

研究报告

培养基磷缺乏对黄瓜毛状根生长、抗氧化酶活性及氮源利用的影响

张悦, 施和平

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

摘要: 采用液体培养的方法研究了培养基磷缺乏对黄瓜毛状根生长及其抗氧化酶活性及培养基中氮源和钙利用的影响。结果表明, 黄瓜毛状根在完全缺磷的培养基中几乎不能生长; 而培养基无机磷缺乏会抑制黄瓜毛状根的生长, 且浓度越低, 其抑制作用越明显, 毛状根变得越纤细而长, 侧根数减少且短小。与全磷培养相比, 磷缺乏培养基培养的黄瓜毛状根可溶性蛋白含量明显偏低, 但其 SOD 和 POD 活性则明显升高。与完全缺磷(对照)相比, 在培养过程中不同无机磷浓度培养的黄瓜毛状根的 SOD 和 POD 活性均比对照低。当黄瓜毛状根在不同磷缺乏浓度的液体培养基中培养时, 随着培养时间的延长, 培养基的电导率逐步下降, 并与培养基起始无机磷浓度成正比; 其培养基的铵态氮和硝态氮不断被吸收和利用, 培养至 15d 时, 培养基中的铵态氮已绝大部分被消耗完毕, 但直至培养 30d 时培养基的硝态氮仍未被消耗完毕。培养基中无机磷缺乏会降低黄瓜毛状根对培养基硝态氮的吸收和消耗以及抑制黄瓜毛状根对钙的吸收。而适当提高培养基的无机磷浓度可促进黄瓜毛状根对培养基中钙的吸收和消耗。

关键词: 磷缺乏, 黄瓜, 毛状根, SOD, POD, 氮源

Influences of Phosphate Deficiency in the Medium on Growth, Activities of Antioxidant Enzymes and Utilization of Nitrogen Resource in *Cucumis sativus* Hairy Roots

Yue Zhang, and Heping Shi

College of Life Sciences, South China Normal University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, Guangzhou 510631, China

Abstract: Effects of phosphorus deficiency in the medium on growth and morphology and activities of SOD and POD, utilization of nitrogen and calcium in the medium during liquid culture of *Cucumis sativus* hairy roots were investigated. The results showed that *C. sativus* hairy roots can not grow in the medium without addition of any phosphorus. When cultured into the medium with different Pi concentrations, the growth of *C. sativus* hairy roots was significantly inhibited with the decreasing of Pi concentration in the medium, its main roots became thinner and longer, the number of its lateral roots was decreased and its lateral roots became shorter and smaller. Compared to the medium with full strength phosphorus, the content of soluble proteins in *C. sativus* hairy roots cultured under Pi deficiency was significantly lower than that with standard full-length Pi, while POD and SOD activities in *C. sativus* hairy roots were significantly stimulated. Compared to the control (without addition of any phosphorus in the medium), the activities of

Received: January 14, 2008; **Accepted:** May 14, 2008

Supported by: the Guangdong Natural Sciences Foundation (Nos. 031510 and 990451).

Corresponding author: Heping Shi. Tel: +86-20-85214793; E-mail: shihp@scnu.edu.cn

广东省自然科学基金项目(No. 031510 和 No. 990451)资助。

POD and SOD in *C. sativus* hairy roots cultured in the medium with different concentration of Pi were lower than the control. When *C. sativus* hairy roots were cultured into medium with different Pi concentrations, the medium conductivity was gradually decreased with time and with direct proportion of the initial Pi concentration of the medium; $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ of the medium was gradually absorbed and utilized, at day 15, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ of the medium was nearly used up but its $\text{NO}_3^-\text{-N}$ was not used up until cultured for 30 days. Pi deficiency in the medium could decrease the consumption rate of $\text{NO}_3^-\text{-N}$ and inhibited the absorption and utilization of calcium of the medium by *C. sativus* hairy roots. Proper enhancement of Pi concentration could stimulate absorption and consumption of calcium of the medium.

Keywords: phosphorus deficiency, *Cucumis sativus*, hairy roots, SOD, POD, nitrogen resource, calcium

磷(P)是植物细胞或离体器官培养基中必需的大量元素。相当多的研究表明,磷是影响植物生长和物质代谢最重要的营养元素之一,其状态如磷缺乏或磷饥饿等不仅影响其它矿质元素的吸收,影响根的生长并改变其结构,而且还能诱导或影响某些基因的表达^[1-4]及某些酶活性及蛋白质含量^[5],促进根部有机酸的分泌及其次生代谢类型的改变^[6]。但目前已有的许多有关磷状态(如磷饥饿或缺乏)对植物生长和发育以及基因表达或酶活性影响的研究大多是以完整植株尤其是农作物植株作为研究对象的。未见有关磷状态对毛状根生长、形态及其次生代谢及酶活性等影响的正式报道。

毛状根(Hairy roots)是由发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)侵染植物后,其所含的 Ri (Root inducing) 质粒的 T-DNA 片段在植物细胞核基因组中插入、整合并表达的结果。业已证实,可利用其能在无外源植物生长调节剂的培养基上快速自主生长的特性来产生药用植物的药用有效成分^[7],或作为“生物反应器”来活性表达外源基因^[8];或实现药用成分的生物转化^[9]或用作对环境污染物质进行“植物修复”的工具^[10]。我们曾利用含野生型 Ri 质粒的发根农杆菌 ATCC15834 对黄瓜子叶的遗传转化,获得了能在无激素 MS 培养基上自主生长的毛状根^[11];并曾利用黄瓜毛状根成功地表达了控制药用植物毛花洋地黄(*Digitalis lanata*)次生代谢物合成有关的毛花洋地黄毒甙糖苷转移酶基因^[8]。但如何建立该黄瓜毛状根离体培养的最佳条件以及研究培养基组分的变化等对黄瓜毛状根生长、形态及酶活性等的影响,是利用黄瓜毛状根作为“生物反应器”进行生物转化等应用的前提和条件。植物毛状根培养所用的培养基一般由无机元素和有机附加物等组成。已往的研究表明,培养基的重要组成成分如无机营养元素等的变化能影响毛状根的生长及其

次生代谢物的产生^[12]。而 PO_4 作为毛状根生长发育及其次生代谢调节的必需元素,它的消耗变化或供给状态可反映或影响毛状根的生长和代谢状况。目前对于可离体自主生长的毛状根而言,有关毛状根培养过程中培养基中磷的消耗变化已有少量研究报道^[13]。但未见有关培养基中磷的状态水平如磷缺乏等对毛状根生长形态及酶活性影响及其对培养基中氮源和钙等重要组分吸收和利用影响的研究报道。本文我们报道培养基中磷缺乏对黄瓜毛状根生长形态及其抗氧化酶活性及培养基中氮源和钙消耗等的影响,以期为今后建立适合黄瓜毛状根生长的最佳离体培养条件,研究磷供给状态影响毛状根生长的分子机理及利用黄瓜毛状根作为“生物反应器”来进行药物生物转化等应用奠定基础 and 提供可能性。

1 材料与方法

1.1 培养材料

本实验采用由发根农杆菌(*A. rhizogenes*) ATCC15834 遗传转化“津研四号”黄瓜子叶得到的、能在无外源激素的 MS 培养基上自主生长,且继代保存近一年的黄瓜毛状根为材料,其诱导和培养方法见文献[11]。

1.2 培养基

为探讨培养基中不同磷缺乏水平对黄瓜毛状根生长及其抗氧化酶活性的影响,图 1 至图 9 中用来液体培养黄瓜毛状根的培养基 A、B、C、D、E 和 F,是无机磷浓度分别为 0 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 、750 $\mu\text{mol/L}$ 、1000 $\mu\text{mol/L}$ 、1250 $\mu\text{mol/L}$ 的改良 MS 培养基^[14]。其中,培养基 F 的无机磷浓度为 1250 $\mu\text{mol/L}$,为标准 MS 培养基的无机磷含量;缺磷处理的对照是用 KCl 取代 KH_2PO_4 ;所有培养基的 pH 均为 5.8;每 150 mL 锥形瓶中盛 50 mL 液体培养基。

1.3 毛状根液体培养及其生长量的测定

将来自同一克隆系的生长旺盛的黄瓜毛状根,切成长约 3 cm 的具根尖的毛状根根段,接种到含不同无机磷浓度的 MS 液体培养基的锥形瓶中进行振荡(转速 100 r/min)暗培养,每瓶毛状根的接种量约为 0.2 g 鲜重,培养温度为 $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ 。每隔 5 d 取样进行毛状根生长测定。所取的毛状根经蒸馏水冲洗,用吸水纸吸干毛状根表面的水分后,进行毛状根生物量的测量;并保存在 -20°C 冰箱中供进行可溶性蛋白及酶活性测定用。取样后剩余的培养基过滤后,用灭菌的去离子水定容到 100 mL,供测定培养基中硝态氮、铵态氮及钙的消耗变化用。

1.4 黄瓜毛状根 SOD 和 POD 酶活性的测定

不同无机磷缺乏浓度培养的黄瓜毛状根的可溶性蛋白含量的测定参照 Bradford 的方法^[15];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,595 nm 处进行测定。毛状根的 SOD 活性按照 Beauchamp 和 Fridovich(1971) 所建立的方法进行测定^[16],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 u/mg 蛋白表示。而黄瓜毛状根的 POD 活性按照张志良等^[17] (2003) 的愈创木酚法,测定 470 nm 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。

1.5 黄瓜毛状根培养液中 NO_3^- 、 NH_4^+ 和 Ca^{2+} 含量及电导率的测定

当毛状根接种至液体培养基后,分别在培养后的 5、10、15、20、25 和 30 d 取培养基过滤后,将滤液定容到 100 mL 后用于测定培养液中 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N 和 Ca^{2+} 含量的变化。其中培养液中铵态氮含量的测定参照中国科学院上海植物生理研究所,上海植物生理学会等^[18](1999)编的方法;培养液中硝态氮含量的测定按张志良等^[19](2003)的方法;而黄瓜毛状根培养液中 Ca^{2+} 浓度的 EDTA 络合滴定按照阮湘元等(1998)^[20]的方法。培养基中电导率变化采用上海雷磁新泾仪器有限公司生产的 DDS-11A 型电导仪进行测定。实验重复 3 次,取平均值。

2 结果

2.1 培养基磷缺乏对黄瓜毛状根生长及其形态的影响

图 1 为培养基中不同无机磷浓度对黄瓜毛状根

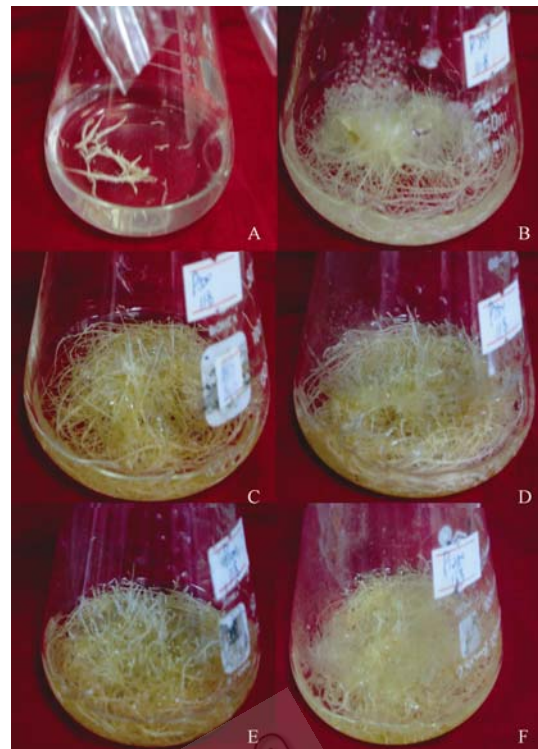


图 1 培养基无机磷浓度对黄瓜毛状根生长形态的影响
Fig. 1 Effects of phosphate concentrations of the medium on growth and morphology of *Cucumis sativus* Linn hairy roots

A~F: *C. sativus* hairy roots cultured in liquid MS medium with different concentration of phosphate for 15 days. A: CK (MS without phosphorus); B: 250 $\mu\text{mol/L}$; C: 500 $\mu\text{mol/L}$; D: 750 $\mu\text{mol/L}$; E: 1000 $\mu\text{mol/L}$; F: 1250 $\mu\text{mol/L}$

生长及其形态的影响。结果表明,当毛状根在完全缺磷(对照)的培养基中培养时,毛状根的生长受到严重抑制或几乎不能生长;在整个培养过程中其生物量几乎没有增加,仅见根段略微肿胀但几乎没有伸长;而当接种培养在添加不同无机磷浓度的培养基中培养 2~3 d 后,黄瓜毛状根开始生长并逐渐产生分枝侧根,培养后 5~15 d 处于快速生长期。除了完全缺磷培养的处理外,液体培养 25 d 时其余各无机磷浓度培养的黄瓜毛状根均达到其生长最大值;25 d 后达到生物量高峰,之后其生长速率逐渐下降。与对照(完全缺磷)及正常供磷处理相比,毛状根虽能在低浓度无机磷的培养基中逐渐生长,甚至毛状根的长度比正常无机磷浓度培养的更长;但与正常供磷相比,随着培养基中无机磷浓度的降低,其毛状根变得愈加纤细,不仅侧根数目变得更少,而且短而细小。而从图 2 可见,随着培养基中无机磷水平的升高,除黄瓜毛状根逐渐增粗外,其生物量也随之逐渐增加,并与培养基的无机磷浓度成正比;其中,以在正常含磷水平(1250 $\mu\text{mol/L}$)的 MS 培养

基中培养的黄瓜毛状根生长最快, 其鲜重增殖倍数及生物量最大, 培养至 25 d 时达到约 10.27 g FW(鲜重)/瓶, 约 1.47 g DW(干重)/瓶。培养至 30 d 时, 在无机磷浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 、750 $\mu\text{mol/L}$ 、1000 $\mu\text{mol/L}$ 和 1250 $\mu\text{mol/L}$ 的培养基中培养的黄瓜毛状根的生物量增殖倍数分别为 0.7、9.96、18.8、15.14、35.53 和 31.36 倍。此外还观察到, 除完全缺磷处理外, 其余各浓度无机磷培养的黄瓜毛状根在培养 20 d 后都开始出现不同程度的褐化, 且随着培养基中无机磷浓度水平的升高, 其毛状根的褐化程度也愈高; 其中以在无机磷浓度为 1250 $\mu\text{mol/L}$ 的正常 MS 培养基中培养的黄瓜毛状根的褐化程度最高。这表明缺磷不利于黄瓜毛状根的生长; 培养基中磷缺乏(低浓度磷)还可影响毛状根的生长及形态, 使毛状根长度增长, 但使毛状根变得纤细且减少侧根的发生。

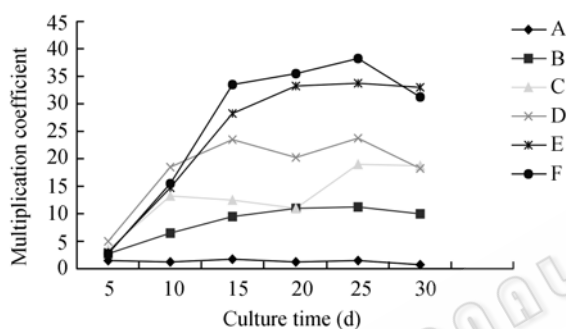


图 2 培养基无机磷浓度对黄瓜毛状根生长的影响
Fig. 2 Influence of phosphorus concentrations in the medium on the growth of *C. sativus* hairy roots

2.2 培养基磷缺乏水平对黄瓜毛状根可溶性蛋白含量的影响

图 3 为培养基无机磷浓度对黄瓜毛状根可溶性蛋白含量的影响。从图 3 可见, 在为期 30 d 的液体培养过程中, 无论是在 250 $\mu\text{mol/L}$ 低浓度无机磷培养基中还是在 1250 $\mu\text{mol/L}$ 高浓度无机磷的培养基中培养, 黄瓜毛状根的可溶性蛋白含量几乎都比完全缺磷培养(对照)的黄瓜毛状根高; 仅只有 750 $\mu\text{mol/L}$ 无机磷浓度培养的毛状根在培养 25 d 时, 其可溶性蛋白含量比完全缺磷培养的毛状根略有降低。在黄瓜毛状根 0~30 d 的培养过程中, 完全缺磷和各无机磷浓度培养的黄瓜毛状根的可溶性蛋白含量都随着培养时间的延长而不断下降; 除完全缺磷外, 其余各无机磷浓度培养的黄瓜毛状根的可溶性蛋白含量大都在培养 25 d 下降到最低值。与培养 5 d 相比, 在

培养基无机磷浓度分别为 0 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 、750 $\mu\text{mol/L}$ 、1000 $\mu\text{mol/L}$ 和 1250 $\mu\text{mol/L}$ 的 MS 培养基中培养 25 d 的黄瓜毛状根的可溶性蛋白含量分别下降了 37.1%、35.86%、54.38%、72.35%、53.74% 和 54.38%; 但在离体培养 25 d 到 30 d 期间, 除完全缺磷的培养基培养的黄瓜毛状根的可溶性蛋白含量继续下降且幅度较大外, 其余的无机磷浓度(250 $\mu\text{mol/L}$ 到 1250 $\mu\text{mol/L}$)培养的黄瓜毛状根的可溶性蛋白含量均略有回升。

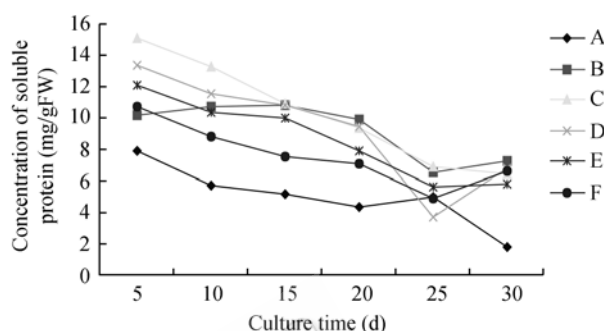


图 3 培养基磷缺乏对黄瓜毛状根可溶性蛋白含量的影响
Fig. 3 Influence of phosphorus deficiency in MS medium on the content of soluble proteins in *C. sativus* hairy roots

2.3 培养基磷缺乏对黄瓜毛状根 SOD 活性的影响

图 4 为在不同浓度无机磷的 MS 培养基中培养的黄瓜毛状根 SOD 活性的变化。从图 4 可见, 在供试的含不同磷缺乏浓度的 MS 培养基中, 完全缺磷(对照)培养的黄瓜毛状根 SOD 活性均比其它各浓度无机磷培养的黄瓜毛状根高; 完全缺磷培养的黄瓜毛状根 SOD 活性在培养 5 d 后逐渐升高, 培养 10 d 达到峰值, 达 39.967 u/mg 蛋白, 约为毛状根培养初期 SOD 活性的 2.163 倍; 10~15 d 略有下降; 之后, 培养至 15~25 d 时酶活性变幅不明显, 但在培养 20 d 到 30 d 又出现 SOD 活性大幅升高, 达到 39.919 u/mg 蛋白; 而在含不同无机磷浓度(250 $\mu\text{mol/L}$ 到 1250 $\mu\text{mol/L}$)的改良 MS 培养基中培养的黄瓜毛状根, 其 SOD 活性在培养后 5 d 至 10 d 都略有下降, 之后则逐渐升高, 且均在培养 30 d 时达到最大值; 但在整个培养期间其 SOD 活性均比完全缺磷培养的黄瓜毛状根低。

2.4 培养基磷缺乏对黄瓜毛状根 POD 活性的影响

图 5 为不同浓度无机磷液体培养的黄瓜毛状根 POD 活性的测量结果。结果表明, 在黄瓜毛状根液体培养过程中, 完全缺磷(对照)培养的毛状根的

POD 活性在 5~30 d 内逐渐升高;而在不同无机磷浓度(250~1250 $\mu\text{mol/L}$)的 MS 培养基中培养的黄瓜毛状根的 POD 活性在整个培养过程中均比对照低;而且在培养 5~10 d 内 POD 活性均略有下降,10~25 d 间大都逐渐升高;而在培养 25~30 d 期间,在无机磷浓度分别为 250 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 和 750 $\mu\text{mol/L}$ 的培养基中培养的毛状根的 POD 活性逐渐下降;而在无机磷浓度分别为 1000 $\mu\text{mol/L}$ 和 1250 $\mu\text{mol/L}$ 中培养的黄瓜毛状根的 POD 活性则继续升高,且随着培养基中无机磷浓度升高,其 POD 活性也更高。

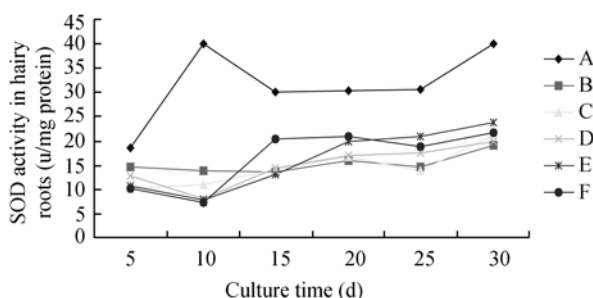


图 4 培养基磷缺乏对黄瓜毛状根 SOD 活性的影响
Fig. 4 Influence of phosphorus deficiency in the medium on the activity of SOD in *C. sativus* hairy roots

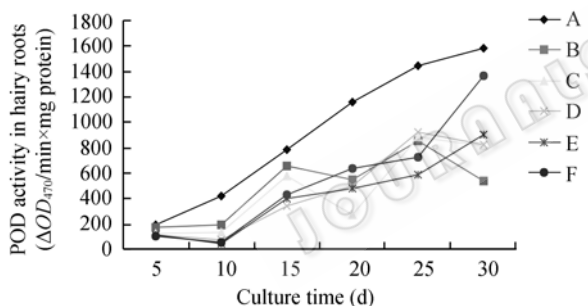


图 5 培养基磷缺乏对黄瓜毛状根 POD 活性的影响
Fig. 5 Influence of phosphorus deficiency in the medium on the activity of POD in *C. sativus* hairy roots

2.5 磷缺乏对黄瓜毛状根培养基电导率的影响

图 6 所示为黄瓜毛状根培养过程中不同无机磷浓度的 MS 培养基电导率的变化。从图 6 可见,在黄瓜毛状根液体培养过程中,随着培养时间的延长,毛状根液体培养基的电导率逐步下降,即表明随着毛状根的生长,各培养基中的离子含量逐步下降,很多离子被吸收利用。其中以完全缺磷培养基的电导率最高;这可能与完全缺磷处理的黄瓜毛状根由于几乎没有生长,其培养基中的离子也基本没有被吸收和利用有关;而在其它含不同磷缺乏浓度的培

养基中,随着毛状根培养时间的延长,其培养基的电导率均不断下降,培养至 15 d 时,随着培养基无机磷浓度的升高,其培养基的电导率下降愈多,即起始培养基中无机磷浓度愈高,其培养基中的电导率愈下降。

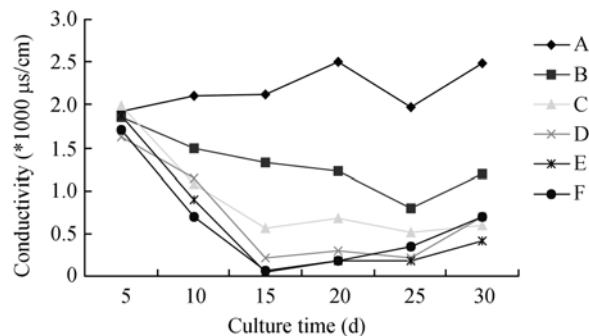


图 6 培养基无机磷浓度对黄瓜毛状根培养基电导率的影响
Fig. 6 Influence of phosphorus concentration on the conductivity of liquid medium of *C. sativus* hairy roots

2.6 磷缺乏对培养基硝态氮含量的影响

图 7 为培养基无机磷浓度对黄瓜毛状根液体培养过程中培养基硝态氮含量的影响。从图 7 可见,黄瓜毛状根在不同无机磷浓度的液体培养基中培养时,随着培养时间的延长,培养基中硝态氮含量呈逐渐下降的趋势。其中,由于黄瓜毛状根在对照(完全缺磷)培养基几乎没有生长,只吸收利用了培养基中极小部分硝态氮,因而其培养基中的硝态氮含量在整个液体培养过程中几乎没多大变化,下降幅度最小;而当黄瓜毛状根在其他各磷缺乏浓度的培养基中培养时,其培养基中的硝态氮均被逐渐消耗,其含量随着培养时间的延长而逐渐下降,并在培养 25 d 时降到最低,但直至液体培养 30 d,各无机磷缺乏浓度的培养基中的硝态氮仍未被消耗完毕。在含不同无机磷浓度的培养基中,虽以无机磷浓度为 1250 $\mu\text{mol/L}$ 培养的黄瓜毛状根对其培养基硝态氮的吸收利用最多,但直至培养 30 d 时,仍有占培养基起始硝态氮浓度约 3.85% 的硝态氮未被吸收利用;而此时黄瓜毛状根的生长速率减慢,其颜色也逐渐由白色或浅黄色,并开始不同程度变褐。

2.7 磷缺乏对培养基铵态氮含量的影响

图 8 为培养基无机磷浓度对黄瓜毛状根培养基中铵态氮消耗的影响。从图 8 可见,在供试的各个培养基中,随着毛状根培养时间的延长,不同磷浓

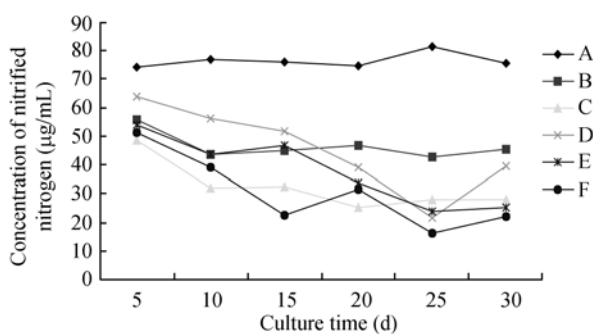


图 7 培养基磷缺乏对黄瓜毛状根培养过程中培养基硝态氮消耗速率的影响

Fig. 7 Influence of phosphorus deficiency in the MS medium on the consumption rate of NO_3^- -N of the medium during the culture of *C. sativus* hairy roots

度的液体培养基中的铵态氮含量都逐步下降。其中完全缺磷培养的黄瓜毛状根由于其几乎没有生长,其培养基的铵态氮含量也仅极少部分被吸收利用,在整个培养过程中,其培养基的铵态氮含量从培养 5 d 的 451.2 $\mu\text{g/mL}$ 仅下降到培养 30 d 时的 410.2 $\mu\text{g/mL}$ 。而当黄瓜毛状根在其它无机磷浓度的培养基中培养时,其培养基的铵态氮则被不断吸收和利用,其浓度随着培养时间的延长而逐渐下降,且随着培养基无机磷浓度升高,培养基中铵态氮含量下降更明显。在接种后 5~15 d 的快速生长期,培养基中的铵态氮被大量吸收、消耗,培养至 15~25 d 时,培养基的铵态氮的消耗较慢,但直至培养 30 d,除了完全缺磷的培养基外,其余各磷浓度的培养基的铵态氮已几乎全部用完。这表明,黄瓜毛状根液体摇瓶培养时,其培养基中铵态氮的代谢周期为 30 d 左右;与培养基硝态氮消耗变化(图 7)相比,培养基磷缺乏对黄瓜毛状根吸收和利用铵态氮的影响较小。

2.8 磷缺乏对培养基钙离子含量的影响

图 9 为黄瓜毛状根在不同无机磷浓度的培养基中培养时其培养基 Ca^{2+} 的消耗变化。从图 9 可见,在 5~10 d 的培养期间,各无机磷浓度的培养基中的 Ca^{2+} 的吸收和消耗都较少,其浓度变化幅度较小;但培养 10~15 d 期间,培养基中的 Ca^{2+} 含量被迅速吸收和利用,其浓度急剧下降,而且其消耗量随着培养基中无机磷浓度的升高而升高,培养至 15 d 时,添加 0 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 、750 $\mu\text{mol/L}$ 、1000 $\mu\text{mol/L}$ 和 1250 $\mu\text{mol/L}$ 浓度磷的培养基中的 Ca^{2+} 含量分别约为起始浓度的 59.31%、42.36%、25.42%、16.90%、12.73%和 4.26%,即培养基中起

始磷浓度越低则最后残存的钙含量越高;培养 30 d 后,在磷浓度分别为 1000 $\mu\text{mol/L}$ 和 1250 $\mu\text{mol/L}$ 的培养基中的钙被消耗殆尽,培养基中仅残存有占起始浓度约 8.95%和 5.97%的 Ca^{2+} ;而在无机磷浓度分别为 0、250、500 和 750 $\mu\text{mol/L}$ 的液体培养基中,毛状根培养 30 d 后,培养基中仍残存有占起始浓度约 95.47%、38.78%、17.90%和 11.93%的 Ca^{2+} 。这表明,钙虽然是毛状根生长所必需的矿质元素,但培养基中的无机磷水平会影响其吸收和利用;完全缺磷和磷缺乏会抑制毛状根对钙的吸收;而培养基中的无机磷浓度升高,可促进培养基中钙的吸收和消耗,且在一定范围内与无机磷浓度高低成正比。

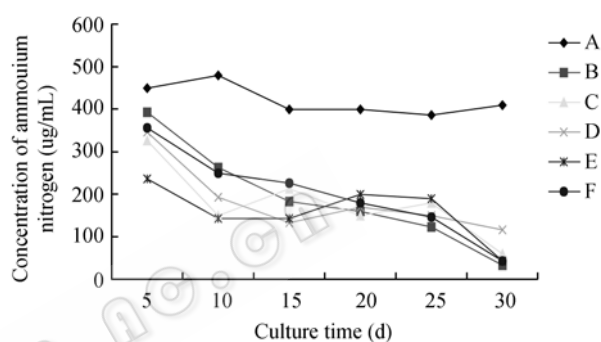


图 8 培养基磷缺乏对黄瓜毛状根培养过程中培养基铵态氮消耗变化的影响

Fig. 8 Influence of phosphorus deficiency in the MS medium on the consumption rate of NH_4^+ -N of the medium by *C. sativus* hairy roots

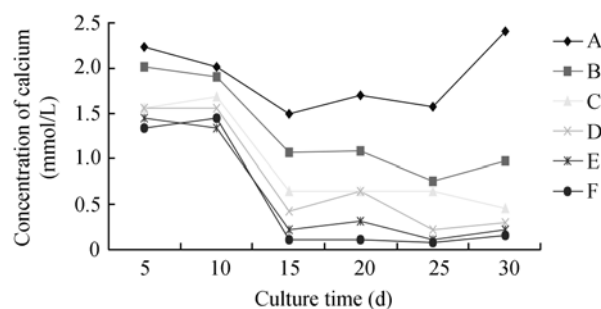


图 9 培养基磷缺乏对黄瓜毛状根培养过程中培养基钙消耗变化的影响

Fig. 9 Influence of phosphorus deficiency on the absorption and consumption of calcium in the medium by *C. sativus* hairy roots

3 讨论

有关磷缺乏(Pi deficiency)对植物(株)生长和物质代谢、根的结构及基因表达和蛋白质含量等的影响已有许多研究报道^[1,21,22]。如水培小麦时,缺磷可使小麦根部 IAA 浓度提高进而诱导 *cycLA1* 基因表达,

并促进根轴长度和侧根密度的增加^[3]。而缺磷环境可增加水培小麦根轴长度、侧根数量和根系长度,但根轴的数量和侧根长度减少^[21]。而培养液中磷缺乏还可促进拟南芥叶片中 *rab18* 基因的表达^[22];甚至磷的状态还可影响野生型和突变体拟南芥中 UDP-glucose pyrophosphorylase 的基因表达,蛋白质含量及其酶活性^[23]。在拟南芥中两个与衰老有关的 RNase 基因 (RNS1 和 RNS2) 均可被磷饥饿 (Pi starvation) 所诱导^[24]。SOD 是植物体内活性氧清除系统中起关键性作用的防御性酶,可防止或减轻活性氧在植物细胞内积累过多而带来的细胞膜损伤。而 POD 则具有多种氧化功能,能分解植物体内有害作用的过氧化氢,也对植物起着重要的保护作用。一些对植物耐低磷生理机理的研究表明,植物的保护酶 POD 和 SOD 等酶活性的变化可作为植物耐低磷能力的重要评价指标之一^[25]。如刘厚诚等(2003)发现,缺磷条件下对缺磷不敏感的长豇豆品种保护酶活性(15d 内平均活性)升高或升幅较大,而对缺磷敏感的品种则活性下降或升幅较小^[26];而万美亮等(1999)发现,随着磷胁迫时间延长,耐低磷能力强的甘蔗品种的保护酶(SOD 和 POD)活性显著升高,而耐低磷能力弱的品种则其活性明显下降^[27]。同时也有研究表明,磷缺乏可促进菜豆(*Phaseolus vulgaris*)根产生自由基,促进过氧化氢的产生^[28];但至今为止,有关磷缺乏对植物根的生长和次生代谢影响的生理机理及对基因表达的影响都是以完整的植株根系来开展研究的;未见有关磷缺乏对离体根或毛状根生长及形态及酶活性的影响及其影响机理研究的任何报道。磷作为毛状根生长发育及其次生代谢调节的必需元素,它的消耗变化可反映毛状根的生长和代谢状况。而有关毛状根对培养基中磷的吸收消耗变化已有少量研究^[12,29],如在培养长春花(*Catharanthus roseus*)毛状根时发现,培养基中的磷酸盐在培养 8 d 后就被全部消耗完毕^[29]。但未见有关培养基中磷的状态水平如磷不同程度缺乏或完全缺磷对毛状根生长及其酶活性影响以及对培养基中氮源和钙等吸收和利用影响的研究报道。在本研究中,培养基中完全缺磷严重抑制黄瓜毛状根的生长,而培养基中不同程度磷缺乏则抑制毛状根生长,使根变得纤细且长,侧根数目减少且短小;随着培养基中无机磷浓度水平的提高,黄瓜毛状根的生长也

越快;同时在磷缺乏胁迫下,毛状根中的可溶性蛋白含量明显偏低,而 SOD, POD 这些保护酶的活性也明显升高;而随着培养基中无机磷浓度的上升,黄瓜毛状根生长逐步增加,抗逆境的保护酶活性也逐步降低。而这与孙海国等(2002)水培小麦缺磷胁迫产生的结果不完全一致。在他们的研究中,缺磷环境会促进植株根系的发育,增加侧根数量和根系长度,甚至发现,缺磷条件下,其主根长度比正常供磷的处理还长得多。而在我们用完全缺磷和不同浓度磷缺乏培养离体黄瓜毛状根时,磷缺乏或低磷胁迫处理都会不同程度抑制黄瓜毛状根的生长;并且培养基中无机磷浓度越低,对毛状根生长的抑制愈严重;且培养基中无机磷缺乏会抑制侧根发生,虽使主根变得细而长,但侧根数目变少,且变得短而小;而随着培养基中无机磷浓度的增加,毛状根变得愈粗,侧根发生愈多。我们认为这种差异的产生可能与毛状根的特性以及实验材料的类型不同等有关;而至于磷缺乏影响毛状根生长的分子机理及其对那些基因的表达调节有关则尚待今后研究。

硝酸盐和铵盐是毛状根培养基中最重要的氮源。已有的一些研究大都集中在研究培养基中氮源的消耗变化及硝态氮和铵态氮的比率对毛状根生长及其次生代谢物积累的影响。如培养基中硝态氮和铵态氮的比率能明显影响 *Atropa belladonna* 毛状根的生长及其次生物质东莨菪碱/天仙子胺的比率;而且降低培养基中的硝态氮浓度还可促进毛状根中生物碱的产生^[30]。而在培养栝楼毛状根时,培养基中铵态氮和硝态氮随着生长的进行而被逐渐消耗,在培养 24 d 时铵态氮已被完全消耗,而此时硝态氮则仍有 17% 未被消耗和利用^[12]。但至今为止,未见有关培养基中磷的状态或磷缺乏程度对毛状根培养基中氮源的消耗变化的影响以及磷缺乏对毛状根的生长及其形态等影响的研究报道。在用低磷和全磷培养基培养菜豆植株的实验中发现,根部较低的无机磷浓度会降低根部的 ATP 水平及对硝态氮的吸收速率^[31]。而在本实验中,当毛状根在添加不同无机磷浓度的液体培养基中培养时,其培养基中的铵态氮和硝态氮不断被吸收和利用,其浓度均随着培养时间的延长而逐渐下降;培养至 15 d 时培养基中的铵态氮已绝大部分被消耗完毕,但直至培养 30 d 后,含不同无机磷浓度的培养基中的硝态氮仍未被消耗

完毕;而且发现,培养基起始无机磷浓度越低的培养基中所残存的硝态氮越多,也即其培养基中的硝态氮被黄瓜毛状根吸收和消耗的量越少;而这与 Gniazdowska 等^[31](2000)水培菜豆的结果类似。但至于在低磷或磷缺乏浓度下毛状根较少吸收和消耗硝态氮的机理是否相同则不清楚,尚待今后研究。

与 N 一样,钙也是植物细胞生长发育必需的矿物质元素。有研究表明,培养基中的 Ca^{2+} 浓度或 Ca^{2+} 的拮抗剂等能提高 *Polygonum hydropiper* 悬浮细胞黄酮醇的产量^[32]或促进长春花毛状根中吲哚生物碱的产生和释放^[33];而提高培养基的 Ca^{2+} 浓度虽对天仙子(*Hyoscyamus albus*)毛状根的生长无明显影响,但却能明显提高毛状根中托品生物碱的产量^[34]。然而,至今为止有关毛状根培养过程中培养基中 Ca^{2+} 离子消耗变化的研究极少。本实验的结果表明,在黄瓜毛状根液体培养过程中,培养基的 Ca^{2+} 可被毛状根逐渐吸收和利用,但与培养基铵态氮的消耗变化相比,毛状根对 Ca^{2+} 的吸收和利用与培养基中的无机磷缺乏程度有关;培养基磷缺乏会抑制黄瓜毛状根对钙的吸收;而培养基中无机磷浓度的升高可促进毛状根对培养基中钙的吸收和消耗,且培养基中钙的消耗变化在一定范围内与培养基中起始无机磷浓度高低成正比。

我们的结果表明,培养基中缺磷或磷供应不足会影响黄瓜毛状根的生长及其形态,使毛状根主根变得细而长,但侧根变短且数目减少;降低黄瓜毛状根的硝态氮消耗速率以及影响黄瓜毛状根对钙的吸收和利用。适当提高培养基中的无机磷浓度可促进培养基中钙的吸收和消耗。本实验结果为今后研究磷缺乏对毛状根生长和次生代谢影响的分子机理及设计毛状根的合适培养条件及利用毛状根来进行生物转化等奠定了实验技术基础。

REFERENCES

- [1] Bariola PA, Howard CJ, Taylor CP, *et al.* The *Arabidopsis* ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to Pi limitation. *Plant J*, 1994, **6**: 673–658.
- [2] Malboobi ML, Lefebvre DD. A phosphate-starvation inducible β -glucosidase gene (psr. 3.2) isolated from *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct subfamily of the BGA family. *Plant Mol Biol*, 1997, **34**: 57–68.
- [3] Sun HG, Zhang FS. Growth response of wheat roots to phosphorus deficiency. *Acta Bot Sin*, 2000, **42**(9): 913–919.
- [4] Sun HG, Zhang FS, Yang JF. Effect of phosphorus deficiency on the expression of cyclin gene *cycl1 At* in wheat roots. *Acta Phytophysiol Sin*, 2000, **26**(5): 441–445.
- [5] Ciereszko Iwona, Henrik Johansson, Leszek A Kleczkowski. Interactive effects of phosphate deficiency, sucrose and light/dark conditions on gene expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol*, 2005, **162**: 343–353.
- [6] Fukuda T, Saito A, Wasaki J, *et al.* Metabolic alterations proposed by proteome in rice roots grown under low P and high Al concentration under low pH. *Plant Sci*, 2007, **172**: 1157–1165.
- [7] Hu ZB, Alfermann AW. Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*, 1993, **32**(2): 699–703.
- [8] Shi HP, Lindemann P. Expression of recombinant *Digitalis lanata* EHRH. cardenolide 16'-O-glucohydrolase in *Cucumis sativus* L. hairy roots. *Plant Cell Rep*, 2006, **25**: 1193–1198.
- [9] Orden AA, Bisogno FR, Cifuentes DA, *et al.* Asymmetric bioreduction of natural xenobiotic diketones by *Brassica napus* hairy roots. *J Mol Catal B: Enzymatic*, 2006, **42**: 71–77.
- [10] Eapen S, Suseelan KN, Tivarekar S, *et al.* Potential for rhizofiltration of uranium using hairy root cultures of *Brassica juncea* and *Chenopodium amaranticolor*. *Environ Res*, 2003, **91**: 127–133.
- [11] Shi HP, Qi Y, Zhang Y, *et al.* Induction of cucumber hairy roots and effect of cytokinin 6-BA on its growth and morphology. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(3): 514–520.
- [12] Nussbaumer P, Kapetanidis I, Christen P. Hairy roots of *Datura candica* \times *D. aurea*: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Rep*, 1998, **17**: 405–409.
- [13] Zheng MZ, Guo ZG, Liu RZ. Kinetics of growth and nutrient consumption in a culture of *Trichosanthes kirilowii* hairy root. *J Tsinghua Univ (SCI & Tech)*, 2002, **42**(10): 1309–1312.
- [14] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 1962, **15**: 473–497.

- [15] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248–254.
- [16] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase, improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 1971, **44**: 276–287.
- [17] Zhang ZL, Zhai WJ. A Text-manual for Plant Physiology, 3rd edition. Beijing: Higher Education Press, 2003, 123–124.
张志良, 翟伟菁. 植物生理学实验指导(第三版). 北京: 高等教育出版社, 2003, 123–124.
- [18] Shanghai Association for Plant Physiology. A Text-manual for Plant Physiology, 1st edition. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 1985, 598–599.
上海植物生理学会编. 植物生理学实验手册(第一版). 上海: 上海科学技术出版社, 1985, 598–599.
- [19] Zhang ZL, Zhai WJ. A Text-Manual for Plant Physiology, 3rd edition. Beijing: Higher Education Press, 2003, 48–52.
张志良, 翟伟菁. 植物生理学实验指导(第三版). 北京: 高等教育出版社, 2003, 48–52.
- [20] Ruan XY, Su YL. Experiments for Analytic Chemistry. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press, 1998, 124–128.
阮湘元, 苏亚玲. 分析化学实验. 广州: 广东高等教育出版社, 1998, 124–128.
- [21] Sun HG, Zhang FS. Morphology of wheat roots under low-phosphorus stress. *Chin J App Ecol*, 2002, **13**(3): 295–299.
孙海国, 张福锁. 缺磷胁迫下的小麦根系形态特征研究. 应用生态学报, 2002, **13**(3): 295–299.
- [22] Ciereszko I, Leszek A Kleczkowski. Effects of phosphate deficiency and sugars on expression of rab18 in *Arabidopsis*: hexokinase-dependent and okadaic acid-sensitive transduction of the sugar signal. *Biochim et Biophys Acta*, 2002, **1579**: 43–49.
- [23] Ciereszko I, Johansson H, Hurry V, *et al*. Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and pho mutants of *Arabidopsis*. *Planta*, 2001, **212**: 598–605.
- [24] Taylor CB, Bariola PA, DelCardayre SB, *et al*. A senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 5118–5122.
- [25] Pan XH, Liu SY, Li F, *et al*. Effect of low-Phosphorus stress on membrane lipid peroxidation and protective enzyme activities in rice leaves of different cultivars. *Chinese J Rice Sci*, 2003, **17**(1): 57–60.
潘晓华, 刘水英, 李锋, 等. 低磷胁迫对不同水稻品种叶片膜脂过氧化及保护酶活性的影响. 中国水稻科学, 2003, **17**(1): 57–60.
- [26] Liu HC, Kuang YH, Chen RY. Changes of lipid peroxidation and activities of protective enzymes in asparagus bean seedlings under phosphorus-deficiency stress. *Acta Horticult Sin*, 2003, **30**: 215–217.
刘厚诚, 邝炎华, 陈日远. 缺磷胁迫下长豇豆幼苗膜脂过氧化及保护酶活性的变化. 园艺学报, 2003, **30**(2): 215–221.
- [27] Wan ML, Kuang YH, Chen JX. Studies on membrane lipid peroxidation and protective enzyme activity of sugarcane under phosphorus deficiency. *J South China Agric Univ*, 1999, **20**(2): 1–6.
万美亮, 邝炎华, 陈建勋. 缺磷胁迫对甘蔗膜脂过氧化及保护酶系统活性的影响. 华南农业大学学报, 1999, **20**(2): 1–6.
- [28] Malusà Eligio, Enzo Laurenti, Izabela Juszczyk, *et al*. Free radical production in roots of *Phaseolus vulgaris* subjected to phosphate deficiency stress. *Plant Physiol Biochem*, 2002, **40**: 963–967.
- [29] Moreno-Valenzuela O, Coello-Coello J, Loyola-Vargas VM, *et al*. Nutrient consumption and alkaloid accumulation in a hairy root line of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol Lett*, 1999, **21**: 1017–1021.
- [30] Bensaddek L, Gillet F, Saucedo JEN, *et al*. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. *J Biotechnol*, 2001, **85**: 35–40.
- [31] Gniazdowska A, Mikulska M, Rychter AM. Growth, nitrate uptake and respiration rate in bean roots under phosphate deficiency. *Biol Plan*, 2000, **41**(2): 217–226.
- [32] Nakao M, Ono K, Takio S. The effect of calcium on flavanol production in cell suspension cultures of *Polygonum hydropiper*. *Plant Cell Rep*, 1999, **18**: 759–763.
- [33] Moreno-Valenzuela OA, Minero-Garcia Y, Chan W, *et al*. Increase in the indole alkaloid production and its excretion into the culture medium by calcium antagonists in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**: 1345–1349.
- [34] Christen P, Aoki T, Shimomura K. Characteristics of growth and tropane alkaloid production in *Hyoscyamus ablus* hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4. *Plant Cell Rep*, 1992, **11**: 597–600.