

# 荔枝花芽分化过程中多胺、核酸和蛋白质的动态<sup>\*</sup>

肖华山<sup>1\*\*</sup> 吕柳新<sup>2</sup> 陈志彤<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>福建师范大学闽南科技学院 福建泉州 362332; <sup>2</sup>福建农林大学园艺学院 福州 350002; <sup>3</sup>福建农业科学院 福州 350001)

**摘 要** 荔枝茎尖由营养生长转变为生殖生长时,多胺含量达到高峰(115.79 nmol g<sup>-1</sup>, FW),该过程先于核酸和蛋白质的大量合成,表明多胺影响了 DNA 的复制、转录和翻译。成熟秋梢叶片不含腐胺(Putrescine, Put),但含亚精胺(Spermidine, Spd)和精胺(Spermine, Spm),其 F/L 的比值维持在 1~3;叶片中可溶性蛋白的含量随顶芽或花(序)芽中含量的增加而增加,其相关系数  $R=0.929\ 4$ ,表明叶片含氮化合物的代谢对荔枝茎尖由营养生长转变为生殖生长及其发育过程极为重要。图 1 表 3 参 19

**关键词** 荔枝;花芽;多胺;核酸;蛋白质

**CLC** S667.101

## Dynamic Changes in Polyamine, Nucleic Acid and Proteins During the Differentiation of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Floral Bud<sup>\*</sup>

XIAO Huashan<sup>1\*\*</sup>, LÜ Liuxin<sup>2</sup> & Chen Zhitong<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Minnan Science and Technology, College of Bioengineering, Fujian Normal University, Quanzhou 350007, Fujian, China)

(<sup>2</sup>College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

(<sup>3</sup>Fujian Agricultural Academy of Sciences, Fuzhou 350001, China)

**Abstract** The content of polyamine increased to a peak level between leaf bud stage and primary panicle development of litchi, which occurred earlier than the mass-synthesis of nucleic acid and proteins. Therefore, polyamine might affect floral development by regulating the synthesis of biological macromolecule. The contents of Spm, Spd and soluble proteins in the mature top leaf increased along with the increasing of Spm, Spd and soluble proteins in terminal buds or floral buds. It showed that the metabolism of nitrogenous compounds in leaf was vital for stem apex shifting from nutritive growth to reproductive growth. Thus, this article offers theoretic basis for using nitrogenous fertilizer or urea to facilitate the differentiation of litchi floral buds. Fig 1, Tab 3, Ref 19

**Keywords** litchi; floral bud; polyamines; nucleic acid; proteins

**CLC** S667.101

果树成花是果树个体发育过程中极为重要的组成部分,它直接关系到果树生产的产量和质量。花芽分化过程中的形态变化与其内部的生化变化密切相关,尤其是一些调节植物生长发育的物质以及核酸、蛋白质等生命大分子的动态变化,对花芽的发育和分化起着重要作用。因此,研究花芽分化的生化基础有助于我们对发育过程的了解,从而调控发育的过程。作者曾对荔枝花发育过程中雌雄蕊碳氮化合物的动态变化、花芽分化过程的细胞超微结构、雌花发育期蛋白质的特性、花发育过程中雌雄蕊内源激素的动态变化进行了研究<sup>[1~4]</sup>,但有关荔枝花芽分化过程中多胺、核酸和蛋白质的动态变化研究仍还欠缺<sup>[5~12]</sup>。本文就荔枝由营养生长转变为生殖生长过程中多胺、核酸和蛋白质的动态变化进行分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

采自栽培在福建农林大学校园内的荔枝,品种为元红(*Litchi chinensis* cv. Yuanhong)。取不同发育时期花芽,根据石蜡

切片和显微观察,并参考季作梁等<sup>[5]</sup>对荔枝花芽分化不同阶段的区分,取材时间为:Ⅰ. 叶芽期(2000年12月8日);Ⅱ. 圆锥花序分化初期(2001年1月2日);Ⅲ. 圆锥花序发育期(1月15日);Ⅳ. 圆锥花序发育后期(2月8日);Ⅴ. 花器官分化期(2月19日)。选择生长正常、具有花芽的树8株,当秋梢老熟时,自2000年12月8日至翌年3月下旬,每隔10~15 d 取样1次,采样部位为当年生秋梢顶芽,后期采集花穗上的一个小花序,叶片取距顶芽的第3成熟复叶第2~3对小叶。样品经液氮处理后贮于-85℃冰箱中备用。

### 1.2 多胺含量测定

取0.5 g材料加5 mL预冷的5%过氯酸匀浆,冰浴中放置30~60 min,1 000×g低温(0~4℃)离心20 min,取上清液测定多胺含量<sup>[13]</sup>。采用高效液相色谱法(HPLC),参照 Redmond<sup>[14]</sup>的方法略加改进。腐胺(Put)、亚精胺(Spd)和精胺(Spm)标样均为Sigma产品。高效液相色谱仪为Beckman 338型,紫外检测器波长为254 nm,色谱柱为C18反相柱(ODS 4.6×250 mm),流动相为甲醇:乙腈:水=65:5:31,流速0.5 mL min<sup>-1</sup>。柱温25℃,进样量为20 μL,用外标法定量计算。每个样品重复3次。

收稿日期:2005-04-18 接受日期:2005-07-11

\* 福建省自然科学基金计划资助项目(No. B0310005) Supported by the Natural Science Foundation of Fujian, China (No. B0310005)

\*\* 通讯作者 Corresponding author (E-mail: xiaohs2002@yahoo.com.cn)

1.3 核酸和蛋白质含量测定

核酸和蛋白质含量测定基本按照朱治平<sup>[15]</sup>等方法,用紫外吸收法测定总核酸和蛋白质含量,二苯胺显色法测定 DNA 含量,从总的核酸含量中减去 DNA,即得 RNA 含量;小牛胸腺作标准样品. 仪器为 WF2800 - D30,北京瑞丽分析仪器公司. 每个样品重复 3 次,2 年重复.

2 结果

表 1 荔枝花芽发育过程多胺含量的变化

Table 1 Changes in polyamine content (b/nmol g<sup>-1</sup>, FW) during the development of litchi floral bud

| 发育时期<br>Developmental stage | 腐胺 Putrescine (Put) |   |     | 亚精胺 Spermidine (Spd) |              |      | 精胺 Spermine (Spm) |             |      |
|-----------------------------|---------------------|---|-----|----------------------|--------------|------|-------------------|-------------|------|
|                             | F                   | L | F/L | F                    | L            | F/L  | F                 | L           | F/L  |
| I                           | 0.55 ± 0.04         | 0 | /   | 51.65 ± 2.35         | 16.57 ± 1.93 | 3.11 | 9.77 ± 1.16       | 1.11 ± 0.21 | 8.80 |
| II                          | 0                   | 0 | 0   | 66.28 ± 4.13         | 17.13 ± 1.21 | 3.87 | 49.51 ± 2.95      | 9.02 ± 1.80 | 5.49 |
| III                         | 0.86 ± 0.06         | 0 | /   | 47.89 ± 2.19         | 30.01 ± 2.66 | 1.60 | 4.26 ± 0.31       | 2.92 ± 0.34 | 1.46 |
| IV                          | 0.82 ± 0.05         | 0 | /   | 51.24 ± 3.13         | 40.32 ± 1.15 | 1.27 | 3.51 ± 0.17       | 2.15 ± 0.18 | 1.63 |
| V                           | 1.55 ± 0.10         | 0 | /   | 59.64 ± 2.29         | 16.44 ± 1.59 | 3.63 | 4.35 ± 0.18       | 2.62 ± 0.21 | 1.66 |
| F                           | 47.25               | / | /   | 8.20                 | 47.34        | /    | 217.39            | 23.44       | /    |
| P                           | <0.01               | / | /   | <0.01                | <0.01        | /    | <0.01             | <0.01       | /    |

I. 叶芽期 Leaf bud; II. 圆锥花序分化初期 Panicle initiation; III. 圆锥花序发育期 Panicle development; IV. 圆锥花序发育后期 Later stage of panicle development; V. 花器官分化期 Floral organ initiation. F: 花芽 Floral bud; L: 叶 Leaf. 下同 The same below

2.2 核酸含量的变化

在荔枝花芽分化过程中,顶芽或花(序)原基中的总核酸含量随着发育进程逐渐增加(表 2),到圆锥花序发育后期和花器官分化期,其含量达到高峰并趋于稳定( $P < 0.01$ ). 同时期,叶中总核酸含量的变化不大,维持在 1 000  $\mu\text{g g}^{-1}$  (FW) 左右( $P > 0.05$ ). 核酸 F/L 比值持续上升,也说明花芽分化时,花原基合成核酸的量大于叶片. DNA 含量除了在圆锥花序分化初

2.1 多胺含量的变化

由表 1 可知,在不同的发育时期,顶芽或花(序)原基多胺的含量比叶片高. 从叶芽期到圆锥花序发育期是营养生长转变为生殖生长的关键时期,此时顶芽中 Spd 和 Spm 含量持续增长,到圆锥花序发育初期达到高峰,同时叶片中 Spd 和 Spm 含量也随之增加. 统计分析表明,除了叶片的 Put 含量外,不同发育时期的顶芽和叶片的多胺含量具有极显著差异.

期有一上升外,基本保持相对稳定( $P > 0.05$ ). 细胞中的 DNA 主要存在于细胞核中,因此,在整个花芽发育过程中,染色体倍数如无变化,每个细胞的 DNA 含量就不会有明显的变化. 但 RNA 含量的变化趋势却与总核酸含量变化相似( $P < 0.01$ ),即随着发育进程而增加,说明 RNA 的大量合成是细胞分化和花器官发育所必需的.

表 2 荔枝花芽发育过程中核酸含量的变化

Table 2 Changes in nucleic acid content (w/ $\mu\text{g g}^{-1}$ , FW) during the development of litchi floral bud

| 发育时期<br>Developmental stage | Nuclear acid    |                 |     | DNA           |               |     | RNA            |               |     |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----|---------------|---------------|-----|----------------|---------------|-----|
|                             | F               | L               | F/L | F             | L             | F/L | F              | L             | F/L |
| I                           | 1288.8 ± 17.35  | 951.6 ± 14.67   | 1.4 | 727.6 ± 22.12 | 406.9 ± 13.47 | 1.8 | 561.2 ± 8.24   | 544.7 ± 23.18 | 1.0 |
| II                          | 1424.4 ± 67.30  | 1057.9 ± 70.06  | 1.3 | 865.1 ± 22.45 | 644.0 ± 18.84 | 1.3 | 559.3 ± 22.96  | 413.9 ± 20.75 | 1.4 |
| III                         | 1723.7 ± 60.86  | 810.0 ± 28.69   | 2.1 | 689.8 ± 14.34 | 452.7 ± 14.23 | 1.5 | 1033.9 ± 61.21 | 357.3 ± 40.45 | 2.9 |
| IV                          | 2334.2 ± 188.81 | 1117.2 ± 154.96 | 2.1 | 636.0 ± 24.25 | 414.9 ± 29.64 | 1.5 | 1698.2 ± 94.40 | 702.3 ± 17.32 | 2.4 |
| V                           | 2340.1 ± 140.76 | 905.7 ± 11.03   | 2.6 | 727.6 ± 26.89 | 361.0 ± 22.07 | 2.0 | 1612.5 ± 38.67 | 544.7 ± 15.59 | 3.0 |
| F                           | 36.12           | 0.003           | /   | 1.85          | 3.14          | /   | 6.81           | 69.17         | /   |
| P                           | <0.01           | >0.05           | /   | >0.05         | >0.05         | /   | <0.01          | <0.01         | /   |

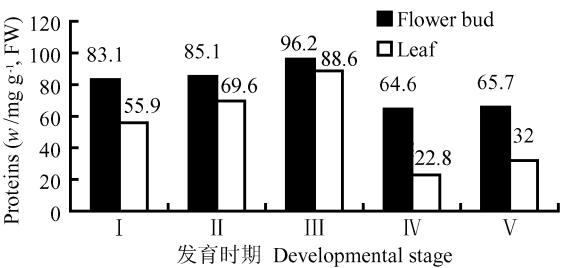


图 1 荔枝花芽分化过程蛋白质含量的变化

Fig. 1 Changes in protein content during the development of litchi floral bud

2.3 可溶性蛋白质含量的变化

蛋白质是细胞分裂、分化和增殖的主要物质基础,其含量

变化与花芽分化也有密切关系. 从图 1 可知,可溶性蛋白质含量在 I ~ III 期一直较高,随后下降,叶片蛋白质含量比同期的花芽低,但变化趋势与花芽相似;经统计分析,二者相关系数  $R = 0.929 4$ ,说明花芽蛋白质的合成与叶片有极显著相关.

3 分析与讨论

3.1 荔枝花芽分化与多胺、核酸、蛋白质代谢的关系

多胺包括腐胺(Put)、亚精胺(Spd)、精胺(Spm)等,是生物体代谢过程中产生的具有生物学活性的低分子量脂肪族含氮碱,其生物合成在细胞分裂最旺盛的地方最为活跃,对植物的生长发育包括开花过程有调节作用. 上述结果表明,从叶芽期到圆锥花序发育初期多胺含量持续上升并达到高峰的过程先

于核酸和蛋白质的大量合成(表3),揭示了多胺在DNA复制、转录和翻译3个水平上都能影响生物大分子的合成.从叶芽期到花芽分化过程中RNA/DNA比值的变化,揭示了DNA转录过程逐渐增强.第I时期RNA/DNA的比值为0.77,至第IV期达到高峰,其比值为2.7(表3),增加了近4倍,从而说明了花芽分化过程各种生理活动逐渐加强;而蛋白质/RNA比值的变化则揭示了RNA的翻译活性与多胺含量变化的趋势趋于一致(表3),也说明了多胺参与了蛋白质合成的调节.

表3 花芽分化过程中多胺、RNA/DNA以及蛋白质/RNA比值的动态

Table 3 Dynamics of polyamine, ratios of RNA/DNA and protein/RNA during the differentiation of litchi floral bud

| 项目 Item                                | I     | II     | III   | IV    | V     |
|----------------------------------------|-------|--------|-------|-------|-------|
| Polyamine(b/nmol g <sup>-1</sup> , FW) | 61.97 | 115.79 | 53.01 | 55.57 | 65.55 |
| RNA/DNA                                | 0.77  | 0.65   | 1.50  | 2.70  | 2.22  |
| Protein/RNA                            | 148.1 | 152.1  | 93.0  | 37.3  | 40.8  |

我们的研究还发现,荔枝顶芽由营养芽转变为生殖芽时,除了Put之外,成熟叶片中的Spd和Spm含量也随着发育进程而增加,F/L的Spd和Spm比值在1~3范围,说明成熟组织也合成多胺,而且叶片的数量远远超过顶芽(或花芽),它们合成的多胺总量应比花芽多,因此成熟秋梢上叶片多胺的合成对花芽的分化起着至关重要的作用.这与外源多胺处理柑桔<sup>[16]</sup>、苹果<sup>[17]</sup>促进花芽形成的结果一致.已有研究表明<sup>[18]</sup>,植物施用尿素后通过脲酶的作用分解而被植物体吸收,增加了植物体内NH<sub>4</sub><sup>+</sup>含量,并导致精氨酸(Arg)生物合成的加强.精氨酸是多胺生物合成的前体之一.Flores等<sup>[13]</sup>报道,供给植物NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N源后,发现可引起Put积累.此外,在花芽分化期间,成熟叶片可溶性蛋白质含量的变化趋势与花芽相似,呈极显著相关,这些结果都说明,成熟叶片含氮化合物的代谢对花芽的分化极为重要.已知土壤条件对荔枝花芽分化有较大影响,戴良昭等<sup>[19]</sup>对22 a生兰竹荔枝施氮肥的结果表明,在株施尿素0.25~0.80 kg范围内,总花量和叶片氨基酸含量随施氮量增加而升高.因此生产上应注意土壤管理,在一定范围内,氮肥多、水分充足将促进花芽的分化.

### 3.2 荔枝茎尖由营养生长转变为生殖生长的形态及生物大分子的变化

荔枝茎尖生长锥由营养生长转变为生殖生长过程是一个由量变到质变的过程,表面上看,在花芽分化前顶芽几乎停止生长,外部形态相对稳定,但我们应用透射电镜对荔枝茎尖这段发育过程的细胞超微结构进行观察的结果表明,荔枝圆锥花序发育前期细胞核中的核仁中心“液泡”化,细胞质内有丰富的线粒体、核糖体和膜状系统,内质网内连细胞核外接胞间连丝,细胞内囊泡大量形成、融合与迁移,这些均显示出细胞内结构物质在此期经历着活跃的周转和合成代谢<sup>[4]</sup>.因此荔枝茎尖由营养生长转变为生殖生长过程中,细胞内部在基因的控制下有序地表达,包括多胺、DNA、RNA、蛋白质等的合成和运输,信息的传递等生理活动,为细胞的分裂、生长和分化提供信息、能量和物质基础;当物质和信息积聚到一定程度,生殖生长过程便骤然启动.

#### References

1 Xiao HS (肖华山), Lü LX (吕柳新), Xiao XX (肖祥希). Dynamic changes of carbonitride during development of litchi (*Litchi chinensis*

Sonn.) pistil and stamen. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2002, **8** (1): 26~30

2 Xiao HS (肖华山), Lü LX (吕柳新), Wang XP (王湘平), Wang P (王平). Observation on cell ultrastructure of flower bud differentiation in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *J Fujian Teachers Univ Nat Sci* (福建师范大学学报自然科学版), 2002, **18** (2): 57~60

3 Xiao HS (肖华山), Lü LX (吕柳新), Chen W (陈伟). Study on specific protein of litchi (*Litchi chinensis* Sonn) in the process of female flower development. *Chin J Trop Crops* (热带作物学报), 2002, **23** (4): 33~38

4 Xiao HS (肖华山), Lü LX (吕柳新), Chen ZT (陈志彤). Dynamic changes of endogenous hormone in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2003, **9** (1): 11~15

5 Ji ZL (季作梁), Li PW (李沛文), Liang LF (梁立峰), Chen CX (陈村喜), Zhao XD (招晓东), Zheng GL (郑国梁). A preliminary observation on the flower bud initiation of litchi. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 1984, **11** (2): 134~137

6 Robbertse H, Menzel CM. A reevaluation of tree model, inflorescence morphology, and sex ratio in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *J Amer Soc Hort Sci*, 1995, **120**: 914~920

7 Batten DJ. Towards on understanding of reproductive failure in lychee. *Acta Hort*, 1986, **175**: 79~83

8 Menzel CM, Rasmussen TS, Simpson DR. Effects of temperature and leaf water stress on growth and flowering of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *J Hort Sci*, 1989, **64**: 739~752

9 Menzel CM, Simpson DR. Temperature above 20 °C reduce flowering in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *J Hort Sci*, 1995, **70**: 981~987

10 Menzel CM, Simpson DR. Effects of temperature and leaf water stress on panicle and flower development of litche (*Litchi chinensis* Sonn.). *J Hort Sci*, 1991, **66**: 335~344

11 吕柳新, 陈景淦. 荔枝雌雄性器官发育的相互消长. *中国果树*, 1990 (1): 9~12

12 Xu SX (徐是雄). Scanning electron microscopic studies on the development of the organs of litchi flower. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1990, **32** (12): 905~908

13 Flores HE, Galston AW. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol*, 1982, **69**: 701~706

14 Redmond JW. High-pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *J Chromatogr*, 1979, **170**: 479~481

15 Zhu ZP (朱治平), Shen RJ (沈瑞娟), Tang XH (唐锡华). Studies on the developmental biology of embryogenesis in higher plants II: biochemical changes during embryo development of *Oryza sativa* L. *Acta Phytophysiol Sina* (植物生理学报), 1980, **6** (2): 141~147

16 Zheng YS (郑玉生), Zhang QM (张秋明), Lovatt CJ. Polyamines metabolism during citrus anthesis and its effects on fruit set. *J Fruit Sci* (果树科学), 1997, **14** (4): 216~219

17 Xu JZ (徐继忠), Chen HJ (陈海江), Shao JZ (邵建柱), Yuan XL (袁小乱), Ma BK (马宝焜), Zhang WC (章文才). Effects of exogenous polyamines on flower bud formation of Red Fuji apple variety. *J Fruit Sci* (果树科学), 1998, **15** (1): 10~12

18 Sun WQ (孙文全). Polyamines in relation to flowering of horticulture crops—literature review. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 1989, **16** (3): 178~184

19 Dai LZ (戴良昭), Lin CX (林昌显), Liu LR (刘丽蓉), Su ML (苏目兰), Fu YE (傅仰恩). Effects of the levels of nitrogen application on the amino acid contents and flower sex of Lanzhou litchi. *J Fujian Agri Univ* (福建农业大学学报), 1998, **27** (4): 419~422