

6-BA拮抗脱落酸缓解渗透胁迫对种子萌发的抑制

李娜^{1,2,*}, 王琳丹²

¹郑州澍青医学高等专科学校基础医学部, 郑州450000; ²棉花生物学国家重点实验室, 河南大学生命科学学院, 河南开封475004

摘要: 细胞分裂素促进细胞分裂、芽的分化, 拮抗脱落酸抑制的种子萌发, 而细胞分裂素合成基因*Ipt8*在种子萌发过程中发挥重要的作用。本文分别用120 mmol·L⁻¹ NaCl和240 mmol·L⁻¹甘露醇模拟盐和干旱胁迫处理拟南芥种子, 探讨6-BA拮抗ABA对其抑制种子萌发和萌发后生长的影响。结果表明, 细胞分裂素合成相关突变体*ipt6-1*、*ipt6-2*、*ipt8-1*和*ipt8-2*的种子萌发和生长可被NaCl和甘露醇显著抑制; 而ABA合成相关突变体*aba2-1*对相同浓度NaCl和甘露醇的处理表现相对不敏感。进一步研究发现添加外源6-BA可恢复*ipt6-1*、*ipt6-2*、*ipt8-1*和*ipt8-2*的相关敏感表型, 并且随6-BA浓度的增加, 恢复效果也愈趋明显。

关键词: 脱落酸; 细胞分裂素; 萌发; 渗透胁迫

Alleviation of 6-BA Antagonizing ABA on the Inhibition of Seed Germination by Osmotic Stress

LI Na^{1,2,*}, WANG Lin-Dan²

¹Faculty of Basic Medicine, Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450000, China; ²State Key Laboratory of Cotton Biology, College of Life Sciences, Henan University, Henan, Kaifeng 475004, China

Abstract: Cytokinins promote cell division, differentiation of buds, antagonist abscisic acid inhibition of seed germination. The cytokinin biosynthesis gene *Ipt8* plays an important role in the process of seed germination. In this paper, we studied the alleviation of 6-BA antagonizing ABA on the inhibition of seed germination in *Arabidopsis thaliana* by osmotic stress. And the *Arabidopsis* seeds were treated with 120 mmol·L⁻¹ NaCl and 240 mmol·L⁻¹ mannitol to simulate the salt and drought stress. The results showed that the seed germination and growth of cytokinin biosynthesis mutants *ipt6-1*, *ipt6-2*, *ipt8-1*, and *ipt8-2* were significantly inhibited by NaCl and mannitol. But the ABA biosynthesis the mutant *aba2* was insensitized to same concentrations of NaCl and mannitol. Further results showed that the sensitized ecotype of *ipt6-1*, *ipt6-2*, *ipt8-1*, *ipt8-2* could be recovered by adding exogenous cytokinin (6-BA), otherwise the effects were more obvious with the increasing concentrations of 6-BA.

Key words: abscisic acid; cytokinin; germination; osmotic stress

土壤盐渍化是现代农业所面临的主要问题之一, 盐分胁迫影响植物的产量、蛋白质合成、光合作用以及能量代谢(Parida和Das 2005)。近几年, 关于作物对盐胁迫的响应机制已做了大量的研究(吕金印等2008; 张云华等2004; 陈源闽等2010; 李卫欣等2010; 孙慕华等2010; 郭峰等2010)。盐胁迫对棉花种子萌发和幼苗生长的伤害主要涉及渗透胁迫、离子毒害以及对酶活性的抑制(孙小芳等2000)。同时, 干旱胁迫也是自然界中最主要的非生物胁迫之一, 严重影响了种子的萌发和幼苗的正常生长过程(吴文荣等2012)。

通常, 干旱和盐渍处理等非生物胁迫可以促使脱落酸(abscisic acid, ABA)浓度的升高(周金鑫等2008)。ABA作为一种植物激素在植物生长发育过程中起

重要作用, 如促进果实与叶片脱落、器官衰老和气孔关闭, 影响植物开花、调节种子和胚的发育等生理功能(Bleecker和Patterson 1997; Finkelst 2006; Leonardi等1995; Mishra等2006; Gao等2007)。ABA被认为与种子的休眠有关(付婷婷等2008)。在许多物种中, 内源ABA涉及种子休眠状态的诱导与维持(Leubner-Metzger 2003; Nam-bara和Marion-Poll 2003)和种子萌发的抑制(Hilhorst 1995; Kermod 2005)。发育中的种子提早萌发通常与ABA的缺乏或

收稿 2013-08-30 修定 2014-02-28

资助 河南省教育厅科学技术研究重点项目(13B180288)和河南省教育厅自然科学基金基础研究专项基金(2011B180007)。

* 通讯作者(E-mail: ln877979316@hotmail.com; Tel: 0371-67673815)。

者不敏感有关(Hilhorst 1995; Bewley 1997), 例如玉米胎萌突变体(*vp*)、番茄ABA缺乏突变体(*sit*)以及拟南芥ABA缺乏突变体(*aba*)和ABA不敏感突变体(*abi*) (Bewley 1997)等。而外加ABA可防止种子发生胎萌(洪克前和张妙彬2004)。ABA是种子休眠诱导的正调节因子和萌发的负调节因子(付婷婷等2008)。

细胞分裂素(cytokinin, CTK)能促进顶端优势、休眠芽的萌发和休眠种子的萌发(罗超等2011; Cohn和Butera 1982), 其中CTK对种子萌发的促进作用主要是通过ABA的相互作用实现的, CTK与ABA同时出现时表现出拮抗效应(杨荣超等2012)。抗CTK的烟草突变体种子表现出休眠程度降低以及对CTK-ABA相互作用的多效性(Fischer-Iglesias和Neuhaus 2001)。但是关于CTK和ABA在种子萌发过程中的具体相互作用知之甚少。最新的研究报道中, 关于CTK和ABA共同参与调控的种子休眠与萌发信号传导网络, 其中涉及到多个CTK合成过程中的基因如*AtIPT8*, 以及ABA信号转导途径中的*abi4*、*abi5*等, 并且包括一些在信号网路途径中的蛋白质调节因子。磷酸腺苷异戊烯基转移酶(adenosinephosphate-isopentenyl transferase) IPT是细胞分裂素生物合成催化酶。Takei等(2001)和Kakimoto (2001)研究小组从拟南芥基因组测序中鉴定出9个*ipt*同系物(*ipt-homologs*), 命名为*AtIPT1*~*AtIPT9*。*AtIPT4*基因过表达时, 即使在无外源CTK存在的条件下, 茎仍能再生。同样, 通常只有当CTK存在时, 愈伤组织才能有茎的再生。这表明在植物体中, 此基因的产物能催化CTK的生物合成(Kakimoto 2001)。*AtIPT3*、*AtIPT5*和*AtIPT7*基因在营养器官中表达。*AtIPT8*专一地在再生器官中表达, 在未成熟的种子中表达量最高。*AtIPT4*主要在再生的未成熟种子中表达。*AtIPT1*在胚珠和营养器官中表达。CTK负调节*AtIPT1*、*AtIPT3*、*AtIPT5*和*AtIPT7*在植物体中的表达(Miyawaki等2006)。最新的研究表明*AtIPT8*在细胞分裂素促进的种子萌发过程中发挥作用。然而, 目前仍没有具体检测到*AtIPT4*和*AtIPT6*在表达上对细胞分裂素的效应途径。

本文以细胞分裂素和ABA合成或信号转导子突变体为材料, 采用NaCl和甘露醇来模拟盐和干旱的非生物胁迫, 观察分析拟南芥种子的萌发及子叶生长变绿状况, 探讨细胞分裂素对ABA缓解渗透胁迫抑制种子萌发生长的影响。

材料与方法

1 材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)为Columbia-0 (Col-0)生态型、*ipt6-1* (CS2360)、*ipt6-2* (CS22-659)、*ipt8-1* (Salk_143008)、*ipt8-2* (Salk_140499)、*aba2-1* (CS156)和*abi5-2* (CS66980)等基因型纯合突变体种子均是从拟南芥资源信息中心(<http://www.Arabidopsis.org>)订购。实验主要是在河南大学棉花生物学国家重点实验室完成。

2 方法

2.1 NaCl和甘露醇处理的培养基制备

配制MS培养基, 在灭菌之前分别将NaCl和甘露醇添加进去, 使得NaCl终浓度分别为120 mmol·L⁻¹; 甘露醇终浓度为240 mmol·L⁻¹; 经高压蒸汽灭菌(121 °C, 15 min)后分装到无菌培养皿中。

2.2 不同浓度ABA和6-BA处理的培养基制备

配制MS培养基或添加NaCl和甘露醇于MS培养基, 分装于锥形瓶中, 经高压蒸汽灭菌(121 °C, 15 min)后, 在无菌操作台内放凉。待培养基尚未凝固前分别加入用微孔滤过滤的ABA和6-BA的母液, 摇匀, 使得ABA终浓度分别为0.1、0.5和1.0 μmol·L⁻¹, 6-BA终浓度分别为0.01和0.05 μmol·L⁻¹, 最后倒入无菌培养皿中。

2.3 种子的萌发

选取籽粒饱满、大小均匀、无病虫害的种子, 用0.1% HgCl₂浸种4~5 min后, 在超净工作台中用灭菌的双蒸水冲洗5~6次, 将种子均匀点播在分装的不同MS培养基中, 培养皿用封口膜封口后, 置于4 °C冰箱中春化3 d, 之后转到光照培养室(温度为18~22 °C, 光/暗为16 h/8 h, 光照强度300 μmol·m⁻²·s⁻¹, 相对湿度为80%)中培养。

2.4 测定指标与方法

选取同一批收获的拟南芥种子, 自放入培养室的第1天开始, 统计各个处理的种子萌发数目。种子以露白为萌发标准, 连续统计数天。萌发率=(萌发种子数/供试种子总数)×100%。每个处理3个重复, 每隔24 h观察并记录种子萌发情况, 统计相关数据, 持续数天。萌发后第4天做萌发表型分析。对照是同一光照培养室内生长在MS培养基上萌发的拟南芥种子。

同批收获的拟南芥种子萌发过程中, 胚根首

先突破种皮形成根系。然后下胚轴加速伸长, 将子叶和胚芽推出, 子叶出现绿色即为子叶变绿。每个处理3个重复, 每隔24 h观察并记录种子萌发及子叶变绿情况。统计相关数据, 持续数天。萌发后第7天做子叶变绿表型分析。对照是同一光照培养室内生长在MS培养基上萌发的拟南芥种子。

以上的数据用Excel 2007和Origin 5.0软件进行分析作图。

结果与讨论

1 外源NaCl和甘露醇对拟南芥种子萌发表型的影响

如图1所示, 120 mmol·L⁻¹ NaCl和240 mmol·L⁻¹甘露醇处理可显著抑制*ipt6-1*和*ipt6-2*种子的萌发以及子叶变绿, 使其萌发率分别降低近60%, 子叶变绿率分别降低近70%, 而野生型种子仍能够萌发并生长。也就是说在盐和干旱胁迫下*ipt6-1*和*ipt6-2*突变体种子萌发和生长能力显著弱于野生型, 证实*IPT6*基因参与调节NaCl和甘露醇引起的渗透胁迫。

2 外源ABA对拟南芥种子萌发表型的影响

通常, 干旱、寒冷、高温和盐等多种非生物胁迫条件下, 植物体内的ABA含量大幅度升高, ABA促进种子休眠的诱导和维持, 抑制种子的萌发。为了确定NaCl与甘露醇对种子萌发的抑制是否依赖于ABA调控, 本文检测了细胞分裂素合成相关

基因*IPT6*对ABA的反应。如图2所示, 外源ABA对种子的萌发抑制作用具有浓度依赖性, 随着浓度的升高, 抑制作用愈趋明显。1 μmol·L⁻¹ ABA处理下, 种子的萌发状况与120 mmol·L⁻¹ NaCl、240 mmol·L⁻¹甘露醇处理下的种子萌发率非常接近, 因此基本认为NaCl和甘露醇处理下的种子萌发受抑制是ABA依赖的。

为进一步证实NaCl和甘露醇处理下种子萌发抑制的ABA依赖性, 本文对ABA合成过程中的突变体*aba2-1*以及其它细胞分裂素合成过程的相关突变体*ipt8-1*和*ipt8-2*进行NaCl和甘露醇处理, 观察种子萌发及子叶变绿表型特征。如图3所示, 与对照相比, ABA的合成突变体*aba2-1*在NaCl和甘露醇处理下生长状况良好, 萌发率较高, 子叶变绿情况也优于其他种子。可见, NaCl和甘露醇抑制种子萌发现象是依赖ABA的。同时发现, NaCl和甘露醇处理下细胞分裂素合成突变体*ipt8-1*和*ipt8-2*的种子萌发状况与*ipt6-1*和*ipt6-2*极其相似, 说明目前已掌握的细胞分裂素合成突变体在外源NaCl和甘露醇胁迫处理下, 具有相同的种子萌发受抑制表型, 所以初步推测, 种子萌发过程中, 细胞分裂素与ABA存在一定的平衡调节或浓度比例协调关系, 共同参与了种子休眠的解除过程以及子叶变绿的调控途径。

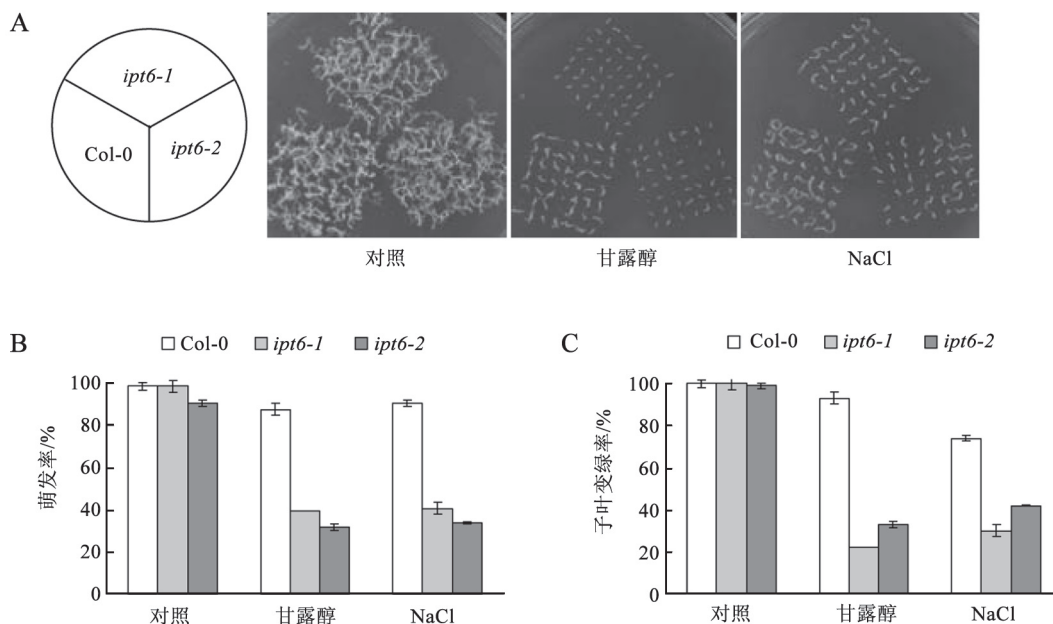


图1 外源NaCl和甘露醇处理对拟南芥种子萌发和子叶变绿的影响

Fig.1 Effects of exogenous NaCl and mannitol on seed germination and green cotyledons of *Arabidopsis*

A: 拟南芥萌发表型, 培养基上不同基因型拟南芥按此分布, 下图同此。

3 细胞分裂素与ABA共同参与调控种子的萌发

为了进一步证实细胞分裂素与ABA在种子的萌发过程中存在一定的平衡调节或浓度比例协调关系, 本文在NaCl和甘露醇处理的基础上, 添加0.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA, 观察种子的萌发及子叶变绿表型。如图4所示, 与不加6-BA的(图1和2)相比, 添加

6-BA后, *ipt6-1*和*ipt6-2*种子的萌发率有所提高, 而受抑制表型得恢复。再次证明突变体*ipt6-1*和*ipt6-2*对盐、干旱胁迫以及ABA敏感, 主要是其体内合成细胞分裂素能力降低所致。

为了证明细胞分裂素和ABA共同参与调控植物种子萌发, 本文对不同基因型突变体种子进行

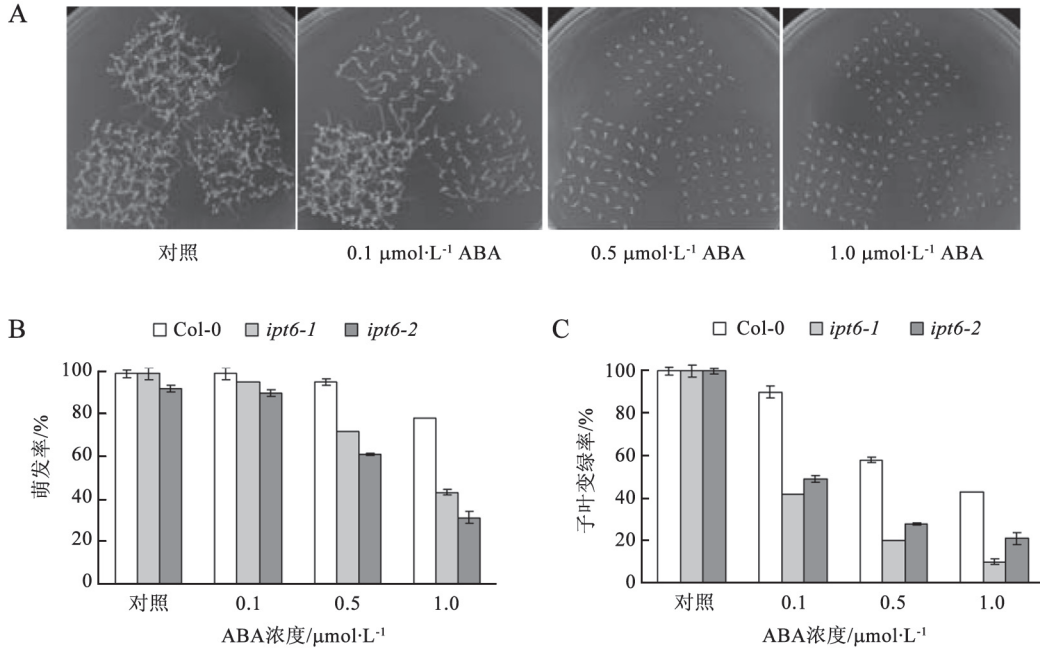


图2 外源ABA对拟南芥种子萌发和子叶变绿的影响

Fig.2 Effects of exogenous ABA on seed germination and green cotyledons of *Arabidopsis*

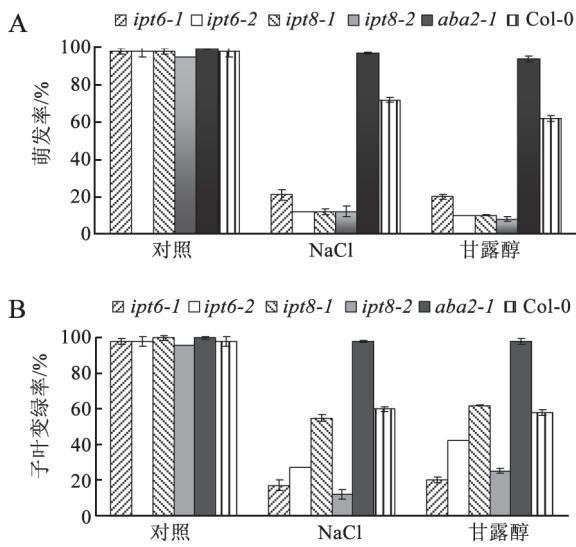


图3 NaCl和甘露醇对不同基因型拟南芥种子萌发和子叶变绿的影响

Fig.3 Effects of NaCl and mannitol on seed germination and green cotyledons of different genotypes of *Arabidopsis*

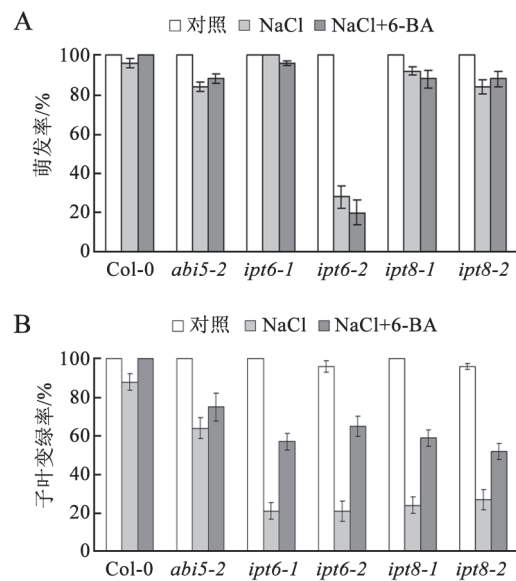


图5 不同处理对不同基因型拟南芥种子萌发的影响

Fig.5 Effects of different treatments on seed germination of different genotypes of *Arabidopsis*

同样的处理, 观察种子萌发受抑制表型是否得以恢复。如图5所示, 与对照相比, NaCl明显抑制*Ipt*家族中*ipt8-1*、*ipt8-2*、*ipt6-1*和*ipt6-2*种子萌发及子叶变绿; 外加0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA可以明显缓解NaCl对其子叶变绿的抑制。此外, 我们发现ABA

不敏感突变体*abi5-2*对NaCl处理相对不敏感(图5-B), 这表示NaCl对种子萌发的抑制依赖于ABA合成和信号传递。综上所述, 植物种子的萌发过程是细胞分裂素和ABA共同参与调控的, 二者存在一定的平衡协调关系, 并且细胞分裂素在促进

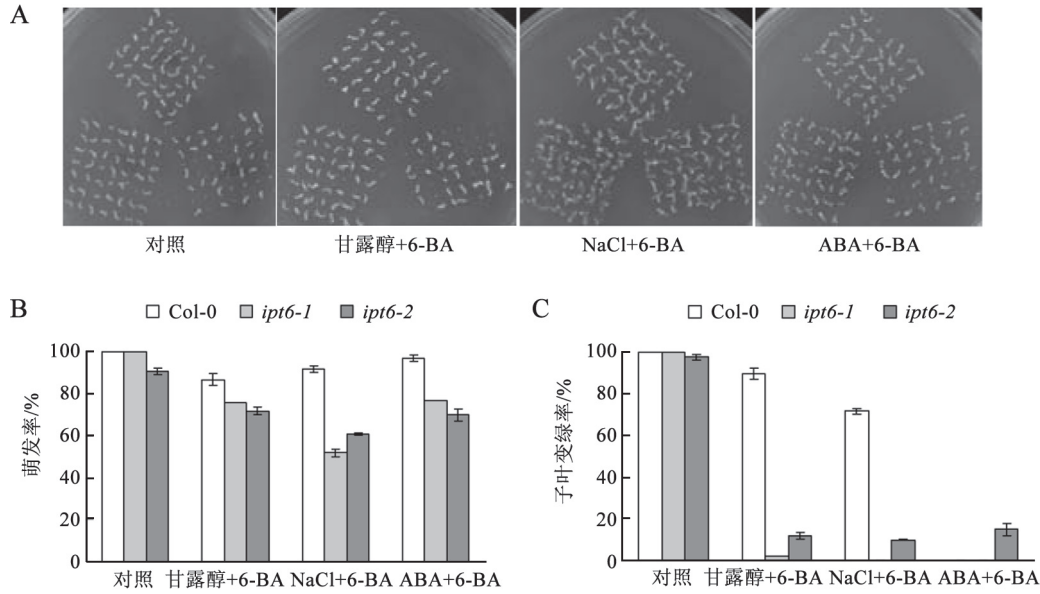


图4 不同处理对拟南芥种子萌发和子叶变绿的影响

Fig.4 Effects of different treatments on seed germination and green cotyledons of *Arabidopsis*

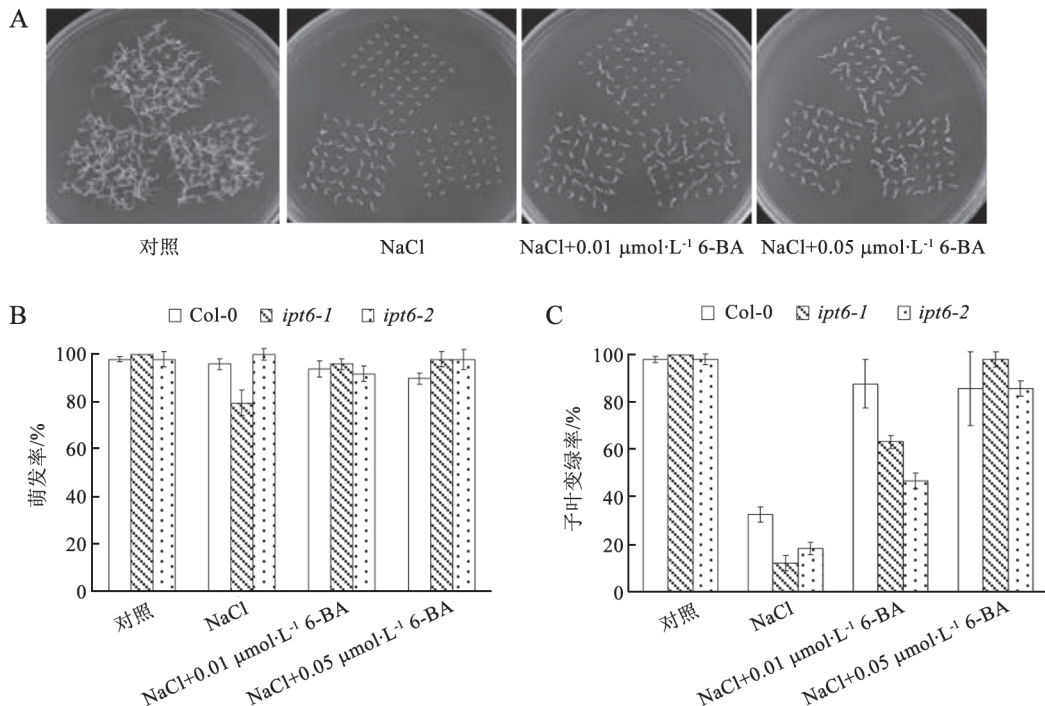


图6 外源6-BA处理对拟南芥种子的萌发的影响

Fig.6 Effects of exogenous 6-BA on seed germination of *Arabidopsis*

种子萌发方面发挥着重要的作用。

为了探究如何维持6-BA与ABA的平衡, 本文设置0.01和0.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的6-BA处理, 观察其种子的恢复表型。如图6所示, 与NaCl胁迫相比, 在NaCl+0.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA处理的种子萌发表型得到有效恢复。结果表明, 在调控种子萌发过程中, 6-BA和ABA共同发挥调控作用, 并且存在一定的浓度比例依赖关系。任何一种激素浓度的变化都足以使种子的萌发异常。

上述结果证明不同激素之间的信号途径存在直接或间接作用。因此, 对植物激素调节信号的研究必须从整体上全面地分析影响种子萌发过程的多种因素间的相互作用。此外, 在种子萌发的过程中, 一种激素的含量及敏感性变化在靶组织中具有特异性, 所以进一步分析种子休眠及萌发过程中的生理机制还需要利用其他的一些非模式作物进行分析。

种子的休眠与萌发性状的形成是一系列基因的表达及多个功能蛋白执行功能的综合体现, 尽管已知一些基因家族与种子的休眠有关。那么, 在休眠的诱导和释放过程中, 这些信号又是怎样相互作用的? 以前的研究主要集中在针对单个或几个功能基因的研究分析, 无法同一时间内对多个基因的时空表达进行研究。随着功能基因组学的迅速发展, 目前基因芯片技术及深度测序技术已经成为研究表达分析的有效工具, 这些生物技术能够提供大量差异表达基因的信息, 能够对参与种子休眠和萌发的特异性基因进行分子识别, 使得对种子萌发的信号转导机制有更深入的了解。

参考文献

陈源闽, 崔世茂, 赵彦, 新居直祐(2010). NaCl胁迫对不同地域胡萝卜种子萌发特性的影响. 内蒙古农业大学学报, 31 (3): 91~95
付婷婷, 程红焱, 宋松泉(2009). 种子休眠的研究进展. 植物学报, 44 (5): 629~641
郭峰, 万书波, 李新国, 徐平丽, 孟静静(2010). NaCl胁迫对花生种子萌发的影响. 干旱地区农业研究, 28 (3): 177~181
洪克前, 张妙彬(2004). 种子中脱落酸的研究进展. 徐州师范大学学报, 22 (2): 75~78
李卫欣, 刘畅, 王鹏, 陈贵林(2010). NaCl胁迫对不同南瓜幼苗生理特性的影响. 北方园艺, (6): 56~58
吕金印, 赵晖, 冯万健(2008). NaCl胁迫对甜高粱幼苗保护酶活性等生理特性的影响. 干旱地区农业研究, 26 (6): 133~137
罗超, 黄世文, 王菡, 赵露(2011). 细胞分裂素的生物合成、受体和信号转导的研究进展. 特产研究, 2 (2): 71~75
孙慕华, 陈学珍, 徐娜, 谢皓(2010). NaCl对大豆科丰14种子萌发的

影响. 北京农学院学报, 25 (4): 4~5
孙小芳, 郑青松, 刘友良(2000). NaCl胁迫对棉花种子萌发和幼苗生长的伤害. 植物资源与环境学报, 9 (3): 22~25
吴文荣, 刘晓艳, 吴桂丽, 李珂蕾, 朱月梅(2012). 不同干旱胁迫对胡麻种子萌发特性的影响. 作物杂志, (2): 134~137
杨荣超, 张海军, 王倩, 郭仰东(2012). 植物激素对种子休眠和萌发调控机理的研究进展. 草地学报, 20 (1): 1~9
张云华, 孙守均, 王云, 宋桂云, 王翠花, 白金明(2004). 高粱萌发期和苗期耐盐性研究. 内蒙古民族大学学报, 19 (3): 300~302
周金鑫, 胡新文, 张海文, 黄荣峰(2008). ABA在生物胁迫应答中的调控作用. 农业生物技术学报, 16 (1): 169~174
Bewley JD (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9: 1055~1066
Bleecker AB, Patterson SE (1997). Last exit : senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 9: 1169~1179
Cohn MA, Butera DL (1982). Seed dormancy in red rice (*Oryza sativa*). II. Response to cytokinins. *Weed Sci*, 30: 200~205
Finkelstein RR (2006). Studies of abscisic acid perception finally flower. *Plant Cell*, 18: 786~791
Fischer-Iglesias C, Neuhaus G (2001). Zygotic embryogenesis. Hormonal control of embryo development. In: Bhojwani SS, Soh WY (eds). *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 223~247
Gao Y, Zeng Q, Guo J, Cheng J, Ellis BE, Chen JG (2007). Genetic characterization reveals no role for the reported ABA receptor, GCR2, in ABA control of seed germination and early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant J*, 52: 1001~1013
Hilhorst HWM (1995). A critical updated on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Sci Res*, 5: 61~73
Kakimoto T (2001). Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyl transferases. *Plant Cell Physiol*, 42: 677~685
Kermode AR (2005). Role of abscisic acid in seed dormancy. *J Plant Growth Regul*, 24: 319~344
Leonardi AS, Haimovaara D, Wang M (1995). Differential involvement of abscisic acid in dehydration and osmotic stress in rice cell suspension. *Plant Physiol*, 93: 31~37
Leubner-Metzger G (2003). Functions and regulation of β -1,3-glucanase during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Sci Res*, 13: 17~34
Mishra G, Zhang W, Deng F, Zhao J, Wang X (2006). A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science*, 312: 264~266
Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, Kato T, Sato S, Tarkowska D, Tabata S, Sandberg G, Kakimoto T (2006). Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyl transferases and tRNA isopentenyl transferases in cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 16598~16603
Nambara E, Marion-Poll A (2003). ABA action and interactions in seeds. *Trends Plant Sci*, 8: 213~217
Parida AK, Das AB (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol Environ Safe*, 60 (3): 324~349
Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T (2001). Identification of genes encoding adenylate isopentenyl transferase a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Biol Chem*, 276: 26405~26410