文章编号:1000-7601(2019)03-0031-10 **doi**:10.7606/j.issn.1000-7601.2019.03.04

外源 ABA 对苹果砧木叶片解剖结构及内源激素含量的影响

王顺才[1],李 超[2],师守国[2],马锋旺[2]

(1.天水师范学院 生物工程与技术学院,甘肃 天水 741000;2.西北农林科技大学园艺学院,陕西 杨凌 712100)

摘 要:通过光镜和透射电镜分别观察外源脱落酸(ABA)处理下楸子(*Malus prunifolia*)、平邑甜茶(*M. hupehensis*)和新疆野苹果(*M. sieversii*)叶片解剖结构及叶绿体超微结构的变化,利用扫描电镜和酶联免疫法分别研究 ABA 处理对叶片气孔特征及其内源激素含量的影响。结果表明:与对照相比,ABA 处理下楸子、平邑甜茶和新疆野苹果的叶厚分别减少了 7.93%、0.25%和 0.81%,栅栏组织厚度分别减少了 31.43%、8.53%和 4.99%($P<0.05$),海绵组织厚度分别增加了 10.34%、6.14%和 5.63%($P<0.05$),叶肉组织结构疏松度(SR)分别增加了 19.59%、6.55%和 6.50%。ABA 处理下楸子和平邑甜茶的栅栏组织/海绵组织厚度比值(P/S)及叶肉组织结构紧密度(CTR)较对照显著减少($P<0.05$),其中,P/S 值分别下降 37.86%和 13.82%,CTR 分别下降 25.46%和 8.29%,而新疆野苹果的 P/S 值和 CTR 下降但不显著。此外,ABA 处理下楸子和平邑甜茶的上表皮细胞厚度较对照分别增加了 5.82%和 6.43%,新疆野苹果的较对照减少了 26.23%($P<0.05$);楸子和新疆野苹果的下表皮细胞厚度较对照增加了 12.09%和 14.21%($P<0.05$),平邑甜茶的较对照减少了 12.56%。平邑甜茶和新疆野苹果叶片上下角质层厚度较对照显著增加($P<0.05$),而楸子的变化不显著。在 ABA 诱导下,3 种砧木的气孔密度、气孔大小(长度×宽度)及其开口度和开张比均不同程度地下降,其中,楸子的较对照分别下降了 3.62%、7.12%×19.59%、67.60%和 86.66%,平邑甜茶的分别下降了 3.50%、4.99%×20.65%、32.42%和 58.24%,新疆野苹果的分别下降了 8.54%、0.92%×12.06%、20.37%和 16.35%。ABA 处理下 3 种砧木叶片细胞中叶绿体的数量变少,类囊体结构排列疏松,叶绿体上的淀粉粒趋于变小。外施 ABA 使 3 种砧木叶片内源 ABA 和玉米素核苷(ZR)的含量极显著增加($P<0.01$),其中楸子 ABA 和 ZR 含量比对照分别增加 30.83%和 13.31%,平邑甜茶的分别增加 62.40%和 45.28%,而新疆野苹果的分别增加了 37.07%和 17.06%。楸子和新疆野苹果叶片的吲哚乙酸(IAA)和赤霉素(GA)含量无显著变化,而平邑甜茶叶片的 IAA 及 GA 含量比对照分别增加了 62.62%和 20.62%($P<0.01$)。总之,在 ABA 处理下,3 种苹果砧木的叶片组织解剖结构和气孔特征都发生旱生性结构变化,叶肉细胞中淀粉粒趋于变小,叶片内源 ABA 和 ZR 水平增加显著,而 IAA 和 GA 水平变化因基因型不同而存在差异。

关键词:苹果砧木;外源 ABA;叶片解剖结构;气孔特性;内源激素含量

中图分类号:S661.1;Q945.79 **文献标志码**:A

Effects of exogenous ABA on leaf anatomy and hormone contents of apple rootstocks

WANG Shun-cai[1], LI Chao[2], SHI Shou-guo[2], MA Feng-wang[2]

(1. *College of Bioengineering and Technology*, *Tianshui Normal University*, *Tianshui*, *Gansu* 741000, *China*;
2. *College of Horticulture*, *Northwest A & F University*, *Yangling*, *Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: The changes of leaf anatomical features and chloroplast ultrastructure of three apple grafting rootstocks, viz., *Malus prunifolia*, *M. hupehensis* and *M. sieversii* seedlings which were subjected to exogenous abscisic acid (ABA) for 24 h, were investigated by light microscope (LM) and transmission electron microscopy (TEM). The effects of exogenous ABA on stomatal features and endogenous hormone contents in leaves of three apple grafting rootstocks seedlings were also studied by scanning electron microscopy (SEM) and enzyme-linked immunosor-

收稿日期:2018-09-18 **修回日期**:2019-04-23

基金项目:国家自然科学基金项目(31660565);甘肃省高等学校科研项目(2016B-070);天水市科技局科技支撑计划项目(40101)

作者简介:王顺才(1975-),男,甘肃陇西人,副教授,博士,主要从事果树抗性生理与生物技术研究。E-mail:scwang@ tsnu.edu.cn

通信作者:马锋旺(1964-),男,山东济宁人,教授,博士,主要从事果树逆境生物学研究。E-mail:fwm64@ nwsuaf.edu.cn

bent assay (ELISA). Compared with control plants (without ABA treatment), observation of LM showed that the leaf thickness of *M. prunifolia*, *M. hupehensis* and *M. sieversii* decreased by 7.93%, 0.25% and 0.81%, and their palisade tissue thickness significantly decreased by 31.43%, 8.53% and 4.99% ($P<0.05$), respectively. However, the sponge tissue thickness of these three apple rootstocks significantly increased by 10.34%, 6.14% and 5.63% ($P<0.05$), and their scattered rate (SR) increased by 19.59%, 6.55% and 6.50%, respectively. The palisade tissue/spongy tissue (P/S) of *M. prunifolia* and *M. hupehensis* significantly decreased by 37.86% and 13.82% ($P<0.05$), and their cell tightness rate (CTR) decreased by 25.46% and 8.29% under ABA treatment ($P<0.05$), and then those of *M. sieversii* also reduced but not significantly. The upper epidermis thickness of *M. prunifolia* and *M. hupehensis* increased by 5.82% and 6.43% under ABA treatment, while that of *M. sieversii* significantly decreased by 26.23% ($P<0.05$). The lower epidermis thickness of *M. prunifolia* and *M. sieversii* significantly increased by 12.09% and 14.21% under ABA treatment ($P<0.05$), while that of *M. hupehensis* decreased by 12.56%. The upper and lower cuticle thickness in leaves of *M. hupehensis* and *M. sieversii* significantly increased under ABA treatment ($P<0.05$), while the changes of upper and lower cuticular in leaves of *M. prunifolia* was not obvious. Observation by SEM indicated that the stomatal density, stomatal size, and the stomatal opening degree and rate of three apple rootstocks presented the decline of different degrees under ABA treatment. For example, those of *M. prunifolia* decreased by 3.62%, 7.12%×19.59%, 67.60% and 86.66%, and those of *M. hupehensis* decreased by 3.50%, 4.99%×20.65%, 32.42% and 58.24%, as well as those of *M. sieversii* decreased by 8.54%, 0.92%×12.06%, 20.37% and 16.35%, respectively. For three apple rootstocks, analysis of TEM probably indicated that chloroplast numbers in palisade tissue and spongy tissue cells reduced, thylakoid structure arranged loosely, and there was a slightly hint that starch grains in chloroplast became smaller in a shape after ABA treatment. Under ABA treatment, the contents of ABA and ZR in leaves of three apple rootstocks significantly increased ($P<0.01$). Compared with the control, the contents of ABA and ZR in *M. prunifolia* increased by 30.83% and 13.31%, those of *M. hupehensis* increased by 62.40% and 45.28%, and those of *M. sieversii* increased by 37.07% and 17.06%, respectively. There were no obvious changes in endogenous IAA and GA levels for *M. sieversii* and *M. prunifolia* leaves between control and ABA conditions, but those of *M. hupehensis* significantly increased by 62.62% and 20.62% under ABA treatment ($P<0.01$), respectively. Overall, the three apple rootstocks seedlings response to exogenous ABA treatment commonly have an adaptive change of xeromorphic structure between leaf anatomy and stomata traits, and the size of starch grains in chloroplast has an obvious degradation. The contents of endogenous ABA and ZR in leaves of three apple rootstocks show significant increases under ABA treatment, while the changes of endogenous IAA and GA levels are different due to their different genotypes.

Keywords: apple rootstocks; exogenous ABA treatment; leaf anatomical structure; stomata traits; endogenous hormone contents

脱落酸(abscisic acid,ABA)是植物体内合成的一类植物激素,在种子萌发、幼苗生长、植物发育调控、气孔行为、叶片衰老、非生物胁迫及病虫害响应中起着重要的作用[1-3]。研究表明,植物在应答非生物胁迫时能够快速合成胁迫激素 ABA,激发 ABA 诱导基因的表达,并导致气孔关闭,减少蒸腾失水,最终抑制细胞生长[4]。与其他环境胁迫因子一样,外施 ABA 也能诱导胁迫相关基因的表达,通过积累保护性物质和促使相关的代谢途径发生改变来提高植物的抗逆性[5-6]。在生产中,外施 ABA 可以提高果树的抗逆能力,在生理水平上减少膜的损伤,减少自由基对膜的破坏以及改变植物体内生理代谢[7]。据报道,叶面喷施 ABA 可通过调节活性氧(ROS)水平来提高菊花的抗蚜性[8]。近年来,转录组研究结果证实,在 ABA 处理下,被子植物有数千个相似基因发生上调和下调表达,其中许多 ABA 相关基因在植物水分平衡和水分利用效率(WUE)方面的功能比较保守,涉及到渗透调节物质的累积、光合蛋白的降解以及气孔密度与大小、叶面积及根系的变化等生理生化机制[9]。

苹果(*Malus domestica* Borkh.)是世界寒冷和温带地区栽培面积最广的果树之一[10]。在我国苹果生产中,楸子、平邑甜茶和新疆野苹果是常见的砧木材料[11]。楸子(*M. prunifolia* (Willd.) Borkh.)和

新疆野苹果(*M. sieversii* Ledeb.)具有较强的抗旱及耐盐性,而平邑甜茶(*M. hupehensis* Rehd.)表现出较高的抗病、耐涝及耐低氧胁迫能力[12-14]。在国内学者以往的研究中,外源 ABA 处理对苹果砧木影响的研究多集中在生长发育及生理生化方面[15-16],而对不同苹果砧木叶片解剖结构、角质层厚度、气孔特征、叶绿体超微结构及内源激素含量变化的研究依然缺乏。因此,进行此方面的相关研究,对深入了解苹果砧木的抗性调控机理及其应用具有重要的意义。

1　材料与方法

1.1　试验材料及处理

试验在西北农林科技大学园艺场日光温室内进行。楸子(陕西富平,34°75′N,109°15′E)、平邑甜茶(山东平邑,35°07′N,117°25′E)和新疆野苹果(新疆巩留,43°15′N,82°51′E)种子均从原产地采调,经 4℃层积处理后播种在营养钵中育苗发芽,幼苗长至 10 cm 时,选生长整齐一致的幼苗进行盆栽,移栽于塑料盆(30 cm×26.5 cm×22 cm)中,每盆 1 株,培养基质由田园土、细砂和腐熟羊粪按 5∶1∶1(体积比)配制,常规管理 1 年。

第二年 7 月下旬,每个树种选取长势一致、株高约 1 m 的盆栽苗 20 株,设置 2 组处理:一组喷施去离子水(对照),另一组喷施 ABA,每个处理各 10 株。根据预试验的结果,叶面喷施 ABA 浓度为 100 μmol・L^{-1}[17]。早上 9∶00 进行叶面喷施处理,以叶片正反面全部湿润为准,24 h 后采样。每组随机选取 3 株,分别取其新梢顶端完全展开的第 4~5 片幼叶,在叶片主叶脉两侧用刀片切取大小为 2 mm × 2 mm 的组织块,快速投入用 0.1 mol・L^{-1}磷酸缓冲液(PBS,pH6.8)配制的 1%戊二醛中,抽气使组织块下沉后,带回实验室进行扫描电镜和透射电镜样品的制备。同时,随机选取长势一致的对照组和 ABA 处理组植株各 3~4 株,每组选取新梢顶端完全展开的第 4~6 片幼叶,重复 3 次,用铝箔纸封包后迅速投入液氮,采样带回实验室后置于-70℃保存备用。

1.2　测试指标

1.2.1　扫描电镜和透射电镜样品的制备与观察

扫描电镜和透射电镜样品的制备参照前期研究中干旱处理样品的制备方法[18]。扫描电镜样品表面喷金后用 JSM-6360LV 型扫描电镜(JEOL Ltd.,Tokyo,Japan)进行观测照相,每个处理观察 20 个视野,用 ImageJ 软件(http://rsbweb.nih.gov/ij/)对气孔密度、气孔大小(长度×宽度)及其开张度(用气孔开口横径表示)进行测量和计算。

透射电镜样品包埋块用 LeicaultracutUCT 超薄切片机(Leica Microsystems GmbH,Wetzlar,Germany)切出约 70 nm 厚的超薄切片,经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色后,用 JEM-1230 型透射电镜(JEOL Ltd.,Tokyo,Japan)观测叶片上下角质层及叶绿体超微结构。超薄切片每个处理观察 20 个视野并照相,并用 ImageJ 软件对角质层厚度进行测量。

1.2.2　光镜样品的制备与观察

制备光镜样品时,选透射电镜样品组织块,切出厚度约为 1 100 nm 的半薄横切片,用 1%甲苯胺蓝染色 20 s,蒸馏水冲洗后置于 60℃烘干。半薄切片每处理选择 3 个典型叶片在光学显微镜 CX31-12C02(Olympus Co.,Ltd.)下观察叶片厚度、栅栏组织厚度、海绵组织厚度及其上下表皮细胞厚度并拍照,用 ImageJ 软件进行测量,并按下式计算:叶片组织结构紧密度 *CTR*(%)= 栅栏组织厚度/叶片总厚度×100%;叶片组织结构疏松度 *SR*(%)= 海绵组织厚度/叶片总厚度×100%。

1.2.3　内源激素含量的测定

利用酶联免疫吸附法(ELISA)测定叶片内源激素脱落酸(ABA)、吲哚乙酸(IAA)、玉米素核苷(ZR)和赤霉素(GA)的含量[19]。试剂盒由中国农业大学农学与生物技术学院提供,激素测定在中国农业大学完成,激素单位均为 ng・g^{-1}。

1.3　数据处理与统计分析

试验数据采用 IBM SPSS 23.0 软件进行成对样品 T-检测(Paired Test),图形绘制用 Sigma Plot 10.0 软件进行。

2　结果与分析

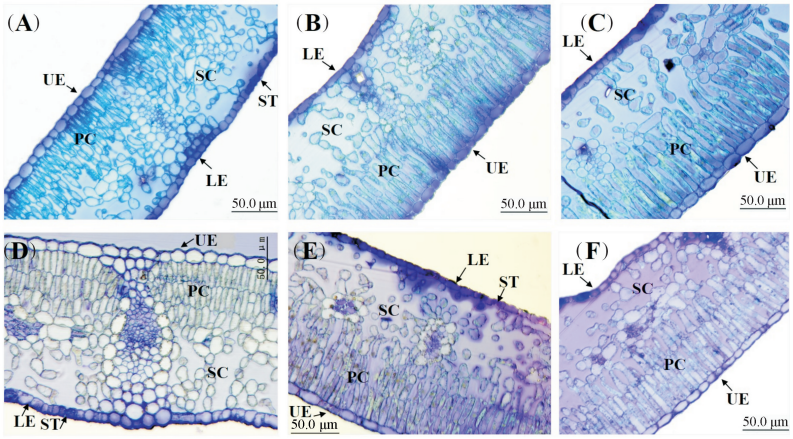
2.1　ABA 处理对苹果砧木叶片解剖结构及叶绿体超微结构的影响

由图 1 可见,光镜观察发现,3 种苹果砧木的叶片均为异面叶,表皮由单层细胞构成,上下表皮厚度不等,栅栏组织都有 2 层柱状细胞,与上表皮细胞呈垂直排列分布,外层柱状细胞长度比较一致且排列整齐,而内层柱状细胞长短不一且排列较疏松。其中,楸子和平邑甜茶的内外层栅栏细胞长度相差较小,而新疆野苹果外层栅栏细胞长度明显大于内层栅栏细胞(图 1(A)~图 1(C))。在 ABA 处理下,3 种苹果砧木叶片组织发生明显的失绿变化,叶肉细胞内液泡收缩,栅栏组织外层细胞中叶绿体数量明显减小,而海绵组织细胞内叶绿体数目的减少不十分明显(图 1(D)~图 1(F))。

由表 1 可知,ABA 处理下,楸子、平邑甜茶和新

疆野苹果的叶厚较对照(CK)分别减少了 7.93%、0.25%和 0.81%,栅栏组织厚度分别减少了 31.43%、8.53%和 4.99%($P<0.05$),海绵组织厚度分别增加了 10.34%、6.14%和 5.63%($P<0.05$)。与对照相比,外施 ABA 使楸子叶片上下表皮细胞厚度均增加,而下表皮细胞增厚达到显著水平($P<0.05$);平邑甜茶的上表皮细胞厚度增加,下表皮厚度减小,但变化都不显著;新疆野苹果的上表皮细胞厚度显著减小而下表皮厚度显著增加($P<0.05$)。此外,ABA 处理使 3 种苹果砧木的栅栏组织/海绵组织(P/S)比值、CTR 值都下降,使其 SR 值均增加。

由图 2 可见,正常条件下,3 种苹果砧木叶肉细胞内每个叶绿体有 1~2 个淀粉粒(图 2(A)~图 2(C))。在 ABA 处理下,3 种砧木叶肉细胞内叶绿体的体积趋于变小,类囊体垛叠凝聚,出现松散现象,叶绿体上淀粉颗粒大小趋于减少。其中,楸子叶绿体上的淀粉粒变化较明显(图 2(D)),而平邑甜茶和新疆野苹果的变化较小(图 2(E)、2(F))。



注:(A)~(C)分别为楸子、平邑甜茶与新疆野苹果的对照,(D)~(F)分别为上述 3 种材料的 ABA 处理。UE-上表皮细胞;LE-下表皮细胞;PC-栅栏组织细胞;SC-海绵组织细胞;ST-气孔。标尺:50.0 μm。

Note: (A)~(C) represent the leaf cross sections of *M. prunifolia*, *M. hupenensis* and *M. sieversii* under control condition, and (D)~(F) represent those of three apple rootstocks under ABA treatment, respectively. UE, upper epidermis; LE, lower epidermis; PC, palisade tissue cells; SC, spongy tissue cells; ST, stomata. Bar, 50.0 μm.

图 1 ABA 处理对 3 种苹果砧木幼苗叶片解剖结构的影响

Fig.1 Effect of ABA treatment on leaf anatomical structure of three apple rootstock seedlings

表 1 ABA 处理下 3 种苹果砧木幼苗叶片组织解剖结构的变化

Table 1 Changes of leaf anatomical structure of three apple rootstock seedlings under ABA treatment

苹果砧木 Apple rootstock	处理 Treatment	叶片厚度/μm Thickness of leaf	栅栏组织厚度 Thickness of palisade tissue/μm	海绵组织厚度 Thickness of spongy tissue/μm	上表皮细胞厚度 Upper epidermis thickness/μm	下表皮细胞厚度 Lower epidermis thickness/μm	栅栏/海绵组织厚度 Palisade/spongy tissue (P/S)	叶片组织结构紧密度 Cell tightness rate(CTR)/%	叶片组织结构疏松度 Scattered rate(SR)/%
楸子	CK	207.66±7.52	89.81±5.18	92.18±5.52	13.74±1.49	11.91±1.17	0.97	43.2	44.4
M. prunifolia	ABA	191.20±3.91*	61.58±4.30*	101.71±6.53*	14.54±1.72	13.35±1.09*	0.61*	32.2*	53.1*
平邑甜茶	CK	263.54±7.44	98.60±4.63	136.86±2.86	15.09±1.07	12.98±0.65	0.72	37.4	51.9
M. hupehensis	ABA	262.89±7.81	90.19±1.68*	145.27±3.83*	16.06±2.04	11.35±1.68	0.62*	34.3*	55.3
新疆野苹果	CK	255.10±6.41	110.14±4.55	113.85±8.21	18.30±1.59	12.81±1.81	0.97	43.2	44.6
M. sieversii	ABA	253.04±10.31	104.64±5.97*	120.26±6.97*	13.50±1.40*	14.63±1.67*	0.87	41.4	47.5

注:表中数据为平均数±标准差,* 表示 $P<0.05$ 显著水平。下同。

Note: Data represents the means ± SD. * mean significantly different at $P<0.05$. The same below.

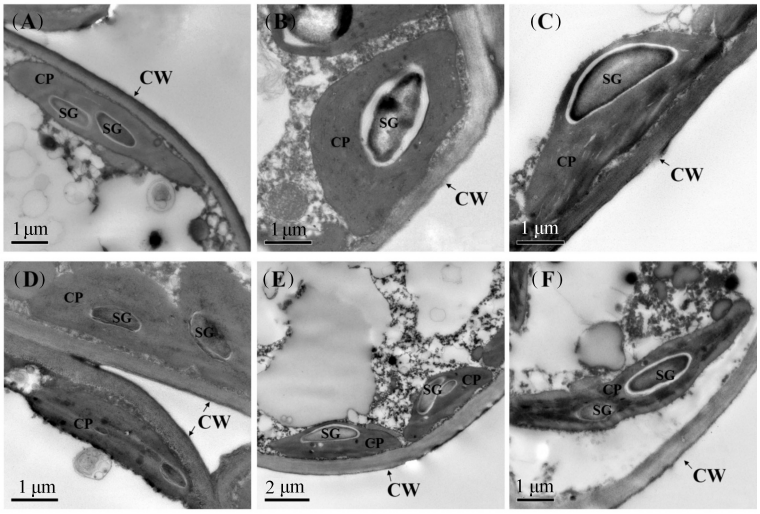
2.2　ABA 处理对苹果砧木叶片角质层厚度的影响

透射电镜观察结果表明,在正常条件下,3 种苹果砧木叶片的上表皮角质层较厚,而它们的下表皮角质层较薄(图 3、图 4)。其中,上表皮角质层厚度大小依次为平邑甜茶>新疆野苹果>楸子,而下表皮角质层厚度大小为楸子>新疆野苹果>平邑甜茶。

与对照相比,在 ABA 诱导下,楸子叶片的上下表皮角质层厚度无显著变化,而平邑甜茶和新疆野苹果的上下表皮角质层厚度显著增加($P<0.05$),其上表皮角质层较对照分别增加了 40.26%和 23.09%(图 4(A)),其下表皮角质层厚度分别增加了 16.56%和 5.24%(图 4(B))。

2.3　ABA 处理对苹果砧木叶片气孔特征的影响

扫描电镜观察发现,正常条件下,3 种苹果砧木的叶片仅下表皮有气孔分布,两个肾形的保卫细胞构成的气孔器大小不一,且明显凸出表皮,处于最大开放状态(图 5(A)~图 5(C))。在 ABA 处理下,楸子和平邑甜茶叶片的部分气孔几乎完全关闭(图 5(D)、5(E)),而新疆野苹果的大部分气孔仍处于半闭合状态(图 5(F))。

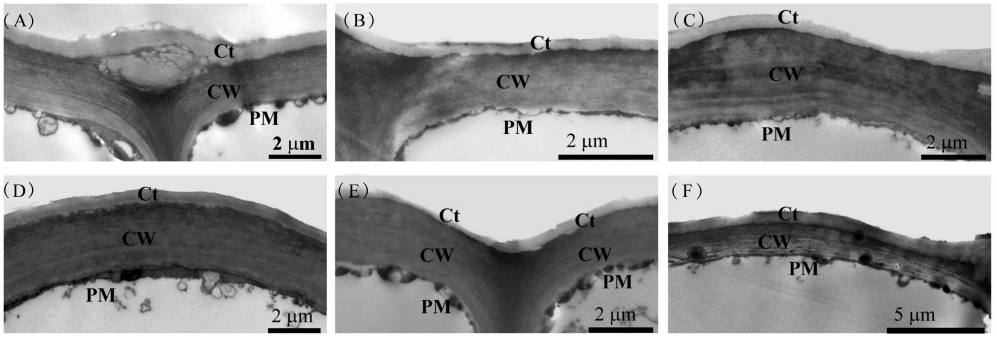


注:(A)~(C)分别为楸子、平邑甜茶与新疆野苹果的对照;(D)~(F)分别为上述 3 种材料的 ABA 处理。CP-叶绿体,SG-淀粉粒,CW-细胞壁。标尺(A)~(D)、(F):1μm,(E):2μm。

Note: (A)~(C) represent the chloroplast ultrastructure of *M. prunifolia*, *M. hupenensis* and *M. sieversii* under control condition, and (D)~(F) represent those of three apple rootstocks under ABA treatment, respectively. CP, chloroplasts; SG, starch grain; CW, cell wall. Bar of (A)~(D) and (F), 1 μm; Bar of (E), 2 μm.

图 2　ABA 处理对 3 种苹果砧木幼苗叶绿体超微结构的影响

Fig.2　Effect of ABA treatment on chloroplast ultrastructure of three apple rootstock seedlings

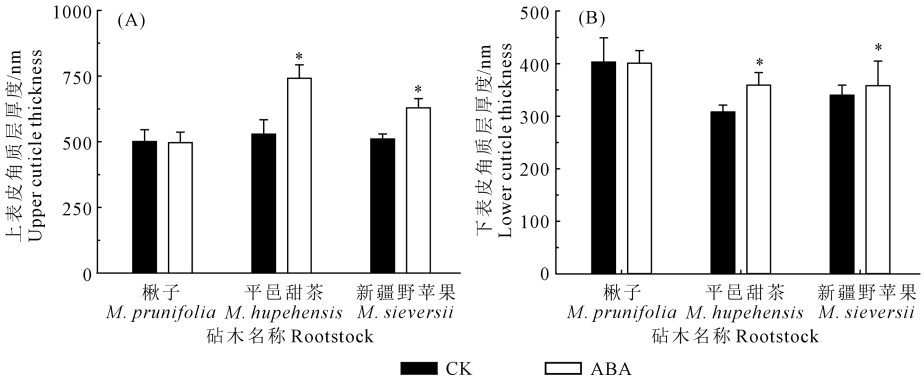


注:(A)~(C)分别为楸子、平邑甜茶与新疆野苹果对照叶片上表皮角质层;(D)~(F)分别为上述 3 种材料 ABA 处理的上表皮角质层。Ct-角质层,CW-细胞壁,PM-质膜。标尺(A)~(E):2 μm;(F):5 μm。

Note: (A)~(C) represent the upper cuticle in leaves of *M. prunifolia*, *M. hupenensis* and *M. sieversii* under control condition, and D~F represent those of three apple rootstocks under ABA treatment, respectively. Ct, cuticle; CW, cell wall; PM, plasma membrane. Bar of (A)~(E), 2 μm; Bar of (F), 5 μm.

图 3　ABA 处理对 3 种苹果砧木幼苗叶片角质层厚度的影响

Fig.3　Effect of ABA treatment on leaf cuticle thickness of three apple rootstock seedlings

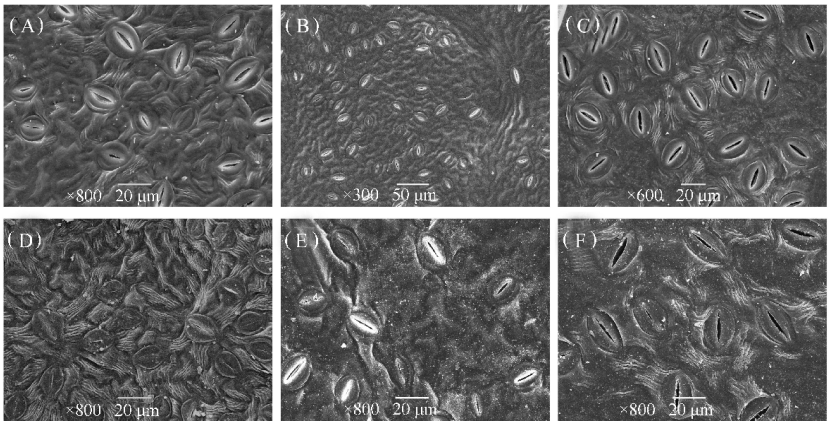


注:图中 * 表示差异显著($P<0.05$),下同。

Note: * means significantly different at $P<0.05$, the same below.

图 4 ABA 处理下 3 种苹果砧木幼苗叶片上下表皮角质层厚度的变化

Fig.4 Changes of the upper and lower cuticle thickness in leaves of three apple rootstock seedlings under ABA treatment



注:(A)~(C)分别为楸子、平邑甜茶与新疆野苹果正常叶片的气孔;(D)~(F)分别为上述 3 种材料 ABA 处理的气孔。标尺(A),(C)~(F):20 μm;(B):50 μm。

Note: (A)~(C) represent the stomata of control seedlings from *M. prunifolia*, *M. hupenensis* and *M. sieversii*, and (D)~(F) represent those under ABA treatment, respectively. Bar of (A), (C)~(F), 20 μm; Bar of (B), 50 μm.

图 5 ABA 处理对 3 种苹果砧木幼苗叶片气孔特性的影响

Fig.5 Effects of ABA treatment on leaf stomata properties of three apple rootstock seedlings

在 ABA 处理下,楸子、平邑甜茶和新疆野苹果的气孔密度较对照分别下降了 3.62%、3.50% 和 8.54%(图 6(A));楸子的气孔大小(长度×宽度)较对照下降了 7.12%×19.59%($P<0.05$),平邑甜茶的气孔大小下降了 4.99%×20.65%,而新疆野苹果的气孔大小变化相对较小,其降幅为 0.92%×12.06%(图 6(B)、6(C))。

与对照相比,ABA 处理使楸子、平邑甜茶和新疆野苹果的气孔开张度分别下降了 67.60%、32.42% 和 20.37%($P<0.05$,图 7(A)),其开张比分别下降了 86.66%、58.24%和 16.35%($P<0.05$,图 7(B))。

2.4 ABA 处理对苹果砧木叶片内源激素含量的影响

从表 2 可见,与对照相比,在 ABA 诱导下,3 种苹果砧木叶片内源 ABA 和玉米素核苷(ZR)含量极显著地增加($P<0.01$),其中楸子的 ABA 和 ZR 含量分别增加了 30.83%和 13.31%,平邑甜茶的分别增加了 62.40%和 45.28%,而新疆野苹果的增加了 37.07%和 17.06%。平邑甜茶叶片内源吲哚乙酸(IAA)和赤霉素(GA)含量极显著增加($P<0.01$),比其对照分别增加 62.62%和 20.62%;而楸子和新疆野苹果叶片 IAA 和 GA 含量无显著变化。3 种苹果砧木的 IAA/ABA、ZR/ABA 和(IAA+GA+ZR)/ABA 比值都显著下降($P<0.05$);而它们的 ZR/GA、ZR/IAA 和 ABA/GA 比值均升高,其中平邑甜茶和新疆野苹果的变化较明显,两者的 ZR/GA 值比其对照分别上升41.56%、18.92%($P<0.05$),ZR/IAA 值分别上升24.00%、19.23%($P<0.05$),ABA/GA 值分别上升 59.92%、38.48%($P<0.01$)。

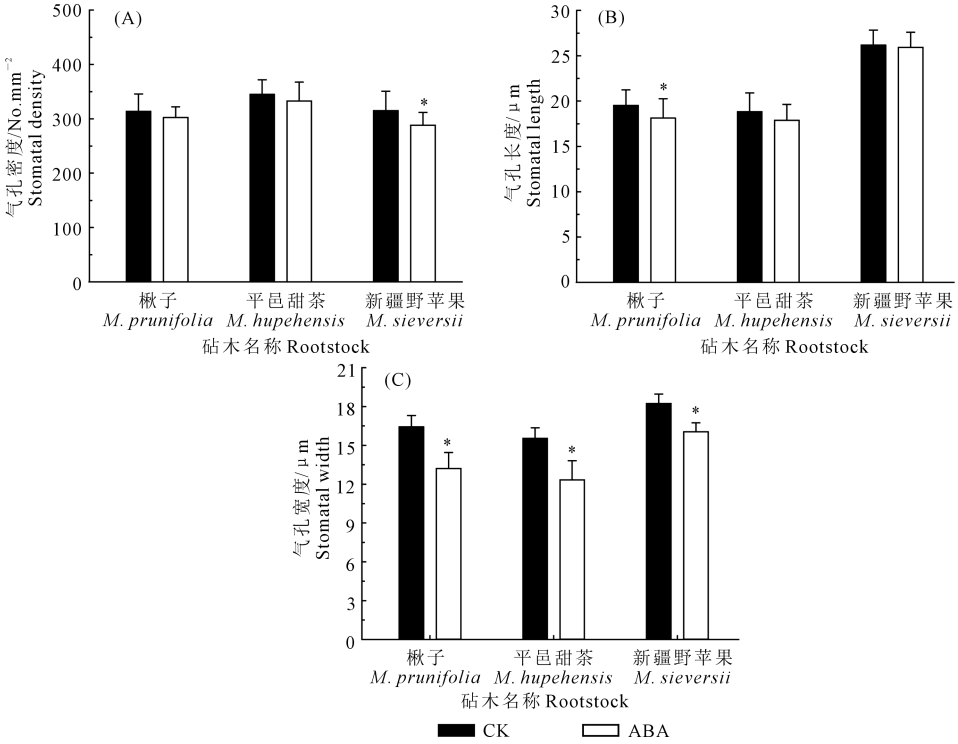


图 6　ABA 处理下 3 种苹果砧木幼苗叶片气孔密度和气孔大小的变化

Fig.6　Changes of stomatal density and stomatal size in leaves of three apple rootstock seedlings under ABA treatment

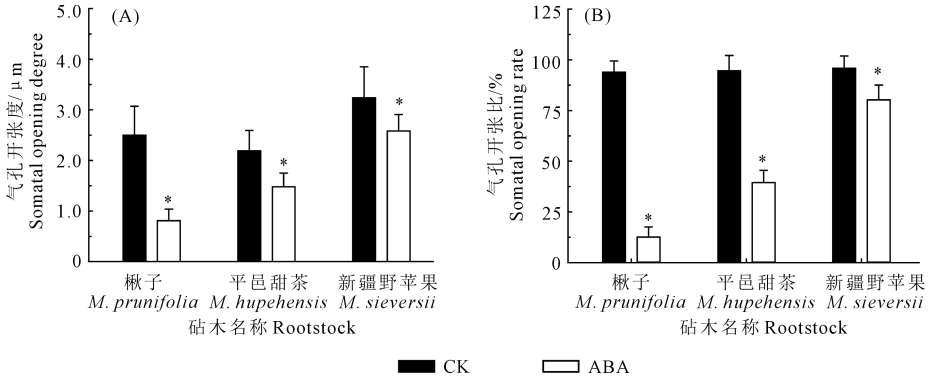


图 7　ABA 处理下 3 种苹果砧木幼苗气孔开张度及开张比的变化

Fig.7　Changes of the opening degree and rate of stomata in leaves of three apple rootstock seedlings under ABA treatment

表 2　ABA 处理下苹果砧木幼苗叶片内源激素含量的变化

Table 2　Changes of endogenous hormone contents in leaves of three apple rootstock seedlings under ABA treatment

苹果砧木 Apple rootstock	处理 Treatment	ABA /(ng·g⁻¹)	ZR /(ng·g⁻¹)	IAA /(ng·g⁻¹)	GA /(ng·g⁻¹)	IAA /ABA	ZR /ABA	ZR /IAA	ZR /GA	ABA /GA	(IAA+GA+ZR) /ABA
楸子 *M. prunifolia*	CK	66.60±0.98	17.00±0.18	63.87±0.64	16.34±0.23	0.96	0.26	0.27	1.04	4.07	1.46
	ABA	96.28±1.91**	19.61±0.17**	64.37±0.41	16.89±0.20	0.67**	0.20*	0.30	1.16	5.70*	1.05**
平邑甜茶 *M. hupehensis*	CK	36.78±0.24	8.70±0.08	45.53±0.22	19.33±0.04	1.24	0.24	0.19	0.45	1.90	2.00
	ABA	97.81±1.42***	15.90±0.23***	62.62±0.67***	20.62±0.06**	0.64**	0.16*	0.25*	0.77*	4.74**	1.01**
新疆野苹果 *M. sieversii*	CK	64.49±0.89	13.66±0.16	64.57±0.97	22.78±0.11	1.00	0.21	0.21	0.60	2.83	1.57
	ABA	102.48±1.30***	16.47±0.11**	62.82±0.31	22.30±0.16	0.61**	0.16*	0.26*	0.74*	4.60**	0.99**

注:*、** 和 *** 分别表示 $P<0.05$、$P<0.01$ 和 $P<0.001$ 显著水平。

Note: *, ** and *** mean significantly different at $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively.

3 讨论

3.1 外源 ABA 对 3 种苹果砧木叶片解剖结构的影响

前人研究表明,苹果砧木叶片的解剖结构特征与其生长势密切相关,矮化砧木叶片的栅栏组织较发达,而乔化砧木叶片的海绵组织较发达,叶片栅栏组织/海绵组织(P/S)比值>1 是评价砧木矮化性的有效指标之一[20]。本试验发现,正常条件下新疆野苹果和楸子的 P/S 比值均为 0.97,而平邑甜茶的 P/S 比值仅为 0.72(表 1)。3 种苹果砧木也符合乔化砧木叶片 P/S 比值<1 这一观点[20]。研究表明,较大的叶片表皮细胞具有贮水作用,有利于增强植物水分的调节能力,这是植物对旱生环境的一种适应[21]。在 ABA 处理下,楸子叶片上下表皮细胞厚度和新疆野苹果叶片下表皮细胞厚度明显增加,而平邑甜茶仅上表皮细胞略有增厚。这表明,ABA 诱导下楸子叶片表现出较强的适应旱生环境的能力。

在 ABA 处理下,3 种苹果砧木的叶厚、栅栏组织厚度均不同程度地减小,而海绵组织厚度均不同程度地增加,表现为 P/S 比值、CTR 值下降,SR 值增加,呈现出一定的规律性。这与我们前期干旱试验的研究结果相一致[18]。这表明外源 ABA 处理使苹果砧木叶片形成了更具抗旱性的解剖结构特征,增强了其适应环境的能力。与对照相比,在 ABA 处理下抗旱砧木楸子栅栏组织柱状细胞明显地变短变粗,细胞间隙减小,排列程度更加紧密,柱状细胞层数增加至 2~3 层(图 1(D)),而非抗旱砧木平邑甜茶和抗旱砧木新疆野苹果的栅栏组织细胞形态及其排列方式的变化不是十分明显(图 1(E)、图 1(F))。与平邑甜茶和新疆野苹果相比,楸子叶片解剖结构对 ABA 处理的反应较敏感。由此说明,不同苹果砧木响应 ABA 的抗性机制因基因型不同而存在差异,而与砧木的抗旱能力没有明显的一致性。

3.2 外源 ABA 对 3 种苹果砧木叶片叶绿体超微结构的影响

本试验发现,3 种苹果砧木对照植株叶片细胞中叶绿体紧贴着细胞内壁分布,这种排列方式有利于扩大细胞内光合反应面积,CO_2易于从大气向叶绿体中扩散并被利用,也利于植株发挥最大光合效率。在 ABA 处理下,3 种砧木叶片细胞内中央液泡明显缩小,细胞质凝缩,叶绿体与细胞内壁发生分离,类囊体垛叠结构排列松散,叶片细胞中的淀粉粒有变小减少的趋势(图 2)。这表明,在 ABA 处理下,不同苹果砧木叶片的光合结构受到一定程度的影响,光合同化产物淀粉的积累量下降,其中以楸子细胞中淀粉粒的变化最为明显。最新研究发现,外施 ABA 能诱导拟南芥叶片中编码淀粉酶基因的表达,导致淀粉酶活性升高,降解叶片中的淀粉,进而提高植物的渗透调节能力。植物叶肉细胞中 ABA 调节淀粉降解积累的糖可作为渗透物质影响保卫细胞的水势进而调节气孔的张开[22]。但董明辉等[23]研究表明,在水稻灌浆期喷施低浓度 ABA,提高了籽粒中 ABA 含量或 ABA/GA 比值,可促进蔗糖转化为淀粉的生化效率,有利于同化物向穗部运输和籽粒充实。我们认为,外源 ABA 处理下,3 种苹果砧木叶片细胞中淀粉的降解或转化可能与细胞小分子物质的渗透调节作用有关,其中楸子具有较强的渗透调节能力。

3.3 外源 ABA 对 3 种苹果砧木叶片角质层厚度的影响

植物叶片表皮角质层由角质和蜡质组成,对其适应外界环境起到了非常重要的作用。角质层具有阻止植物组织内部非气孔性失水和气体交换,提高抗旱性,防止机械损伤及紫外线伤害,抵御病虫害侵袭等功能[24]。最新研究发现,在番茄叶片发育过程中,ABA 调控作用是角质层形成所必需的,外施 ABA 导致番茄角质合成单体 2-羟基棕榈酸和香豆酸发生轻微而持续的增加[25]。本试验发现,在 ABA 诱导下,抗旱砧木楸子上下表皮角质厚度变化不显著,而抗旱砧木新疆野苹果和非抗旱砧木平邑甜茶上下表皮角质层厚度较对照显著增加($P<0.05$),且两者上表皮角质层的增厚程度高于下角质层的增厚程度(图 3 和图 4)。这表明,外源 ABA 诱导苹果砧木角质层厚度的增加量与砧木的抗旱性无关,可能与外施 ABA 的浓度与作用时间有关。

3.4 外源 ABA 对 3 种苹果砧木气孔特征的影响

大量研究表明,ABA 为生长抑制型激素,能诱导气孔关闭[4, 26]。植物体内 ABA 水平的增加可诱导气孔关闭以减少水分损失,通过增加质膜的稳定性,进而增强植物对不良环境的抵抗力[27-28]。气孔对空气湿度的快速反应首先依赖于保卫细胞自主合成的 ABA,当植物长期处于水分亏缺时,在维管组织中的 ABA 可能起着重要的作用[2]。本试验发现,在 ABA 处理下,3 种砧木的气孔密度都有不同程度的降低,气孔开口快速缩小以降低叶片水分蒸腾。这可能是气孔响应 ABA 的适应性反应。张永福等[29]对荔枝叶解剖结构的研究表明,叶片的气孔密度与生长势呈显著正相关,而气孔开度与生长势的关系不大[29]。本试验结果显示,楸子和平邑甜茶

叶片的气孔较小,对 ABA 处理的反应十分敏感,表现为两者的气孔开张数量及开张比都大幅度降低;而新疆野苹果的气孔较大,在 ABA 诱导下气孔反应不如楸子和平邑甜茶的明显。有研究报道,叶片表面的气孔越小,气孔反应的速度越快[30]。本试验结果也证实了这一点。

近年来研究表明,气孔反应与 ABA 诱导表达的基因有关,也与 ABA 受体密切相关;前者通常在几分钟到几小时内会引起气孔反应,而后者调节气孔反应的速度更快,仅需几秒钟到几分钟[31]。这些过程都需要很多复杂的内外因子参与,目前有关 ABA 信号分子参与调控植物气孔发生和气孔运动的分子机理并不完全清楚[32]。

3.5　外源 ABA 对 3 种苹果砧木叶片内源激素含量的影响

激素作为植物体内痕量信号分子,在植物的生长发育、新陈代谢和逆境应答中起着重要的调节作用[26,33]。本试验发现,外施 ABA 使 3 种苹果砧木叶片内源 ABA 和 ZR 的含量极显著增加($P<0.01$),叶片 ABA 与 ZR 含量之间的变化呈正响应。研究证实,植物体内合成的 ABA 来自于玉米素(zeatin, ZT)[34],而 ZT 与玉米素核苷(zeatinriboside, ZR)的合成存在着关联。研究表明,不同植物器官和组织中 ABA 的分布是不均匀的,ABA 水平是由 ABA 的合成、分解及其转运三者间相互协调控制的[2]。高水平的 ABA 是诱发植物体内 ABA 信号转导途径的关键[35]。不同器官 ABA 水平的提高导致植物特定器官或细胞的应答[27]。李源等[21]研究发现,干旱胁迫下 3 种胶质苜蓿的 ZR/ABA 比值均下降,ZR 与 ABA 的拮抗作用是向着气孔关闭的方向进行。本试验结果显示,外源 ABA 处理下 3 种苹果砧木叶片 ZR/ABA 比值及其气孔变化与干旱胁迫下 3 种胶质苜蓿的变化相一致。

植物激素之间相互作用控制着植物的生长发育[36]。IAA 和 GA 具有促进生长的作用,GA 的生理功能以 IAA 为前提,而与 ABA 相拮抗[37]。植物在抵御逆境的过程中,IAA 和 GA 对植物的抗旱和水分利用效率的提高有重要作用[38]。本试验发现,外施 ABA 使平邑甜茶内源 IAA 和 GA 含量极显著上升($P<0.01$),而楸子和新疆野苹果的 IAA 和 GA 含量变化不显著。这可能是因为与平邑甜茶对照植株相比,楸子和新疆野苹果对照植株体内较高水平的 ABA,对 IAA 和 GA 的合成可能有较强的拮抗作用(表 2)。

曹敏格等[20]对苹果砧木的研究表明,叶片 IAA/ABA 和(IAA+GA+ZR)/ABA 比值与树体生长势存在正相关性,两者的比值越小,对树体的矮化程度越大。张晨光等[39]对不同砧木类型'富士'苹果幼树的研究表明,幼树生长势越强,叶片 IAA/ABA 和(IAA+GA+ZR)/ABA 比值越大。本试验发现,在正常条件下,3 种苹果砧木叶片 IAA/ABA 和(IAA+GA+ZR)/ABA 比值均为平邑甜茶>新疆野苹果>楸子;在 ABA 处理下,它们的叶片 IAA/ABA 和(IAA+GA+ZR)/ABA 比值都降低,比值大小为楸子>平邑甜茶>新疆野苹果。我们认为,外源 ABA 可通过改变苹果砧木内源激素含量以及激素之间的相互作用来抑制植株的生长,但不同砧木的矮化程度不同。这些内源激素的变化可能与 ABA 诱导的信号转导途径有关[3]。

4　结　论

在外施 ABA 条件下,3 种苹果砧木叶片的组织解剖结构都不同程度地发生了旱生性变化,叶肉细胞中叶绿体内的淀粉粒趋于变小,气孔数量、大小及其开口度和开张比均发生不同程度的降低以减少叶片水分的散失,进而增强植株适应环境的能力。在 ABA 诱导下,不同苹果砧木叶片角质层厚度的变化具有种间差异性,其中,新疆野苹果和平邑甜茶叶片上下表皮角质层的增厚程度比楸子的明显。与对照相比,在 ABA 处理下 3 种苹果砧木叶片内源激素 ABA 和 ZR 含量极显著增加,平邑甜茶 IAA 和 GA 含量极显著增加,而新疆野苹果和楸子 IAA 和 GA 含量变化不显著;3 种苹果砧木的 ZR/GA、ZR/IAA 和 ABA/GA 比值均增加,而 ZR/ABA、IAA/ABA 和(IAA+GA+ZR)/ABA 的比值均下降,这些内源激素含量及其相互比值的变化具有调节气孔反应、抑制植株生长的生理效应。以上变化与 ABA 的抗性调控机制有着密切的关系,而它们之间相互作用的内在机制仍需进一步研究。

参 考 文 献:

[1] Cutler S R, Rodriguez P L, Finkelstein R R, et al. Abscisic acid: emergence of a core signaling network[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61(1): 651-679.

[2] Merilo E, Jalakas P, Laanemets K, et al. Abscisic acid transport and homeostasis in the context of stomatal regulation[J]. Molecular. Plant, 2015, 8(9): 1321-1333.

[3] Gomez-Cadenas A, Vives V, Zandalinas S I, et al. Abscisic acid: a versatile phytohormone in plant signaling and beyond[J]. Current Protein & Peptide Science, 2015, 16(5): 413-434.

[4] Peleg Z, Blumwald E. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2011, 14(3):

290-295.

[5] Hong J H, Seah S W, Xu J. The root of ABA action in environmental stress response[J]. Plant Cell Reports,2013,32(7):971-983.

[6] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. Annual Review of Plant Biology,2002,53(53):247-273.

[7] Ma X, Ma F, Mi Y, et al. Morphological and physiological responses of two contrasting *Malus* species to exogenous abscisic acid application [J]. Plant Growth Regulation,2008,56(1):77-87.

[8] 张瓒,王萃铂,房伟民,等.ABA 喷施提高菊花抗蚜性及其生理机理[J].植物生理学报,2014,50(12):1857-1862.

[9] Negin B, Moshelion M. The evolution of the role of ABA in the regulation of water-use efficiency: from biochemical mechanisms to stomatal conductance[J]. Plant Science,2016,251:82-89.

[10] Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, et al. The genome of the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.)[J]. Nature Genetics,2010,42(10):833-839.

[11] Ma X, Ma F, Li C, et al. Biomass accumulation, allocation, and water-use efficiency in 10 *Malus* rootstocks under two watering regimes [J]. Agroforestry Systems,2010,80(2):283-294.

[12] Li C, Bai T, Ma F, et al. Hypoxia tolerance and adaptation of anaerobic respiration to hypoxia stress in two *Malus* species[J]. Scientia Horticulturae,2010,124(2):274-279.

[13] Wang S, Liang D, Li C, et al. Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks[J]. Plant Physiology & Biochemistry,2012,51(2):81-89.

[14] Duan K, Yang H, Ran K, et al. Characterization of a novel stress-response member of the MAPK family in *Malus hupehensis* Rehd[J]. Plant Molecular Biology Reporter,2009,27(1):69-78.

[15] 牛自勉,梁德声,房耀仁.苹果砧木脱落酸与树木生长规律的研究[J].北京林业大学学报,1991,13(3):50-55.

[16] 邵开基,牛自勉,张忠仁,等.苹果砧木矮化程度与 ABA 含量关系的研究[J].园艺学报,1987,14(1):7-11.

[17] Wang S, Wang R, Liang D, et al. Molecular characterization and expression analysis of a glycine-rich RNA-binding protein gene from *Malus hupehensis* Rehd[J]. Molecular Biology Reports,2012,39(4):4145-4153.

[18] 王顺才,邹养军,马锋旺.干旱胁迫对 3 种苹果属植物叶片解剖结构、微形态特征及叶绿体超微结构的影响[J].干旱地区农业研究,2014,32(3):15-23.

[19] 刘长海,周莎莎,邹养军,等.干旱胁迫条件下不同抗旱性苹果砧木内源激素含量的变化[J].干旱地区农业研究,2012,35(5):94-98.

[20] 曹敏格,杨海玲,张文,等.苹果砧木矮化性评价指标的研究[J].中国农业大学学报,2008,13(5):11-18.

[21] 李源,王赞,刘贵波,等.干旱胁迫下胶质苜蓿内源激素及解剖结构的研究[J].华北农学报,2010,25(6):211-216.

[22] Thalmann M, Pazmino D, Seung D,et al. Regulation of leaf starch degradation by abscisic acid is important for osmotic stress tolerance in plants[J]. Plant Cell,2016,28(8):1860-1878.

[23] 董明辉,顾俊荣,陈培峰,等.水稻不同粒位籽粒脱落酸含量差异及其与籽粒灌浆的关系[J].植物生理学报,2013,49(8):729-737.

[24] Yeats T H, Rose J K C. The formation and function of plant cuticles [J]. Plant Physiology,2013,163(1):5-20.

[25] Lbb M, Romero P, Fich E A, et al. Cuticle biosynthesis is developmentally regulated by abscisic acid[J]. Plant Physiology,2017,174(3):1384-1398.

[26] Santner A, Estelle M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling[J]. Nature,2009,459(7250):1071-1078.

[27] Boursiac, Yann, Léran, et al. ABA transport and transporters[J]. Trends in Plant Science,2013,18(6):325-333.

[28] Suhita D, Raghavendra A S, Kwak J M, et al. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate - and abscisic acid-induced stomatal closure[J]. Plant Physiology,2004,134(4):1536-1545.

[29] 张永福,卢博彬,潘丽佳,等.荔枝矮化品种的相关机制研究[J].果树学报,2011,28(4):624-629.

[30] Drake P L, Froend R H, Franks P J. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance[J]. Journal of Experimental Botany,2013,64(2):495-505.

[31] Fanourakis D, Bouranis D, Giday H, et al. Improving stomatal functioning at elevated growth air humidity: a review[J]. Journal of Plant Physiology,2016,207:51-60.

[32] Yoshida T, Mogami J, Yamaguchi-Shinozaki K. Omics approaches toward defining the comprehensive abscisic acid signaling network in plants[J]. Plant & Cell Physiology,2015,56(6):1043-1052.

[33] Waadt R, Hsu P K, Schroeder J I. Abscisic acid and other plant hormones: methods to visualize distribution and signaling[J]. Bioessays,2015,37(12):1338.

[34] Nambara E, Marionpoll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism [J]. Annual Review of Plant Biology,2005,56(56):165-185.

[35] Xu Z Y, Kim D H, Hwang I. ABA homeostasis and signaling involving multiple subcellular compartments and multiple receptors[J]. Plant Cell Reports,2013,32(6):807-813.

[36] Vanstraelen M, Benková E. Hormonal interactions in the regulation of plant development[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology,2012,28(28):463-487.

[37] Nemhauser J L, Hong F, Chory J. Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses[J].Cell,2006,126(3):467-475.

[38] 马超,冯雅岚,张均,等.外源茉莉酸甲酯对干旱胁迫下小麦花后内源激素含量及产量形成的影响[J].植物生理学报,2017,53(6):1051-1058.

[39] 张晨光,赵德英,袁继存,等.'富士'苹果幼树叶片内源激素与矿质营养年动态变化分析[J].果树学报,2017,34(3):303-311.