

生长素类化合物及6-苯甲基腺嘌呤对拟南芥主根生长的抑制效应比较

李晓峰^{1,2}, 孟广目³, 梁城磊¹, 李丹¹, 张瑞婷¹, 牟长军¹, 陈倪¹, 刘恒^{1,*}

¹兰州大学生命科学学院, 兰州730000; ²中国科学院寒区旱区环境与工程研究所, 兰州730000; ³河南省信阳高级中学, 河南信阳464000

摘要: 为更好的研究生长素类化合物及6-苯甲基腺嘌呤(6-BA)对细胞分裂和细胞伸长的影响, 以拟南芥主根为材料, 从组织学水平比较了IAA、NAA、2,4-D和6-BA对拟南芥主根分生区和伸长区的抑制效应, 发现IAA和NAA效果是相似的, 可以通过促进细胞分裂显著增加根分生区长度, 但也显著缩短主根伸长区长度, 而2,4-D和6-BA则通过抑制细胞分裂来显著缩短根分生区长度, 同时也显著缩短根伸长区的长度。

关键词: 生长素类化合物; 6-苯甲基腺嘌呤; 拟南芥; 根分生区; 根伸长区

Comparison of the Inhibit Effects of Auxins and 6-Benzyladenine on *Arabidopsis* Main Root Growth

LI Xiao-Feng^{1,2}, MENG Guang-Mu³, LIANG Cheng-Lei¹, LI Dan¹, ZHANG Rui-Ting¹, MU Chang-Jun¹, CHEN Ni¹, LIU Heng^{1,*}

¹School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; ²Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; ³Xinyang Senior Middle School of Henan Province, Xinyang, Henan 464000, China

Abstract: To study the effect of auxins and 6-BA on cell division and cell elongation, we compared the inhibit effects of IAA, NAA, 2,4-D and 6-BA on *Arabidopsis* main root development. We found that IAA and NAA has similar effects on root development that can increase the length of root meristem zone through promoting cell division and decrease the length of root elongation zone, but 2,4-D and 6-BA decrease both the length of root meristem zone through inhibiting cell division and root elongation zone.

Key words: auxins; 6-benzyladenine; *Arabidopsis*; root meristem zone; root elongation zone

常见的生长素类化合物包括吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、萘乙酸(1-naphthaleneacetic acid, NAA)和2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D), 其中IAA属于天然生长素, NAA和2,4-D则属于人工合成的生长素类化合物(Michniewicz等2007)。这几种化合物在生长素相关研究中经常被使用, 但一些研究却表明这几种化合物对细胞分裂或细胞伸长的效果是不一样的。

拟南芥主根是研究细胞分裂和细胞伸长的理想材料, 根分生区负责细胞分裂, 伸长区负责细胞伸长(Beemster和Baskin 1998)。在研究生长素调控根发育的过程中, 人们发现在IAA、NAA和2,4-D处理下, 拟南芥(Col-0)主根生长都受到抑制, 但抑制机制却并不相同, IAA和NAA主要通过抑制细胞生长而2,4-D主要通过抑制细胞分裂来抑制根的生长(Beemster和Baskin 2000; Benková和Hejácík 2009; Campanoni和Nick 2005; Dello Ioio等2008; Rahman等2007; Růžička等2009)。CycB1;1是显示

细胞分裂指数的指示基因, 利用CycB1;1::GUS_{DB}标记植株, 人们观察了2,4-D对根分生区细胞分裂的影响, 结果表明2,4-D对细胞分裂的影响不同于IAA和NAA, GUS活性却与6-苯甲基腺嘌呤(N⁶-benzyladenine, 6-BA)相似(Růžička等2009)。6-BA属于人工合成的细胞分裂素, 是细胞分裂素研究中使用较多的细胞分裂素类化合物(Sakakibara 2006)。研究表明细胞分裂素对拟南芥主根的抑制效应主要作用于根分生区, 其抑制作用是通过抑制细胞分裂来完成的(Riou-Khamlich等1999; D'Agostino等2000; Sheen 2002)。

我们以拟南芥(Col-0)为材料, 从组织学水平比较了4种化合物对拟南芥主根分生区和伸长区

收稿 2012-02-22 修定 2012-03-08

资助 国家自然科学基金(30970234)、教育部博士点基金(200807300014)和兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金(lzujbky-2010-60)。

* 通讯作者(E-mail: xfli@lzu.edu.cn; Tel: 0931-8915601)。

的抑制效果,以更好的了解几种生长素类化合物的作用效果并进一步确定2,4-D和6-BA在抑制效果上是否存在相似之处。

材料与方法

1 材料

材料为拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)野生型(Col-0)。

2 主要试剂

IAA、NAA、2,4-D、6-BA和二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)均购于Sigma公司, IAA、NAA、2,4-D和6-BA用DMSO溶解配制成1 mmol·L⁻¹母液储存。

3 实验方法

3.1 材料种植与处理

拟南芥(Col-0)种子经0.1%的HgCl₂消毒,用灭菌水至少清洗5遍,然后点种到1/2MS培养基上。培养皿用封口膜封口后,先放在4℃冰箱中黑暗条件下春化3 d,再转移到温室中垂直培养,温室的条件为温度22℃,光照为长日照(16 h光照),光照强度为40 μmol·m⁻²·s⁻¹。

根据实验需要,培养基中添加相应浓度的激素:检验生长素类化合物抑制拟南芥主根生长时IAA、NAA和2,4-D的工作浓度均为0.0001、0.001、0.01、0.1和1 μmol·L⁻¹。检验对主根各分区的影响时各激素的工作浓度为NAA和6-BA是0.1 μmol·L⁻¹, IAA和2,4-D是0.03 μmol·L⁻¹。

3.2 主根各区测量

将温室里培养到第8天的不同激素处理下的拟南芥幼苗的根尖部分剪下,按照以下步骤固定透明。

根尖部分先于100%乙醇固定30 min,换成75%乙醇固定15 min,接着溶于20%的甲醇(含0.24 mol HCl) 37℃下处理15 min,然后溶于60%乙醇(含7% NaOH)温室处理15 min,接着分别于40%、20%和10%乙醇各处理5 min,再换成5%乙醇处理15 min,然后25%甘油处理15 min,最后于50%甘油保存。

将固定透明好的根尖放到载玻片,盖上盖玻片后于BX51显微镜下观察(Olympus Tokyo, 日本)。观察和拍摄采用Normarski/Hoffman光学系

统。拍摄及图形处理软件来自SPOT (美国Diagnostic Instruments公司)。

3.3 主根长度和生长速率的测量

在幼苗生长到第5天时开始测量生长速率,从第4天开始测量每天的根长,一直测到第8天,然后用当天的根长减去前一天的根长即为当天的生长速率,数据用Excel分析统计。统计的样本数均大于30株,实验重复3次。

3.4 根内皮层细胞数目测量

固定透明好的根在BX51显微镜下观察,统计根分生区内皮层细胞数目,样本数30株左右。

实验结果

1 不同生长素类化合物和6-BA对拟南芥主根生长的抑制效应

为比较不同生长素类化合物对拟南芥主根生长的抑制效应,我们通过外源施加不同种类、不同浓度的生长素处理,比较了各种处理下拟南芥主根的长度。结果表明:IAA、NAA和2,4-D处理下,主根生长都受到抑制,且随着浓度的增加,抑制现象也更加显著。三种激素对根的抑制效应不同:IAA在0.001 μmol·L⁻¹和0.01 μmol·L⁻¹处理下,主根的抑制效应强于同浓度下NAA和2,4-D处理时的效应,而在较高浓度0.1 μmol·L⁻¹处理下,2,4-D的抑制效应强于IAA和NAA(图1)。

为更好的比较不同生长素类化合物和6-BA对主根的抑制效应,首先需要确定不同生长素类化

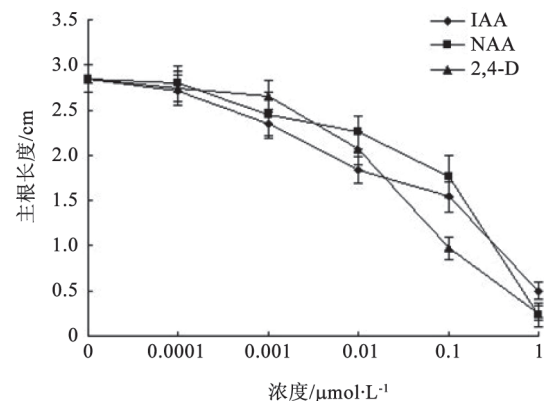


图1 生长素类化合物抑制拟南芥主根生长

Fig.1 Auxins inhibit *Arabidopsis* main root elongation

拟南芥垂直培养于含不同浓度及不同种类的生长素的1/2MS培养基中,统计的是第8天的主根长度。

合物和6-BA达到相同抑制效果的浓度,为此我们以第8天的拟南芥主根长度抑制率接近于未处理的主根长度的50%为标准确定了各种生长素类化合物的使用浓度: NAA和6-BA是 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, IAA和2,4-D是 $0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图2)。

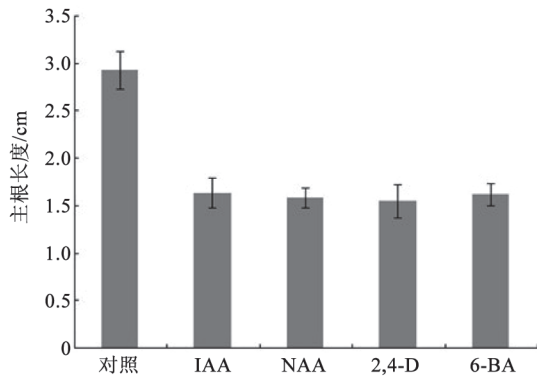


图2 生长素类化合物及6-BA对拟南芥主根生长的抑制效应
Fig.2 Inhibit effects of auxins and 6-BA on *Arabidopsis* main root elongation

NAA和6-BA浓度是 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, IAA和2,4-D浓度是 $0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。统计的是生长于含对应激素中第8天的拟南芥主根长度。对照指在1/2MS培养基中垂直生长了8 d的主根长度。

2 不同生长素类化合物和6-BA对主根各分区的影响

拟南芥主根的纵向结构根据细胞属性,从顶部到基部可以分为3个区:分生区,伸长区,成熟区。分生区和伸长区组成生长区。分生区主要进行细胞分裂,伸长区主要进行细胞伸长。为比较各种生长素类化合物和6-BA的抑制效应,我们对各种处理(NAA和6-BA是 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, IAA和2,4-D是 $0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)下的主根各个区进行了相关分析统计。

结果显示:相比未处理的对照, IAA和NAA处理组的根分生区长度有明显增加,但IAA和NAA之间无明显差异;而2,4-D和6-BA处理后分生区的长度与对照相比明显变短,与IAA和NAA处理组相比缩短程度更为显著(图3-A)。对伸长区进行比较时发现:相比对照组, IAA、NAA、2,4-D和6-BA处理后伸长区的长度都出现显著的变短,但IAA和NAA处理组之间无明显差异, 2,4-D和6-BA处理组的伸长区变短程度更大,相比于对照组以及IAA和NAA处理组均差异显著(图3-B)。整个生长区的统计结果表明: IAA、NAA、2,4-D和6-BA处理后,相比对照组,生长区的长度都显著缩短, IAA和NAA处理

组之间无明显差异, 2,4-D和6-BA处理组的生长区缩短程度更大,相比IAA和NAA处理组也差异显著(图3-C)。

同时我们也对分生区内皮层细胞的数目进行了观察统计,结果显示:相比未处理的对照组, IAA和NAA处理组分生区细胞的数目明显增加;而2,4-D和6-BA处理组细胞的数目显著减少,并且减少程度比较相似(图3-D)。

讨 论

我们的实验结果表明:施加4种不同的激素时,拟南芥主根的生长都受到抑制,而这种抑制效应对于不同的激素来说可能是通过不同的调节机制起作用的。

IAA和NAA处理时,对主根的生长同时具有两种不同的效果,两种化合物处理下根分生区长度和分生区内皮层细胞数目均增加,表明分生区长度的增加是由细胞数目增加导致的,提示两种化合物可以促进根分生区细胞的分裂。然后分析伸长区长度时,却发现伸长区长度显著变短,提示两种化合物抑制细胞伸长。通过比较分生区增加的长度和伸长区受抑制的程度,会发现对细胞伸长的抑制效应远远强于对分生区细胞分裂的促进作用,所以在IAA和NAA处理时,主根生长还是受到了明显的抑制。

2,4-D对主根生长的效果却是全面抑制根的生长区, 2,4-D处理下分生区和伸长区的长度都减少了。但伸长区的减少,可能是由于分生区细胞分裂能力减弱导致的,分生区的细胞处于不断分裂的状态,分裂形成的子细胞不断地向伸长区过渡。分生区为伸长区提供大量的细胞,一旦分生区向伸长区提供的细胞数目减少,伸长区的长度也会发生改变。新奇的是, 2,4-D对主根生长的抑制效应居然与6-BA是相似的, 6-BA处理下,根分生区和伸长区的长度也都减少了。在2,4-D与6-BA对细胞分裂的影响上,我们通过根尖组织学水平观察得到的结论与Růžička等(2009)通过比较*Cybl1::GUS*的表达得出的结论是一致的。

上述结果也提示生长素对细胞分裂的调控很可能是通过细胞分裂素相似信号通路来完成的。

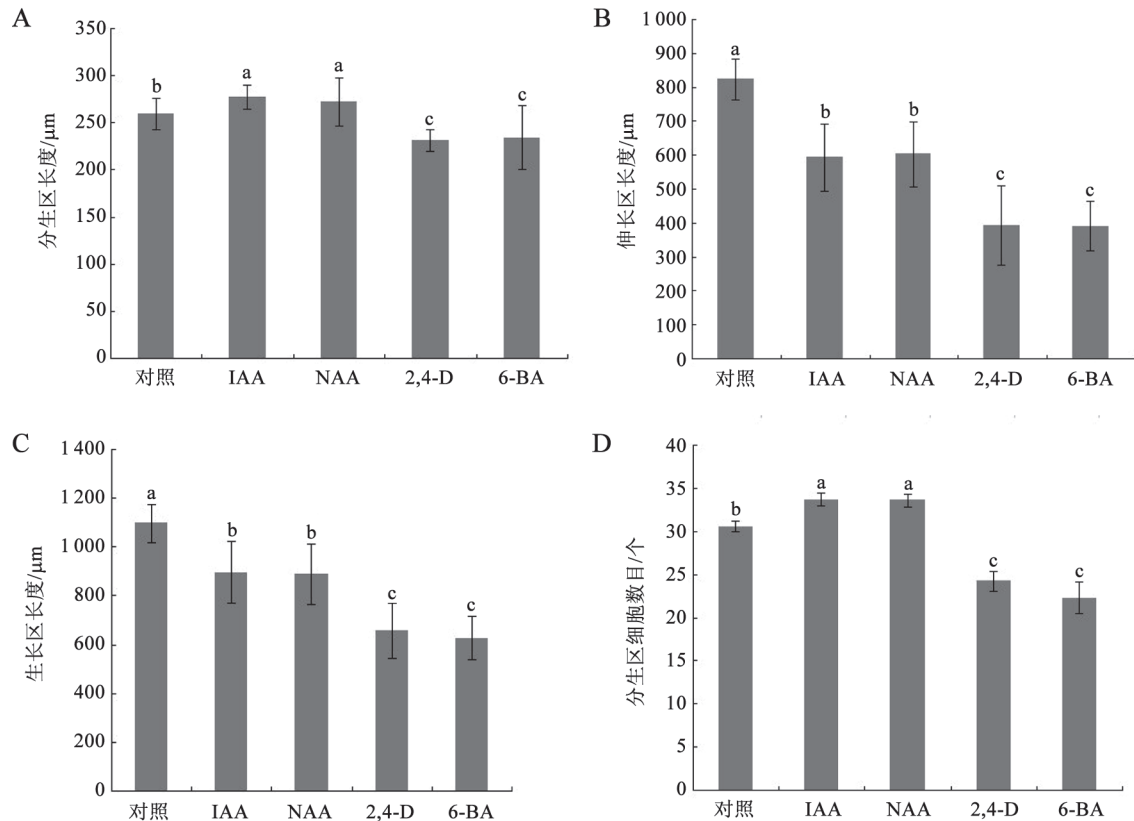


图3 生长素类化合物及6-BA对拟南芥主根的不同抑制效应

Fig.3 Differential inhibit effects of auxins and 6-BA on *Arabidopsis* main root growth

A: 相应浓度下生长素类化合物及6-BA对拟南芥主根分生区长度的影响; B: 相应浓度下生长素类化合物及6-BA对拟南芥主根伸长区长度的影响; C: 相应浓度下生长素类化合物及6-BA对拟南芥主根生长区长度的影响; D: 相应浓度下生长素类化合物及6-BA对拟南芥主根分生区内皮层细胞数目的影响。NAA和6-BA浓度是 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, IAA和2,4-D浓度是 $0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。统计的是生长于含对应激素中的第8天的拟南芥主根。对照指在1/2MS培养基中垂直生长了8 d的主根。不同小写字母表示不同处理之间有显著性差异($P < 0.05$)。

而通过分析2,4-D与IAA和NAA的这种差异原因,会发现一些生长素极性运输载体可能参与细胞分裂的调控过程。研究表明2,4-D与IAA和NAA在进入细胞内的方式是不同的,2,4-D需要生长素运输载体,但IAA和NAA却可以自由扩散的方式进入细胞内,我们利用RT-PCR检测了相关处理下一些生长素运输载体的表达情况,发现一些生长素运输载体的表达情况也是与以上结果相似的,IAA和NAA处理下被显著上调,但2,4-D与6-BA处理下都被显著下调(未发表数据)。因此通过本实验为将来进一步研究生长素如何调控细胞分裂提供了一种新的研究切入点。

参考文献

Beemster GTS, Baskin TI (1998). Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth

in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 116: 1515~1526

Beemster GTS, Baskin TI (2000). *STUNTED PLANT 1* mediates effects of cytokinin, but not of auxin, on cell division and expansion in the root of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 124: 1718~1727

Benková E, Hejácíko J (2009). Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Mol Biol*, 69: 383~396

Campanoni P, Nick P (2005). Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiol*, 137: 939~948

D'Agostino IB, Deruère J, Kieber JJ (2000). Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol*, 124: 1706~1717

Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Costantino P, Sabatini S (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 322: 1380~1384

- Michniewicz M, Zago MK, Abas L, Weijers D, Schweighofer A, Meskiene I, Heisler MG, Ohno C, Zhang J, Huang F et al (2007). Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell*, 130: 1044~1056
- Rahman A, Bannigan A, Sulaman W, Pechter P, Blancaflor EB, Baskin TI (2007). Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root. *Plant J*, 50: 514~528
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacqumard A, Murray JAH (1999). Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science*, 283: 1541~1544
- Růžička K, Šimášková M, Duclercq J, Petrášek J, Zažímalová E, Simon S, Friml J, Montagu MCEV, Benková E (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 4284~4289
- Sakakibara H (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 431~449
- Sheen J (2002). Phosphorelay and transcription control in cytokinin signal transduction. *Science*, 296: 1650~1652