

## 研究报告 Original Papers

## 柑橘体细胞杂种砧木对脐橙幼树生长及根和叶中抗氧化酶系活性的影响

周开兵<sup>1,\*</sup> 郭文武<sup>2</sup> 夏仁学<sup>1,\*\*</sup> 黄仁华<sup>1</sup> 胡利明<sup>1</sup>华中农业大学<sup>1</sup>柑橘研究所, <sup>2</sup>作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 以体细胞杂种红橘+枳、红橘+粗柠檬和有性杂种 Troyer 枳橙、Swingle 枳柚作砧木的脐橙二年生嫁接苗为试材, 于盆栽条件下研究砧木对苗木生长及根和叶中抗氧化酶系活性影响的结果表明, 红橘+枳的生长势和花量明显强于和大于其它砧木, 红橘+粗柠檬的生长和花量表现介于两种有性杂种之间; 砧木不影响叶片中可溶性蛋白含量和超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性年动态变化特征。4、6、8月, 叶中 POD 活性高低分别与各次新梢生长量和树冠体积(8月)大小呈负相关; 12月, 根系与叶片的 SOD 和 POD 活性分别呈正相关, 根系可溶性蛋白含量和根系 CAT 活性呈正相关。

**关键词** 柑橘砧木; 生长; 超氧化物歧化酶; 过氧化物酶; 过氧化氢酶

## Effects of Somatic Hybrids Rootstocks on the Growth of Young Tree and the Activities of Anti-oxidant Enzymes in Leaves and Roots of Navel Orange (*Citrus sinensis*)

ZHOU Kai-Bing<sup>1,\*</sup>, GUO Wen-Wu<sup>2</sup>, XIA Ren-Xue<sup>1,\*\*</sup>, HUANG Ren-Hua<sup>1</sup>, HU Li-Ming<sup>1</sup><sup>1</sup>Citrus Research Institute, <sup>2</sup>National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070

**Abstract** It was conducted with navel orange two-year-old young tree whose rootstocks were Red tangerine+Trifoliolate, Red tangerine+Rough lemon somatic hybrids and Troyer Citrange, Swingle Citrumelo sexual hybrids. The effects of various rootstocks on the tree growth and the activities of antioxidant enzymes were studied through potted experiment. The results showed that the growth and the number of the flowers of Red tangerine+Trifoliolate were more vigorous and larger than the other three, respectively, and Red tangerine+Rough lemon performed between the two varieties of sexual hybrids. Various rootstocks did not influence the general characters of the annual changes in the content of soluble protein and the activities of CAT, SOD and POD in leaves. In April, June and August, the activities of POD in leaves were negatively correlated with shoot length in Spring, Summer and Autumn and canopy volume. In December, the activities of the POD and SOD in roots were respectively positively correlated with that in leaves. In root, the CAT activity was positively correlated with the content of soluble protein.

**Key words** rootstock for citrus; growth; SOD; POD; CAT

我国长期以来以枳为柑橘的主导砧木, 而枳有后期不亲和、抗旱性差、不耐瘠、易感裂皮病和根腐病等弱点, 已成为生产中突出问题, 制约着柑橘增产和品质的改善。因此, 培育、选择和应用优良的新型砧木势在必行, 体细胞融合和有性杂交可能是有效的途径。美国已大量应用枳橙、枳柚等有性杂种<sup>[1,2]</sup>, 试验和开始推广体细胞杂种砧木<sup>[3]</sup>, 形势喜人。因此, 柑橘砧木的选育和利用研究成了我国柑橘砧木研究的重要任务之一。

### 材料与方 法

试材共 4 种砧木, 分别为体细胞杂种红橘+枳(*Citrus tangerina*+*Poncirus trifoliata*)<sup>[4]</sup>和红橘+粗柠檬(*Citrus tangerina*+*Citrus jambhiri*)、有性杂

收稿 2004-01-13 修定 2004-05-24

资助 科技部移民科技专项(S200216)。

\* E-mail: kaibingzhou0528@163.com

\*\* 通讯作者(E-mail: renxuexia@mail.hzau.edu.cn, Tel:027-87284181)。

种Troyer枳橙(*Citrus sinensis*×*Poncirus trifoliata*)和Swingle枳柚(*Citrus grandis*×*Poncirus trifoliata*)。前2种体细胞杂种为自根砧,后2种有性杂种为实生砧。2种体细胞杂种由我校作物遗传改良国家重点实验室提供(体细胞杂种红橘+粗柠檬尚未公开),于1999年春季将试管自根苗移栽于温室,进行营养钵育苗;2种有性杂种种子于2000年春引自美国佛罗里达州,并立即播种于营养钵。所有苗木于2000年11月在温室中嫁接耐湿脐橙(*Citrus sinensis*,暂定名,待审定品种)进行育苗。2001年3月中旬选生长一致、无任何不良表现的苗木上盆定植,每盆定植1株。试验用容积为7 L的陶盆。盆土为人工调配的营养土,腐熟粪肥土、菜园土、砂土各占1/3,有机质含量为4.56%,pH为6.17。定植后移入培养网室,培养网室在6~8月覆盖遮阳网,全年避雨。冬季经抗寒锻炼后,于每年1月上旬移入温室越冬。其它管理采用常规盆栽措施。比较4种砧木在生长和生化指标上的差异。单株小区,4次重复,随机区组排列。在2002年4、6、8、10、12月的15日和2003年2月15日分别取叶样,7月前叶片取自上一年春梢中部,7月及其后取自当年生春梢中部。根样于2002年12月15日挖取,选粗度2 mm以下细根。所有样品洗净后,液氮速冻,在-40℃超低温冰箱中保存备用。

在适宜物候期测定生长指标,穗、砧粗分别为嫁接口上和下5 cm处粗度。2003年4月盛花期调查花量。可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝G-250法<sup>[5]</sup>、过氧化物酶(peroxidase, POD)活性采用愈创木酚法<sup>[5]</sup>,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性采用氮蓝四唑法<sup>[5]</sup>,过氧化氢酶(catalase, CAT)活性采用高锰酸钾滴定法<sup>[5]</sup>。

采用SAS软件ANOVA过程作各时期不同砧木间和各砧木不同时期差异显著性测验,采用LSD法作多重比较分析,采用SAS软件CORR过程作一元线性相关性分析。

## 实验结果

### 1 生长和花量

不同砧木对树体各项生长指标和花量都有明显影响(表1)。从总体上说,红橘+粗柠檬、红橘+枳和Swingle枳柚新梢生长量都较大,后二者树冠体积最大,Troyer枳橙生长最弱。红橘+枳的花量极显著地高于另3种砧木,Swingle枳柚的花量极显著地高于其余2种砧木,Troyer枳橙花量最小。说明红橘+枳有利于幼树生长和提早成花,红橘+粗柠檬使幼树新梢生长较强,花量与Troyer枳橙差异不显著。

表1 砧木对树体生长和花量的影响

Table 1 Effects of rootstocks on the growth and blossom of trees

砧木	树高/cm	冠幅/cm	树冠体积/m <sup>3</sup>	穗粗/cm	砧粗/cm	新梢生长量/cm			花量/朵
						春梢	夏梢	秋梢	
Troyer 枳橙	51.70b	36.58b	0.018c	0.93ab	1.18b	6.71ab	7.78b	6.25b	7.5C
Swingle枳柚	55.13ab	46.96a	0.032a	0.81b	1.41ab	7.92ab	12.91a	9.38a	35.8B
红橘+枳	66.30a	43.24a	0.032a	0.87b	1.56a	9.09a	8.94b	8.11ab	58.0A
红橘+粗柠檬	55.75ab	40.31ab	0.024b	1.03a	1.44ab	5.64b	15.38a	8.07ab	17.0C

表中树冠体积按圆锥形树冠计算。数字后的不同字母表示差异显著,小写字母表示 $P \leq 0.05$ ,大写字母表示 $P \leq 0.01$ 。表2同此。

## 2 叶片生化指标

**2.1 可溶性蛋白含量** 红橘+枳在4~6月有一个明显下降过程,其它3种砧木则为上升过程(图1)。除此差异外,6月以后不同砧木叶片中可溶性蛋白含量的年变化动态曲线具有相同的线形,并且在年周期内,年动态变化总体上为上升趋势,表明不同砧木基本上不改变叶片中可溶性蛋白含量年

动态变化特征。

在不同时期里,砧木显著或极显著地影响叶片中可溶性蛋白含量的高低,且在不同时期,不同砧木间叶片中可溶性蛋白含量的相对高低次序不同。

**2.2 过氧化物酶活性** 不同砧木对叶片中POD活性年动态变化特征无明显的影响(图2)。POD活性年

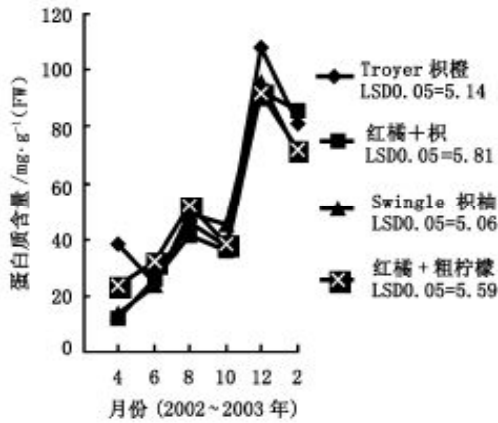


图1 砧木对脐橙叶片中可溶性蛋白含量的影响  
Fig.1 Influence of rootstocks on the content of soluble protein in leaves of navel orange

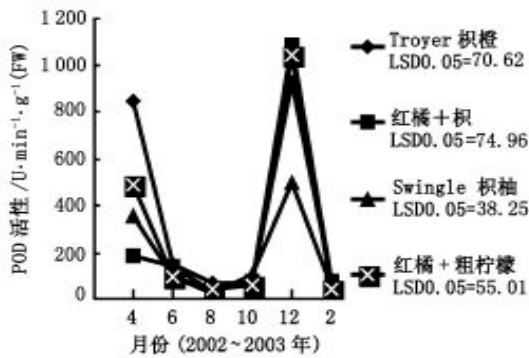


图2 砧木对脐橙叶片中POD活性的影响  
Fig.2 Influence of rootstocks on the activities of POD in leaves of navel orange

动态变化曲线为双峰曲线, 在4月有一个小高峰, 在12月有一个大高峰。在各不同时期里, 不同砧木对叶片中POD活性高低具有显著或极显著的影响, 且不同时期, 不同砧木叶片中POD活性的相对高低次序不同。在12月, 2种体细胞杂种叶片中POD活性极显著地高于2种有性杂种。

在4、6和8月不同砧木叶片中POD活性分别与不同砧木的春梢、夏梢和秋梢生长量呈显著负相关(相关系数分别为:  $r=-0.9636^*$ 、 $r=-0.9604^*$ 、 $r=-0.9757^*$ 。\*表示  $P \leq 0.05$ , 下同); 8月不同砧木叶片中POD活性还与不同砧木树体的树冠体积呈显著负相关( $r=-0.9565^*$ )。表明在生长期, 叶片中POD活性与树体生长势呈负相关, 说明砧木通过影响叶片中POD活性而影响树体生长。

**2.3 超氧化物歧化酶** 不同砧木对叶片中SOD活性年动态变化特征没有明显的影响(图3)。4种砧木

的叶片中SOD活性年动态变化曲线都为单峰曲线, 并都在8月出现高峰; 在10~12月都有一个酶活性上升过程; 各砧木在12月的酶活性和其在次年2月的酶活性无显著差异。在不同时期里, 不同砧木对叶片中SOD活性高低具有显著或极显著的影响, 并且在不同时期, 不同砧木叶片中SOD活性的相对高低次序不同; 在年周期内, 红橘+粗柠檬的SOD活性维持较高水平; 在12月, 2种体细胞杂种叶片中SOD活性与活性最高的Swingle枳柚无显著差异, 维持较高活性。

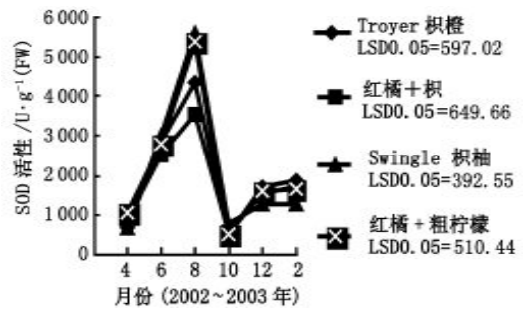


图3 砧木对脐橙叶片中SOD活性的影响  
Fig.3 Influence of rootstocks on the activities of SOD in leaves of navel orange

**2.4 过氧化氢酶活性** 不同砧木对叶片中CAT活性的年变化动态曲线的线形无明显影响, 表明不同砧木基本上不改变叶片中CAT活性年动态变化特征(图4)。动态曲线的基本特征都为“L”形, 4~6月有一个急剧下降过程; 此后动态变化曲线平缓, 各砧木活性无显著变化。在各不同时期里, 砧木对叶片中CAT活性的高低有显著或极显著的影响, 并在不同的时期里, 不同砧木间叶片

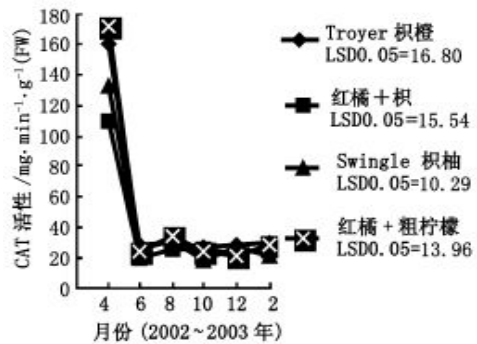


图4 砧木对脐橙叶片中CAT活性的影响  
Fig.4 Influence of rootstocks on the activities of CAT in leaves of navel orange

中CAT活性的相对高低次序不同。在12月, 2种体细胞杂种的CAT活性极显著低于2种有性杂种。

### 3 根系生化指标

12月测定不同砧木根系的生化指标表现出明显的差异(表2)。红橘+粗柠檬的可溶性蛋白含量极显著低于Troyer枳橙, 极显著高于红橘+枳, 与Swingle枳柚差异不显著。红橘+粗柠檬的SOD活性与Troyer枳橙、红橘+枳无显著差异, 而显

著地高于Swingle枳柚。2种体细胞杂种的POD活性极显著地高于2种有性杂种。CAT活性以Troyer枳橙最高, 红橘+粗柠檬次之, 另2种最低。统计分析表明砧木根系的可溶性蛋白含量与其CAT活性呈显著正相关( $r=0.9798^*$ ), 说明根系CAT有可能是根系可溶性蛋白的主要组分之一。

将12月叶片生化指标与对应砧木根系生化指标作线性相关性分析的结果表明, 可溶性蛋白含

表2 不同砧木根系的12月份生化指标

Table 2 Biochemist indexes in root of different rootstock in December

砧木	可溶性蛋白/mg·g <sup>-1</sup> (FW)	SOD /U·g <sup>-1</sup> (FW)	POD /U·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> (FW)	CAT /mg·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> (FW)
Troyer 枳橙	128.31A	2 630.2a	284.02C	23.48A
Swingle枳柚	63.42BC	1 578.4c	231.98C	11.86C
红橘+枳	50.20C	1 947.2bc	452.82A	11.07C
红橘+粗柠檬	80.39B	2 209.8ab	360.47B	17.42B

量和CAT活性之间无线性相关性, 而砧木根系与接穗叶片的SOD与POD活性之间呈显著正相关(分别为 $r=0.9645^*$ 和 $r=0.9575^*$ )。由于12月的SOD和POD与抗寒性有关, 这反映出砧木的抗寒性强弱与接穗抗寒性强弱具有正相关关系。

## 讨 论

根据本文结果, 得到如下两方面的认识:

### 1 体细胞杂种新资源用作砧木的初步评价

红橘+枳的生长势比其它3种砧木都强, 而且其花量最大, 因此, 可以初步认为, 红橘+枳是一个很有希望的优良砧木资源。本文结果表明, 红橘+粗柠檬的生长势介于2种有性杂种之间; 花量显著低于Swingle枳柚, 而与Troyer枳橙差异不显著。表明红橘+粗柠檬使耐湿脐橙幼树在生长和成花上的表现介于2种有性杂种之间。又由于已经证实在田间Troyer枳橙和Swingle枳柚是优良的砧木, 并在美国已普遍应用<sup>[1,2]</sup>。这说明红橘+粗柠檬也是一种很有希望成为优良砧木的新资源。

SOD、POD和CAT是植物交叉适应的关键酶<sup>[6]</sup>, 根系和叶片中酶活性高低应与树体抗逆性强弱正相关<sup>[7,8]</sup>。在12月, 根系和叶片中抗氧化酶系活性高低应与树体抗寒性强弱呈正相关。2种体细胞杂种使树体叶片和根系的3种酶活性高低

的综合表现介于2种有性杂种之间, 即2种体细胞杂种砧木使幼树的抗寒性可能介于2种有性杂种砧木之间。这也证明2种体细胞杂种可能是优良的新型砧木资源。

### 2 不同砧木叶、根抗氧化酶系活性的关系

前人研究过叶片中POD活性与砧木矮化特性和树体生长的关系<sup>[9~15]</sup>, 但绝大多数是在田间条件下进行的, 且取叶样局限于秋季, 并未深入到POD活性的季节性变化。这些研究大致分两种, 一是认为POD活性高低与树体生长强弱呈正相关<sup>[9,10]</sup>, 另一种看法则相反<sup>[11~15]</sup>, 因而尚无定论。植物体中POD分为两类, 即结构型和诱导型, 且以诱导型为主, 结构型主要调节植物体生长与发育<sup>[6]</sup>。由于田间试验易遭遇逆境, 因而可能会有大量的诱导型POD形成, 误差来源广, 这可能是前人试验结果出现对立的原因。本文用盆栽试验, 精细管理, 未遭遇逆境, 可能无诱导型POD形成; 跟踪新梢抽生的高峰, 及时采样分析叶片中POD活性高低与新梢生长量大小的相关性得到了叶片中POD活性与新梢生长量呈负相关的直接证据, 而8月(秋季)的叶片中POD活性与树冠体积呈负相关, 与前人的后一种结果<sup>[11~15]</sup>一致。表明不同砧木是通过影响叶片中POD活性而影响树体生长的。高POD活性抑制树体生长的生理原因可能是POD降解生长素, 生长素浓度降低后生长

受抑制所致<sup>[16]</sup>, 而 POD 则促进细胞壁中木质素的形成和积累, 因此限制了细胞壁的膨胀而抑制细胞生长<sup>[17]</sup>。

在休眠期, 根系和叶片的 SOD 和 POD 活性呈正相关, 这反映了砧木影响接穗抗性的方式, 说明可以通过改善砧木的抗性来改善品种的某些抗性。根系和叶片中可溶性蛋白含量和 CAT 活性无线性相关, 说明接穗的这 2 种指标相对不易受砧木影响, 同时也说明砧木对接穗抗性、生长和发育的影响可能是通过深刻影响接穗 SOD 和 POD 活性而进行的。

### 参考文献

- Rom RC, Carlson RF. Rootstocks for Fruit Crops. New York: A Wiley-Interscience Pub, 1987. 374~378
- Castle WS, Tucker DPH, Krezdorn AH et al. Rootstocks for Florida Citrus. Institute of Food and Agricultural Sciences/University of Florida, 1989, (2):17~19
- 郭文武, 邓秀新. 原生质体融合与果树遗传改良. 果树科学, 1996, 13(1):49~55
- Guo WW, Cheng YJ, Deng XX. Regeneration and molecular characterization of intergeneric somatic hybrids between *Citrus reticulata* and *Poncirus trifoliata*. Plant Cell Rep, 2000, 20:829~834
- 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 中国高等教育出版社, 2000. 119~185
- 田国忠, 李怀方, 裘维蕃. 植物过氧化物酶研究进展. 武汉植物学研究, 2001, 19(4):332~344
- Bolwell GP, Wojtaszek D. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence—abroad perspective. Physiol Mol Plant Pathol, 1997, 51:347~366
- Lewis N, Yamamoto E. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1990, 41: 455~496
- 吕斌, 陈学年, 李质怡等. 不同砧木先锋橙叶片 POD 活性与树体生长势的关系. 西南农业学报, 1999, 12(2): 63~67
- 李文斌, 张映南, 刘庚峰等. 柑橘矮化砧及半矮化砧过氧化物酶同工酶及活性的比较. 园艺学报, 1989, 16(4): 261~265
- 胡国谦, 张谷雄, 周中建等. 利用叶片过氧化物酶同工酶鉴定柑橘砧木资源矮化性能. 热带作物科技, 1992, (1): 15~17
- 赵大中, 陈民, 罗先实. 柑橘矮化砧木的生理生化预选指标的研究. 西北植物学报, 1997, 17(1):28~33
- 胡国谦, 张谷雄, 周中建等. 柑橘砧木矮化性与叶片过氧化物酶同工酶特性的关系. 南京农业大学学报, 1993, 16(1): 123~126
- 聂华堂, 钟广炎, 陈竹生. 叶片过氧化物酶活性作为柑橘短枝型品系预选指标初探. 果树科学, 1991, 8(1):46~48
- 赵大中, 陈民, 罗先实. 不同种类柑橘幼苗生长势与叶片过氧化物酶活性、GA<sub>5</sub> 和 ABA 含量的关系. 果树科学, 1998, 15(3):267~269
- Lee TT. Role of phenolic inhibitors in peroxidase mediated degradation of indole-3-acetic acid. Plant Physiol, 1997, 59: 372~375
- Eshdat Y, Holland D, Faltin Z et al. Plant glutathione peroxidases. Physiol Plant, 1997, 100:234~240