

# 无刺花椒嫁接愈合过程中相关生理指标的变化

朱晓慧<sup>1</sup>, 杨途熙<sup>2\*</sup>, 魏安智<sup>2</sup>, 冯世静<sup>2</sup>, 蒋弘刚<sup>2</sup>, 侯娜<sup>3</sup>, 刘永红<sup>2</sup>

(1. 西北农林科技大学 生命科学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100;  
3. 贵州省林业科学院, 贵州 贵阳 550005)

**摘要:**以“无刺花椒/凤县大红袍”、“凤县大红袍/凤县大红袍”2种嫁接组合为试验材料,研究了花椒嫁接体愈合过程中 POD 酶、PPO 酶活性及 IAA、总酚、可溶性糖含量的变化。结果表明,在愈合过程中,嫁接体接合部的 POD 酶、PPO 酶活性及 IAA 含量随愈合时间的延长呈“先增加后降低”的变化,其中在嫁接后的第 14 天增加显著,且达到最大。愈合植株及未愈合植株接合部的总酚含量均随着时间的延长而增加,但未愈合植株的总酚含量显著高于愈合植株。愈合植株接合部的可溶性糖含量随着时间的延长而逐渐减少,而未愈合植株中可溶性糖含量逐渐增加,至嫁接后第 22 天,未愈合植株中可溶性糖含量显著高于愈合植株。POD 酶和 IAA 含量的增加有利于接合部的愈合,而总酚的累积不利于愈合。嫁接后的 2 周是花椒愈合的关键时期。

**关键词:**花椒;接合部;过氧化物酶;多酚氧化酶;生长素;总酚;可溶性糖

**中图分类号:**S723.2      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2015)02-0134-05

## Changes of Relative Physiological Indices Involved in the Graft Union Development of *Zanthoxylum bungeanum*

ZHU Xiao-hui<sup>1</sup>, YANG Tu-xi<sup>2\*</sup>, WEI An-zhi<sup>2</sup>, FENG Shi-jing<sup>2</sup>, JIANG Hong-gang<sup>2</sup>,  
HOU Na<sup>3</sup>, LIU Yong-hong<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 3. Guizhou Academy of Forestry, Guiyang, Guizhou 550005, China)

**Abstract:** In this study, changes of auxin, phenol and soluble sugar content, activities of peroxidase and polyphenol oxidase were monitored in the graft union development of *Zanthoxylum bungeanum* with Wuci-huajiao as scion and Dahongpao as stock. Meanwhile, Dahongpao was self-grafted, which was taken as the control. The results showed that the activity of peroxidase, polyphenol oxidase and auxin increased at first and then decreased. They increased significantly and reach max at 14 d. Phenols content in healed and unhealed plants kept increasing, while in unhealed plants it was significantly higher than healed plants. Soluble sugar content in healed plants decreased gradually. However, it kept increasing in the unhealed plants, which became significantly high compared to healed plants at 22 d. These results suggested that increased peroxidase and polyphenol oxidase activities, auxin content might be favorable to graft union development in *Z. bungeanum*, and the accumulation of phenols might be unfavorable to graft union development. The crucial healing time of *Z. bungeanum* is 2 weeks after grafting.

**Key words:** *Zanthoxylum bungeanum*; graft union; peroxidase; polyphenol oxidase; auxin; phenols; soluble sugar

收稿日期:2014-06-03 修回日期:2014-07-18

基金项目:西北农林科技大学项目(TGZX2012-07、XNY2013-10)。

作者简介:朱晓慧,女,硕士研究生,研究方向:植物资源开发与利用。E-mail:zhuxiaohui0815@126.com

\* 通信作者:杨途熙,男,副教授,硕士生导师,研究方向:植物资源开发与利用。E-mail:y2848@126.com

花椒(*Zanthoxylum bungeanum*)为芸香科、花椒属植物,是我国重要的经济林树种。花椒不仅果皮可作为调味品,而且果实、根、茎和叶都可药用<sup>[1]</sup>。我国生产上栽培的花椒品种大多有皮刺,导致采摘不便。特别是近年来,随着我国劳动力价格的快速增长,因采摘不便所带来的采收成本增加,已成为了制约花椒产业持续发展亟待解决的突出问题。而通过嫁接,繁育和推广无刺花椒良种,对于解决采摘困难、提高花椒的种植效益具有重要意义。目前,国内外对无刺花椒嫁接技术虽有报道,如郭伟珍<sup>[2]</sup>等以葡萄山椒、朝仓山椒和琉锦山椒为接穗嫁接国内1、2、3、5 a 花椒实生苗,发现嫁接时间和砧木年龄对嫁接成活率影响显著,1年生砧木的嫁接成活率最高,并且及时去除砧木上萌芽可显著提高山椒嫁接成活率。但未见有关无刺花椒嫁接愈合机理的研究。以凤县大红袍花椒实生苗为砧木、以无刺花椒为接穗,对嫁接愈合过程中的相关生理指标变化进行了探讨,以期对无刺花椒嫁接愈合机理的研究和嫁接技术的改进提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验所用砧木为2012年3月采用种子播种繁育获得的凤县大红袍1年生实生苗;嫁接所用凤县大红袍接穗,采自陕西凤县当地4年生的凤县大红袍花椒园;嫁接所用无刺花椒接穗,采自4年生无刺花椒,2007年从河北省涉县林业局引进。

### 1.2 试验方法

1.2.1 接穗的采集与处理 2013年2月10日,在4年生无刺花椒和4年生凤县大红袍花椒树冠外围,采集充分木质化的1年生枝条为接穗。采集后,将接穗剪成长度50 cm左右的枝段,并按50根1捆进行捆扎后进行沙藏,以待嫁接。嫁接时,取出接穗,去除接穗上的皮刺后,将其蹲入底部盛有浅水的水桶中,使水浸没接穗底部2~3 cm左右,以防接穗失水。

1.2.2 砧木的选择与处理 选择生长健壮、距离地面高度10 cm处直径在0.4 cm以上的1年生凤县大红袍实生苗作为砧木。嫁接1周前,对砧木浇透水1次。嫁接时将砧木距离地面剪留30 cm左右,并捋去砧木上的皮刺。

1.2.3 嫁接时间与方法 嫁接于2013年3月28日(晴天)进行;嫁接方法是,在砧木上距离地面10 cm左右处采用带木质嵌芽接法进行嫁接,露芽绑扎。

1.2.4 采样与样品处理 嫁接7 d后,检查成活情况,并分别选择愈合的“无刺花椒与凤县大红袍砧木嫁接苗(A1组)”、“凤县大红袍与凤县大红袍砧木嫁接苗(A0组)”各60株,嫁接薄膜内有水汽且接穗的芽没干枯或长出嫩叶的植株定为愈合植株,嫁接薄膜内无水汽且接穗芽干枯的植株为未愈合植株。在嫁接后的7、14、22 d和29 d,取试验株上嫁接愈合部位枝段(长约2 cm)作为试样。采样后立即在液氮中速冻,并带回实验室,于超低温冰箱中-80℃保存,以用于过氧化物酶、多酚氧化酶和生长素(IAA)活性测定;在嫁接后的7、14、22、29 d和36 d,分别采A0组愈合植株结合部和A1组愈合与未愈合植株接合部,并带回实验室,用于测定总酚和可溶性糖含量。每次采样时,A0组和A1组各在3株试验株上采样。

### 1.3 生理指标测定

1.3.1 过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)和生长素(IAA)活性测定 将整个接合部剪碎液氮研磨,测定POD、PPO活性和IAA含量。其中,PPO活性按照刘军伟<sup>[3]</sup>等的方法测定;POD活性按照李合生<sup>[4]</sup>等的方法测定。将上述2种方法中活性的计算略作修改,以1 min内1 g鲜重样品对吸光度降低0.1为1个酶活力单位(U)。IAA含量按照高俊凤<sup>[5]</sup>等的固相抗原型ELISA法测定。

1.3.2 总酚和可溶性糖含量测定 可溶性糖含量按照高俊凤<sup>[5]</sup>等的蒽酮比色法测定;总酚含量按照刘倩<sup>[6]</sup>等的Folin-Ciocalteu比色法测定。

### 1.4 数据处理

用Microsoft Excel软件进行数据处理和作图,用PASW Statistics 18软件对数据进行单因素方差分析,用Duncan检验法进行差异显著性( $p < 0.05$ )检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 嫁接愈合过程中POD和PPO活性及IAA含量

在嫁接愈合过程中,A0组和A1组的POD活性都呈“先增加后降低”的变化趋势。其中,在第14天时POD活性增加最为显著,且达到最大。至第22天时,POD活性虽有降低,但仍维持在较高的显著水平(图1)。

在嫁接愈合过程中A0组和A1组植株多酚氧化酶活性都呈“先增加后降低”的变化趋势。其中,在第14天多酚氧化酶活性显著增加,达到最大值后,又于第22天显著降低(图2)。

在嫁接愈合过程中,A0组和A1组的IAA含

量都呈“先增加后降低”的变化,在第 14 天增加显著,并达到最大,随后又显著降低(图 3)。

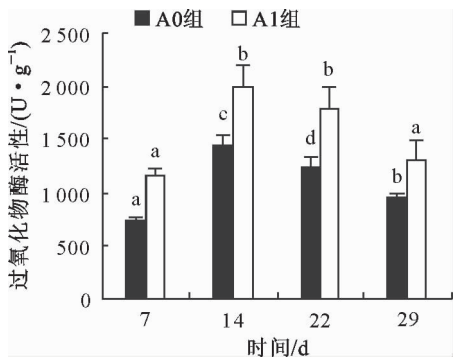


图 1 嫁接后过氧化物酶活性的变化

Fig. 1 Changes of peroxidase activity after grafting

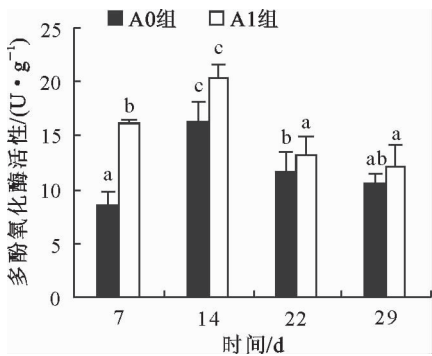


图 2 嫁接后多酚氧化酶活性的变化

Fig. 2 Changes of polyphenol oxidase activity after grafting

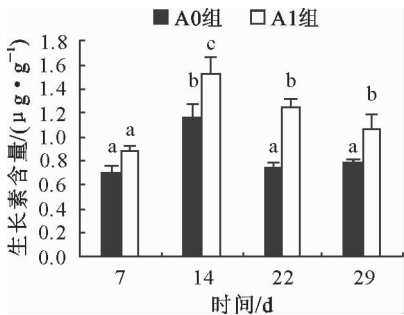


图 3 嫁接后生长素含量的变化

Fig. 3 Changes of auxin content after grafting

2.2 嫁接愈合过程中总酚和可溶性糖含量的变化

图 4 表明,A0 和 A1 组的未愈合植株嫁接部位总酚含量随时间的延长都呈增加的变化趋势。在试验所观察的 4 个时间点中,A1 组中未愈合植株嫁接部位总酚含量显著高于 A0 组和 A1 组愈合植株;在嫁接后的第 22 天,A1 组愈合植株中总酚含量也显著高于 A0 组,在第 14 天到第 22 天这段时间内,未愈合植株中总酚含量出现较大的增加,增幅为 58.99%,同时 A0 组和 A1 组的愈合植株中的增幅分别为 10.24%和 24.00%。上述结果说明,总酚的大量积累不利于接合部的愈合。

图 5 表明,嫁接后,随着时间的延长,A0 组 A1 组愈合植株中可溶性糖的含量变化均呈逐渐减少的趋势,而未愈合植株中可溶性糖含量呈持续增加的变化趋势;在试验所观察的 4 个时间点中,第 14 天时,三者中可溶性糖含量差异不显著,随着接合部愈合时间的增加,在第 22 天、第 29 天和第 36 天时未愈合植株中可溶性糖含量显著高于 A0 组和 A1 组的愈合植株。并且在第 22 天和第 36 天时,A1 组愈合植物中可溶性糖含量也显著高于 A0。表明接合部中出现可溶性糖的大量积累也不利于其愈合。

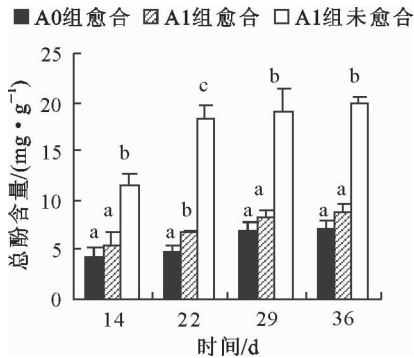


图 4 愈合和未愈合植株中总酚含量的变化

Fig. 4 Changes of phenol content in healed and unhealed plants

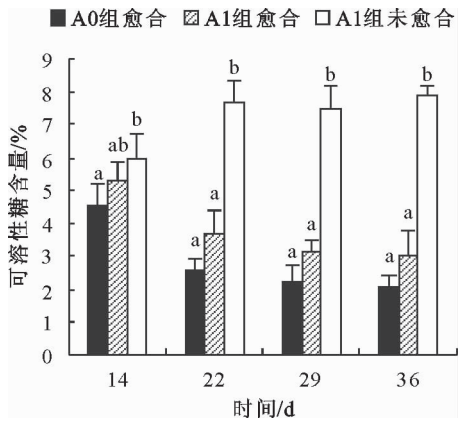


图 5 愈合和未愈合植株中可溶性糖含量的变化

Fig. 5 Changes of soluble sugar content in healed and unhealed plants

3 讨论

在嫁接接合部的发育过程中,可以将其分为以下 3 个阶段:1)产生大量愈伤组织,充满砧木和接穗之间的间隙。2)愈伤组织分化,形成新的形成层。3)新的形成层分化产生新的维管组织<sup>[7]</sup>。在不同的阶段都会有相关的生理物质发挥作用,才能保证嫁接愈合过程中各个阶段的顺利进行。

在嫁接接合部新维管组织的分化过程中,会出现木质部和韧皮部的分化和木质化,很多研究也表

明,POD 具有促进木质化、对感病与机械损伤等伤害的保护作用<sup>[8]</sup>,杨冬冬<sup>[9]</sup>等在西瓜嫁接体发育中对木质素合成和相关酶的研究显示,POD 活性的增加和木质素的合成是相关的,所以试验结果中活性大量增加的 POD 可能是来参与细胞中大量的木质化反应的。这也正说明了在嫁接后 14 d 内 A0 和 A1 接合部中过氧化物酶活性增加可能的原因,表明接合部中 POD 活性的增加可促进结合部的愈合。S. Zajackowski<sup>[15]</sup>等和杨冬冬<sup>[9]</sup>等分别对西红柿和西瓜嫁接体发育中 POD 活性动态的测定也表明,嫁接后 15 d 内,POD 的活性呈增加的趋势,本研究结果与其研究一致。

PPO 是植物体中一种普遍存在的末端氧化还原酶<sup>[10]</sup>,属于次生代谢防御酶,主要在接合部愈合初期发挥作用,将多酚类化合物氧化成活性醌,醌自发聚合和蛋白质中的氨基酸发生集团反应,产生黑色和褐色物质,从而形成隔离层<sup>[3,11]</sup>,保护伤口。隔离层能防止水分蒸发,保护伤口不受有害物质侵入,但是,隔离层如果太宽太厚就会影响愈合,降低成活率。所以试验结果显示嫁接后多酚氧化酶活性在 2 周内一直增加,表明其对于砧木和接穗切口的保护。在接来下的 2 周内,多酚氧化酶活性出现显著降低。也有研究表明,在不亲和嫁接组合中酶活性比在亲和嫁接组合中高,持续时间长<sup>[12]</sup>,这说明持续保持多酚氧化酶的高活性也是不利于接合部的愈合的,本文中结果与其一致。

IAA 的作用是促进植株细胞分裂、伸长和分化<sup>[13]</sup>,而在嫁接后接穗和砧木之间会产生大量的愈伤组织,所以试验中 2 周内大量增加的 IAA 主要参加愈伤组织的分化。试验结果显示,在嫁接后的 2 周内生长素含量一直增加,且在第 14 天达到显著水平,因为在嫁接初期需要生长素诱导产生大量愈伤组织,从而充满砧木和接穗之间的空隙,并且在维管束分化时也需要生长素参与,卢善发<sup>[27]</sup>等在番茄嫁接中也观测到,在维管束桥分化形成时出现生长素含量的高峰期,所以生长素主要在愈伤组织的形成和维管束分化时发挥作用,曲云峰<sup>[14]</sup>等在大扁杏嫁接部位生化物质含量变化的研究中也发现,在嫁接 1 周后 IAA 含量开始增加。在随后的 2 周内生长素含量一直减少,可能是接合部中细胞将多余的生长素向下端转移。生长素作为一种形态建成物质,向下运输才能组织整个植物形态模式<sup>[15]</sup>,并且过多的生长素有可能抑制接合部新叶的生长。

酚类物质是植物次生代谢产物,普遍存在于高等植物中<sup>[16]</sup>。酚类物质也影响接合部的愈合。试

验结果显示,未愈合植株中总酚出现大量累积,而 A0 组和 A1 组愈合植株中总酚也有增加,但是增幅不如未愈合植株中大,表明酚类物质的大量累积不利于植株接合部愈合,史俊燕等也在酚类物质对核桃嫁接成活率影响的研究中发现,酚类物质含量与嫁接成活率负相关<sup>[17]</sup>。酚类物质参与木质素合成,但也易被氧化成有毒物质,导致蛋白质沉淀<sup>[18]</sup>;同时,也能影响愈伤组织的分化<sup>[19]</sup>,诱导愈伤组织亚细胞水平上的解体从而造成细胞损伤<sup>[20]</sup>,进而影响嫁接亲和性。A. Errer<sup>[21]</sup>等和 A. Pina<sup>[22]</sup>等在杏的嫁接研究中也发现不亲和嫁接组织中出现酚类物质的大量累积,本文结果与他们的研究一致。

接合部的愈合过程是一系列的消耗能量的过程,所以,可溶性糖作为能源物质参与到接合部的愈合过程中。本试验结果中,愈合植株接合部中可溶性糖含量的持续减少可能是由于在砧木和接穗之间恢复正常物质交流之前,接合部中愈伤组织产生、分化和维管组织形成等过程需要消耗可溶性糖以提供能量。而未愈合植株接合部可溶性糖的含量的持续增加,可能是由于接合部维管组织分化不完全或者是没有分化,所以造成可溶性糖的累积。王瑞<sup>[23]</sup>等对油茶的嫁接愈合过程的研究也显示,在嫁接后 40 d 内可溶性糖含量在砧木和接穗中均呈下降趋势,本试验嫁接部愈合植株中可溶性糖含量变化趋势也与其一致。

## 4 结论

无刺花椒嫁接接合部在愈合过程中,POD 酶和 PPO 酶活性、IAA 含量均呈“先增加后降低”的变化,并在嫁接后的第 14 天达到最大,表明嫁接后的 2 周是花椒嫁接愈合的关键时期,在嫁接后 2 周内 POD 酶活性的增加和 IAA 水平的提高,有利于促进花椒嫁接体的愈合;而酚类物质的大量累积不利于嫁接植株的愈合。

## 参考文献:

[1] 黄成就. 中国植物志(第 43 卷第 2 分册)[M]. 北京:科学出版社,1997.  
HUANG C J. Flora of China[M]. Beijing: Science Press, 1997.

[2] 郭伟珍,赵京献,曹军合,等. 山椒嫁接育苗技术研究[J]. 北方园艺,2013(14):46-49.  
GUO W Z, ZHAO J X, CAO J H, *et al.* Study on seedling raising technique of zanthoxylum piperitum by grafting[J]. Northern Horticulture, 2013(14):46-49. (in Chinese)

[3] 刘军伟,胡志和,苏莹. 紫薯中多酚氧化酶活性的研究及褐变控制[J]. 食品科学,2012,33(17):207-211.

LIU J W, HU Z H, SU Y. Activity and browning inhibition of polyphenol oxidase from purple sweet potato[J]. Food Science, 2012, 33(17):207-211. (in Chinese)

[4] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2000.

LI H S. The experiment principle and technique on plant physiology and biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000. (in Chinese)

[5] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 2006.

GAO J F. Experimental guidance for plant physiology[M]. Beijing: Higher Education, 2006.

[6] 李倩, 刘子衿, 叶燕彬, 等. 分光光度法测定仙鹤草总酚含量的方法研究[J]. 首都医科大学学报, 2012, 33(1):107-109.

LI Q, LIU Z J, YE Y B, *et al.* Study on determining of total polyphenols content in *Agrimonia pilosa* Ledeb. by the spectrophotometry[J]. Journal of Capital Medical University, 2012, 33(1):107-109. (in Chinese)

[7] PINA A, ERREA P. A review of new advances in mechanism of graft compatibility-incompatibility[J]. Scientia horticulturae, 2005, 106(1):1-11.

[8] 卢善发. 番茄/番茄嫁接体发育过程中的过氧化物酶同工酶[J]. 园艺学报, 2000, 27(5):340-344.

LU S F. Peroxidase isoenzymes in tomato/tomato graft union[J]. Acta Horticulturae, 2000, 27(5):340-344. (in Chinese)

[9] 杨冬冬, 黄丹枫. 西瓜嫁接体发育中木质素合成及代谢相关酶活性的变化[J]. 西北植物学报, 2006, 26(2):290-294.

YANG D D, HUANG D F. Lignin contents and the activities of enzymes related to lignin biosynthesis in the stock and scions of watermelon after grafting[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26(2):290-294. (in Chinese)

[10] ZHANG Z F, LU J, ZHENG Y L, *et al.* Purple sweet potato color protects mouse liver against d-galactose-induced apoptosis via inhibiting caspase-3 activation and enhancing PI3K/Akt pathway[J]. Food Chem. Toxicol, 2010, 48(8): 2500-2507.

[11] HASLAM E, VEGETABLE TANNINS, SWAIN T, *et al.* Biochemistry of plant phenolics (Rec Adv Phytochem 12) [M]. Plenum Press; New York & London, 1979:475-523.

[12] 张蜀秋, 杨世杰, 马龙彪. 嫁接组合形成过程中两种酶活性的动态变化[J]. 北京农业大学学报, 1990, 16(2):149-152.

ZHANG S Q, YANG S J, MA L B. The changes of two enzymes activities during the developmental process of graft unions[J]. Acta Agriculturae Universitatis Pekinensis, 1990, 16(2):149-152. (in Chinese)

[13] 贺学礼. 植物生物学[M]. 北京:科学出版社, 2009.

HE X L. Plant biology[M]. Beijing: Science Press, 2009. (in Chinese)

[14] 曲云峰, 赵忠, 彭少兵, 等. 大扁杏嫁接部位形成层生化物质含量变化研究[J]. 西北林学院学报, 2008, 23(2):73-76.

QU Y F, ZHAO Z, PENG S B, *et al.* Variations of several biochemical substance in cambium of grafted armeniaca vulgaris[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2008, 23(2):73-76. (in Chinese)

[15] ZAJACZKOWSKI S, WODZICKI T J, BRUINSMA J. A possible mechanism for whole plant morphogenesis[J]. Physiologia Plantarum, 1983, 57(2):306-310.

[16] BROUILLARD R, DANGLES O, HARBORNE J. The flavonoids: advances in research since 1986[M]. London: Chapman & Hall, 1994:565-588.

[17] 史俊燕, 樊金拴, 严江. 酚类物质及其相关酶对核桃嫁接成活的影响[J]. 西北林学院学报, 2005, 20(1):80-83.

SHI J Y, FAN J S, YAN J. The effect of polyphenol and relative enzyme on walnut grafting[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2005, 20(1):80-83. (in Chinese)

[18] HASLAM E. Plant polyphenols: vegetable tannins revisited [M]. London: Cambridge University Press, 1989.

[19] ERREA P, FELIPE A, TREUTTER D, *et al.* Flavanol accumulation in apricot grafts as a response to incompatibility stress[J]. International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance, 1993, 381:498-501.

[20] ERREA P, TREUTTER D, FEUCHT W. Characterization of flavanol type-polyphenols in apricot cultivar and rootstocks [J]. Advances in Horticultural Science, 1994, 8(3): 165-169.

[21] PINA A, ERREA P, MARTENS H J. Graft union formation and cell-to-cell communication via plasmodesmata in compatible and incompatible stem unions of *Prunus* spp. [J]. Scientia Horticulturae, 2012, 143:144-150.

[22] ERREA P, GARAY L, MARÍN J A. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using in vitro techniques[J]. Physiologia Plantarum, 2001, 112(1): 135-141.

[23] 王瑞, 陈永忠, 王湘南. 油茶芽苗砧嫁接愈合过程中砧穗相关生理指标的研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2014, 42(1):46-50.

WANG R, CHEN Y Z, WANG X N, *et al.* Dynamic changes in physiological indexes of *Camellia oleifera* nurse seed graft in the grafting and recovering process[J]. Journal of Northwest A&F University: Nat. Sci. Edi., 2014, 42(1): 46-50. (in Chinese)