

## 黄瓜毛状根的诱导及细胞分裂素 6-BA 对其生长和形态的影响 Induction of Cucumber Hairy Roots and Effect of Cytokinin 6-BA on its Growth and Morphology

施和平\*, 齐莹, 张悦, 梁山

SHI He-Ping\*, QI Ying, ZHANG Yue and LIANG Shan

华南师范大学生命科学学院广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631

College of Life Science, Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

**摘 要** 含农杆菌型 Ri 质粒 pRiA4b 的发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) ATCC15834 感染黄瓜子叶外植体 5 d 后产生毛状根, 毛状根可直接从叶片外植体叶脉处产生。感染 10d 后, 约 90% 的子叶外植体产生毛状根。毛状根能在无外源生长调节剂的 MS 固体和液体培养基上自主生长。PCR 扩增结果证实, 发根农杆菌 Ri 质粒的 *rolB* 和 *rolC* 基因已在黄瓜毛状根基因组中整合并得到表达。挑选一无菌黄瓜毛状根系置于含不同浓度 6-BA 的 MS 培养基中悬浮培养来探讨细胞分裂素 6-BA 对黄瓜毛状根生长及其形态变化的影响。结果表明, 细胞分裂素 6-BA 能促进黄瓜毛状根的生长及改变其生长形态。随着培养基中 6-BA 浓度的升高, 黄瓜毛状根变得越来越短而粗, 更少分枝。与对照相比, 培养基中添加 0.1~3.0 mg/L 6-BA 能推迟毛状根最大生长峰的出现, 降低其可溶性蛋白含量、SOD 和 POD 酶活性; 而黄瓜毛状根的乙烯释放高峰比其最大生长峰和 SOD 和 POD 酶活性高峰提前 5 天, 但 6-BA 处理能降低毛状根的内源乙烯释放量。该结果表明细胞分裂素 6-BA 可能通过对乙烯生成和释放的调节来影响黄瓜毛状根的生长和形态并延缓毛状根的衰老。

**关键词** 发根农杆菌, 黄瓜, 毛状根, 6-BA, 乙烯, 过氧化物酶, SOD

**中图分类号** Q813 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2006)03-0514-07

**Abstract** Hairy roots of *Cucumis sativus* L. could be incited directly from the cut edges of 10-day-old cotyledon explants after infection with the strain *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 harboring agropine-type plasmid, pRiA4b for 5 days. It was observed that the percentage of rooting cotyledon explants was more than 90% 10 days after infection. Hairy roots could grow rapidly and highly branched on solid plant growth regulator-free MS medium. The PCR amplification of *rolB* genes and *virC* gene showed that T-DNA of Ri plasmid of *A. rhizogenes* was integrated and expressed into the genome of transformed cucumber hairy roots. A bacterium-free transformed cucumber hairy root line was selected to culture on solid MS medium to examine influence of exogenous cytokinin 6-BA on growth and morphology alteration of cucumber hairy roots. The results showed that cytokinin 6-BA can influence the growth and altered the morphology of hairy roots. With increasing of 6-BA concentrations, Cucumber hairy roots become shorter and thicker and less branched. 6-BA at the concentration of 0.1~3.0 mg/L could delay the appearance of maximum growth peak by 5 days and decreased the content of soluble protein, enhanced the activities of SOD and POD and decreased the levels of endogenous ethylene evolution in cucumber hairy roots. Our results also indicated that cytokinin 6-BA in the medium could influence growth and morphology alternation of cucumber hairy roots and delay its senescence of hairy roots by acting through ethylene.

Received: December 1, 2005; Accepted: February 21, 2006.

This work was supported by the grants from Guangdong Natural Sciences Foundation(No.031510 and No.990451).

\* Corresponding author. Tel: 86-20-85214793; E-mail: shihp@senu.edu.cn

广东省自然科学基金项目(No.031510 和 No.990451)。

**Key words** *Agrobacterium rhizogenes*, *Cucumis sativus* L., Hairy roots, 6-BA, ethylene, peroxidase, SOD

发根农杆菌侵染植物后,通过所含 Ri (root inducing) 质粒的 T-DNA 在植物细胞核基因组中整合并表达,导致毛状根的发生<sup>[1]</sup>。所产生的毛状根不仅可在无外源植物生长调节剂的培养基上自主生长,具备多分枝和缺乏向地性等形态特征及再生成转基因植株,而且具有比亲本植物相同甚至更高的次生物质的产生能力<sup>[2,3]</sup>。然而,一些研究表明,外源加入植物生长物质如 IAA、NAA 或 GA<sub>3</sub> 等都能对毛状根的生长、形态和次生代谢物的合成等产生影响<sup>[4,5]</sup>。细胞分裂素被认为是调控细胞分裂、控制养分代谢、调控基因表达和延缓叶片衰老的激素<sup>[6,7]</sup>。但近期发现,细胞分裂素能明显促进人参毛状根的生长和总皂甙的积累及促进西洋参毛状根中总皂甙的生物合成<sup>[8,9]</sup>;然而,也有相反报道表明,细胞分裂素如激动素(KIN)能明显抑制 *Lobelia inflata* 毛状根生长及次生物质山梗烷醇酮的产生<sup>[10]</sup>。但至今为止,尚缺乏有关细胞分裂素如何影响毛状根的生长、形态发生和次生代谢及其影响的生理机理的正式报道。为此,本文我们利用含农杆菌型 Ri 质粒的发根农杆菌 ATCC15834 对黄瓜子叶的遗传转化,获得能在无激素的培养基上自主生长的毛状根,并研究外源细胞分裂素 6-BA 对黄瓜毛状根生长及其形态的影响及其生理机理,为今后建立黄瓜毛状根植株再生系统,利用发根农杆菌的遗传转化来培育黄瓜新品种奠定相关的实验和技术基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 细菌菌株及其培养

所用菌株发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) ATCC15834 含有质粒 pRiA4b。在感染黄瓜子叶之前,将农杆菌单菌落接种于 YEB 液体培养基中 28 °C 暗振荡培养 30h 后,待用。

### 1.2 无菌苗的获得

将黄瓜“津研四号”种子用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 22min, 无菌水漂洗后,在盛载湿润脱脂棉的三角瓶中暗萌发 48h 后,转移至恒温光照培养箱中,在每天 12 h 光照、光强 2 000 lx、25 °C 下萌发成无菌苗。

### 1.3 毛状根的诱导和培养

将萌发 10d 的黄瓜幼苗子叶切成 0.5 ~ 1cm<sup>2</sup> 的小块并接种在无外源激素的 MS 培养基上预培养 1d,放入用 MS 液体培养基稀释 2 倍的发根农杆菌悬液中浸泡 20min,取出、吸干多余菌液并放回原

培养基上共培养 2d 后,转入 MS + 500mg/L 头孢噻肟钠(cefotaxime)的培养基上,在光强 2 000 lx、每天 14h 光照、28 °C 下诱导毛状根。切下毛状根置于含头孢噻肟钠的 MS 培养基上除菌培养。所获得的无菌毛状根在无外源激素的 MS 培养基上保存和繁殖。

### 1.4 毛状根的 PCR 检测

取能自主生长的无菌毛状根约 500mg,按 Edwards 等<sup>[11]</sup>(1991)的方法提取毛状根基因组 DNA,纯化后用作 PCR 扩增的模板。以黄瓜非转化根的基因组总 DNA 作对照。根据 Fumer 等<sup>[12]</sup>(1986)和 Choi 等<sup>[13]</sup>(2004)发表的序列,设计用于扩增 *rolB*、*rolC* 和 *virC* 的 PCR 引物,其序列如表 1 所示,均由中国科学院上海细胞生物研究所合成。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列  
Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification

Target gene	Primer sequence
<i>rolB</i>	P1: 5'-GCTTTCAGTGGTAGATTT-3'
	P2: 5'-GAAGGTGCAAGCTAUCTCTC-3'
<i>rolC</i>	P1: 5'-CTCCTG ACATCA AACTGGTC-3'
	P2: 5'-TGCTTCGACTTATGGGTACA-3'
<i>VirC</i>	P1: 5'-GGCTCGCCAACCAATTTGGAGAT-3'
	P2: 5'-TTTTGCTCCTCAAGGGAGGTGCC-3'

在 0.2mL 的硅化离心管中加入模板 DNA 50 ng, Taq DNA 聚合酶 2 个单位,PCR 反应总体积为 50 $\mu$ L。*rolB* 和 *rolC* 基因的扩增反应参数为:94 °C 起始热变性 3min,35 个循环,每个循环包括 94 °C 变性 1min,53.5 °C 退火 1min 和 72 °C 延伸反应 1min,最后 72 °C 延伸 10min;而 *virC* 基因的扩增条件为:94 °C 起始热变性 5min,30 个循环,每个循环包括 94 °C 变性 45s,55 °C 退火 45 s 和 72 °C 延伸反应 2min,最后 72 °C 延伸 7min。扩增产物采用 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳和溴乙锭(EtBr)染色进行分析。

### 1.5 6-BA 对黄瓜毛状根生长及其形态的影响

将来源于同一转化克隆的毛状根切成 2 ~ 3cm 的小段,分别接入添加不同浓度 6-BA 的 MS 固体培养基中(30mL/150mL 三角瓶),起始接种量为 0.2 g/瓶(FW),于 25 °C  $\pm$  2 °C 暗培养。培养基中 6-BA 的使用浓度分别为 0、0.1mg/L、0.5mg/L、1.0mg/L、3.0 mg/L 和 5.0mg/L,pH 值 5.8 ~ 6.0。在为期 25d 的培养过程中,每隔 5d 随机抽取各个不同处理毛状根培养物各 3 瓶,用自来水洗去琼脂,吸水纸吸干水分后进行毛状根鲜重测量,并计算毛状根培养物的鲜重

增殖倍数。所收获的新鲜毛状根一部分随即用于内源乙烯释放量的测定;一部分保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中,供毛状根 POD 和 SOD 酶活性测定和可溶性蛋白含量测定用。

### 1.6 黄瓜毛状根培养过程中可溶性蛋白含量、SOD 和 POD 活性及乙烯释放量的测定

毛状根可溶性蛋白含量的测定参照 Bradford (1976 年)的方法<sup>[14]</sup>,用考马斯亮蓝 G-250 进行染色,于岛津 UV-1206 型紫外分光光度仪,595nm 处进行测定。SOD 活性按照 Beauchamp 和 Fridovich (1971)所建立的方法进行测定<sup>[15]</sup>,以抑制氮蓝四唑(NBT)光化还原 50% 为一个酶活力单位,酶活性以  $\text{u/mg}$  蛋白表示。POD 活性按照张志良等<sup>[16]</sup>(2003)的愈创木酚法测定 470nm 下 OD 值的变化,并以  $\Delta OD_{470}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  蛋白表示酶活性的大小。而黄瓜毛状根培养过程中内源乙烯释放量的测定基本按照施和平等<sup>[17]</sup>(2000)的方法,用气相色谱法测定乙烯释放量。测定条件:岛津 GC-9A 气相色谱仪,氢火焰离子检测器, $\phi 1\text{mm}\times 1\text{m}$  Porapak N 不锈钢填充柱;以氮气为载气,流速  $25\text{mL}/\text{min}$ ;氢气流速: $35\text{mL}/\text{min}$ ,空气流速: $400\text{mL}/\text{min}$ ;柱温  $T_c = 80^{\circ}\text{C}$ ,检测器温度  $T_D = 200^{\circ}\text{C}$ ,进样室温度  $T_I = 200^{\circ}\text{C}$ ;进样量: $0.5\text{mL}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄瓜毛状根的诱导和培养

被发根农杆菌 ATCC15834 感染的黄瓜子叶外植体共培养 3~4 d 后,可观察到从子叶形态学下端切口主脉附近产生颗粒状白色或浅绿色的愈伤组织,并逐渐分化产生出密被白色根毛的不定根(图 1A),而在其形态学上端极少产生愈伤组织和生根,10d 后产生毛状根的子叶外植体百分率达 90%,平均每个外植体产生 10 条根。毛状根大多密集簇生,部分向上生长。而未被感染的黄瓜子叶外植体(对照)在无外源激素的 MS + 500mg/L 头孢噻肟钠的培养基上培养 20 d 后,仅极少数能在切口部位生根,但生根迟,生根率低(平均每个外植体仅产生 1 条根),且根纤细,侧根及根毛少,只向下生长。将该不定根切下接入无外源激素 MS 培养基中培养后,其生长十分缓慢,或部分根段呈黄色或局部褐化,继代两代后均逐渐死亡。

将被农杆菌感染的黄瓜子叶外植体上产生的不定根切下,置于无外源激素的添加头孢噻肟钠的 MS 培养基上进行单根除菌培养,每 10 d 继代转接一次,并剔除生长缓慢或死亡的不定根,约 5~6 次转

接后即可获得无菌的毛状根。无菌的毛状根与非转化根相似,能产生具大量短根毛的侧根,但比非转化根略粗,缺乏向地性,并可在无外源激素的 MS 培养基上快速自主生长(图 1B)。同时,我们也观察到,在 MS 培养基上固体培养时,随着培养时间的延长,黄瓜毛状根表面的颜色会由白色逐渐变成浅黄色或浅褐色,培养 20 d 后开始肿胀,进而老化死亡。

### 2.2 黄瓜毛状根的 PCR 检测

*rolB* 和 *rolC* 是发根农杆菌 Ri 质粒 TL-DNA(T-DNA 左臂)上的 2 个生根基因。而 *virC* 是 Ri 质粒中参与 T-DNA 转化过程但本身并不整合进植物基因组中的毒性基因之一。以 *rolB*、*rolC* 和 *virC* 的引物分别从黄瓜对照根、毛状根基因组 DNA 及发根农杆菌单菌落扩增产物的电泳结果如图 2。从图 2 可见,我们利用 *rolB* 和 *rolC* 的 PCR 引物能从黄瓜毛状根的总 DNA 及发根农杆菌 ATCC15834 单菌落克隆中分别扩增到期望的 540bp 和 770bp 左右的特异性 DNA 片段,而从黄瓜非转化根的总 DNA 中扩增不到任何片段(图 2);而以 *virC* 引物仅能从发根农杆菌菌落中扩增出约 650bp 条带,而不能从黄瓜毛状根和非转化根基因组 DNA 中扩增出任何片段。这说明,发根农杆菌的含 *rol* 基因的 RiT-DNA 部分已在黄瓜毛状根基因组中整合并得到表达。

### 2.3 6-BA 对黄瓜毛状根生长及其形态的影响

黄瓜毛状根在含不同浓度 6-BA 的 MS 固体培养基培养 15d 的生长情况如图 1B、C、D、E 和 F。与对照(无外源生长调节剂的 MS 培养基上培养的毛状根)相比,0.1mg/L 6-BA 培养的毛状根的形态没有较大改变,只是主根略显加粗(图 1C);而用 0.5 mg/L 6-BA 培养的毛状根,其主根开始增粗和变短,侧根数量略减少;而添加 1.0mg/L 6-BA 培养的毛状根,其主根明显变短加粗,而侧根也变短且数量减少;添加 3.0mg/L 6-BA 处理的毛状根的主根更进一步加粗,且几乎不再产生侧根;当用 5.0mg/L 6-BA 培养毛状根时,毛状根的伸长生长严重受抑,根更粗更短,直径可达 0.6cm,并可观察到在培养基中的毛状根的表层被白色粉状疏松的愈伤组织,而内层光滑透明,似玻璃管状;而在固体培养基表面的毛状根根段则形成浅黄色疏松的愈伤组织。可见,随着培养基中 6-BA 浓度升高,黄瓜毛状根变得越来越粗短,侧根逐渐减少;其中当 6-BA 浓度达到 5.0mg/L 时,黄瓜毛状根根段会形成浅黄色愈伤组织。

图 3A 为 6-BA 浓度对黄瓜毛状根生长的影响。从图 3A 可见,对照毛状根经过 5d 的生长迟滞期后

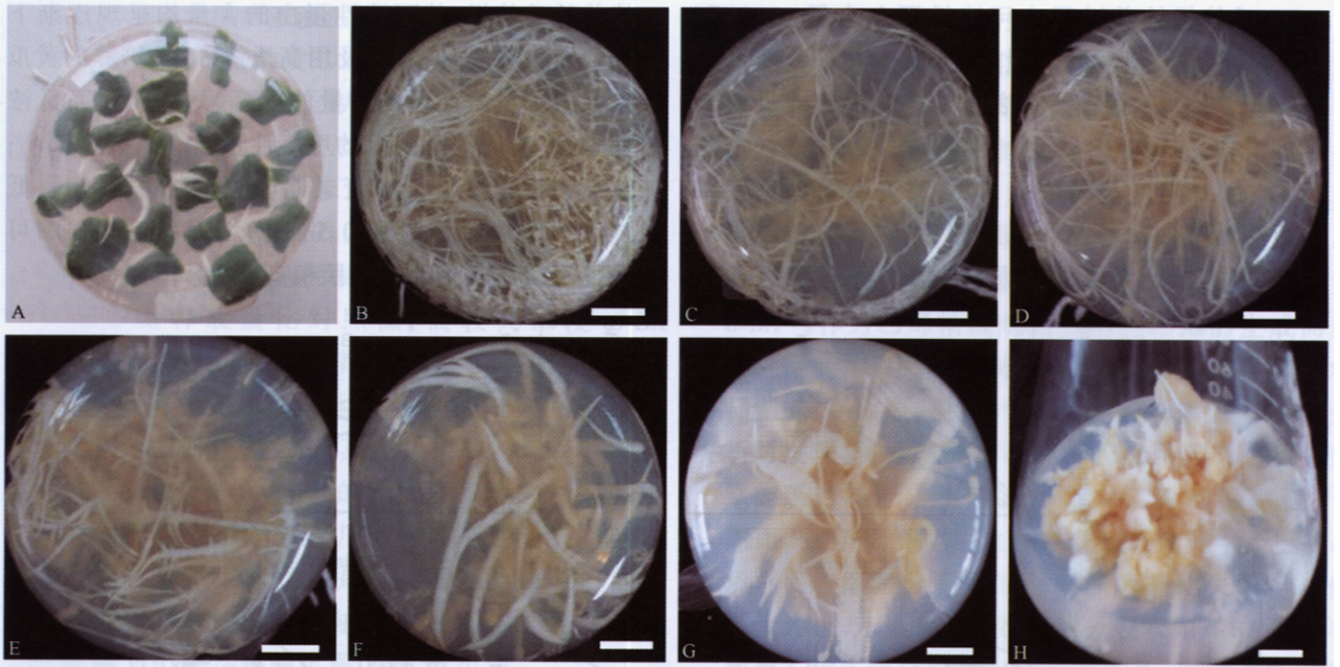


图1 黄瓜毛状根诱导及 6-BA 浓度对其毛状根生长形态的影响

Fig. 1 Induction of cucumber hairy roots and effects of 6-BA concentrations of the medium on its growth and morphology.

A: hairy roots induced from cucumber cotyledon explants after infected with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 for 5 days. B ~ H: cucumber hairy root fragments were transferred to medium containing a range of concentrations of 6-BA and photographed after 15 days. B: hormone-free MS medium; C: MS + 6-BA 0.1 mg/mL; D: MS + 6-BA 0.5mg/mL; E: MS + 6-BA 1.0mg/mL; F: MS + 6-BA 3.0mg/mL; G and H: MS + 6-BA 5.0mg/mL, bar = 1.8cm.

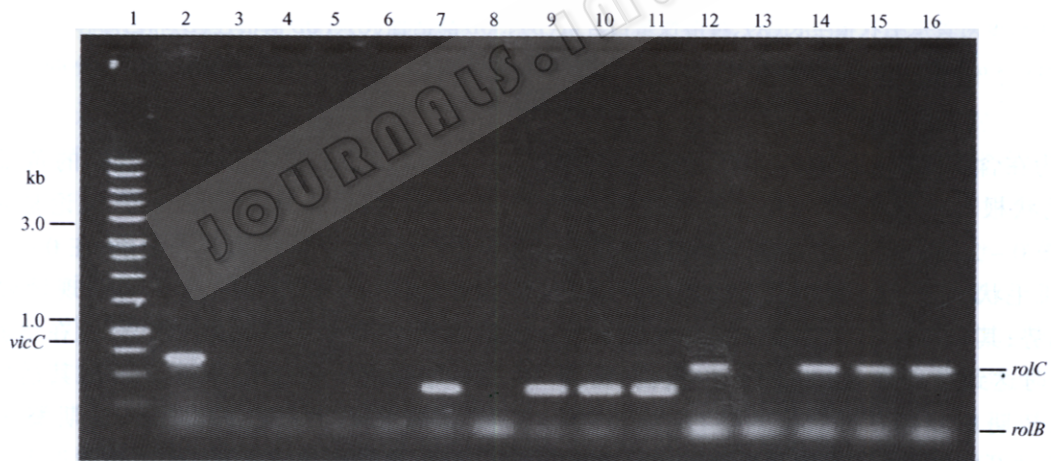


图2 黄瓜毛状根 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products from cucumber hairy roots

1: marker, 100bp DNA ladder; 2 ~ 6: fragments amplified with *virC* primers; 7 ~ 11: fragments with *rolB* primers; 12 ~ 16: fragments with *rolC* primers; 2, 7, 12: fragments from colony of *A. rhizogenes* ATCC15834; 3, 8, 13: fragments from control roots; 4 ~ 6, 9 ~ 11; 14 ~ 16: fragments from cucumber hairy roots.

开始进入快速生长期,至培养 15 d 时其鲜重增值倍数达到最大,约增殖 14 倍,之后毛状根的生长速率不断下降并逐渐变褐和衰老。而不同浓度 6-BA 培养的黄瓜毛状根则均不呈现明显的生长迟滞期,直至培养 20 d 时其鲜重增值倍数才达到最大,但培养 20 d 后生长速率开始下降。在供试的 6-BA 浓度中,除 0.1 mg/L 6-BA 外,其余浓度的 6-BA (0.5 ~ 3.0

mg/L) 均能促进毛状根的生长;并且发现,无论是低浓度还是高浓度的 6-BA 均可使毛状根的最大生长时期推延 5d 出现。由于毛状根达到最大生长期后,其生长速率也逐渐减慢,颜色也由白色逐渐变为浅黄色或开始肿胀,老化变褐;可见在培养基中加入不同浓度的细胞分裂素 6-BA 不仅可促进黄瓜毛状根生长和形态改变,而且还可明显延缓其衰老进程。

## 2.4 毛状根培养过程中可溶性蛋白含量、SOD 和 POD 酶活性及乙烯释放量的变化

图 3B 为黄瓜毛状根培养过程中可溶性蛋白含量的变化。从图 3B 可见,在毛状根培养初期(培养后 5~15 d 内),不同浓度 6-BA 培养的黄瓜毛状根中可溶性蛋白的含量均比对照毛状根低;但随着培养时间的延长,无论是对照还是添加不同浓度 6-BA

培养的毛状根,其可溶性蛋白的含量均呈现逐渐下降的变化趋势,但对照及用高浓度 6-BA 培养的黄瓜毛状根中可溶性蛋白含量的下降幅度较大;而低浓度 6-BA 培养的毛状根的可溶性蛋白降低幅度较小;甚至在毛状根生长的衰老期(培养后 20~25d),低浓度 6-BA(0.1mg/L 和 0.5mg/L)培养的毛状根的可溶性蛋白的含量还比对照稍高。

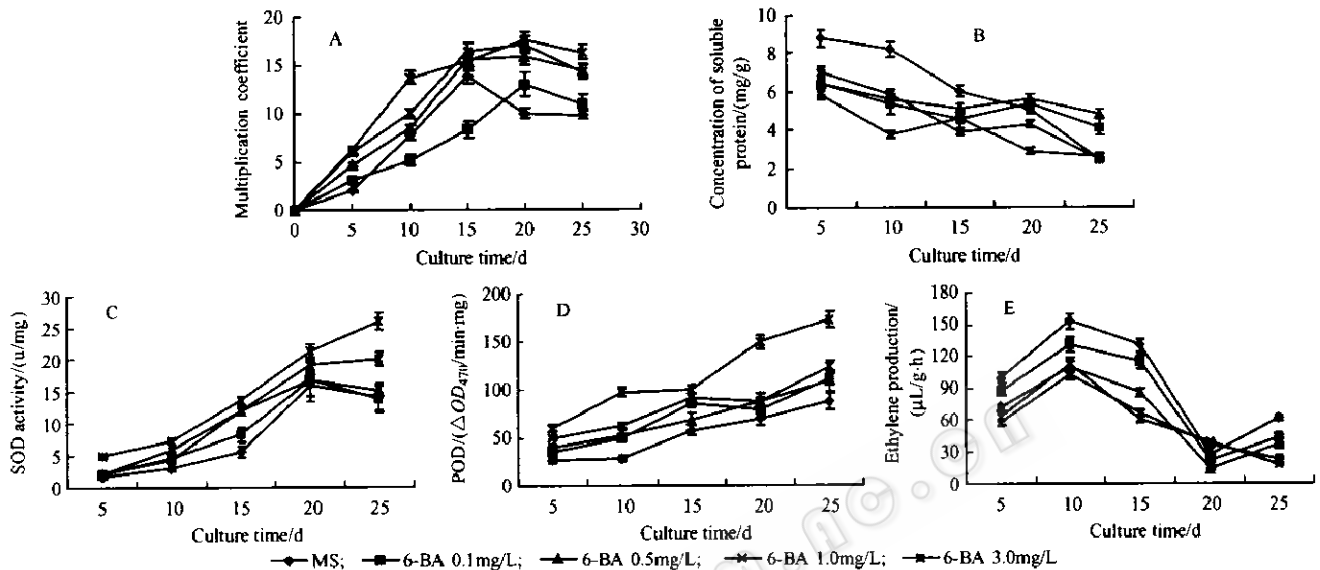


图 3 6-BA 浓度对黄瓜毛状根生长(A)、可溶性蛋白含量(B)、SOD 酶活性(C)、POD 酶活性(D)和乙烯释放量(E)的影响  
Fig. 3 Effects of 6-BA concentrations in the medium on the growth (A), the content of soluble protein(B), activities of SOD(C) and POD(D) and the level of ethylene evolution of cucumber hairy roots

图 3C 为在含不同浓度 6-BA 的 MS 培养基中培养的黄瓜毛状根 SOD 酶活性的变化。从图 3C 可见,在毛状根 0~25d 的培养过程中,随着培养时间的延长,黄瓜毛状根的 SOD 酶活性呈现先上升后下降的变化趋势;其中对照黄瓜毛状根的 SOD 酶活性在培养 20d 时达到最高峰,达 15.88u/mg 蛋白,约为毛状根生长初期 SOD 酶活性的 8.8 倍,但培养 20d 后其 SOD 活性开始下降,且其变化趋势与其生长曲线变化一致,但 SOD 活性高峰比生长曲线高峰推后 5d 出现。与对照相比,低浓度 6-BA(0.1mg/L 和 0.5mg/L)培养的黄瓜毛状根的 SOD 活性变化趋势与对照相似,但其 SOD 酶活性均比对照略高;而高浓度 6-BA(1.0mg/L 和 3.0mg/L)培养的毛状根的 SOD 酶活性也比对照高,但其 SOD 酶活性高峰出现却较对照和低浓度 6-BA 培养的毛状根推迟,可能在培养 25d 后才达到最高峰。在供试的不同 6-BA 浓度中,6-BA 培养的黄瓜毛状根的 SOD 活性均比对照高,且随着 6-BA 浓度升高而逐渐升高,其中尤以 6-BA3.0mg/L 培养的黄瓜毛状根中 SOD 活性变化尤为显著,其最高的 SOD 酶活性高达 25.91u/mg 蛋白。

图 3D 为不同浓度 6-BA 培养的黄瓜毛状根中 POD 酶活性的变化。结果表明,无论是对照还是不同浓度 6-BA 培养的黄瓜毛状根,在 0~25 d 的培养过程中,其 POD 酶活性变化均呈现缓慢上升的趋势。其中,对照毛状根的 POD 活性在培养初期(5~10d 内)几乎没有变化,培养 10d 后其活性才逐渐升高,25 d 后的酶活性约为生长初期酶活性的 3.36 倍。而用不同浓度 6-BA 培养的黄瓜毛状根的 POD 酶活性的变化趋势与对照一致,但其 POD 活性都明显比对照高。其中,尤以 6-BA3.0mg/L 培养的黄瓜毛状根最为明显,培养 25 d 时其 POD 活性约为对照的 2 倍。虽然未测定培养 25d 后黄瓜毛状根 POD 活性的变化情况,但结合前面毛状根的生长曲线和 SOD 活性的变化情况,可以推测毛状根 POD 活性高峰的出现会比 SOD 活性高峰的出现稍迟,即可能在 25~30d 之间出现。这可能因为 POD 是植物体内降低活性氧伤害的另一种酶促细胞防御系统酶,能把 SOD 产生的  $H_2O_2$  变成  $H_2O$  和  $O_2$ ,与 SOD 有协调一致的作用,使活性氧维持在较低水平上。而 SOD 使  $O_2^-$  转化为  $H_2O_2$ ,为了清除  $H_2O_2$ ,植物细胞内的

POD 酶系统才随后被激活。

图 3E 为不同浓度 6-BA 培养的黄瓜毛状根中内源乙烯释放量的变化。从图 3E 可见,在离体培养过程中,对照毛状根的乙烯释放量在培养至第 10 天时达到最大值,随后逐渐下降,至培养 20d 时降到最低,之后又开始小幅回升。而低浓度 6-BA (0.1mg/L 和 0.5mg/L) 培养的毛状根的变化趋势与对照相似,但其乙烯释放量比对照低;而较高浓度 6-BA (1.0mg/L 和 3.0mg/L) 培养的黄瓜毛状根的乙烯释放量在培养至第 10d 时达到高峰后一直下降,也不再出现小幅回升现象,且其毛状根的乙烯释放量比对照和低浓度 6-BA 培养的毛状根都低。这表明,细胞分裂素 6-BA 能降低黄瓜毛状根的乙烯产生能力。从我们的结果发现,无论是对照还是 6-BA 培养的毛状根,其乙烯的生成峰均在其生长曲线最高峰及 SOD 和 POD 酶活性峰出现之前 5d 出现。

### 3 讨论

有关细胞分裂素对毛状根的生长和次生代谢的影响已有报道<sup>[8-10]</sup>,但至今为止未见有关细胞分裂素对毛状根生长形态影响及其生理机理研究有关的正式报道。一些研究结果表明,细胞分裂素能延缓细胞中蛋白质和核酸的降解,从而在延缓植物细胞和器官的衰老过程中起着重要的作用<sup>[18,19]</sup>。如沈法富等(2003)发现,外施细胞分裂素 6-BA 能够有效阻止棉花叶片内可溶性蛋白含量的迅速下降,提高 SOD 酶活性并延缓棉花幼苗的衰老<sup>[20]</sup>。而在本实验中,与对照毛状根相比,不同浓度的 6-BA 能影响毛状根生长,并导致黄瓜毛状根逐渐增粗变短,侧根逐渐减少;同时提高黄瓜毛状根的 SOD 和 POD 酶活性水平,并且其 SOD 和 POD 酶活性水平随着 6-BA 浓度的升高而逐渐升高,并使毛状根的最大生长峰推迟出现。这可能表明,外源 6-BA 可能通过提高毛状根细胞的 SOD 和 POD 酶活性水平来促进黄瓜毛状根的生长及延缓其衰老进程。

植物的生长发育和形态建成往往受不同类型的激素进行相互调节。对植物或其器官衰老过程的一些研究表明,与乙烯和 ABA 的作用效果相反,细胞分裂素可以抑制或促进乙烯的生物合成,从而延缓乙烯引起的植物器官衰老进程<sup>[21]</sup>,如低浓度的细胞分裂素 BAP (0.5 ~ 10 $\mu$ mol/L) 能提高黄化拟南芥幼苗的乙烯合成能力至能引起“三重反应”的水平<sup>[22]</sup>;而外加细胞分裂素能通过降低乙烯的生物合成和对乙烯的敏感性来延迟石竹切花的衰老<sup>[23,24]</sup>;除此之

外,有不少的研究表明,细胞分裂素对植物生长发育的影响也与乙烯的作用密切相关或通过乙烯的作用来实现<sup>[25,26]</sup>。如 Cary 等(1995)证实,细胞分裂素可通过增高乙烯水平来抑制拟南芥下胚轴的伸长生长<sup>[25]</sup>;或通过乙烯起作用使在红光下生长的拟南芥幼苗恢复向地性<sup>[26]</sup>。此外,乙烯还能促进拟南芥乙烯不敏感的突变体 *eti-5* 的叶片衰老,而细胞分裂素 6-BA 可作为乙烯拮抗剂通过拮抗乙烯的生成而延缓该突变体叶片的衰老进程<sup>[27]</sup>。而对转含根癌农杆菌 *ipt* 基因所获得的转 PSAG12-*ipt* 矮牵牛植株分析时发现,转基因植株花冠中较高水平的细胞分裂素能延迟花冠的衰老及降低对乙烯的敏感性<sup>[28]</sup>。然而,也有报道表明,在牵牛花衰老过程中产生的乙烯可促进细胞分裂素的降解和糖基化失活<sup>[29]</sup>。但至今为止,未见有关外源细胞分裂素如 6-BA 等对毛状根乙烯生物合成影响的正式报道。而在我们的实验中,与对照比较,各浓度 6-BA 处理都不同程度地降低黄瓜毛状根中的乙烯释放量,但无论是对照还是用不同浓度 6-BA 培养的黄瓜毛状根,接种培养后其毛状根中的乙烯含量均逐渐增加,而且其乙烯的释放高峰均在其 POD 酶活性及 SOD 酶活性以及其最大生长峰之前出现。因而不难推测,外源细胞分裂素 6-BA 对黄瓜毛状根生长形态变化的影响及其衰老进程的推迟可能与其通过对乙烯生物合成的调节有关或者说是通过乙烯对毛状根发挥调节作用的结果。但有关外源细胞分裂素对黄瓜毛状根生长及其形态变化和衰老进程影响的分子机理及其与乙烯调节之间的相互作用尚待进一步研究。

黄瓜是一种重要的鲜食和加工蔬菜,但具有严重的有性不亲和杂交障碍,用常规育种方法很难将抗病、抗虫等优良性状从别的物种导入其中<sup>[30]</sup>。而有关黄瓜毛状根的诱导虽已有报道<sup>[31]</sup>,但获得转化植株的研究较少。我们的结果也为今后利用发根农杆菌的遗传转化来改良黄瓜品种以及建立黄瓜毛状根的转化再生系统奠定了相关的实验基础和提供了可能性。

**致谢** 本研究工作得到了广东省自然科学基金委资助(项目批准号分别为:031510 和 990451);德国马丁·路德大学 Peter Lindemann 博士馈赠发根农杆菌菌种 ATCC15834;华南师范大学分析测试中心袁敏指导毛状根乙烯的气相色谱法测定,在此一并致谢。