

转双价基因毛白杨组培生根过程中内源激素含量对比研究

贾香楠¹, 辛 蓓¹, 马圣俊¹, 李 伟¹, 陈晓阳^{1,2}

(1. 北京林业大学 林木育种国家工程实验室, 北京 100083; 2. 华南农业大学 林学院, 广东 广州 510642)

摘要:为探讨转 *rolB-pttGA20ox* 双价基因毛白杨生根生理变化, 对转 *rolB-pttGA20ox* 双价基因毛白杨株系 RG-4 和对照株系 PT-16 组培苗生根过程中内源激素含量进行了测定分析。结果表明: RG-4 株系在无激素培养基上 8 d 即可见根突出现, 比对照提前 3 d, 生根率、平均根长及根数均高于对照; 其内源 IAA 含量在不定根形成时增加, 根形成后降低, 且 RG-4 在起始和处于峰值时期的内源 IAA 含量显著高于对照; RG-4 的 GA_3 含量在生根前降低, 生根后升高, 与对照的变化趋势相反; ABA 含量在生根过程中波动变化, 但起始 ABA 含量 RG-4 低于 PT-16; RG-4 的 IAA/ABA 在根突形成前保持较高的水平, 根突形成后降低。

关键词: 转双价基因; 毛白杨; 内源激素

中图分类号: S792.117

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2010)05-0007-03

在植物的生长过程中, 不定根的发生多受内外因素影响, 其中内源激素是诱导不定根发生的主导因素。国内外对内源激素与生根的关系研究较多。生长素(IAA)具有明显的促进不定根和侧根发生和生长的作用。Maldiney 等^[1]认为生根前高浓度的 IAA 是生根所必需的。徐忠志^[2]在研究桃硬枝扦插中发现, 插穗愈伤组织的根原基形成过程中, 内源 IAA 含量下降, 但不定根突出表皮前内源 IAA 含量上升到高峰, 在根突出后其含量又下降。刘关君等^[3]对长白落叶松扦插试验表明, GA_1 的含量增加与插穗不定根的产生呈正相关性。肖关丽等^[4]对甘蔗继代培养绿苗中的内源激素进行测定分析, 认为 GA_1 、 GA_3 与生根率呈显著负相关性, ABA 的作用不能确定。一般认为, ABA 含量与生根呈显著负相关^[5-6], 而蒙海涛^[7]研究表明低浓度的 GA_3 含量和一定浓度的 ABA 含量有利于不定根的形成。陈雪梅^[8]对扦插成活率不同的 3 种杨树研究发现, 皮部 IAA/ABA 和 ZR 含量高, 使潜伏根原基有迅速恢复生长的条件, 能自发生根成活。

毛白杨属扦插难生根树种, 辛蓓^[9]通过农杆

菌介导的叶盘转化方法, 将双价基因 *rolB-pttGA20ox* 转入毛白杨优良无性系 PT-16 基因组中, 对组培苗和盆栽苗的生根能力及生长研究发现转基因植株明显高于对照。通过对转 *rolB-pttGA20ox* 双价基因毛白杨株系 RG-4 和未转基因毛白杨株系 PT-16 生根过程中的内源 IAA、 GA_3 、ZR 和 ABA 含量进行测定分析, 以探讨双价基因对毛白杨生根生理的影响, 为选育易扦插生根的毛白杨新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为转 *rolB-pttGA20ox* 双价基因的毛白杨株系 RG-4 和对照毛白杨株系 PT-16 组培苗, 培养基为 1/2 MS+蔗糖 30.0 g·L⁻¹+琼脂 4.5 g·L⁻¹, pH 5.8, 置(25±2)℃培养, 光照强度 2 200 lx, 光照时间 14 h·d⁻¹。于接种的第 0、5、10、15、20、30 d 分别取样, 每样品取 0.3 g, 液氮速冻保存, 3 次重复。

1.2 方法

采用间接酶联免疫吸附测定法(ELISA)提取并测定各样品的内源 IAA、 GA_3 、ZR 和 ABA 含量。

2 结果与分析

2.1 不同株系的生根效果

将转化株系 RG-4 和对照 PT-16 植株各 30 株接种于不含任何激素的 1/2 MS 培养基上培

收稿日期: 2010-03-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271097)

第一作者简介: 贾香楠(1981-), 女, 内蒙古赤峰市人, 在读博士, 从事林木基因工程研究。E-mail: jiaxiangnan0616@163.com。

通讯作者: 陈晓阳(1958-), 男, 四川省南充市人, 博士, 博士生导师, 从事林木基因工程研究。

养,30 d 后进行观察统计(见表 1)。转化株系的植株在接种后 8 d 时可观察到有不定根出现,培养 30 d 生根率均达到 92.2%,平均根数达到 3.3 个,平均根长 3.2 cm。而对照 PT-16 在接种后的 11 d 时开始有不定根出现,培养 30 d 时的生根率只有 13.5%,平均根数 1.5 个,平均根长 1.7 cm。

表 1 不同株系的生根效果

株系	起始生根时间/d	生根率/%	平均根数/个	平均根长/cm
PT-16	11	13.5	1.5	1.7
RG-4	8	92.2	3.3	3.2

2.2 生根过程中 IAA 含量的变化

PT-16 的 IAA 含量在第 10 天出现峰值,为 $44.05 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$,第 15 天时急速下降,之后缓慢下降。RG-4 的 IAA 含量在第 10 天出现峰值,达到 $52.10 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$,是对照的 1.25 倍;第 15 天时急速下降至 $33.31 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$,在 15~20 d 时有所回升,之后缓慢下降。于雪飞^[10]对中美山杨组培生根研究发现,内源 IAA 水平在生根的早期有一个峰值,峰值高低与生根率高低呈正相关。RG-4 起始和处于峰值时期的 IAA 含量均高于 PT-16,这可能是转化植株生根能力提高的重要原因之一(见图 1)。

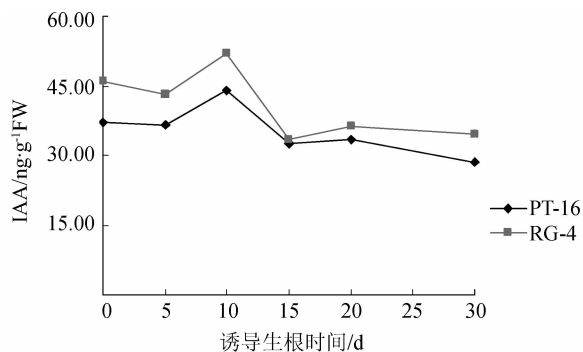


图 1 生根过程中 IAA 含量的变化

2.3 生根过程中 GA₃ 含量的变化

PT-16 的 GA₃ 含量在 0~5 d 缓慢上升,5~15 d 大幅下降至低谷,15~20 d 缓慢回升,之后缓慢下降。RG-4 的 GA₃ 含量在 0~10 d 内与 PT-16 的变化趋势相反,是先下降至低谷,再升至高峰,之后变化平缓。RG-4 的 GA₃ 含量在生根前降低,生根后升高,可能与生根前减弱顶端生长而促进根萌发有关,根突形成后 GA₃ 含量升高,恢复顶端生长和根的伸长。而 PT-16 在生根前

GA₃ 含量高而生根后降低,导致其生根能力降低(见图 2)。

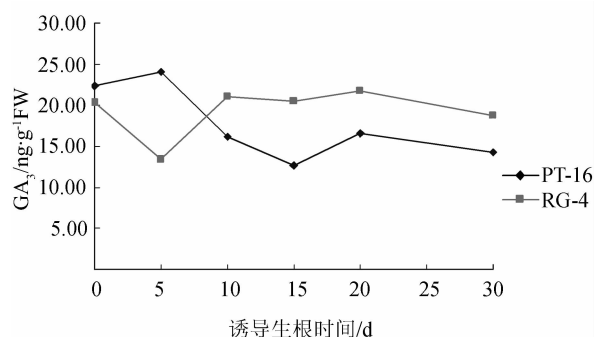


图 2 生根过程中 GA₃ 含量的变化

2.4 生根过程中 ZR 含量的变化

PT-16 的 ZR 含量在 0~20 d 缓慢下降,之后平缓上升。RG-4 在 0~30 d 内呈“降—升—降—升—降”的波动变化趋势,且 RG-4 的起始 ZR 含量低于 PT-16(见图 3)。

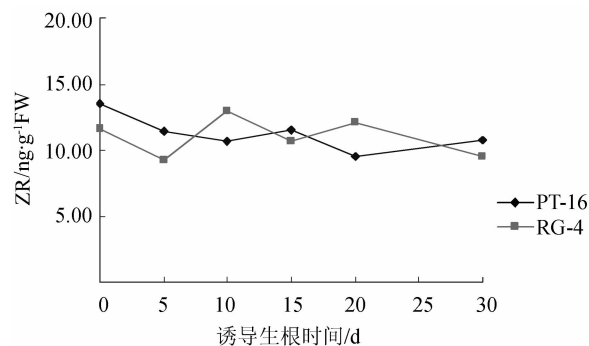


图 3 生根过程中 ZR 含量的变化

2.5 生根过程中 ABA 含量的变化

PT-16 与 RG-4 的 ABA 含量在 0~20 d 的变化趋势相似,20~30 d PT-16 的 ABA 含量仍缓慢上升,RG-4 大幅降低。RG-4 的起始 ABA 含量低于 PT-16(见图 4)。

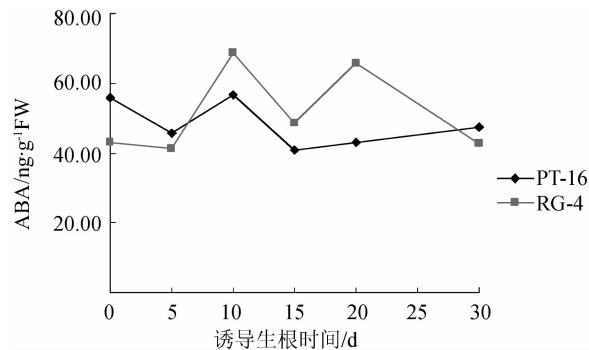


图 4 生根过程中 ABA 含量的变化

2.6 生根过程中 IAA/ABA 的变化

IAA/ABA 高低是生根难易的标准之一。由图 5 可知,PT-16 的 IAA/ABA 在整个生根过程中变化平缓,在 0~5 d 有所升高后缓慢降低,而 RG-4 的 IAA/ABA 在根突形成前保持较高的水平,在第 10 天即根突形成后大幅降低,之后变化缓慢。而郑钧宝^[11]在研究圆柏等 4 个针叶树种的嫩枝扦插时指出,IAA/ABA 高者易生根。转化植株根突形成前较高的 IAA/ABA 可能是其易生根的原因之一。

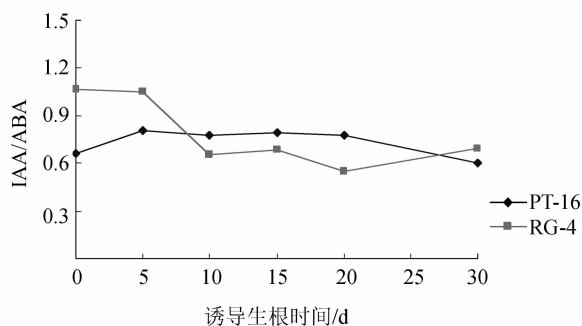


图 5 生根过程中 IAA/ABA 值的变化

3 结论与讨论

转 *rolB-pttGA20ox* 植株在无激素培养基中 8 d 即可见根突出现,生根率、平均根长及根数均高于对照;其内源 IAA 含量在不定根形成时增加,根形成后降低,且转化株系 RG-4 在起始和处于峰值的内源 IAA 含量显著高于对照;RG-4 的 GA_3 含量在生根前降低,生根后升高,与对照的变化趋势相反,因此认为生根前 GA_3 含量降低减弱顶端生长而促进根萌发,根突形成后 GA_3 含量升高,恢复顶端生长和根的伸长;ABA 含量在生根过程中波动变化,但起始 ABA 含量 RG-4 低于 PT-16,这与于雪飞^[10]认为第 0 天 ABA 浓度与生根率呈反比相一致;RG-4 的 IAA/ABA 在根突形成前保持较高的水平,根形成后降低,因此认为根突形成前较高的 IAA/ABA 是生根能力的标志之一。

转 *rolB-pttGA20ox* 植株生根能力提高、内源激素含量发生变化,这与 *rolB* 基因和 *pttGA20ox* 基因的表达密不可分。*rolB* 基因能够促进植物

体内生长素的合成^[12-13],但同时由于 *pttGA20ox* 基因的表达提高了转基因植株体内 GA_{20ox} 的活性含量,从而催化生成了具有生物活性的赤霉素,转基因植株中 GA_3 的含量上升,且 IAA、 GA_3 与各种激素间存在着复杂的调节作用,从而提高植株的生长和生根能力,但具体机制还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] Maldiney R, Pelese F, Pilate G, et al. Endogenous levels of abscisic acid, indole-3-acetic acid, zeatin and zeatin-riboside during the course of adventitious root formation in cuttings of Craigella and Craigella lateral suppressor tomatoes [J]. Pysiol Plant, 1986, 68: 426-430.
- [2] 徐继忠,陈四维.桃硬枝插条的内源激素(ABA, IAA)含量变化对生根的影响[J].园艺学报,1989,16(4):275-278.
- [3] 刘关君,李绪尧,由香玲,等.长白落叶松插穗内源激素变化与不定根产生的关系[J].东北林业大学学报,2000,28(1):19-20.
- [4] 肖美丽,杨清辉,李富生.甘蔗组培苗继代培养中内源激素与绿苗生根率关系研究[J].云南农业大学学报,2001,16(4):271-273.
- [5] 郑钧宝,裴保华,耿桂荣.毛白杨扦插生根的研究[J].东北林业大学学报,1988,16(6):34-40.
- [6] 赵一宇.河北杨插条内源激素的季节性消长与生根的关系[J].林业科学,1987,23(2):208-213.
- [7] 蒙海涛,韩清芳,贾志宽,等.水培紫花苜蓿的茎段生根过程中内源激素含量变化[J].植物生理学通讯,2008,44(3):498-500.
- [8] 陈雪梅,高红兵,王沙生.三种杨树扦插生根期间内源激素水平的比较研究[J].林业科学,1994,30(1):1-7.
- [9] 辛蓓. *rolB-pttGA20ox* 双价基因转化毛白杨及遗传稳定性研究[D].北京:北京林业大学,2009.
- [10] 于雪飞,白卉,王洪星.4种内源激素在中美山杨组培生根过程中的变化[J].林业科技,2009,34(2):5-7.
- [11] 郑钧宝,刘玉军,裴保华,等.木本植物茎插穗生根于内源激素的关系[M]//王沙生,王世绩,裴保华.杨树栽培生理研究.北京:北京农业大学出版社,1991:360-367.
- [12] Estruch J J, Schell J, Spena A. The protein encoded by the *rolB* plant oncogene hydrolyses indole glucosides[J]. Embo J., 1991, 10(1):3125-3128.
- [13] Spena A, Estruch J J, Prinsen E, et al. Anther-specific expression of the *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes* increases IAA content in anthers and alters anther development and whole flower growth[J]. Theor Appl Genet, 1992, 84:520-527.

(下转第 12 页)

易与 DNA 结合形成粘稠的胶状物,既难溶解,又会抑制 Taq 酶活性,从而影响 PCR 反应的质量。因此该试验以亚麻的幼嫩叶片为材料提取 DNA,并且采用 Tiangen 公司生产的 DNA 提取试剂盒,这样既保证了试验质量,又提高了试验效率。

通过优化适宜亚麻 ISSR 的 PCR 体系和程序,利用筛选出的适宜亚麻的 ISSR 引物可以对亚麻种质资源进行分子鉴定,并为亚麻种质资源的亲缘关系提供分子依据。

参考文献:

- [1] Zietkiewicz E, Rafalske A, Iabuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genome, 1994, 20:178-183.
- [2] Fritsch P, Riese L H. The use of random amplified poly-

morphic DNA (RAPD) in conservation genetics[M]//Smith T B, Wayne R K. Molecular Genetic Approaches in Conservation. London: Oxford University Press, 1996:54-73.

- [3] Hedrick P W. Conservation genetics and molecular techniques: A perspective[M]//Smith T B, Wayne R K. Molecular Genetic Approaches in Conservation. London: Oxford University Press, 1996:459-477.
- [4] CHEN Xiang-ming, ZHENG Guo-sheng, MENG Li. RAPD-PCR analysis of genetic diversity of different colour 35 tree paeonia cultivars[J]. Sci Agric Sin, 2002, 35(5): 546-551.
- [5] LI Jin-bo, JIANG Liang-rong, LI Chun-hai, et al. Comparisons of genetic analysis based on ISSR and SSR in PGMS and TGMS rice lines[J]. Molecular Plant Breed, 2003, 1(1): 42-47.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 2002.

Optimization and Primer Screening of the ISSR Reaction System in Flax

JIANG Wei-dong

(Industrial Crops Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: The ISSR reaction conditions of flax were optimized. 13 primers out of 60 were screened out by 3 typical flax varieties which had high level polymorphism and repeatability. This research made the foundation for the molecular identification of flax.

Key words: flax; genome DNA; ISSR reaction; screening

(上接第 9 页)

Comparison Study on the Content of Endogenous Hormones in Transgenic Double Genes of *Populus tomentosa* Carr. during the Rooting Culture

JIA Xiang-nan¹, XIN Bei¹, MA Sheng-jun¹, LI Wei¹, CHEN Xiao-yang^{1,2}

(1. National Engineering Laboratory of Forest Tree Breeding of Beijing Forestry University, Beijing 100083; 2. College of Forestry of South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract: In order to study the rooting and physiological changes of the transgenic *rolB-pttGA20ox* double genes *Populus tomentosa* Carr., the content of endogenous hormones in the controlled strains PT-16 and the transgenic *rolB-pttGA20ox* double genes *Populus tomentosa* Carr. RG-4 were measured. The results showed that in the hormone-free medium, root process of RG-4 formed in 8 days, 3 days earlier than the controlled strains, and the rooting rate, the average length and the number of roots were also higher than those of the controlled strains. The content of endogenous IAA in RG-4 was rising during the formation of adventitious root, but decreasing after the root process, and the content in the beginning and peak time were significantly higher than those of the controlled strains. The content of GA₃ in RG-4 was decreasing before the root formation while increasing after the root formation, which was just opposite to the controlled strains. The content of ABA fluctuated during the root formation, but at the beginning, the content of ABA in RG-4 was lower than that in PT-16. The ratio of IAA and ABA of RG-4 kept a high level before the formation of root process, but decreased after the root process.

Key words: transgenic double genes; *Populus tomentosa* Carr.; endogenous hormones