

Ri T-DNA 转化对黄瓜毛状根内源激素水平的影响

施和平, 李玲, 潘瑞炽

(华南师范大学生物系, 广东 广州 510631)

摘要: 利用酶联免疫法和气相色谱法分别测定发根农杆菌 R1000 转化黄瓜子叶产生的三种毛状根内源 IAA、ABA、iPAs、ZR_s、GA₁+3、GA₄+7 和乙烯含量的变化。结果表明: 内源 IAA、ABA 和 GA₁+3 含量都以 III 型毛状根最高, II 型毛状根次之, I 型毛状根最低; 但 GA₄+7 含量顺序恰好与之相反, III 型毛状根 GA₄+7 含量低至检测不出。黄瓜对照根和毛状根的 GA₁+3 和 iPAs 含量都分别比 GA₄+7 和 ZR_s 高得多, 但毛状根的内源 iPAs 和 ZR_s 含量均高于对照根。发根农杆菌 R1000 菌株转化黄瓜子叶产生的 II 型毛状根和 III 型毛状根产生乙烯的能力比对照根强得多。

关键词: 毛状根; 内源植物激素; 黄瓜; 发根农杆菌

中图分类号: Q946.885

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2000)01-0043-06

EFFECT OF Ri T-DNA TRANSFORMATION ON THE LEVELS OF ENDOGENOUS PHYTOHORMONES IN HAIRY ROOTS OF *CUCUMIS SATIVUS* L.

SHI He-ping, LI Ling, PAN Rui-chi

(Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: The contents of endogenous IAA, ABA, iPAs, ZR_s, GA₁+3, GA₄+7 and ethylene in three phenotypes of cucumber hairy roots transformed by Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* R1000 were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and gas chromatography, respectively. The 3 phenotypes of cucumber hairy roots were described by the authors and published in *Acta Botanica Sinica* 1998, 40(5):470-473. The results showed that the contents of endogenous IAA, ABA and GA₁+3 in hairy roots were highest in phenotype III, and less in descending order in phenotype II and phenotype I, whereas the amount of GA₄+7 was in opposite order, GA₄+7 content in hairy roots of phenotype III was lowest and could not be detected. The contents of iPAs and GA₁+3 in control roots and R1000-transformed hairy roots were much higher than those of ZR_s and GA₄+7, respectively. However, the contents of iPAs and ZR_s in R1000-transformed hairy roots were higher than those in control roots. The ability of ethylene production in R1000-transformed hairy roots was much higher than that in cucumber control roots.

Key words: Hairy root; Endogenous phytohormone; *Cucumis sativus*; *Agrobacterium rhizogenes*

收稿日期: 1999-05-13

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (990451)

发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 的 T-DNA 在植物细胞中整合和表达后, 产生生长迅速、多侧根及具激素自主型生长的毛状根^[1]。从毛状根再生的转化植株通常具有皱叶、节间缩短、无顶端优势等一系列表型特征; 而这种生长习性的异常改变可能与某种内源激素的代谢变化等有关^[2]。目前对发根农杆菌 Ri 质粒的 T-DNA 或 TL-DNA 甚至单个 *rol* 基因导入植物后对某些内源激素水平的影响, 已有一些报道^[3-5], 但尚缺乏 Ri T-DNA 转化对转化毛状根内各种内源激素水平影响的报道。而植物的生长发育和形态建成通常受几种不同类型激素的共同调节。我们的前文曾报道, 发根农杆菌 R1000 感染津研四号黄瓜子叶后得到了三种具不同表型特征的黄瓜毛状根^[6]。本文通过酶联免疫法和气相色谱法测定了三种黄瓜毛状根中各种内源激素含量, 以阐明含 *aux* 基因的 Ri T-DNA 转化对黄瓜毛状根内源激素变化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验应用发根农杆菌 R1000 诱导黄瓜子叶产生的, 并已在无激素的 MS 培养基上继代保存四个半月, 经冠瘿碱(甘露碱和农杆菌碱)检测呈阳性的毛状根^[6]为材料, 将它们分别转接到无外源激素 MS 培养基上 25 °C 暗培养两周后, 取其根段供内源激素测定用。由于黄瓜子叶自然生根率太低, 故以黄瓜种子萌发形成的无菌苗根在无激素培养基上建立的同龄离体根作对照。

1.2 内源生长素, 脱落酸, 细胞分裂素和赤霉素的提取与测定

黄瓜毛状根内源生长素, 脱落酸, 细胞分裂素和赤霉素含量的测定均采用酶联免疫分析方法。所需的 ELISA 试剂盒包括: IAA, ABA, GA1+3, GA4+7, iPAs 和 ZRs, 均购自南京农业大学植物激素研究室。参照试剂盒使用说明书及吴颂如等^[7]的方法提取各样品中的植物激素并测定其含量。不同的是分别取新鲜毛状根和对照根各 1 g 用 80% 甲醇提取激素, 经溶剂萃取纯化定容后, 一部分经甲酯化处理后供 IAA、ABA 和 GA4+7 测定, 另一部分样品直接用于 GA1+3, ZRs 和 iPAs 等测定。实验重复二次, 每样品做三个平行重复取平均值。

1.3 内源乙烯的测量

参照冯启理和潘瑞焯^[8]的方法测定。用上海分析仪器厂生产的 1001 型气相色谱分析仪, 氢火焰离子检测器, Porapak N 柱, 柱长 1 m。以氮气为载体, 压力: 0.75 kg cm⁻², 气流速度: 22 ml min⁻¹。氢气流速: 35 ml min⁻¹, 空气流速: 400 ml min⁻¹; 柱温 100 °C, 检测室温度 100 °C, 进样器温度 50 °C。

2 结果和分析

2.1 黄瓜毛状根内源 IAA 含量的变化

从表 1 可见, 黄瓜对照根中内源 IAA 含量比各类型毛状根低, 培养二周的对照根内源 IAA 含量比培养一周略有下降, 而三种不同表型黄瓜毛状根的内源 IAA 含量随培养时间延长而有不同程度升高, 分别比培养一周时提高 0.44, 1.68 和 2.12 倍, 其中以 III 型毛状根增长幅度最大, 含量最高, 达 2774.84 pmol g⁻¹FW, II 型毛状根次之, I 型毛状根最低。三种黄瓜毛状根在培养过程中内源 IAA 含量不断升高, 这可能与带有 *aux* 合成基因的 Ri T-DNA 在黄瓜细胞中

转化和表达有关。

表1 黄瓜毛状根和对照根的 IAA 含量 ($\times 10^2$ pmol g⁻¹FW)
Table 1 Endogenous IAA contents ($\times 10^2$ pmol g⁻¹ FW) in hairy roots and control roots of *Cucumis sativus* L.

根类型 Root type	继代培养时间 Subculture time (d)	
	7	14
对照根 Control root	4.995 ± 0.208	4.913 ± 0.251
I型根 Roots of phenotype I	5.298 ± 0.816	7.644 ± 0.423
II型根 Roots of phenotype II	5.886 ± 0.353	15.813 ± 0.698
III型根 Roots of phenotype III	8.905 ± 0.110	27.748 ± 0.443

表2 黄瓜毛状根和对照根ABA含量的变化 ($\times 10^5$ pmol g⁻¹FW)
Table 2 Endogenous ABA content ($\times 10^5$ pmol g⁻¹ FW) in hairy roots and control roots of *Cucumis sativus* L.

根类型 Root type	继代培养时间 Subculture time (d)	
	7	14
对照根 Control root	1.834 ± 0.068	1.194 ± 0.077
I型根 Roots of phenotype I	1.292 ± 0.172	1.696 ± 0.129
II型根 Roots of phenotype II	1.453 ± 0.108	3.232 ± 0.257
III型根 Roots of phenotype III	1.540 ± 0.035	4.616 ± 0.441

2.2 黄瓜毛状根内源 ABA 含量的变化

从表2可见, 培养一周的对照根内源 ABA 含量略高于三种黄瓜毛状根, 但培养二周后就明显降低; 相反, 培养二周的 I 型、II 型和 III 型毛状根中内源 ABA 含量明显提高, 分别比对照根提高 0.42, 1.70 和 2.86 倍, 其中以 III 型毛状根的增幅最大, 含量最高, 达 4.616×10^5 pmol g⁻¹FW, II 型毛状根次之, I 型毛状根最低, 与内源 IAA 含量变化趋势一致。

2.3 黄瓜毛状根内源 GA1+3 和 GA4+7 含量的变化

由表3可见, 黄瓜对照根和三种不同表型毛状根中的内源 GA1+3 含量都比 GA4+7 高, 说明 GA1+3 可能是黄瓜根中主要存在的赤霉素。培养二周后对照根内源 GA1+3 和 GA4+7 含量都有所降低; 而在三种表型黄瓜毛状根中却呈现差异。它们的内源 GA1+3 含量都升高, 并以 III 型毛状根增长

表3 黄瓜毛状根和对照根的 GA1+3 和 GA4+7 含量 ($\times 10^2$ pmol g⁻¹FW)
Table 3 Endogenous GA1+3 and GA4+7 contents ($\times 10^2$ pmol g⁻¹ FW) in control roots and hairy roots of *Cucumis sativus* L.

激素 Hormones	根类型 Root types	继代培养时间 Subculture time (d)	
		7	14
GA1+3	对照根 Control roots	28.559 ± 1.376	10.712 ± 2.506
	I型根 Roots of phenotype I	20.125 ± 0.648	25.210 ± 1.808
	II型根 Roots of phenotype II	24.295 ± 0.239	25.668 ± 0.228
	III型根 Roots of phenotype III	24.352 ± 5.392	253.362 ± 20.997
GA4+7	对照根 Control roots	1.771 ± 0.448	1.252 ± 0.388
	I型根 Roots of phenotype I	3.359 ± 0.655	2.164 ± 0.146
	II型根 Roots of phenotype II	1.388 ± 0.555	0.711 ± 0.104
	III型根 Roots of phenotype III	ND*	ND

* ND: Not detectable.

幅度最大, 含量最高。II 型毛状根和 I 型毛状根次之。内源 GA4+7 含量比 GA1+3 低一个数量级以上, 其中 III 型毛状根的内源 GA4+7 含量低至检测不出, II 型毛状根含量低于 I 型毛状根。这可能与 Ri T-DNA 转化影响了 C-13 位上导入羟基的赤霉素 GA4 和 GA7 合成途径有关。

2.4 黄瓜毛状根内源 iPAs 和 ZRs 含量的变化

从表4可见, 黄瓜对照根和毛状根的内源 iPAs 含量比 ZRs 高, 且毛状根的内源 iPAs 含量和 ZRs 含量都比对照根高。培养一周后, 三种毛状根的内源 iPAs 含量分别比对照根提高 0.09, 3.47 和

2.34 倍; 内源 ZRs 含量分别比对照根提高 0.02、0.56 和 0.91 倍(表 4)。可见, 黄瓜毛状根和对照根的细胞分裂素以 iPAs 为主, 发根农杆菌 Ri T-DNA 转化可不同程度地提高黄瓜毛状根的内源 iPAs 和 ZRs 水平。

2.5 黄瓜毛状根内源乙烯生成能力的变化

培养一周和二周的黄瓜毛状根的乙烯释放量均比对照根

高, 其中 II 型毛状根的乙烯释放量比对照根提高 2.73 和 3.53 倍; III 型毛状根的乙烯释放量分别比对照根提高 5.17 和 5.18 倍。但培养 3 d 的 II 型毛状根和 III 型毛状根的乙烯释放量却比对照根(非转化根)低(表 5), 这可能与毛状根存在 2-3 d 生长停滞期有关。联系到表 1 可见, II 型毛状根和 III 型毛状根较高的内源 IAA 含量与其乙烯生成能力成正比。说明 Ri T-DNA 转化既提高黄瓜毛状根的内源 IAA 水平也促进其乙烯的生成。

表 4 黄瓜毛状根和对照根的内源 iPAs 和 ZRs 含量($\times 10^2$ pmol g^{-1} FW)

Table 4 Endogenous iPAs and ZRs contents ($\times 10^2$ pmol g^{-1} FW) in control roots and hairy roots of *Cucumis sativus* L.

激素 Hormones	根类型 Root types	继代培养时间 Subculture time (d)	
		7	14
iPAs	对照根 Control roots	3.866 \pm 0.455	3.434 \pm 0.345
	I 型根 Roots of phenotype I	4.218 \pm 0.212	3.833 \pm 0.524
	II 型根 Roots of phenotype II	17.263 \pm 1.531	16.051 \pm 2.132
	III 型根 Roots of phenotype III	12.905 \pm 0.504	12.347 \pm 1.297
ZRs	对照根 Control roots	0.588 \pm 0.036	0.253 \pm 0.044
	I 型根 Roots of phenotype I	0.599 \pm 0.006	0.633 \pm 0.556
	II 型根 Roots of phenotype II	9.172 \pm 0.050	1.024 \pm 0.058
	III 型根 Roots of phenotype III	1.125 \pm 0.101	1.261 \pm 0.184

表 5 黄瓜对照根和毛状根的乙烯释放速率($\times 10^2$ μ l g^{-1} FW h^{-1})

Table 5 Ethylene release rates ($\times 10^2$ μ l g^{-1} FW h^{-1}) in control roots and hairy roots of *Cucumis sativus* L. during subcultures

根类型 Root type	继代培养时间 Subculture time (d)		
	3	7	14
对照根 Control roots	0.568 \pm 0.363	0.358 \pm 0.061	0.256 \pm 0.023
II 型根 Roots of phenotype II	0.501 \pm 0.090	1.325 \pm 0.189	1.247 \pm 0.150
III 型根 Roots of phenotype III	0.471 \pm 0.052	2.192 \pm 0.206	1.132 \pm 0.429

3 讨论

农杆菌型菌株 15834 和甘露碱型菌株 8196 转化的豌豆(*Pisum sativum* L.) 毛状根内源 IAA 水平测定表明, 除个别 pRi15834 菌株转化毛状根 IAA 含量较高外, 绝大部分毛状根内源 IAA 水平与非转化根之间没有显著差异^[5]。这与我们对黄瓜毛状根内源 IAA 测定结果不完全一致, 我们得到的黄瓜转化毛状根 IAA 含量高, 生长快, 分生侧根多, 但不产生愈伤组织。从冠瘿碱检测结果表明, 含有冠瘿碱合成酶的 TR-DNA 已在黄瓜毛状根中得到表达^[6]。含 *aux* 基因的 T-DNA(TL-DNA+TR-DNA) 或单独 TR-DNA 转化的豌豆毛状根都产生较高水平的 IAA 和 IAM^[9]。同时, *rolABC* 能显著降低含有 TR-DNA 的 Ri T-DNA 转化根中游离 IAA 水平^[10]。我们认为 II 型毛状根和 III 型毛状根中较高水平的内源 IAA 水平可能与 Ri T-DNA 的 TR-DNA 的 *aux* 基因的不同程度整合和表达有关。

在高等植物中, ZT 及其核苷是主要形式的细胞分裂素, 而细菌等低等生物中主要形式是 2-i-P 及其核苷^[11]。向烟草中转入发根农杆菌 Ri T-DNA 的 *rolC* 基因后会影

致 iPAs 含量显著降低^[12]。本实验结果表明, 黄瓜毛状根和对照根中的细胞分裂素以 iPAs 为主, 而 Ri T-DNA 转化能不同程度地提高黄瓜毛状根的内源 iPAs 和 ZRs 水平。利用根癌农杆菌 Ti (tumor inducing) 质粒介导将异戊烯基转移酶基因 (ipt) 转入黄瓜后, 其转化植株中 iPA 含量显著高于 ZT, 而 ZRs 含量低至检测不出^[13], 这与本实验 Ri T-DNA 转化产生的黄瓜毛状根内源细胞分裂素测定的结果不完全一致。这是否表明黄瓜中可能存在阻止 iPA 转化成 ZRs 的某种机制或者说这种差异是否与含有 *aux* 基因的 TR-DNA 的导入有关, 尚待研究。

已知根对生长素最敏感, 极低的浓度就可促进根的生长, 而过量的生长素则促进乙烯的生成^[14]。本文中, 除培养三天外, Ri T-DNA 转化产生的黄瓜 II 型毛状根和 III 型毛状根的乙烯释放量明显高于对照根。Tepfer 等报道, Ri T-DNA 转化产生的烟草转化植株可比对照产生更多乙烯^[2]。³⁵S-*rolC* 转化降低其烟草转化植株花的乙烯释放量, 但其 TL-DNA 的 *rolA* 转化却对转基因烟草花的乙烯释放能力没有影响^[15]。根癌农杆菌 Ti 质粒 *tms* 基因超表达可使矮牵牛 (*Petunia*) 呈现偏上生长 (epinasty)^[16]。而用仅含 *aux* 基因的 TR-DNA 转化所产生的欧白英 (*Solanum dulcamara* L.) 植株总呈现偏上生长^[17]。这种现象通常是由于 IAA 升高和乙烯产生的结果。这表明含有 *aux* 基因的 TR-DNA 转化可能参与诱导乙烯生成。从我们的结果 (表 1 和 5) 来看, 发根农杆菌的 Ri T-DNA 转化既可以提高黄瓜毛状根的内源 IAA 水平, 也可以促进毛状根的乙烯生成。

有关 Ri T-DNA 转化后对转化植株或转化根中 ABA 代谢影响的报道较少。转入发根农杆菌 Ri T-DNA 的 *rolC* 基因的转化烟草植株的内源 ABA 含量明显低于对照^[10]。而 TL-DNA 转化后也降低油菜 (*Brassia napus* L. var. *oleifera* cv Brutor)、甘蓝 (*B. oleracea*) 和烟草转化植株的 ABA 水平^[3,4]。这显然与我们的结果不一致。在本实验中, 培养 14 d 的黄瓜三种毛状根内源游离 ABA 含量都升高, 以 III 型毛状根增幅最大, II 型毛状根次之; 并且毛状根的 ABA 含量比其它任何一种内源激素都高。而不同毛状根中内源游离 ABA 的变化又刚好与它们的内源 IAA 含量一致。结果证实含有 TR-DNA 片段的 Ri T-DNA 转化可增加黄瓜毛状根的内源 IAA 和 ABA 含量; 而毛状根中的 ABA 代谢变化也可能与 TR-DNA 的 *aux* 基因的表达有关。

GA1+3 可能是黄瓜根中主要的赤霉素。而 ABA 通常被视为赤霉素的天然拮抗剂, 二者都是由异戊二烯化合物单位构成, 都是从甲羟戊酸转变而来^[14]。三种黄瓜毛状根内源 GA4+7 含量刚好与它们的 ABA 含量成反比, 因而推测, 毛状根 GA4+7 含量的显著降低, 除可能与 Ri T-DNA 转化影响了 C-13 位点上导入羟基的赤霉素 GA4 和 GA7 合成途径有关外, 也可能说明 ABA 的拮抗作用仅影响了 C-13 位点上导入羟基的赤霉素 GA4 和 GA7 的合成。

综上所述, 发根农杆菌 Ri T-DNA 转化可提高毛状根内源 IAA、iPAs、ZRs 和 GA1+3 水平和乙烯的生成能力, 使毛状根 ABA 含量显著提高, 但抑制某些 GAs 的合成。

参考文献:

- [1] Chilton M D, Tepfer D A, Petit A et al. *Agrobacterium rhizogenes* insert T-DNA into the genomes of the host plant root cells [J]. *Nature*, 1982, 295:432-434.
- [2] Tepfer D. Transformation of several species of high plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype [J]. *Cell*, 1984, 37:959-967.
- [3] Julliard J, Pelese F, Sotta B et al. TL-DNA transformation decreases ABA level [J]. *Physiol Plant*, 1993, 88:654-660.

- [4] Prinsen D, Chriqui D, Vilaine F et al. Endogenous phytohormones in tobacco plants transformed with *Agrobacterium rhizogene* pRiTL-DNA genes [J]. *J Plant Physiol*, 1994, 144:80-85.
- [5] Schaerer S, Pilet P E. Quantification of indole-3-acetic acid in untransformed and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed pea roots using gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Planta*, 1993, 189:55-59.
- [6] 施和平, 李玲, 潘瑞炽. 发根农杆菌对黄瓜的遗传转化 [J]. *植物学报*, 1998, 40(5):470-473.
- [7] 吴颂如, 陈婉芬, 周莹. 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.
- [8] 冯启理, 潘瑞炽. 花生结荚期间生长素、赤霉素和乙烯的变化 [J]. *植物生理学通讯*, 1989, (2):25-28.
- [9] Prinsen E, Bercetche J, Chrigui D et al. *Pisum sativum* epicotyls inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* agropine strains harbouring various T-DNA fragments: Morphology, histology and endogenous indole-3-acetic acid and indole-3-acetamide [J]. *J Plant Physiol*, 1992, 140:75-83.
- [10] Gartland K M A, McInnes E, Hall J F et al. Effect of Ri plasmid *rol* gene expression on the IAA content of transformed roots of *Solanum dulcamara* L. [J]. *Plant Growth Regul*, 1991, 10:235-241.
- [11] 陶国清, 章一安. 细胞分裂素 [A]. 北京市植物生理学会. 植物生理生化进展 [C]. 北京: 科学出版社, 1986, 74-98.
- [12] Nilsson O, Moritz T, Imbault N et al. Hormonal characterization of transgenic tobacco plants expressing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA [J]. *Plant Physiol*, 1993, 102:363-371.
- [13] 董春海, 王善平, 卫志明等. 黄瓜导入异戊烯基转移酶基因后对内源激素的影响 [J]. *植物生理学报*, 1993, 19(2): 149-154.
- [14] 潘瑞炽, 董恩得. 植物生理学 [M]. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 1995, 194-206.
- [15] Martin-Tanguy J, Corbinau F, Burtin D et al. Genetic transformation with a derivative of *rolC* from *Agrobacterium rhizogenes* and treatment with α -aminoisobutyric acid produce similar phenotypes and reduce ethylene production and the accumulation of water-insoluble polyamine-hydroxycinnamic acid conjugates in tobacco flowers [J]. *Plant Sci*, 1993, 93:63-76.
- [16] Klee H J, Horsch R B, Rogers S G. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology [J]. *Annu Rev Plant Physiol*, 1987, 38:467-486.
- [17] McInnes E, Morgan A J, Mulligan B J et al. Phenotypic effects of isolated pRiA4TL-DNA *rol* genes in presence of intact TR-DNA in transgenic plants of *Solanum dulcamara* L. [J]. *J Exp Bot*, 1991, 42(243):1279-1286.