

## 2, 4-表油菜素内酯和生长素促进大麦胚芽鞘 伸长生长的协同作用

张会曦, 甘立军, 夏凯\*

(南京农业大学生命科学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 以大麦胚芽鞘为材料, 研究了生长素吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA) 和 2, 4-表油菜素内酯 (2, 4-epibrassinolide, epiBR) 对胚芽鞘伸长的影响。结果表明: 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 和 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  epiBR 在黑暗条件下均促进大麦胚芽鞘的伸长生长, 而且在该过程中二者存在协同作用, 但必须是在 IAA 之前施用 epiBR 或两者共同处理时才能表现; 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2, 3, 5-三碘苯甲酸 (2, 3, 5-triiodobenzoic acid, TIBA) 能抑制 epiBR 诱导的胚芽鞘伸长生长, 暗示 IAA 的极性运输是 epiBR 促进大麦胚芽鞘伸长生长所必需的; 内源激素分析表明, epiBR 处理后胚芽鞘内源 IAA 含量上升, 暗示 epiBR 对大麦胚芽鞘伸长的促进作用在一定程度上通过调控内源 IAA 的水平起作用。

**关键词:** 吲哚乙酸; 2, 4-表油菜素内酯; 胚芽鞘; 伸长

中图分类号: Q946.885 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2006) 03-0023-05

## Synergistic effects of 2, 4-epibrassinolide and auxin in promotion of coleoptile elongation in barley

ZHANG Hui-xi, GAN Li-jun, XIA Kai\*

(College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Barley coleoptile segments were used to study the interactions between 2, 4-epibrassinolide (epiBR) and indole-3-acetic acid (IAA) in regulation of elongation process. The results showed that both 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA and 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  epiBR promoted coleoptile elongation in dark. They showed a synergistic relationship only when epiBR was applied before IAA or they were treated at the same time. Furthermore, the impact of epiBR on coleoptile elongation could be inhibited by 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2, 3, 5-triiodobenzoic acid (TIBA), which suggested that the effect of epiBR was partly dependent on the IAA polar transportation. Assay of plant hormones revealed that exogenous epiBR increased IAA content in coleoptile, which suggested that epiBR might also act its function through the increase of IAA level.

**Key words:** indole-3-acetic acid; 2, 4-epibrassinolide; coleoptile; elongation

植物激素间的相互作用在植物生命周期中是必不可少的。研究这些复杂的交叉过程对了解植物生长发育有着重要的作用。最近的研究使我们对油菜素内酯 (brassinosteroids, BRs) 和生长素之间的信号作用过程有了进一步的认识: 两者协同调控黄瓜<sup>[1]</sup>、南瓜<sup>[2]</sup>等下胚轴的伸长生长, 拟南芥侧根的发生<sup>[3]</sup>, 而且两者在对共同靶基因 *SAUR-AC1*、*TCH4*、*IAA3*、*IAA19* 等转录水平的调控上有交叉<sup>[4-9]</sup>。对单子叶植物的研究表明, 两者均可诱导水稻生长基因 *OsBLE2* 表达<sup>[10]</sup>, 但关于生理学水平上的研究鲜见报道。本试验以单子叶植物大麦为试验材料, 研究了 BR 和生长素在胚芽鞘伸长生长过程中的相互关系, 以期从生理学水平上研究两者之间的相互作用。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 试验材料

大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 岗啤 1 号, 由南京农业大学神州种业公司提供。

收稿日期: 2005-11-02

作者简介: 张会曦 (1982-), 硕士研究生。\* 通讯作者: 夏凯 (1965-), 副教授, 硕士生导师, 主要从事植物激素生理和生物技术研究, Tel: 025-84396069, E-mail: zhish@njau.edu.cn。

## 1.2 试验试剂

将  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  2.351 g、柠檬酸 1.019 g、蔗糖 20 g 加水定容至 1 000 mL，配成 pH = 5.0 的缓冲液，用时稀释 10 倍。用该缓冲液稀释液分别配制  $1\ 000\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA)、 $100\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  2, 4-表油菜素内酯 (2, 4-epibrassinolide, epiBR)、 $400\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2, 3, 5-三碘苯甲酸 (2, 3, 5-triiodobenzoic acid, TIBA) 母液，用缓冲液稀释至所需浓度用于试验。

## 1.3 试验方法

种子经  $10\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$   $HgCl_2$  消毒 10 min，蒸馏水漂洗 3 次，然后置于恒温箱  $20\ ^\circ\text{C}$  黑暗条件下水培。当胚芽鞘长至 1.5 ~ 2.0 cm，去除尖端 3 mm，然后切取 1.0 cm 长切段用 10 倍稀释液浸泡 1 h，再分别转到不同浓度的生长素或 epiBR 溶液中处理，分别于 12、24、36、48 h 测量胚芽鞘的长度。在研究 BR 与 IAA 的相互关系时，胚芽鞘切段先用  $1\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  epiBR 或  $200\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 溶液处理 1 h，然后再分别转到 IAA 或 epiBR 中浸泡，48 h 测量胚芽鞘的长度。在研究 TIBA 对 BR 作用的影响时，胚芽鞘切段浸泡在上述浓度的 TIBA 与 BR 的混合液中，48 h 测量胚芽鞘的长度。试验重复 3 次，每处理 12 个重复。用 SSR 测验法进行差异显著性分析 ( $n = 12$ ,  $P < 0.01$ )。

内源 IAA 测定：取各处理胚芽鞘样品 1 g (鲜重) 左右，测定 IAA 含量。按吴颂如等<sup>[11]</sup>的方法进行样品的提取和纯化，IAA 的酶联免疫吸附分析 (ELISA) 按 Chen 等<sup>[12]</sup>的方法进行。每个处理测定 3 个样品，每个样品 3 个测试重复 ( $n = 9$ ,  $P < 0.01$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 IAA 对大麦胚芽鞘伸长生长的促进作用

图 1 显示：中浓度 (40 和  $200\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) IAA 能显著促进大麦胚芽鞘的伸长生长。 $200\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 处理大麦胚芽鞘 48 h 后的净伸长量为 1.04 mm，是对照的 1.4 倍。低浓度 ( $8\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和高浓度 ( $1\ 000\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) IAA 处理与对照相比差异不显著。因此选用  $200\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 作为后续试验的处理浓度。图 2 结果显示：IAA 处理后胚芽鞘伸长量快速增加，处理后 12 h 其伸长量已显著高于对照，12 h 后伸长速度减慢，但仍显著高于对照，而且这种差异一直持续到处理后 48 h 以后。

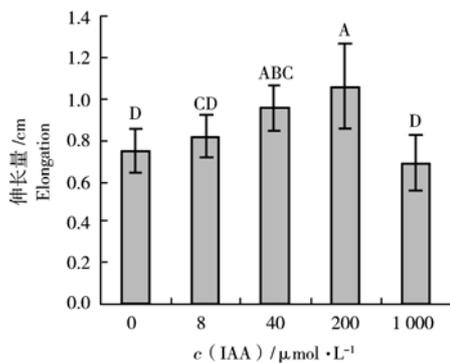


图 1 处理 48 h 时 IAA 对胚芽鞘伸长生长的浓度效应

Fig. 1 A dose-response of coleoptile segment elongation to IAA treatment for 48 h

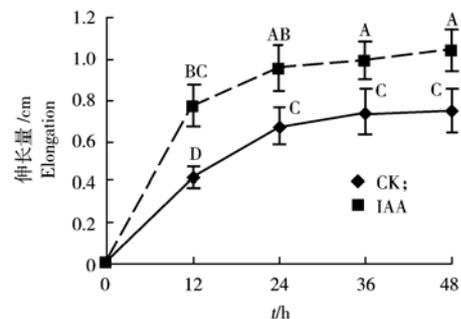


图 2  $200\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 促进胚芽鞘伸长生长的时间进程

Fig. 2 Time-courses of  $200\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA on coleoptile segment elongation

### 2.2 epiBR 对大麦胚芽鞘伸长生长的促进作用

浓度高于  $1\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 epiBR 能显著促进大麦胚芽鞘的伸长生长 (图 3)。 $1\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 epiBR 处理 48 h 后胚芽鞘的净伸长量为 1.13 cm，而对照仅为 0.75 cm。因此选用  $1\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 epiBR 作为后续试验的处理浓度。由图 4 可以看出，同 IAA 处理的结果相似，epiBR 处理后 12 h 胚芽鞘伸长量已显著高于对照。

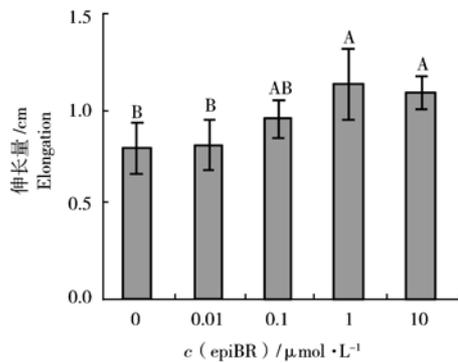


图3 处理48 h时 epiBR 对胚芽鞘伸长生长的浓度效应

Fig. 3 A dose-response of coleoptile segment elongation to epiBR treatment for 48 h

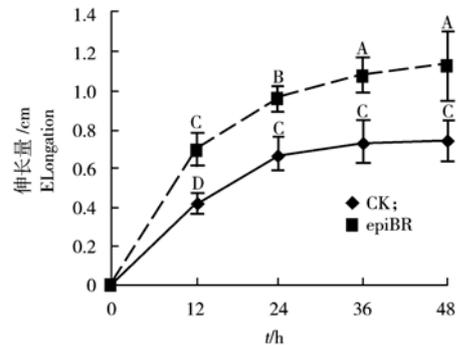


图4 1 μmol·L⁻¹ epiBR 对胚芽鞘伸长生长的时间效应

Fig. 4 Time-courses of 1 μmol·L⁻¹ epiBR on coleoptile segment elongation

2.3 在促进大麦胚芽鞘伸长生长过程中 IAA 和 epiBR 的关系

2.3.1 TIBA 对大麦胚芽鞘伸长生长的抑制作用

图5显示：浓度高于 50 mg·L<sup>-1</sup> TIBA 能显著抑制大麦胚芽鞘的伸长生长，随着浓度的升高，抑制作用加强。100 mg·L<sup>-1</sup> TIBA 处理大麦胚芽鞘 48 h 后的净伸长量为 0.46 mm，是对照的 66%。低浓度（25 mg·L<sup>-1</sup>）TIBA 处理与对照相比差异不显著。

2.3.2 IAA 和 epiBR 之间的协同作用

表1显示：200 μmol·L<sup>-1</sup> IAA 处理 1 h 后转入 1 μmol·L<sup>-1</sup> epiBR 处理 48 h，大麦胚芽鞘切段的净伸长量与两者单独处理相比差异不显著；而用 epiBR 处理 1 h 后，再转入 IAA 处理则能显著促进大麦胚芽鞘的伸长生长，净伸长量为 1.53 cm，显著高于两者单独处理的；IAA 与 epiBR 同时处理胚芽鞘净伸长量为 1.60 cm，与先用 epiBR 处理 1 h 后用 IAA 处理的结果相当。提示：epiBR 和 IAA 在大麦胚芽鞘的伸长生长过程中存在协同作用，但只有 epiBR 处理在 IAA 处理之前或者二者同时处理才能表现。

2.3.3 epiBR 促进大麦胚芽鞘的伸长生长依赖于 IAA 的极性运输

由图5和表2可知，TIBA 浓度高于 50 mg·L<sup>-1</sup> 时显著抑制 epiBR 诱导的大麦胚芽鞘的伸长生长，且随着 TIBA 浓度的升高，抑制作用增强。100 mg·L<sup>-1</sup> TIBA 与 epiBR 共同处理 48 h 后胚芽鞘的净伸长量仅为单独 epiBR 处理的 68%。提示：用 TIBA 抑制 IAA 的极性运输后，即能抑制 epiBR 诱导的胚芽鞘伸长生长，epiBR 促进大麦胚芽鞘的伸长

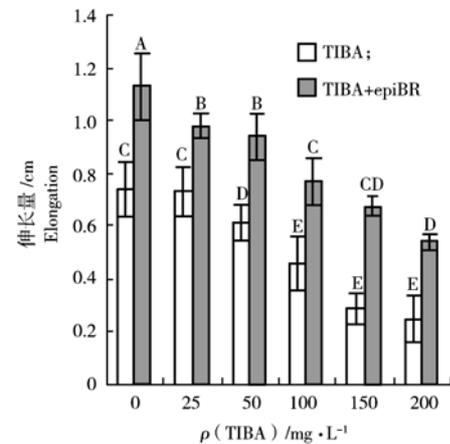


图5 处理48 h 时不同浓度的 TIBA 对 1 μmol·L<sup>-1</sup> epiBR 诱导的胚芽鞘伸长生长的抑制效应

Fig. 5 Inhibition of TIBA at various concentrations on 1 μmol·L<sup>-1</sup> epiBR induced coleoptile segments elongation for 48 h

表1 IAA 和 epiBR 处理 48 h 胚芽鞘切段的伸长效应比较

Table 1 Comparison of elongation responses of coleoptile segments to IAA and epiBR treatments for 48 h

处理 Treatment	净伸长量/cm Elongation
CK	0.71 ± 0.13 <sup>C</sup>
IAA	1.04 ± 0.20 <sup>B</sup>
epiBR	1.12 ± 0.18 <sup>B</sup>
IAA 1 h→epiBR	1.15 ± 0.07 <sup>B</sup>
IAA + epiBR	1.60 ± 0.11 <sup>A</sup>
epiBR 1 h→IAA	1.53 ± 0.13 <sup>A</sup>

Note: n=12, P<0.01. IAA: 200 μmol·L<sup>-1</sup>, epiBR: 1 μmol·L<sup>-1</sup>. The same as follows.

表2 epiBR 与 TIBA 处理 48 h 胚芽鞘切段伸长效应比较

Table 2 Comparison of elongation responses of coleoptile segments to TIBA and epiBR treatments for 48 h

处理 Treatment	净伸长量/cm Elongation
CK	0.70 ± 0.13 <sup>D</sup>
epiBR	1.13 ± 0.13 <sup>A</sup>
epiBR + TIBA	0.77 ± 0.10 <sup>C</sup>
TIBA + IAA	0.94 ± 0.06 <sup>B</sup>
TIBA	0.46 ± 0.09 <sup>E</sup>

Note: TIBA: 100 mg·L<sup>-1</sup>

生长依赖于 IAA 的极性运输。100 mg · L<sup>-1</sup> TIBA 单独处理能显著抑制大麦胚芽鞘的伸长生长, 相同浓度的 TIBA 与 IAA 共同处理后, 胚芽鞘的伸长生长能够恢复, 表明 TIBA 对大麦胚芽鞘伸长生长的抑制并非由于其药理毒性而引起的。

2.3.4 epiBR 处理 48 h 内大麦胚芽鞘内源 IAA 含量的动态变化 图 6 显示: 1 μmol · L<sup>-1</sup> epiBR 处理后, 大麦胚芽鞘内源 IAA 含量在处理 12 h 就开始增加, 并高于对照; 在处理后的 24 ~ 36 h 持续上升, 并远高于对照; epiBR 处理 36 h 时内源 IAA 含量最高, 为 1 761.4 pmol · g<sup>-1</sup>, 是对照的 2.6 倍; 其后 IAA 含量逐渐降低, 48 h 时 IAA 含量下降至 129.8 pmol · g<sup>-1</sup>, 与对照相似。该结果说明, epiBR 处理后能引起胚芽鞘内源 IAA 水平的升高, 提示 epiBR 促进胚芽鞘的伸长生长还可能通过促进 IAA 合成起作用。

### 3 讨论

Vesper 等<sup>[13]</sup>研究表明, 外源 IAA 可促进单子叶植物玉米胚芽鞘的伸长生长。本研究中, 施用 IAA 同样也可诱导大麦胚芽鞘的伸长生长。外源 BR 也能促进大麦离体胚芽鞘的伸长生长。也有研究认为, 油菜素内酯促进植物组织生长必须在有光的条件下才有效果<sup>[14]</sup>, 而本试验结果表明 BR 在黑暗下也可促进大麦胚芽鞘的伸长生长。

本研究表明, 在促进大麦胚芽鞘伸长过程中 IAA 和油菜素内酯之间存在协同作用, 但必须是 BR 施用在生长素之前或同时施用才能表现。与 Katsumi<sup>[1]</sup>以光照条件下黄瓜下胚轴切段为材料的研究结果一致。拟南芥中 BR 和生长素协同控制 *SAUR-AC1* 基因的表达, 单独使用一种激素对该基因的表达并没有显著的效果<sup>[8-9]</sup>; Yang 等<sup>[10]</sup>发现两者都能诱导水稻生长基因 *OsBLE2* 表达; 水稻叶片着生角度受生长素、BR 双重调控<sup>[15]</sup>。暗示 IAA 和 BR 对植物生长的调控具有相同的途径。在拟南芥中, 外源 IAA 处理抑制 BR 诱导基因 *BRL1-like*、*VHI/BRL2* 基因的表达<sup>[16]</sup>。本试验中, IAA 处理后再用 BR 处理, 两者不能表现出协同效应, 其原因也可能是 IAA 先处理抑制了 BR 诱导的某些基因的表达。

油菜素内酯对大麦胚芽鞘伸长的促进作用在一定程度上通过 IAA 起作用。本研究结果发现 IAA 的极性运输抑制剂 TIBA 能抑制 BR 诱导的大麦胚芽鞘切段伸长生长。表明 BR 可能通过调控 IAA 的极性运输发挥作用。类似的结果在拟南芥侧根的发生<sup>[3]</sup>、玉米根的向重力性<sup>[17-18]</sup>研究中也发现。Nakamura 等<sup>[19]</sup>发现在拟南芥中 BR 能调控 *PIN* 基因的表达, 该基因与 IAA 极性运输有关。而 Tanaka 等<sup>[20]</sup>发现 TIBA 不能抑制 BRs 促进的光下拟南芥下胚轴伸长。与本试验结果相反。这可能与有无光照有关, 也可能因为在不同环境下或不同植物不同组织中, 两者的作用模式不同。对内源 IAA 的分析表明, epiBR 处理后胚芽鞘内源 IAA 水平上升, 暗示 BR 也可能通过调节内源 IAA 水平来起作用。与 Eun 等<sup>[2]</sup>研究结果一致。在大麦胚芽鞘伸长过程中生长素作用是否依赖于 BR 还有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Katsumi M. Interaction of a brassinosteroid with IAA and GA<sub>3</sub> in the elongation of cucumber hypocotyl sections [J]. *Plant Physiol*, 1985, 26: 615-625
- [2] Eun J S, Kuraishi S, Sakurai N. Changes in levels of auxin and abscisic acid and the evolution of ethylene in squash hypocotyls after treatment with brassinolide [J]. *Plant Cell Physiol*, 1989, 30: 807-810
- [3] Bao F, Shen J, Brady S R, et al. Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1624-1631
- [4] Zurek D M, Rayle D L, McMorris T C. Investigation of gene expression, growth kinetics, and wall extensibility during brassinosteroid-regulated stem elongation [J]. *Plant Physiol*, 1994, 104: 505-513
- [5] Clouse S D, Daniel M Z, Baker M E. Effect of brassinolide on gene expression in elongating soybean epicotyls [J]. *Plant Physiol*, 1992,

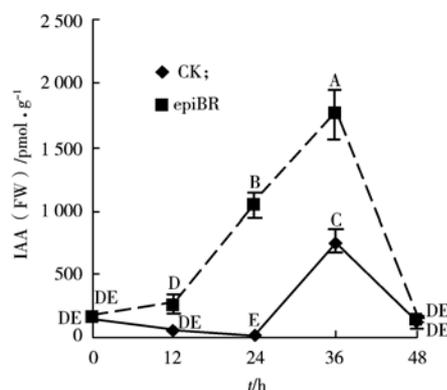


图 6 1 μmol · L<sup>-1</sup> epiBR 处理胚芽鞘对内源 IAA 含量的影响

Fig. 6 Effects of 1 μmol · L<sup>-1</sup> epiBR on IAA content in the coleoptile

- 100: 1377 - 1383
- [6] Sasse J M. Brassinolide-induced elongation and auxin [J]. *Plant Physiol*, 1990, 80: 401 - 408
- [7] Hailliday K J. Plant hormones: the interplay of brassinosteroids and auxin [J]. *Current Biology*, 2004, 14: 1008 - 1010
- [8] Nakamura A, Shimada Y, Goda H, et al. *AXR1* is involved in BR-mediated elongation and *SAUR-AC1* gene expression in *Arabidopsis* [J]. *FEBS Lett*, 2003, 553: 28 - 32
- [9] Goda H, Sawa S, Asami T, et al. Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1555 - 1573
- [10] Yang G X, Matsuoka M, Iwasaki Y, et al. A novel brassinolide-enhanced gene identified by cDNA microarray is involved in the growth of rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 52: 843 - 854
- [11] 吴颂如, 陈婉芬, 周燮. 酶联免疫法 (ELISA) 测定内源植物激素 [J]. *植物生理学通讯*, 1988(5): 53 - 57
- [12] Chen J G, Zhao H Y, Zhou X. Changes in levels of endogenous hormones in *Azalea* from apical dominance [J]. *J Hort Sci*, 1997, 72: 583 - 591
- [13] Vesper M J, Evans M L. Time-dependent changes in the auxin sensitivity of coleoptile segments [J]. *Plant Physiol*, 1978, 61: 204 - 208
- [14] Clouse S D, Hall A F, Langford M, et al. Physiological and molecular effects of brassinosteroids on *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Growth Regul*, 1993, 12: 61 - 66
- [15] Yamamuro C, Ihara Y, Wu X, et al. Loss of function of a rice *brassinosteroid insensitive 1* homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 1591 - 1605
- [16] Nemhauser J L, Mockler T C, Chory J. Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Biology*, 2004, 2: 1460 - 1471
- [17] Kim S K, Chang S C, Lee E J, et al. Involvement of brassinosteroids in the gravitropic response of primary root of maize [J]. *Plant Physiol*, 2000, 123: 997 - 1004
- [18] Chang S C, Kim Y S, Lee J Y, et al. Brassinolide interacts with auxin and ethylene in the root gravitropic response of maize (*Zea mays*) [J]. *Physiol Planta*, 2004, 121: 666 - 673
- [19] Nakamura A, Goda H, Shimada Y, et al. Brassinosteroid selectively regulates *PIN* gene expression in *Arabidopsis* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68: 952 - 954
- [20] Tanaka K, Nakamura Y, Asami T, et al. Physiological roles of brassinosteroids in early growth of *Arabidopsis*: brassinosteroids have a synergistic relationship with gibberellin as well as auxin in light-growth hypocotyls elongation [J]. *Plant Growth Regul*, 2003, 22: 259 - 271

责任编辑: 夏爱红