

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201412005

闫慧芳,曾炳山,范春节,等. 油菜素内酯对巨桉组培中不定根诱导、苗木生长和茎基部细胞结构的影响[J]. 广西植物, 2016, 36(7):763-767  
YAN HF, ZENG BS, FAN CJ, et al. Adventitious root induction, shoot height and cellular structure of basal stem by exogenous application of brassinosteroid in *Eucalyptus grandis*[J]. Guihaia, 2016, 36(7):763-767

## 油菜素内酯对巨桉组培中不定根诱导、苗木生长和茎基部细胞结构的影响

闫慧芳, 曾炳山, 范春节\*, 刘英, 裘珍飞, 李湘阳

(中国林业科学研究院 热带林业研究所, 广州 510520)

**摘要:**以巨桉优良无性系 EG5 和 GL1 组培苗为材料,在生根培养基中分别加入 0、0.005、0.01、0.05、0.10、0.20 mg · L<sup>-1</sup> 的油菜素内酯,研究其对桉树组培苗中不定根的诱导、茎的生长以及茎基部细胞分化的影响。结果表明:油菜素内酯对巨桉无性系 EG5 的生根率和苗高具有显著影响,无性系 EG5 在含有 0.005 mg · L<sup>-1</sup> 油菜素内酯的生根培养基中达到最高为 76.6% 的生根率,同时组培苗的苗高随着油菜素内酯浓度的增加而呈现出逐渐降低的趋势。对于巨桉无性系 GL1,在生根培养基中添加 0.05 mg · L<sup>-1</sup> 油菜素内酯达到最高为 88.3% 的生根率,不同浓度的油菜素内酯对苗高没有显著影响。同时也发现油菜素内酯明显抑制了无性系 EG5 不定根的根长,随着其浓度的增加根长逐渐变短;而根条数表现为低浓度时无显著影响,在高浓度时显著性降低,且油菜素内酯对侧根的诱导和分化不起作用。另外通过对无性系 EG5 生根植株基部的组织切片和化学染色分析表明,油菜素内酯在 0.10 mg · L<sup>-1</sup> 时能促进桉树基部的形成层和木质部的分化,这可能是抑制不定根诱导和分化的原因之一。

**关键词:** 油菜素内酯, 桉树, 不定根诱导, 形成层

**中图分类号:** Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2016)07-0763-05

## Adventitious root induction, shoot height and cellular structure of basal stem by exogenous application of brassinosteroid in *Eucalyptus grandis*

YAN Hui-Fang, ZENG Bing-Shan, FAN Chun-Jie\*,

LIU Ying, QIU Zhen-Fei, LI Xiang-Yang

(Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China)

**Abstract:** Brassinosteroids (BRs) refer to a group of polyhydroxylated plant steroid hormones that are essential regulators of plant architecture, growth and development including embryogenesis, cell division, vascular system differentiation and stress tolerance processes. However, the effects of BRs in adventitious root induction of *Eucalyptus* have not been demonstrated. In this study, adventitious root induction, growth of shoots and histochemical staining of basal stem were

收稿日期: 2015-03-16 修回日期: 2016-01-25

基金项目: 国家自然科学基金(31400554); 国家科技计划项目(2013AA102705); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(RITFYWZX201304)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(31400554); Project of National Science and Technology Plan(2013AA102705); Special Foundamental Research Fund of the Central Research Institutes of Public Benefit (RITFYWZX201304)].

作者简介: 闫慧芳(1987-),男,陕西渭南人,硕士研究生,研究方向为分子遗传学,(E-mail) huifang@sina.com.

\*通讯作者: 范春节,博士,助理研究员,从事木材形成分子机理研究,(E-mail) fancy0417@163.com.

analyzed by adding the exogenous brassinosteroid (Concentration: 0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 0.20 mg · L<sup>-1</sup>, respectively) in the root inducing medium of *E. grandis* clones EG5 and GL1. The results showed that the height of shoot and induction frequency of adventitious root of *E. grandis* clone EG5 were significantly affected by adding the exogenous brassinosteroid. Induction frequency of adventitious root was 76.6%. The length of adventitious root of *E. grandis* clone EG5 was the highest in the root inducing medium containing 0.005 mg · L<sup>-1</sup> brassinosteroid for. In the meantime. The height of shoot decreased significantly with the increasing concentration of exogenous brassinosteroid and it was reduced by 21.8% at 0.10 mg · L<sup>-1</sup> brassinosteroid concentration compared to control. The adventitious root induction frequency of *E. grandis* clone GL1 reached the highest level with 88.3% in the root inducing medium of adding 0.05 mg · L<sup>-1</sup> brassinosteroid concentration but the height of shoot showed no significant change by adding the exogenous brassinosteroid. It was interesting that the root elongation of *E. grandis* clone EG5 was significantly inhibited due to the addition of the exogenous brassinosteroid. Root length and number were reduced to 2.49 cm and 1.75 at 0.20 mg · L<sup>-1</sup> brassinosteroid from 4.64 cm and 3.02 (control) respectively. However, the lateral root induction and differentiation were not affected by adding the exogenous brassinosteroid. Besides, the growth in xylary cells of basal stem was clearly promoted and the cambium cell number of basal stem increased at 0.10 mg · L<sup>-1</sup> brassinosteroid by way of the histochemical analysis. Together, brassinosteroids was necessary to adventitious root induction and shoot growth and increasing xylem was a primer cause of lower frequency of adventitious root induction at a few extra brassinosteroid.

**Key words:** brassinosteroid, *Eucalyptus grandis*, adventitious root induction, cambium

油菜素内酯 (Brassinosteroids, BRs) 是广泛存在于植物中一种甾醇类化合物, 作为一种类固醇类激素, 在植物生长发育中起着不可缺少的作用。早期的研究发现通过外施 BRs 可明显促进胚轴的伸长、提高农作物产量、提高植物抗逆性和果蔬的生长 (候雷平和李梅兰, 2001; 束红梅等, 2011)。在火炬松 (*Pinus taeda*)、花旗松 (*Pseudotsuga menziesii*)、挪威云杉 (*Picea abies*)、佛罗里达榿树 (*Torreya taxifolia*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 的体胚诱导过程中发现添加不同浓度的 BRs 可以促进胚性细胞的诱导和进一步的分化 (Ma et al, 2012; Pullman et al, 2003)。另外在培养基中添加不同浓度的 BRs 有助于狐米草 (*Spartina patens*) 愈伤组织的诱导和植株再生 (Lu et al, 2003), 而以烟草 (*Nicotiana tabacum*) 叶片为外植体进行愈伤组织诱导和植株再生中进一步证实了 BRs 的作用 (Song-Lim Kim, 2008)。

BRs 除了参与到种子萌发、矮化、黑暗中光周期响应、改变气孔分布、延迟开花、雄性不育等发育过程中 (Zhu et al, 2013), 而且还在细胞伸长和细胞壁扩展中起到重要作用 (候雷平和李梅兰, 2001)。在百日草叶肉悬浮细胞培养时加入 BRs 可以诱导维管组织的分化, 同时在菊芋 (*Helianthus tuberosus*) 中也发现 BRs 可以在体外诱导木质部的分化 (Clouse, 1996; Fukuda, 1997)。在木本植物中发现 BRs 可以诱导日本山杨和美洲锯齿白杨杂交种 (*Populus sieboldii* × *P. grandidentata*) 愈伤组织中导管的形

成, 而且这些导管分子具有典型的次生木质部 (Yamagishi et al, 2013)。研究也发现 BRs 能够引起鹅掌楸 (*Liriodendron tulipifera*) 中纤维和导管长度的增加, 促进细胞分裂和延伸, 引起木质素合成基因的下调 (Jin et al, 2014)。尽管如此, BRs 对植物根发育的作用研究较少, 尤其是对木本植物不定根发育的影响几乎未见有报道。

本研究通过外源施加 BRs 到桉树生根培养中, 研究油菜素内酯对桉树不定根诱导的影响, 旨在为木本植物不定根的诱导提供新的思路。同时通过对桉树生根苗茎基部组织化学分析, 确定 BRs 对桉树茎基部细胞结构的影响, 进一步了解其对桉树茎生长发育的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

采用在增殖培养基 (改良的 MS 培养基 + 0.50 mg · L<sup>-1</sup> 6BA + 0.10 mg · L<sup>-1</sup> NAA) 上培养 15 d 的巨桉无性系 EG5 和 GL1 无菌增殖苗, 选择生长健壮、苗高约为 1.50 cm 的增殖芽苗进行生根实验。

### 1.2 桉树生根实验

材料为巨桉无性系 EG5 和 GL1 组培生根苗。分别采用改良的 1/2MS 培养基 + 1.00 mg · L<sup>-1</sup> IBA, 同时加入 0、0.005、0.01、0.05、0.10、0.20 mg · L<sup>-1</sup> 油菜素内酯, 每个处理 10 ~ 15 瓶, 每瓶 10 ~ 15 株。

20 d 调查生根率、苗高和生长状况。

对于桉树根长和根条数选择巨桉无性系 EG5, 在生根培养基中 30 d 后测量最长根的根长、根条数和是否有侧根。

### 1.3 植物组织切片

选择对照和添加  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BRs 生根培养基上培养 30 d 的巨桉 EG5 的基部, 切取 3~5 mm 的茎段, 立即浸入 FAA 固定液, 抽气 2 次, 每次 15 min, 室温下固定 24 h 以上。然后依次通过逐级脱水至 100% 叔丁醇, 每级 1.5~2 h。最后一次加入与叔丁醇等体积的石蜡,  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 24 h, 期间用纯石蜡替代 4 次。然后进行包埋、固定和修块, 切片时采用滑走切片机切出  $12 \text{ }\mu\text{m}$  厚度的切片, 在  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$  温箱中过夜烤片。经过脱蜡后甲苯胺蓝 O (TBO) 滴染约 1 min, 漂洗, 甘油封片, 显微镜观察拍照。

### 1.4 统计分析

应用 SPSS 和 EXCEL 软件对生根苗各项指标进行方差分析和多重比较, 多重比较采用 LSD 最小显著性差异法 ( $P < 0.05$ ), 生根率在进行方差分析前采用反正弦转换。

## 2 结果与分析

### 2.1 BRs 在巨桉无性系不定根诱导中的作用

不同浓度的 BRs 对巨桉的生根率具有显著性影响 (图 1), 在无性系 GL1 中, 随着 BRs 浓度的增加, 桉树的生根率呈现不同程度的增加, 在外施 BRs 浓度为  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时达到最高 (88.3%)。在无性系 EG5 中, 外施不同浓度的 BRs 对其生根率的影响也达到显著水平, 在外施 BRs 较低时如  $0.005$ 、 $0.01$  和  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, EG5 的生根率显著性增加; 在 BRs 浓度为  $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, EG5 的生根率达到最高 (76.6%)。从图 1 可以看出, 在浓度超过  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基中, EG5 的生根率显著下降, 当培养基中 BRs 的浓度为  $0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, EG5 的生根率达到最低, 为 34.1%, 明显低于对照的 57.0%, 说明高浓度的 BRs 抑制了桉树不定根的诱导。

### 2.2 BRs 对巨桉苗高的影响

通过对不同浓度 BRs 处理的巨桉无性系 EG5 和 GL1 的生根苗高度进行测量, 图 2 结果表明 EG5 和 GL1 对不同浓度 BRs 响应不同。外施 BRs 抑制了 EG5 的生长, 芽苗的抽高受到明显抑制, 在  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时达到了最低 (1.57 cm), 与对照相比降低

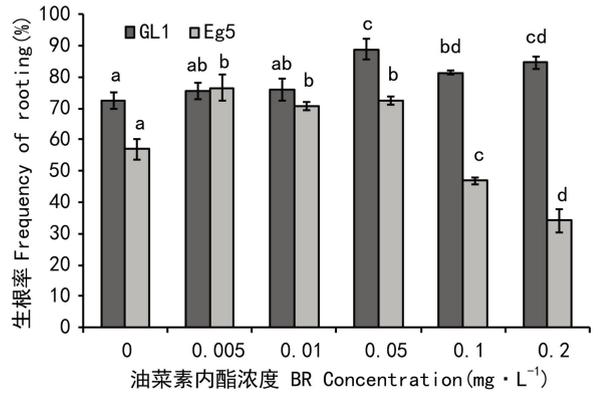


图 1 不同浓度的油菜素内酯对巨桉无性系生根率的影响 同一个无性系中不同的小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

Fig. 1 Effects of different concentrations of brassinosteroid on the rooting rate of clone *E. grandis* Different small letters in the same column represent significant differences ( $P < 0.05$ ). The same below.

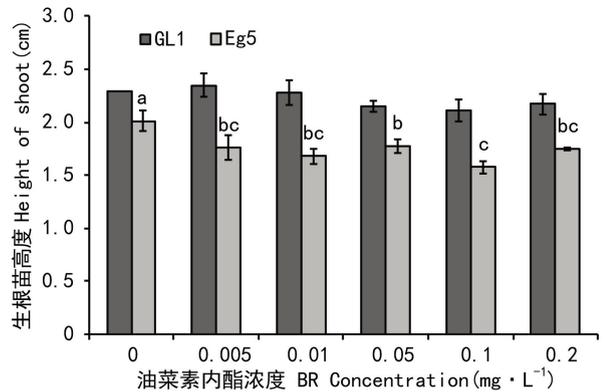


图 2 不同浓度油菜素内酯对巨桉生根苗高度的影响  
Fig. 2 Effects of different concentrations of brassinosteroid on the shoot height of *E. grandis*

了 21.8%。而施加不同浓度的 BRs 到无性系 GL1 发现其对生根苗高度上的影响不显著。尽管如此, 仍然可以看到在加入 BRs 后苗高略微下降。可能是由于不同无性系之间由于茎基部结构的差异导致其对油菜素内酯的响应浓度和响应方式的不同。

### 2.3 BRs 对 EG5 不定根根长和根条数的影响

由于在生根实验中发现 BRs 对 EG5 生根率和高度上的影响, 为了弄清是否由于根生长受到抑制引起生长上的抑制, 因此对 EG5 的根长和根条数进行了进一步的研究。从图 3 可以看出, 在 30 d 的生根培养基上, 发现随着 BRs 浓度的增高, 根长出现

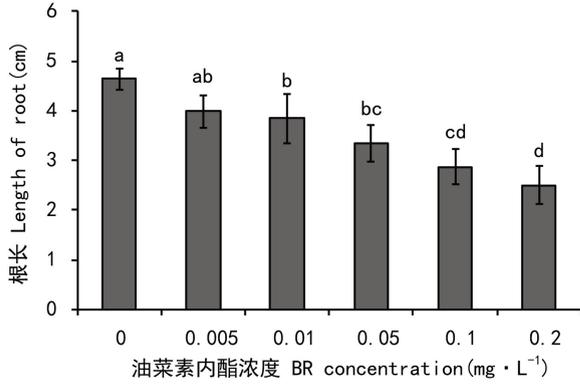


图3 油菜素内酯对巨桉 EG5 根长的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of brassinosteroid on root length of *E. grandis* clone EG5

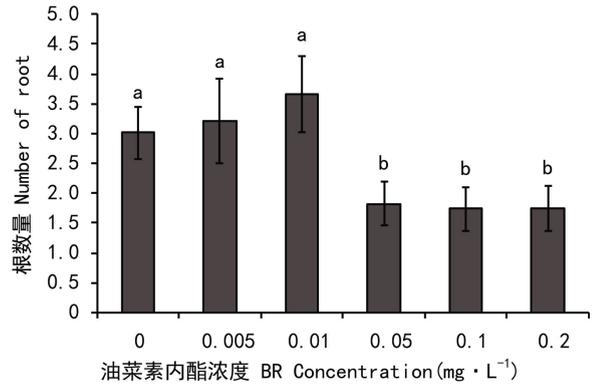


图4 油菜素内酯对巨桉 EG5 根数量的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of brassinosteroid on the root number of *E. grandis* clone EG5

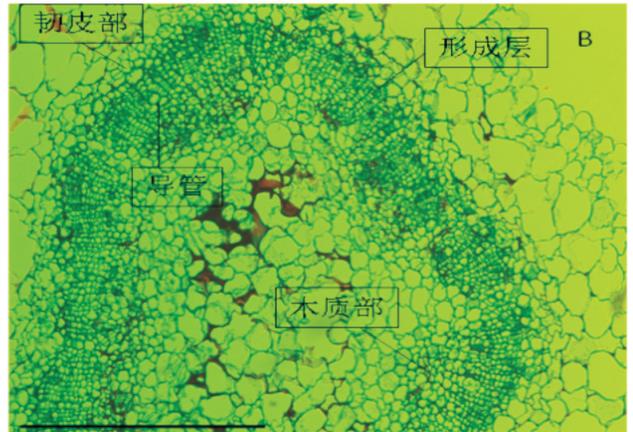
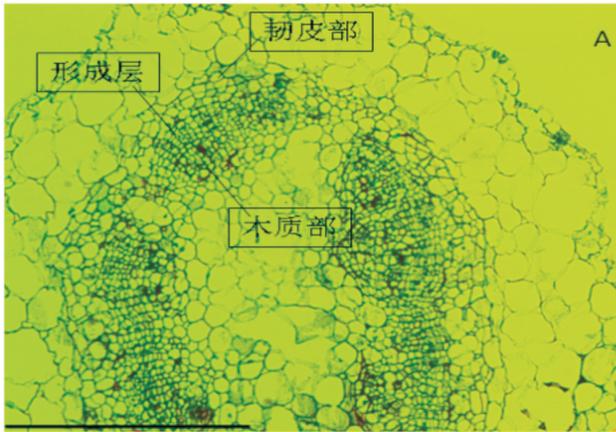


图5 巨桉 EG5 生根苗基部切片分析 A. 对照; B.  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BR。线状比例为 0.10 mm。

Fig. 5 Histochemical analysis of basal stem of *E. grandis* clone EG5 A. Control; B.  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  brassinosteroid. Scale bar=0.10 mm.

明显下降。在没有添加 BRs 的培养基中,平均根长为 4.64 cm;而在浓度为  $0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的生根培养基中平均根长只有 2.49 cm,说明 BRs 抑制了 EG5 不定根的伸长,这可能是 BRs 抑制桉树生根苗抽高的主要原因之一。

在此基础上,进一步对外施 BRs (浓度为 0.005 和  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),并对不定根数量进行了分析。从图 4 可以看出,与对照相比,不定根的数量无明显变化,说明低浓度 BRs 对 EG5 不定根诱导作用不显著。而随着 BRs 浓度的进一步增高,不定根的数量明显降低,由原来的平均在 3 条以上降低到 2 条以下。这些与 BRs 在高浓度时引起巨桉生根率降低的结果相一致,说明高浓度的 BRs 明显抑制了不定根的诱导和形成。除此之外,通过对生根苗中侧根

的诱导统计,所有处理的不定根都有侧根出现。这表明 BRs 主要通过影响桉树不定根的诱导和发育来进一步作用于桉树的生长。

#### 2.4 BRs 对桉树茎基部初生木质部分化的影响

在上述研究中发现,高浓度 BRs 抑制了桉树不定根的诱导,为了进一步了解其机制,因此对茎基部进行了细胞结构分析。在外施 BRs (浓度在  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 中发现,BRs 引起桉树基部膨胀作用最为明显,因此在本研究中选择外施 BRs,当外施 BRs 的浓度在  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,对 EG5 生根苗茎基部取样进行石蜡切片分析。从图 5 可以看出,与对照相比,韧皮部细胞数量变少,细胞变小,而薄壁细胞数量明显增加,且细胞变小,同时薄壁细胞连接起来,甚至出现导管,已经具有明显的次生长,另外在图 5 中

还可以明显看到木质部细胞明显增加。

### 3 讨论与结论

本文通过在桉树生根培养基中添加不同浓度的 BRs 研究其对桉树不定根诱导、苗木高以及桉树茎基部细胞结构的影响。结果表明低于  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 BRs 可以不同程度地提高桉树的生根率,且对植株的高度生长影响较小甚至不受影响。因此可以通过添加适当浓度的 BRs 来改善和提高木本植物组培过程中的不定根诱导困难的问题,这为解决木本植物生根率低的问题提供一种解决方式。

值得注意的是  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 BRs 会明显地抑制不定根的诱导。经过切片分析,  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 BRs 引起桉树基部的形成层细胞增多,且木质化程度增加。这些结果与 BRs 诱导百日草悬浮细胞形成导管以及 BRs 会引起杨树愈伤组织诱导次生木质部的形成结果一致 (Fukuda, 1997; Yamagishi et al, 2013),说明 BRs 对桉树组培苗茎基部木质化细胞的诱导和分化起作用。在白桦 (*Betula platyphylla*) 不定根诱导的过程中对不定根起源研究时发现,不定根起源于幼茎内部少数维管射线细胞与形成层的交叉处加宽的部位 (詹亚光等, 2002),而在本研究中发现  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 BRs 引起桉树基部形成了环状的形成层,意味着进入了次生生,在此过程中单独的成团细胞减少,引起诱导不定根的条件减少。说明桉树茎基部的木质化增加可能是不定根诱导受到抑制的主要原因之一。

除此之外,在研究中发现添加 BRs 明显地抑制了不定根的伸长,与小麦和绿豆中的作用类似 (Roddick & Ikekawa, 1992)。而在拟南芥中发现 BRs 在低浓度时仍然能够促进根的伸长 (Müssig et al, 2003),但会抑制根毛的发育。与之不同,在水稻中 BRs 表现出在一定的浓度范围内促进根毛的生长发育 (王凤茹和董金皋, 2010)。因此推测 BRs 对不定根发育的影响受到剂量调控,不同物种响应 BRs 的浓度不同从而导致其对根发育的影响不同。

#### 参考文献:

CLOUSE SD, 1996. Molecular genetic studies confirm the role of

- brassinosteroids in plant growth and development [J]. *Plant J*, 10: 1-8.
- FUKUDA H, 1997. Tracheary element differentiation [J]. *Plant Cell*, 9: 1 147.
- HOU LP, LI ML, 2001. Progress of studies on the plant growth promoting mechanism of Brassinolide (BR) [J]. *Chin Bull Bot*, 18:560-566. [侯雷平, 李梅兰, 2001. 油菜素内酯 (BR) 促进植物生长机理研究进展 [J]. *植物学通报*, 18:560-566.]
- JIN H, DO J, SHIN SJ, et al, 2014. Exogenously applied 24-epi brassinolide reduces lignification and alters cell wall carbohydrate biosynthesis in the secondary xylem of *Liriodendron tulipifera* [J]. *Phytochemistry*, 101:40-51.
- LU Z, HUANG M, GE DP, et al, 2003. Effect of brassinolide on callus growth and regeneration in *Spartina patens* (Poaceae) [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 73:87-89.
- MÜSSIG C, SHIN GH, ALTMANN T, 2003. Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 133:1 261-1 271.
- MA X, BUCALO K, DETERMANN RO, et al, 2012. Somatic embryogenesis, plant regeneration, and cryopreservation for *Torreya taxifolia*, a highly endangered coniferous species [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 48:324-334.
- PULLMAN GS, ZHANG Y, PHAN BH, 2003. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice [J]. *Plant Cell Rep*, 22:96-104.
- RODDICK JG, IKEKAWA N, 1992. Modification of root and shoot development in monocotyledon and dicotyledon seedlings by 24-epibrassinolide [J]. *J Plant Physiol*, 140:70-74.
- SHU HM, NI WC, GUO SQ, 2011. Brassinosteroid: biosynthesis, metabolism and its regulation on plant salt tolerance [J]. *Mol Plant Breed*, 9: 1 261-1 266. [束红梅, 倪万潮, 郭书巧, 2011. 油菜素内酯代谢相关基因及其调控植物耐盐性的研究进展 [J]. *分子植物育种*, 9:1 261-1 266.]
- SONG LIM KIM YL, SEUNG-HYEON L, SOO-HWAN K, et al, 2008. Brassinolide influences the regeneration of adventitious shoots from cultured leaf discs of tobacco [J]. *J Plant Biol*, 51: 221-226.
- WANG FR, DONG JH, 2010. The response of root hair on Brassinosteroids in *Arabidopsis* and rice [J]. *J Agric Univ Hebei*, 33: 105-109. [王凤茹, 董金皋, 2010. 油菜素内酯对拟南芥和水稻根毛发育的影响 [J]. *河北农业大学学报*, 33:105-109.]
- YAMAGISHI Y, YOSHIMOTO J, UCHIYAMA H, et al, 2013. *In vitro* induction of secondary xylem-like tracheary elements in calli of hybrid poplar (*Populus sieboldii* × *P. grandidentata*) [J]. *Planta*, 237:1 179-1 185.
- ZHU JY, SAE-SEAW J, WANG ZY, 2013. Brassinosteroid signaling [J]. *Development*, 140:1 615-1 620.
- ZANG YG, YANG CP, WANG YC, 2002. Anatomical study on morphogenesis *in vitro* culture from *Betula platyphylla* [J]. *Sci Silv Sin*, 38:142-145. [詹亚光, 杨传平, 王玉成, 2002. 白桦组培离体再生的解剖学研究 [J]. *林业科学*, 38:142-145.]