

荔枝花芽分化过程中源细胞分裂素 变化动态的研究*

梁立峰 季作樑 李沛文

提 要

为了寻求内源细胞分裂素与荔枝花芽分化的关系，本文研究了荔枝花芽中的细胞分裂素的提取、分离和生物鉴定的方法，并测定了糯米糍荔枝不同时期花芽的内源细胞分裂素水平。

通过薄板层析和生物鉴定证明，荔枝花芽提取液中存在细胞分裂素类物质。采用生物鉴定并通过与不同浓度的标准激动素溶液的生理活性相比较，测出了不同时期荔枝花芽中的内源细胞分裂素水平，从而知道糯米糍荔枝花芽分化过程细胞分裂素的变化动态。从十一月到次年一月，荔枝花芽中的细胞分裂素含量逐渐增加，一月下旬达到高峰。二月下旬以后，花芽中的细胞分裂素含量很低。由于一月份是荔枝花芽分化的一个关键时刻，这时花芽中的细胞分裂素不断增加，初步认为内源细胞分裂素会在荔枝成花的生理过程中起调节作用。细胞分裂素对荔枝的花芽分化会有促进作用。

前 言

荔枝有比较明显的大小年结果现象，尤以糯米糍、桂味等品种为显著^[2]。小年结果主要由不能开花或开花稀少引起。欲克服大小年结果现象，就要揭示荔枝成花的规律。但是迄今关于荔枝花芽分化过程的形态学或者生理化方面的报道还很少。因此，深入研究荔枝的花芽分化就很有必要。

近代的研究表明，果树的花芽分化受着各种内源激素的综合影响^[5]。Luckwill在1970年提出了苹果的花芽分化与临界的赤霉素／细胞分裂素平衡有关的假说^[8]。他认为嫩叶及发育中的种子产生的赤霉素会抑制苹果的花芽分化，而由根部产生的，因叶子的蒸腾作用而随木质部汁液上行的细胞分裂素，特别是玉米素和它的核苷酸是促进苹果花芽分化的物质。不少研究者支持 Luckwill 的这种假说^{[6][7][8][10]}。根据前人的这些工作，本文以大小年结果现象比较明显的糯米糍荔枝大年树的花芽为材料，对目前认为具有促花效应的细胞分裂素进行研究，探索糯米糍荔枝花芽分化过程的内源细胞分裂素的变化动态，从中了解细胞分裂素与荔枝花芽分化的关系。

* 本研究得到广东省东莞市果树研究所的大力支持。

本文承李明启教授审阅。汪安琳、丁静、沈镇德、黄辉白、黄自然等先生对本研究给予指导。梁承愈、吴素芬老师及郑国樑、招晓东、陈村喜、吴筱颖等同志协助部分工作。一并致谢。

材料和方法

(一) 实验材料的采集和处理

供试植株是广东省东莞市果树研究所的七十至八十年生的糯米糍荔枝树 (*Litchi chinensis* Sonn.)。

采样之前先根据植株的秋梢期、树势及健康状况选出八株采样植株。编号并登记这些植株的基本情况。

荔枝的花芽分化始于秋梢顶芽的花序原基形成和发育。本研究采集秋梢顶芽及后来慢慢突出和伸长的花序为实验材料，这些实验材料统称花芽。从1980年11月到1981年3月每隔30天采集一次实验材料，每次每株采集6~10克。采集到的实验材料用锡纸包卷，做好标记后立即放置干冰中快速冰冻。实验材料带回实验室后转移至-20°C低温冰箱中保存备用。

(二) 细胞分裂素的提取和分离

本实验采用上海植物生理研究所丁静等介绍的方法¹来提取和分离荔枝花芽中的细胞分裂素。图一示荔枝花芽的细胞分裂素提取分离流程。

(三) 细胞分裂素的鉴定

1. 细胞分裂素的薄板层析：提取液中含有细胞分裂素，但提取液的成分非常复杂，故使用薄板层析法将提取液中的细胞分裂素作进一步的分离和纯化。薄板层析使用的支持剂为带萤光的氧化铝 [Aluminium oxide GF245 neutral (Typ E)，西德Merck公司出品]。支持板是16厘米×9厘米的软质玻璃。展开剂为正丁醇：氨水：水 (15:0.1:1)。薄板点样后先放层析缸中饱和一小时，然后展开10厘米，取出风干。薄板风干后用紫外分析仪 (254mμ) 观察展开后的细胞分裂素的暗斑位置。

2. 细胞分裂素的生物鉴定：取适量的提取液和标准玉米素（美国Sigma公司产品）分别点于氧化铝薄板上并如上展开。将展开后的薄板从原点到终点分成十等分。分别刮下各区段的支持剂并用酒精提出其中的活性成分。然后用尾穗苋 (*Amaranthus caudatus* L.，上海植物生理研究所提供的种子的后代) 黄化苗子叶苋红合成法^[1]鉴定细胞分裂素。

(四) 荔枝花芽分化过程不同时期花芽的细胞分裂素水平测定

分别将各个时期采集的实验材料混合剪碎，以四分法取出两份样本，每份相当于25克鲜重。在同一时间内进行细胞分裂素的提取分离工作。于是每一时期就有两份提取液作为重复。用苋红合成法考察不同时期细胞分裂素水平的变化时，将这些提取液分成两组，使每组均有不同采样时期的提取液。

每一样本提取液点板四块，每块点样量为0.5毫升。展开后刮取定性鉴定时确定的具活性物质区段用苋红合成法进行生物鉴定。不同的样本提取液含有不同量的细胞分裂素，因此它们会使尾穗苋黄化子叶合成不同浓度的苋红色素。测定它们的苋红溶液光密度。

在此同时，取不同浓度的标准激动素（美国Sigma公司产品）溶液用苋红合成法进

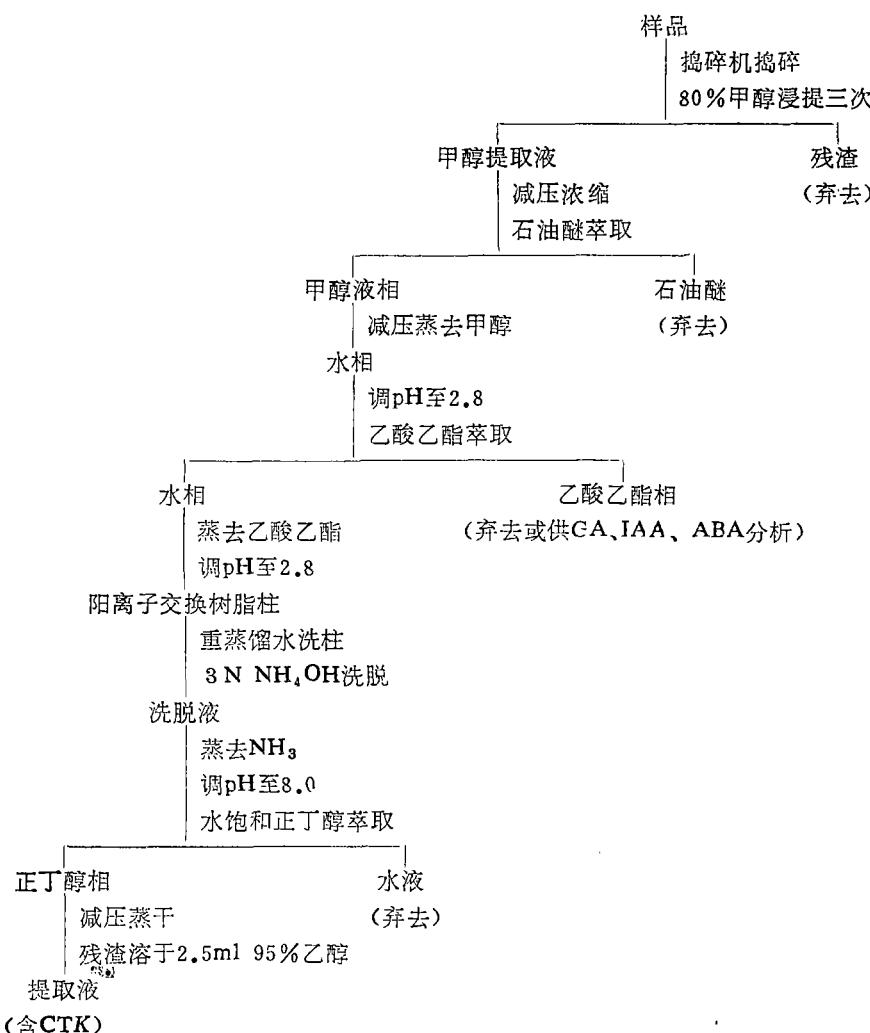


图1 荔枝花芽的细胞分裂素提取分离流程

行生物鉴定。不同浓度的激动素溶液会使尾穗苋黄化子叶合成不同浓度的苋红色素。在激动素溶液浓度为0.01~0.5ppm时，苋红溶液光密度与激动素溶液浓度的对数成比例关系^[1]。实验结束后用最小二乘法求出经验公式。根据测定的样本提取液的苋红溶液光密度（均值），可用经验公式算出相当的激动素浓度。经过换算便得到每100克材料鲜重所含的细胞分裂素相当的激动素的量。从而知道糯米糍荔枝花芽分化过程的内源细胞分裂素的变化动态。本实验未根据回收率对细胞分裂素水平作出校正。

试验结果

(一) 细胞分裂素的鉴定结果

1. 细胞分裂素的薄板层析：0.5毫升提取液在氧化铝薄板上经展开剂（正丁醇：氨水：水=15:0.1:1）展开后，在254mμ紫外分析仪下可以看到四个斑点（图2）

位于 R_F 0.9—1.0区段的暗斑为浓蓝黑斑。位于 R_F 0.7—0.8区段的暗斑为浓褐黑斑。其余两个暗斑为很淡的褐黑斑，特别是位于 R_F 0.3处的暗斑。对于薄板层析来说，某成分的 R_F 值和它在与大量的杂质一同存在时的 R_F 值不同，即杂质的存在会影响它的 R_F 值⁽³⁾。因而在鉴定样品的某一成分时，总是用已知成分作对照。

100微克标准玉米素在氧化铝薄板上展开后，在紫外光(254mμ)下于 R_F 0.8附近见到一浓褐黑斑(图3)。

由于提取液的 R_F 0.7—0.8区段的褐黑斑与位于标准玉米素板的 R_F 0.8附近的褐黑斑颜色相同， R_F 值相近，初步认为样本提取液板的 R_F 0.7—0.8区段的褐黑斑为细胞分裂素。这个判断由生物鉴定作进一步的证明。

2. 细胞分裂素的生物鉴定：提取液在氧化铝薄板上展开后，各区段用苋红合成法进行生物鉴定。结果表明，具明显生理活性的区段是 R_F 0.7—0.8及 R_F 0.8—0.9两个区段(图4)。 R_F 0.7—0.8区段就是有深褐黑斑的区段，但另一区段并未见斑点存在。

标准玉米素(0.8μg)在氧化铝薄板上展开后，各区段同样用苋红合成法进行生物鉴定，结果表明。具明显生理活性的区段亦是 R_F 0.7—0.8及 R_F 0.8—0.9两个区段(图5)。但是，这两个区段均未见斑点存在。

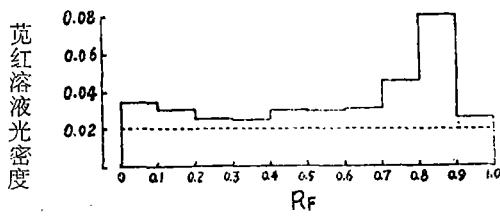


图4 提取液在氧化铝薄板上展开后各区段的活性(……为对照值)

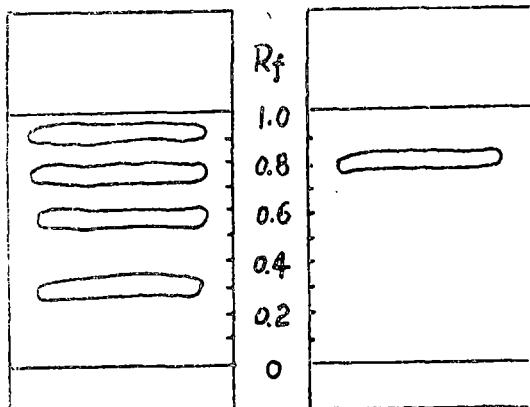


图2 提取液在氧化铝薄板上展开后的色谱图

图3 玉米素在氧化铝薄板上展开后的色谱图

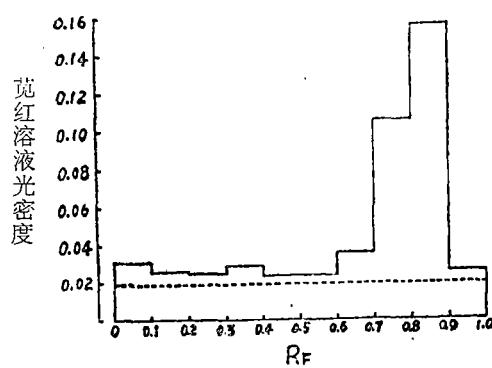


图5 玉米素在氧化铝薄板上展开后各区段的活性(……为对照值)

苋红合成法是专一性很强的一种细胞分裂素的生物鉴定方法。既然提取液及标准玉米素在氧化铝薄板上展开后具有相同的活性区段，可以认为，提取液展开后的 R_F 0.7—0.8及 R_F 0.8—0.9两区段含有的活性物质是细胞分裂素类物质。在测定不同时期花芽的细胞分裂素水平时就刮取 R_F 0.7—0.8及 R_F 0.8—0.9两区段，也就是 R_F 0.7—0.9区段的氧化铝粉来进行生物鉴定。

(二) 荔枝花芽分化过程中源细胞分裂素的变化动态

两组样本提取液在两个不同时间用苋红合成法测定它们的细胞分裂素水平。表1和

表 1 第一组样本提取液的细胞分裂素水平测定 测定年份：1981

测 号		1	3	5	7	9
采 样 日 期		11月27日	12月27日	1月26日	2月25日	3月27日
苋 红 溶 液 光 密 度 (Xi)	X ₁	0.052	0.080	0.098	0.055	0.041
	X ₂	0.054	0.071	0.094	0.037	0.037
	X ₃	0.058	0.086	0.071	0.052	0.031
	X ₄	0.060	0.044	0.094	0.075	0.036
	ΣX	0.224	0.281	0.357	0.219	0.145
	—X	0.056	0.070	0.089	0.055	0.036
激动素浓度当量 (ppm)		0.0189	0.0298	0.0550	0.0183	0.0099
μg激动素当量/100克鲜重		0.379	0.596	1.101	0.367	0.199

表 2 第二组样本提取液的细胞分裂素水平测定 测定年份：1981

测 号		2	4	6	8	10
采 样 日 期		11月27日	12月27日	1月26日	2月25日	3月27日
苋 红 溶 液 光 密 度 (Xi)	X ₁	0.042	0.083	0.074	0.065	0.040
	X ₂	0.061	0.064	0.101	0.066	0.043
	X ₃	0.074	0.097	0.106	0.030	0.024
	X ₄	0.071	0.055	0.085	0.049	0.031
	ΣX	0.248	0.299	0.366	0.210	0.138
	—X	0.062	0.075	0.092	0.053	0.035
激动素浓度当量 (ppm)		0.0270	0.0414	0.0725	0.0201	0.0111
μg激动素当量/100克鲜重		0.543	0.829	1.449	0.402	0.222

表 2 分别表示第一组样本提取液及第二组样本提取液的测定结果。

在测定每组样本提取液的生理活性的同时用苋红合成法测定一组不同浓度的标准激动素溶液的生理活性(四次重复)。由于激动素溶液浓度为0.01—0.5ppm时，激动素浓度增高，苋红溶液光密度亦随之增加。苋红溶液光密度(Y)与激动素溶液浓度(X)的对数成比例关系。用最小二乘法算出这两组不同浓度的激动素溶液与苋红溶液光密度相关的经验公式分别为：

第一组的经验公式：Y = 0.07124Lg X + 0.17871 (与第一组样本提取液同时测定)

第二组的经验公式：Y = 0.07001Lg X + 0.17180 (与第二组样本提取液同时测定)

根据测得的各组样本提取液的苋红溶液光密度(均值)，用相应的经验公式算出的激动素浓度当量如表 1 和表 2 所示。经过换算得到的每100克材料鲜重所含细胞分裂素的激动素当量也列于表 1 和表 2。从表 1 和表 2，可以得到如图 6 所示的两条趋势基本相同的糯米糍荔枝花芽分化过程内源细胞分裂素的变化动态曲线。

两条曲线共同表明：不同时期的荔枝花芽的细胞分裂素水平是不同的。从十一月到

次年一月，荔枝花芽中的细胞分裂素的含量逐渐增加，一月下旬达到高峰。到了二月下旬以后，花芽中的内源细胞分裂素含量很低。

讨 论

Luckwill^[8]曾描述过木质部汁液中的细胞分裂素在苹果花芽分化的临界期的作用，认为苹果长梢的顶芽和侧芽能否形成花原基取决于长梢停止生长时木质部汁液中的细胞分裂素的含量。

Agrawal和Ram在1980曾测定芒果花芽分化过程的内源细胞分裂素的变化。

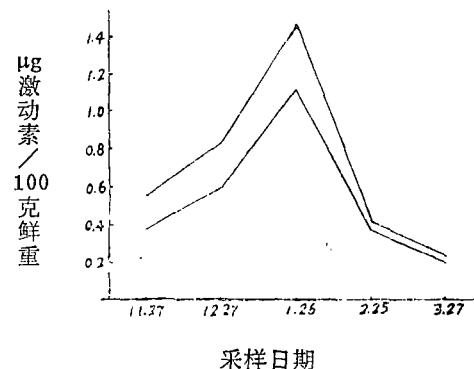
他们发现，大年芒果树梢尖中总的细胞分裂素从十一月中旬开始增加，到十二月中达到一个高峰。但是，小年芒果树梢尖中总的细胞分裂素没有这个变化，而且含量也比大年的少得多^[6]。已经有人报道，在北印度的条件下，十二月份最后一周是芒果花芽分化的一个临界时期。刚好在这个临界时期，芒果梢尖中总的细胞分裂素含量达到一个高峰。于是Agrawal和Ram认为，细胞分裂素对芒果的花芽分化可能会产生作用^[6]。

本文的研究结果表明，在糯米糍荔枝的花芽分化过程中，花芽中内源细胞分裂素在不断地变动着。从十一月到次年一月，花芽中的细胞分裂素含量逐渐增加，在一月下旬达到高峰，到二月下旬以后，花芽中细胞分裂素含量很低。

在广东的气候条件下，糯米糍荔枝在上述各月属于花芽分化的哪一个阶段尚未见报道。本试验的一项辅助性花芽形态解剖工作显示出，从12月13日起，秋梢顶芽生长锥已经变圆。也就是说，顶芽已进入了花芽分化的初期了。参照梁天干等^[4]关于龙眼和Shukla等^[11]关于荔枝花芽分化的报道。我们认为这个变圆了的顶芽已经形成了花序原基。到1月6日，花序原基已经变成了花序的雏形，在花序顶端生长锥两侧形成突起，这是侧生花序原基。随后，花序迅速发育，花序顶端的生长锥进一步伸长，分化出新的侧生花序原基，原来的侧生花序原基又形成了侧生花序的雏形。到1月26日，园锥花序的雏形已基本建成并转上如Shukla^[11]所示的花器官建成阶段。二月初，中旬，花芽作进一步的分化。到了2月23日，可以看到雌雄蕊已经形成了。

可知，在荔枝花芽形态建成过程中，内源细胞分裂素的含量在花芽进入分化初期及花序迅速发育期后逐渐增加。一月下旬以后，也就是到了花序要建成花器官的阶段以后，花芽中细胞分裂素的含量达到高峰，说明荔枝的花芽分化在这个分化复杂而激烈的阶段需要一定量的细胞分裂素。到了二月下旬，也就是形成了雌雄蕊以后，花芽中的细胞分裂素含量降了下来，说明在荔枝花芽分化快要结束的时候已经不需要多量的细胞分裂素了。

由于一月下旬以后，糯米糍荔枝的花芽分化处于一个决定花器官的建成的阶段，因



图六 糯米糍荔枝花芽分化过程内源细胞分裂素的变化动态

第一组样本提取液的变化曲线（下曲线）

第二组样本提取液的变化曲线（上曲线）

可以认为这个阶段是荔枝花芽分化的一个关键时刻。在这样的时候，荔枝花芽中的细胞分裂素达到最高水平，说明内源细胞分裂素与荔枝的花芽分化之间存在着密切的关系。初步认为，内源细胞分裂素在荔枝成花的生理过程中起了调节作用。或者说，花芽中细胞分裂素的存在促进了荔枝的花芽分化。这与前面论述过的细胞分裂素在苹果和芒果的花芽分化关键时刻起着重要的作用的看法是一致的。在荔枝花芽分化上的这个初步发现，进一步说明细胞分裂素会在果树成花过程中起重要作用。

参 考 文 献

- [1] 丁静等, 1979, 植物内源激素的提取分离和生物鉴定, 《植物生理学通讯》(2) : 27—39。
- [2] 广东省农业科学院主编, 1978, 《广东荔枝志》115—117, 广东省科学技术出版社。
- [3] 中国医学科学院药物研究所编著, 1978, 《薄层层离及其在中草药分析中的应用》68—69, 科学出版社。
- [4] 梁天干、陈玲玲, 1965, 福州红孩子龙眼花芽分化初步观察, 《园艺学报》4 (1) : 13—18。
- [5] 梁立峰, 1982, 植物激素与果树的花芽分化, 《植物生理学通讯》(4) : 1—6。
- [6] Agrawal, A. et al., 1980. Endogenous cytokinins of mango (*mangifera indica* L.) shottips & their significance in flowering. Indian Journal of Experimental Biology, 18, 504—509.
- [7] Hoad, G.V., 1980. The role of seed derived hormones in the control of flowering in apple. Acta Horticulture, 80, 93—103.
- [8] Luckwill, L.C., 1970. The control of growth and fruitfulness of apple trees. In Luckwill, L.C. et al.(ed.), Physiology of Tree crops, 237—254.
- [9] Pal, S. et al., 1978. Endogenous gibberellins of mango shottips and their significance in flowering. Scientia Horticulturae, 9, 369—379.
- [10] Ramirez, H. et al., 1978. Effect of succinic acid 2,2-dimethylhydrazide(SADH)and hormones on flower initiation in apple. In The effect of interactions between growth regulators on plant growth and yield. London, UK; British Plant Growth Regulator Group, (1978)Monograph No.2, 37—47, (From Hort. Abst. 50 : 167).
- [11] Shukla, R.K. et al., 1970. Blossom bud differentiation and ontogeny in litchi(*Litchi chinensis* Sonn.). Indian Journal of Horticulture, 31, 226—228.

FLUCTUATION OF ENDOGENOUS CYTOKININS CONTENTS IN THE DIFFERENTIATING FLOWER BUDS IN THE LITCHI(*Litchi chinensis* Sonn.)

Liang Lifeng Ji Zuoliang Puiman Lee

(Department of Horticulture)

ABSTRACT

In order to find the relationship between endogenous cytokinins contents in the developing buds and the process of floral differentiation of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) methods of extraction, isolation and bioassay of cytokinins in litchi developing buds were studied and the levels of endogenous cytokinins contents in these buds at different times were determined.

It was demonstrated that by thin layer chromatography and bioassay methods that there are cytokinins in the extract of developing buds in litchi. The levels of this endogenous hormone in the buds at different times were determined by bioassay in comparison with the biological activity of a series of standard solutions of kinetin of different concentrations and it is apparent that the cytokinins fluctuated in the process of floral bud formation in the No Mi Chi cultivar of litchi. The contents of cytokinins in these buds increased gradually from November to January of next year, the level being highest in the last ten days of January. The cytokinins contents became very low after the last ten days of February. Since January is the critical period for flower formation in litchi and the cytokinins in the buds reached highest at that time it can be postulated preliminarily that this endogenous hormone acts as a regulative agent in the process of flower formation in litchi and possibly plays a role in promoting flower bud differentiation.