

## 激素对水稻分蘖芽生长和分蘖相关基因表达的调控效应

刘杨, 丁艳锋, 王强盛, 李刚华, 王绍华\*

南京农业大学农学院/农业部南方作物生理生态重点开放实验室, 南京210095

**摘要:** 以水稻品种‘南粳44’为材料, 研究了植物激素对水稻分蘖芽生长及*OsTBI*、*OsD3*、*OsD10*和*OsD27*等基因表达的调控。结果表明, 水稻分蘖芽生长的调控至少存在两条途径, 一条通过调控分蘖芽中CTK含量进而调控*OsTBI*等基因表达来实现, 另一条通过调控*OsD3*、*OsD10*和*OsD27*等系列基因表达来实现。外源IAA和GA<sub>3</sub>对水稻分蘖芽生长的调控是通过这两条途径共同实现的。

**关键词:** 水稻; 激素; 基因; 分蘖芽

## Effect of Hormones on the Growth of Rice Tiller Bud and the Expression of the Genes Related to Tiller Growth

LIU Yang, DING Yan-Feng, WANG Qiang-Sheng, LI Gang-Hua, WANG Shao-Hua\*

Agronomy College, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Crop Physiology & Ecology in Southern China, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China

**Abstract:** In the present study, ‘Nanjing 44’ was used to investigate the effects of hormones on rice (*Oryza sativa*) tiller bud growth and the expression of *OsTBI*, *OsD3*, *OsD10* and *OsD27*. The results show that external IAA and GA<sub>3</sub> might have regulated tiller bud growth by at least two means: one is regulating the CTK content and the expression level of *OsTBI* in tiller buds, and another is regulating the expression levels of *OsD3*, *OsD10* and *OsD27* in tiller buds.

**Key words:** rice (*Oryza sativa*); hormone; gene; tiller bud

分蘖是水稻生长发育过程中形成的一种特殊分枝特性, 由分蘖芽发育而成(Li等2003)。植物激素在分蘖芽生长过程中起着关键作用。生长素(IAA)抑制分蘖的发生, 去除或削弱IAA活性可以解除分蘖芽的休眠(Leopold 1949)。与IAA相反, 外源施用细胞分裂素(CTK)可以刺激分蘖芽的生长, 但IAA可以逆转这种效应(Langer等1973)。除此之外, 赤霉素(GA<sub>3</sub>)和脱落酸(ABA)也对水稻分蘖芽的生长有抑制效应(洪晓富等1998; 马兴林和梁振兴1997)。此外, 近年来有研究发现, 一些基因的表达同水稻分蘖芽生长有密切的关系。水稻*OsTBI*基因控制分蘖芽伸长, 其过量表达的转基因水稻植株分蘖数目显著减少(Takeda等2003)。*OsD3*基因是以多蘖型矮秆突变体*Id3*为材料分离出来的与水稻分蘖相关的基因, 其缺失突变体分蘖发生数目显著增多(Ishikawa等2005)。*OsD10*基因是*MAX/RMS1*的同源基因, Arite等(2007)认为其可以抑制分蘖芽生长。Lin等(2009)发现*OsD27*缺失突变体分蘖数目同样增多。前人研究表明, *OsTBI*、

*OsD3*、*OsD10*和*OsD27*的表达和植物激素均调控分蘖芽生长, 但关于二者在调控分蘖芽生长过程中的相互关系, 还缺乏相关研究。本研究利用水稻伸长节间着生的休眠分蘖芽, 在抽穗后去除顶穗刺激其萌发生长, 同时外源施用IAA和GA<sub>3</sub>抑制其萌发, 测定分蘖芽萌发和休眠转换过程中分蘖芽*OsTBI*、*OsNAC2*、*OsD3*和*OsD10*的表达和内源激素的变化, 分析基因表达变化与激素在分蘖芽生长过程中的相互关系, 为更好地探索水稻分蘖芽生长机理提供依据。

### 材料与方法

供试材料为水稻(*Oryza sativa* L.)品种‘南粳44’, 2009年5月22日播种, 6月12日选取生长一致的

收稿 2010-12-01 修定 2011-03-11  
资助 国家自然科学基金(31071364)和江苏省自然科学基金(BK2010449)。

\* 通讯作者(E-mail: wshnau@126.com; Tel: 025-84396475)。

秧苗移栽至装有15 kg过筛土的盆钵中, 每盆5苗。每盆施尿素1.73 g, 过磷酸钙6.27 g, 氯化钾2.05 g。抽穗后开始进行处理: (1) RP处理, 去除顶穗; (2) IAA处理, 去除顶穗同时叶面喷施50 mg·L<sup>-1</sup> IAA; (3) GA处理, 去除顶穗同时叶面喷施50 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>; (4) CK, 保留顶穗。每个处理20盆, 共100苗, 重复3次。

在处理0、3、6、12、24、36和48 h取样, 将倒数第二节上着生的分蘖芽(倒二芽)取下, 测定其长度。每个处理测定40个芽, 重复3次。然后液氮速冻后存放于-70 °C冰箱保存。

分蘖芽中内源IAA、GA<sub>1+4+7</sub>、玉米素(Z)+玉米素核苷(ZR)、脱落酸(ABA)含量采用酶联免疫法(Yang等2001)测定, 酶联免疫试剂盒购自中国农业大学, 使用SpectraMax Plus 384型酶标仪测定。每个样品称取0.2 g左右, 重复测定3次, 取平均值。

使用E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plant RNA Kit (Omega Bio-Tek, Inc, USA)提取倒二芽RNA, 并除去基因组DNA。按PrimScript<sup>™</sup> RT Reagent Kit (TaKaRa, Kyoto, Japan)说明书进行反转录。使用SYBR Premix Ex Taq<sup>™</sup> (TaKaRa, Kyoto, Japan)试剂盒和ABI7300荧光定量PCR仪进行Real-time RT-PCR反应, 按试剂盒说明书进行操作, 以*Actin*基因作为内

标基因, 各基因PCR引物序列见表1。表达结果以CK为参比样本进行分析, 每个样品称取0.1 g左右, 所有样品均设3个重复。

另外, 为了验证CTK与*OsTBI*表达的关系, 选择水稻品种‘南粳44’为供试材料, 2010年5月30日播种, 将露白的种子播种于装满石英砂的培养皿中, 一个培养皿中50粒种子。待幼苗长至二叶时, 外源喷施20 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA (刘杨2009b), 以喷清水处理为对照, 喷施后6和12 h取样, 测定叶中*OsTBI*表达。RNA提取和表达分析采用上述的方法。

## 实验结果

### 1 分蘖芽生长状况

去除顶穗打破了倒二芽的休眠, 促进了其萌发, 在处理36 h, RP处理倒二芽长度已显著高于CK (表2)。外源喷施IAA和GA<sub>3</sub>几乎完全抑制了去除顶穗对倒二芽生长的促进作用, 在处理48 h内, IAA和GA处理倒二芽长度与CK无显著差异, 同样于处理后36 h开始显著低于RP处理。

### 2 分蘖芽中激素含量变化

去除顶穗和外源喷施IAA和GA<sub>3</sub>对倒二芽中IAA和GA<sub>1+4+7</sub>含量均无显著影响, 在处理36 h内, 各处理间倒二芽中IAA含量和GA<sub>1+4+7</sub>含量均无显

表1 引物信息

Table 1 Primer information

基因	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
<i>OsTBI</i>	GCCGATGCAAGAAATC	TCAGCAGTAGTGCCGCGAA
<i>OsD3</i>	TTCGGCTACTCTCAAGGAA	CACAGCTTCACTGAGGTCCA
<i>OsD10</i>	GGTAGCAACGAGAGGCAGTT	TCGACCTTGGTGAGCGTGTT
<i>OsD27</i>	TCTGGGCTAAAGAATGAAAAGGA	AGAGCTTGGGTCAAAATCTCG
<i>Actin</i>	CAATCGTGAGAAGATGACCC	GTCCATCAGGAAGCTCGTAGC

表2 去除顶穗和外源激素对分蘖芽生长的影响

Table 2 Effects of panicle removal and external hormones on tiller buds growth

处理后时间/h	倒二芽长度/cm			
	CK	RP处理	IAA处理	GA处理
0	0.62±0.07 <sup>a</sup>	0.64±0.08 <sup>a</sup>	0.67±0.12 <sup>a</sup>	0.64±0.04 <sup>a</sup>
12	0.64±0.08 <sup>a</sup>	0.65±0.11 <sup>a</sup>	0.63±0.05 <sup>a</sup>	0.65±0.09 <sup>a</sup>
24	0.65±0.08 <sup>a</sup>	0.66±0.03 <sup>a</sup>	0.66±0.07 <sup>a</sup>	0.64±0.08 <sup>a</sup>
36	0.63±0.09 <sup>b</sup>	1.12±0.10 <sup>a</sup>	0.64±0.06 <sup>b</sup>	0.63±0.05 <sup>b</sup>
48	0.62±0.07 <sup>b</sup>	1.59±0.11 <sup>a</sup>	0.63±0.06 <sup>b</sup>	0.65±0.04 <sup>b</sup>

表中同行数据后不同小写字母表示差异达0.05显著水平。

著差异(图1-A和D)。与此不同, 去除顶穗后, RP处理倒二芽中Z+ZR含量持续升高, 从处理后3 h开始显著高于CK处理; 外源IAA和GA<sub>3</sub>完全抑制了去除顶穗对倒二芽Z+ZR含量的增加作用, 在处理后36 h内, IAA、GA和CK处理倒二芽中Z+ZR含量基本保持不变, 并从处理后3 h开始显著低于RP处理(图1-B)。另外, 从图1-C可以看出, 在去除顶穗后36 h, RP处理倒二芽中ABA含量显著下降, 但是, 外施IAA和GA<sub>3</sub>抑制了ABA含量的下降, 在处理后36 h, IAA和GA处理倒二芽中ABA含量显著高于RP处理, 与CK无显著差异。

### 3 分蘖芽中*OsTBI*、*OsD3*、*OsD10*和*OsD27*的表达变化

从图2可以看出, 与CK相比, 去除顶穗显著降低了分蘖芽中*OsTBI*、*OsD3*、*OsD10*和*OsD27*的表达, 但各基因的具体情况不同。在处理后3 h, RP处理的*OsD3*、*OsD10*和*OsD27*表达量显著低于

CK, 但此时*OsTBI*的表达量和CK无显著差异; 至处理后6 h, RP处理4个基因的表达量均显著低于CK。外源IAA和GA<sub>3</sub>抑制了去除顶穗对这4个基因表达的降低作用, 在处理后6 h, IAA和GA处理芽中*OsTBI*表达量显著高于RP处理, 但GA处理芽中*OsTBI*表达量显著低于CK, 而IAA处理与CK无显著差异; 除*OsTBI*外, GA处理分蘖芽中*OsD3*、*OsD10*和*OsD27*的表达量在处理后3和6 h均基本恢复至同期CK水平, IAA处理*OsD3*和*OsD27*的表达量在处理后3和6 h均与同期CK无显著差异, 而*OsD10*表达量在处理后3和6 h显著高于同期CK水平。

## 讨 论

### 1 激素对分蘖芽生长的影响

本试验结果表明, 外源IAA和GA<sub>3</sub>对水稻分蘖萌发生长有明显抑制作用, 外施50 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>或

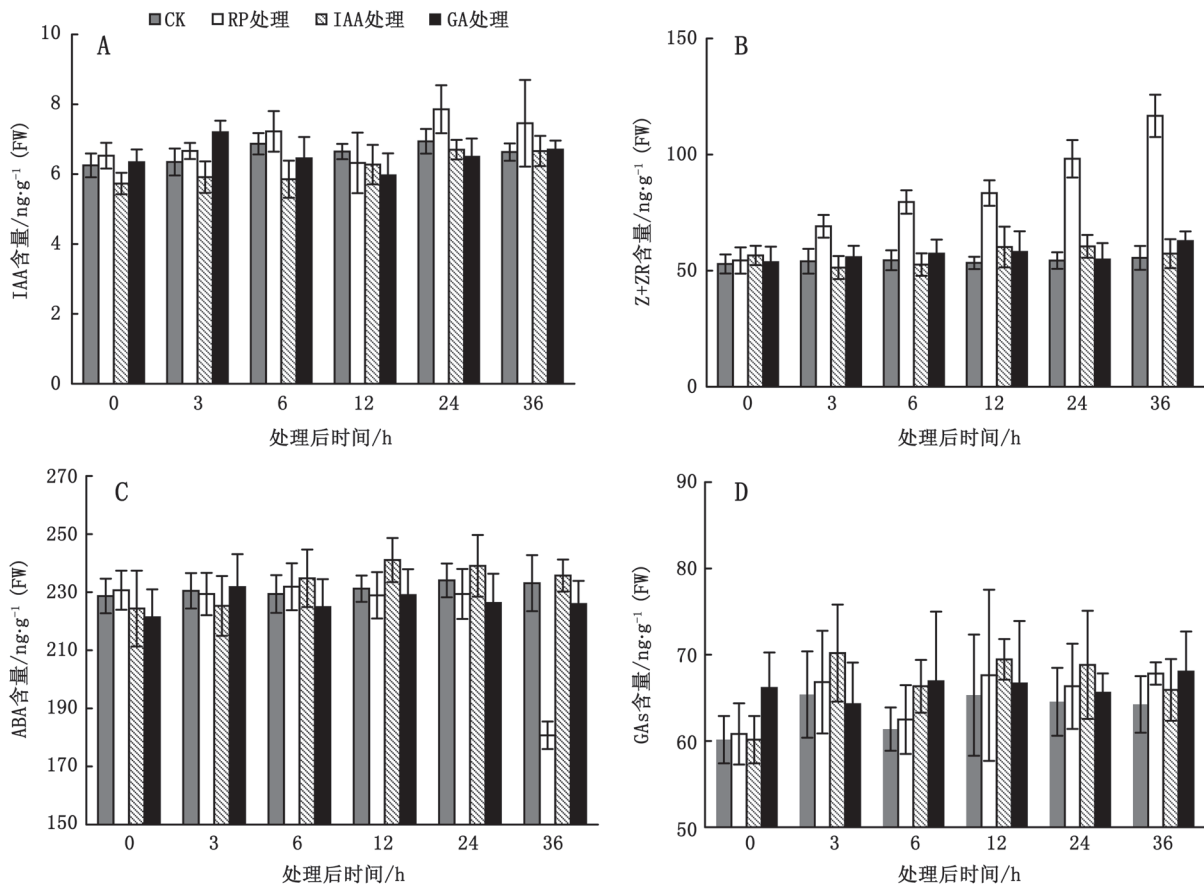


图1 去除顶穗和外源激素对分蘖芽中内源激素含量的影响

Fig.1 Effects of panicle removal and external hormones on the hormone contents in tiller buds

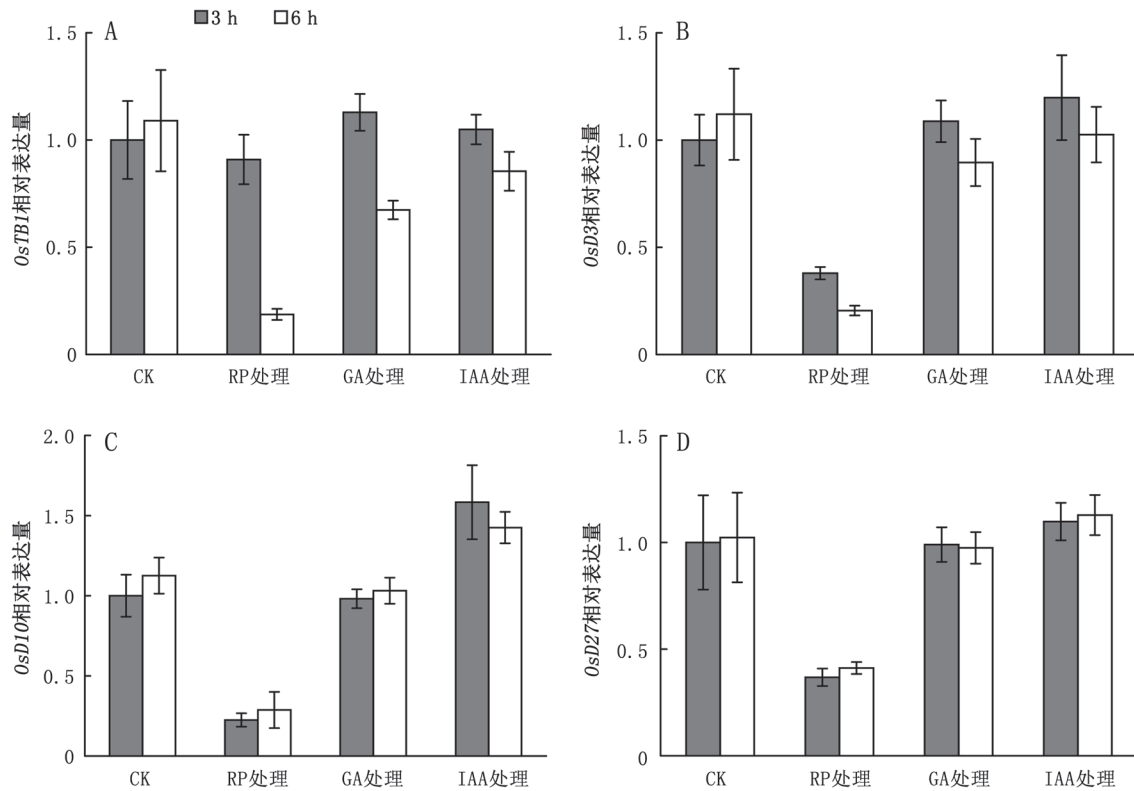


图2 去除顶穗和外源激素对分蘖芽中*OsTB1*、*OsD3*、*OsD10*和*OsD27*表达的影响

Fig.2 Effects of panicle removal and external hormones on the expression of *OsTB1*, *OsD3*, *OsD10* and *OsD27* in tiller buds

IAA几乎能够完全逆转去除顶穗对分蘖芽生长的促进作用。前人研究认为,植物侧芽的生长主要受生长素和细胞分裂素的互作调控,细胞分裂素在根部(Bangerth 1994)或茎部合成(Schmulling 2002),运输至侧芽刺激侧芽生长,外施细胞分裂素促进小麦(*Triticum aestivum*)分蘖芽生长(Langer等1973),小麦分蘖发生衰亡与分蘖节内Z+ZR含量密切相关(马兴林和梁振兴1997)。与CTK相反,IAA抑制侧芽生长(Wang等2006),消除或削弱IAA的活性可以打破侧芽的休眠使其萌发,外源施用生长素类激素可以消除CTK对侧芽生长的促进作用(Cline等2001)。本研究发现,去除顶穗后在倒二芽长度显著增加前分蘖芽中Z+ZR含量显著增加,但是外源IAA和GA<sub>3</sub>抑制倒二芽萌发生长的同时显著抑制分蘖芽中Z+ZR含量的增加,这表明Z+ZR含量增加是水稻分蘖芽萌发生长的重要前提条件,IAA和GA<sub>3</sub>对分蘖芽生长的调控是通过调控Z+ZR的含量实现的。Bangerth (1994)在大豆中的研究认为,CTK作为第二信使参与IAA调控休眠的过程,

CTKs在根内合成随后运至腋芽以打破休眠,同时,IAA调控CTK的浓度进而调控芽的生长,这与本试验结果一致。前人研究表明,GA<sub>3</sub>能够促进IAA的合成(王忠2006),这可能是GA<sub>3</sub>抑制Z+ZR含量的提高进而抑制分蘖芽萌发的主要原因。另外,本研究发现各处理对分蘖芽中IAA含量都没有显著影响,这表明IAA对分蘖芽生长的抑制作用是间接的。我们以前的试验结果表明,IAA是通过影响分蘖节部位的激素平衡进而影响分蘖芽的萌发生长(刘杨等2009a),另有其他植物的研究也证实了IAA主要通过极性运输在木质部和束间厚壁组织中起作用,这种作用不是直接的而是间接的(巩鹏涛和李迪2005)。本研究结果还发现,去穗和外源激素也显著影响了分蘖芽中ABA含量的变化,但是ABA含量的变化与分蘖芽萌发生长同步,并未发生在分蘖芽长度显著变化之前,这表明ABA可能不是水稻分蘖芽生长的主要调控因素。Tucker (1978)认为ABA受到IAA的调控,作为第二信使抑制侧芽生长,而且有研究发现ABA和IAA的互作与



侧芽生长有关(Cline和Oh 2006)。这些结果和本试验结果暗示ABA可能受到IAA的调控进而控制水稻分蘖芽萌发。

## 2 分蘖芽生长与基因表达的关系

水稻*OsTBI*基因是玉米*TBI*基因在水稻中的对等基因, 控制分蘖芽伸长, 其过量表达的转基因水稻植株分蘖数目显著减少, 但分蘖芽的起始不受影响(Takeda等2003)。本试验结果表明, 去除顶穗促进分蘖芽生长的同时显著降低了*OsTBI*的表达, 而外源IAA和GA<sub>3</sub>在抑制分蘖芽生长的同时增强了其表达, 表明*OsTBI*是分蘖芽生长的负调控因子, 这与前人研究结果相似。另外, 本研究发现*OsTBI*基因的表达变化发生在Z+ZR变化之后, 这暗示*OsTBI*的表达有可能受到CTK的影响。*OsTBI*基因属于TCP基因家族成员, TCP的生化功能为转录因子, 能够调节细胞的分裂(Cubas等1999)。Kosugi和Ohsshi (2002)认为*OsTBI*是通过抑制腋芽分生组织的细胞增殖来控制从腋芽原基到侧枝形成的生长过程, 这与CTK的生理功能相近。这些结果表明*OsTBI*对分蘖芽生长的调控与CTK密切相关, 其可能受到CTK的调控, 进而调控水稻分蘖芽的生长。我们用外源6-BA (一种人工合成的细胞分裂素)处理的结果表明, 外源6-BA能够显著抑制*OsTBI*的表达(图3), 暗示CTK能够抑制*OsTBI*的表达, 这也为本试验结果提供了佐证。

*OsD3*、*OsD10*和*OsD27*基因是从一系列突变体*d3*、*d10*和*d27*中分离出来的分蘖发生的相关基因。本试验结果表明, 去除顶穗同样显著抑制了

这3种基因表达, 同时, 外源IAA和GA<sub>3</sub>提高了其表达水平, 这表明, 同*OsTBI*一样, *OsD3*、*OsD10*和*OsD27*也是分蘖芽生长的负向调控基因, 这与前人研究结果一致。但是, 与*OsTBI*不同, *OsD3*、*OsD10*和*OsD27*的变化与Z+ZR的变化同步, 这暗示此3个基因的表达可能不受CTK的调控。近几年来, 通过对拟南芥*max3*和*max4*、豆科植物*rsm1*等突变体的研究发现了一条新的受类胡萝卜素衍生的MAX/RMS蛋白调控的植物侧芽生长途径, 此途径与一种新的调控植物侧枝生长的激素独角金内酯密切相关(王台等2010)。而*OsD3*、*OsD10*和*OsD27*基因是MAX和RSM基因家族系列的同源基因(Lin等2009; Arite等2007), 这说明*OsD3*、*OsD10*和*OsD27*可能是通过MAX/RMS蛋白调控途径调控分蘖芽生长。Tanaka等(2006)研究发现RMS和MAX系列基因的表达受到IAA的调控, 这暗示*OsD3*、*OsD10*和*OsD27*等的表达也可能受到IAA的调控; 另外, Arite等(2007)研究发现*d3*、*d10*和*d27*突变体中IAA含量显著高于野生型。这些结果表明IAA能够调控*OsD3*、*OsD10*和*OsD27*等的表达, 这为本研究外源IAA能够增强*OsD3*、*OsD10*和*OsD27*基因表达的结果提供了佐证, 而GA<sub>3</sub>对此3个基因表达的调控也可能是通过IAA实现的。

从这些结果中可以看出, 水稻分蘖芽生长的调控可能至少存在两条途径, 一条通过调控分蘖芽中CTK含量进而调控相关基因表达来调控水稻分蘖芽生长, 另一条通过MAX/RMS/D蛋白途径调控水稻分蘖芽生长, 外源IAA等激素对水稻分蘖芽生长的调控也是通过这两条途径共同实现, 但是关于这两条途径的具体作用以及二者的相互联系还需要进一步深入研究。

## 参考文献

- 巩鹏涛, 李迪(2005). 植物分枝发育的遗传控制. 分子植物育种, 3 (2): 151~162
- 洪晓富, 蒋彭炎, 郑寨生, 卢昌银, 王撮明(1998). 水稻分蘖期喷施赤霉素(GA<sub>3</sub>)对控制分蘖和提高成穗率的效果. 浙江农业科学, (1): 3~5
- 刘杨, 王强盛, 丁艳锋, 刘正辉, 李刚华, 王绍华(2009a). 水稻休眠分蘖芽萌发过程中内源激素水平的变化. 作物学报, 35 (2): 356~362
- 刘杨, 王强盛, 丁艳锋, 刘正辉, 李刚华, 王绍华(2009b). 氮素和6-BA对水稻分蘖芽发育的影响及其生理机制. 作物学报, 35

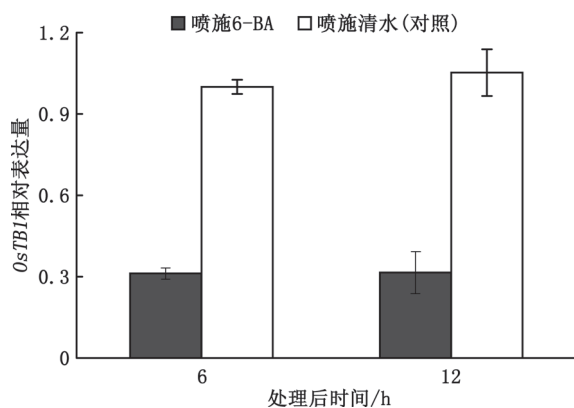


图3 外源6-BA对*OsTBI*表达的影响

Fig.3 Effect of external 6-BA on the expression of *OsTBI*

- (10): 1893~1899
- 马兴林, 梁振兴(1997). 冬小麦分蘖衰亡过程中内源激素作用的研究. 作物学报, 23 (2): 200~207
- 王台, 钱前, 袁明, 王小菁, 杨维才, 瞿礼嘉, 孔宏智, 许亦农, 蒋高明, 种康(2010). 2009年中国植物科学若干领域重要研究进展. 植物学报, 45: 265~306
- 王忠(2006). 植物生理学. 北京: 中国农业出版社
- Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M, Kojima M, Sakakibara H, Kyojuka J (2007). *DWARF10*, an *RMS1/MAX4/DADI* ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J*, 51: 1019~1029
- Bangerth F (1994). Response of cytokinin concentration in the xylem exudates of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to decapitation and auxin treatment, and relationship to apical dominance. *Planta*, 194: 439~442
- Cline MG, Chatfield SP, Leyser O (2001). NAA restores apical dominance in the *axr3-1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot*, 87: 61~65
- Cline MG, Oh C (2006). A reappraisal of the role of abscisic acid and its interaction with auxin in apical dominance. *Ann Bot*, 98: 891~897
- Cubas P, Lauter N, Doebley J, Coen E (1999). The TCP domain: a motif found in protein regulating plant growth and development. *Plant J*, 18: 215~222
- Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, Onishi K, Takamura I, Kyojuka J (2005). Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutant of rice. *Plant Cell Physiol*, 46 (1): 79~86
- Kosugi S, Ohashi Y (2002). DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family. *Plant J*, 30 (3): 337~348
- Langer RHM, Prasad PC, Laude HM (1973). Effects of kinetin on tiller bud elongation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ann Bot*, 37: 565~571
- Leopold AC (1949). The control of tillering in grasses by auxin. *Am J Bot*, 36: 437~440
- Li XY, Qian Q, Fu ZM, Wang YH, Xiong GS, Zheng DL, Wang XQ, Liu XF, Teng S, Hiroshi F et al (2003). Control of tillering in rice. *Nature*, 422: 618~621
- Lin H, Wang RX, Qian Q, Yan MX, Meng XB, Fu ZM, Yan CY, Jiang B, Su Z, Li JY et al (2009). *DWARF27*, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *Plant Cell*, 21: 1512~1525
- Schmulling T (2002). New insights into the functions of CKs in plant development. *J Plant Growth Regul*, 21: 40~49
- Takeda T, Suwa Y, Suzuki M, Kitano H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Matsuoka M, Ueguchi C (2003). The *OsTBI* gene negatively regulates lateral branching in rice. *Plant J*, 33: 513~520
- Tanaka M, Takei K, Kojima M, Sakakibara H, Mori H (2006). Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J*, 45: 1028~1036
- Tucker DJ (1978). Apical dominance in the tomato: the possible roles of auxin and abscisic acid. *Plant Sci Lett*, 12: 273~278
- Wang GY, Romheld V, Li CJ, Bangerth F (2006). Involvement of auxin and CKs in boron deficiency induced changes in apical dominance of pea plants (*Pisum sativum* L.). *J Plant Physiol*, 163: 591~600
- Yang JC, Zhang JH, Wang ZQ, Zhu QS, Wang W (2001). Hormonal changes in the grains of rice subjected to water stress during grain filling. *Plant Physiol*, 127: 315~323