

生长素、乙烯和一氧化氮对拟南芥下胚轴插条形成不定根的调节

王金祥*, 陈碧丽, 廖红*, 严小龙

华南农业大学资源与环境学院, 根系生物研究中心, 广州 510642

摘要: 研究生长素、乙烯和一氧化氮(NO)对拟南芥下胚轴插条形成不定根的调节, 以及生长素和乙烯信号转导成员在IAA促进不定根形成中的作用的结果表明: 拟南芥切条以IAA和硝普钠(NO供体)单独处理7 d后的不定根形成均受到促进, 其中以 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP的促进作用为最强, 乙烯的促进作用不明显; 生长素运输和信号转导以及乙烯信号转导相关突变体对IAA促进生根作用的敏感性比野生型有所下降, 特别是IAA14功能获得型的突变体。IAA和NO在促进不定根形成中有协同效应。

关键词: 拟南芥不定根; 下胚轴插条; 生长素; 乙烯; 一氧化氮

Regulation of Auxin, Ethylene and Nitric Oxide on Adventitious Rooting in *Arabidopsis* Hypocotyl Cuttings

WANG Jin-Xiang*, CHEN Bi-Li, LIAO Hong*, YAN Xiao-Long

Root Biology Center, College of Natural Resources and Environment Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: *Arabidopsis* hypocotyl cuttings were employed to study effects of auxin, ethylene and nitric oxide (NO) on adventitious rooting. The functions of auxin and ethylene signaling players cooperated with indole acetic acid (IAA) in adventitious rooting were also investigated. The results showed that treatment with either IAA or sodium nitroprusside (SNP, donor of NO) on *Arabidopsis* cuttings for 7 days could stimulate adventitious root formation, and the optimal concentration is $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively; while ethylene played little role in rooting. Compared with wild type, sensitivity of auxin transportation and signal transduction and ethylene signaling-related mutants to stimulatory effect of IAA on rooting was reduced, especially gain-of-function of mutated IAA14 (SLR). NO had synergistic role with IAA in adventitious rooting.

Key words: *Arabidopsis* adventitious root; hypocotyl cutting; auxin; ethylene; nitric oxide

植物不定根的形成受植物激素的调节。在根原基的发生阶段, 生长素可促发早期根原基的形成, 乙烯也参与调节不定根的形成(Bollmark和Eliasson 1990; Lobiecke 和 Sauter 1999)。业已查明, 一氧化氮(nitric oxide, NO)作为一种细胞间和细胞内信使分子参与调控植物的多种生理过程, 近10年来的研究表明, NO在种子萌发、根和叶的生长和发育、抗病和防御反应、细胞程序性死亡和植物响应非生物胁迫的生理过程中均起作用(Crawford和Guo 2005)。生长素诱导的黄瓜不定根形成依赖于NO, 作为NO供体的硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)对不定根的形态和结构的影响近似于吡啶类生长素(Pagnussat等2003)。Steffens等(2006)报道, 乙烯而非生长素在调节深水水稻(deepwater rice)节上形成的不定根中起中心作用, 赤霉酸(gibberellic acid, GA)与乙烯之间有协同效应, 而脱

落酸(abscisic acid, ABA)与赤霉酸之间则有拮抗作用。表明深水水稻不定根的形成受激素之间相互作用的调节。植物激素的相互作用一直是植物发育生物学研究中的热点之一, 但迄今对生长素、乙烯和一氧化氮三者单独或结合使用对拟南芥下胚轴中的不定根形成的影响还不清楚。本文就此问题作了一些探讨。

收稿 2009-08-15 修订 2009-09-10

资助 广东省自然科学基金(04300588)、教育部博士点基金(20040564004)和国家自然科学基金(30600380)。

致谢 美国拟南芥种子中心(ABRC)提供 *aux1-7*、*axr1-3*、*tir1-1*、*etr1-1*、*ctr1-1*、*ein2-1* 和 *ein3-1* 突变体种子; Hidehiro Fukaki 和 Catherine Bellini 博士提供 *slr-1* 和 ARF17 过表达系种子。

* 共同通讯作者(E-mail: jinxiangwang@scau.edu.cn, hliao@scau.edu.cn; Tel: 020-85280156)。

材料与方法

试验材料为拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.) Columbia 野生型和 *axr1-3*、*aux1-7*、*tir1-1*、*slr-1*、*arf17*、*etr1-1*、*ctr1-1*、*ein2-1* 和 *ein3-1* 突变体(遗传背景均为 Col-0)。其中 *aux1-7*、*axr1-3* 和 *tir1-1* 分别是生长素运输和信号转导成员 AUX1、AXR1 和 TIR1 失去功能的突变体(Bennett 等 1996; Leyser 等 1993; Ruegger 等 1998); *slr-1* 是 IAA14 功能获得型的突变体(Fukaki 等 2002); *arf17* 是 T-DNA 插入导致 ARF17 过表达的突变体(Sorin 等 2005); *etr1-1*、*ctr1-1*、*ein2-1* 和 *ein3-1* 分别是乙烯信号转导成员 ETR1、CTR1、EIN2 和 EIN3 失去功能的突变体(Bleecker 等 1988; Kieber 等 1993; Chao 等 1997; Alonso 等 1999)。

培养基为 1/2MS 培养基, 含大量元素、微量元素、1% 蔗糖和琼脂, 用 1 mol·L⁻¹ 的 KOH 或 1 mol·L⁻¹ 的 HCl 调 pH 至 5.7, 高压灭菌后在超净台上倒平板。IAA、1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)和硝普钠(SNP)为 SIGMA 公司产品, 用过滤方法除菌。挑选饱满健康的拟南芥野生型和相关突变体种子, 在无菌操作台上用无菌水浸泡 20 min, 再用 70% 酒精消毒 5 min, 接着用次氯酸钠浸泡 5 min, 然后用无菌水洗 5 次, 每次 1~2 min。消毒过的种子播种到装有适量水和湿润滤纸的培养皿里, 用锡箔纸包好培养皿, 放入 4 °C 的冰箱中暗培养 4 d 以打破种子休眠。萌发的种子用毛笔播种到 1/2MS 培养基上, 放入培养箱中照光 5~6 h (光照强度为 70 μmol·m⁻²·s⁻¹), 再用双层锡箔纸包好遮光培养 3~4 d, 下胚轴长至 2 cm 后切成插条。用灭菌过的小刀片切掉拟南芥苗的根部后, 只保留子叶以下 1.5 cm 左右的下胚轴, 然后用毛笔将下胚轴插条播种到加有不同水平和不同激素的 1/2MS 培养基上。置于培养箱中光下培养 7 d, 光暗周期为 16 h/8 h, 温度为 22 °C/18 °C, 光照强度为 70 μmol·m⁻²·s⁻¹。拟南芥下胚轴的不定根在光下培养至第 3 和第 4 天时即突出表皮。所有试验均是在光下培养至第 7 天时于 NIKON 显微镜下统计不定根数, 凡明显突出表皮的不定根均计算在内。

每个试验至少重复 3 次, 结果用 SAS 8.2 统计软件分析, 文中数据均是平均值 ±SE, Duncan's 多

重比较检验, 图中不同字母表示差异显著性($P < 0.05$)。

结果与讨论

1 IAA 对拟南芥下胚轴插条形成不定根的影响

IAA 促进拟南芥不定根的形成, 在 0~50 μmol·L⁻¹ IAA 范围内, 随着 IAA 浓度的升高其促进生根的作用增强; 50 μmol·L⁻¹ IAA 的促进作用最强, IAA 浓度超过 50 μmol·L⁻¹ 时, 不定根的数量即减少, 表明 50 μmol·L⁻¹ 是 IAA 促进拟南芥不定根形成的最适浓度(图 1)。

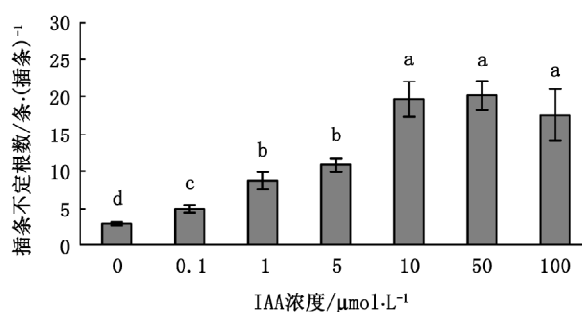


图 1 IAA 对拟南芥下胚轴插条形成不定根的影响
Fig.1 Effect of IAA on formation of adventitious root in *Arabidopsis* hypocotyls cuttings

2 生长素运输和信号转导以及乙烯信号转导相关基因突变对生长素诱导不定根形成的影响

图 2 和图 3 显示, (1)在不加生长素的条件下, *slr-1* 突变体形成的不定根数少于野生型, 差异显著; 而 *arf17* 突变体则和野生型相比差异不明显。在 5 μmol·L⁻¹ IAA 的条件下, 野生型和 *arf17* 突变体形成的不定根数均明显比不作 IAA 处理的多, 但两者差异不明显; 而 *slr-1* 突变体的不定根数明显比野生型的少, 仅为它的 16.8%。经 IAA 处理的 *slr-1* 突变体其形成的不定根数和不作 IAA 处理的差异不显著。这些说明: ARF17 表达增强的突变对生长素的响应不大, 而 IAA14 蛋白功能获得型的突变则可导致突变体对 IAA 的敏感性下降(图 2)。(2)在不作生长素处理的情况下, 与生长素和乙烯相关的突变体和野生型拟南芥不定根形成差异不明显, 外源生长素均能不同程度地促进野生型和突变体拟南芥不定根的形成; 与野生型拟南芥相比, *axr1-3*、*aux1-7* 和 *tir1-1* 突变体对生长素的响应有些下降, 不定根

数的增加幅度小于野生型的; 此外 *etr1-1*、*ctr1-1*、*ein2-1* 和 *ein3-1* 突变体对生长素的敏感度也均有下降, 其中 *ctr1-1* 突变体对生长素敏感度下降幅度最大(图3), 说明乙烯组成型信号转导是抑制生长

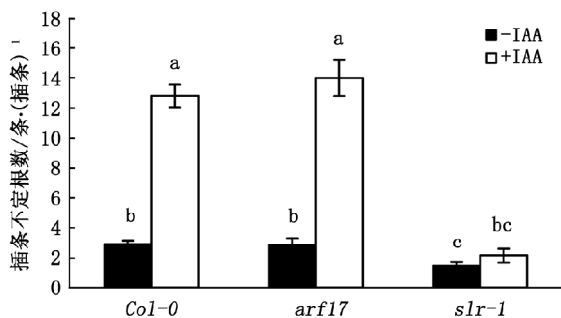


图2 IAA对 *arf17* 和 *slr-1* 突变体不定根形成的影响

Fig.2 Effect of IAA on formation of adventitious root in *arf17* and *slr-1* mutant
IAA 浓度为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

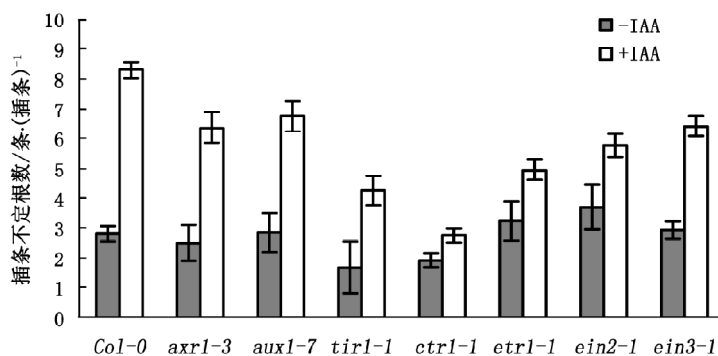


图3 IAA对生长素以及乙烯信号转导和运输的突变体不定根形成的影响

Fig.3 Effect of IAA on formation of adventitious root in auxin and ethylene signaling-related mutants
IAA 浓度为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3 ACC对拟南芥插条不定根形成的影响

图4显示, 在ACC(乙烯前体)的所试浓度中, 仅 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACC略有促进不定根形成的作用, 但不显著, 随着ACC浓度的增加, ACC即表现出抑制不定根形成的作用。

4 NO供体硝普钠对拟南芥插条不定根形成的影响

图5显示, 低浓度的SNP对拟南芥插条不定根的形成有促进作用, 高浓度则有明显的抑制作用; $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP的促进作用最明显。当浓度大于 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 即表现出明显的抑制作用, 特别是 100 和 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP下的插条几乎不生根。

最后, 根据前述结果, 考虑到最适 IAA 和 SNP

素的信号转导的。

这些结果表明: AXR1、AUX1、TIR1 和 IAA14 (SLR) 都参与 IAA 调节不定根的形成(图2、3)。IAA14蛋白GWPPV基序突变可阻止 IAA14 的有效而及时的降解, 以致 *slr-1* 侧根数明显减少, 甚至没有侧根形成(Fukaki等2002, 2005; Tan等2007); 本文结果也说明, IAA14也参与调节不定根的形成, 但不同的是, IAA14功能获得型突变不能完全抑制不定根的形成, 说明不定根和侧根形成的机制有差别; 乙烯信号转导系统参与生长素对不定根形成的调节(图3), 这可能与乙烯调节生长素的合成和运输(Stepanova等2005)以及生长素信号转导和乙烯信号转导之间是相互作用的有关。此外, 所有相关基因突变体都对外源生长素作出一定程度的响应(图2、3), 这说明拟南芥基因组可能还存在类似的功能基因。

浓度可能掩盖它们在促进不定根形成中的相互作用, 我们分别用 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA、 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACC 和 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP 单独或三者组合处理拟南芥下胚轴插条7 d (IAA 和 SNP 促进不定根形成的次佳浓度分别是 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACC 促进生根作用不显著)。图6结果表明, $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 促进不定根的效应明显比 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP 和 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACC 处理的好, 且均达到显著水平; 和 IAA 单独处理的相比, IAA 和 SNP 组合处理的以及 IAA、SNP 和 ACC 三者组合的促进不定根形成的效应明显, 差异显著, IAA 与 ACC 组合处理的略微有促进, 但不显著; IAA 与 SNP 有协同效应。

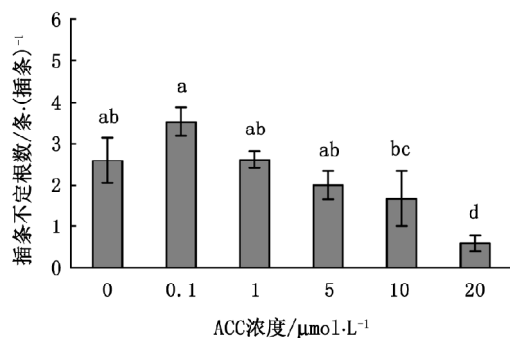


图4 ACC对拟南芥下胚轴插条不定根形成的影响
Fig.4 Effect of ACC on formation of adventitious root in *Arabidopsis* hypocotyl cuttings

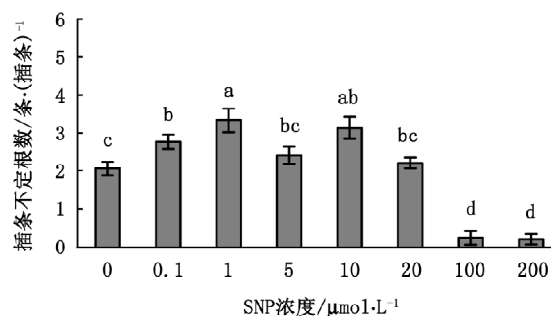


图5 SNP对拟南芥下胚轴插条不定根形成的影响
Fig.5 Effect of SNP on formation of adventitious root in *Arabidopsis* hypocotyl cuttings

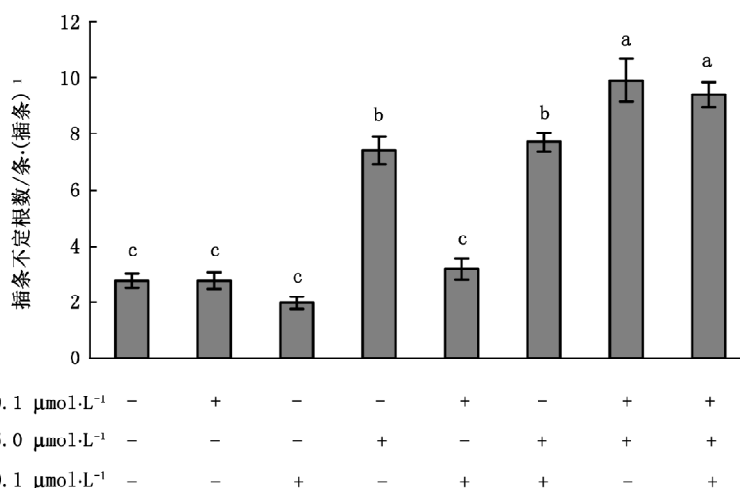


图6 生长素、SNP和ACC相互作用对拟南芥插条不定根形成的影响
Fig.6 Interactions between auxin, SNP and ACC in regulation of adventitious rooting in *Arabidopsis*

参考文献

- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science*, 284: 2148~2152
- Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schultz B, Feldmann KA (1996). *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, 273: 948~950
- Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C, Kende H (1988). Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 241: 1086~1089
- Bollmark M, Eliasson L (1990). Ethylene accelerates the breakdown of cytokines and thereby stimulates rooting in Norway spruce hypocotyl cuttings. *Physiol Plant*, 80: 534~540
- Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker JR (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, 89: 1133~1144
- Crawford NM, Guo FQ (2005). New sights into nitric oxide metabolism and functions. *Trends Plant Sci*, 10 (4): 195~200
- Fukaki H, Nakao Y, Okushima Y, Theologis A, Tasaka M (2005). Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J*, 44: 382~395
- Fukaki H, Tameda S, Masuda H, Tasaka M (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
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldman KA, Ecker JR (1993). *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*, 72: 427~441
- Leyser HMO, Lincoln C, Timpte C, Lammer D, Turner J, Estelle M (1993). The auxin-resistance gene *AXR1* of *Arabidopsis* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature*, 364: 161~164
- Lobiecke R, Sauter M (1999). Adventitious root growth and cell-cycle induction of deepwater rice. *Plant Physiol*, 119: 21~29
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lamattina L (2003). Nitric oxide and

- cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol*, 132: 1241~1248
- Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M (1998). The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev*, 12: 198~207
- Sorin C, Bussell JD, Camus I, Ljung K, Kowalczyk M, Geiss G, McKhann H, Garcion C, Vaucheret H, Sandberg G, Bellini C (2005). Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1. *Plant Cell*, 17: 1343~1359
- Steffens B, Wang JX, Sauter M (2006). Interactions between ethylene, gibberellin and abscisic acid regulate emergence and growth rate of adventitious roots in deepwater rice. *Planta*, 223: 604~612
- Stepanova AN, Hoyt JM, Hamilton AA, Alonso JM (2005). A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17: 2230~2242
- Tan X, Calderon-Villalobos LI, Sharon M, Zheng CX, Robinson CV, Estelle M, Zheng N (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, 446: 640~645