

外源油菜素内酯对矮生梨试管苗茎、叶生长及解剖特性的影响

陈宝印, 王彩虹, 初庆刚, 田义轲, 孙敬贤, 许延帅

(青岛农业大学 园艺学院, 山东 青岛 266109)

摘 要:以矮生型梨试管苗为试材,通过在培养基中添加不同浓度外源油菜素内酯(BR)(0.001、0.010、0.100、1.000 mg/L),以不添加 BR 为对照,观察其对矮生梨试管苗生长的表型效应,以探讨矮生梨的矮生特性与外源 BR 的关系。结果表明:较高浓度的外源 BR 可明显促进矮生梨茎的高度和其节间长度的增加;另外,用石蜡切片法观察发现,1.000 mg/L BR 处理可明显促进矮生梨试管苗茎和叶脉维管束的分化,提高叶肉细胞的密度和角质层的厚度。

关键词:油菜素内酯;矮生梨;试管苗;生长特性;解剖结构

中图分类号:S 661.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)11-0007-05

油菜素内酯(Brassinolides, BRs)是植物调节生长发育所必须的一类植物激素,植物体 BR 生物合成或信号转导途径受阻则会表现出植株矮化、叶卷曲、叶柄变短、育性降低等生长缺陷的表型特征。BR 在植物种子休眠与萌发、根茎的伸长、维管组织发育、开花和衰老等过程中起到重要的调控作用^[1-3]。其中,最显著的生理作用就是促进根茎的伸长生长^[4-5]。国内外学者研究表明, BR 促进植物生长的机制源自于细胞的伸长和分裂^[6-9]。一方面, BR 可以通过各种机制(如木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶(XTH)、微管)促使细胞壁松弛,使细胞体积扩大,促进细胞的伸长。另一方面, BR 可以促进植物细胞的分裂和细胞数目的增加,进而促进植物的生长。另外, BR 还可以促进维管组织和叶肉细胞的分化,调节源-库-流的关系,提高植株的长势^[6,10-11]。当 BR 生物合成或信号转导途径受阻时,则会导致植物矮化。众多研究证明,许多植物的矮生性状与油菜素内酯相关的基因突变有关^[12]。如拟南芥 BR 生物合成突变体 *det2*^[13]、*dwarf4*^[14] 和 *dwarf1*^[15] 等。目前,虽然关于油菜素内酯生物合成及其在植物生长、代谢、形态建成等方面的作用有较多报道,但在果树上的研究较少。

源自西洋梨(*Pyrus communis* L.)实生变异品种‘Le Nain Vert’的矮生型后代在表型上明显区别于普通型,其植株矮小、树冠紧凑、枝条节间呈高度短缩状,非常适合于高密度栽植。但目前这一重要农艺性状产生的机理还不清楚。该研究拟以矮生型梨的试管苗为试材,在离体条件下探讨外源 BR 对其生长特性和解剖特性的影响,以进一步揭示该矮生性状形成的生理机制和分子机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以西洋梨矮生品种‘Le Nain Vert’实生株系与白梨(*P. bretschneideri* Rehd.)品种‘荏梨’杂交获得矮生型实生单株(编号:7-45)为试材。于2012年3月在青岛农业大学莱阳果树试验站剪取幼芽萌动的枝条,剥取幼芽作为初代培养的材料。供试的外源 BR 购自上海楷洋生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 组培苗的获得 外植体的制备以及初代培养和继代培养参照代庆海^[16]的方法进行。

1.2.2 试验处理 从继代培养的试管苗中,选取长势相同的植株,剪取长度为1.0 cm 茎尖,接种于含有不同浓度 BR 的 MS 培养基中,设置 BR 4 个浓度处理:0.001、0.010、0.100、1.000 mg/L,以不含 BR 为对照(CK)。每处理9株。接种后40 d,用直尺测量株高、并统计节间数量,计算节间平均长度。

1.2.3 叶片石蜡切片的取样和制备 随机选取 CK 和 1.000 mg/L 外源 BR 处理的试管苗各3株,从各单株上取其中上部面积最大的叶片,以叶片中脉中部为中心,剪取0.5 cm² 大小的叶样,立即置于 FAA 固定液中。

第一作者简介:陈宝印(1987-),男,山东临沂人,硕士研究生,研究方向为果树分子育种。E-mail:ba_oyin_love@126.com

责任作者:王彩虹(1968-),女,陕西礼泉人,博士,教授,硕士生导师,现主要从事果树生物技术及遗传育种等研究工作。E-mail:chwang@qau.edu.cn

基金项目:山东省科技发展计划资助项目(2011GNC11018);山东省良种工程-资源创新与利用资助项目(2011-2014)。

收稿日期:2014-03-13

固定 24 h 后,经系列浓度的酒精逐级脱水后浸蜡包埋,用 Lecia RM 212RT 旋转切片机制成 10 μm 的切片,经番红-固绿双重染色,中性胶封片,用 Nikon ECLIPSE 80i 显微镜观察并拍照,每片镜检 10 个视野。

1.3 数据分析

试验数据采用 DPS v 7.05 专业版进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 外源 BR 对矮生梨植株表型特征的影响

外源 BR 对矮生梨组培苗表型特征影响较明显。总体上看,随外源 BR 处理浓度的升高,矮生梨试管苗的株高有增高趋势。与对照相比,0.010、0.100、1.000 mg/L BR 处理均能显著促进矮生梨试管苗茎的伸长生长。其中,1.000 mg/L BR 处理对株高的影响效应最为明显(图 1),且能显著促进节间长度的增加(图 2)。另外,还观察到外源 BR 处理对试管苗叶片生长也有影响,其中 0.010 mg/L BR 处理的试管苗叶片面积较其它几种处理明显偏大,而 1.000 mg/L BR 处理的叶片颜色明显变浅。

2.2 外源 BR 对矮生梨植株茎维管束的影响

由图 3 可以看出,与对照相比,1.000 mg/L BR 处理的矮生梨试管苗维管束数量明显增多,髓射线宽度较窄,甚至少数相邻维管束之间没有明显髓射线。可见,BR 在促进维管束的分化方面有重要作用。

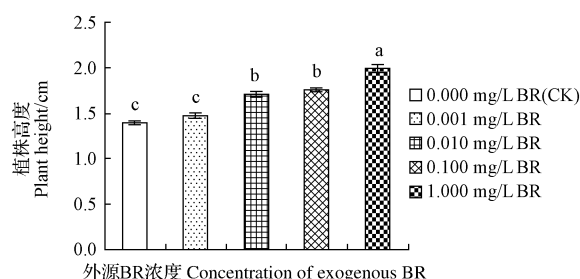


图 1 不同浓度的外源 BR 对矮生梨试管苗植株高度的影响

Fig. 1 The effect of different concentrations of exogenous BR on the height of dwarf pear plantlet *in vitro*

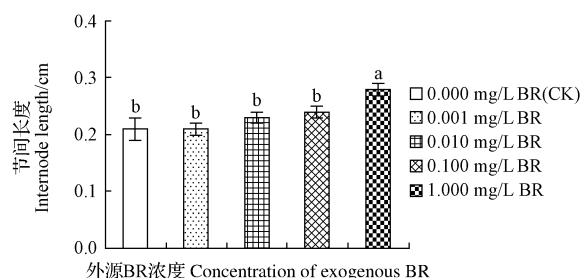


图 2 不同浓度的外源 BR 对矮生梨试管苗节间长度的影响

Fig. 2 The effect of different concentrations of exogenous BR on the internode length of dwarf pear plantlet *in vitro*

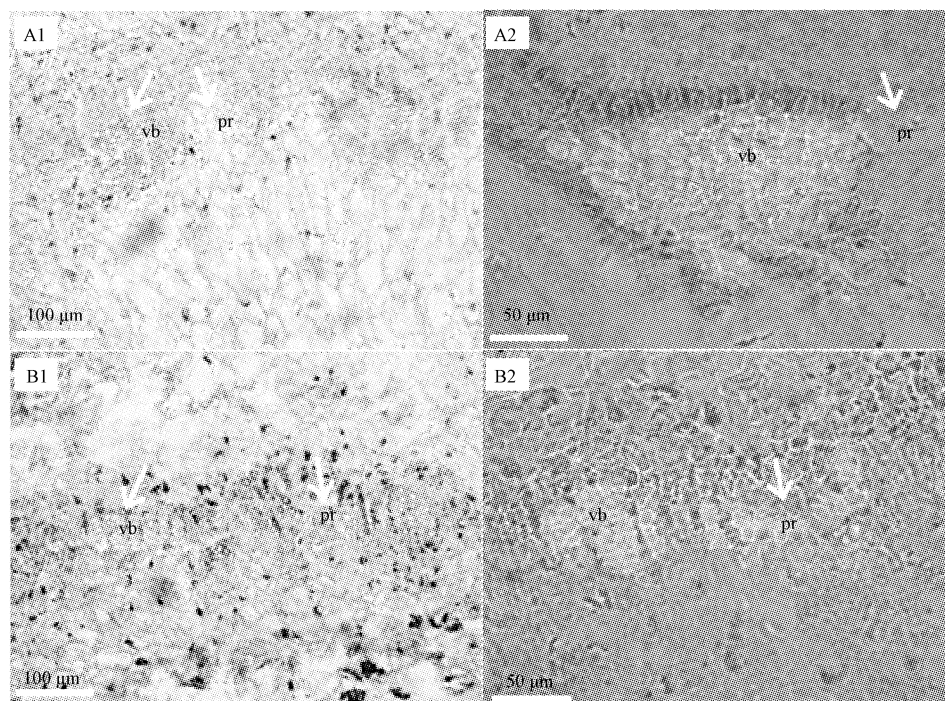


图 3 外源 BR 处理对矮生梨试管苗茎横切面解剖结构的影响

注: A1、A2 为对照(0 mg/L BR); B1、B2 为处理(1.000 mg/L BR); vb 为维管束; pr 为髓射线。

Fig. 3 The effect of exogenous BR treatment on the stem transection anatomical structure of dwarf pear plantlet *in vitro*

Note: A1, A2 were control (0 mg/L BR); B1, B2 were treatment (1.000 mg/L BR); vb mean vascular bundle; pr mean pith ray.

2.3 外源 BR 对矮生梨叶片解剖结构的影响

外源 BR 处理对矮生梨试管苗叶片解剖结构有明显影响。对照处理的叶片栅栏组织细胞基本为 2 层,细胞体积较大、排列较疏松;1.000 mg/L 外源 BR 处理的叶片栅栏组织细胞多为 2 层,部分位置出现 3 层,细胞体积较小,且呈紧密状排列;另外,1.000 mg/L 外源 BR 处理的海绵组织细胞的密度明显偏大,叶片下表皮细胞的

细胞密度也明显增加,上、下表皮细胞的角质层厚度也明显大于对照(图 4)。可见,BR 对叶肉细胞和表皮细胞的分裂与分化有重要影响。

另外,该研究观察到,与对照相比,1.000 mg/L 外源 BR 处理的矮生梨试管苗叶片中脉维管束的分化程度也显著大于对照(图 5A、B)。

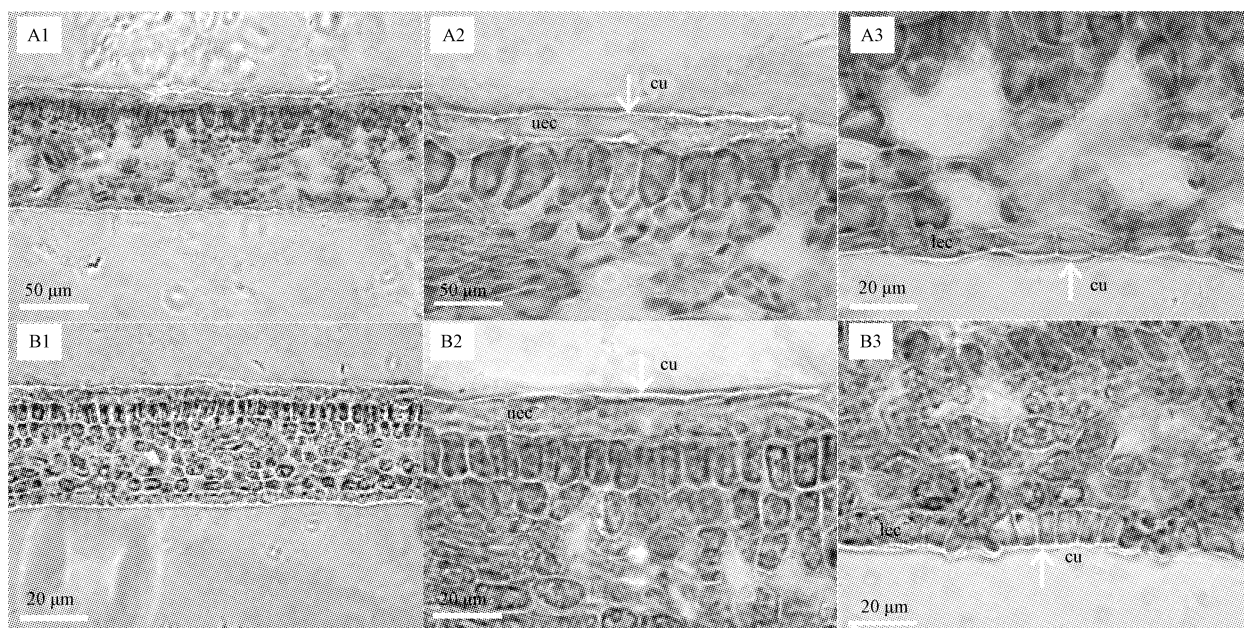


图 4 外源 BR 处理对矮生梨试管苗叶片解剖结构的影响

注:A1~A3 为对照(0 mg/L BR);B1~B3 为处理(1.000 mg/L BR);cu 为角质层;uec 为上表皮细胞;lec 为下表皮细胞。

Fig. 4 The effect of exogenous BR treatment on the leaf anatomical structure of dwarf pear plantlet *in vitro*

Note: A1~A3 were control (0 mg/L BR); B1~B3 were treatment (1.000 mg/L BR); cu mean cuticle; uec mean upper epidermal cell; lec mean lower epidermal cell.

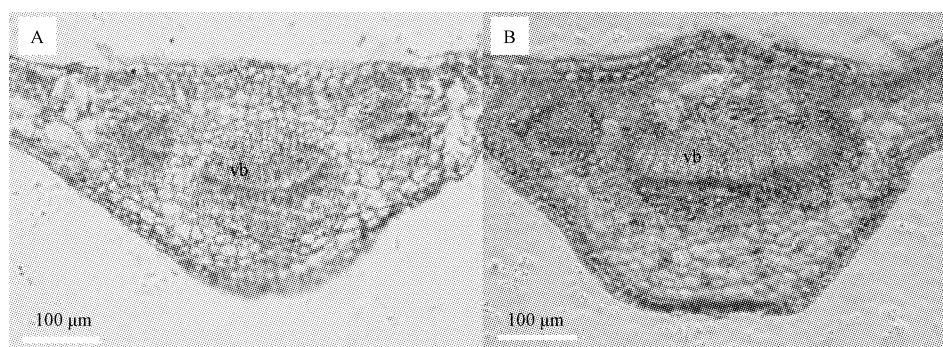


图 5 外源 BR 处理对矮生梨试管苗叶脉解剖结构的影响

注:A 为对照(0 mg/L BR);B 为处理(1.000 mg/L BR);vb 为维管束。

Fig. 5 The effect of exogenous BR treatment on the leaf primary vein anatomical structure of dwarf pear plantlet *in vitro*

Note: A was control (0 mg/L BR); B was treatment (1.000 mg/L BR); vb mean vascular bundle.

3 讨论与结论

油菜素内酯在植物的生长发育过程中起着重要的调节作用,而油菜素生物合成或信号转导过程中相关基因的缺失会导致一系列的负面影响,其中最显著的性状

则是矮化^[12]。众多研究学者表明,对拟南芥 BR 缺陷型突变体(*dwarf1*、*det2*、*dwf4*、*bul*)施加外源的 BR,能显著促进突变体下胚轴或茎的生长^[7,14-15,17]。Jager 等^[18]利用豌豆的 BR 缺失突变体 *lkb* 研究表明,外源 BR 可以显著促进茎的伸长,且 BR 对茎伸长的调控机制不依赖

于内源活性的 GA。进一步研究表明, BR 可以通过调控细胞壁相关酶类的表达或影响细胞外层微管的排列, 从而调控细胞壁的伸长, 进而促进了植株的生长^[8]。该研究发现, 对矮生梨试管苗施加一定浓度的外源 BR 能显著增加其植株高度。因此, 可以推测, 梨矮生性状的形成机制可能与内源 BR 水平有关。

维管束是植物运输水分、无机盐和有机物质的主要通道, 维管束的多少与植物的生长密切相关。Szekeres 等^[19]对拟南芥 BR 生物合成矮化突变体 *dwf7-1* 研究发现, 其维管束的数量明显少于野生型。Caño-Delgado 等^[10]和 Choe 等^[15]证明, 拟南芥 BR 缺陷型突变体 *cpd* 和 *bri1brl1brl3* 茎中的导管的数量也显著减少。Iwasaki 等^[20]和 Turner 等^[21]证明, 添加 BR 生物合成抑制剂可以阻止百日草叶肉细胞分化成管状分子 (TEs, 管胞和导管的总称), 但添加 BR 可以恢复叶肉细胞分化成管状分子的能力。该试验对矮生梨试管苗茎和叶脉的解剖观察发现, 一定浓度的外源 BR 处理能促进维管束的分化。维管束数量的增多, 会更有利于水分、无机盐及有机物的运输, 从而有利于植株的生长。

叶肉细胞是植物光合作用的主要场所, 叶肉细胞的大小和数量影响着光合作用的强弱。Oh 等^[6]证明, 油菜素内酯可以显著促进矮牵牛离体叶肉细胞的分裂; Zhiponova 等^[11]发现, BR 能调节表皮细胞和叶肉细胞的分裂、扩展和分化。该研究在梨上的研究也证实外源 BR 处理能显著促进叶片栅栏组织细胞的分裂与分化, 同时增大海绵组织细胞密度。因此, BR 也可能会通过促进叶肉细胞的发育来提高植株的光合作用, 进而影响植株的生长。

另外, 该研究还证明, 外源 BR 有利于叶片表皮细胞的分裂及角质层的合成, 这与 Çavuşoğlu 等^[22]和 Verma 等^[23]分别在萝卜和花生上的研究结果相似。由此可推测, BR 可提高植物抗生物胁迫和非生物胁迫的能力。

综上所述, 一定浓度的外源 BR 可以显著增加矮生梨株高, 也能显著促进维管束和叶肉细胞的分化。所以, 矮生梨的矮生特性可能与其体内的 BR 水平有关, 但具体生理和分子机制还需要进一步研究。

参考文献

- [1] Topping J F, May V J, Muskett P R, et al. Mutations in the HYDRA1 gene of Arabidopsis perturb cell shape and disrupt embryonic and seedling morphogenesis[J]. Development, 1997, 124(21): 4415-4424.
- [2] Yamamoto R, Fujioka S, Iwamoto K, et al. Co-regulation of brassinosteroid biosynthesis-related genes during xylem cell differentiation[J]. Plant and Cell Physiology, 2007, 48(1): 74-83.
- [3] Xia X J, Wang Y J, Zhou Y H, et al. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber[J]. Plant Physiology, 2009, 150(2): 801-814.
- [4] Guan M, Roddick J G. Comparison of the effects of epibrassinolide and steroidal estrogens on adventitious root growth and early shoot development in mung bean cuttings[J]. Physiologia Plantarum, 1988, 73(3): 426-431.
- [5] Li S, Wang F, Dong J. A proteomic approach to investigating the promote effects of brassinolide on root growth of rice seedlings[J]. Frontiers of Agriculture in China, 2011, 5(2): 146-151.
- [6] Oh M H, Clouse S. Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of Petunia hybrida[J]. Plant Cell Reports, 1998, 17(12): 921-924.
- [7] Catterou M, Dubois F, Schaller H, et al. Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in Arabidopsis thaliana. II. Effects of brassinosteroids on microtubules and cell elongation in the bull mutant[J]. Planta, 2001, 212(5-6): 673-683.
- [8] Cosgrove D J. Growth of the plant cell wall[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005, 6(11): 850-861.
- [9] 张会曦, 甘立军, 夏凯. 2,4-表油菜素内酯和生长素促进大麦胚芽鞘伸长生长的协同作用[J]. 南京农业大学学报, 2006, 29(3): 23-27.
- [10] Caño-Delgado A, Yin Y, Yu C, et al. BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in Arabidopsis[J]. Development, 2004, 131(21): 5341-5351.
- [11] Zhiponova M K, Vanhoutte I, Boudolf V, et al. Brassinosteroid production and signaling differentially control cell division and expansion in the leaf[J]. New Phytologist, 2013, 197(2): 490-502.
- [12] Kwon M, Choe S. Brassinosteroid biosynthesis and dwarf mutants[J]. Journal of Plant Biology, 2005, 48(1): 1-15.
- [13] Fujioka S, Li J, Choi Y H, et al. The Arabidopsis deetiolated2 mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis[J]. The Plant Cell Online, 1997, 9(11): 1951-1962.
- [14] Choe S, Dilke B P, Fujioka B P, et al. The DWF4 gene of Arabidopsis encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis[J]. The Plant Cell Online, 1998, 10(2): 231-243.
- [15] Choe S, Dilkes B P, Gregory B D, et al. The Arabidopsis dwarf1 mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis[J]. Plant Physiology, 1999, 119(3): 897-908.
- [16] 代庆海. 矮生西洋梨离体保存及矮化机理研究[D]. 青岛: 青岛农业大学, 2008.
- [17] Ohnishi T, Szatmari A M, Watanabe B, et al. C-23 hydroxylation by Arabidopsis CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis[J]. The Plant Cell Online, 2006, 18(11): 3275-3288.
- [18] Jager C E, Symons G M, Ross J J, et al. The brassinosteroid growth response in pea is not mediated by changes in gibberellin content[J]. Planta, 2005, 221(1): 141-148.
- [19] Szekeres M, Németh K, Koncz-Kálmán Z, et al. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis[J]. Cell, 1996, 85(2): 171-182.
- [20] Iwasaki T, Shibaoka H. Brassinosteroids act as regulators of tracheary-element differentiation in isolated Zinnia mesophyll cells[J]. Plant and Cell Physiology, 1991, 32(7): 1007-1014.
- [21] Turner S, Gallois P, Brown D. Tracheary element differentiation[J]. Annu Rev Plant Biol, 2007, 58: 407-433.
- [22] Çavuşoğlu K, Kılıç S, Kabar K. Effects of some plant growth regulators on stem anatomy of radish seedlings grown under saline (NaCl) conditions[J]. Plant Soil Environ, 2008, 54(10): 428-433.
- [23] Verma A, Malik C, Chaturvedi V. Varietal differences in epicuticular wax content in peanut[J]. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, 2009(3): 328-331.

温度和年份对蓝蓟种子发芽状况的影响

徐惠风¹, 魏龙雪¹, 高志新², 侯威¹, 冯政东¹

(1. 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118; 2. 中邦园林股份有限公司, 吉林 长春 130118)

摘要:以蓝蓟种子为试材, 研究人工气候箱培养条件下, 4 种不同恒定温度(即 10、15、20、25℃), 处理对蓝蓟种子发芽状况的影响; 并以近 3 a 蓝蓟种子为试材, 比较研究了常规室温条件下不同年份的发芽状况。结果表明: 不同恒定温度处理条件下, 15℃与其它处理的发芽指标具显著差异性, 为蓝蓟种子适宜的发芽恒温条件; 近 3 a 的蓝蓟种子进行室内发芽试验结果表明, 在 5 月份室内条件下, 2012 年与其它年份处理发芽指标具显著差异性, 种子的发芽状况为 2012 年 > 2011 年 > 2010 年; 说明蓝蓟种子播种时期适宜的恒温条件为 15℃, 在播种时应选择当年新生种子, 以获得较好的发芽状况, 以利于稳定收获。

关键词:蓝蓟; 发芽; 温度; 年份

中图分类号:S 565.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)11-0011-04

蓝蓟(*Echium vulgare*)为紫草科蓝蓟属下的一个种。其有蓝、紫、粉、白等多种花色和长达 3 个月的花期, 既可作为花境用于园林美化^[1-2], 又因其种子中富含不饱和脂肪酸, 在防治心脑血管疾病上具有极其重要的医药价值^[3-5]; 另外, 种子中含量较高的三油脂酸, 对于皮肤美容有着极为重要的意义^[6-9]。国外多有涉及水、恒温、盐碱条件对种子发芽的影响研究^[10-16], 国内蒋盛岩等^[17]

和黄燕芬等^[18]通过恒温和光照控制研究了夏枯草和药用植物的发芽状况。该试验在参考国内外种子发芽的研究方向基础上, 研究了播种前 4 种不同恒定温度和室温条件处理对不同年份蓝蓟种子活力^[19-20]的影响, 旨在更好掌握种子播期、播种量, 为蓝蓟进一步引种驯化和常规条件下的大田栽培提供一定理论指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为蓝蓟种子, 属特殊油料作物。

1.2 试验方法

1.2.1 人工气候培养 试验日期为 2012 年 3~4 月和 2013 年 5 月, 选取均匀一致饱满的蓝蓟种子, 先用 0.3% KMnO₄ 溶液消毒 15 min, 冲洗干净, 将处理后种子随机

第一作者简介:徐惠风(1965-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为作物栽培生理及生态环境。E-mail: xhfzj@163.com.

基金项目:吉林省科技厅基础应用资助项目(201105070); 吉林省教育厅重大资助项目(201240); 吉林省科技厅重点资助项目(2013)。

收稿日期:2014-01-20

Effect of Exogenous Brassinolide on Growth and Anatomical Characteristics for Stems and Leaves of Dwarf Pear *in vitro*

CHEN Bao-yin, WANG Cai-hong, CHU Qing-gang, TIAN Yi-ke, SUN Jing-xian, XU Yan-shuai
(College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract: Taking dwarfing pear of tube seedling as material, different concentrations of exogenous brassinolides (BR) (0.001, 0.010, 0.100, 1.000 mg/L) were added to the media and the effect on phenotypes of the plantlets *in vitro* were observed, with no added BR as control, in order to reveal the relationship between the dwarf trait of pear and BR. The results showed that the higher concentration of BR increased the height and internode length of the plantlet. Furthermore, by the technique of paraffin section, it was observed that the treatment of 1.000 mg/L BR distinctively accelerated the differentiation of vascular bundles in stems and primary veins of leaves, and increased the density of mesophyll cells and the thickness of cuticle.

Key words: brassinolide; dwarf pear; plantlet; growth characteristics; anatomical structures