

## 不同倍性白桦叶芽中 IAA 和 ABA 含量分析

王遂, 赵慧, 李墨野, 姜静\* (东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要** [目的]初步比较二、三、四倍体白桦叶芽中 IAA 和 ABA 含量的差异, 为研究植物内源激素在不同倍性白桦生长发育过程中所发挥的作用提供参考。[方法]利用 HPLC 法测定了二、三、四倍体白桦叶芽中 IAA 和 ABA 含量。[结果]对不同倍性白桦叶芽 IAA 与 ABA 含量的比较发现, 多倍体白桦叶芽 IAA 含量均显著高于二倍体, 而 ABA 含量则显著低于二倍体; 单位质量的二、三、四倍体白桦叶芽中 IAA/ABA 的值分别为 0.76、1.45、1.06。[结论]染色体倍数的增加对内源激素含量产生了重要影响。

**关键词** 多倍体; 白桦; 吲哚-3-乙酸; 脱落酸; 高效液相色谱

**中图分类号** S792.153 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)27-09418-03

### Analysis of IAA and ABA in Leaf Buds of Different Ploidy *Betula platyphylla* Suk.

WANG Sui, ZHAO Hui, LI Mo-ye, JIANG Jing\* (National Key Laboratory of Forest Tree Genetic Breeding, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

**Abstract** [Objective] To compare differences of IAA and ABA in leaf buds of diploidy, triploidy and tetraploidy white birches, which will provide reference for studying the role of plant endogenous hormone in growth and development process of *Betula platyphylla* Suk. [Method] HPLC method was adopted to determine IAA and ABA content in leaf buds of *Betula platyphylla* Suk. [Result] The comparison results of IAA and ABA content in leaf buds of different ploidy *Betula platyphylla* Suk. showed that the IAA was significantly higher and the ABA was significantly lower in the polyploidy than those in the diploidy, respectively. Ratios of IAA/ABA in diploidy, triploidy and tetraploidy *Betula platyphylla* Suk. were 0.76, 1.45, 1.06. [Conclusion] The result demonstrated that chromosome doubling has a significant impact on the content of endogenous phytohormone.

**Key words** Polyploid; *Betula platyphylla* Suk.; IAA; ABA; HPLC

白桦(*Betula platyphylla* Suk.)是桦木科桦木属植物,落叶乔木或灌木,主产北半球寒温带、温带地区,抗性极强,对土壤适应性广,生长快,耐干旱贫瘠,是我国北方最重要的经济和园林绿化树种之一<sup>[1]</sup>。

笔者所在实验室前期利用秋水仙素诱导产生白桦四倍体后,又通过与白桦二倍体杂交,获得白桦三倍体杂种。初步研究发现,三、四倍体与二倍体白桦相比,高生长变化不大,径生长明显增加,苗木整体呈现出粗壮的变化趋势。目前吲哚-3-乙酸(IAA)与脱落酸(ABA)等植物内源激素在不同倍性白桦生长发育中所发挥的作用尚不清楚。该试验利用高效液相色谱法(HPLC)检测白桦二、三、四倍体叶芽中 IAA 和 ABA 的含量,旨在初步比较 3 种不同倍性白桦叶芽中 IAA、ABA 的含量差异,为研究植物内源激素在不同倍性白桦生长发育过程中所发挥的作用提供基础资料。

## 1 材料与与方法

### 1.1 研究材料

**1.1.1 供试材料。**2014 年 4 月 25 日上午,在东北林业大学林木育种基地,分别取一定量的二倍体、三倍体和四倍体 9 年生中国白桦生长健壮的叶芽若干,迅速放入液氮中冷却后,储存在 -80℃ 超低温冰箱保存待用。

**1.1.2 主要试剂。**IAA 为 HPLC 用标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司生产);ABA 为 HPLC 用标准品(美国 SIGMA 公司生产);色谱级甲醇(美国 Fisher Scientific 公司生产);娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司生产);其余试剂均为分析

纯,购自上海国药集团化学试剂有限公司。

**1.1.3 主要仪器。**Waters 高效液相色谱系统(Waters 600 四元泵, Waters 2707 自动进样器,柱温箱和 Waters 2996 二极管阵列检测器, Empower 3.0 色谱分析系统), Symmetry® C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5.0 μm), Sep-Pak® C18 固相萃取柱(3cc),均由美国 Waters 公司生产; TissueLyser II 样品破碎系统(德国 Qiagen 公司生产);离心机 and Concentrator plus 真空离心浓缩仪(由德国 Eppendorf 公司生产)。

### 1.2 研究方法

**1.2.1 色谱条件。**流动相: A. 甲醇, B. 水(含 0.1% 冰乙酸);洗脱程序见表 1。

脱气: 氦气在线脱气;柱温: 30℃;进样量: 20 μl;检测波长: IAA 为 218.7 nm, ABA 为 262.2 nm;进样延迟: 5 min;运行时间: 30 min。

表 1 梯度洗脱程序

时间//min	流量//ml/min	A//%	B//%
0	1	10	90
2	1	10	90
15	1	90	10
20	1	90	10
25	1	100	0
30	1	100	0

### 1.2.2 标准工作液。

**1.2.2.1 母液的配制。**取 0.100 0 g 植物内源激素,用 HPLC 级甲醇定容在 100 ml 容量瓶中,配制成浓度为 1 mg/ml 的母液。

**1.2.2.2 单标储备液的配制。**取 1 ml 激素母液,用 HPLC 级甲醇定容在 100 ml 容量瓶中,配制成浓度为  $1 \times 10^{-2}$  mg/ml 的单标储备液。

**基金项目** “十二五”国家科技支撑计划课题(2012BAD01B05)。

**作者简介** 王遂(1988-),男,黑龙江哈尔滨人,硕士研究生,研究方向:林木遗传育种。\*通讯作者,教授,博士生导师,从事林木遗传育种研究。

**收稿日期** 2014-08-15

**1.2.2.3 标准工作液的配制。**利用微量移液器,将不同体积的单标储备液加入容量瓶中,用 HPLC 级甲醇定容,配制 2 种溶质终浓度均为  $1 \times 10^{-2}$ 、 $5 \times 10^{-3}$ 、 $2.5 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-3}$ 、 $5 \times 10^{-4}$ 、 $2.5 \times 10^{-4}$ 、 $1 \times 10^{-4}$ 、 $5 \times 10^{-5}$ 、 $2.5 \times 10^{-5}$  与  $1 \times 10^{-5}$  mg/ml 的不同标准工作液,并依次命名为标准工作液 ①~⑩。

**1.2.3 样品前处理方法。**参照前人的相关方法,进一步改进方案为<sup>[2-5]</sup>:

(1)准确称取白桦叶芽 1 g(FW),迅速放入  $-80$  °C 超低温冰箱待用。

(2)将储存的白桦叶芽置于球磨机中,加入液氮冷却后,在 28 Hz 频率下研磨 0.5 min,至样品变为极细粉末,放入锡纸包好的 50 ml 大试管中。

(3)向大试管中加入 5 ml 冷的含 80% 甲醇,20% 水的提取液。

(4)超声波冰浴振荡 60 min。

(5)6 000 r/min,4 °C 离心 10 min,取上清液。

(6)收集沉淀,再用 5 ml 冷 80% 甲醇提取液提取 1 次,重复步骤(3)~(5)。

(7)合并 2 次提取液,在真空离心浓缩仪中减压浓缩至只剩水相。

(8)加入 5 ml,pH=8.0 的 PBS(磷酸盐缓冲液)。

(9)加等体积石油醚,萃取 3 次,弃去有机相。

(10)加 0.5 mol/L 柠檬酸,调 pH 至 2.8~3.0。

(11)加等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,合并酯相,减压浓缩至干。

(12)用 2 ml,pH=8.0 的 PBS(磷酸盐缓冲液)溶解。

(13)过 Sep-Pak 固相萃取柱(需先用 3 ml 100% 甲醇活化,再用 3 ml pH=3.0 的去离子水平衡),过柱流速均为 1 ml/min。

(14)用 1 ml pH=3.0 的去离子水作为淋洗液淋洗。

(15)用含 0.1% 冰乙酸的 80% 甲醇为洗脱液洗脱,收集洗脱液。

(16)接取洗脱后的馏分,经  $0.45 \mu\text{m}$  的滤器过滤,减压浓缩至干,用 100% 甲醇(色谱纯)定容,储存在  $4$  °C 冰箱中,备用进样。

**1.2.4 数据处理方法。**利用 Empower 3.0、SPSS 20.0 和 Excel 2010 软件进行数据分析处理。

## 2 结果与分析

**2.1 标准曲线** 将制作好的标准工作液依次进样,每 1 标准工作液进样 3 次,以标准品浓度为横坐标,以峰面积积分为纵坐标,根据两者之间的线性相关性,用 Empower 3.0 软件计算标准曲线方程(表 2)。结果可以看出,两者线性关系良好,相关系数  $R^2$  均大于 0.99。

**2.2 精密度和稳定性** 准确吸取标准工作液 ⑤ 20  $\mu\text{l}$ ,连续进样 3 次,记录峰面积积分值。结果表明,3 次进样后峰面积积分值变化不大,IAA 与 ABA 对应峰面积相对标准偏差(R. S. D)均小于 0.2%,精密度的符合要求。

表 2 标准曲线方程

标准品	标准曲线方程	$R^2$	检测范围//ng/ml
IAA	$y = 298.62x - 7973.6$	0.998	30 ~ 10 000
ABA	$y = 108.86x + 3815.1$	0.997	20 ~ 10 000

准确吸取标准工作液 ⑤ 20  $\mu\text{l}$ ,于配置后的 0、6、12、24 和 48 h 分别进样,记录峰面积积分值。结果显示,IAA 与 ABA 2 种植物内源激素在甲醇溶液中稳定性良好,峰面积相对标准偏差(R. S. D)均小于 0.6%,在试验需要的时间范围内,具有良好的稳定性。

**2.3 回收率** 向已知 IAA 和 ABA 含量的叶芽样品中分别加入 10 000 ng 的 IAA 和 ABA 标准品,用上文所述样品前处理方法处理,计算回收率,重复 3 次(表 3)。结果表明,IAA 和 ABA 2 种物质在复杂的前处理过程中有部分损失。故在计算完成样品中 2 种物质的含量后需要一个校正系数将测定值转换成更接近真实值的数值,根据两者的平均回收率,将 IAA 的校正系数定为 1.35,ABA 的校正系数为 1.29。

表 3 回收率

重复	IAA 回收率	ABA 回收率
第 1 次	75.2	79.7
第 2 次	75.6	75.4
第 3 次	71.2	78.1
平均回收率	74.0	77.7

**2.4 不同倍性白桦叶芽中 IAA 与 ABA 含量** 将处理好的样品依次进样,根据保留时间和光谱特征确定目标峰,峰面积积分后带入相应的标准曲线方程,得出计算值,之后乘以校正系数,得到一个更接近真实值的终值,见表 4 和图 1。结

表 4 不同倍性白桦叶芽中 IAA 和 ABA 含量

重复	IAA			ABA		
	二倍体	三倍体	四倍体	二倍体	三倍体	四倍体
第 1 次	723.60	1 056.88	797.16	1058.60	785.84	745.87
第 2 次	693.17	1 198.30	788.95	885.71	791.73	855.83
第 3 次	676.49	1 094.77	795.79	950.50	843.99	742.25
平均值	697.75	1 116.65	793.97	964.94	807.19	781.32
标准差(SD)	23.89	73.20	4.40	87.34	32.01	64.56
校正系数		1.35			1.29	
终值	941.97	1 507.48	1 071.86	1 244.77	1 041.27	1 007.90

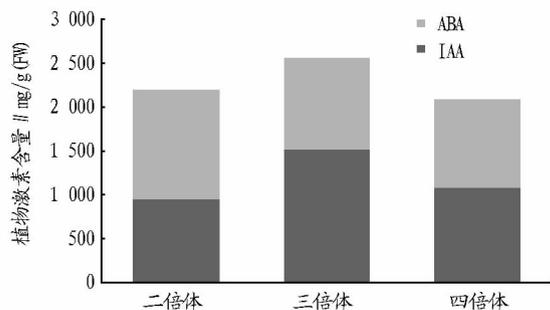


图1 不同倍性白桦叶芽中 IAA 和 ABA 含量

果发现,普通二倍体白桦叶芽中 IAA 含量最低,ABA 最高;三倍体的 IAA 含量最高;四倍体的 ABA 含量最低。单位质量的二、三、四倍体白桦叶芽中 IAA/ABA 的值分别为 0.76、1.45、1.06。对原始计算结果进行差异显著性分析显示,不同倍性白桦叶芽中 IAA 含量差异极显著( $P < 0.01$ ),ABA 含量差异显著( $P < 0.05$ )。进一步的多重比较表明(Duncan法,  $\alpha = 0.05$ ),不同倍性白桦叶芽之间 IAA 含量差异均显著;而 ABA 只在二倍体与多倍体之间差异显著。

### 3 结论与讨论

人们对多倍体的研究已有很长的历史,多倍体植株常较普通二倍体生长发育缓慢,开花成熟晚,含水量高,渗透压低,植物组织内碳水化合物、维生素、蛋白质、叶绿素和一部分次生代谢产物含量显著升高<sup>[6]</sup>。笔者所在实验室前期的研究发现,多倍体白桦与二倍体白桦相比,在胸径、叶片、气孔和果序方面明显增大。这些特点与内源激素含量的变化有着很大关系<sup>[7]</sup>。对于单个或多个基因的多拷贝,有时会对内源激素产生重要影响,而其影响大小与插入基因拷贝数的多少关系不大。就吡啶-3-乙酸而言,即使插入的是其合成相关基因,也不能保证最终 IAA 表达的含量一定上升,这可能与基因的共抑制或插入位点不同有关<sup>[8-10]</sup>。但关于多倍体植株,尤其是木本植物内源激素的报道尚不多见。一般认为,随着染色体倍数的增加,部分植物内源激素的含量会有所上升,而上升的比例与染色体增加的倍数并无多大关联<sup>[11]</sup>。但也有报道发现,有时内源激素也会随着染色体倍

数的增加而降低<sup>[12]</sup>。从此次试验的结果看,三、四倍体叶芽中 IAA 的含量明显高于二倍体,而 ABA 含量低于二倍体。观察三者的形态结构发现,三、四倍体叶芽的体积大,单个叶芽的质量也重,但芽的数量少;二倍体叶芽体积小,单芽质量轻,而芽的数量多,这可能与植物内源激素含量和互作的变化有很大关联。通过对四倍体和二倍体白桦基因转录组数据的分析也发现,在 IAA 合成途径中,四倍体较二倍体共有 11 个差异基因,全部上调表达,这从分子角度初步阐释了多倍体白桦 IAA 含量上升的机理。由于材料的限制,该试验的样本数较少,其测定结果是否具有普遍性尚需进一步验证;同时,由于多倍体的复杂性,染色体倍数的增加与内源激素含量的变化关系十分复杂,因此从不同角度对其进行研究阐述亦具有重要意义。

### 参考文献

- [1] 张志翔. 树木学(北方本)[M]. 北京:中国林业出版社,2008.
- [2] 杨婕,张日清,金晓玲. 高效液相色谱法在木本植物内源激素含量检测中的应用[J]. 经济林研究,2010(1):122-126.
- [3] 陈昆松,徐昌杰,李方,等. HPLC 法检测果实组织中内源 IAA、ABA 方法的改进[J]. 果树学报,2003(1):4-7.
- [4] ABUL Y, MENÉNDEZ V, GÓMEZ-CAMPO C, et al. Occurrence of plant growth regulators in *Psilotum nudum* [J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(14):1211-1213.
- [5] 赵晓菊,唐中华,郭晓瑞,等. 固相萃取富集-高效液相色谱法测定长春花中的 3 种内源激素[J]. 色谱,2006(5):534.
- [6] 潘一山,潘裕添,邹金美. 果树多倍体育种的探讨[J]. 漳州师范学院学报:自然科学版,2005,18(3):102-104.
- [7] KONDOROSI E, ROUDIER F, GENDREAU E. Plant cell-size control: growing by ploidy? [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2000, 3(6):488-492.
- [8] JONES A M, IM K H, SAVKA M A, et al. Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1 [J]. Science, 1998, 282(5391):1114-1117.
- [9] VAUCHERET H, FAGARD M. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators [J]. Trends in Genetics, 2001, 17(1):29-35.
- [10] 郝宇,梁海永,杨敏生. 多拷贝 *rol* 基因对转基因杨树生长及内源激素的影响[J]. 林业科学,2010(5):58-63.
- [11] 孙敏红,张蜀宁. 二、四倍体不结球白菜子叶再生能力及其与内源激素的关系[J]. 南京农业大学学报,2006,29(2):25-28.
- [12] 罗向东,戴亮芳,钱春桃,等. 黄瓜属不同倍性异源多倍体的形态及生理特性分析[J]. 西北植物学报,2008,28(3):542-546.

(上接第 9285 页)

- [4] THOMAS C L, LEH V, LEDERER C, et al. Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana* [J]. Virology, 2003, 306:33-41.
- [5] QU F, REN T, MORRIS T J. The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step [J]. J Virol, 2003, 77(1):511-522.
- [6] 邱又彬,陶刚,黄永会,等. TC-RT-PCR 技术在马铃薯病毒检测及其基因克隆上的应用[J]. 西南农业学报,2009, 22(2):329-331.
- [7] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Mol Biol Evol, 2007, 24:1596-1599.
- [8] HUISMAN M J, LINTHORST H J M, BOL J F, et al. The complete nucleotide sequence of Potato virus X and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses [J]. J Gen Virol, 1988, 69:1789-1798.
- [9] 姚东校,洪鲲,杨立昌,等. 马铃薯 X 病毒贵州分离物的分子鉴定[J]. 广东农业科学,2013(13):139-141.
- [10] 颜谦,黄萍,宋吉轩,等. 贵州不同海拔地区马铃薯病毒病初步调查及检测鉴定[J]. 安徽农业科学,2009,37(29):14262-14263.
- [11] 杜志游,陈集双. 马铃薯 X 病毒湖南分离物的鉴定与分组研究[J]. 中国病毒学,2003,18(2):119-123.
- [12] GOULDEN M, KOHM B, CRUZ S S, et al. A feature of the coat protein of potato virus X affects both induced virus resistance in potato and viral fitness [J]. Virology, 1993, 197:293-302.