

落叶松扦插生根过程 SSH 文库构建及 部分基因的表达分析*

冯 健^{1,2} 齐力旺¹ 孙晓梅¹ 张守攻¹

(1. 中国林业科学研究院林业研究所细胞生物学实验室 北京 100091; 2. 辽宁省林业科学研究院 沈阳 110032)

摘 要: 为研究落叶松在扦插生根过程中基因的表达情况,以落叶松扦插生根率存在显著差异的 2 个全同胞无性系为材料构建差异表达 cDNA 文库,获得正、反 2 个消减文库。随机挑取正库和反库各 500 个克隆进行测序。将测序结果整理后,正库得到 272 个 UniEST,反库得到 249 个 UniEST。经生物信息学分析表明,这些 UniEST 分别属于新陈代谢、信号途径、物质运输、抗性相关、生长发育等类别基因,这些基因可能在扦插生根过程中具有重要作用。选择部分有代表性的基因,运用半定量 PCR 技术对这些基因在落叶松不同器官、不同扦插阶段的表达情况及对 IBA 的响应进行检测。检测结果表明激素在落叶松扦插生根过程中发挥重要作用,除激素类基因外,小 G 蛋白、ABC 转运蛋白类、因伤诱导物质等相关基因也参与落叶松扦插生根的过程。

关键词: 落叶松; SSH 文库; 扦插; 生长素

中图分类号: S718.46 文献标识码: A 文章编号: 1001-7488(2010)06-0027-08

Construction of Suppression Subtractive Hybridization Library and Expression Pattern of a Few Genes Involved in Rooting of *Larix* Cuttings

Feng Jian^{1,2} Qi Liwang¹ Sun Xiaomei¹ Zhang Shougong¹

(1. Group of Trees Cell Biology, Research Institute of Forestry, CAF Beijing 100091; 2. Liaoning Academy of Forestry Shenyang 110032)

Abstract: In order to investigate the expression pattern of genes during rooting of *Larix* cuttings, two differentially expressed cDNA libraries were constructed by using two *Larix* clones whose rates of rooting are significantly different. Each 500 clones, stochastically selected from positive and negative library, were sequenced. After sequencing and assembling, we obtained 521 UniEST (272 from positive library and 249 from negative library). The UniEST included the genes related to metabolism, signal pathway, transport, resistance, development and cell structure. The result suggested that these genes might have the function during rooting of *Larix* cuttings. The representational genes were selected and further detected by using semi-quantitative RT-PCR to understand their expression patterns in roots, stems, leaves and at different stages of rooting of *Larix* cuttings. The result indicated that hormones played pivotal roles in rooting of *Larix* cuttings. Besides genes related to hormones, small G protein genes, ATP binding cassette transporters genes and WRCs genes were all involved in the rooting procedure.

Key words: *Larix*; SSH library; cutting; auxin

落叶松 (*Larix*) 是我国北方地区主要造林树种。扦插繁殖是落叶松今后实现无性系化的主要方式。但是,落叶松是难生根树种,其生根能力差成为其无性系化的瓶颈(杨书文等,1994)。为解决此问题,很多学者从解剖学和生理学角度分析落叶松扦插生根的过程,并提出解决办法(敖红等,2002;杜继煜等,2004;黄卓烈等,2002;刘桂丰等,1992)。这些办法在一定程度上提高了落叶松扦插生根率,但是并未探明落叶松扦插生根的机制,使得生产上带有

一定的盲目性。为了解落叶松扦插生根过程中基因表达谱,探明落叶松扦插生根机制,解决落叶松扦插生根率低的问题,本文利用抑制消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术,分别以扦插生根率存在显著差异的 2 个落叶松全同胞无性系为试验材料,构建落叶松消减文库,并对部分重要的差异表达基因进行表达分析。获得这些基因及其表达模式可为落叶松提高扦插生根率及遗传改良提供理论支持和基因资源。

收稿日期: 2009-06-29; 修回日期: 2009-09-29。

基金项目: “863”计划“高产优质多抗林木花草分子与细胞高效育种技术及品种创制”(2006AA100109)和国家转基因与产业化专项“优质、杂种落叶松抗旱基因工程育种研究”(J2002-B-005)。

* 张守攻为通讯作者。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为杂种落叶松 (*Larix leptolepis* × *L. olgensis*) (日永 85 × 长 4C) 31-6 和 15-4 两个全同胞无性系,其中无性系 31-6 的生根率 >90%,无性系 15-4 的生根率 <20%。均取自辽宁大孤家国营林场,取样时间为 2006—2007 年。插穗经 IBA 处理后进行扦插试验。取材分 3 个时期,分别为插穗茎段、插穗形成愈伤组织且有根原基形成、不定根生长初期,其中插穗茎段分 IBA 处理前和处理后,处理的方法为 2×10^{-4} mol·L⁻¹ IBA 处理 30 min,6 h 后取材。上述材料为建库和半定量 PCR 部分材料。另外取 1 个 14-12 全同胞无性系(日永 85 × 长 4C)(其生根率为 45% ~ 55%)根、茎、叶作为半定量 PCR 材料使用。取材后迅速液氮冷冻,带回实验室后 -70 °C 保存。

1.2 方法

1.2.1 落叶松 mRNA 分离 总 RNA 提取参照 Scott Jr 等 (1998) 的方法; mRNA 分离纯化采用 Qiagen mRNA 分离试剂盒提供的方法。

1.2.2 cDNA 消减文库构建 获得足量 mRNA 后,按照 Clontech PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit 操作手册获得 cDNA 片段。获得的 cDNA 片段与 T-easy 载体连接;然后转化大肠杆菌菌株 DH5 α ,构建落叶松 cDNA 消减文库。正库构建以无性系 31-6 插穗茎段经 IBA 处理前和处理后、插穗形成愈伤组织且有根原基形成、不定根生长初期 4 个时期的总

RNA 等量混合后反转录成 cDNA 为 Tester;以无性系 15-4 插穗茎段经 IBA 处理前和处理后、插穗形成愈伤组织且有根原基形成、不定根生长初期 4 个时期的总 RNA 等量混合后反转录成 cDNA 为 Driver;反库构建所用 Tester 和 Driver 为正库构建所用的 Tester 和 Driver 互换。

细菌培养参考《分子克隆实验指南》(萨姆布鲁克,2002)的方法进行。随机挑取 1 000 个克隆,委托上海生工生物工程技术有限公司进行 3' 端单向序列测定。

1.2.3 生物信息学分析 采用 NCBI 的 BLAST 软件对所测序列与 GenBank 中的非冗余数据库 (non-redundant database, NR)、dbEST 库比对。

1.2.4 半定量 PCR 分析 选择 9 个差异表达基因,设计特异性引物,落叶松 β -actin 作为内参照物(表 1)。以落叶松根、茎、叶、插穗茎段经 IBA 处理前和处理后、插穗形成愈伤组织且有根原基形成的插穗基部、不定根生长初期为试验材料,取等量的总 RNA 为模板合成第 1 链 cDNA,进行 RT-PCR 分析。反应体系为:模板 1 μ L, dNTP 0.4 μ L, 10 × PCR 反应缓冲液 2 μ L, 上游基因特异引物 0.4 μ L, 下游基因特异引物 0.4 μ L, 酶 0.2 μ L, PCR 级无菌水 15.6 μ L, 合计 20 μ L。反应循环参数为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 18 ~ 35 个循环(不同的基因,循环数不同,但每个基因在所有参样品中的循环数是固定的); 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。所有的 PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,每个基因至少重复 3 次。

表 1 半定量 RT-PCR 上下游引物

Tab. 1 Primer sequences used in semi-quantitative RT-PCR

cDNA	上游引物 Upstream Primers	下游引物 Downstream Primers	片段大小 Size/bp
IAAOL1	5'-CAAATGATGAGGGTATGGAAA-3'	5'-CTCACTCAAACCATCCCTTCCT-3'	204
IAAOL2	5'-GTCCTGGGCTTCTATGTC-3'	5'-CCATCGTCTGTAGGCTTTGA-3'	218
NACOL	5'-CGAAACAAGATGGCACAAGACT-3'	5'-GCTCCCTTCCTTCTCTTCTC-3'	182
GA200L	5'-CTCCTCTCTCCAAGACCAAGT-3'	5'-GAACCTGCCGTTGCTCAGATAA-3'	140
RGAOL	5'-CACAGAGGCATCTCACTACTATT-3'	5'-CTTCCCAGCAGAGAATAGGCTG-3'	275
ARFOL	5'-GAGACCGTGTATGAGGCT-3'	5'-GCCATGGTTGTCACTCATT-3'	346
RACOL	5'-ACATTATTGCTGCGGCTGC-3'	5'-TCCTTCTGCTTTGGTGGTTG-3'	240
ABCOL	5'-CGCTTTTGATGATGGTGAGC-3'	5'-ATAGCAACGGCTGTGTCCAT-3'	328
Peroxidase gene	5'-TTCTCCAACCTTTCCAACCTC-3'	5'-ACACAGTAACTTGACCACCT-3'	278
β -actin	5'-TGCTCCAGAAGAACACCCTA-3'	5'-GGAAGTGGTCTTGCTGTCT-3'	415

2 结果与分析

2.1 落叶松 cDNA 消减文库构建

经过总 RNA 和 mRNA 质量、接头连接效率、消减效率、阳性率检测表明,各项指标均符合试

验要求。获得的 EST 大小在 500 bp 左右,消减效率明显,阳性率达到 85% 以上。上述结果表明,以落叶松扦插生根率存在显著差异的 2 个全同胞优良无性系为材料成功构建了 cDNA 消减文库。

2.2 落叶松 cDNA 消减文库 EST 功能分类

在构建的正、反 2 个 cDNA 消减文库中,随机挑取各 500 个克隆进行单序列测定。对测序结果进行整理后,正库得到 272 个 UniEST,反库得到 249 个 UniEST。将以上获得的 521 条序列和 NCBI 的 NR 库、dbEST 库进行序列比对,正库中有 161 条序列,反库中有 182 条序列与数据库中的序列具有同源性(分值 ≥ 80 ,相似性 $\geq 78\%$,同源序列长 100 bp 以上)。所获得的 521 条序列分别属于不同的类别,具体统计情况如表 2 所示。

分类结果(表 2)显示,在正库所获得的 272 个 UniEST 中,有同源性的序列中,以信号途径占的比例最大,达到 15.07%,其次是生长发育和抗性相关,分别达到 10.66% 和 9.93%;无同源序列的 UniEST 占 39.70%,加上功能尚未确定的序列,占到所获得 UniEST 的 47.70%。在反库所获得的 249 个 UniEST 中,有同源性的序列中,新陈代谢类序列占的比例最大,达到 26.51%,其次是信号途径、抗性相关、生长发育类序列;无同源序列的 UniEST 占 28.11%,加上功能尚未确定的序列,占到所获得 UniEST 的 38.15%。

表 2 落叶松扦插生根过程差异表达 cDNA 文库所获得的 UniEST 分类

Tab. 2 The sort of UniEST obtained from the differentially expressed cDNA library of *Larix* in cutting

基因类别 Sorts of genes	正库序列个数 UniEST in positive library	反库序列个数 UniEST in negative library
新陈代谢 Metabolism	25	66
信号途径 Signal pathways	41	33
物质运输 Transport	15	7
抗性相关 Resistance	27	23
生长发育 Developmental processes	29	20
亚细胞组成 Localization	5	4
功能未知 Unknown proteins	22	26
无比对结果 No hits found	108	70
合计 Total	272	249

2.3 激素类基因表达分析

2.3.1 *IAAOL1* 基因表达分析 如图 1 所示,*IAAOL1* 基因在根、茎、叶中均表达,叶中表达量最高,茎中表达量最低。无论是生根率高的落叶松无性系(31-6, L1)还是生根率低的落叶松无性系(15-4, L2),IBA 处理后,*IAAOL1* 基因表达量均增加。表明 *IAAOL1* 基因受生长素的调控。在 L1 中,各个时期均有 *IAAOL1* 基因表达,且在不定根生长初期表达量较高。在 L2 中,各个时期均有 *IAAOL1* 基因表达,但是在插穗不定根根原基形成和不定根生长初期 2 个时期表达量很

低。上述结果表明,*IAAOL1* 基因是生长素早期响应基因,其在落叶松扦插生根过程中可能具有促进不定根和侧根形成和生长发育的作用。

2.3.2 *IAAOL2* 基因表达分析 如图 1 所示,*IAAOL2* 基因在根、叶和茎中均表达,茎中表达量高,叶中表达量最低。IBA 处理后,*IAAOL2* 基因在 L2 中表达量明显升高,而在 L1 中表达量升高不明显。表明 *IAAOL2* 基因受生长素的调控,但不同落叶松无性系间,其表达量变化不同。在 L2 中,各个时期均有 *IAAOL2* 基因表达,且在 IBA 处理后表达量最高。在 L1 中,*IAAOL2* 基因表达均很低。以上结果表明,*IAAOL2* 基因是生长素早期响应基因,其在落叶松扦插生根过程中的作用有待进一步研究。

2.3.3 *NACOL* 基因表达分析 如图 1 所示,*NACOL* 基因在根、茎、叶中均表达,且表达量无明显差别。IBA 处理后,*NACOL* 基因表达量在 L1 和 L2 中均增加。表明 *NACOL* 基因受生长素的调控,且为生长素早期响应基因。在落叶松扦插生根各个时期,*NACOL* 基因在 L1 中表达量均高于其在 L2 中表达量。这一结果表明,*NACOL* 基因可能具有促进落叶松插穗形成不定根或侧根的作用。

2.3.4 *GA200L* 基因表达分析 如图 1 所示,*GA200L* 基因在根、茎、叶中均表达,且茎中表达量高于根和叶中表达量。IBA 处理后,*GA200L* 基因在 L2 中表达量变化不明显;而其在 L1 中表达量明显增加。在落叶松扦插生根各个时期,*GA200L* 基因在 L2 中表达量均低于其在 L1 中的表达量,并且,在 L1 中,*GA200L* 基因在 IBA 处理后和不定根根原基形成 2 个时期表达量高于其他 2 个时期。

2.3.5 *RGAOL* 基因表达分析 如图 1 所示,*RGAOL* 基因在根、茎、叶中均表达,且茎中表达量高于根和叶中表达量。IBA 处理后,*RGAOL* 基因表达量在 L1 中无明显变化,在 L2 中有增加的趋势。在落叶松扦插生根各个时期,*RGAOL* 基因在 L2 中表达量均高于该基因在 L1 中表达量。

2.4 信号转导类基因——小 G 蛋白基因的表达分析

2.4.1 *RACOL* 基因表达分析 如图 2 所示,*RACOL* 基因在根、茎、叶中均表达,其中茎中的表达量略高于根和叶中的表达量。IBA 处理后,*ARFOL* 基因表达量在 L1 和 L2 中均明显增加。在扦插生根过程中,该基因在 L2 中的表达量均低于其在 L1 中的表达量。在 L2 中,该基因在根生长初期表达量极低。在 L1 中,该基因在激素处理后和不定根根原基形成 2 个时期的表达量明显高于其他时期。上述结果表

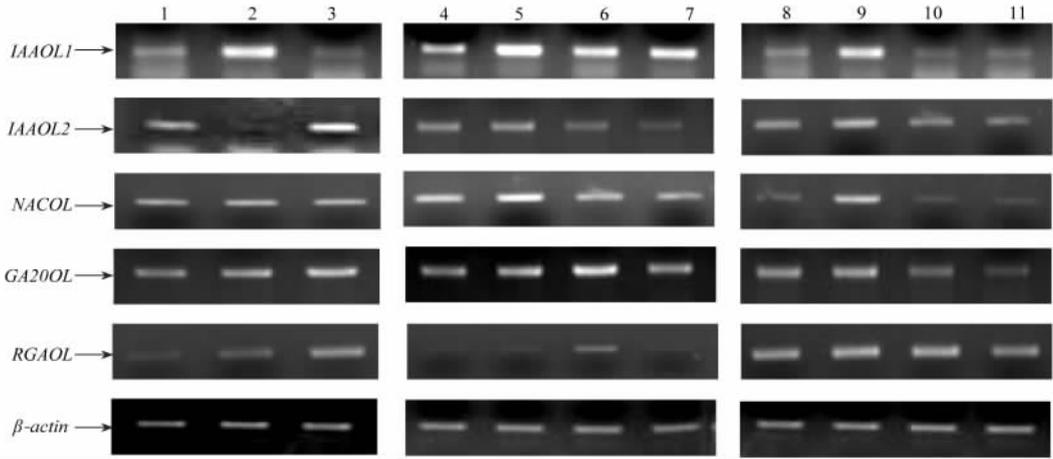


图1 *IAAOL1*, *IAAOL2*, *NACOL*, *GA200L* 和 *RGAOL* 基因表达模式

Fig. 1 The expression of *IAAOL1*, *IAAOL2*, *NACOL*, *GA200L* and *RGAOL*

1. 根; 2. 叶; 3. 茎; 4-7. *IAAOL1*, *IAAOL2*, *NACOL*, *GA200L* 和 *RGAOL* 基因在生根率高的落叶松无性系 (31-6) 中不同生根时期的表达; 8-11. *IAAOL1*, *IAAOL2*, *NACOL*, *GA200L* 和 *RGAOL* 基因在生根率低的落叶松无性系 (15-4) 中不同生根时期的表达。4, 8. 插穗; 5, 9. $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 处理的插穗; 6, 10. 插穗不定根根原基形成; 7, 11. 不定根生长初期。
1. Root; 2. Leaf; 3. Stem; 4-7. The expression of *IAAOL1*, *IAAOL2*, *NACOL*, *GA200L* and *RGAOL* during rooting of *Larix* cutting which has high rate of rooting; 8-11: The expression of *IAAOL1*, *IAAOL2*, *NACOL*, *GA200L* and *RGAOL* during rooting of *Larix* cutting which has low rate of rooting. 4, 8. Cuttings; 5, 9. Cuttings treated with $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA; 6, 10. Callus with adventitious root primordium; 7, 11. Original development of adventitious root.

明, *RACOL* 基因的表达量可能受生长素的调控。该基因在落叶松扦插形成不定根的关键时期表达量较高, 表明其可能参与生长素作用的信号途径。

2.4.2 *ARFOL* 基因表达分析 如图2所示, *ARFOL* 基因在根、茎、叶中均表达, 且根中的表达量略高于茎和叶中的表达量。IBA 处理后, *ARFOL* 基因表达量在 L1 和 L2 中均增加, 但增加不明显。在扦插生根的各个时期, *ARFOL* 基因在 L1 的不定根生长初

期表达量最低, 在不定根根原基形成过程中表达量最高。*ARFOL* 基因在 L2 中茎段和不定根生长初期表达量低, 在不定根根原基形成过程中为高表达。在形成愈伤组织且有根原基形成时期, *ARFOL* 基因在 L1 中表达量明显高于该基因在 L2 中表达量。上述结果表明, *ARFOL* 基因表达量是否受生长素的调控不能确定。该基因可能具有促进落叶松扦插形成不定根的作用。

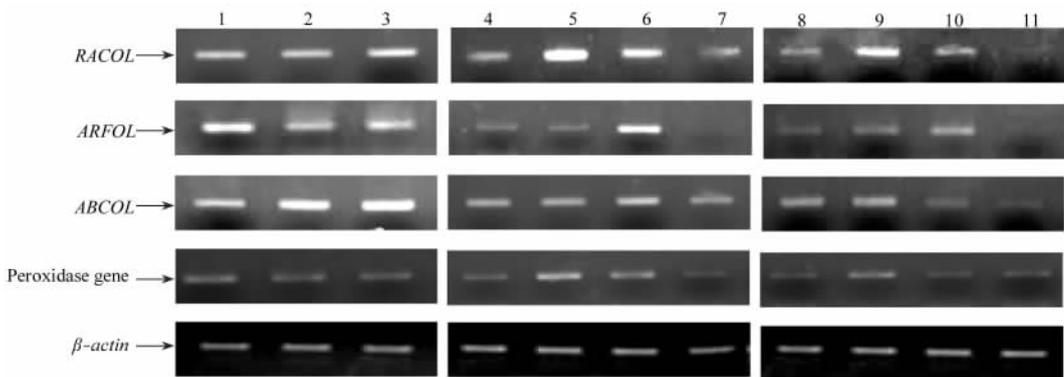


图2 *RACOL*, *ARFOL*, *ABCOL* 和 Peroxidase 基因表达模式

Fig. 2 The expression of *RACOL*, *ARFOL*, *ABCOL* and Peroxidase

1. 根; 2. 叶; 3. 茎; 4-7. *RACOL*, *ARFOL*, *ABCOL* 和 Peroxidase 基因在生根率高的落叶松无性系 (31-6) 中不同生根时期的表达; 8-11. *RACOL*, *ARFOL*, *ABCOL* 和 Peroxidase 基因在生根率低的落叶松无性系 (15-4) 中不同生根时期的表达。4, 8. 插穗; 5, 9. $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 处理的插穗; 6, 10. 插穗不定根根原基形成; 7, 11. 不定根生长初期。
1. Root; 2. Leaf; 3. Stem; 4-7. The expression of *RACOL*, *ARFOL*, *ABCOL* and Peroxidase during rooting of *Larix* cutting which has high rate of rooting; 8-11. The expression of *RACOL*, *ARFOL*, *ABCOL* and Peroxidase during rooting of *Larix* cutting which has low rate of rooting. 4, 8. Cuttings; 5, 9. Cuttings treated with $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA; 6, 10. Callus with adventitious root primordium; 7, 11. Original development of adventitious root.

2.5 转运蛋白基因表达分析

如图 2 所示, *ABCOL* 基因在根、茎、叶中均表达。IBA 处理后, *ARFOL* 基因在 L1 和 L2 中表达量均无明显变化。在 L1 和 L2 中, 该基因在扦插生根的各个时期均表达。不定根根原基形成和根生长初期, 该基因在 L2 中的表达量明显低于该基因在 L1 中的表达量。另外, 在根原基形成时期, 该基因表达量明显高于其他时期, 表明该基因可能在不定根形成中发挥作用。

2.6 因伤诱导物质相关基因——过氧化物酶基因表达分析

如图 2 所示, 落叶松过氧化物酶基因在根、茎、叶中均表达, 且表达量无明显差别。IBA 处理后, 落叶松过氧化物酶基因表达量在 L2 和 L1 中均增加, 但 L1 增加量高于 L2 增加量。在落叶松扦插生根的各个时期, 落叶松过氧化物酶基因在 L2 中的表达量均低于该基因在 L1 中的表达量。在 L1 中, 落叶松过氧化物酶基因在 IBA 处理后和不定根根原基形成 2 个时期表达量明显高于该基因在其他时期的表达量。上述结果表明, 在落叶松扦插生根的过程中伴随着大量酶类基因的表达, 这些基因的表达产生大量创伤相关物质, 这些物质同外援 IBA 共同作用, 在落叶松扦插生根过程中促进不定根或侧根的形成和生长发育。

3 讨论

构建一个好的差异表达 cDNA 文库对起始 mRNA 的完整性和纯度要求非常高。本试验的结果表明, 试验获得的总 RNA 含量高, 完整性好, 28S 与 18S 带型亮度比达到 2:1。mRNA 的完整性和纯度也完全达到文库构建要求。在本文抑制消减杂交试验中, 从反转录合成 cDNA 的监控、加接头后的接头连接效率分析到差减 cDNA 片段的差减效率分析试验, 都随时监控着各个试验环节, 保证最终获得高质量的差异表达 cDNA 文库。单菌落 PCR 扩增电泳图谱呈现很好的多态性, 点杂交试验结果为阳性率在 85% 以上。这些结果直接说明获得了高质量的正、反 2 个差异表达 cDNA 文库。

通过生物信息学分析, 正库获得的 272 个 UniEST 中, 以信号途径占的比例最大, 达到 15.07%, 其次是生长发育和抗性相关, 分别达到 10.66% 和 9.93%; 无同源序列的 UniEST 占 40.81%, 加上功能尚未确定的序列, 占到所获得 UniEST 的 47.70%。这些结果表明, 在落叶松扦插生根过程中, 与生长发育和新陈代谢相关的基因大

量表达, 这些基因的表达产生相应的蛋白和信号, 最终促使插穗形成不定根根原基并最终发育成不定根。反库获得的 249 个 UniEST 中, 新陈代谢类序列占的比例最大, 达到 26.51%, 其次是信号途径、抗性相关、生长发育类序列; 无同源序列的 UniEST 占 28.11%, 加上功能尚未确定的序列, 占到所获得 UniEST 的 38.15%; 这些结果表明, 在生根能力弱的落叶松无性系插穗中大量表达新陈代谢类基因。这些基因的表达会在插穗中产生大量次生代谢物, 这些物质的产生是否影响插穗生根, 有待进一步研究。

3.1 激素相关基因对落叶松扦插生根能力的影响

Aux/IAA 基因家族是生长素早期响应基因之一, 该基因的功能获得性突变体在根的生长发育中表现出生长素敏感性降低, 并表现出十分明显的与生长素相关的发育缺陷, 如 *axr2/iaa7* 突变体 (Nagpal *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 1990), *axr3/iaa17* 突变体 (Rouse *et al.*, 1998) 和 *axr5/iaa1* 突变体 (Yang *et al.*, 2004) 向地性和顶端优势改变, *iaa28* 突变体 (Rogg *et al.*, 2001) 和 *slr/iaa14* 突变体 (Fukaki *et al.*, 2002) 严重的侧根缺陷, *shy2/iaa3* (Qing *et al.*, 1999; Soh *et al.*, 1999) 光形态建成缺陷, *msg2/iaa19* 突变体 (Tatematsu *et al.*, 2004) 下胚轴向性缺陷。这些结果说明, *Aux/IAA* 基因在不定根和侧根生长发育中发挥重要作用。本研究通过 RT-PCR 结果表明, 在使用 IBA 处理后, 所获得的 2 个落叶松 *Aux/IAA* 基因表达量均增加, 说明 *IAAOL1* 和 *IAAOL2* 基因均受生长素的调控, 为生长素响应基因。在 L1 中, 在扦插生根的各个时期均有 *IAAOL1* 基因表达, 且均高于其在 L2 中的表达量。上述结果说明, *IAAOL1* 基因伴随着落叶松扦插生根的各个过程, 其在落叶松扦插生根过程中具有促进不定根形成和生长发育的作用。然而, IBA 处理后, *IAAOL2* 基因在 L2 中的表达量明显高于其在 L1 中表达量。在落叶松扦插生根的各个过程中, *IAAOL2* 基因在 L1 中表达量均低于其在 L2 中表达量, 因此, *IAAOL2* 基因对不定根和侧根的发生具有促进还是抑制作用有待进一步探讨。

NACs 是一个植物中特有的基因家族, 在植物发育过程中起作用。在根中首次发现该基因家族成员是 *NAC1*。 *NAC1* 在根尖、子叶和叶子中都有表达, 但以根中的表达最为活跃。通过对 *NAC1* 检测, 其同样具有转录因子的作用。 *NAC1* 参与生长素信号转导途径, 过量表达将促进侧根的发生。同时, *NAC1* 控制着 *DBP* 和 *AIR3* 两个生长素相关基因的

表达。这表明 *NAC1* 参与了生长素调控的侧根发生过程(Qi *et al.*, 2000)。半定量分析表明,本研究中 *NACOL* 基因受生长素的调控。在扦插生根各个时期,*NACOL* 基因均在 L1 中表达量高于其在 L2 中表达量。这表明 *NACOL* 基因可能在落叶松扦插生根过程中具有促进不定根和侧根生长发育的作用。

上述生长素响应基因的表达分析结果表明,在落叶松扦插生根过程中伴随着一系列生长素相关基因的表达。这些基因的表达最终促进不定根和侧根的形成与生长发育。这些生长素响应基因的发现,从分子水平上证明,生长素在落叶松扦插生根过程中发挥重要作用。这一结果同以往从生理角度研究落叶松扦插生根的结果相一致(敖红等, 2002)。

赤霉素对根生长发育影响的报道不多,在落叶松扦插试验中,GA₄ 促进插穗愈伤组织形成和不定根产生。另外,研究表明赤霉素通过减少 DELLA 蛋白在细胞核内浓度从而降低 DELLA 蛋白的生长抑制效应。在赤霉素的合成过程中赤霉素 20-氧化酶发挥重要作用,参与催化多步氧化的过程,使 C₂₀-GAs 氧化掉 1 个碳原子转化成 C₁₉-GAs。本研究结果表明,GA200L 基因表达量在 L1 和 L2 中存在明显差异,且该基因受生长素的影响。IBA 处理后和形成愈伤组织且有根原基形成 2 个时期,GA200L 基因在 L1 中表达量明显高于其在 L2 中表达量。这些结果表明,生根能力强的落叶松无性系在扦插生根过程中合成的赤霉素多,相反,生根能力弱的落叶松无性系在扦插生根过程中合成的赤霉素少。另外,本研究还获得 1 个 *RGA* 基因,该基因编码一种 DELLA 蛋白,DELLA 蛋白具有抑制植物生长发育的作用,但是在生长素促进下赤霉素可以减少 DELLA 蛋白的浓度,从而降低其对生长发育的抑制作用。半定量分析表明,在落叶松扦插生根各个时期,*RGAOL* 基因在 L2 中表达量均高于该基因在 L1 中表达量。在生根能力弱的无性系中,*RGAOL* 基因大量表达产生 DELLA 蛋白,从而抑制落叶松扦插过程中不定根的生长发育。而在生根能力强的落叶松无性系中,一方面 *RGAOL* 基因表达量低,产生的 DELLA 蛋白少,另一方面,大量合成赤霉素降解 DELLA 蛋白。这两方面的综合作用,使得 DELLA 蛋白的抑制生长作用大大降低,从而使插穗具有较强的生根能力。

3.2 其他基因对落叶松扦插生根能力的影响

3.2.1 小 G 蛋白对落叶松扦插生根的影响 小 G 蛋白家族成员是单体蛋白,分子质量较小,大约 20~30 ku,为了与异三聚体 G 蛋白区别,通常称之

为小 G 蛋白。小 G 蛋白家族成员结构保守,一般包括 4 个鸟核苷酸结合区和 1 个效应器分子结合区(Yang, 2002)。小 G 蛋白虽然结构保守,但其功能却具有多样性。许多植物特有的信号途径和功能均需要小 G 蛋白参与完成。Ras 家族在酵母和哺乳动物中调节细胞分化过程;Rho 家族成员调控肌动蛋白重组过程和参与 MAP 激酶的细胞信号转导过程;Rab 家族在膜转运过程中起着重要作用;而 Ran 家族在核孔位置调节着蛋白和 RNA 分子的运输过程。Arf 和 Arf GEF(guanine nucleotide exchange factor)对 PIN1 的极性定位有很重要的作用。在调控质膜和胞质之间的蛋白运输中,PIN1 可能充当了植物激素的运出载体(Geldner *et al.*, 2001; Yang, 2002)。ROP 是植物小 G 蛋白中参与信号转导的唯一家族。ROP 在调控根毛的发育中起到重要的作用。通过对 *ROP4* 抗体和 *GFP-ROP2* 的定位研究表明,ROP 位于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)伸长的根毛尖端。*ROP2* 调控了根毛的发生和尖端的生长,拟南芥 *ROP2* 超表达植株增加了根毛的数量和密度,*CA-rop2*, *CA-rop4* 或 *CA-rop6* 能引起根毛尖端各向同性生长或延长根毛的长度,而 *DN-rop2* 则抑制根毛尖端的生长(Baluska *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2002; Molenduk *et al.*, 2001; 吕品等, 2005)。另外,ROP 介导了 ABA 应答途径的负调控。拟南芥 *DN-rop2* 和 *CA-rop2* 分别促进和抑制 ABA 抑制的种子萌发过程。对某些功能缺失突变体研究表明:*ROP9* 和 *ROP10* 是 ABA 反应的负调控子。*ROP9* 或 *ROP10* 突变体中,ABA 对种子萌发、变绿以及根生长的抑制作用都微弱增强了,而 *ROIPI0/ROIPI9* 双突变体显著增强了 ABA 在这些方面的反应(Pei *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 2002)。ROP 除了介导 ABA 应答途径的负调控外,还可能调控其他激素的功能和发育的过程,如转 35S: *CA-rop2* 植株表型上类似于生长素或油菜素内酯过量表达的植株。与此相反,转 35S: *DN-rop2* 植株表型上类似于缺乏生长素或油菜素内酯的植株。推测不同的 ROP 基因参与不同的生长素或油菜素内酯反应或积累调控,从而调控植物的形态建成(Li, 2001)。本研究获得的 *RACOL* 基因在扦插生根率高的落叶松无性系扦插生根的各个时期均有表达,且在生长素处理后和形成愈伤组织且有根原基形成时期表达量高于其他时期。同时,与 L2 相比,该基因表达量在 L1 的扦插生根各个时期表达量均较高。这些结果表明,该基因可能在落叶松扦插生根过程中具有促进不定根发生发育的作用。因该基因在生长素处理后表达量明显增加,其

作用机制可能参与生长素的信号转导途径。本研究获得的 *ARFOL* 基因在落叶松扦插最关键的不定根原基形成时期表达量最高,且该基因在 L1 中表达量明显高于其在 L2 中的表达量。表明该基因在落叶松扦插形成不定根过程中具有促进不定根形成的作用。其作用机制有待进一步探讨。可以肯定的是在落叶松扦插形成不定根、侧根和根毛过程中,小 G 蛋白具有一定的促进作用。

3.2.2 转运蛋白对落叶松扦插生根能力的影响

自然界生物体中普遍存在着 2 大家族的初级和次级转运体: ATP 结合盒式蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC)转运体超家族和主要易化转运体(major facilitator superfamily, MFS)超家族。ABC 家族主要是初级主动转运体,通过 ATP 水解释放能量而运输大小分子化合物,包括离子、氨基酸、核苷酸、多糖、多肽甚至蛋白质等。ABC 蛋白除了运输环境胁迫过程中积累的细胞毒素物质到细胞质中以外,还参与调控植物体内的离子运输和植物的生长过程。在拟南芥中,由 *AtMRP5* 编码的 ABC 转运蛋白是有机阳离子的运载体,主要在植物的维管束核表皮表达,此基因的缺失,引起根生长减慢,侧根增加,生长素含量升高,由此认为 *AtMRP5* 可能为生长素结合运输载体(Nicola *et al.*, 2001)。在落叶松扦插生根的各个时期, L1 中 *ABCOL* 基因的表达量均明显高于 L2 中该基因的表达量。在 L1 中, *ABCOL* 基因在不定根根原基形成时期表达量特别高。这表明, *ABCOL* 基因的表达量同落叶松扦插形成不定根或侧根的能力成一定的正相关。其在落叶松扦插形成不定根和侧根的过程中可能具有促进作用。

3.2.3 创伤相关物质对落叶松扦插生根能力的影响

植物在受到创伤时,会产生一些与伤害有关的物质及代谢酶类,如葡聚糖酶、过氧化物酶、磷脂酶和脂氧化酶等。国内外很多研究表明,一些种类的酶与不定根的发生有关。Szabolcs 等(2002)测定了马缨丹(*Lantana camara*)、南美天芥菜(*Heliotropium arborescens*)、斯托卡蜡菊(*Helichrysum stoechas*)扦插生根过程中的过氧化物酶(peroxidase)的动态变化,生根快的马缨丹和南美天芥菜比生根慢的斯托卡蜡菊插穗上所有器官内的过氧化物酶活性都要高 10 倍。所有插穗上叶片内过氧化物酶活性在生根前均缓慢下降,过氧化物酶活性自顶部向基部逐渐升高,在插穗基部愈伤组织形成的过程中达到最高水平。而最显著的变化是在扦插 7 天后,马缨丹和南美天芥菜基部的过氧化物酶活性都升高 5 倍,而斯托卡蜡菊则升高 20 倍,不定根发生后,过氧化物酶活性

降低,最终恢复至样本的初始水平。因此, Szabolcs 等(2002)认为不定根发生过程中的过氧化物酶活性与植物生根能力密切相关。通过测定黑杨(*Populus nigra*)、银白杨(*Populus alba*)、欧洲山杨(*Populus tremula*)在扦插生根过程中过氧化物酶和 IAA 氧化酶活性的动态变化,发现尽管 3 个树种的插穗生根能力不同,但在根发生或根原基形成过程中,过氧化物酶活性均上升,没有发现过氧化物酶活性和生根能力有显著的相关性,因此认为过氧化物酶活性不影响插穗生根能力和生根率,但对细胞分裂起作用(Szabolcs *et al.*, 2002; Tohit, 2000; Liu *et al.*, 2003; 张肪等, 2006)。本研究结果表明, IBA 处理后,落叶松过氧化物酶基因在 L1 和 L2 中的表达量均升高。但是该基因的表达量是否跟生长素处理有关,仍无法确定。本研究生长素处理后材料是 IBA 处理至少 6 h 后取材的,在这段时间里,由于插穗已造成切口,因此与产生因伤诱导物质相关的基因已开始表达。在落叶松扦插生根各个时期,过氧化物酶基因在 L1 中表达量均高于其在 L2 中表达量。在 L1 中,过氧化物酶基因在生长素处理后和不定根根原基形成 2 个时期的表达量明显高于其他时期该基因的表达量。这些结果说明,该基因的表达量与落叶松生根能力存在正相关,且在落叶松扦插生根的关键时期表达量增高。据此表明,落叶松过氧化物酶基因可能有促进落叶松扦插形成不定根和侧根的作用。

参 考 文 献

- 敖 红,王 昆,冯玉龙. 2002. 长白落叶松插穗的内源激素水平及其与扦插生根的关系. 植物研究, 22(2): 190-195.
- 杜继煜,白 岩,白宝璋. 2004. 植物的插条繁殖生理. 农业与技术, 24(5): 96-97.
- 黄卓烈,李 明,谭绍满,等. 2002. 萘乙酸处理桉树插条后过氧化物酶活性及其同工酶变化与插条生根的关系研究. 植物研究, 22(3): 296-300.
- 刘桂丰,杨书文,杨春华,等. 1992. 长白落叶松嫩枝扦插生根的解剖研究. 东北林业大学学报, 20(1): 9-13.
- 吕 品,李建华,张 岩,等. 2005. 植物小 G 蛋白研究进展. 河北师范大学学报: 自然科学版, 29(2): 193-198.
- 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 2002. 分子克隆实验指南. 黄培堂,王嘉玺,朱厚础,等译. 3 版. 北京: 科学出版社.
- 杨书文,王秋玉,夏德安. 1994. 落叶松的遗传改良. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 279-282.
- 张 肪,郭素娟. 2006. 不定根发生机理的研究进展. 广东林业科技, 22(3): 91-95.
- Baluska F, Salaj J, Mathur J, *et al.* 2000. Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched

- bulges. *Dev Biol*, 227: 618–632.
- Fukaki H, Tameda S, Masuda H, *et al.* 2002. Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *Plant J*, 29: 153–168.
- Geldner N, Friml J, Sittlerhof Y D, *et al.* 2001. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413: 425–428.
- Jones M A, Shen J J, Fu Ying, *et al.* 2002. The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *Plant Cell*, 14: 763–774.
- Li Hai, Shen Junjiang, Zheng Zhiliang, *et al.* 2001. The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126: 670–684.
- Liu Wei, Xu Zhihong, Luo Da, *et al.* 2003. Roles of OsCK1, a rice casein kinase I, in root development and plant hormone sensitivity. *The Plant Journal*, 36: 189–202.
- Molenduk J, Bischoff F, Rajendrakumar C S V, *et al.* 2001. *Arabidopsis thaliana* ROP GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO J*, 20: 2779–2788.
- Nagpal P, Walker L M, Young J C, *et al.* 2000. *AXR2* encodes a member of the *Aux/IAA* protein family. *Plant Physiol*, 123: 563–573.
- Nicola G, Markus K, Uener K, *et al.* 2001. The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter *AtMRP5* controls root development and stomata movement. *The EMBO Journal*, 20: 1875–1887.
- Pei Z M, Ghassemian M, Kwak C M, *et al.* 1998. Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. *Science*, 282: 287–290.
- Qi X, Giovanna F, Diana C, *et al.* 2000. *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes & Development*, 14: 3024–3036.
- Qing T, Jason W R. 1999. Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* *SHY2/IAA3* gene. *Development*, 126: 711–721.
- Rogg L E, Lasswell J, Bartel B. 2001. A gain-of-function mutation in *IAA28* suppresses lateral root development. *Plant Cell*, 13: 465–480.
- Rouse D, Mackay P, Stirnberg P, *et al.* 1998. Changes in auxin response from mutation in an *AUX/IAA* gene. *Science*, 279: 1371–1373.
- Scott Jr D L, Clark C W, Deahl K L, *et al.* 1998. Isolation of functional RNA from periderm tissue of potato tubers and sweet potato storage roots. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16: 3–8.
- Soh M S, Hong S H, Kim B C, *et al.* 1999. Regulation of both light- and auxin-mediated development by the *Arabidopsis* *IAA3/SHY2* gene. *Journal of Plant Biology*, 42: 239–246.
- Szabolcs F, Andrea M, Eva S B. 2002. Change of peroxidase enzyme activities in annual cuttings during rooting. *Acta Biologica Szegediensis*, 46(3/4): 29–31.
- Tatematsu K, Kumagai S, Muto H, *et al.* 2004. *MASSUGU2* encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyls and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16: 379–393.
- Tohit G. 2000. Peroxidase and IAA-Oxidase activities during rooting in cuttings of three poplar species. *Turk J Bot*, 24: 97–101.
- Wilson A K, Picket F B, Turner J C, *et al.* 1990. A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene, and abscisic acid. *Molecular and General Genetics*, 222: 377–383.
- Wu Guang, Gu Ying, Li Shundai, *et al.* 2001. A genome-wide analysis of *Arabidopsis* Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets. *Plant Cell*, 13: 2841–2856.
- Yang X, Lee S, So J H, *et al.* 2004. The IAA1 protein is encoded by *AXR5* and is a substrate of SCF^{TIR1}. *Plant J*, 40: 772–782.
- Yang Zhenbiao. 2002. Small GTPase: versatile signaling switches in plants. *The Plant Cell*, 14: 375–388.
- Zheng Z L, Nafisi M, Tam A, *et al.* 2002. Plasma membrane-associated ROP10 small GTPase is a specific negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14: 2787–2797.

(责任编辑 徐 红)