

## 外源信号物质对肉苁蓉种子萌发与吸器形成内源激素水平变化的影响

陈虞超, 李苗, 石磊, 甘晓燕, 王敬东, 宋玉霞\*

宁夏农业生物技术重点实验室, 银川750002

**摘要:** 利用外源信号物质氟草敏(norflurazon)和2,6-二甲氧基对苯醌(2,6-DMBQ)分别诱导肉苁蓉种子萌发与吸器形成, 研究它们在此过程中对内源激素脱落酸(ABA)、赤霉素(GA<sub>3</sub>)、吲哚乙酸(IAA)、玉米素核苷(ZR)水平变化的影响。结果表明: 在诱导肉苁蓉种子萌发时, 经norflurazon处理0~168 h后, 种子中ABA水平呈现显著降低的变化趋势, GA<sub>3</sub>、IAA、ZR水平呈现显著升高的变化趋势。在诱导肉苁蓉种子萌发体吸器形成时, 经2,6-DMBQ处理0~72 h后, 肉苁蓉种子萌发体ABA水平变化不显著, GA<sub>3</sub>、IAA、ZR水平均呈现显著升高的变化趋势。表明在肉苁蓉种子萌发与吸器形成中外源信号物质norflurazon和2,6-DMBQ能影响内源激素水平的变化。

**关键词:** 外源信号物质; 肉苁蓉; 种子萌发; 吸器形成; 内源激素

## Effects of Exogenous Signal Substances on Changes in Endogenous Hormone Levels in *Cistanche deserticola* Y. C. Ma Seeds during Germination and Haustorium Formation

CHEN Yu-Chao, LI Miao, SHI Lei, GAN Xiao-Yan, WANG Jing-Dong, SONG Yu-Xia\*

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

**Abstract:** The seed germination and haustorium formation of *Cistanche deserticola* were induced by norflurazon and 2,6-dimethoxy-*p*-benzoquinone (2,6-DMBQ) respectively. The effects of them on changes in endogenous levels of ABA, GA<sub>3</sub>, IAA and ZR during seed germination and haustorium formation were studied. The results showed that ABA level significantly decreased and the levels of GA<sub>3</sub>, IAA and ZR significantly increased during 0–168 h treated with norflurazon. ABA level changed indistinctively, and the levels of GA<sub>3</sub>, IAA and ZR significantly increased in 0–72 h treated with 2,6-DMBQ. The results preliminarily confirmed that the exogenous signal substances, norflurazon and 2,6-DMBQ, effected the endogenous hormone levels of *C. deserticola* during seed germination and haustorium formation.

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

植物内源激素脱落酸(abscisic acid, ABA)、赤霉素(gibberellin, GA, 特别是GA<sub>3</sub>)、吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、玉米素核苷(zeatin riboside, ZR)参与了种子休眠、萌发以及幼苗生长的调控(Kucera等2005; Finch-Savage和Leubner-Metzger 2006; 杨玲等2008)。种子萌发和吸器形成是肉苁蓉完成寄生生活史的关键阶段。有研究表明, 肉苁蓉等寄生植物的种子萌发和吸器形成与其内、外源植物激素水平密切相关。牛东玲等(2006)用GA<sub>3</sub>处理肉苁蓉种子, 使其萌发率达到16.7%。陈庆亮等(2009)利用低温层积处理诱导肉苁蓉种子萌发, 发现种子内源激素GA含量逐渐增加, ABA含量逐渐降低。Tomilov等(2005)研究发

现植物激素对寄生植物种子萌发和吸器形成具有促进作用。

在自然条件下, 肉苁蓉种子萌发率极低, 其种子萌发和吸器形成需在特定外源信号物质作用下才能完成(宋玉霞等2008)。研究发现, 外源信号物质氟草敏(norflurazon)和2,6-二甲氧基对苯醌(2,6-dimethoxy-*p*-benzoquinone, 2,6-DMBQ)可分别诱导肉苁蓉种子萌发与吸器形成(陈虞超等2012)。本实验利用norflurazon和2,6-DMBQ分别

收稿 2012-05-28 修定 2012-07-20

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)。

诱导肉苁蓉种子萌发与吸器形成, 研究此过程中内源激素ABA、GA<sub>3</sub>、IAA、ZR水平的变化情况, 以及norflurazon和2,6-DMBQ对这4种内源激素水平变化的影响, 为深入研究外源信号物质对肉苁蓉寄生生长的影响和作用机制提供依据。

## 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。norflurazon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, 酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒由中国农业大学作物化学控制研究中心提供, 其他试剂均为国产分析纯。ELISA测定法所用仪器为Thermo公司的MULTISKAN MK3检测仪。

### 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 °C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。之后, 再用 $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> norflurazon进行处理。将处理后的种子摆放在铺有玻璃纤维滤纸的无菌培养皿中, 在25 °C和80%湿度的条件下于恒温培养箱中暗培养168 h后, 种子开始萌发。萌发阶段取样时间为norflurazon处理后0、0.5、1、2、4、8、24、48、72、96、120、144、168 h。以蒸馏水处理的肉苁蓉种子作为对照。肉苁蓉种子萌发后, 经 $1 \times 10^{-7}$  mol·L<sup>-1</sup> 2,6-DMBQ处理, 摆放在铺有玻璃纤维滤纸的无菌培养皿中, 在25 °C和80%湿度的条件下于恒温培养箱中暗培养48 h后, 种子类胚根状体开始形成吸器。吸器形成阶段取样时间为2,6-DMBQ处理后0、0.5、1、2、4、8、24、48、72 h。以蒸馏水处理的肉苁蓉种子萌发体作为对照。所取样品在液氮中速冻30 s后, 置于-80 °C冰箱中保存。

#### 2.2 激素测定

激素测定参照盛晋华(2006)的方法, 并按照ELISA试剂盒操作说明进行。取冰箱中保存的种

子材料0.2 g (精确至0.001 g), 置于研钵中, 加入2 mL样品提取液与0.5 g石英砂, 在冰浴中研磨成匀浆, 转入10 mL离心管中, 再用3 mL提取液分3次将研钵冲洗干净, 一并转入试管中, 摇匀后放置在4 °C冰箱中提取4 h, 然后离心10 min (3 220×g), 取上清液。取4 mL上清液转入5 mL离心管中, 过反相C<sub>18</sub>柱, 用氮气吹干, 加样品稀释液定容至10 mL, 用ELISA测定样品中ABA、GA<sub>3</sub>、IAA、ZR的水平。每组实验重复3次。

## 实验结果

### 1 外源信号物质对肉苁蓉种子萌发中内源激素水平变化的影响

由图1-A可见, 处理前肉苁蓉种子(图2-A)的ABA水平为192.5 ng·g<sup>-1</sup> (FW); norflurazon处理后, ABA水平逐渐降低。处理2 h后, 与对照组相比, 处理组ABA水平呈现显著下降的变化趋势。处理168 h后, 种子开始萌发(图2-B), 此时ABA水平降到最低, 为37.1 ng·g<sup>-1</sup> (FW), 与处理前相比显著降低。对照组肉苁蓉种子ABA水平保持在190 ng·g<sup>-1</sup> (FW)左右, 无显著变化。

由图1-B可见, 处理前肉苁蓉种子GA<sub>3</sub>水平为3.82 ng·g<sup>-1</sup> (FW); norflurazon处理后, GA<sub>3</sub>水平逐渐升高。处理2 h后, 与对照组相比, 处理组GA<sub>3</sub>水平呈现显著升高的变化趋势。处理168 h后, GA<sub>3</sub>水平升高至18.1 ng·g<sup>-1</sup> (FW), 与处理前相比显著升高。对照组肉苁蓉种子GA<sub>3</sub>水平保持在3.6 ng·g<sup>-1</sup> (FW)左右, 无显著变化。

由图1-C和D可见, norflurazon处理后, 肉苁蓉种子IAA和ZR水平均呈现出逐渐升高的变化趋势。处理2 h后, 与对照组相比, 处理组IAA和ZR水平均呈现显著升高的变化趋势。处理168 h后, IAA水平由处理前的30.5 ng·g<sup>-1</sup> (FW)升高至172.4 ng·g<sup>-1</sup> (FW), ZR水平由处理前的7.21 ng·g<sup>-1</sup> (FW)升高至18.9 ng·g<sup>-1</sup> (FW), 二者均显著升高。对照组的IAA和ZR水平分别在31~35和7.3~8.0 ng·g<sup>-1</sup> (FW)区间内波动, 无显著变化。

### 2 外源信号物质对肉苁蓉种子吸器形成中内源激素水平变化的影响

由图3-A可见, 2,6-DMBQ处理后, 肉苁蓉种子萌发体(图2-C)的ABA水平在95~104 ng·g<sup>-1</sup> (FW)区

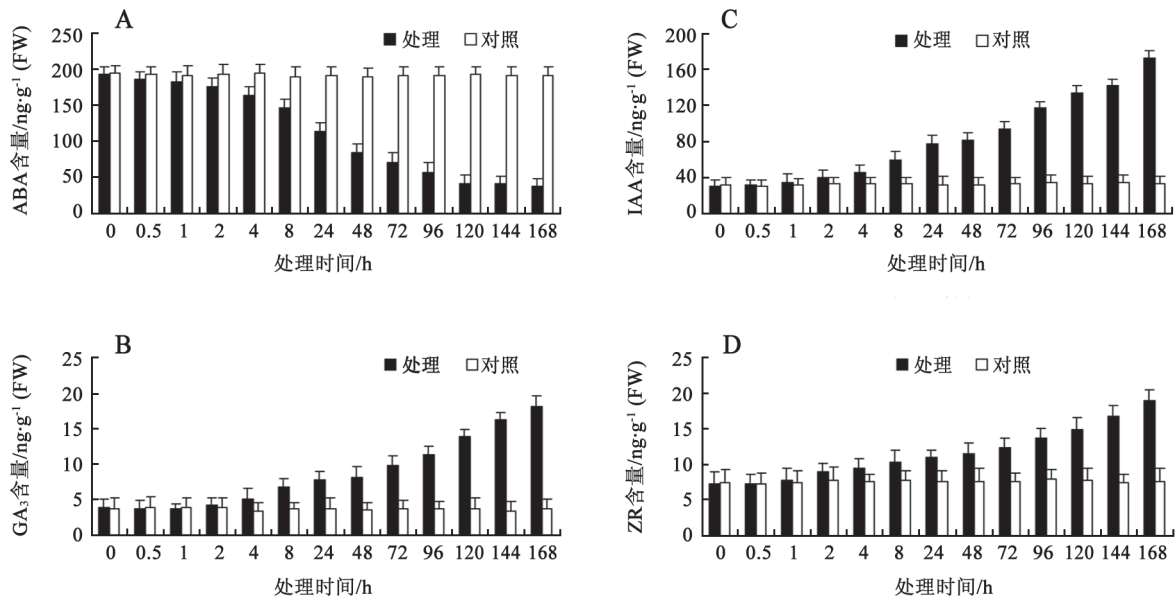


图1 norflurazon处理后肉苁蓉种子内源激素水平的变化

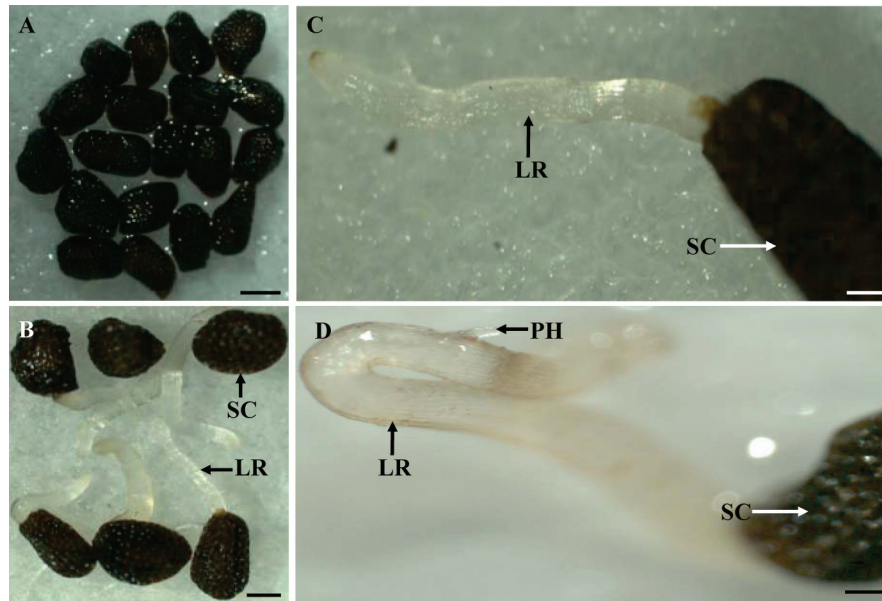
Fig.1 Changes in endogenous hormone levels in *C. deserticola* seeds treated with norflurazon

图2 外源信号物质处理后肉苁蓉种子萌发与吸器形成

Fig.2 The germination and haustorium formation of *C. deserticola* seeds treated with exogenous signal substances

A: 处理后尚未萌发的种子(标尺=100 μm); B: 处理后萌发的种子(标尺=100 μm); C: 处理后吸器尚未形成的萌发体(标尺=50 μm); D: 处理后吸器已形成的萌发体(标尺=30 μm)。LR: 类胚根状体; SC: 种皮; PH: 初生吸器。

间内波动, 变化规律不明显, 与对照组相比无显著差异。

由图3-B可见, 2,6-DMBQ处理后, 肉苁蓉种子萌发体IAA水平呈现逐渐升高的变化趋势。处理前, 萌发体IAA水平为249.8 ng·g<sup>-1</sup> (FW); 处理2 h后,

与对照组相比, 处理组IAA水平呈现显著升高的变化趋势; 处理48 h后, 类胚根状体上的吸器开始形成(图2-D), IAA水平升高至354.1 ng·g<sup>-1</sup> (FW), 与处理前相比显著升高。对照组IAA水平也有所升高, 由248.4 ng·g<sup>-1</sup> (FW)升高到257 ng·g<sup>-1</sup> (FW)。

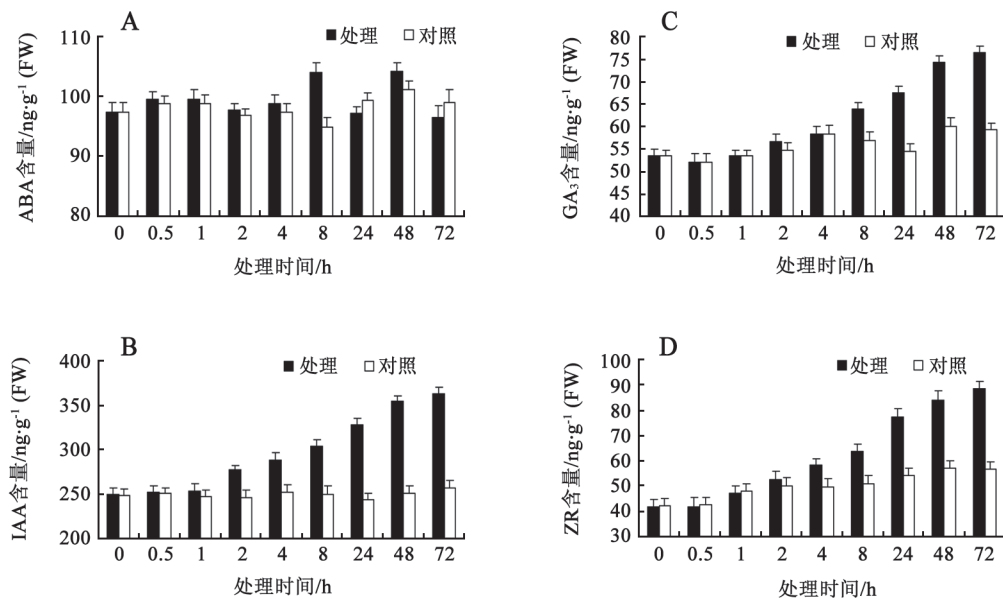


图3 2,6-DMBQ处理后肉苁蓉种子萌发体内源激素水平的变化

Fig.3 Changes in endogenous hormone levels in seed germinant body of *C. deserticola* treated with 2,6-DMBQ

由图3-C可见, 2,6-DMBQ处理后, 肉苁蓉种子萌发体GA<sub>3</sub>水平呈现逐渐升高的变化趋势。处理8 h后, 与对照组相比, 处理组GA<sub>3</sub>水平呈现显著升高的变化趋势; 处理48 h后, GA<sub>3</sub>水平显著升高, 由处理前的53.4 ng·g<sup>-1</sup> (FW)升高至74.1 ng·g<sup>-1</sup> (FW)。对照组GA<sub>3</sub>水平也有所升高, 由53.4 ng·g<sup>-1</sup> (FW)升高至60.1 ng·g<sup>-1</sup> (FW)。

由图3-D可见, 2,6-DMBQ处理后, 肉苁蓉种子萌发体ZR水平呈现逐渐升高的变化趋势。处理4 h后, 与对照组相比, 处理组ZR水平呈现显著升高的变化趋势; 处理48 h后, ZR水平显著升高, 由处理前的41.9 ng·g<sup>-1</sup> (FW)升高至84.1 ng·g<sup>-1</sup> (FW)。对照组ZR水平也有所升高, 由42.3 ng·g<sup>-1</sup> (FW)升高至57.1 ng·g<sup>-1</sup> (FW)。

## 讨 论

ABA是控制种子休眠的主要因素之一, 它可能是通过降低种子胚的吸水能力和渗透势来阻碍胚根的生长, 从而抑制种子萌发的, 外源ABA只具有暂时休眠作用, 只有内源ABA才能使种子持续休眠(Le Page-Degivry和Garello 1992; Le Page-Degivry等1990)。本研究发现, 肉苁蓉种子ABA水平较高, 我们认为高水平的内源ABA可能是导致肉苁蓉种子萌发率不高的主要原因之一。norflura-

zon处理后, 肉苁蓉种子ABA水平逐渐降低, 有可能打破种子休眠促进萌发。norflurazon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ABA的前体, 所以norflurazon能抑制ABA的合成(周峰等2009; Kusumoto等2006)。可见norflurazon有可能通过该作用机制而诱导肉苁蓉种子萌发。

Bewley (1997)认为GA能促进和维持种子萌发, 但不直接参与种子休眠的调控, 而是拮抗ABA, 即反作用于ABA的萌发抑制效应。norflurazon处理后, 肉苁蓉种子GA<sub>3</sub>水平显著升高, 可能正是基于此机制而产生的生理变化。ZR是细胞分裂素的一种, 其主要的生理作用是促进细胞的分裂与生长。ZR常与GA联合作用排除种子对环境条件的要求, 从而促进萌发。IAA尽管可能无促进萌发的作用, 但却是植物合成活性GA的必要条件(Kucera等2005; Gazzarrini和Mccourt 2003)。norflurazon处理后, 肉苁蓉种子IAA和ZR水平变化趋势与GA<sub>3</sub>相似, 这表明GA<sub>3</sub>、IAA和ZR三者协同作用, 抵消ABA的抑制作用, 促进肉苁蓉种子萌发。

在2,6-DMBQ诱导肉苁蓉种子萌发体吸器形成过程中, 萌发体ABA水平趋于稳定, 而GA<sub>3</sub>、IAA和ZR的水平显著升高。ABA虽然对生长具有抑制作用, 但同时也是基因表达与蛋白合成的必

要调控物质, 萌发体生长和吸器形成需要ABA维持在一定的水平。研究发现, 肉苁蓉种子萌发体的吸器由其类胚根状体的表皮细胞向外进行伸长生长而形成(陈虞超等2011)。IAA促进细胞分裂、伸长与分化, ZR促进细胞分裂与生长(蔡传杰和陈善娜2001)。2,6-DMBQ处理后, 高水平的IAA可能促进萌发体表皮细胞伸长和分化, 进而形成吸器。ZR水平显著升高, 可能也是为了促进萌发体吸器的形成。对照组肉苁蓉种子萌发体GA<sub>3</sub>、IAA和ZR的水平也有所升高, 这可能是由于肉苁蓉种子萌发后, 萌发体的类胚根状体自身也存在生长现象。2,6-DMBQ需要在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等活性氧(ROS)物质的参与作用下, 才能诱导根寄生植物吸器的形成, 而ROS又与内源激素一起完成一些生理生化作用(Kwak等2006; Keyes等2000)。虽然2,6-DMBQ诱导吸器形成的分子机制目前尚未完全清楚, 但我们推测内源激素在其中起着重要作用。

#### 参考文献

- 蔡传杰, 陈善娜(2001). 植物激素的研究进展. 云南大学学报(自然科学版), 23: 99~101
- 陈庆亮, 王华磊, 王志芬, 单成钢, 翟志席, 郭玉海(2009). 低温层积与外源GA<sub>3</sub>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
- 陈虞超, 李苗, 陈晓军, 张丽, 宋玉霞(2012). 外源信号物质对肉苁蓉种子萌发与吸器形成的影响. 植物生理学报, 48 (3): 260~264
- 陈虞超, 李苗, 甘晓燕, 石磊, 宋玉霞(2011). 外源信号物质对肉苁蓉种子萌发体的影响研究. 电子显微学报, 30 (2): 153~157
- 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
- 盛晋华, 张雄杰, 刘宏义, 李莉(2006). 肉苁蓉种子后熟阶段内源激素含量变化. 种子, 25 (4): 1~7
- 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
- 杨玲, 沈海龙, 梁立东, 刘春苹(2008). 人工干燥和冷层积过程中的花楸树种子中内源激素含量变化. 植物生理学通讯, 44 (4): 682~688
- 周峰, 陈君, 徐荣, 于晶(2009). 根寄生植物种子萌发刺激物研究进展. 植物生态学报, 33 (3): 607~616
- Bewley JD (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9: 1055~1066
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol*, 171: 501~523
- Gazzarrini S, Mccourt P (2003). Cross-talk in plant hormone signaling: what *Arabidopsis* mutant are telling us. *Ann Bot*, 91: 605~612
- Keyes WJ, OMalley RC, Kim D, Lynn DG (2000). Signaling organogenesis in parasitic angiosperms: xenogonin generation, perception and response. *Plant Growth Regul*, 19: 217~231
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G (2005). Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci Res*, 15: 281~307
- 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
- Kwak JM, Nguyen V, Schroeder JI (2006). The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiol*, 141: 323~329
- Le Page-Degivry MT, Barthe H, Garelo G (1990). Involvement of endogenous abscisic acid in onset and release of *Helianthus annuus* embryo dormancy. *Plant Physiol*, 92: 1164~1168
- Le Page-Degivry MT, Garelo G (1992). *In situ* abscisic acid synthesis. A requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. *Plant Physiol*, 98: 1386~1390
- Tomilov AA, Tomilova NB, Abdallah I, Yoder JI (2005). Localized hormone fluxes and early haustorium development in the hemiparasitic plant *Triphysaria versicolor*. *Plant Physiol*, 138 (3): 1469~1480