

油菜素内酯促进绿豆下胚轴不定根发生研究

刘灵^{1,2}, 李海航¹, 杨丽霞¹, 谢子华¹, 龙海涛¹

1. 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631

2. 广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004

[摘要] 用 10^{-2} mol/L 油菜素内酯浸泡绿豆种子, 其幼苗下胚轴插条培养 2 d 后, 不定根长度、根数和生根范围均增加, 分别比对照增加 12.5%、27.4% 和 37.6%, 插条基部细胞的吲哚丙酮酸脱羧酶、吲哚乙醛氧化酶和色氨酸转氨酶的比活性分别比对照提高 120.6%、82.1% 和 54.7%, 吲哚乙酸含量增加 22.3%, 插条基部细胞进入细胞周期 S 期的数目增加 23%。结果表明, BR 可能通过增加 IAA 含量, 促进 DNA 合成和细胞分裂, 从而促进不定根的发生。

[关键词] 油菜素内酯; 绿豆; 不定根; 吲哚乙酸; 细胞周期

[中图分类号] Q946.885

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)05-0056-05

Stimulation of Brassinolide on Adventitious Root Formation in Mung Bean

LIU Ling^{1,2}, LI Haihang¹, YANG Lixia¹, XIE Zihua¹, LONG Haitao¹

1. School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

2. School of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, Guangxi Province, China

Abstract: The pre-treatment of germinating seeds of mung bean with 10^{-2} mol/L of brassinolide (BR) is found to help the adventitious root formation and root growth in hypocotyl cuttings of mung bean. Root length, root numbers and rooting areas per cutting were increased by 12.5%, 27.4%, 37.6%, respectively, over the controls after two days of treatment. Enzyme activities of indole pyruvate decarboxylase, indole acetaldehyde oxidase and tryptophan aminotransferase were increased by 120.6%, 82.1% and 54.7%, respectively, and indole acetic acid (IAA) content was increased by 22.3% in the rooting zone of the cuttings. Cell numbers in S phase in the basal part of rooting zone was increased by 23% in the BR treatment. Results indicate that BR helps the rooting by increasing IAA contents.

Key Words: brassinolide; mung bean; adventitious rooting; indole acetic acid; cell cycle

CLC Number: Q946.885

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)05-0056-05

0 引言

油菜素内酯又称芸苔素内酯 (Brassinolide, 简称 BR), 其化学结构与动物雄性激素、副肾皮质激素、雌性激素、昆虫蜕皮激素等同源^[1], 其作用为促进细胞伸长和分裂, 调节植物生长发育^[2-4]。

不定根的形成受植物激素调控, 在植物发育生物学中是一个重要的问题。绿豆下胚轴生长周期短, 生长条件易于控制, 是一种良好的研究根系发育的实验体系。有报道指出, 10^{-2} mol/L BR 能有效促进黄瓜下胚轴

插条不定根生长^[5], 但其影响原因尚少报道。本文研究 10^{-2} mol/L BR 对绿豆下胚轴插条基部不定根发生的影响, 了解生长素的作用和细胞周期时相作用的变化, 为深入探讨 BR 作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

绿豆 (*Phaseolus radiatus* L.) 为材料。种子经 70% 乙醇消毒, 洗净后浸泡 4 h。将种子置于含 10^{-3} mol/L BR

收稿日期: 2006-12-07

作者简介: 刘灵, 女, 桂林市育才路 15 号广西师范大学生命科学学院, 讲师, 研究方向为植物生理学; E-mail: lilab@sennu.edu.cn

李海航 (通讯作者), 男, 广州市石牌华南师范大学生命科学学院, 教授, 研究方向为植物化学与分子生物学;

Email: li_haihang@yahoo.com

(Sigma 产品) 培养皿中的吸水纸上 (80 粒种子/100 ml), 以蒸馏水为对照, 于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 暗萌发 24 h。以细沙为培养介质, 于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 暗培养 3 d, 选取长势、茎粗、叶片大小一致, 下胚轴约 6 cm 的幼苗, 切除根部作为插条。

1.2 方法

插条基部浸入盛蒸馏水的瓶 (20 株/杯) 中培养, 每天换水, 培养 1 d、2 d 和 4 d, 观察不定根发生根数, 测量最长的根长和生根范围。

参考丁静^[6]和王金祥^[7]的方法提取、纯化生长素, 用 Beckman System Gold 液相色谱仪测定生长素含量; 流动相为水:乙醇:乙酸=60:35:5, 流速为 0.5 ml/min; 色谱柱为 Hypersil ODS C18, 检测器为 Beckman System Gold 168 Detector, 检测波长为 254 nm; 外标法定性, 峰面积法定量。

按照 Koga^[4]等方法测定吲哚丙酮酸脱羧酶活性。酶活力单位定义为每分钟催化形成 $1\mu\text{mol}$ 吲哚乙醛的酶量。参照 Bower^[8]等方法测定吲哚乙醛氧化酶活性。酶活力定义为每分钟每克鲜重催化形成吲哚乙酸值。参照《现代植物生理学实验指南》^[9]方法测定色氨酸转氨酶活性, 酶活力定义为每小时每微克蛋白质催化形成谷氨酸的 μg 数。用 Bradford^[10]的方法测定蛋白质含量, 牛血清蛋白作为标准。

取插条基部 5 mm 切段, 切成 0.5 mm 的薄片。按照

朱文廉和张建国^[11]的方法, 提取原生质体, 用 13% CPW 液洗涤, 1 000 rpm 离心 8 min, 纯化原生质体。原生质体悬浮至一定密度, 取 1 滴于载玻片上, 加入同体积 0.02% 双醋酸酯 (FDA) 稀释液, 静置 5 min。于 Nikon 倒置荧光显微镜下观察, 发出绿色荧光的为有活力的细胞。原生质体加入碘化丙锭 (PI) 染液工作液 (PI:50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; RNaseA 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0.5% Triton 100; 0.1% 柠檬酸钠), 避光染色 30 min。用 EPICS2XL 型流式细胞仪检测细胞周期, 每样品检测 10^5 个以上细胞, 488 nm 光激发, 接收波长 610 nm。

2 结果与分析

2.1 BR 对绿豆下胚轴不定根发生的影响

绿豆下胚轴不定根从维管束发生 (图 1), 培养 2 d 后, 在插条基部薄壁细胞或维管束细胞形成了根原基, 细胞分裂, 体积增大, 部分不定根已露出表皮 (图 2)。经 BR 处理的绿豆插条, 培养 1 d 形成的不定根已露出表皮, 培养 2 d 和 4 d 插条基部的不定根数量增多, 生根范围显著大于对照 (图 2)。

经 BR 处理的绿豆插条, 培养 2 d 的不定根长度、根数和生根范围分别比对照增加 12.5%、27.4%、37.6% (表 1); 培养 4 d 后, 从 BR 处理的插条基部发生的不定根长度和生根范围分别比对照增加 31.5% 和 22.2%。

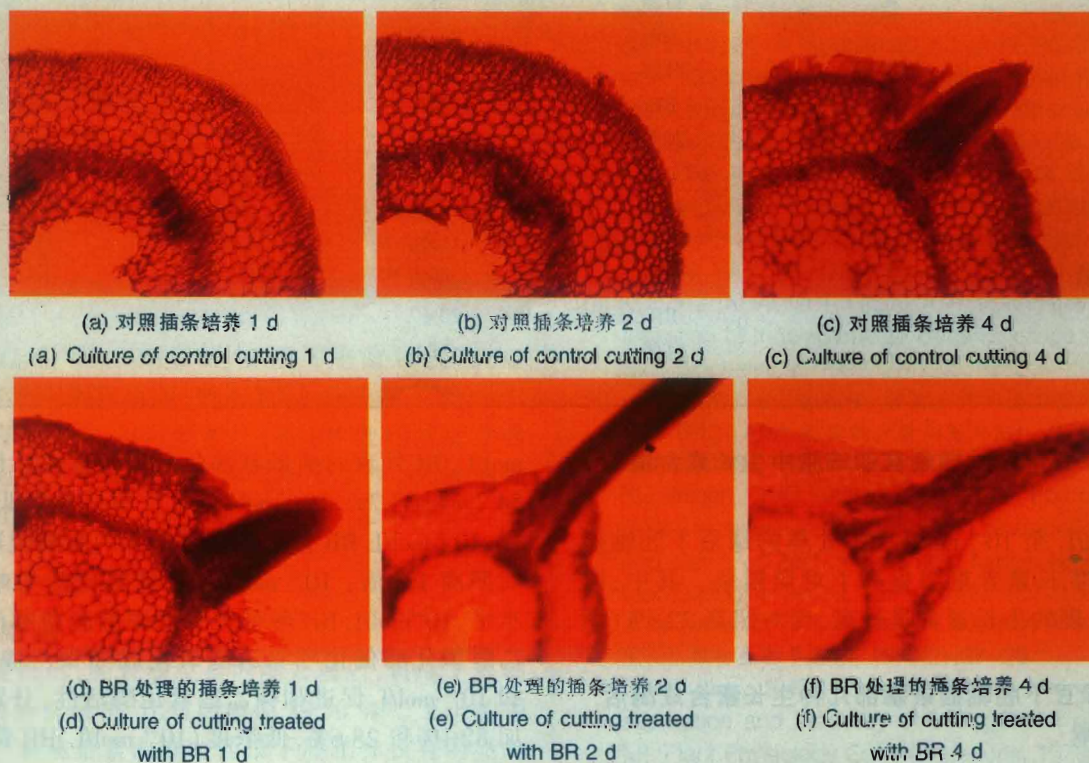
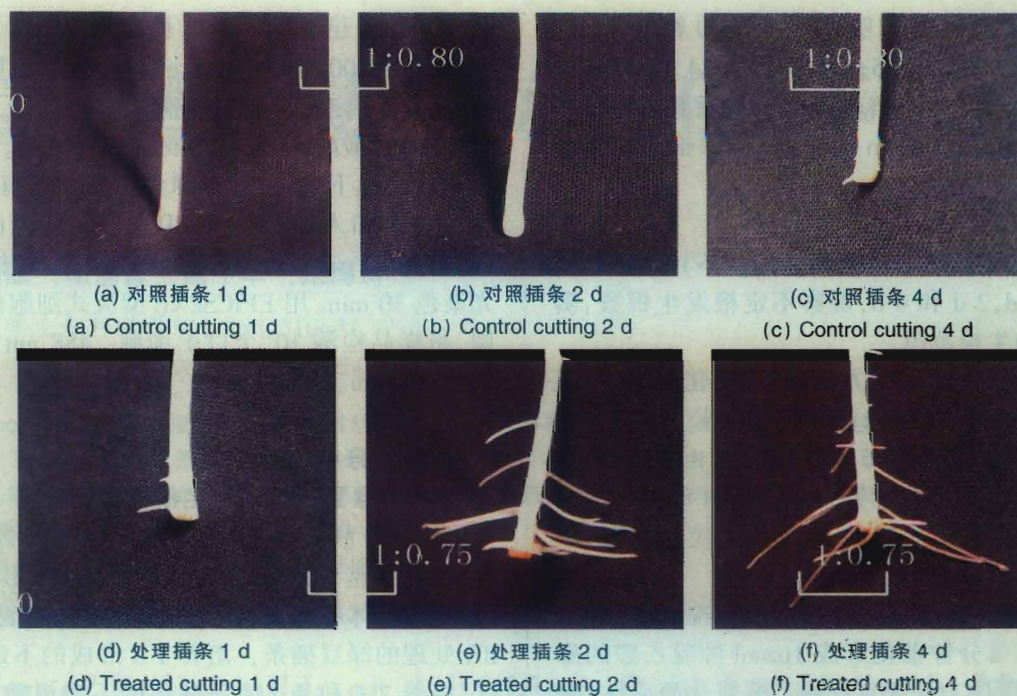


图 1 10^{-2} mol/L BR 处理绿豆下胚轴不定根发生的横切面结构观察 ($\times 40$)

Fig.1 Cross section of rooting zones of hypocotyl cuttings of mung bean treated with 10^{-2} mol/L BR ($\times 40$)

图 2 10^{-2} mol/L BR 对绿豆下胚轴插条不定根发生的影响Fig. 2 Effect of 10^{-2} mol/L BR on adventitious root formation in hypocotyl cuttings of mung bean表 1 10^{-2} mol/L BR 对绿豆下胚轴插条不定根发生的影响Table 1 Effect of 10^{-2} mol/L BR on adventitious root formation in hypocotyl cuttings of mung bean

指标	插条培养天数/d	处理	均值/mm	显著水平/5%	极显著水平/1%
根长	4	对照	16.5	b	B
		BR	21.73	a	A
	2	对照	5.85	b	A
		BR	7.45	a	A
根数	4	对照	15.65	a	A
		BR	15.65	a	A
	2	对照	8.5	b	B
		BR	11.75	a	A
生根范围	4	对照	25.03	a	A
		BR	29.17	a	A
	2	对照	0.84	ab	A
		BR	0.89	a	A

2.2 BR 对绿豆下胚轴插条基部细胞中生长素含量的影响

10^{-2} mol/L 至 10^{-4} mol/L BR 处理的绿豆下胚轴插条基部细胞生长素含量明显高于对照插条。其中,以 10^{-2} mol/L 处理的生长素含量最高,比对照高 22.3% (图 3)。

2.3 BR 对绿豆下胚轴插条基部几种生长素合成酶活性的影响

高等植物体内生长素的生物合成需要色氨酸转氨酶、吲哚丙酮酸脱羧酶、吲哚乙醛氧化酶的参与和催化作用。表 2 表明,与对照插条相比, 10^{-2} mol/L 和 10^{-3}

mol/L BR 处理的插条基部色氨酸转氨酶活性分别提高 54.7% 和 31.7%, 10^{-4} mol/L BR 使酶活性降低 21.7%。同样, 10^{-2} mol/L BR 使插条基部吲哚丙酮酸脱羧酶活性比对照高 1.2 倍, 10^{-3} mol/L BR 使酶比活力略高于对照水平, 10^{-4} mol/L BR 降低吲哚丙酮酸脱羧酶活性。吲哚乙醛氧化酶催化吲哚乙醛氧化成吲哚乙酸, 10^{-2} mol/L 和 10^{-3} mol/L 促进吲哚乙醛氧化酶活性, 分别比对照增加 82.1% 和 28.6%, 低浓度 (10^{-4} mol/L) BR 降低该酶的比活性。

2.4 BR 对绿豆下胚轴插条基部细胞周期的影响

对照的绿豆插条基部细胞离体培养 0 d 时, 下胚轴

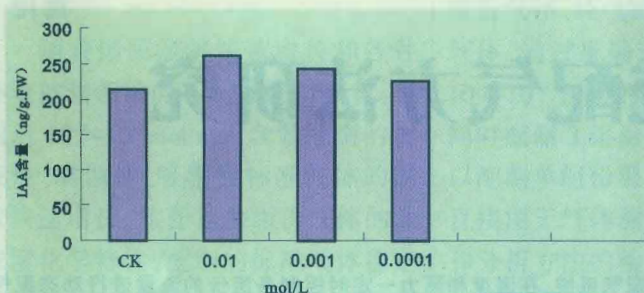


图 3 不同浓度 BR 对绿豆下胚轴插条基部细胞 IAA 含量的影响

Fig. 3 Effect of BR concentrations on IAA contents in rooting zones of hypocotyl cuttings of mung bean

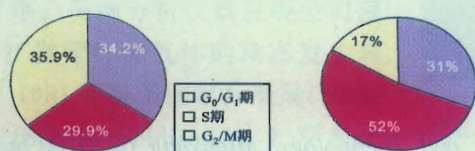
图 4 10^{-2} mol/L BR 对绿豆下胚轴插条基部细胞周期的影响Fig. 4 Effect of 10^{-2} mol/L BR on cell phase of cell cycle in rooting zone of hypocotyls cutting of mung bean

表 2 油菜素内酯对绿豆下胚轴插条 3 种生长素合成酶比活性的影响

Table 2 Effect of BR on activities of three enzymes of auxin biosynthesis in rooting zone of hypocotyl cuttings in mung bean

处理	色氨酸转氨酶	吲哚丙酮酸脱羧酶	吲哚乙醛氧化酶
10^{-2}	8.20	2.56	40.47
10^{-3}	6.98	1.26	28.58
10^{-4}	4.15	0.82	16.60
CK	5.30	1.16	22.22

细胞进入 G_0/G_1 期、S 期和 G_2/M 期细胞数目表明,近 70% 的细胞处于细胞间期,处于 DNA 合成期(S 期)的细胞数目只有 29.9%;与对照相比,经 BR 处理的绿豆插条基部细胞处于 S 期的细胞比对照多 23%, G_2/M 期细胞数目比对照少 12%, G_0/G_1 期细胞数目无显著变化(图 4)。

3 讨论与结论

有报道指出,经表油菜素内酯处理后,黄瓜下胚轴在第 1 天内伸长最快,比对照增加 39.50 %^[5]。王玉琴等研究表明,表油菜素内酯对西瓜下胚轴伸长有明显的促进作用,比对照增加了 43.8 %^[12]。本实验结果证明, 10^{-2} mol/L 油菜素内酯处理黄化绿豆苗 3 d,促进下胚轴伸长,其作用效果与浓度有关,可能与插条基部细胞

对油菜素内酯的敏感性有关。有报道指出,BR 可诱导植物细胞的伸长和分裂^[11]。陈利萍等^[13]用表油菜素内酯处理绿豆下胚轴切段能够维持其细胞超微结构的完整性而延缓衰老过程,对照下胚轴切段在第 3 d,其皮层细胞中的细胞器已经解体。

已知生长素在绿豆下胚轴插条生根过程中起关键作用,是促进植物不定根发生的内源激素^[14]。生长素在植物体内的生物合成主要通过吲哚丙酮酸途径:色氨酸转氨酶催化色氨酸转氨作用,形成吲哚丙酮酸,再在吲哚丙酮酸脱羧酶作用下脱羧,形成吲哚乙醛,吲哚乙醛氧化酶促进吲哚乙醛脱氢变成吲哚乙酸。本实验结果证明,黄化绿豆插条存在吲哚丙酮酸途径, 10^{-2} mol/L 油菜素内酯有效提高色氨酸转氨酶、吲哚丙酮酸脱羧酶和吲哚乙醛氧化酶活性,促进生长素合成,增加吲哚乙酸含量,是促进插条不定根发生的原因之一。

本实验利用流式细胞仪分析 BR 对插条基部细胞的细胞周期的影响,结果表明, 10^{-2} mg/L BR 处理后的插条基部细胞进入 S 期细胞明显增多,DNA 合成能力加强,致使根原基形成提前,增加细胞分裂,促进不定根伸长。

参考文献(References)

- [1] ZUREK D M, RAYLE D L, McMORRIS T C, *et al.* Investigation of gene expression, growth kinetics and wall extensibility during brassinosteroid-regulated stem elongation[J]. *Plant Physiol*, 1994, 104: 505-513.
- [2] GAUDINOVA A, SUSSENBKOVA H, VOJTECHNOVA M, *et al.* Different effects of two brassinosteroids on growth, auxin and cytokinin concentration in tobacco callus tissue [J]. *Plant Growth Regul*, 1995, 17: 121-126.
- [3] MAYUMI K, SHIBAOKA H. A possible double role for brassinolide in there-orientation of cortical microtubules in the epidermal cells of Azuki bean epicotyls [J]. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36: 173-181.
- [4] KOGA J, ADACHI T, HIDAKA H. Purification and characterization of indolepyruvate decarboxylase [J]. *Journal of Biol. Biochemical*, 1992, 267(22): 15823-15828.
- [5] 徐如涓, 郭一松, 赵毓楠. 表油菜素内酯对黄瓜下胚轴伸长、内源 GA3、ABA 及淀粉含量的影响[J]. *植物生理与分子生物学报*, 1990, 16 (2): 125-130.
- XU Rujuan, GUO Yisong, ZHAO Yuju. Epibrassinolide-induced changes in the elongation, endogenous GA3, ABA and starch content of cucumber hypocotyls[J]. *Acta Photophysiological Sinica*, 1990, 16 (2): 125-130.
- [7] 丁静, 沈镇德, 方亦雄. 植物内源激素的提取分离和生物鉴定[J]. *植物生理学通讯*, 1979(2): 27-29.
- DING Jing, SHEN Zhende, FANG Yixiong. Extraction, separation and bioassay of endogenous plant hormones [J]. *Plant Physiology Communications*, 1979(2): 27-39.
- [7] 王金祥, 傅建华, 陈良碧. 三种禾本科植物花粉中激素、维生素含量比较研究[J]. *湖南师范大学学报(自然科学版)*, 1999, 22(2): 81-84