

过氧化物酶用于山楂嫁接亲和性早期鉴定研究

王 威, 彭金根, 刘 燕*, 王凤洲

(北京林业大学 园林学院, 国家花卉工程技术研究中心, 北京 100083)

摘要: 木本植物嫁接体生长多年才表现出不亲和, 为实现猩红英国山楂不同嫁接组合砧穗亲和性的早期鉴定, 研究了猩红英国山楂及其砧木过氧化物酶(POD)的同工酶谱带, 并对嫁接后各组合砧木和接穗的 POD 活性进行了动态测定。结果表明, 砧穗 POD 同工酶谱带相同值的大小可以反映嫁接亲和性的强弱。嫁接后, 砧穗 POD 活性差异小且逐渐变小的猩红英国山楂/单籽山楂组合亲和性强, 砧穗 POD 活性差异大且逐渐增大的猩红英国山楂/辽宁山楂组合亲和性差。因而认为, 砧穗的 POD 活性可以作为山楂嫁接亲和性的早期鉴定指标。

关键词: 过氧化物酶; 同工酶; 嫁接亲和性; 早期鉴定; 山楂

中图分类号: S661.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)06-0119-05

Early Detection of Graft-compatibility in *Crataegus* L. Using POD Analysis

WANG Wei, PENG Jin-gen, LIU Yan*, WANG Feng-zhou

(College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing 100083, China)

Abstract: Experiments were conducted to analyze the peroxidase isoenzymes of the ornamental hawthorn cultivar (*Crataegus laevigata* 'Paul's Scarlet') with three kinds of hawthorn rootstocks (*C. pinatifida*, *C. sanguinea*, *C. monogyna*), and to measure the POD activity of scion and rootstock bark after grafting. The results were as follows: the same count value of POD isoenzyme of scion and rootstock was related to graft-compatibility, the former was bigger and the latter was stronger. As growth of the graft union, the difference value of POD activity between rootstock and scion became smaller from Clps/Cm of which the compatibility was stonger, and from Clps/Cs, the difference value became bigger, while the compatibility was weaker. So the POD activity at graft unions could be used as a method for early detection of graft-compatibility.

Key words: POD; isoenzyme; graft-compatibility; early detection; *Crataegus* L.

在木本嫁接植株中, 不亲和嫁接体砧木和接穗间也能形成维管束, 并连接进行水分及养分的交流, 但生长多年后, 果实产量及品质会逐渐降低, 嫁接植株树势减弱直至死亡, 从而造成严重的经济损失^[1-2]。因此, 实现嫁接亲和性的早期鉴定非常必要。目前, 国外学者已在离体技术^[3-4]、组织学观察^[5]、酚类物质及同工酶检测^[6-9]等方面进行了木本植物嫁接亲和性的早期鉴定研究, 而国内这方面的研究开展的还相对较少。

猩红英国山楂 (*Crataegus laevigata* "Paul's Scarlet") 初夏开花, 花色粉红, 重瓣, 为观赏山楂品种, 已在欧洲国家广泛栽培, 主要采用当地原产的单籽山楂 (*C. monogyna*) 作为嫁接砧木进行繁殖。刘江华^[10]、丛磊^[11]开展了猩红英国山楂及单籽山楂的引种工作, 并进行了国内嫁接砧木的初步筛选, 认为山楂 (*C. pinatifida*)、辽宁山楂 (*C. sanguinea*) 作为砧木时嫁接成活率较高。但是嫁接成活率的高低并不能完全反映各嫁接组合亲和与否, 鉴于此, 以猩红英国

收稿日期: 2012-01-16

作者简介: 王 威 (1986-), 男, 河南信阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 园林植物繁殖栽培。E-mail: wangwei_cdut@126.com

* 通讯作者: 刘 燕 (1963-), 女, 湖南永州人, 教授, 博士生导师, 主要从事园林植物种质资源超低温保存研究。

E-mail: chbly@sohu.com

山楂为接穗,山楂、辽宁山楂、单子山楂为砧木,研究了 4 种山楂过氧化物酶(POD)同工酶谱带,以及嫁接后各组合砧穗 POD 活性的变化,探讨将 POD 用于猩红英国山楂嫁接亲和性早期鉴定的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

猩红英国山楂采用的是 2003 年自法国巴黎引进的嫁接植株,山楂、辽宁山楂、单子山楂采用的是 7 年生的实生苗,4 种山楂均栽培在北京市国家花卉工程技术研究中心基地。

1.2 方法

1.2.1 田间嫁接试验 田间嫁接于 2011 年 4 月 5—7 日进行,采用切腹接。砧木为山楂(Cp)、辽宁山楂(Cs)、单子山楂(Cm)的 1 年生枝条,接穗为 2010 年 12 月沙藏的猩红英国山楂(Clps)健康饱满的当年生枝条(嫁接前剪成 5 cm 的小段,带 2~3 个芽,蘸蜡处理)。每组合重复 5 次,每重复 10 个枝组。嫁接 30 d 后统计嫁接成活率。嫁接 54 d 后起,每隔半个月测量 1 次各组合接穗萌生新梢的长度与粗度,每组合随机取 5 个枝组。

1.2.2 嫁接后砧木及接穗 POD 活性的变化 嫁接 18、54、108 d 后,分别检测切腹接各组合的砧木和接穗枝皮 POD 活性,砧木和接穗取材部位分别距嫁接结合部 1 cm,并以同时期末嫁接的砧木和接穗枝条为对照。POD 活性的测定参考李合生^[12]的方法,采用日本岛津 UV-2550 紫外可见分光光度计在 470 nm 下测定,以每分钟 OD 值增加 0.01 定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.3 嫁接砧木及接穗枝条 POD 同工酶的分离 采集山楂、辽宁山楂、单子山楂、猩红英国山楂的 1 年生枝条,用冰盒带回实验室。酶液的制备参考张新中等^[13]的方法,样品提取液为 0.1 mol/L pH 值 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液,4℃下 12 000 r/min 离心 10 min。取 0.5 mL 上清液用样品提取液稀释 1 倍后加入等体积的样品处理液(5 mL 甘油,0.5 mL 1% 溴酚蓝,5 mL 0.1 mol/L pH 值 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液),混匀后置于 4℃冰箱保存备用。

POD 同工酶分离参考李强栋等^[14]的方法,采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)。分离凝胶浓度为 7.0%,0.65 mol/L pH 值为 8.8 的 Tris-HCl 缓冲液;浓缩胶浓度为 4.0%,0.125 mol/L pH 值为 6.8 的 Tris-HCl 缓冲液。电泳仪为美国 Bio-Rad 伯乐 PROTEAN II xi Cell 型,每孔上样量 80 μL,浓缩胶稳流 20 mA,分离胶稳流 35 mA。

计算酶带迁移率(Rf)和相同值(S),Rf=酶带迁

移距离/溴酚蓝迁移距离,S=相同的同工酶酶带数/相比较种类总的同工酶酶带数×100%。

1.2.4 数据分析及图表绘制 分别采用 SPSS 18.0、Origin 7.5 及 Excel 2010 软件进行。

2 结果与分析

2.1 不同组合嫁接成活率及嫁接苗生长情况

从表 1 可以看出,山楂、辽宁山楂与猩红英国山楂嫁接,成活率均在 90%以上,单子山楂与猩红英国山楂嫁接的成活率仅为 62.5%。前 2 种砧木采用切腹接,成活率与丛磊^[11]采用嫩枝切接的成活率接近;单子山楂为猩红英国山楂在欧洲地区的嫁接砧木,砧穗亲和性得到了生产实践的检验,表现出较高的亲和性,但其成活率在 3 个组合中最低。砧穗嫁接亲和性的强弱影响嫁接成活率的高低,但嫁接成活率的高低并不能完全反应嫁接亲和性的强弱。

表 1 猩红英国山楂与不同砧木切腹接的嫁接成活率

组合	不同砧木		
	山楂	辽宁山楂	单子山楂
嫁接数量	50	50	50
嫁接成活率/%	96a	92.5b	62.5c

注:数据分析采用 LSD 检验法,同行不同小写字母代表各处理的差异显著($P<0.05$)。

嫁接体接穗的生长情况见图 1 和图 2。山楂、辽宁山楂、单子山楂作为砧木,接穗芽萌发后抽生的新枝枝粗和枝长不同。其中嫁接成活率居中的山楂为砧木的组合一开始表现出较强的长势,而嫁接成活率最高的辽宁山楂组合,嫁接初期枝长和枝粗与其他 2 组没有明显不同,但后期明显表现出新枝生长势减弱、嫁接结合部因愈合不牢而折损等不亲和性的现象,这种现象可能与砧木的物候期有一定关系,山楂、辽宁山楂耐寒力强,春季萌动早;单子山楂冬末早春抽梢,春季缓苗慢,萌动晚,因此前两者为砧木的接穗生长开始早。而嫁接成活率最低的单子山楂组合,后期生长量先后超过前 2 个组合,表现出单子山楂作砧木在 3 个嫁接组合中接穗生长势最强,其接口愈合也很好,亲和性最高。结果表明,

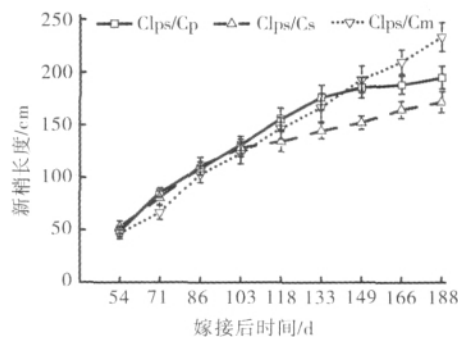


图 1 3 个嫁接组合接穗萌生新梢长度

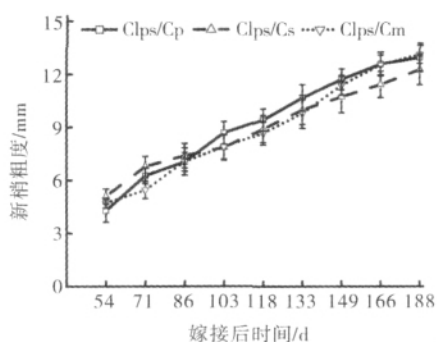


图2 3个嫁接组合接穗萌生新梢粗度

嫁接成活率单一指标并不能完全反应嫁接亲和性的强弱,后期生长情况能客观地反映嫁接亲和性强弱。

2.2 不同组合嫁接后嫁接体砧穗 POD 活性的变化

图3、4、5表明了嫁接18、54、108 d后不同嫁接组合嫁接体上的砧木与接穗及同时期未嫁接的砧木与接穗各自枝皮 POD 活性变化。未嫁接前,不同砧木及接穗本身 POD 活性明显不同,从高到低分别为辽宁山楂、山楂、单子山楂、猩红英国山楂;嫁接后,不同嫁接组合嫁接体上砧木和接穗 POD 活性变化趋势不同,山楂、辽宁山楂为砧木的组合,嫁接后嫁接体上砧木 POD 活性大幅上升,而接穗 POD 活性稍有提高,两者表现趋同,但总体差值较大;而单子山楂砧木嫁接组合中,两者 POD 活性均表现出上升,只是砧木 POD 活性上升幅度小,而接穗上升幅度大,均高于未嫁接时各自的 POD 活性,且表现

出嫁接后两者相差无异,尤其后期更为明显。结合前面嫁接成活后接穗生长情况得出,嫁接后砧木和接穗 POD 活性趋同和一致的组合,嫁接后生长状况更好,表现出亲和性更高。

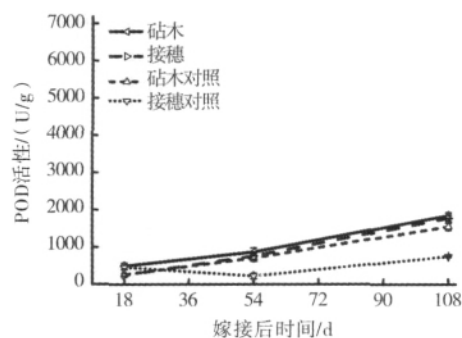


图5 嫁接后单子山楂组合砧穗 POD 活性

2.3 4种山楂枝皮 POD 同工酶酶谱

4种山楂枝皮 POD 同工酶酶谱及酶谱模式图如图6,共计14条酶带,按集中分布程度可分为A、B2个酶区,特征酶带共7条,与张育民等^[15]的研究结果一致。其中A区10条酶带,各酶带相对迁移率 Rf 在 0.433~0.731; B区4条酶带, Rf 在 0.058~0.234。

从图6可以看出,单子山楂与猩红英国山楂酶带迁移率相同值达83.3%,而山楂、辽宁山楂分别为66.7%、53.8%。单子山楂为砧木的嫁接组合是3个组合中生长势最强、接口愈合很好的一组,砧穗

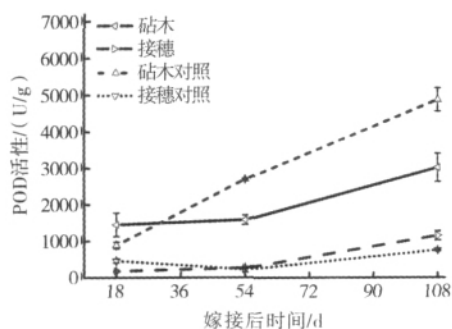


图3 嫁接后山楂组合砧穗 POD 活性

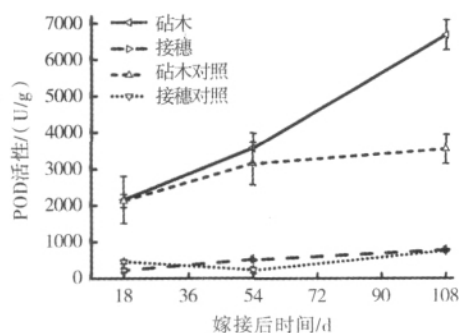
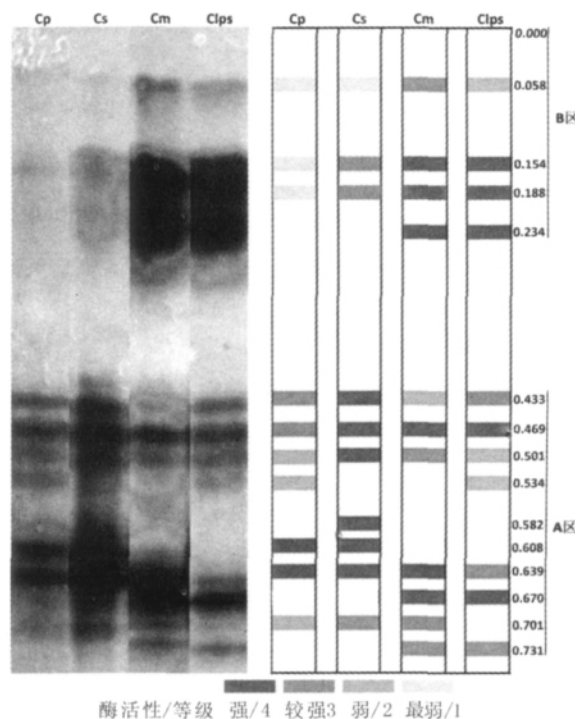


图4 嫁接后辽宁山楂组合砧穗 POD 活性



Cp. 山楂; Cs. 辽宁山楂; Cm. 单子山楂; Clps. 猩红英国山楂

图6 4种山楂枝条的 POD 同工酶酶谱及酶谱模式

亲和性最好;辽宁山楂组合新梢生长势最弱,部分接口折损,亲和性弱。可见,砧穗 POD 同工酶迁移率相同值的大小与嫁接后各组合亲和力强弱表现相印证(表 2)。

表 2 3 种砧木山楂与猩红英国山楂枝皮 POD 同工酶酶带迁移率相同值及嫁接后嫁接体生长情况

项目	山楂	辽宁山楂	单子山楂
相同值/%	66.7	53.8	83.3
新梢长/cm	195.0b	171.6c	233.4a
新梢粗/mm	12.9a	12.2a	13.1a
接口表现	愈合良好	部分折损	愈合良好

注:数据分析采用 LSD 检验法,小写英文字母代表各处理的差异显著性($P < 0.05$)。

3 结论与讨论

3.1 嫁接后砧木与接穗 POD 活性变化与嫁接亲和性的关系

作为嫁接体发育过程中的关键酶,POD 能氧化吲哚乙酸^[16],调节嫁接结合部生长素水平,维持激素含量的稳定;参与木质素合成^[17-18]。在砧木和接穗维管束桥连接的过程中,POD 活性的变化与维管组织木质化作用相关^[19],维管组织的木质化程度反映了嫁接体愈合的牢固程度,进而反映砧穗的亲合程度。

关于嫁接体发育过程中砧穗 POD 活性的变化,一些学者利用亲和的砧穗嫁接体进行了探索。Nieves 等^[20]、杨冬冬等^[21]对西瓜异砧嫁接后 15 d 内砧木与接穗 POD 活性的动态测定表明,POD 活性均呈升高趋势,但二者间的差异变化小。Olfa 等^[22]研究表明,嫁接后 5 个月亲和与非亲和的桃/李嫁接体中砧穗 POD 活性差异显著,非亲和性组合 POD 活性显著增加,并认为 POD 活性可以作为嫁接亲和性的早期鉴定指标。本研究结果与其一致,砧穗亲和性强的单子山楂组合,嫁接体愈合牢固,砧穗 POD 活性差异小并维持在较低水平;亲和性弱的辽宁山楂组合,嫁接体愈合不牢,砧穗枝皮 POD 活性差异大,且呈增大的趋势。因此,认为 POD 活性可以作为山楂嫁接亲和性的早期鉴定指标,用于筛选砧木。

3.2 砧木与接穗 POD 同工酶酶带相同值大小与嫁接亲和性的关系

砧木与接穗 POD 同工酶酶带相同值的大小反映了砧木与接穗亲缘关系的远近。Gosler^[23]、Fineschi 等^[24]的研究表明,单子山楂与英国山楂亲

缘关系较近,本研究中单子山楂与猩红英国山楂同工酶酶带相同值达 83.3%,则进一步证实了以上二者的研究。而山楂、辽宁山楂与猩红英国山楂的亲缘关系较单子山楂远,亲缘关系的近远与嫁接成活率高低并未表现出正相关,这与李晓林等^[25]、谢梦洲等^[26]在苹果属(*Malus* Mill)、绒毛皂荚(*Gleditsia vestita*)的嫁接研究中所获结果一致,但亲缘关系却反映了嫁接体的生长表现。亲缘关系近的单子山楂组合,嫁接成活率低,但嫁接体生长势强,愈合良好;亲缘关系远的辽宁山楂组合,嫁接成活率高,但在嫁接后约 3 个月表现出不亲和。因此,砧穗 POD 同工酶酶带相同值大小可以作为判断其亲和性强弱的指标,进一步证实了前人的研究结论^[7,27-29]。

参考文献:

- [1] Errea P, Felipe A. Compatibilidad de injerto en albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) [J]. Invest Agrar Ser Prod Veg, 1993, 8: 67-77.
- [2] Hartmann H T, Kester D E, Davies F T, et al. Plant propagation [C]. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ: 1997.
- [3] Errea P, Garay L, Marín J A. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using *in vitro* techniques [J]. Physiologia Plantarum, 2001, 112: 135-141.
- [4] Jonard R, Lukman D, Schall F, et al. Early testing of graft incompatibilities in apricot and lemon trees using *in vitro* techniques [J]. Scientia Horticulturae, 1990, 43 (1-2): 117-128.
- [5] Ermel F F, Kervella J, Catesson A M, et al. Localized graft incompatibility in pear/quince (*Pyrus communis* / *Cydonia oblonga*) combinations: multivariate analysis of histological data from 5-month-old grafts. [J]. Tree Physiology, 1999, 19: 645-654.
- [6] Errea P. Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species [J]. Scientia Horticulturae, 1998, 74: 195-205.
- [7] Gulen H, Arora R, Kuden A, et al. Peroxidase isozyme profiles in compatible and incompatible pear-quince graft combinations [J]. J Am Soc Hort Sci, 2002, 127 (2): 152-157.
- [8] Usenik V, Krska B, Vican M, et al. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.) using phenol analyses [J]. Scientia Horticulturae, 2006, 109(4): 332-338.
- [9] Hossein D G, Farajollah S, Hassanpour H. Identifica-

- tion of graft incompatibility of pear cultivars on quince rootstock by using isozymes banding pattern and starch [J]. Asian Journal of Plant Sciences, 2008, 7(1): 109-112.
- [10] 刘江华. 金链花和红花山楂扩繁技术和关键栽培技术研究[D]. 北京:北京林业大学, 2006.
- [11] 丛磊. 金链花与欧洲红花山楂引种及繁殖技术研究[D]. 北京:北京林业大学, 2004.
- [12] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2000.
- [13] 张新中, 纪瑛. 苦参和苦豆子的过氧化物酶同工酶谱分析和比较[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(7): 681-683.
- [14] 李强栋, 孟林, 毛培春, 等. 马蔺种质材料过氧化物酶同工酶谱特征分析[J]. 草业科学, 2011, 28(7): 1331-1338.
- [15] 张育明, 辛孝贵, 王巨. 中国山楂属植物染色体数目和同工酶的研究[J]. 中国农业科学, 1986, 19(3): 37-44.
- [16] Gazaryan I G, Lagrimini L M, Ashby G A. Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases; anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidase[J]. Biochem J, 1996, 313: 841-847.
- [17] Christensen J H, Bauw G, Welinder K G. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem[J]. Plant Physiol, 1998, 118: 125-135.
- [18] Deloire A, Hebant C. Peroxidase activity and lignification at the interface between stock and scion of compatible and incompatible grafts of *Capsicum* on *Lycoopersicum*[J]. Ann Bot, 1982, 49: 887-891.
- [19] 卢善发. 番茄/番茄嫁接体发育过程中的过氧化物酶同工酶[J]. 园艺学报, 2000, 27(5): 340-344.
- [20] Nieves F G, Micaela C, Enrique O. Graft union formation in tomato plants; peroxidase and catalase involvement[J]. Annals of Botany, 2004, 93(1): 53-60.
- [21] 杨冬冬, 黄丹枫. 西瓜嫁接体发育中木质素合成及代谢相关酶活性的变化[J]. 西北植物学报, 2006, 26(2): 290-294.
- [22] Olfa Zarrouk, Pilar S T, María Carmen Risueño, et al. Changes in cell/tissue organization and peroxidase activity as markers for early detection of graft incompatibility in peach/plum combinations[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2010, 135: 9-17.
- [23] Gosler A G. Introgressive hybridization between *Crataegus monogyna* Jacq. and *C. laevigata* (Poir.) DC. in the Upper Thames Valley, England[J]. Watsonia, 1990, 18: 49-62.
- [24] Fineschi S, Salvini D, Turchini D, et al. *Crataegus monogyna* Jacq. and *C. laevigata* (Poir.) DC. (*Rosaceae*, *Maloideae*) display low level of genetic diversity assessed by chloroplast markers[J]. Plant Systematics and Evolution, 2005, 250(3/4): 187-196.
- [25] 李晓林, 刘素君, 杨海港, 等. 苹果属植物嫁接后的表现与亲缘关系初探[J]. 四川果树, 1997(2): 5-7.
- [26] 谢梦洲, 周日宝. 珍稀濒危植物绒毛皂荚营养繁殖的研究[J]. 湖南林业科技, 1997, 24(3): 32-34.
- [27] 张玉兰, 崔瑞雪, 尹玉和. 山楂枝皮过氧化物酶同工酶及嫁接亲和力初探[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1993, 14(3): 12-18.
- [28] Frank S, Santamour J R. Graft in compatibility related to cambial peroxidase isozymes in Chinese Chestnut. [J]. J Environ Hort, 1988, 6(2): 33-39.
- [29] 肖艳, 黄建昌, 高平飞, 等. 龙眼砧穗过氧化物同工酶及嫁接亲和力初探[J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(1): 70-72.