

不同家系马尾松插穗内源生根抑制物的分离、纯化及鉴定

李永进^{1,2}, 丁贵杰¹

(1. 贵州大学 造林生态研究所, 贵州 贵阳 550025; 2. 湖南省林业科学院, 湖南 长沙 410004)

摘要: 为提高马尾松 *Pinus massoniana* 扦插繁殖生根率, 采用浸渍法、萃取法和高效液相色谱法 (HPLC) 对 5 个家系插穗内源抑制物进行分离提纯, 并用 HPLC 自动积分仪测定了内源抑制物各组分相对含量。结果表明: 每个家系插穗内源抑制物都含有 7 种组分, 它们为脱落酸类、黄酮类和苯酚类物质, 但其相对含量在 5 个家系插穗内存在显著差异 ($P = 0.0329 < 0.05$), 表明这些内源抑制物质受遗传基因的控制。由内源抑制物对白菜 *Brassica chinensis* 幼根生长的影响的方差分析结果可知, 内源抑制物有较强的抑制活性, 内源抑制物各组分对白菜幼根生长的抑制程度存在极显著差异 ($P = 0.0001 < 0.01$); 在 5 个家系之间, 插穗内内源抑制物的同一组分对白菜幼根生长的抑制程度无显著差异 ($P = 0.0881 > 0.05$)。由内源抑制物与生根率之间的相关性可知, 插穗内内源抑制物的含量与插穗生根率呈显著性负相关。另外, 对分离物和乙醚萃取残余液进行生物鉴定表明, 内源抑制物质可分为 2 类: 一类易溶于水的, 另一类易溶于乙醚等非极性溶剂。图 2 表 4 参 11

关键词: 森林培育学; 马尾松; 家系; 内源抑制物质; 插穗; 纯化; 生物鉴定

中图分类号: S722 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2010)04-0507-06

Separation, purification, and identification of endogenous inhibitory substances in *Pinus massoniana* cuttings

LI Yong-jin^{1,2}, DING Gui-jie¹

(1. The Institute of Silviculture and Ecology, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Hunan Forestry Academy, Changsha 410004, Hunan, China)

Abstract: To improve the rooting rate of *Pinus massoniana*, endogenous inhibitors from cuttings of five *P. massoniana* lines were purified and separated using extraction and high pressure liquid chromatography (HPLC). Biological assays along with analysis of variance (ANOVA) with 4 treatments of aether extracts and 3 replications with comparisons to *Brassica chinensis* seeds were employed. Results revealed seven components of endogenous inhibitors in each *P. massoniana* cutting belonging to flavones, phenols, and abscisic acid (ABA). This indicated that their expression was controlled by genes with significant differences among lines ($P = 0.0329$). By comparison, an ANOVA for the influence of endogenous inhibitors on growth of *B. chinensis* roots was highly significant ($P = 0.0001$); whereas compared to the same component of endogenous inhibitors in the root growth of *B. chinensis*, inhibition with the five *P. massoniana* lines were not significantly different. Also, except for MI₆ (No. 6 of HPLC educts), correlation analyses between the relative content of endogenous inhibitors and the rooting rate of *B. chinensis* were negative. Biological assays for extractions and their residuals extracted with ether showed two kinds of endogenous inhibitors: one that

收稿日期: 2009-08-11; 修回日期: 2009-09-14

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD24B0301); 国家科技成果转化项目(2007GB2F200286); 贵州省特助人才计划资助项目(TZJF-2007年20号)

作者简介: 李永进, 助理研究员, 硕士, 从事林木遗传育种、森林生态等研究。E-mail: youngon@126.com。通信作者: 丁贵杰, 教授, 博士生导师, 从事人工林生态系统管理及优化栽培模式、喀斯特退化生态系统恢复和重建等研究。E-mail: guijieding@yahoo.com.cn

dissolved easily in water and the other that was easily soluble in a non-polar solvent. [Ch, 2 fig. 4 tab. 11 ref.]

Key words: silviculture; *Pinus massoniana*; line; endogenous inhibitor; cutting; purification; biological assay

马尾松 *Pinus massoniana* 是中国特有的最重要的乡土工业用材林树种之一, 在森林资源发展中, 具有十分重要的地位。它具有分布广, 适应性强, 耐干旱贫瘠, 速生丰产, 用途广泛, 纤维优良和全树综合利用程度高等特点^[1]。20世纪90年代以来, 一些学者对马尾松扦插繁殖技术进行了研究^[2-6], 取得了较大突破, 对马尾松内源抑制物也有一些研究报道^[7-8], 但未见有从家系水平探讨马尾松内源抑制物的文献报道。笔者借鉴国内有关内源抑制物的研究经验^[9-11], 选取5个家系马尾松插穗进行内源抑制物的测定分析, 希冀通过对其内源抑制物质的分析来揭示不同家系马尾松插穗难生根的原因, 为提高马尾松插穗生根率, 推动无性繁殖及改良工作提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 插穗的来源

插穗采自重庆亚克公司马尾松采穗圃。以2年生的5个家系(Z₃₆₄, Z₅₀₅, Z₁₉₀, Z₂₅₈, Z₂₃₅)作为采穗母株, 选取当年生半木质化, 生长健壮, 10 cm左右的萌条作为穗条。

1.2 内源抑制物质的提取和纯化

材料的处理方法见参考文献[7], 并按图1所示流程对内源抑制物质进行分离、纯化, 制备得到5个家系插穗内源抑制物质提取液。

1.3 提取分离物的活性测定

先把提取得到的, , , 等4种乙醚提取物, 分别浓缩定容至100 mL。在培养皿中放入滤纸, 分别加入, , , 等4种乙醚提取物1.0 mL, 待乙醚完全挥发后, 加入蒸馏水10 mL·皿⁻¹, 用白菜 *Brassica chinensis* 种子进行活性鉴定, 蒸馏水做对照。在培养箱内, 28℃条件下黑暗中培养24 h。24 h后测定白菜种子发芽率, 48 h后测定幼根长度。试验重复3次。

1.4 纸层析、化学鉴定及生物鉴定

内源抑制物成分的纸层析、化学鉴定及以白菜为材料进行生物鉴定的方法均见参考文献[7]。另外, 进行纸层析时, 同时用内源抑制物提取液进行脱落酸标准品的纸层析, 用正丁醇: 乙酸乙酯: 乙醇(4: 5: 1)为溶剂, 对脱落酸标准品和提取物进行纸层析。

1.5 仪器分析

高效液相色谱仪(Agilent 1100, 美国 Agilent 公司)分析条件为490紫外检测器, Zorbax Eclipse XDB-C18柱(4.6 mm × 150.0 mm; 5 μm), 流动相为15.0 g·kg⁻¹醋酸: 甲醇 = 30: 70, 流速为1.0 mL·min⁻¹, 压力为2 000 Pa, 柱温为25℃, 检测波长为260 nm, 灵敏度0.2, 进样量均为10 μL·次⁻¹。

各类插穗内源抑制物经高效液相色谱法(HPLC)分离提纯, 得单一吸收峰的组分, 从各组分中吸取10 μL, 使各对应组分混和检查是否仍为单一吸收峰。

用紫外/可见光光度计(UT-1800, 中国北京普析通用仪器有限责任公司)检测分离物各组分200~300 nm 波长范围的紫外光谱图。

1.6 扦插试验

取上述5个家系插穗各40个, 按随机区组设计, 50个插穗·小区⁻¹, 共4个重复, 按4 cm × 5 cm的密度扦插; 3个月后调查其生根率。

1.7 数据处理

采用高效液相色谱法(HPLC)自动积分仪法, 得内源抑制物每个吸收峰面积。

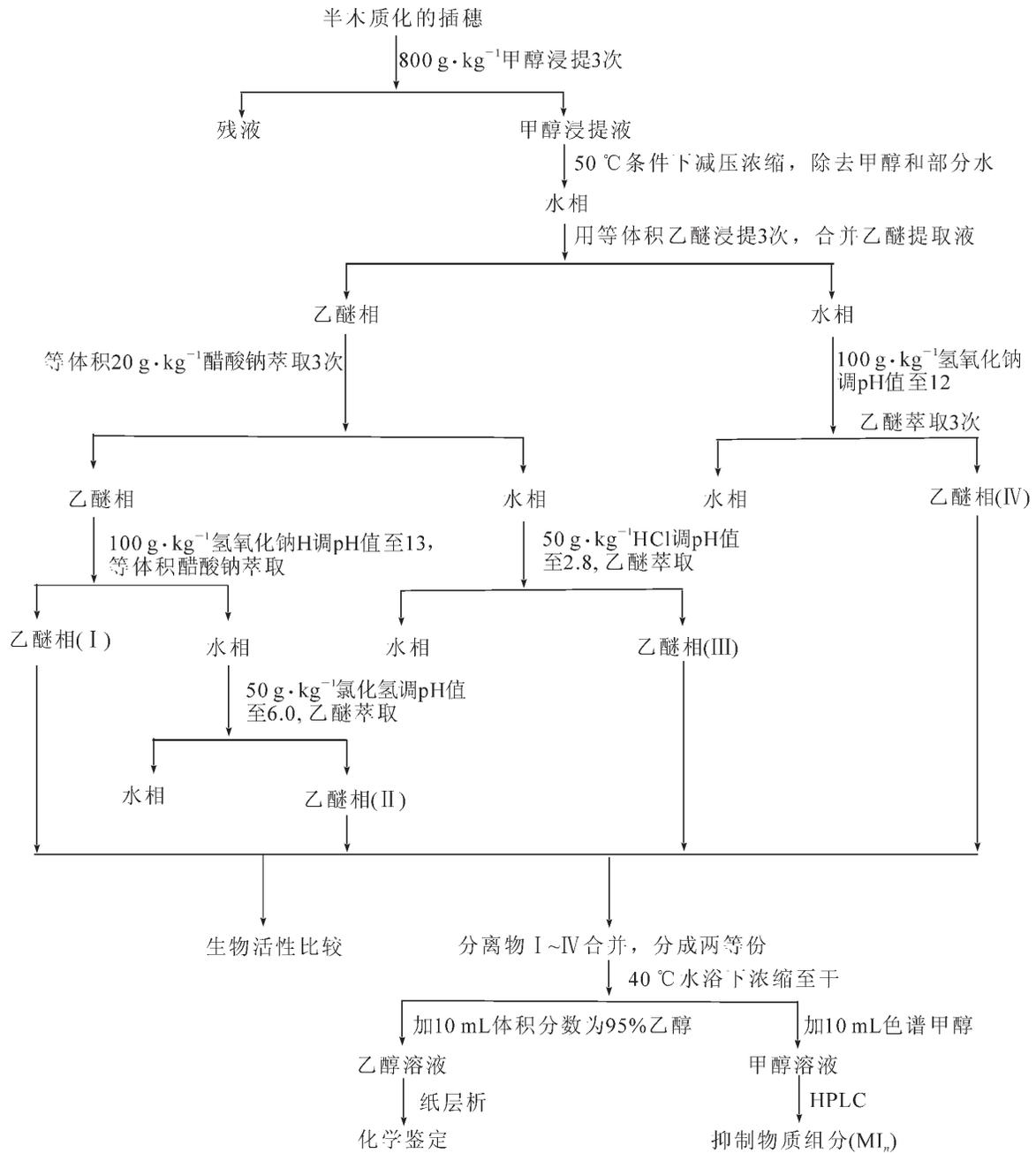


图 1 马尾松插穗内源抑制物质的分离纯化流程

Figure 1 Isolation and purification flow of endogenous inhibitor contents in *Pinus massoniana* cuttings

2 结果与分析

2.1 4 种乙醚提取分离物质的活性比较

从表 1 可以看出，5 个家系插穗中存在着活性较高的内源抑制物。提取物₁，提取物₂，提取物₃，提取物₄等 4 种乙醚提取物的抑制活性差别较大，提取物₁和提取物₂的抑制活性最强，两者对白菜幼根生长的抑制活性明显高于对白菜种子萌发的抑制活性，且提取物₁对白菜种子萌发的抑制活性最强，用其处理的白菜种子发芽率仅为对照的 14%。提取物₃和提取物₄对白菜种子萌发、幼根生长抑制作用较小。

表 1 乙醚提取分离物的抑制活性

Table 1 Inhibiting activity of the outlier adjusted with ether

提取物	白菜种子发芽率/%	白菜幼根长/%
	96	87
	98	91
	69	5
	14	5

2.2 内源抑制物提取液的纸层析与成分鉴定

内源抑制物提取液在以异丙醇:氨水:水(8:1:1)为溶剂进行纸层析后,发现内源抑制物提取液在滤纸上的移动速度(R_f)存在差异。经 $10.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 三氯化铁乙醇溶液鉴定,发现在 $R_f = 0 \sim 0.50$ 区段有 3 个分离不明显的棕褐色斑点,说明抑制物内含有苯酚类。经 $10.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 三氯化铝乙醇溶液鉴定,发现在 $R_f = 0 \sim 0.35$ 区段有 2 个分离不明显的弱荧光斑,在 $R_f = 0.35 \sim 0.50$ 区段有一个强荧光斑,表明其中有黄酮类。同时发现在紫外光下分离物层析纸上 $R_f = 0.70$ 处和脱落酸标准品 $R_f = 0.70$ 处,都有荧光出现,只是脱落酸标准品的荧光斑大;另外,脱落酸标准品和提取物在以环己烷:乙酸乙酯(7:3)为溶剂纸层析后,发现两者的 R_f 值同为 0.60,由此推断分离物中可能含有脱落酸类物质。

结果还发现,各种插穗的内源抑制物斑点位置相同,但斑点颜色的深浅有差异,表明各家系插穗的内源抑制物种类相同但含量存在差异。另外,乙醚萃取残余液纸层析分离后,进行生物鉴定表明,萃取残余液中的有些成分对白菜种子的萌发和幼根的生长也有抑制作用。由此推测,马尾松插穗中可能存在着两大类内源抑制物质:一类水溶性较强,另一类则易溶于乙醚等非极性溶剂。

2.3 内源抑制物的 HPLC 分离与鉴定

2.3.1 分离提纯和初步定性 内源抑制物经 HPLC 分离,均产生 7 个吸收峰(图 2)。这与纸层析每组分均产生 7 个斑点相吻合,进一步确证内源抑制物由 7 种成分($\text{MI}_1, \text{MI}_2, \text{MI}_3, \text{MI}_4, \text{MI}_5, \text{MI}_6$ 和 MI_7)组成。将各类插穗的内源抑制物各对应组分混合,即 MI_1 与 MI_1 相混合, MI_2 与 MI_2 相混合,……,各混合液经 HPLC 分离,发现混合物仍为单一吸收峰,进一步确证各家系马尾松插穗的内源抑制物组分完全相同,不同之处仅在于浓度上的差异。由此可以推测,内源抑制物的表达受遗传基因控制,环境因子影响其表达程度^[9]。在确证各类插穗内源抑制物相同的前提下,仅须检测其中一个家系内源抑制物的紫外光谱图。结果发现 $\text{MI}_1, \text{MI}_2, \text{MI}_3, \text{MI}_4, \text{MI}_5, \text{MI}_6$ 和 MI_7 分别在 228, 215, 253, 262, 274, 286 和 234 nm 有最大吸收峰。据内源抑制物 7 组分的纸层析 R_f 值及苯酚类和黄酮类的紫外吸收峰波长,进一步确证了 MI_1, MI_2 和 MI_7 为苯酚类, MI_3, MI_5 和 MI_6 为黄酮类,而 MI_4 为脱落酸类。

2.3.2 内源抑制物组分相对含量比较 由图 2 可以看出,5 种家系插穗的内源抑制物对应组分吸收峰的高度存在着差异。根据 HPLC 自动积分仪所得峰面积,计算各对应组分相对含量相对比较值(表 2)。从表 2 中可以看出,5 个家系的内源抑制物各组分总相对含量,以 Z_{364} 为最高, Z_{235} 为最低;不同家系间,插穗内源抑制物各组分相对含量差异较大,其中以 MI_4 相差最悬殊, Z_{364} 插穗的 MI_4 相对含量值

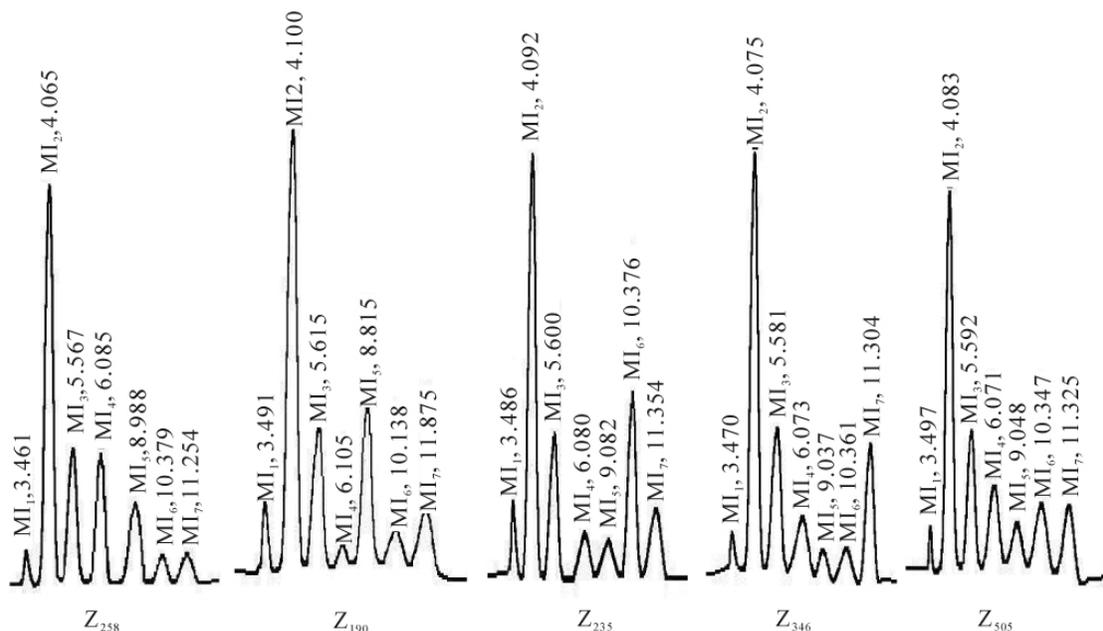


图 2 不同家系母株插穗内源抑制物的 HPLC 图谱

Figure 2 HPLC figures of endogenous inhibitor in cuttings from five *Pinus massoniana* lines

表 2 不同家系马尾松母株插穗内源抑制物质对应组分相对含量比较

Table 2 Comparison of the relative content of endogenous inhibitor in cuttings from five *Pinus massoniana* lines

家系	内源抑制物相对含量/%						
	MI ₁	MI ₂	MI ₃	MI ₄	MI ₅	MI ₆	MI ₇
Z ₃₆₄	27.64	37.12	37.24	57.79	29.16	18.42	14.83
Z ₅₀₅	21.81	15.82	14.96	7.76	33.91	16.47	10.81
Z ₁₉₀	18.34	14.37	14.70	11.81	13.16	38.24	17.54
Z ₂₅₈	21.75	24.98	24.72	10.54	11.84	11.78	44.34
Z ₂₃₅	10.46	7.71	8.38	12.10	11.93	15.09	12.48

为最高, 达 57.79%, 而 Z₅₀₅ 插穗的 MI₄ 相对含量较低, 仅为 7.79%。对内源抑制物各组分在 5 个家系间的含量进行方差分析表明, 内源抑制物各组分在 5 个家系插穗中的相对含量存在显著差异 ($P = 0.0329 < 0.05$)。

2.3.3 内源抑制物的生物鉴定 用白菜种子萌发和幼根的生长对内源抑制物提取液进行生物鉴定。结果表明 (表 3): MI₃, MI₄, MI₆, MI₅, MI₇ 共 5 种组分的抑制程度较大, 其中 MI₆ 和 MI₇ 抑制程度最大, 而 Z₃₆₄ 各个组分整体抑制程度都大于其他家系, 说明内源抑制物在一定程度上抑制了白菜种子的萌发和幼根的生长。对 5 个家系插穗内的内源抑制物各组分对白菜幼根生长的影响进行方差分析表明, 内源抑制物各组分对白菜幼根生长的影响存在极显著差异 ($P = 0.0001 < 0.01$), 而在 5 个家系之间, 插穗内内源抑制物的同一组分对白菜幼根生长的影响无显著性差异 ($P = 0.0881 > 0.05$)。

2.3.4 扦插成活率的验证 据 5 个马尾松插穗扦插生根率调查结果发现, 在 5 个马尾松家系之间, 其扦插生根率存在较大差异, 5 个家系的生根率分别为 49.5%, 74.5%, 70.0%, 53.0% 和 84.5%; 对其生根率与内源抑制物各组分相对含量进行相关性分析表明 (表 4), 马尾松扦插成活率与 MI₂ 和 MI₃ 呈极显著负相关, 与内源抑制物总量、MI₁ 呈显著负相关, 与 MI₄, MI₅ 和 MI₇ 存在负相关, 与 MI₆ 存

表 3 内源抑制物各组分对白菜幼根生长的影响

Table 3 Influence of endogenous inhibitor in cutting on the *Brassica chinensis* radical

家系	内源抑制物各组分对白菜幼根生长的影响/%						
	MI ₁	MI ₂	MI ₃	MI ₄	MI ₅	MI ₆	MI ₇
Z364	86.5	78.2	71.3	52.4	87.3	74.1	71.4
Z505	90.2	93.4	85.1	70.2	80.9	75.6	80.4
Z190	93.8	92.7	84.9	82.8	74.5	63.4	70.3
Z258	90.4	88.2	77.6	80.7	87.8	73.9	67.4
Z235	98.3	98.6	93.3	79.5	82.0	69.4	74.6

在正相关, 但相关性并不明显。因此, 阻遏内源抑制物基因表达或采取其他措施降低内源抑制物含量, 将是提高马尾松扦插成活率的一个关键措施。

3 结论

马尾松插穗生根率低的内部因素之一是插穗中存在活性较高的 7

表 4 5 个家系插穗生根率与内源抑制物各组分相对含量间的相关性分析

Table 4 Correlation between the relative content of endogenous inhibitor and the rooting rate of 5 *Pinus massoniana* lines

项目	生根率	Sig. (1-tailed)	项目	生根率	Sig. (1-tailed)
MI ₁	-0.852*	0.033	MI ₅	-0.164	0.396
MI ₂	-0.942**	0.008	MI ₆	0.137	0.413
MI ₃	-0.939**	0.009	MI ₇	-0.561	0.163
MI ₄	-0.626	0.129	内源抑制物总量	-0.909*	0.016

种内源抑制物质, 它们为黄酮类、苯酚类和脱落酸类物质; MI₁, MI₂ 和 MI₇ 为苯酚类, MI₃, MI₅ 和 MI₆ 为黄酮类, 而 MI₄ 为脱落酸类。季孔庶等^[7-8]研究发现, 内源抑制物属黄酮类和苯酚类, 而没发现脱落酸类, 笔者再次进行本研究的重复实验, 仍检测出脱落酸类的存在, 这种差异可能由于提取路线、采穗季节的不同造成的, 这方面原因需要进一步探讨。

5 个家系插穗内源抑制物质对应组分的相同性, 表明其插穗内源抑制物质受遗传基因的控制。内源抑制物各组分在 5 个家系插穗内的相对含量存在显著差异, 且内源抑制物各组分对白菜幼根生长的抑制程度存在极显著差异; 在 5 个家系之间, 插穗内内源抑制物的同一组分对白菜幼根生长的抑制程度无显著差异。对内源抑制物对各组分相对含量与生根率之间的相关性分析可知, 除 MI₆ 外, 马尾松插穗内的内源抑制物各组分与扦插生根率均呈负相关。另外, 对分离物和乙醚萃取残余液进行生物鉴定表明, 内源抑制物质大致可分为 2 类: 一类易溶于水的, 另一类易溶于乙醚等非极性溶剂。

参考文献:

- [1] 丁贵杰, 周志春, 王章荣, 等. 马尾松纸浆用材林培育与利用[M]. 北京: 中国林业出版社, 2006.
- [2] 秦国锋. 马尾松嫩枝扦插繁殖[J]. 林业科学研究, 1994, 7 (1): 96 - 103.
QIN Guofeng. Softwood cutting of *Pinus massoniana* [J]. *For Res*, 1994, 7 (1): 96 - 103.
- [3] 余能健, 游为贵, 陈明武, 等. 马尾松扦插繁殖技术的研究[J]. 福建林学院学报, 1992, 12 (1): 19 - 25.
YU Nengjian, YOU Weigui, CHEN Mingwu, et al. Study of cutting propagation techniques for *Pinus massoniana* [J]. *Fujian Coll For*, 1992, 12 (1): 19 - 25.
- [4] 季孔庶, 王章荣, 陈天华, 等. 马尾松扦插繁殖年龄效应及继代扦插后复壮效果[J]. 浙江林学院学报, 1999, 16 (4): 341 - 345.
JI Kongshu, WANG Zhangrong, CHEN Tianhua, et al. Cyclophysis and effect of rejuvenation with continued cuttage in *Pinus massoniana* cutting propagation [J]. *J Zhejiang For Coll*, 1999, 16 (4): 341 - 345.
- [5] 季孔庶, 王章荣, 陈天华, 等. 几种生长调节剂对马尾松插穗促根的效应[J]. 福建林学院学报, 2001, 21 (2): 120 - 123.
JI Kongshu, WANG Zhangrong, CHEN Tianhua, et al. Effects of root-inducing regulators in rooting of cutting from *Pinus massoniana* Lamb.[J]. *J Fujian Coll For*, 2001, 21 (2): 120 - 123.
- [6] 季孔庶, 王章荣, 陈天华, 等. 马尾松插穗生根能力变异的研究[J]. 南京林业大学学报, 1998, 22 (3): 66 - 70.
JI Kongshu, WANG Zhangrong, CHEN Tianhua, et al. A study on rooting ability variation of *Pinus massoniana* Lamb. cuttings [J]. *J Nanjing For Univ*, 1998, 22 (3): 66 - 70.
- [7] 季孔庶, 王章荣, 陈天华, 等. 马尾松插穗内源抑制物质的研究[J]. 林业科学, 1997, 33 (2): 142 - 151.
JI Kongshu, WANG Zhangrong, CHEN Tianhua, et al. Study on the endogenous inhibitors in masson pine cuttings [J]. *Sci Silv Sin*, 1997, 33 (2): 142 - 150.
- [8] 季孔庶, 王章荣, 陈天华, 等. 马尾松种源与内源生根抑制物的相关性[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2002, 26 (2): 24 - 28.
JI Kongshu, WANG Zhangrong, CHEN Tianhua, et al. A study on variation of the endogenous inhibitors in *Pinus massoniana* cuttings [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2002, 26 (2): 24 - 28.
- [9] 赵敏, 王炎, 张伟. 北五味种子内源抑制物质活性的消长规律[J]. 东北林业大学学报, 1999, 27 (3): 44 - 47.
ZHAO Min, WANG Yan, ZHANG Wei. The changes of activity for the inner inhibitory substances in *Schisandra chinensis* (Trucz.) Baill seeds [J]. *J Northeast For Univ*, 1999, 27 (3): 44 - 47.
- [10] 赵敏. 防风种子中内源抑制物质活性的研究[J]. 中草药, 2004, 35 (4): 441 - 444.
ZHAO Min. Studies on intrinsic activity in seed of dried root of *Saposhnikovia divaricata* [J]. *Chin Tradit Herbal Durg*, 2004, 35 (4): 441 - 444.
- [11] 贾彩霞, 翟梅枝, 宋艳枝. 核桃壳内源抑制物质活性的初步研究[J]. 西北林学院学报, 2006, 21 (3): 98 - 100.
JIA Caixia, ZHAI Meizhi, SONG Yanzhi. A preliminary study on the intrinsic inhibitor activities from walnut endocarp [J]. *J Northwest For Univ*, 2006, 21 (3): 98 - 100.