

苹果矮化中间砧 SH40 激素含量及生长素转运蛋白基因 *pin1* 表达

于迟 张鹤 李鸿莉 王忆 张新忠 韩振海*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

摘要 为探讨 SH40 作为苹果中间砧时激素含量及生长素转运蛋白基因 *pin1* 表达量变化与矮化的可能存在的关系,为今后致矮机理研究打下基础。在控制条件下,以矮化中间砧砧穗组合富士/SH40/八棱海棠、乔化自根砧砧穗组合富士/八棱海棠以及乔化苗八棱海棠和矮化苗 SH40 为试材,采用 HPLC 法测定分析了材料茎皮中生长素(IAA)和脱落酸(ABA)含量的变化,采用 qRT-PCR 研究了 *pin1* 基因表达量的变化。结果表明:无论砧木苗本身,还是嫁接品种后,SH40 茎皮中 ABA/IAA 比值显著高于乔化砧木八棱海棠;SH40 做中间砧时,其茎皮中 IAA 含量显著减少,可能与其中 IAA 转运蛋白 *pin1* 基因表达量显著降低有关。

关键词 苹果; 砧木; SH40; 矮化; IAA; ABA; *pin1* 基因

中图分类号 S 661.1

文章编号 1007-4333(2012)02-0080-05

文献标志码 A

The content of hormone and auxin transport gene *pin1* of SH40 as the interstock of apple

YU Chi, ZHANG He, LI Hong-li, WANG Yi, ZHANG Xin-zhong, HAN Zhen-hai*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Both rootstock SH40, *Malus micromalus* and scion-rootstock combinations Fuji/SH40/*Malus micromalus*, Fuji/*Malus micromalus* were used as the materials in this experiment. Both IAA and ABA were measured by HPLC in the bark of different materials. qRT-PCR (quantitative realtime PCR) were also used to search for the difference of expression of *pin1* gene. Our aim was to explore the relationship between the content of hormone, the expression of *pin1* gene and the possible dwarfing factors of SH40 as the interstock of apple. The results showed that the ratio of ABA/IAA was remarkable higher in the dwarf trees than the vigorous controls. In graft combination Fuji/SH40/*Malus micromalus*, the content of IAA in the bark of the interstock was much lower than the scion, which might be due to the significant lower expression of IAA-transporting protein gene *pin1* in the bark of the interstock.

Key words apple; rootstock; SH40; dwarfing; IAA; ABA; *pin1* gene

在苹果栽培中,利用矮化砧木嫁接是控制树体大小,提高果树产量最有效和最经济的方法^[1]。由山西省农业科学院果树研究所选育的 SH 系苹果砧木具有矮化、早果、丰产、果实品质优异、抗逆性强和适应性广等一系列优良特性,适宜在华北和西北等苹果产区推广^[2-3]。因此,对其致矮相关机理的研究

对其栽培应用及进一步筛选具有重要的指导意义。果树矮化砧和矮化中间砧茎(根)干外层的皮层在其致矮性中起着决定性作用,且这种作用很有可能是通过影响嫁接树的根系反过来导致嫁接树矮化的^[4]。苹果矮化砧木的茎皮具有较强的生长素破坏能力,且矮化作用越强,生长素破坏能力越强^[5]。而

收稿日期: 2011-05-20

基金项目: 北京市科技计划课题(Z090605006009010)

第一作者: 于迟,硕士研究生,E-mail:scholl168@yahoo.cn

通讯作者: 韩振海,教授,博士生导师,主要从事果树矿质元素吸收利用及分子生物学研究,E-mail:rschan@cau.edu.cn

将矮化砧木的茎皮嫁接到半矮化或乔化砧木上可起到与矮化中间砧相同的矮化效果^[6-7], 由此提出苹果树矮化砧和矮化中间砧是由于其茎皮破坏及减少了由地上部向根系运输的生长素而导致嫁接树体矮化。而生长素的运输主要有 2 种形式, 一种是快速与其他代谢产物一起以集束流(mass flow)的形式通过成熟维管束组织进行的被动运输, 这种运输不需要消耗能量, 无固定方向; 另一种是慢速单方向、在细胞之间进行的依赖于载体来完成的运输, 这种运输称为极性运输^[8-9]。高等植物中生长素的极性运输所需要的载体主要为 PIN 蛋白家族^[10]。Galweiler 等^[11]用转座子标签的方法克隆出拟南芥 *pin1* 基因(*Atpin1*), 该基因编码一个由 622 个氨基酸组成的蛋白质, 由 12 个跨膜转运蛋白组成。序列分析表明其与真核和原核生物的转运蛋白同源, 说明 AtPIN1 蛋白可能就是一种生长素转运蛋白。本研究选用矮化砧木 SH40 及乔化对照八棱海棠为试验材料, 通过对其 IAA、ABA 及其相关比例以及编码生长素极性运输蛋白基因 *pin1* 表达变化观测, 旨在探究 SH40 作为苹果矮化中间砧时激素含量及 *pin1* 基因表达量的变化与树体矮化的可能存在的关系, 为今后苹果矮化砧木致矮机理的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用材料为 2 年生乔化自根砧砧穗组合富士/八棱海棠、矮化中间砧砧穗组合富士/SH40/八棱海棠、矮化苗 SH40 和乔化苗八棱海棠, 于 2009 年 3 月在中国农业大学科学园网室栽种于直径 50 cm, 深 35 cm 的花盆中, 选用栽培土、草炭和蛭石质量比为 3:1:1 的基质进行栽培, 采用滴灌系统进行灌溉。

从第 2 年开始取样, 分别在新梢旺盛生长期、封顶期和秋梢期进行采样, 每个样品选取 3 株长势相同的树体作为 3 次重复。分别取富士/SH40/八棱海棠砧穗组合中富士、SH40 和八棱海棠的茎皮, 富士/八棱海棠砧穗组合中富士和八棱海棠的茎皮, 方法是距对应嫁接口 5~15 cm 的部位进行环剥; 分别

选取砧木 SH40 和八棱海棠距土表 20~30 cm 的茎皮进行环剥。取材后采用液氮速冻, 随后在 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 方法

1) 激素的提取。采用冰乙腈法提取材料内源激素。

激素的测定: 采用 Waters600 型高效液相色谱(HPLC), Waters2487 紫外检测器, Intertsil ODS-3 柱。

高效液相色谱条件: HPLC 型号 Waters600, Waters2487 紫外检测器, Intertsil ODS-3 柱, 250×4.6 mm, 粒径 5 μm, 流动相为甲醇和 0.6% 乙酸的体积比 = 45:55, 流速 0.8~1.0 mL/min, 紫外检测波长为 252 nm, 进样量为 30 μL。

2) Realtime PCR。RNA 的提取(CTAB 法)→消化 DNA→测 OD 值→反转录 cDNA→半定量 PCR 检测 cDNA 模板质量→实时荧光 PCR 检测 *pin1* 基因表达。

实时荧光 PCR 条件: 选用苹果属植物核糖体 18S rRNA 基因作为内参基因, 每个基因进行 3 次平行测定, 取平均值。采用 ABI 公司 7500 型实时荧光 PCR 仪, PCR 条件为 95 °C 30 s; 95 °C 5 s; 60 °C 34 s, 后 2 步共 40 个循环, 4 °C 终止反应。导出数据并在 EXCEL 中分析数据。

所用引物序列: *pin1* Fwd 5'-ATGTTTCAGCC-TTGTTTGTATTATGG-3'; *pin1* Rev 5'-TACAA-TGGCAACATGCAAGAGAGTG-3'。

2 结果与分析

2.1 不同砧木及嫁接组合茎皮中 ABA 和 IAA 含量及其比例的变化

表 1 可示: 无论在新梢旺盛生长期、封顶期或是秋梢期, 矮化砧木 SH40 茎皮中生长抑制型激素 ABA 的含量均显著高于乔化对照八棱海棠的茎皮; 而生长促进型激素 IAA 的含量则恰恰相反, 在八棱海棠茎皮中含量高。柑橘的相关研究表明: ABA/IAA 的比值能够更明显地反映出砧木中内源激素含量与树体高矮之间的关系, ABA/IAA 的比值越高, 表明树体的矮化程度越强; 反之, 则乔化程度越强^[12]。本试验在苹果上也取得了类似的结果。

表1 不同砧木和嫁接组合中 IAA 和 ABA 质量分数及其比例关系

Table 1 Content of IAA, ABA and their ratio in different rootstock and scion/rootstock combinations ng/g(鲜质量)

不同处理	新梢旺长期			封顶期			秋梢期		
	IAA	ABA	ABA/IAA	IAA	ABA	ABA/IAA	IAA	ABA	ABA/IAA
八棱海棠	83.61±1.85 a	271.17±5.82 c	3.24 c	69.14±1.98 a	345.97±12.94 d	5.00 d	73.10±1.66 a	531.24±10.37 b	7.27 b
SH40	54.56±1.78 b	840.36±4.55 a	15.40 a	50.22±3.47 b	1 053.61±86.48 a	20.98 a	61.14±0.87 b	1123.54±70.18 a	18.38 a
富士/八棱海棠	82.14±5.28 a	474.28±10.85 b	5.77 b	66.14±2.46 a	655.52±6.07 c	9.91 c	79.55±1.31 a	671.62±6.00 b	8.44 b
富士/SH40/八棱海棠	48.02±0.20 b	779.48±6.63 a	16.23 a	50.80±1.57 b	832.36±20.00 b	16.39 b	57.12±3.54 b	989.56±3.09 a	17.32 a

注:不同字母表示差异水平显著($P < 0.05$)。下同。

对砧穗组合富士/SH40/八棱海棠中间砧段 SH40 及乔化对照富士/八棱海棠基础八棱海棠的茎皮的测定结果(表 1)可以看出:矮化砧木茎皮中 ABA/IAA 的比值显著高于乔化对照茎皮中二者的比值,这与砧木自身所表现出来的趋势一致。说明无论是砧木苗本身还是嫁接组合,其茎皮中的内源激素含量与比例与树体高矮存在密切联系。有意思的是,在富士/SH40/八棱海棠嫁接组合中,虽然根部仍是乔化的八棱海棠,但因中间砧段采用矮化的 SH40,却产生了明显的矮化效果。中间砧段茎皮中 ABA 含量、ABA/IAA 比值均显著升高,这说明矮化中间砧段茎皮中的激素代谢与致矮有着十分密切的关系。

2.2 嫁接组合富士/SH40/八棱海棠各段茎皮中 IAA 含量的差异

本试验针对富士/SH40/八棱海棠这一组合中中间砧上部富士、中间砧段 SH40 和中间砧下部八棱海棠的茎皮中 IAA 含量的测定分析(图 1)发现,中间砧段 SH40 茎皮中 IAA 的含量在新梢旺长期、封顶期和秋梢期等 3 个时期均显著少于中间砧上部富士茎皮中 IAA 含量,而 SH40 茎皮中 IAA 含量和下部八棱海棠茎皮中相比无明显差异,表明 IAA 的运输在中间砧段受到阻碍。此外,基础八棱海棠茎皮中 IAA 含量在封顶期与秋梢期之间差异不显著,二者均显著高于新梢旺长期基础茎皮中 IAA 含量。

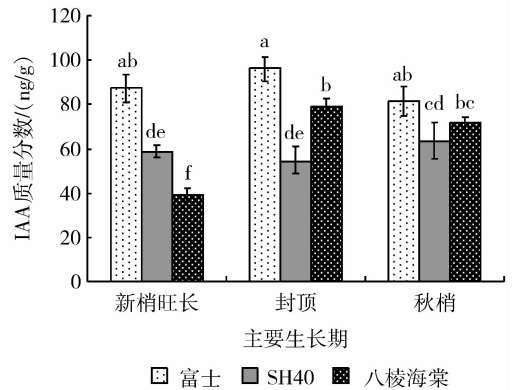


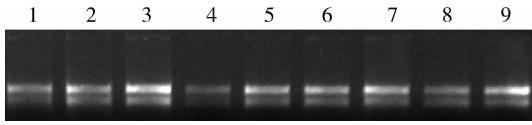
图1 富士/SH40/八棱海棠组合各段茎皮中 IAA 质量分数

Fig. 1 Content of IAA in different bark of Fuji/SH40/*Malus micromalus*

2.3 嫁接组合富士/SH40/八棱海棠各段茎皮中 IAA 转运蛋白基因 *pin1* 表达量的差异

2.3.1 总 RNA 的提取结果

选取试验材料富士/SH40/八棱海棠各段茎皮提取总 RNA,经 1.0 mg/mL 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色后,能够看到明显的 2 条带(图 2),证明所提 RNA 质量较好,无明显降解。经过微量紫外分光光度计测定,样品在 260 nm 处有最大吸收峰,浓度均在 1 000 ng/ μ L 左右,OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 均在 1.9~2.1 之间,说明提取的 RNA 纯度较高,无杂蛋白和酚类物质干扰。



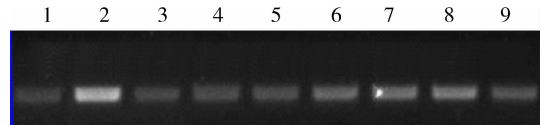
1,2 和 3 分别为新梢旺长期富士、SH40 和八棱海棠茎皮中的总 RNA；4,5 和 6 分别为封顶期富士、SH40 和八棱海棠茎皮中的总 RNA；7,8 和 9 分别为秋梢期富士、SH40 和八棱海棠茎皮中的总 RNA。

图 2 富士/SH40/八棱海棠各段茎皮总 RNA 电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis for total RNA

2.3.2 半定量 PCR 验证反转录结果

用设计的 *pin1* 正反向引物对反转录产物 cDNA 进行扩增,产物经 1.0 mg/mL 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 3 所示,得到一个 400 bp 左右的片段,与参考的拟南芥 *pin1* 基因 406 bp 大小相当,且特异性较好,说明引物和模板质量良好,可以用于后续的实时荧光定量 PCR 分析。



1,2 和 3 分别为新梢旺长期富士茎皮、SH40 茎皮和八棱海棠茎皮中的 *pin1* 基因片段;4,5 和 6 分别为封顶期富士茎皮、SH40 茎皮和八棱海棠茎皮中的 *pin1* 基因片段;7,8 和 9 分别为秋梢期富士茎皮、SH40 茎皮和八棱海棠茎皮中的 *pin1* 基因片段。

图 3 *pin1* 基因 cDNA 的半定量 PCR 验证

Fig. 3 PCR for cDNA of *pin1* gene

2.3.3 基因扩增曲线和溶解曲线

pin1 基因扩增曲线走势正常,在 18~23 个循环之间目的基因片段开始大量扩增,在 28~34 个循环扩增达到极值并开始稳定,与试验设计一致。该基因溶解曲线呈单一尖峰,表明引物特异性较好,无引物二聚体和非特异性引物。

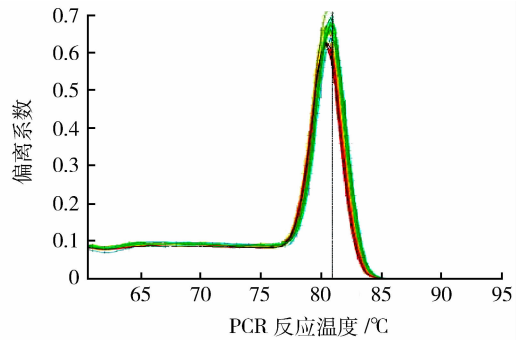
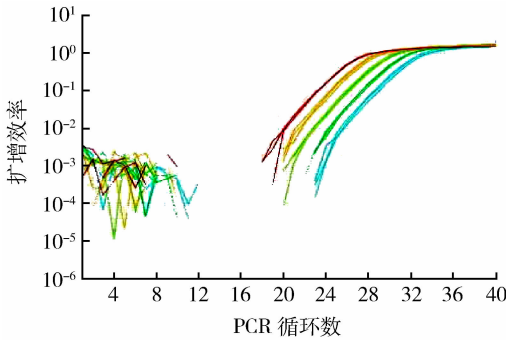


图 4 *pin1* 基因的扩增曲线及溶解曲线

Fig. 4 PCR curves and melting curves for *pin1* gene

2.3.4 SH40 中间砧各段茎皮中 *pin1* 基因表达量差异

如表 2 和图 5 所示,对富士/SH40/八棱海棠嫁接组合而言,在新梢旺长期 SH40 茎皮中 *pin1* 基因表达量约为富士茎皮中表达量的 60%,在封顶期前者为后者的 40%,在秋梢期前者约为后者的 30%。而基础八棱海棠茎皮中 *pin1* 基因表达量在新梢旺长期约为富士茎皮的 220%,在封顶期该比率约为

表 2 富士/SH40/八棱海棠各段茎皮中 *pin1* 基因丰度值

Table 2 Abundance of of *pin1* gene in different bark of Fuji/SH40/ *Malus micromalus*

主要生长期	富士	SH40	八棱海棠
新梢旺长	15.48±2.51 a	11.97±3.51 c	12.30±3.18 b
封顶	10.97±2.10 a	7.67±1.30 c	9.95±1.02 ab
秋梢	11.60±1.26 a	8.46±1.14 c	10.49±1.11 ab

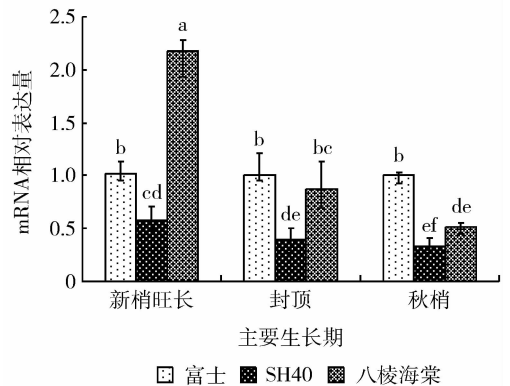


图 5 富士/SH40/八棱海棠各段茎皮中 *pin1* 基因相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *pin1* gene in different bark of Fuji/SH40/*Malus micromalus*

90%，在秋梢期反而降至富士茎皮的50%。与接穗富士茎皮相比，中间砧段SH40茎皮中*pin1*基因的表达量在各个时期均显著下调，说明中间砧SH40茎皮中生长素输出载体的含量较少。值得注意的是，基砧八棱海棠茎皮中*pin1*基因的表达量在新梢旺长期约为富士茎皮的2倍，然而在秋梢期却降至后者的1/2，表明基砧茎皮中生长素输出载体含量在不同生长时期有很大的差异，而基砧茎皮直接向根部运输地上部合成的生长素，所以这种差异很可能会导致根部的生长受到某种调控。

3 讨论

在果树生长发育过程中，激素起着十分重要的调控作用。其中，生长素被普遍认为和植物个体大小有着最为直接和密切的关系^[13-14]。本试验选取的矮化砧木SH40、乔化砧木八棱海棠及其嫁接组合富士/SH40/八棱海棠、富士/八棱海棠的研究表明：无论是实生砧木还是嫁接组合，矮化砧木SH40茎皮中IAA的含量低于乔化对照八棱海棠，运输到矮化砧木根部的IAA含量也相对较少^[15]。对富士/SH40/八棱海棠嫁接组合各嫁接段茎皮中*pin1*基因表达量的研究表明，相对于其上部富士茎皮中，SH40中间砧段中该基因表达量较小，可以推测由此编码的IAA转运蛋白载体的含量相对较少。矮化中间砧SH40致矮的机理可能是因为在其茎皮中*pin1*基因表达量下降、造成IAA运输能力下降，IAA在中间砧段茎皮中降解，导致向根部运输的总的IAA含量减少。

值得注意的是，在由新梢旺长向封顶期和秋梢期过渡的过程中，富士/SH40/八棱海棠基砧茎皮中*pin1*基因表达量与接穗富士茎皮相比呈一种下降的趋势(图2)，然而基砧茎皮中IAA的含量却是在封顶期和秋梢期显著高于新梢旺长期(图1)^[16]。该现象产生的原因为：基砧茎皮中*pin1*基因表达产生的PIN蛋白作为载体负责将IAA转运至根部，在新梢旺长期，*pin1*基因表达量最高，表明有更多的载体将基砧茎皮中的IAA向根部转运，所以此时基砧茎皮中IAA的含量反而最少；在封顶期和秋梢期，基砧茎皮中*pin1*基因表达量急剧减少，IAA转运能力减弱，所以基砧茎皮中IAA含量反而高于新梢旺长期。

从本试验结果看，除了IAA、ABA^[17-18]在SH40树体矮化中也明显起着一定的作用。至于ABA致矮的原因及其在矮化机理中的地位，还有待于进一

步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 贾鳞厚. 矮生果树及其研究[M]. 北京: 科学出版社, 1978
- [2] 王中英. 苹果矮化中间砧段对¹⁴C光合产物运转的研究[J]. 山西果树, 1986(2): 5-8
- [3] 邵开基, 牛自勉, 张忠仁, 等. 苹果砧木矮化程度与ABA含量的关系[J]. 园艺学报, 1987, 14(1): 7-11
- [4] Lockard R C, Schneider G W. Relationship between phonetics substances and dwarfing mechanism in apple dwarfing rootstocks[J]. Acta Horticulture, 1981, 120: 107-111
- [5] Gur A, Samish R W. The role of auxins and auxin destruction in the vigour effect induced by various apple rootstocks[J]. Beitrage Biol, 1968, 45: 91-111
- [6] 曹敏格, 杨海玲, 张文, 等. 苹果砧木矮化性评价指标的研究[J]. 中国农业大学学报, 2008, 13(5): 11-18
- [7] Facust M. Physiology of temperate zone fruit trees [M]. Michigan: wiley, 1989
- [8] Friml J. Auxin transport: shaping the plant[J]. Curr Opin Plant Biol, 2003, 6: 7-12
- [9] Morris D A, Friml J, Zazimaiova E. The transport of auxins [J]. Plant Hormones, 2010, 451-484
- [10] Utsuno K, Shikanai T, Yamada Y, et al. AGR, an Agravitropic locus of *Arabidopsis thaliana*, encodes a novel membrane protein family member[J]. Plant Cell Physiol, 1998, 39(10): 1111-1118
- [11] Gaiweiler L, Guan C, Muller A, et al. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue [J]. Science, 1998, 282(5397): 2226-2230
- [12] Katsuji Noda, Hitoshi Okuda, Isao Iwagaki. Indole acetic acid and abscisic acid levels in new shoots and fibrous roots of citrus scion-rootstock combinations[J]. Scientia Horticulturae, 2000, 84: 245-254
- [13] Bangerth F. Polar auxin transport as a signal in the regulation of tree and fruit development[J]. Acta Hort, 1993, 329: 70-74
- [14] Facust M, Wang S Y, Line J. The possible role of indole-3-acetic acid[J]. Amer Soc Hort Sci, 1994, 119(6): 1215-1221
- [15] Kantharaj G R, Mahadevan S, Padmanabhan G. Tubulin synthesis and auxin-induced root initiation in phaseolus[J]. Phytochemistry, 1985, (24): 23-27
- [16] Brown C S. Rootstock and scion effects on the seasonal distribution of dry weight and carbohydrates in young apple trees[J]. Amer Soc Hort Sci, 1985, 110(5): 696-710
- [17] 赵大中, 陈民, 罗先实. 不同种类柑桔幼苗生长势与叶片过氧化物酶活性、GA和ABA含量的关系[J]. 果树科学, 1998, 15(3): 267-269
- [18] Yabava U L, Dayton D F. The relation of endogenous abscisic acid to the dwarfing capability of East Mailing apple rootstocks [J]. American Soc Holt Sci, 1972, 97: 701-706