

促花和抑花处理对柑桔成花及芽内蛋白质组份的影响

何绍兰 邓烈 李宜琴 廖蓉

(中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712)

(四川省科协, 成都 610017)

摘要 对金柑、木剑柑和温州蜜柑施行促、抑花调控处理, 并利用 SDS-PAGE 和 IEF-PAGE 电泳技术, 分析了金柑、木剑柑和温州蜜柑在受促、抑花处理后芽体的蛋白质图谱变化动态。结果表明, 在柑桔花芽诱导期, 经 GA_3 或 BA 抑花处理的芽组织中均有新的小分子蛋白质或中性至弱碱性蛋白质出现。随着花芽由生理分化向形态分化过渡, 环割处理芽中出现小分子或酸性特异蛋白质。可能表明柑桔成花或抑花具有不同的基因表达与蛋白质代谢特征。进一步证实了因处理时间不同, BA 对柑桔花芽分化具有促进或抑制的双重作用。

关键词 柑桔; 促花; 抑花; 蛋白质代谢

分类号 Q946.1

EFFECTS OF FLORAL PROMOTION OR INHIBITION TREATMENTS ON FLOWERING OF CITRUS TREES AND PROTEIN FRACTIONS IN BUDS

He Shaolan Deng Lie Li Yiqing

(Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agri. Sci., Chongqing 400712)

Liao Rong

(Scientific Society of Sichuan Province, Chengdu 610017)

Abstract Different methods of flowering regulation were used on oval Kumquat (*Fortunella margarita* Swingle), Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco 'Pokon') and Satsuma orange (*C. reticulata* Blanco 'Miyagawa Wase') trees which were all grafted on rootstocks of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*). The changes in protein fractions during the flower initiation were determined by SDS-PAGE and IEF-PAGE. The results showed that flower numbers were obviously increased by girdling treatment and decreased by GA_3 , and were also decreased by BA treated at the early stage of flower induction but increased by that at the late stage of flower formation. At the flower induction stage, some of the special proteins were observed in the buds treated with GA_3 , but disappeared finally. In the flower primordium formation stage, the intensity of protein bands in the flower buds increased in the shoots girdled, and some special proteins were found in the flower buds. It is suggested that different methods of flowering regulation might result in different gene expression and

characteristics of protein metabolism. Some protein with smaller molecules and lower isoelectric point were related to flower initiation of citrus trees.

Key words Citrus; Flower initiation; Protein metabolism

有关果树花芽分化机理的研究, 虽然已有百余年的历史, 但全面揭示果树成花机理还有待大量研究工作^[1]。近年来, 许多研究者认为, 果树的花芽分化是遗传基因控制下营养与激素综合作用的结果^[2-7]。有研究表明, 在柑桔花芽诱导期喷用 GA_3 可以强烈抑制花芽分化, 而且过氧化物酶的数量和活性也会明显增强^[8]。 GA_3 可能是在蛋白质水平上抑制花芽分化的^[9,10]。蛋白质和酶都是基因表达较直接的产物, 一些特异蛋白质在真核生物基因表达调控中起着重要作用, 并与植物细胞分化、形态建成密切相关^[11,12]。研究柑桔促、抑花处理后的蛋白质代谢特性, 可深入认识柑桔花芽分化的基因表达与调控, 并为柑桔优质丰产提供理论依据。但迄今为止, 对柑桔促、抑花处理后芽内蛋白质代谢的了解少, 与花芽分化密切相关的蛋白质种类尚未见报道。本文旨在阐明柑桔成花或抑花处理后芽内的蛋白质组份变化特点。

1 材料与方法

1.1 试材处理和样品采集

选用本所枳 *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. 为砧木的 8 年生金柑 *Fortunella margarita* (Lour.) Swingle 进行四种处理: (1) 在 10% 春梢停止生长时喷用 $50 \text{ ng ml}^{-1} GA_3$, 每隔 10 d 喷一次, 连续喷布 3 次; (2) 喷用 $50 \text{ ng ml}^{-1} BA$, 方法同处理 (1); (3) 春梢停止生长前主枝环割 3 圈; (4) 对照, 喷用清水。采用单株处理, 对比排列, 三次重复。分别于春梢停止生长、生长点变黄和顶芽自剪脱落期从树冠中、上部采集当年生春梢, 洗净, 贮存于 -20°C 低温冰箱备用。

选用枳为砧木的 10 年木橘柑 *Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan 作试材, 春季全部疏除花果, 秋季进行三种处理: (1) 从 9 月 25 日开始喷布 GA_3 , 每隔 20 d 喷一次, 共喷 3 次, 浓度分别为 25 、 50 和 100 ng ml^{-1} ; (2) 喷布 BA 处理与 (1) 相同, 浓度分别为 50 、 70 和 100 ng ml^{-1} ; (3) 对照喷布 3 次清水。单株处理, 对比排列, 三次重复。于 10 月 10 日, 25 日和 11 月 15 日采集树冠外围中上部健康的春秋梢成花母枝, 洗净后贮于 -20°C 低温冰箱保存备用。

选用 10 年生枳作砧木的宫川温州蜜柑 *Citrus reticulata* cv. Miyagawa Wase, 处理和采样完全与木橘柑相同。于 10 月 25 日和 11 月 25 日近花芽形态分化初期, 喷布 75 、 $100 \text{ ng ml}^{-1} BA$, 以证实 BA 晚期喷布对柑桔花芽的促进作用。

对上述各组试材分别进行新梢长度、节数、节间距、花枝率及每母枝花量等指标的调查。

1.2 蛋白质提取、分离和测定

切取样品枝梢顶端 4 个芽, 每处理取样量 1 g, 用预冷的 $1.0 \text{ mol/L Tris-HCl}$ 缓冲液 (pH7.5) 在冰浴研钵中匀浆, 冷冻 $10000 \times g$ 离心 15 min, 上清液贮于 -20°C 低温冰箱保存备用。

按何忠效等^[13]的方法配制凝胶和缓冲液系统, 进行聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳。SDS-PAGE 分离胶浓度为 12%, 缓冲液为 $1.5 \text{ mol/L Tris-HCl}$, pH8.8, 浓缩胶浓度为 5%, 缓

冲液为 0.5 mol/L Tris-HCl, pH6.8。每槽加样量 50 μ l。金柑样品的 IEF-PAGE 的胶浓度为 7.5%，胶联度 3%，载体两性电解质 (Ampholine) pH 范围为 3-10。每样槽进样量 40 μ l。每种样品的电泳实验均重复 3 次以上。用考马斯亮蓝 R-250 染色，凝胶脱色后用日本岛津公司 CS-930 型双波长薄层扫描仪进行蛋白质带扫描检测。

2 结果

2.1 调控措施对柑桔成花的影响

喷 GA_3 和 BA 后明显促进金柑的生长势，枝梢长度分别增加 56% 和 58%，花量由对照的 8.8 朵/母枝，分别减少到 0.3 朵和 1.5 朵/母枝。环割处理则相反，生长减弱，花量明显增加 (图 1)。

椪柑在春季全部疏除花果后，明显提高次年成花能力。对照处理的花枝率达 68.2%， GA_3 处理后植株无花，BA 处理植株的花枝率也明显下降 (图 2)，表现了抑花效应。

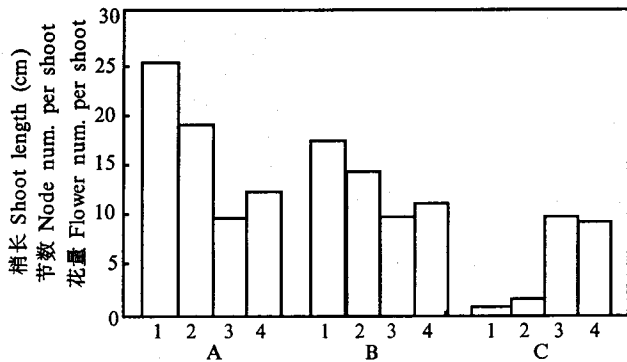


图 1 GA_3 、BA 和环割处理 (GD) 对金柑春梢生长和花量的影响

Fig. 1 Effect of GA_3 , BA and Girdling (GD) treatment on the growth and the flower numbers of spring shoots of Kumquat trees

A: 梢长 Shoot length; B: 节数 Node number per shoot; C: 花量 Flower number per shoot. 1= GA_3 ; 2=BA; 3=GD; 4=Control

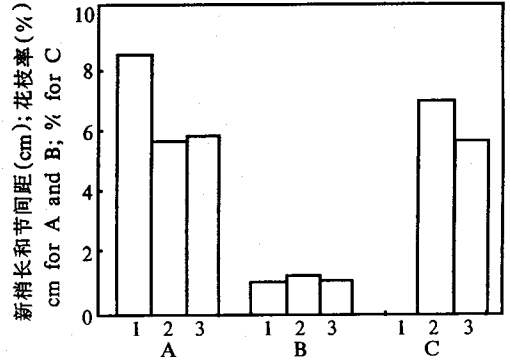


图 2 GA_3 和 BA 处理对椪柑次年生长与开花的影响

Fig. 2 Effects of GA_3 and BA on next year's growth and flowering of Ponkan mandarin after treatment by clearing all the flowers and fruits in spring

A: 新梢长 Length of new shoot; B: 节间距 Length between nodes; C: 花枝率 Percentage of flowering shoots. 1= GA_3 ; 2=Control; 3=BA

宫川温州蜜柑春梢或秋梢成花母枝的花量都因 GA_3 的处理而显著减少 (图 3)。花芽生理代谢出现差别前期喷布 BA，也显著减少了春梢母枝花量。而晚期喷布 BA，春梢母枝的花量明显提高，而秋梢母枝花量略有减少。可见，BA 对柑桔花芽分化因处理时期不同具有促、抑双重作用。

2.2 柑桔促、抑花处理后芽内蛋白质变化动态

2.2.1 SDS-PAGE 电泳图谱的变化

与其他柑桔种类不同，金柑的花芽分化一般在当年新梢上。在新梢停止生长至新梢生长点脱落时期，为金柑的花芽诱导和花原基形成期，此时采集样品进行分析。图 4 显示金柑在春梢

停长、生长点转黄及生长点自剪脱落期芽内蛋白质变化动态。在金柑春梢停止生长期, GA_3 处理后芽内产生了一条新的蛋白质(图 4A 箭头所示); 在生长点转黄期(图 4B), 各处理之间蛋白质图谱几无明显差别; 在生长点自剪脱落期, 环割处理的芽内则出现了一条活性较强的新的蛋白质带(图 4C 箭头所示), 而且自然成花的对照处理芽内一些小分子蛋白质活性也有所增强。

根据多年的观察, 大多数柑桔品种, 如甜橙、木椪柑、温州蜜柑等, 在重庆地区 11 月上中旬开始花芽形态分化, 生理代谢在此之前则出现差异。对已喷 GA_3 和 BA 抑花处理后的椪柑芽进行 SDS-PAGE 分析表明, 于生理代谢出现差异之前在小分子蛋白质谱带区域均产生了一些新的蛋白质带, 以 GA_3 处理的新蛋白质带尤为明显(图 5A), 而形态分化期(11 月 15 日)各处理的蛋白质带则减少, 这时经 GA_3 处理后生理代谢出现差异时期所出现的这些蛋白质带活性亦逐渐减弱或消失, 而大量成花的对照处理和花量较大的后期 BA 处理, 都在小分子蛋白质带区有一条新的蛋白质带(图 5C)。

官川温州蜜柑 SDS-PAGE 电泳扫描图谱(图 6)也表现出与金柑、椪柑类似的结果。在各处理之间, 大分子区域的蛋白质带几乎没有差异, 而在小分子区域中 GA_3 处理的芽样在生理分化前期出现不同的蛋白质(图 6A 箭头所示)。随着生理分化向形态分化过渡, 对照处理在小分子

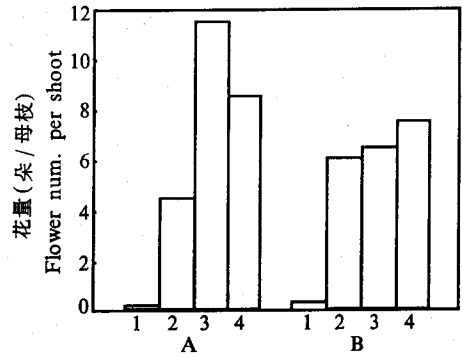


图 3 喷布 GA_3 或 BA 对温州蜜柑花量的影响
 Fig. 3 Effect of GA_3 or BA on flower numbers of *Citrus reticulata* cv. Miyagawa Wase in spring and autumn shoots
 A: 春梢 Spring shoot; B: 秋梢 Autumn shoot;
 1= GA_3 ; 2=BA sprayed at early stage;
 3=BA sprayed at late stage; 4=Control

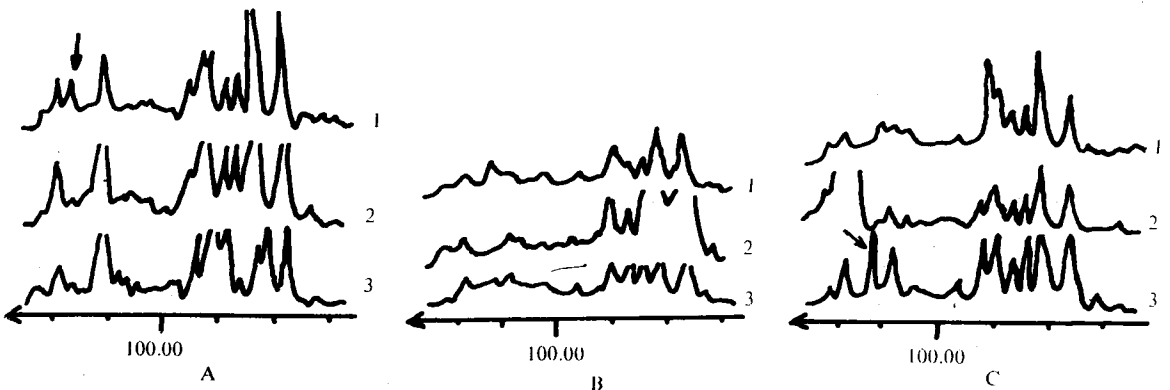


图 4 金柑梢芽在花芽诱导期中的 SDS-PAGE 蛋白质扫描图谱
 Fig. 4 SDS-PAGE scanning of proteins in kumquat spring shoot buds during flower initiation

A: 春梢停长期; B: 春梢生长点转黄期; C: 春梢生长点自剪脱落期; 1、2、3 分别为 GA_3 、对照和环割处理。横座标箭头所指的是蛋白质在电场中移动的方向, 前沿为小分子区域。
 A: At stage of stopping growth of spring shoots; B: At stage of growth point yellowing in spring shoots; C: At stage of growth point self-dropping in spring shoots. 1= GA_3 ; 2=Control; 3=Girdling treatment. The arrows on the straight lines indicate the moving direction of proteins in electric field.

蛋白质区出现了新的蛋白质(图 6B 箭头所示), 到 11 月 15 日, 对照处理新增的这条蛋白质带继续保持较高含量的水平, 而 GA_3 处理样品在生理分化前期出现的新蛋白质则逐渐消失。

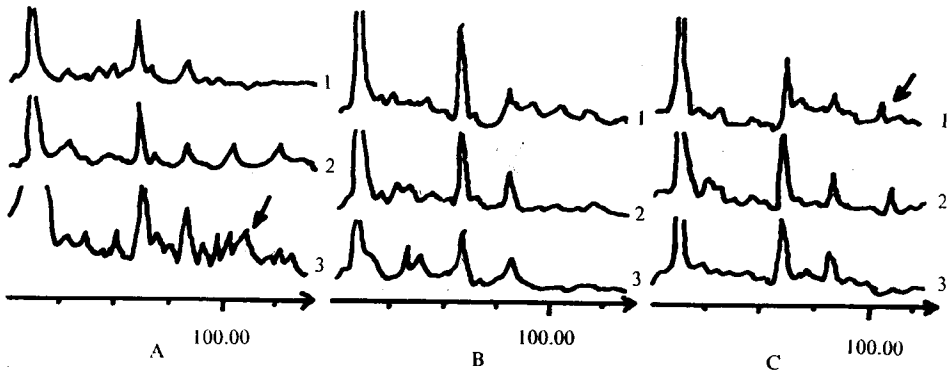


图 5 椪柑促、抑花过程中的 SDS-PAGE 蛋白质扫描图谱

Fig. 5 SDS-PAGE scanning of proteins in Ponkan mandarin shoots during flower initiation
A, B, C 分别为 10 月 10 日、25 日、11 月 15 日的样品; 1, 2, 3 分别为对照、BA 和 GA_3 处理
A, B and C represent the sampling dates on Oct. 10, Oct. 25 and Nov. 15, respectively.
1=Control; 2=BA; 3= GA_3

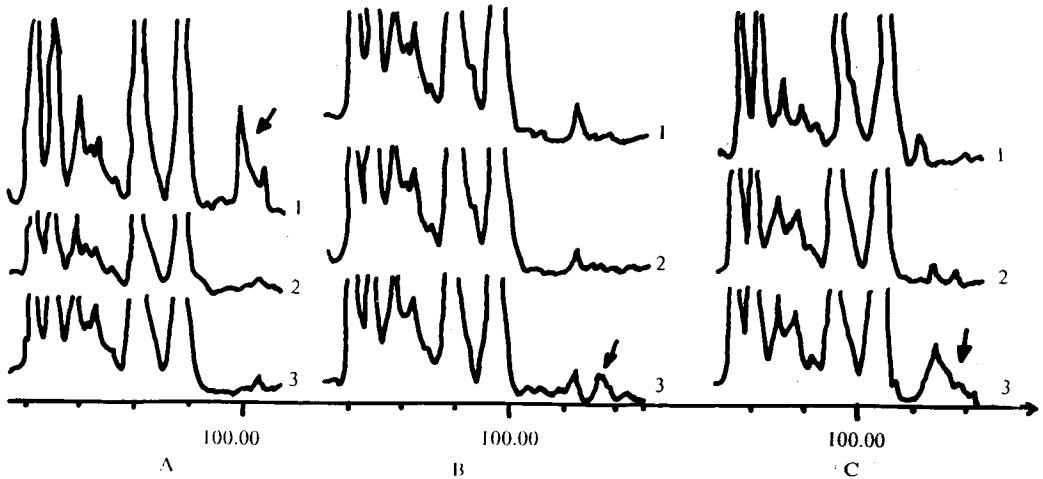


图 6 宫川温州蜜柑促、抑花情况下的 SDS-PAGE 蛋白质扫描图谱

Fig. 6 SDS-PAGE scanning of proteins in Satsuma mandarin buds during flower initiation
A, B, C 分别为 10 月 10 日、25 日和 11 月 15 日的样品; 1, 2, 3 分别为 GA_3 、BA 和对照处理。
A, B and C represent the sampling dates on Oct. 10, Oct. 25 and Nov. 15, respectively.
1= GA_3 ; 2=BA; 3=Control

2.2.2 金柑芽 IEF-PAGE 电泳结果

表 1 是金柑芽样 IEF-PAGE 电泳结果。在新梢停长期, 经 GA_3 和 BA 抑花处理的芽样, 在 Rf 值为 0.47 和 0.44 带位上出现微碱性蛋白质; 在生长点转黄期, 抑花处理的样品在 Rf 值

为 0.61 和 0.64 带位上又有新的中性蛋白质出现。在春梢自剪脱落期, 抑花处理在生长点转黄期出现的特异蛋白质已消失, 而成花的环割处理和对照的芽样却在 Rf 值 0.88 和 0.71 带位上产生了新的酸性蛋白质。

表 1 金柑花芽分化期芽内不同蛋白质含量的变化

Table 1 Changes in protein composition during flower initiation of Kumquat shoot buds

蛋白质 Protein		占总蛋白质的百分率 % of protein content of the total												
Rf	pH 3-10	停长期 Stopping growth				黄尖期 Yellowing of growth point				自剪期 Self-dropping of growth point				
		GA ₃	BA	Gd	Control	GA ₃	BA	Gd	Control	GA ₃	BA	Gd	Control	
0.90	酸 Acid	3.36	0.88	0.90	0.58	1.28	0.56	0.61	0.37	0.08	4.06	1.50	0.48	
0.88								0.70	0.40			2.15	1.22	
0.84	中性 Neutral	5.47	7.06	1.18	2.10	10.58	8.91	1.33	1.00	2.64	8.82	3.17	0.04	
0.78		13.42	3.83	6.01	20.17	10.72	10.08	19.44	21.19	12.24	15.84	14.40	21.26	
0.73		12.27	22.37	8.66	7.67	4.35	0.50	14.76	17.08	23.19	14.26	19.42	21.16	
0.71		3.35	2.78	14.05	7.74	3.82	4.10	4.30	6.02			4.17	2.05	
0.68		28.31	17.81	15.73	15.18	14.71	30.02	15.38	36.02	26.15	15.48	36.93	11.09	
0.64						1.23	0.66							
0.61						2.95	3.48							
0.57		1.73	14.31	16.27	11.82	0.66	1.93	11.13	6.80	19.42	13.19	8.23	14.93	
0.50		16.02	2.06	19.53	11.97	10.34	14.60	5.15	3.42	9.05	8.68	0.70	15.78	
0.47		1.27	0.45			5.60	0.75			3.85	5.99	3.46	1.79	
0.44	1.71	4.85			1.58	3.38	6.24	0.79	2.70	3.81	1.99	9.29		
0.40	1.36	3.39	3.31	11.89	8.55	3.70	1.03	1.57						
0.36	碱性 Basic													
0.32		1.67	1.23	1.83	2.60	10.92		10.06	2.77	0.55	9.56	2.39	0.36	
0.29		9.40	18.89	12.53	7.65	12.71	17.33	9.87	2.57	0.13	0.31	1.49	0.55	
0.27	Base	0.66			0.63									

此表根据金柑芽样进行 IEF-PAGE 后扫描所得数据整理而成。Gd 为环割处理。

Data in Tab. 1 were obtained by IEF-PAGE from Kumquat shoot buds. Gd=Girdling treatment.

3 讨论

本试验结果表明, 采用促、抑花措施, 对柑桔花芽分化的调控有明显作用。喷布 GA₃ 能强烈抑制花芽分化, 疏果和环割则促进了柑桔树大量成花。在花芽生理代谢出现差异前期喷用 BA 有抑花作用, 但其效果不及喷布 GA₃。在花芽形态分化始期对官川温州蜜柑喷布 BA, 能增加春梢母枝花量, 而秋梢母枝花量则略为减少。据切片观察, 喷布 BA 时官川温州蜜柑春梢已开始了花原基分化, BA 可能刺激花器细胞的分裂和发育, 进而促进了成花; 而此时部分秋梢仍处于成花诱导期, 由于柑桔花芽在分化前须停止生长, 而 BA 则可能使生长点细胞继续分裂, 从而最终减少了成花。这表明, 因处理时间不同, BA 对柑桔花芽分化兼具促、抑作用。

根据金柑、椪柑和温州蜜柑的 SDS-PAGE 电泳分离结果表明, 在柑桔花芽分化期, 抑花或成花过程具有不同的蛋白质代谢特点, 都能产生相应的特异蛋白质。对金柑进行了 IEF-PAGE 分离研究, 也有相似的结果。抑花处理在花芽生理代谢出现差异前期会产生一些小分子或中性

至弱碱性的蛋白质, 这些特异蛋白质是否直接对成花基因的表达和调控起着重要作用, 是否就是抑花蛋白质, 尚待研究; 而在花芽形态分化始期, 促花处理的芽组织中又出现了另一些小分子或酸性的蛋白质, 这类特异蛋白质是否直接影响或参与了花器官的形态建成, 是否对花芽特定发育阶段的完成具有重要作用仍有待进一步研究。

从花芽生理代谢出现差异至花原基形成, 是芽发育方向转变的关键时期, 可能与遗传基因控制激素所出现质的转变过程有关, 完成了这个转变, 就决定了芽的发育方向^[7]。Buban 等在研究苹果花芽分化时发现, 苹果短枝挂果会使顶芽核酸水平降低, 核酸组蛋白水平增高, 从而抑制花芽分化^[6,14]。我们过去的研究也曾表明, 喷布 GA₃ 和过量挂果会抑制柑桔花芽分化, 同时也引起花芽生理代谢变化, 如过氧化物酶同工酶和淀粉酶谱带数和活性均增高^[2,8]。本试验着重探讨了花芽生理代谢出现差异至花原基形成这一重要阶段的蛋白质图谱变化动态, 为深入探讨和揭示柑桔成花机理, 探求科学、高效的成花量调控措施提供参考。

参考文献

- 1 梁立峰, 季作樑, 邝森林. 大红柑花芽及营养芽形成过程的内源细胞分裂素变化动态. 华南农业大学学报, 1986, 7(4):11-16
- 2 邓烈等. 柑桔花芽分化与内源激素及淀粉酶活性的关系. 西南农业大学学报, 1991, 13(1):85-91
- 3 李学柱, 邓烈. 喷布 BA 对柑桔内源激素及花芽分化的调控. 园艺学报, 1992, 19(4):314-318
- 4 刘孝仲, 赖毅, 许生吉等. 伏令夏橙花芽分化期蛋白质和氨基酸含量的影响. 园艺学报, 1984, 11(2):85-91
- 5 Khavkin E E, Misharin S I. Embryonal antigens in maize caryopses: the temporal order of antigen accumulation during embryogenesis. *Planta*, 1997, 135:225-231
- 6 Buban T et al. Cytochemical investigation in apices of apple buds with special reference to flower initiation. *Acta Horticulture*, 1978, 80:193-198
- 7 程家胜. 果树花芽分化机理研究概述. 中国果树, 1980, 增刊: 34-41
- 8 何绍兰, 李学柱, 邓烈. 温州蜜柑大小年结果和喷布赤霉素对花芽分化及过氧化物酶同工酶的影响. 中国柑桔, 1989, 18(2):16-18
- 9 Monselise S P, Goren R. The role of internal factors and exogenous control in flowering, peel growth, and abscission in citrus. *HortScience*, 1978, 13:134-139
- 10 Marcelle R. The flowering process and its control. *Acta Hort*, 1984, 149:65-69
- 11 浙江农业大学, 北京农业大学主编. 遗传学. 北京: 农业出版社, 1979, 154-178
- 12 Monselise S P, Huberman M. Comparison of protein fractions of citrus bud during flower formation or its inhibition by gibberellin. *Sci Hort*, 1973, 1:171-176
- 13 何忠效, 张树政. 电泳. 北京: 科学出版社, 1990, 75-155
- 14 Buban T, Faust M. Flower bud induction in apple trees: internal control and differentiation. *Horticultural Reviews*, 1982, 4:174-203