

# 黄瓜“花打顶”茎尖的组织学和细胞学特征

李志英<sup>1,3</sup> 李兴国<sup>2</sup> 徐立<sup>1</sup> 郑成超<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 儋州 571737; <sup>2</sup> 山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018; <sup>3</sup> 山东农业大学园艺学院, 泰安 271018)

**摘要:** 通过解剖学和细胞学的研究发现, 黄瓜“花打顶”茎尖部位的节数、节间长度和茎粗均减小, 顶端幼茎细胞的伸长和伸展受到抑制, 维管束数目增加, 导管壁和厚角组织细胞壁明显增厚, 顶端分生组织分化的原基数量相对减少, 并簇生, 顶端分生组织的体积减小, 细胞液泡化, 核膜、液泡膜及质体膜等部分降解, 细胞呈现衰老趋势; 进一步利用 mRNA 差异显示技术获得了黄瓜生长正常和花打顶的差异表达 cDNA 片段, Northern 分析表明其中精氨酸脱羧酶(ADC)的同源基因和叶绿体 ATPase 亚基 III 的同源基因分别属黄瓜花打顶的正调控和负调控基因。

**关键词:** 黄瓜; 花打顶; 解剖学; 细胞学; mRNA 差异显示

**中图分类号:** S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 03-0315-06

## Studies on the Anatomical and Cytological Characteristics of Blunted with Blossom Cucumber

Li Zhiying<sup>1,3</sup>, Li Xingguo<sup>2</sup>, Xu Li<sup>1</sup>, and Zheng Chengchao<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Tropical Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Hainan Province, Danzhou 571737, China; <sup>2</sup> College of Life Science, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; <sup>3</sup> College of Horticulture, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract:** In order to reveal the characteristics of the “blunt with blossom” cucumbers (BBCs), we investigated the anatomical and cytological characteristics of the young stems and shoot tips of the BBCs by light microscopy (LM), transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) procedures. In BBCs plants, the node number, internode length and the stem diameter in shoot tops all reduced, and the elongation and expansion of the stem cells were inhibited. In contrast, the wall thickness of the collenchyma cell, the number of the vessel bundles, and the number of mature vessels in young stem increased respectively. Meanwhile, the shoot apical meristem cells avacuolated, and the nuclear envelope, tonoplast, plastid envelope and endoplasmic reticulum dissolved partially. In the studies on the role of BBCs, two positive cDNA bands were obtained through mRNA differential display. Northern blot analysis showed that one cDNA fragment homologous to the chloroplast ATPase subunit III was down regulated and the other cDNA fragment homologous to the arginine decarboxylase (ADC) was up regulated in BBCs.

**Key words:** Cucumber; Blunt with blossom; Anatomy; Cytology; mRNA differential display

“花打顶”是黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 生产中普遍存在的一种生理异常现象, 苗期、采收期和生长后期均有发生, 采收期和生长后期更为严重, 使产量和经济效益受到较大影响。前人已做了黄瓜花打顶后的田间表现、发生原因和预防措施的部分研究, 认为在不良的环境条件下, 黄瓜顶端生长停滞, 生长点周围丛生许多大小不一的花蕾, 形成一种“花包头”的现象, 称之为花打顶<sup>[1]</sup>。这些不良的环境条件主要包括低温、高温、干旱、弱光等, 它们均能降低黄瓜植株的各项生理功能, 引起植

收稿日期: 2003-09-08; 修回日期: 2003-11-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (Q30270145); 国家转基因植物研究与产业化专项资助项目 (J99-A-038)

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: cczheng@sdau.edu.cn

株的衰老<sup>[2~5]</sup>, 故有人认为黄瓜花打顶是一种衰老现象<sup>[6]</sup>。由于花打顶后顶端丛生花器官, 故也有人推测花打顶是顶端分生组织只分化花原基造成的, 但至今尚未见有关其解剖及细胞特征研究的报道。本研究的目的是从解剖学和细胞学角度系统观察黄瓜花打顶幼茎和顶端分生组织与生长正常的差异, 进而分析其本质, 并利用 mRNA 差异显示技术研究花打顶的分子机制, 为深入研究其调控机理和寻找可行有效的防治措施提供理论依据。

## 1 材料与方法

试材选用‘新泰密刺’黄瓜, 2001 年 10 月~2002 年 7 月在山东农业大学教学基地、园艺学院蔬菜标本园和温室分别进行, 株距 0.3 m, 行距分别为 0.5 m 和 0.8 m, 按照生产常规管理。待黄瓜部分出现花打顶的性状后, 进行取材和指标测定。

用游标卡尺和直尺测定生长正常和花打顶的茎尖(图版 I, A 和 B) 部位节间的长度、茎粗, 各测定 15~25 株, 重复 3 次, 计算平均值, 进行差异显著性分析。

取正常和花打顶的茎尖各 20 个, 于直视条件下解剖观察茎尖部位的节数(N1)后, 进一步在解剖镜下解剖观察茎尖不能直视部位的节数(N2), 最后将所剩正常和花打顶黄瓜 1~2 mm 茎尖和已测定形态指标的对应节位的茎段, 迅速投入固定液中减压固定, 制石蜡切片<sup>[7]</sup>、半薄切片和超薄切片<sup>[8]</sup>。对石蜡切片的每处理观察 15 个, 统计茎尖纵切片中所含叶原基数目(N3), 计算茎尖部位的总节数(N1 + N2 + N3), 重复 3 次, 计算平均值, 方差分析差异显著性; 半薄切片的每处理观测 15~20 个视野, 重复 3 次, 计算平均值, 并进行差异显著性分析。

分别剥取生长正常和花打顶的茎尖, 立即用 4% 戊二醛固定, 样品粘于载物台上, 并在 HCP-2 型 CO<sub>2</sub> 临界点干燥器中干燥, Polaro E-6100 喷金, JSE-T300 扫描电镜扫描并照相。分别切取正常和花打顶的茎尖, 迅速投入液氮中, 并于 -80℃ 保存。利用 TRIZOL 试剂盒(Promega 公司)提取总 RNA, DNase I 处理 RNA 中残留的 DNA, 进行反转录和 PCR 扩增<sup>[9]</sup>。将得到的 PCR 产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染显带, 回收目的带, 以相应引物二次 PCR 扩增, 克隆并测序后进行 Northern 杂交分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄瓜花打顶茎尖的形态变化

与生长正常的黄瓜植株相比, 花打顶的茎尖部位的节数减少, 节间缩短, 茎变细(表 1), 表明花打顶后顶端分化可能受到影响, 茎细胞的分化、伸长或体积增大等受到了抑制。

表 1 黄瓜花打顶后茎尖形态指标和茎尖解剖结构的变化

Table 1 Morphological and stem anatomical structure changes of the "blunted with blossom" cucumber

植株 Plants	节数 Node No.	节间长 Internode length (cm)	茎粗 Stem diameter (mm)	茎横切面 Transverse section			茎纵切面 Longitudinal section	
				维管束数 Vascular bundles No.	导管数 Vessels No.	韧皮薄壁细胞直径 Phloem cell diameter (μm)	纤维细胞长度 Fiber cell length (μm)	纤维细胞直径 Fiber cell diameter (μm)
正常 Normal	19.0	2.34	0.328	8.7	28.7	0.713	2.49	0.163
花打顶 Blunted with blossom	10.9**	1.55**	0.237*	9.7*	48.8**	0.415**	1.28**	0.129

注: 节数指茎尖部位所含的节的数量, 包括已分化的叶原基数; \*  $P < 0.05$ , 差异显著; \*\*  $P < 0.01$ , 差异极显著。

Note: Node No. means all the nodes of the top, including the leaf premium No.; \*, \*\* Significant at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  respectively.

### 2.2 黄瓜花打顶茎尖的解剖学特征

进一步分析了幼茎的解剖学特征, 发现花打顶后的茎横切和纵切面结构都与正常的有较大差异。花打顶幼茎中维管束的数量显著增加; 维管束中具有次生增厚的导管的数目增加(表 1, 图版 I, C 和 D), 而韧皮薄壁细胞直径减小, 与正常植株比较均达极显著水平(表 1); 同时茎厚角组织细胞的

细胞壁显著增厚(图版 I, E 和 F), 纤维细胞长度减小, 也与正常的差异极显著(表 1, 图版 I, G 和 H)。

为了观察茎尖的整体形态, 进行了扫描电镜观察。与正常的茎尖相比, 花打顶的茎尖周围分化的叶原基和花原基的数量减少, 顶端分生组织的体积相对减小(图版 II, A 和 B), 表明顶端分生组织的分化能力和分生组织细胞的生长发育受到抑制。尽管花打顶的茎尖仍有原基分化, 但细胞的伸长程度降低, 使分化的原基成簇, 不伸展。在染色反应程度方面, 与周围原基比较, 顶端分生组织染色较浅, 表明花打顶后顶端分生组织细胞的活性可能降低(图版 II, C ~ E)。

### 2.3 黄瓜花打顶茎尖的细胞学特征

电镜图片显示, 正常的顶端分生组织细胞内有许多微小的液泡, 花打顶的顶端分生组织细胞高度液泡化, 细胞内容物减少(图版 III, A 和 B)。正常的顶端分生组织细胞内的膜和内质网清晰, 而花打顶后, 质体、核和液泡的膜部分降解, 观察不到清晰的内质网, 细胞核内异染色质的密度降低(图版 III, C 和 D), 表明黄瓜花打顶后顶端分生组织细胞衰老。

### 2.4 黄瓜花打顶后差异基因的表达

利用 mRNA 差异显示技术获得的阳性差异带中, 有两个在 GenBank 中有同源序列, 片段 A 的长度为 344 bp, 其氨基酸序列与 GenBank 中的叶绿体 ATPase 亚基 III 高度同源, 片段 B 的长度为 686 bp, 其氨基酸序列与 GenBank 中的精氨酸脱羧酶(ADC)基因高度同源(图 1)。

片段 A Fragment A	.GQGTAAAGQAVEGIARQPEAEGKIRGTLTLLSLAFMEALTIYGLVVALALLFANPFV
拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	VGQGTAAAGQAVEGIARQPEAEGKIRGTLTLLSLAFMEALTIYGLVVALALLFANPFV
片段 B Fragment B	DQRPTVRGVLSDLTCDSDGKIDKFIGGESSLPHELEGNSLSGGGGGRYYLGMFLGGAY
豌豆 <i>Pisum</i>	DEKPTARGILSDLTCDSDGKIDKFIGGESSLPHEMEGH.....GGCYLGMFLGGSY
片段 B Fragment B	EEALGGVHNLFGGPSVIRVMQSDGPHSFAVTRIVFGPSCGDVLRVMQHEFELMFETLKHR
豌豆 <i>Pisum</i>	EEALGGLHNLFGGPSVVRVLQSDGPHGFAVTRAVAGSSCADVLRVMQHEFELMFETLKHR
片段 B Fragment B	AEEF.GQECDDGGEGI...ANSLAMSFNMPYLASASSCCSETDYNAGVDSGAGDAEQWT
豌豆 <i>Pisum</i>	ALFECGCHDDDSVVNAGVLANSALQSFNMPYLVSTTCCNLNLTNNNGFYCYSGDDFSA
片段 B Fragment B	YCYAZQSLLRFRRPPAIPNZLLHFFSSRSVFVLMGPSPMYFHZFPFSIFCKKKKKKKKK
豌豆 <i>Pisum</i>	DTVSVATSVAGEDENWSY

图 1 片段 A 和 B 的氨基酸序列与拟南芥 ATPase 亚基 III 和豌豆 ADC 的同源比较

Fig. 1 Alignment of amino acid sequence of fragment A and B with those of *Arabidopsis* chloroplast ATPase subunit III and *Pisum sativum* ADC respectively

Northern 杂交分析表明, 黄瓜花打顶后, A 基因的表达减弱甚至不表达, 而 B 基因的表达增加(图 2), 表明 ADC 的同源基因和 ATPase 亚基 III 的同源基因可能分别为黄瓜花打顶的正调控和负调控基因。

## 3 讨论

黄瓜花打顶幼茎的节间长度、直径、茎纤维细胞的长度和韧皮细胞的

直径均显著减小, 但由于节间长度/细胞长度(正常 94, 花打顶 121)和茎粗/细胞直径(正常 20, 花打顶 18)未明显减少, 因此, 花打顶黄瓜顶端幼茎节间细胞分化所受的影响可能不大, 主要是节

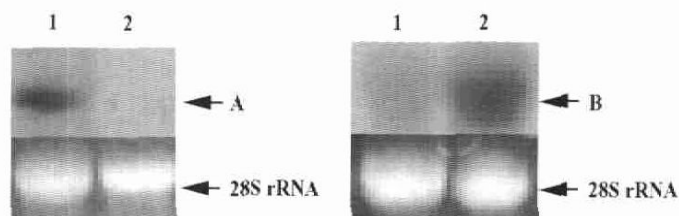


图 2 黄瓜正常生长和花打顶中片段 A 和 B 的 Northern 杂交结果

1. 正常; 2. 花打顶。

Fig. 2 Northern blot analysis of positive fragments A and B in normal and "blunted with blossom" cucumber

1. Normal; 2. Blunted with blossom.

间细胞的伸展和伸长受到了抑制而导致节间缩短,茎变细。另外,花打顶幼茎中的维管束的数量和维管束中具有次生增厚的导管的数目显著增加,茎厚角组织中细胞的细胞壁也显著增厚(图版 I),说明这些组织细胞的发育进程明显加快,即细胞早熟或早衰。细胞壁的增厚,一方面增加了茎的机械强度,使茎变硬,另一方面也降低了细胞壁的延展性,进而限制了茎细胞的伸展和伸长<sup>[10]</sup>。

由于芽顶端分生组织是植株新生细胞和茎、叶、花等各种器官形成的源点<sup>[11]</sup>,花打顶后节数的减少必然与顶端分化能力有关。扫描电镜观察后发现,花打顶植株的顶端分生组织体积减小(图版 II),可能会缩短植株的营养生长期<sup>[12]</sup>。对细胞结构的分析表明花打顶后,顶端分生组织细胞内出现了大的液泡,质体、核和液泡的膜部分降解,观察不到清晰的内质网(图版 III),证实顶端分生组织细胞的分化能力降低,因而花打顶后原基的分化数量相对减少,与周围原基相比,顶端分生组织的染色较浅(图版 II)。同时,近顶端分生组织的茎细胞的分化和伸长也可能受到抑制,而导致花打顶顶端的各种原基簇生。因此,黄瓜花打顶的调控因素一方面抑制了细胞的分化,另一方面阻碍了已分化细胞的生长和发育,从而黄瓜植株失去了顶端生长优势,即黄瓜由无限生长转化为有限生长。但花打顶后植株因何突出花器官的发育是有待深入研究的关键所在。

利用 mRNA 差异显示技术得到了正常和花打顶之间的阳性差异基因片段,其中两个片段分别与叶绿体 ATPase (F-ATPase) 亚基 III 和精氨酸脱羧酶 (ADC) 基因高度同源。Northern 杂交分析表明这两个基因片段分别属黄瓜花打顶中的正、负调控基因,即黄瓜花打顶后, F-ATPase 亚基 III 的同源基因的表达明显减弱,而 ADC 的同源基因的表达增强。但 F-ATPase 亚基 III 和 ADC 的表达是否有相应的变化,从而导致 ATP 的合成与转换<sup>[13]</sup>以及多胺的合成<sup>[14~17]</sup>受到影响而在黄瓜花打顶的形成中起作用,则需要进一步研究。

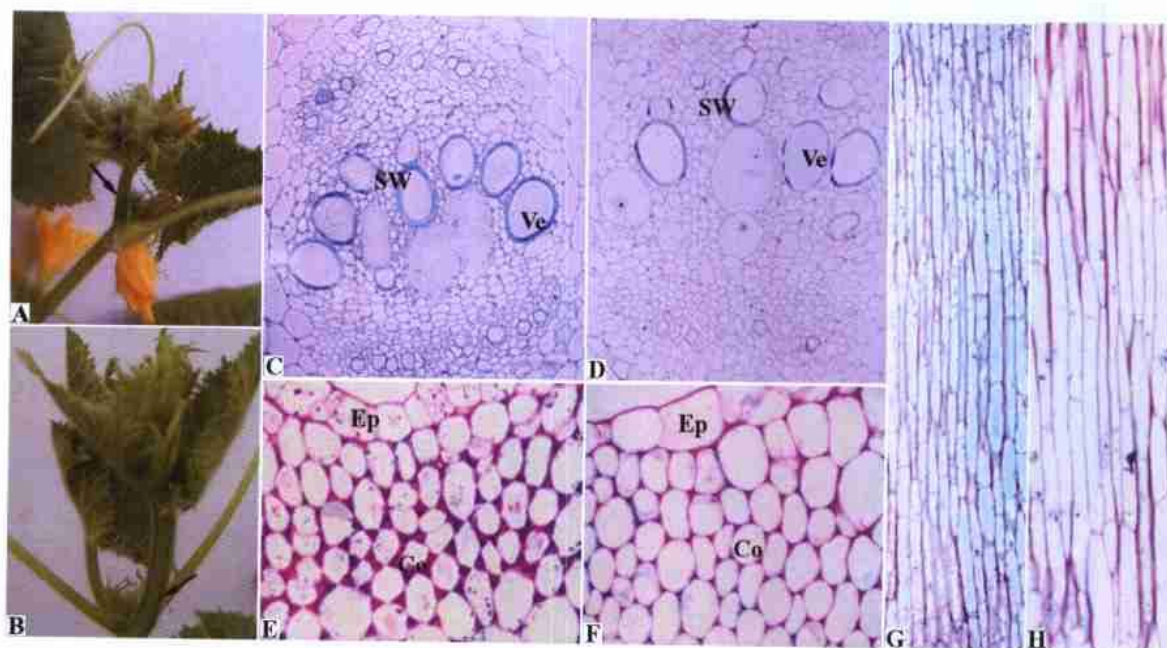
综上所述,黄瓜花打顶主要是由于顶端分生组织的分化能力降低而直接导致的,利用 mRNA 差异显示技术能够获得黄瓜花打顶中的正、负调控基因片段。但是黄瓜花打顶是一种涉及多种诱导因素的复杂的生理异常现象,为从根本上解决生产中存在的这一问题,可能多个基因参与的基因调控网络尚需大量深入细致的研究工作。

## 参考文献:

- 1 孙小镭. 黄瓜冬季栽培花打顶现象分析及防治措施. 山东农业科学, 1997, (1): 35 ~ 36
- 2 李志英, 卢育华, 徐立. 土壤低温对嫁接黄瓜生理生化特性的影响. 园艺学报, 1998, 25 (3): 258 ~ 263
- 3 He Y T, Swain W, Green J D, et al. Networking senescence - regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiol.*, 2001, 126: 707 ~ 716
- 4 Thomas H. Enzymes of nitrogen mobilization in detached leaves of *Lolium temulentum* during senescence. *Planta*, 1978, 142: 161 ~ 169
- 5 Winkler A, von Schaewen A, Leegood R C, et al. Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. Effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiol.*, 1998, 116: 329 ~ 335
- 6 缪旻珉, 李式军. 苗期高温处理对黄瓜衰老和性别分化及激素含量的影响. 植物生理学通讯, 2001, 37 (3): 195 ~ 198
- 7 王心钊. 植物显微技术. 福州: 福建教育出版社, 1986. 156 ~ 171
- 8 孙敬三, 钱迎倩. 植物细胞学研究方法. 北京: 科学出版社, 1987. 1 ~ 32
- 9 徐国恒, 凌雁, 梁德勇, 等. 银染 mRNA 差异显示方法的建立和吗啡诱导基因的克隆. 北京医科大学学报, 1998, 30 (5): 385 ~ 388
- 10 Boris A V, Daniel J C. A model of cell wall expansion based on thermodynamics of polymer networks. *Biophys. J.*, 1998, 75: 2240 ~ 2250
- 11 Marthrew M S E, Kathryn B M. Genetics of angiosperm shoot apical meristem development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1997, 48: 673 ~ 710
- 12 Jun Ichi I, Atsushi H, Hidemi K, et al. A recessive heterochronic mutation, *plastochron1*, shortens the plastochron and elongates the vegetative phase in rice. *Plant Cell*, 1998, 10: 1511 ~ 1522
- 13 Cabezon E, Runswick M J, Leslie A G W, et al. The structure of bovine IF1, the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. *The EMBO Journal*, 2001, 20 (24): 6990 ~ 6996
- 14 Borrell A, Besford R T, Altabella T, et al. Regulation of arginine decarboxylase by spermine in osmotically-stressed oat leaves. *Physiol. Plant*, 1996, 98: 105 ~ 110
- 15 Watson M B, Malmberg R L. Regulation of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyth arginine decarboxylase by potassium deficiency stress. *Plant Physiol.*, 1996, 111: 1077 ~ 1083

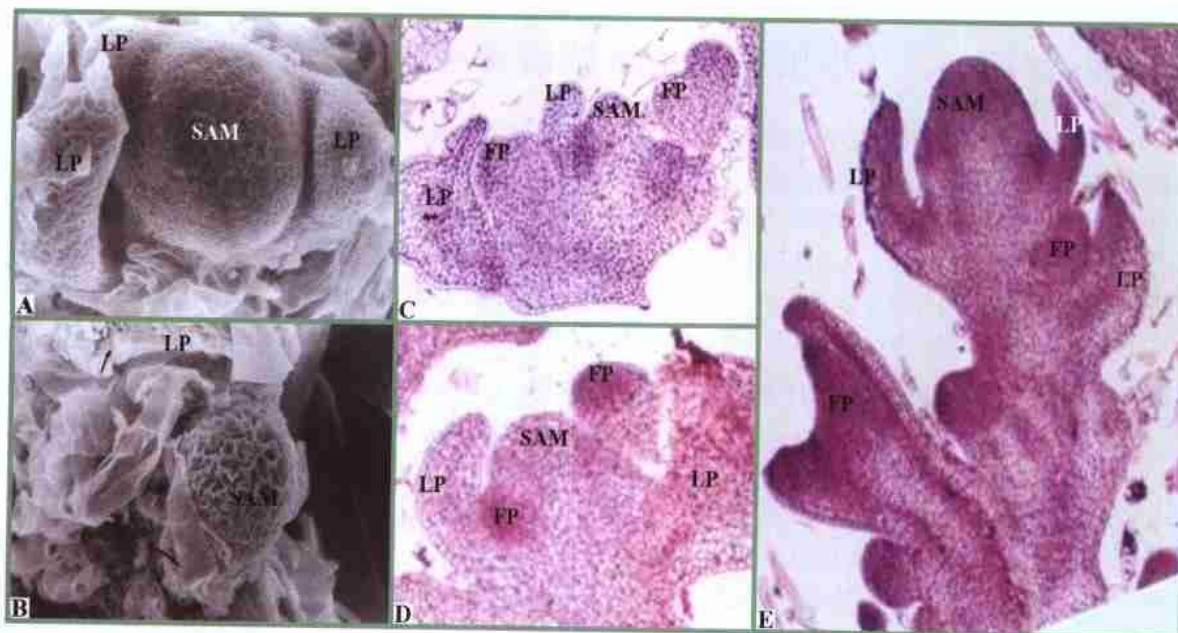


- 16 Chattopadhyay M K, Gupta S, Sengupta D N, et al. Expression of arginine decarboxylase in seedlings of indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars as affected by salinity stress. *Plant Mol. Biol.*, 1997, 34: 477 ~ 483
- 17 Tuomainen J, Pellinen R, Roy S, et al. Ozone affects birch (*Betula pendula* Roth) phenylpropanoid, polyamine and active oxygen detoxifying pathways at biochemical and gene expression level. *J. Plant Physiol.*, 1996, 148: 179 ~ 188



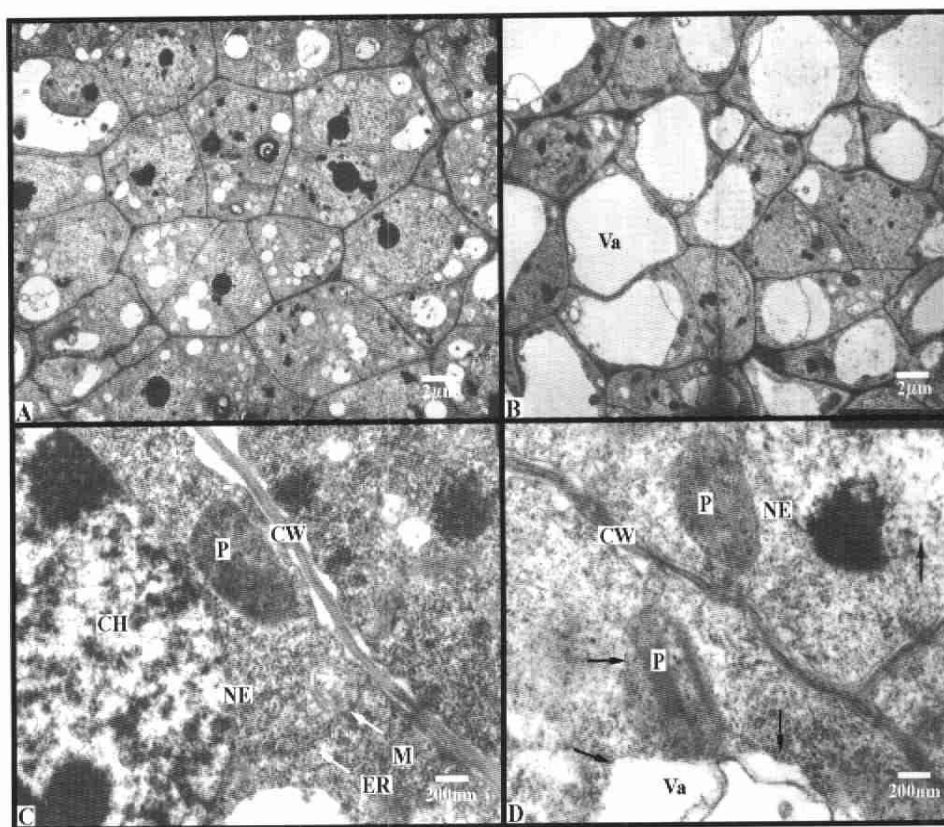
图版 I 说明: A. 花打顶茎尖; B. 正常茎尖; C, E, G. 花打顶幼茎切片 (140 $\times$ ); D, F, H. 正常幼茎切片 (140 $\times$ ); SW: 导管次生增厚; Ve: 导管; Ep: 表皮细胞; Co: 厚角组织。箭头所示为样品部位。

**Explanation of plates I**: A. The shoot tip of "blunted with blossom" cucumber; B. The shoot tip of normal cucumber; C, E, G. Light micrographs of blunted with blossom cucumbers (140 $\times$ ); D, F, H. Light micrographs of normal cucumbers (140 $\times$ ). SW: Secondary cell wall of vessel; Ve: Vessel; Ep: Epidermis; Co: Collenchyma. Arrows mark the stems used to be samples.



图版 II 说明: A. 正常茎尖扫描 (202 $\times$ ); B. 花打顶茎尖扫描 (202 $\times$ ); C, D. 花打顶茎尖纵切片 (87 $\times$ ); E. 正常茎尖纵切片 (87 $\times$ ). LP: 叶原基; FP: 花原基; SAM: 顶端分生组织。

**Explanation of plates II**: A. Shoot tip of normal cucumber (202 $\times$ ); B. Shoot tip of blunted with blossom cucumber (202 $\times$ ); C, D. Logitudinal slice of "blunt with blossom" cucumber shoot tip (87 $\times$ ); E. Logitudinal slice of normal cucumber shoot tip (87 $\times$ ). LP: Leaf premium; FP: Flower premium; SAM: Shoot apical meristem.



图版Ⅲ说明：正常和花打顶黄瓜顶端分生组织的电镜图片。A, C. 正常顶端分生组织细胞；B, D. 花打顶的顶端分生组织细胞。CW：细胞壁；M：线粒体；ER：内质网；P：前质体；NE：核膜；CH：异染色质；Va：液泡。D中箭头所示膜降解部位。

**Explanation of plates Ⅲ:** Transmission electron micrographs of the SAM in normal and "blunt with blossom" cucumber. A and C. SAM cells of normal cucumber; B and D. SAM cells of "blunt with blossom" cucumber. CW: Cell wall; M: Mitochondrion; ER: Endoplasmic reticulum; P: Plastid; CH: Chromatin; NE: Nuclear envelope; Va: Vacuole. Arrows in D mark the dissolved membranes.

### 存书优惠信息

## 《中国主要蔬菜抗病育种进展》

本书是一部集全国蔬菜遗传育种和植物病理专家在开展“蔬菜新品种选育研究”国家重点课题中，总结全国 10 余年的研究成果，编写的中国首部有关主要蔬菜抗病育种理论和技术的著作。内容包括白菜、番茄、黄瓜、辣（甜）椒、甘蓝的病毒、真菌和细菌病害 20 种，涉及毒源、菌源及其株系和生理小种的鉴定方法和鉴定结果，人工接种抗病性鉴定技术，抗病材料的筛选和创新，抗病性及经济性状的遗传，抗病品种选育以及我国抗病育种的研究进展，还附有课题研究期间育成的抗病品种简介及近 50 幅彩图。该书由科学出版社出版，700 多页，100 多万字，16 开精装本，可供蔬菜教学和育种工作者参考。现尚有一部分存书（原价 80 元），为了发挥其作用，特 5 折优惠，现价 40 元（含邮资）。

购书汇款地址：北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所（100081），联系人：范翠蓉，电话：010-62135632

## 《中国蔬菜品种志》

本书由中国农业科学院蔬菜花卉研究所主编，已于 2002 年 9 月出版发行。全书分上、下卷，1~6 章为上卷，包括根菜类、白菜类、芥菜类、甘蓝类、绿叶菜类及葱蒜类，计 2263 个品种，1347 页；7~12 章为下卷，包括瓜类、茄果类、豆类、薯芋类、水生蔬菜类和多年生蔬菜类，计 2550 个品种，1177 页。入志的品种中，地方品种占 90% 以上，少量在全国栽培时间较长、种植面积较大的一代杂种也选入其中。该书的出版发行，是中国蔬菜科技和生产领域具有长远和现实意义的一项基础性工作。该书较全面、系统而又有重点地反映了中国丰富的蔬菜品种资源的概貌、研究成果及育种水平，可供从事蔬菜科研、教学、生产及种子企业、农业行政单位的人员参考。该书出版后受到读者的普遍好评，现尚有少量存书，特以优惠价 490 元（上、下卷，免收邮资）提供给读者（原价 980 元），欢迎购阅。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部，邮编 100081。