

外源信号物质对肉苁蓉种子萌发与吸器形成的影响

陈虞超, 李苗, 陈晓军, 张丽, 宋玉霞*

宁夏农业生物技术重点实验室, 银川750002

摘要: 研究氟草敏(norflurazon)、氟啶酮(fluridone)、GR24、赤霉素(GA₃) 4种外源信号物质对肉苁蓉种子萌发的影响, 以及2,6-二甲氧基-对-苯醌(2,6-DMBQ)、5,8-二羟基萘醌(5,8-DHNQ)、阿魏酸(ferulic acid) 3种外源信号物质对萌发的肉苁蓉种子吸器形成的影响, 结果表明: 氟草敏、氟啶酮、GR24对肉苁蓉种子的萌发均具有明显的促进作用, 其中氟草敏作用最为显著, 处理168 h后肉苁蓉种子开始萌发, 萌发率最高达65%; 2,6-DMBQ对肉苁蓉种子吸器形成具有显著的促进作用, 处理48 h后肉苁蓉种子开始形成吸器, 吸器形成率最高达50%。

关键词: 外源信号物质; 肉苁蓉; 种子萌发; 吸器形成

Effects of Exogenous Signal Substances on Seed Germination and Haustorium Formation of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma

CHEN Yu-Chao, LI Miao, CHEN Xiao-Jun, ZHANG Li, SONG Yu-Xia*

Key Laboratory of Agricultural Biotechnology of Ningxia, Yinchuan 750002, China

Abstract: The effects of four exogenous signal substances (norflurazon, fluridone, GR24 and GA₃) on seed germination and three exogenous signal substances (2,6-dimethoxy-*p*-benzoquinone [2,6-DMBQ], 5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone [5,8-DHNQ] and ferulic acid) on haustorium formation of germinated seeds of *Cistanche deserticola* were studied. The results showed that norflurazon, fluridone and GR24 significantly promoted seed germination. The promotion of norflurazon was the most significant. The seeds treated with norflurazon began to germinate after 168 h, and the highest germination rate was 65%. 2,6-DMBQ significantly promoted haustorium formation. The germinated seeds began to form haustorium 48 h later after being treated with 2,6-DMBQ, and the highest haustorium formation rate was 50%.

Key words: exogenous signal substances; *Cistanche deserticola*; seed germination; haustorium formation

肉苁蓉为列当科肉苁蓉属(*Cistanche*)的多年生专性根寄生植物, 其寄主为藜科植物梭梭(*Haloxylon ammodendron*), 是我国西北荒漠和半荒漠地区珍贵的植物资源。它具有补肾阳、益精血、润燥通肠等功效, 是使用频率最高的补肾中药。由于生境恶劣、野生资源稀少、种子萌发率低以及人为过度采挖等因素影响, 肉苁蓉处于濒危境地, 为国家二级保护植物, 被列入《中国植物红皮书》。

肉苁蓉完成生活史的关键是种子的萌发和吸器的形成, 自然条件下, 肉苁蓉种子萌发、吸器形成靠寄主根系分泌外源信号物质诱导作用完成(宋玉霞等2008; 李天然1996; 李天然等1989)。由于这些信号物质属于瞬间作用, 很难迅速从寄主梭梭根系中分离得到。但Cook等(1966)、Yasuda等(2003)、Xie等(2009)先后从几种天然植物的根系分泌物中分离得到了独脚金内酯(strigolactone)类

化合物, 经研究, 独脚金内酯类化合物(特别是人工合成的GR24 (3-[4-methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2(R)-ylxymethylene]-3,3a(R),4,8b(S)-tetrahydroindeno-[1,2-b]furan-2-one)对独脚金(*Striga asiatica*)等其他根寄生植物的种子萌发具有诱导作用(Yoneyama等2009)。Kusumoto等(2006)的研究证明类胡萝卜素生物合成抑制剂氟草敏(norflurazon)和氟啶酮(fluridone)能够诱导预培养后的根寄生植物独脚金种子萌发。Chang和Lynn (1986)从高粱根中分离出2,6-二甲氧基-对-苯醌(2,6-dimethoxy-*p*-benzoquinone, 2,6-DMBQ), 发现其对根寄生植物种子吸器形成具有诱导作用。还有研究者认为酚酸、醌和

收稿 2011-11-15 修定 2012-01-17

资助 国家自然科学基金项目(30960023和31160066)。

* 通讯作者(E-mail: songyx666@163.com; Tel: 0951-6886755)。

黄酮类物质均可诱导根寄生植物种子吸器的形成(胡飞和孔垂华2003; Hirsch等2003)。在外源信号物质诱导肉苁蓉种子萌发和吸器形成方面, 研究者也开展了许多工作。牛东玲等(2006)、陈庆亮等(2009)用赤霉素(GA₃)等外源信号物质处理肉苁蓉种子后, 可明显地提高萌发率。乔学义等(2007)利用氟啶酮处理肉苁蓉种子, 使其萌发率达到52%。张汝民等(2009)通过研究发现, 植物激素和2,6-DMBQ可分别诱导肉苁蓉种子萌发与吸器形成。本实验在前人研究的基础上, 分别利用氟草敏、氟啶酮、GR24和GA₃对肉苁蓉种子进行处理, 用2,6-DMBQ、5,8-二羟基萘醌(5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone, 5,8-DHNQ)和阿魏酸(ferulic acid)对肉苁蓉种子萌发产生的类胚根状体进行处理, 将外源信号物质对肉苁蓉种子萌发和吸器形成的作用作系统地比较研究, 旨在为从根本上探讨和解决影响肉苁蓉寄生的关键问题提供理论依据。

材料与方法

1 材料

肉苁蓉(*Cistanche deserticola* Y. C. Ma)种子于2008年6月采自内蒙古阿拉善左旗苏海图苏木乌兰布和沙漠中自然分布的肉苁蓉植株。肉苁蓉由宁夏大学马德滋教授鉴定。GA₃、氟草敏、氟啶酮、阿魏酸、5,8-DHNQ购自Sigma公司, 2,6-DMBQ购自东京化成公司, 玻璃纤维滤纸购自Whatman公司, 其他试剂均为国产分析纯。GR24由中国科学院水利部水土保持研究所马永清研究员惠赠。

2 方法

2.1 试验处理

本实验在宁夏农业生物技术重点实验室进行。肉苁蓉种子经25℃的蒸馏水浸泡12 h, 然后用70%乙醇消毒30 s, 无菌水清洗3次, 再用0.1%次氯酸钠消毒15 min, 无菌水清洗5次。选取消毒后的种子100粒, 放在90 mm的培养皿中, 分别用外源信号物质浸泡处理(处理因素及水平见表1) 3 h后, 摆放在铺有玻璃纤维滤纸的无菌培养皿中, 在25℃、湿度80%的条件下于恒温培养箱中暗培养。Leica体式显微镜观察种子萌发情况, 记录初始萌发时间, 待各处理萌发的种子数不再增加时(30 d后), 视

表1 萌发处理因素及水平

Table 1 Levels of factors for exogenous signal substances inducing germination

水平	处理浓度/mol·L ⁻¹			
	氟草敏	氟啶酮	GR24	GA ₃
1	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹
2	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
3	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
4	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
5	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵

氟草敏的水溶液饱和浓度为1×10⁻⁵ mol·L⁻¹, 因此各物质的最大处理浓度也设为1×10⁻⁵ mol·L⁻¹。

萌发完全, 统计萌发率。选取萌发并生长良好的肉苁蓉种子100粒, 放在90 mm的培养皿中, 分别用外源信号物质浸泡处理(处理因素及水平见表2) 3 h后, 摆放在铺有玻璃纤维滤纸的无菌培养皿中, 在25℃、湿度80%的条件下于恒温培养箱中暗培养。每隔4 h在Leica体式显微镜下观察种子的类胚根状体吸器形成情况, 记录吸器初始形成时间, 待各处理形成吸器的种子数不再增加时(72 h后), 视吸器形成完全, 统计吸器形成率。以蒸馏水处理作为对照, 各处理重复3次。

表2 吸器形成处理因素及水平

Table 2 Levels of factors for exogenous signal substances inducing haustorium formation

水平	处理浓度/mol·L ⁻¹		
	2,6-DMBQ	阿魏酸	5,8-DHNQ
1	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹
2	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
3	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
4	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
5	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵

2.2 测定指标与方法

肉苁蓉种子的类胚根状体长度为种子长度的1/2时视为萌发, 萌发率=(萌发种子数/供试种子总数)×100% (处理30 d后测定); 吸器形成率=(吸器形成种子数/供试种子总数)×100% (处理72 h后测定)。

2.3 数据处理

试验数据采用Microsoft Excel 2003处理, 采用SPSS 1310软件进行方差分析。

实验结果

1 外源信号物质对肉苻蓉种子萌发的影响

对经外源信号物质处理的肉苻蓉种子进行连续观察后发现, 对照及不同浓度 GA_3 处理的肉苻蓉种子始终未萌发; 而氟草敏、氟啶酮以及GR24对肉苻蓉种子萌发具有显著的促进作用(图1-A和B)。其中, $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氟草敏作用最为显著,

萌发率达到65%, 相同浓度的GR24和氟啶酮处理后萌发率分别为54%和46%; 不同浓度的氟草敏、氟啶酮、GR24处理, 种子萌发率存在显著差异, 萌发率随处理浓度的升高而升高(表3)。相同浓度氟草敏、氟啶酮、GR24处理对肉苻蓉种子萌发的影响也存在显著差异, 处理后的萌发时间分别为168、216、360; 不同浓度的氟草敏、氟啶酮、GR24对萌发时间的影响差异不明显(表4)。

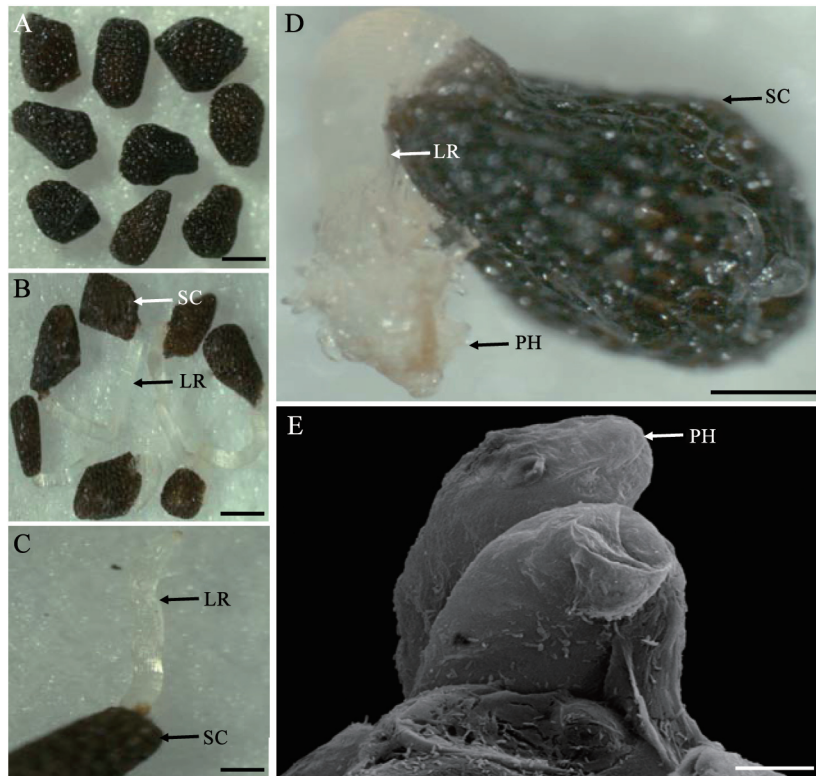


图1 外源信号物质处理后肉苻蓉种子萌发与吸器形成

Fig.1 The germination and haustorium formation of *C. deserticola* seeds treated with exogenous signal substances

A: 外源信号物质处理后尚未萌发的种子(标尺=100 μm); B: 外源信号物质处理后萌发的种子(标尺=100 μm); C: 外源信号物质处理后的萌发体(标尺=60 μm); D: 形成吸器的萌发体(标尺=100 μm); E: 电子显微镜下吸器的形态(标尺=20 μm)。SC: 种皮; LR: 类胚根状体; PH: 初生吸器。

2 外源信号物质对肉苻蓉吸器形成的影响

由表5可见, 对照及不同浓度5,8-DHNQ和阿魏酸处理后的肉苻蓉种子类胚根状体均未形成吸器; 只有不同浓度的2,6-DMBQ对肉苻蓉种子类胚根状体吸器形成具有明显的促进作用, 以浓度为 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的作用最为显著, 低于此浓度时吸器形成率随其浓度升高而升高, 高于此浓度时吸器形成率呈现下降趋势。不同浓度2,6-DMBQ对肉

苻蓉种子类胚根状体吸器诱导时间无影响, 均在48 h后形成吸器。

讨 论

研究表明, 试验所用的几种类胡萝卜素生物合成抑制剂物质氟草敏、氟啶酮以及独脚金内酯GR24对肉苻蓉种子的萌发具有显著的促进作用, 可使肉苻蓉种子萌发率分别达到65%、54%、46%,

表3 外源信号物质对肉苕蓉种子萌发率的影响

Table 3 The effect of exogenous signal substances on germination rate of *C. deserticola* seeds

水平	萌发率/%				
	氟草敏	氟啶酮	GR24	GA ₃	对照
1	22 ^{eA}	11 ^{eC}	16 ^{eB}	0 ^D	0 ^D
2	35 ^{dA}	23 ^{dC}	29 ^{dB}	0 ^D	0 ^D
3	45 ^{cA}	32 ^{cC}	39 ^{cB}	0 ^D	0 ^D
4	54 ^{bA}	38 ^{bC}	46 ^{bB}	0 ^D	0 ^D
5	65 ^{aA}	46 ^{aC}	54 ^{aB}	0 ^D	0 ^D

同列数据上标的不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$); 同行数据上标的不同大写字母表示差异显著($P < 0.05$)。表4和5同此。

表4 外源信号物质对肉苕蓉种子萌发时间的影响

Table 4 The effect of exogenous signal substances on germination time of *C. deserticola* seeds

水平	萌发时间/h		
	氟草敏	氟啶酮	GR24
1	168 ^A	216 ^B	360 ^C
2	168	216	360
3	168	216	360
4	168	216	360

表5 外源信号物质对肉苕蓉种子吸器形成率的影响

Table 5 The effect of exogenous signal substances on haustorium formation rate of *C. deserticola* seeds

水平	吸器形成率/%			
	2,6-DMBQ	阿魏酸	5,8-DHNQ	对照
1	11 ^d	0	0	0
2	32 ^e	0	0	0
3	50 ^a	0	0	0
4	39 ^b	0	0	0
5	31 ^c	0	0	0

因此, 我们认为这类物质很可能就是促进肉苕蓉种子萌发的有效外源信号物质。氟草敏与氟啶酮均为类胡萝卜素生物合成的抑制剂, 抑制类胡萝卜素的生物合成, 而类胡萝卜素是合成脱落酸(ABA)的前体, 因而氟草敏与氟啶酮能抑制ABA(ABA对种子萌发具有抑制作用)的合成。独脚金内酯类物质与ABA一样来自类胡萝卜素途径, 据Akiyama和Hayashi (2008)研究报道, 独脚金内酯类物质5-deoxy-strigol及其类似物来源于类胡萝卜素

途径中的八氢番茄红素(15-*cis*-phytoene), 氟草敏等抑制八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase)的活性, 避免八氢番茄红素转化成六氢番茄红素(phytofluene), 进而导致5-deoxy-strigol及其类似物的积累, 诱导种子萌发。氟草敏与氟啶酮既可抑制ABA合成, 又能促进独脚金内酯类物质的积累, 所以能够诱导肉苕蓉种子萌发。GR24为人工合成的独脚金内酯类物质, 所有的独脚金内酯均具有相同的碳骨架, 是由三环内酯(A、B、C三环)通过烯醇醚键与 α , β -不饱和呋喃环D环耦合形成的。对独脚金内酯的生物活性分析显示, 这些分子中的C、D环部分是独脚金等根寄生植物种子对这类信号物质产生反应的主要部位(Humphrey等2006)。在外源信号物质作用下, 根寄生植物种子启动萌发可能是通过受体介导的信号机制进行不可逆的级联信号传递来实现的(Akiyama和Hayashi 2008; Sugimoto等1998)。依靠受体介导的信号机制而进行作用的诱导反应, 所需要的外源信号物质的量很少。本研究中低浓度的氟草敏、氟啶酮和GR24对肉苕蓉种子萌发具有显著诱导作用证实了这一机制的可能性。本研究中GA₃处理的肉苕蓉种子未见萌发, 与牛东玲等(2006)、陈庆亮等(2009)的研究结果不一致, 我们认为这可能与肉苕蓉种子前期是否进行过层积处理有关。

研究表明, 试验所用几种对苯醌类物质中只有2,6-DMBQ对肉苕蓉种子吸器的形成具有十分显著的促进作用。我们认为这类物质很可能就是促进肉苕蓉种子吸器形成的有效外源信号物质。

2,6-DMBQ的核心结构是对苯醌, 其甲氧基团结构是诱导吸器形成的活性基团。5,8-DHNQ的核心结构虽然也是对苯醌, 但与2,6-DMBQ相比缺少甲氧基团, 我们推断甲氧基团的缺失是5,8-DHNQ对诱导肉苕蓉种子类胚根状体吸器形成无明显作用的原因。因此, 我们认为诱导肉苕蓉种子吸器形成的外源信号物质不仅要具备核心结构对苯醌, 还要具备甲氧基团, 以增强其活性。吸器形成不仅受外源信号物质的调控, 在此过程中还涉及一系列氧化-还原反应。Smith等(1996)对醌类物质与根寄生植物受体进行了研究, 认为醌类物质得到光化学刺激或NADH所提供的1个电子形成半醌, 半醌又失去电子重新氧化形成醌类, 通过这样一

种氧化-还原机制来控制一些蛋白质和其他分子的活性,从而诱导吸器的形成。

种子的萌发和吸器的形成是肉苁蓉完成寄生生长的关键,外源信号物质能够有效促进该关键环节的完成,因此,对外源信号物质的研究,在深入探究肉苁蓉寄生生长机制、离体寄生、人工种植等方面具有重要意义。

参考文献

- 陈庆亮,王华磊,王志芬,单成刚,翟志席,郭玉海(2009). 低温层积与外源GA₃对肉苁蓉种子萌发及其内源GA和ABA含量的影响. 植物生理学通讯, 45 (3): 270~272
- 胡飞,孔垂华(2003). 寄生植物对寄主植物的化学识别. 生态学报, 23 (5): 965~971
- 李天然(1996). 寄生被子植物的种子生理及其与寄主的相互关系. 植物生理学通讯, 32 (6): 450~457
- 李天然,许月英,戈建新,徐梅英(1989). 肉苁蓉(*Cistanche deserticola* Ma)种子的萌发与寄主梭梭(*Haloxylon ammodendron* Bunge)的关系. 内蒙古大学学报(自然科学版), 20 (3): 395~399
- 牛东玲,宋玉霞,郭生虎,马洪爱,李苗,郑国琦,高晓原(2006). 肉苁蓉种子休眠与萌发特性的初步研究. 种子, 25 (2): 17~21
- 乔学义,王华磊,郭玉梅(2007). 一种刺激肉苁蓉种子萌发和吸器发育的方法. 植物学通报, 24 (4): 521~525
- 宋玉霞,马永清,牛东玲,郭生虎,郑国琦,马洪爱,李苗(2008). 肉苁蓉寄生生长形态发育. 植物学通报, 25 (6): 680~686
- 张汝民,陈宏伟,张丹,白静,高岩(2009). 肉苁蓉种子萌发与吸器形成的化学物质诱导. 林业科学, 45 (6): 39~44
- Akiyama K, Hayashi H (2008). Plastid-derived strigolactones show the way to roots for symbionts and parasites. *New Phytol*, 178: 695~698
- Chang M, Lynn DG (1986). The haustorium and the chemistry of host recognition in parasitic angiosperms. *J Chem Ecol*, 12 (2): 561~579
- Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH (1966). Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. *Science*, 154: 1189~1190
- Hirsch AM, Bauer WD, Bird DM, Cullimore J, Tyler B, Yoder JI (2003). Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology*, 84 (4): 858~868
- Humphrey AJ, Galster AM, Beale MH (2006). Strigolactones in chemical ecology: waste products or vital allelochemicals? *Nat Prod Rep*, 23: 592~614
- Kusumoto D, Chae SH, Mukaida K, Yoneyama K, Yoneyama K, Joel DM, Takeuchi Y (2006). Effects of fluridone and norflurazon on conditioning and germination of *Striga asiatica* seeds. *Plant Growth Regul*, 48: 73~78
- Smith CE, Ruttledge T, Zeng XZ, O'Malley RC, Lynn DG (1996). A mechanism for inducing plant development: the genesis of a specific inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 (14): 6986~6991
- Sugimoto Y, Wigchert SCM, Thuring JWJF, Zwanenbury B (1998). Synthesis of all eight stereoisomers of the germination stimulant sorgolactone. *J Org Chem*, 63: 1259~1267
- Xie XN, Yoneyama K, Kurita JY, Harada Y, Yamada Y, Takeuchi Y, Yoneyama K (2009). 7-Oxoobanchyl acetate and 7-oxoobanchol as germination stimulants for root parasitic plants from flax (*Linum usitatissimum*). *Biosci Biotechnol Biochem*, 73 (6): 1367~1370
- Yasuda N, Sugimoto Y, Kato M, Inanaga S, Yoneyama K (2003). (+)-Strigol, a witchweed seed germination stimulant from *Menispermum dauricum* root culture. *Phytochemistry*, 62: 1115~1119
- Yoneyama K, Xie XN, Yoneyama K, Takeuchi Y (2009). Strigolactones: structures and biological activities. *Pest Manag Sci*, 65 (5): 467~470