,无非特异性产物及引物二聚体等生成,表明引物特异性良好,实时定量结果准确反映样品初始浓度。管家基因与目的基因 Ct 值差异较小,其均值和标准差见表 1。

表 1 目的扩增 Ct 值标准误差分析

Table 1 Analysis of Ct value of target amplification

处理 Treatment	管家基因引物 Primer of housekeeping gene	目的基因 <i>PsARP</i> 引物 Primer of <i>PsARP</i>
T ₀	22.65±0.02	21.92±0.04
T ₁	21.64±0.01	19.66±0.11
T ₂	23.32±0.10	21.92±0.00
T ₃	23.19±0.01	21.75±0.00
T ₄	23.13±0.00	21.78±0.00
T ₅	21.36±0.03	20.27±0.01

由图 2 可知,在低温解除花芽休眠过程中,随着感受低温天数的增加,*PsARP* 基因的表达量呈现先高后低的趋势,在低温处理 0~12 d,随着低温天数增加,基因表达量不断升高。最高时的表达量约为对照的 2 倍。在低温处理 18~30 d,随着低温天数增加,基因表达量不断降低,低温 30 d 时,基因表达量只有初始状态的 0.94 倍。从牡丹花芽休眠解除程度来看,当低温 12~18 d 时,牡丹休眠处于打破临界状态,此时,*PsARP* 基因表达

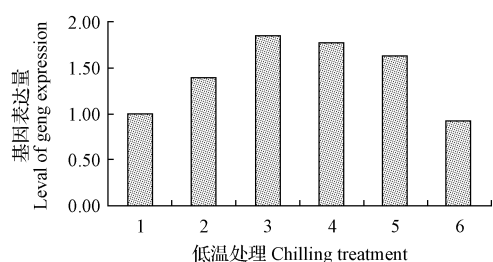


图2 不同低温条件下 *PsARP* 基因表达情况

Fig.2 Level of *PsARP* gene expression under different chilling treatments

量最高。当低温 18 d 以后,牡丹花芽已解除休眠,此时基因表达量降低。表明该基因的表达是与花芽的休眠解除程度相关联的。

2.2 不同处理条件下自由态 IAA 含量变化

HPLC 结果表明,IAA 色谱峰的相对保留时间的 RSD 均在 1.5% 以下,相对峰面积的 RSD 也在 3.1% 以下,说明试验的精密密度良好。IAA 回收率结果见表 2。

表2 自由态 IAA 回收率测定方法

Table 2 Rate of recovery for free IAA

样品	原始含量	加标样含量	Found	回收率	相对标准偏差
Sample	Original/ μg	Added/ μg	/ μg	Recovery/%	RSD/%
1	0.820	0.5	1.190	90.09	1.233
2	0.820	2.0	2.532	89.78	0.975
3	0.820	4.0	4.216	87.48	2.440

由图 3 可知,牡丹花芽自由态 IAA 含量在 0~12 d 低温条件下,随低温天数的增加自由态 IAA 含量不断降低,当低温 12 d 时达到最低,其含量只有 0 d 的 1/5;在 12~18 d 自由态 IAA 含量大幅度增加,18 d 时的含量比 12 d 时的含量增加 7 倍;18 d 后 IAA 含量又缓慢降低。

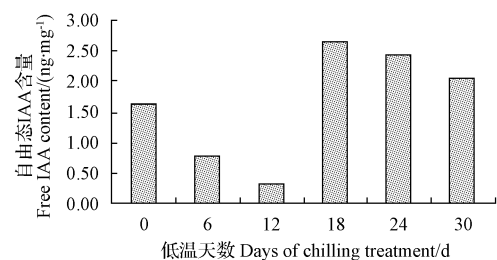


图3 不同低温条件下牡丹花芽自由态 IAA 含量

Fig.3 Free IAA content of dormant floral buds under different chilling treatments

2.3 *PsARP* 表达量与自由态 IAA 含量的关系

由表 3 可知,根据花芽萌动率和成花率,低温 12~18 d 是花芽休眠解除的临界点。在整个休眠解除过程中,自由态 IAA 含量变化特点与低温时间的关系分为 2 个阶段。在休眠解除前,自由态 IAA 随低温天数增加含量不断降低,达休眠解除临界点时含量最低;休眠解除

后花芽开始萌动,此时自由态 IAA 含量随低温时间增加维持在较高水平。

表3 不同低温条件下花芽休眠解除状态、自由态 IAA 含量及 *PsARP* 表达量

Table 3 Statistics of dormancy release rate, free IAA content and expression level of *PsARP*

低温天数	萌动率	成花率	IAA 含量	<i>PsARP</i> 表达量
Days of chilling	Sprouting	Flowering	IAA content	Express level
treatment/d	rate/%	rate/%	/(ng·mg ⁻¹)	of <i>PsARP</i>
0	0	0	1.64	1.00
6	58.65	0	0.79	1.37
12	64.42	47.62	0.33	1.98
18	79.17	79.17	2.63	1.74
24	88.46	83.08	2.43	1.55
30	100.00	92.00	2.04	0.94

3 讨论与结论

长期以来,对于生长素在休眠解除过程中的作用说法不一。Tillberg^[21] 认为生长素不参与休眠的解除,而仅仅与休眠解除后的萌发过程有关,而 Falvre-Rampant 等^[22] 通过对生长素响应因子(ARF6)的研究,认为生长素在调控马铃薯块茎休眠的过程中起一定作用。郑国生等^[2]、陈伟等^[23] 研究认为,低温解除过程中花芽内总 IAA 含量总体上呈下降趋势,但其与休眠解除进程的具体关系缺乏规律。为深入研究这一问题,该研究用 HPLC 方法精度测定了不同低温处理下的花芽自由态 IAA 含量,并与 *ARP* 基因的表达情况进行了比较。总体来看,在花芽休眠解除过程中,自由态 IAA 含量的变化分为 2 个阶段,花芽休眠解除前,自由态 IAA 含量不断降低;达休眠解除临界点后,IAA 含量有一个跃升,随后 IAA 含量保持在一个较高水平。综合低温解除牡丹花芽休眠过程中自由态 IAA 与休眠解除程度的关系来看,自由态 IAA 含量的变化与花芽休眠解除程度相关联,在休眠解除前,随低温积累,自由态 IAA 含量不断降低,休眠解除后,随着花芽内生理生化活动的增强,自由态 IAA 含量也保持较高水平,而总 IAA 水平在整个低温解除休眠过程中的变化没有明显的规律性。*ARP* 基因在休眠解除过程中的动态变化也证明了 *ARP* 基因是调控休眠解除过程中自由态 IAA 向束缚态 IAA 转化的因素之一。

该研究以牡丹品种‘鲁荷红’为试材,在不同低温处理下研究 *PsARP* 基因的表达变化及花芽内源 IAA 的含量变化。自由态 IAA 含量可反映花芽休眠解除状态。在低温处理前期(0~12 d),随着低温时间的增加,自由态 IAA 的含量不断减少,达到花芽休眠解除临界点时 IAA 含量最低。在低温处理的后期(18 d 以后),随着低温时间的增加,自由态 IAA 保持较高的含量。12 d 和

18 d 之间是个转折。IAA 含量的变化与 *PsARP* 基因的表达量具有高度相关性,表明 *PsARP* 基因通过调节 IAA 含量参与花芽休眠解除进程。

参考文献

- [1] 刘波,郑国生,闫志佩,等. 低温处理对牡丹春节催花及营养类物质变化的影响[J]. 西北植物学报,2004,24(9):1635-1639.
- [2] 郑国生,盖树鹏,盖伟玲. 低温解除牡丹芽休眠进程中内源激素的变化[J]. 林业科学,2009,45(2):48-52.
- [3] Lang G A, Early J D, Martin G C. Endo-, para- and eco-dormancy: physiological terminology and classification for dormancy research [J]. Hort Science, 1987, 22: 371-377.
- [4] 黄鑫. 牡丹花芽内休眠解除相关基因的分离与功能分析[D]. 北京: 北京林业大学, 2008.
- [5] 宋运贤,周素英,杜雪玲,等. 低温预处理对小麦花药内源激素的影响[J]. 核农学报,2012,26(7):1064-1069.
- [6] 陈小鹏,王秀峰,孙小镭,等. 高效液相色谱法测定黄瓜瓜条中赤霉素和脱落酸含量[J]. 山东农业科学,2005(1):65-67.
- [7] 吴耕西,毕桂红. 高效液相色谱法测定苹果叶片中的吲哚乙酸和脱落酸[J]. 山东农业大学学报,1994,25(1):51-55.
- [8] 钱利生,沈生荣,潘根生. 茶树新梢内源激素的 HPLC 分析及日变化[J]. 茶叶科学,1996,16(2):135-139.
- [9] Nagar P K, Sood S. Changes in endogenous auxins during winter dormancy in tea (*Camellia sinensis* L.) O. Kuntze [J]. Acta Physiologiae Plantarum 2006, 28(2):165-169.
- [10] 杨晓婉,郑国琦,许兴,等. 宁夏枸杞果实生长发育期内源激素变化及关系研究[J]. 西北植物学报,2013,33(1):116-122.
- [11] Normanly J. Auxin metabolism [J]. Physiol Plant, 1997, 100:431-442.
- [12] Ramaih S, Guedira M, Paulsen G M. Relationship of indole acetic acid and tryptophane to dormancy and preharvest sprouting of wheat [J]. Funct Plant Biol, 2003, 30:939-945.
- [13] 金小英,达世禄. 赤霉素、3-吲哚乙酸和脱落酸的反相高效液相色谱测定法[J]. 江西农业大学学报,1990,12(4):95-98.
- [14] 符继红,褚金芳,王吉德,等. 固相萃取反相高效液相色谱荧光检测法测定拟南芥中的生长素[J]. 分析化学,2009(9):1324-1327.
- [15] 王明月. 高效液相色谱法测定发酵液中的吲哚乙酸含量[J]. 热带农业工程,2009,33(5):1-3.
- [16] 马振宇,吕志华,姜廷福,等. 高效液相色谱法测定菌肥中赤霉素和吲哚乙酸含量方法研究[J]. 分析测试技术与仪器,2005,11(3):174-177.
- [17] 付蕾,王明林. 苹果幼树梢尖 3-吲哚乙酸、赤霉素和脱落酸的高效液相色谱测定法的研究[J]. 山东农业大学学报,1999,30(4):445-447.
- [18] 侯凯,陈郡雯,申浩,等. 川白芷内源激素的提取纯化和高效液相色谱法同步测定[J]. 核农学报,2013,27(5):653-657.
- [19] 王彦杰,董丽,张超,等. 牡丹实时定量 PCR 分析中内参基因的选择[J]. 农业生物技术学报,2012,20(5):521-528.
- [20] 徐丽华,刘春雷,常玉梅,等. 双标准曲线相对定量 PCR 试验原理与方法[J]. 生物技术通报,2011(1):70-75.
- [21] Tillberg E. Levels of Endogenous indole-3-acetic acid in achenes of *Rosa rugosa* during dormancy release and germination [J]. Plant Physiology, 1984, 76:84-87.
- [22] Falvire-Rampant O, Cardle L, Marshall D, et al. Changes in gene expression during meristem activation processes in *Solanum tuberosum* with a focus on the regulation of an auxin response factor gene [J]. J Experi Bot, 2004, 55(397):603-612.
- [23] 陈伟,苏新国,郜海艳,等. 低温对桃果实采后冷害及其内源激素的影响[J]. 核农学报,2013,27(8):1173-1178.

Changes of Free IAA and Relationship Between *PsARP* in Tree Peony

DING Xiao-wen¹, CHENG Jie¹, WU Yu-chuan², ZHOU Rong-quan³, LAO Jun-feng¹, MU Ping¹

(1. College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Innovation Team of Drought Resistance in Shandong Province, Qingdao, Shandong 266109; 2. Jining Bureau of Agriculture, Jining, Shandong 272100; 3. Rangu Agrotechnical Station, Dingtao, Shandong 274100)

Abstract: Using *Paeonia suffruticosa* 'Luhehong' as plant materials, the expression pattern of *PsARP* and changes of free IAA were conducted under different chilling treatments. In order to reveal the changes of free IAA and the relationship between *PsARP* during dormancy release by chilling treatment in tree peony. The results showed that during the first 12 days of chilling treatment, the content of free IAA continuously reduced with the increase of chilling treatment. The lowest point was in accordance with the dormancy release of tree peony. In the later part of chilling treatment, although a reduction situation was also maintained, a relatively high level of content of free IAA was detected. Chilling treatment between 12 days and 18 days was a key point. By Real-time PCR, it showed that the expression of *PsARP* was enhanced and continuously increased in the buds of tree peony during the first step of dormancy release by chilling treatment, reaching the highest value during 12 days chilling treatment. At the second part of chilling treatment, the expression level of *PsARP* reduced to 50% than that of the highest level. The variation of free IAA could reflect the dormancy release degree of the flower bud.

Keywords: *Paeonia suffruticosa*; dormancy release; free IAA; real-time PCR