

吸器诱导因子对管花肉苁蓉吸器形成的影响

赵东平 郭玉海* 朱艳霞 崔旭盛

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

摘要 将萌发2 d的管花肉苁蓉芽管用6-苜氨基嘌呤、2,6-二甲氧基对苯醌、细胞分裂素、间苯二酚、槲皮素处理24 h,以2,7-二氯氢化荧光素乙二脂作为荧光探针,用激光共聚焦显微镜对芽管中的活性氧进行定位和定量测定;同时统计处理5 d后芽管形成吸器的数量,以探讨吸器诱导因子对管花肉苁蓉芽管活性氧含量及吸器建成的影响。结果表明:芽管顶端感受吸器诱导因子刺激,而迅速膨大形成吸器,2,6-二甲氧基对苯醌处理吸器诱导率最高,为80%;依次为Kinetin和6-BA,为76%;槲皮素和间苯二酚,为60%。激光共聚焦显微镜检测活性氧含量表明,芽管顶端是产生活性氧的主要部位,槲皮素处理的芽管 H_2O_2 分泌量最高,依次为间苯二酚、6-BA、Kinetin和DMBQ。可见吸器诱导因子可以提高管花肉苁蓉芽管的吸器诱导率。

关键词 管花肉苁蓉芽管; 吸器; 吸器诱导因子; 活性氧

中图分类号 Q 948.9

文章编号 1007-4333(2011)04-0038-05

文献标志码 A

Influence of haustorium inducing factors on haustorium formation of *Cistanche tubulosa*

ZHAO Dong-ping, GUO Yu-hai*, ZHU Yan-xia, CUI Xu-sheng

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Effects of haustorium inducing factors on the active oxygen content of *Cistanche* germ tube and haustorium building of *Cistanche* sprout were investigated. In this study, different chemical reagents, such as 6-BA, DMBQ, Kinetin, resorcinol and oak endothelin were applied to two-day old *cistanche* germ tube for 24 h. *in vivo* active oxygen location in the germ tube was detected by using H_2DCFDA fluorescence probe, and the related active oxygen content was measured with the laser scanning confocal microscope. Numbers of haustoriums were counted 5 days after chemical applications. The highest induction rate was observed from the treatment with 2,6-DMBQ, followed by treatments with Kinetin and 6-BA. the treatments with quercetin and resorcinol obtained the lest induction rate. The three types of induction rate of haustorial were 80%, 76% and 60%, respectively. It was found that the major *in vivo* location of active oxygen from the top of the germ tube. It can release the highest H_2O_2 after induction by quercetin, followed by resorcinol, 6-BA, Kinetin and DMBQ. It was concluded that haustorium inducing factor can improve the haustorium inducing factors of *Cistanche* germ tube effectively.

Key words germ tube; haustorium; haustorium inducing factors; ROS

寄生植物和寄主及环境间不断地进行着信号传递、感受和反应。寄主的地上部和根际发出的化学信号,能传递到寄生植物;寄生植物感受寄主的化学

信号而做出改变生长方向并发生吸器建成反应。吸器是寄生植物与寄主连接的特异性器官,吸器附着寄主并与寄主维管组织连接,成为寄生植物和寄主

收稿日期: 2011-01-04

基金项目: 国家科技重大专项(2009ZX09308-002); 国家公益性行业科研专项(200903001-2-3); 北京市科技计划项目(D07060200880701)

第一作者: 赵东平, 博士研究生, E-mail: zhaodongping12@163.com

通讯作者: 郭玉海, 教授, 主要从事药用作物栽培研究, E-mail: yhguo@cau.edu.cn

植物间信号、物质交流和次生物质合成的场所^[1-6]。诱导吸器发生信号的物质被称为吸器诱导因子(HIF),关于HIF产生有两种推论:1)吸器诱导因子DMBQ,是木质素的合成和降解中产生的次生代谢产物,通过扩散传递到达寄生植物^[7];2)寄生植物种子在萌发的过程中,受到种皮的压力,芽管顶端分泌活性氧,氧化寄主细胞壁物质,从而使寄主根中的胶质分解产生DMBQ,而DMBQ能够进一步诱导寄生植物初生吸器的形成,使其寄生成功^[8-9]。Avishai Mor在分支列当和拟南芥上的研究表明,连接和侵入部位的ROS(Reactive Oxygen Species)来自于寄生植物,ROS能够促使寄主细胞壁的降解以利于寄生植物侵入寄主和寄生植物本身根的伸长^[10]。此外,在其他非寄生植物上的研究表明,ROS能够促进植物的极性生长以及维管束的形成^[11-13],但是它对管花肉苕蓉吸器形成的影响尚未见报道。

吸器是管花肉苕蓉芽管与柽柳根接触形成的新器官^[14-16],为促进管花肉苕蓉吸器产生,提高接种率和产量,本试验以管花肉苕蓉芽管为材料,以吸器和活性氧为指标,研究了芽管感受DMBQ、槲皮素、间苯二酚、6-BA、Kinetin刺激的吸器发生和活性氧含量反应,为管花肉苕蓉吸器发生机理和适宜的植物生长物质筛选提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

管花肉苕蓉芽管:将萌发2 d的芽管作为吸器诱导和活性氧测定的试验材料,将不同生长阶段的芽管作为活性氧定位的试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计

以蒸馏水处理为对照,以 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 和 10^{-10} mol/L的6-BA(6-苜氨基嘌呤)、DMBQ(2,6-二甲氧基对苯醌)、Kintine(细胞分裂素)、间苯二酚、槲皮素为处理。每个处理选芽管10粒,3次重复。

将萌发2 d的管花肉苕蓉芽管分别放入上述溶液中24 h,然后放入 $10 \mu\text{mol/L}$ H_2DCFDA 中3 min,洗去多余的染料,用共聚焦扫描电镜进行三维观察,以像素强度作为其荧光强度。并在5 d后

对处理后种子的初生吸器用体视荧光显微镜进行统计。

1.2.2 精密仪器和药品规格

所用体视显微镜型号为:OLYMPUS SZH10型;激光扫描共聚焦显微镜型号为Bio-RadMRC1024,共聚焦系统由Bio-Rad公司提供的软件控制,装有Zeiss显微镜,488 nm激发FITC,用于图像采集的显微镜物镜为Plan-Neofluar 10倍物镜,数值孔径(NA)为0.15,显微聚焦旋钮由步进马达控制,图像存为 512×512 像素类型,ZOOM设为1.0,若需要更大倍数时,可以选择更大的ZOOM范围,扫描所用的激发值为100%。体视荧光显微镜型号为:SZX16-DP72。

6-BA、DMBQ、Kintine购自Sigma公司,USA生产;间苯二酚、槲皮素购自Solarbio公司,北京索莱宝生物公司生产。活性氧探针 H_2DCFDA 购自Invitrogen公司,USA生产。

1.2.3 芽管培养

将储存于冰箱($2 \sim 5 \text{ }^\circ\text{C}$)中的管花肉苕蓉种子进行过筛,将大于0.5 mm,小于0.8 mm的种子浸入70%酒精30 s,然后用1%次氯酸钠消毒8 min,再用无菌水冲洗5次,而后置于经过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤氟啶酮(10 mg/L)中,放置在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中,进行黑暗培养。

1.3 统计分析

使用DPS对数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 芽管活性氧的定位

用不同时期的管花肉苕蓉幼苗作为试验材料,将其放入 H_2DCFDA 中3 min,然后洗去多余的染料,并用共聚焦扫描电镜进行测定并对其二维图像进行观察。从图1可见,不同时期的芽管,其活性氧存在部位相同,主要存在于芽管顶端的表面细胞上。

2.2 芽管感受吸器诱导因子刺激的形态反应

从图2可见,不同诱导因子对初生吸器的刺激程度不同,方差分析结果表明:DMBQ处理优于6-BA和Kinetin,芽管顶端与基部相比,差异达到显著水平,其中以DMBQ处理显著;而槲皮素与对照相比差异不显著。

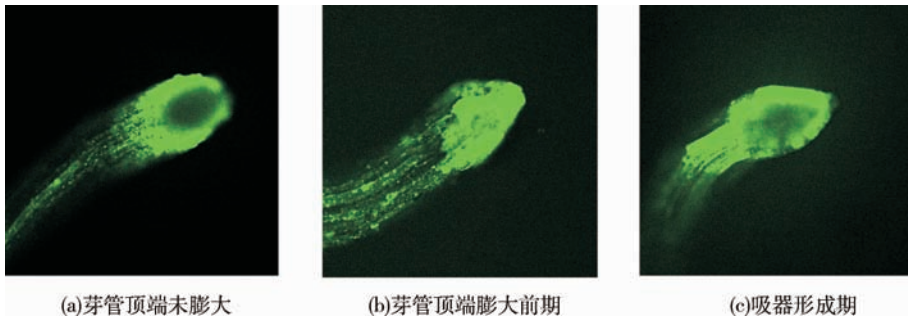


图1 管花肉苁蓉芽管发育过程中的活性氧定位

Fig. 1 Reactive oxygen species positioning on germ tube growth of *Cistanche*



图2 不同诱导因子对初生吸器外观形态的影响

Fig. 2 Effect of different inducers on the morphology of primary haustorium

从图3可见,不同诱导因子处理对管花肉苁蓉初生吸器诱导率的影响不同。随着诱导时间的延

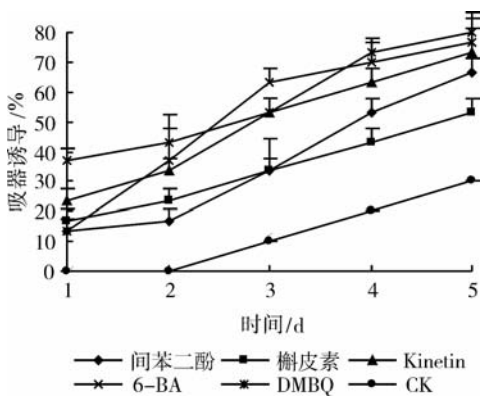


图3 不同诱导因子及诱导时间对吸器形成的影响

Fig. 3 Effects of various inducers and the induction time on the haustorium formation

长,诱导率增加,5 d以后诱导率不再增加。与对照相比,各处理所产生的初生吸器诱导率均高于对照;各处理相比,DMBQ处理差异显著。

2.3 不同吸器诱导因子对管花肉苁蓉吸器诱导率的影响

从表1可见,不同种类及不同浓度的诱导因子对初生吸器的影响不同。吸器诱导率,以 10^{-7} $\mu\text{mol/L}$ DMBQ 的处理为最高,为 80%;依次为 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ Kinetin 为 76%, 10^{-7} $\mu\text{mol/L}$ 6-BA 为 76%, 10^{-9} $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素为 66%, 10^{-7} $\mu\text{mol/L}$ 间苯二酚为 66%。DMBQ 属于醌类,6-BA 和 Kinetin 同属细胞分裂素类,槲皮素属于类黄酮类,间苯二酚属于酚类。比较各处理间的差异可以得出如下结论:对管花肉苁蓉吸器诱导而言,醌类处理优于细胞分裂素类,酚类处理对其影响最小。

表1 不同浓度诱导因子对吸器的诱导率

Table 1 Haustorium induction rate

%

处理	诱导因子用量						CK
	1	2	3	4	5		
	$1 \times 10^{-6} \mu\text{mol/L}$	$1 \times 10^{-7} \mu\text{mol/L}$	$1 \times 10^{-8} \mu\text{mol/L}$	$1 \times 10^{-9} \mu\text{mol/L}$	$1 \times 10^{-10} \mu\text{mol/L}$	1 mol/L	
DMBQ	70 ab	80 a	66 ab	50 bc	36 c	33 c	
Kinetin	76 a	73 a	73 a	70 a	56 ab	33 b	
6-BA	63 ab	76 a	76 a	76 a	53 b	33 c	
槲皮素	53 ab	53 ab	60 ab	66 a	46 bc	33 c	
间苯二酚	60 ab	66 a	56 ab	46 bc	36 c	33 c	

注：不同字母为 0.05 水平上差异显著，下同。

2.4 不同诱导因子对管花肉苕蓉芽管顶端活性氧积累的影响

由表 2 可知，不同激素处理对管花肉苕蓉幼苗活性氧的积累影响极显著。其中以槲皮素处理对活性氧的含量影响较大。吸器在侵入过程中，活性氧

浓度太大，寄主会产生抵御反应，不利于寄生植物寄生成功。由表 2 可以看出，DMBQ 处理和对照相比，差异不显著，而其他处理和对照相比差异极显著。从侵入过程寄主的排斥角度而言，DMBQ 处理更有利于寄生成功。

表2 不同浓度吸器诱导因子对活性氧的影响(荧光强度)

Table 2 Effect of haustorium inducing factor on reactive oxygen species

pixel intensity

处理	诱导因子用量						CK
	1	2	3	4	5		
	$1 \times 10^{-6} \mu\text{mol/L}$	$1 \times 10^{-7} \mu\text{mol/L}$	$1 \times 10^{-8} \mu\text{mol/L}$	$1 \times 10^{-9} \mu\text{mol/L}$	$1 \times 10^{-10} \mu\text{mol/L}$	1 $\mu\text{mol/L}$	
DMBQ	665.09 d	683.61 d	727.73 c	794.73 b	846.47 a	766.93 bc	
Kinetin	1 532.95 a	1 341.59 b	880.01 c	739.92 cd	625.519 cd	766.93 d	
6-BA	3 323.77 a	3 108.05 b	2 932.77 b	2 678.31 c	2 629.99 c	766.93 d	
槲皮素	1 974.00 c	2 643.17 b	3 593.64 a	3 593.64 a	1 681.31 d	766.93 e	
间苯二酚	785.89 d	1 496.96 c	1 691.16 b	1 893.93 a	1 491.19 c	766.93 d	

3 讨论

管花肉苕蓉是我国的濒危寄生药物，接种率低是当前生产的主要问题，吸器是寄生植物和寄主连接的主要器官，并且通过吸器从寄主体内吸收水分和养分。在管花肉苕蓉生产上，吸器发生是影响接种过程的关键环节，它的发生时间和速度及与寄主维管束连接早晚，因 HIFs 的种类、浓度和作用时间而不同。在独脚金、列当等寄生植物上的研究表明，酚类、醌类、细胞分裂素类和类黄酮类^[17]促进吸器形成。此外，在半寄生植物独脚金上的研究表明，ROS 主要在独脚金的根尖处产生并且和寄主根

部的过氧化物酶共同作用氧化寄主根部的酚类物质，在其侵入寄主的过程中起了重要作用^[9]。管花肉苕蓉属于全寄生根寄生植物，关于上述诱导因子对管花肉苕蓉吸器诱导及 ROS 积累的研究尚未见报道。

本研究结果表明： H_2O_2 主要分布于芽管的分裂组织的细胞表面上。这点同 Lynn 在独脚金上的研究结果相同^[18]。 H_2O_2 主要分布于独脚金初生根的分裂组织的细胞里及细胞表面上，只有初生的分裂细胞才分泌 H_2O_2 ，吸器诱导因子的存在能够阻止寄生植物 H_2O_2 的在寄主周围的过量。此外，DMBQ、6-BA、kintine、槲皮素和间苯二酚，在一定

阈值内均能促进吸器发生。DMBQ以 10^{-7} $\mu\text{mol/L}$ 的处理的诱导率最高。为了探讨活性氧在管花肉苕蓉吸器诱导中的作用,进一步测定了DMBQ、6-BA、kintine、槲皮素和间苯二酚的不同浓度条件下对管花肉苕蓉芽管表面活性氧含量的影响。本研究结果表明,在一定的阈值下DMBQ、6-BA、kintine、槲皮素和间苯二酚均可促进芽管顶端活性氧含量提高。

Smith^[19]认为苯醌类化合物都是通过一般的氢氧还原作用来诱导吸器的。细胞分裂素结构上与这些酚类化合物不同,它并不直接与寄主植物的酚类物质受体发生作用。然而,细胞分裂素也能够诱导豆科植物根瘤的发生,Riopel^[20]用细胞分裂素在玄参科上的研究也表明其能够诱导玄参科植物的吸器发育。相反,生长素对吸器诱导起限制作用。这些都表明吸器发育与细胞分裂素密切相关,诱导吸器的信号物质在某个阶段是通过植物生长调节物质的作用而实现的。至于活性氧改变对寄主根界面DMBQ生成量及吸器发生的影响,需要做进一步的深入研究。

参 考 文 献

[1] Santos C V D, Delavault P, Letousey P, et al. Identification by suppression subtractive hybridization and expression analysis of *Arabidopsis thaliana* putative defence genes during *Orobanche ramosa* infection[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2003, 62: 297-303

[2] Yoder J I. Parasitic plant responses to host plant signals: a model for subterranean plant-plant interactions[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1999, 2: 65-70

[3] Scholes J D, Press M C. *Striga* infestation of cereal crops—an unsolved problem in resource limited agriculture[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008, 11: 180-186

[4] Kogel K, Franken P, Huckelhoven R. Endophyte or parasite—what decides? [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9: 358-363

[5] Burketova L, Stillerova K, Feltlova M. Immunohistological localization of chitinase and b-1, 3-glucanase in rhizomania-diseased and benzothiadiazole treated sugar beet roots [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2003, 63: 47-54

[6] 杨太新, 卢月霞, 郭玉海, 等. 华北平原管花肉苕蓉干物质积累和松果菊苷含量动态变化研究[J]. *中国中药杂志*, 2006, 16: 1317-1320

[7] Yoder J I, Scholes J D. Host plant resistance to parasitic weeds: recent progress and bottlenecks[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13: 478-484

[8] Kim D, Kocz R, Boone L, et al. On becoming a parasite: evaluating the role of wall oxidases in parasitic plant development[J]. *Chem Biol*, 1998, 5: 103-117

[9] Keyes W J, Taylor J V, Apkarian R P, et al. Dancing together: Social controls in parasitic plant development [J]. *Plant Physiology*, 2001, 127: 1508-1512

[10] Bar-Nun N. A Role for IAA in the Infection of *Arabidopsis thaliana* by *Orobanche aegyptiaca* [J]. *Annals of Botany*, 2008, 101: 261-265

[11] Barcelo A R. Xylem parenchyma cells deliver the H_2O_2 necessary for lignification in differentiating xylem vessels[J]. *Planta*, 2005, 220: 747-756

[12] Dunand C, Crèvecoeur M, Penel C, et al. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases[J]. *New Phytologist*, 2007, 174(2): 332-341

[13] Julia Foreman V D J H, Panagiota Mylona H M M A, Paul Linstead S C C B, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth [J]. *Letters to Nature*, 2003, 422: 442-446

[14] 王华磊, 汤飞宇, 杨太新, 等. 寄生被子植物吸器的研究[J]. *生物学通报*, 2004, 39(11): 1812-1814

[15] 乔学义, 王华磊, 郭玉海. 一种刺激肉苕蓉种子萌发和吸器发育的方法[J]. *植物学通报*, 2007, 24(4): 521-525

[16] 王华磊, 杨太新, 杨重军, 等. 管花肉苕蓉种子萌发和寄生过程的形态学研究[J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(23): 1812-1814

[17] Fate G D, Chang M, G L D. Control of germination in *Striga asiatica*; chemistry of spatial definition[J]. *Plant Physiology*, 1990, 93: 201-207

[18] Andrew G Palmer, Michael C Chen, Kingler N P, et al. Parasitic angiosperms, semagenesis and general strategies for plant-plant signaling in the rhizosphere[J]. *Pest Manag Sci*, 2009, 65: 512-519

[19] Smith C E, Ruttiedge T, Zeng Z, et al. A mechanism for inducing plant development—the genesis of a specific inhibitor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6986

[20] Riopel J L. Experimental studies on induction of haustoria in *Agalinis purpure* [C] // Raleigh N C; Second Symposium on Parasitic Weeds. North Carolina State University, 1970: 165-173

(责任编辑: 袁文业)