

大白菜下胚轴不定芽再生过程中内源激素和多胺含量的变化

朱丽华¹, 张彩琴², 盛小光¹, 朱月林¹

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 南京农业大学农学院, 江苏 南京 210095)

摘 要: 研究了大白菜 [*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (L.) Olsson] 下胚轴不定芽再生过程中内源激素和多胺含量的动态变化。结果表明, 芽原基出现以前(接种后0~8 d)外植体内源玉米素核苷(ZRs)和脱落酸(ABA)含量上升, 而吲哚乙酸(IAA)含量下降; 不定芽出现(接种后8 d)后变化趋势相反; ABA/IAA 值和 ZRs/IAA 值在培养初期(接种0~8 d)增大, 不定芽出现以后逐渐减小。不定芽分化过程中外植体内源腐胺(Put)、精胺(Spm)和亚精胺(Spd)含量都表现为先上升后下降, 均在培养第8 d时达到峰值; Spm/Put 值和 Spd/Put 值的变化趋势也与此相似。说明大白菜下胚轴不定芽的再生与内源激素和多胺含量及平衡有密切关系。

关键词: 大白菜; 下胚轴; 不定芽再生; 内源激素; 内源多胺

中图分类号: S 634.1; Q 945.31

文献标识码: A

Changes of endogenous hormone and polyamine contents during *in vitro* adventitious shoot regeneration from hypocotyl explants of Chinese cabbage

ZHU Li-hua¹, ZHANG Cai-qin², SHENG Xiao-guang¹, ZHU Yue-lin¹

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China;

2. College of Agronomy, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: Dynamic changes of endogenous hormone and polyamine contents were investigated during *in vitro* shoot regeneration from hypocotyl explants of Chinese cabbage [*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (L.) Olsson]. The results were as follows. Before shoot primordia occurred (0 to 8 days after inoculation), endogenous zeatin ribosides (ZRs) and abscisic acid (ABA) contents increased, while indole-3-acetic acid (IAA) content decreased. After shoot primordia occurred (on the 8th day of inoculation), the contrary changing patterns of ZRs, ABA and IAA contents were observed. At the early stage of culture (0 to 8 days after inoculation), ABA/IAA and ZRs/IAA ratios increased, then gradually decreased after adventitious shoots occurred. Endogenous putrescine (Put), spermine (Spm) and spermidine (Spd) contents increased at the early stage and then gradually declined during the culture course, these indexes reached their peaks on the 8th day of culture. Similar changing patterns were also observed in the ratios of Spm/Put and Spd/Put. The results indicated that endogenous hormone and polyamine contents and their balance were closely associated with the *in vitro* adventitious shoots regeneration from hypocotyl explants of Chinese cabbage.

Key words: *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (L.) Olsson; hypocotyl; adventitious shoot regeneration; endogenous hormone; endogenous polyamine

离体形态发生是高等植物生长发育研究中一个复杂的问题, 受多种内外因素的影响, 至今尚未彻底掌握其规律。植物激素对形态发生起着重要的作用, 外植体离体培养形态建成, 往往需要外源激素的诱导。然而, 外源植物激素必须通过对内源激素平衡的调节才发生作用^[1], 一般认为器官分化的倾向取决于内源激素的平衡, 外源激素必须通过对内

源激素平衡的调节才能对离体再生起调控作用, 各种内源激素的水平和比例通过诱导外植体的基因表达, 从而影响器官分化。

多胺 (polyamine, PA) 是生物体内的一类活性物质, 在植物细胞中主要有腐胺 (putrescine, Put)、精胺 (spermine, Spm) 和亚精胺 (spermidine, Spd)。有研究认为, 内源激素对外植体形态发生的

收稿日期: 2005-06-08 初稿; 2005-12-22 修改稿

作者简介: 朱丽华 (1979-), 女, 硕士, 主要从事蔬菜生理和生物技术研究。

通讯作者: 朱月林 (1963-), 男, 教授, 博士生导师 (E-mail: ylzhu@njau.edu.cn)。

基金项目: 江苏省科技厅资助项目 (BC2003306); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目 ([2001] 498)

影响可能通过多胺来实现或协同作用,多胺在调控形态发生时主要起第二信使的作用,即外因或激素变化引起细胞内多胺变化,再引起生理生化变化,最终影响到形态发生^[2]。

一定种类和浓度的外源激素对大白菜器官分化的影响已有一些研究^[3-6],外源多胺对大白菜不定芽分化的作用也有报道^[7],但关于大白菜器官分化过程中内源激素和多胺变化的研究鲜有报道。本试验通过研究下胚轴不定芽分化过程中外植体内源激素和多胺含量及平衡的动态变化,分析内源激素和多胺变化与下胚轴不定芽分化之间的关系,为阐明大白菜下胚轴不定芽再生的生理生化机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大白菜 [*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (L.) Olsson] 品种为贵龙5号,由青岛贵龙种苗有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的培养和外植体的准备 将贵龙5号大白菜的种子在75%乙醇中表面消毒30 s后,再用0.1%的 HgCl_2 溶液消毒10 min,用无菌水漂洗5次,将消毒好的种子在无菌滤纸上吸干水后,接种在1/2 MS培养基上。每培养皿(直径9 cm)20粒,置于 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、光周期 $12\text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、光照度 $2\ 500\text{ lx}$ 的培养室中培养。

大白菜种子发芽3~5 d后,取长约5~8 mm的下胚轴,将其以正插(形态学下端插入培养基)的方式接种于 $\text{MS} + \text{TDZ } 0.3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{AgNO}_3\ 5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 0.8\%$ 琼脂+3%蔗糖的培养基上,pH为5.8,诱导不定芽的再生^[8]。接种后分别取培养0、3、6、8、10、12、15和18 d的下胚轴外植体进行生理指标的测定。

1.2.2 内源激素和多胺的测定 内源激素含量由南京农业大学生命科学学院植物激素研究室采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定^[9]。多胺含量的测定按刘俊等^[10]的方法进行,用日本产Shimadzu LC-10AT型高效液相色谱仪测定,层析柱为反向 C_{18} 柱($150\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$),64%甲醇为流动相,流速 $0.5\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 25°C ,Shimadzu SPD-10A检测器,波长254 nm,进样量为 $10\text{ }\mu\text{l}$ 。

2 结果与分析

2.1 大白菜下胚轴不定芽再生过程中内源激素含

量的变化 图1是大白菜下胚轴不定芽再生过程中外植体内源IAA、ZR_s和ABA含量的变化。下胚轴接种后外植体IAA含量迅速下降,在芽原基开始出现时(接种后8 d)降至一低谷,此后其含量快速回升,并于第15 d达到峰值,之后含量又呈下降趋势;外植体ZR_s含量的变化趋势为先上升后下降,接种后0~3 d含量缓慢增加,3~8 d内迅速增加,第8 d达到高峰,此后又迅速下降;ABA含量的变化趋势与ZR_s类似,即在接种后含量迅速上升,到第8 d达到高峰,以后随着培养时间的延长,含量不断降低。

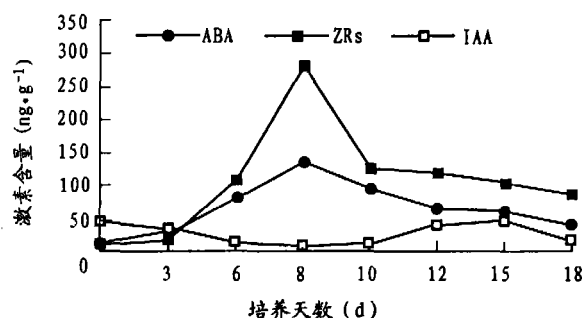


图1 大白菜(贵龙5号)下胚轴不定芽再生过程中内源激素含量的变化

Fig. 1 Changes of endogenous hormone contents during shoot regeneration from hypocotyl explants of Chinese cabbage (cv. Guilong 5)

2.2 下胚轴不定芽再生过程中内源激素平衡的变化 大白菜下胚轴不定芽再生过程中内源激素平衡的动态变化如图2所示。芽原基开始形成(接种后8 d)前,下胚轴外植体中ZR_s/IAA值和ABA/IAA值持续升高,而芽原基形成后则迅速下降,接种15 d后又开始略有回升。

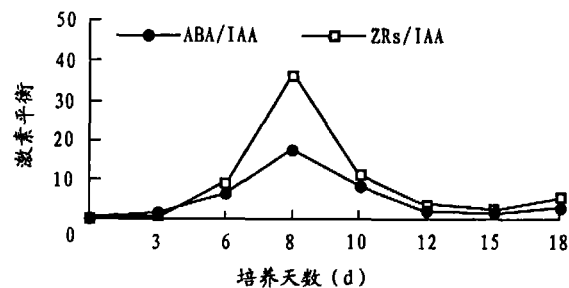


图2 大白菜(贵龙5号)下胚轴不定芽再生过程中内源激素平衡的变化

Fig. 2 Changes of endogenous hormone balance during shoot regeneration from hypocotyl explants of Chinese cabbage (cv. Guilong 5)

2.3 下胚轴不定芽再生过程中内源多胺含量的变化

在大白菜下胚轴再生不定芽的过程中, 外植体内源精胺 (Spm)、亚精胺 (Spd) 和腐胺 (Put) 含量的变化显著 (图3)。不定芽再生过程中外植体内源精胺 (Spm)、亚精胺 (Spd) 和腐胺 (Put) 含量的变化趋势基本一致, 均表现为先上升后下降, 即培养早期3种多胺含量都明显增加, 在芽原基出现时 (接种后第8~10 d) 达到峰值, 此后含量持续下降。

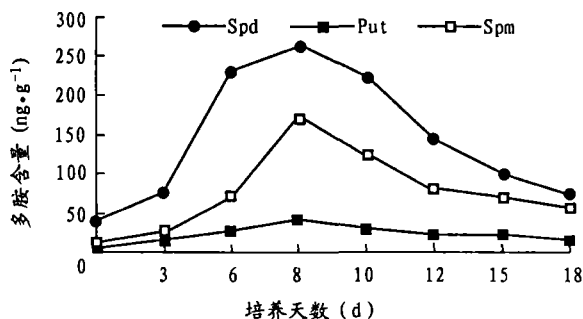


图3 大白菜 (贵龙5号) 下胚轴不定芽再生过程中内源多胺含量的变化

Fig. 3 Changes of endogenous polyamine contents during shoot regeneration from hypocotyl explants of Chinese cabbage (cv. Guilong 5)

2.4 下胚轴不定芽再生过程中内源多胺平衡的变化

在大白菜下胚轴不定芽分化过程中, 内源多胺平衡的变化也很明显 (图4)。Spd/Put 值和Spm/Put 值在培养初期 (接种后0~6 d) 处于相对较低的状态, 随着不定芽的分化缓慢增大, 均于芽原基出现时 (接种第8~10 d) 达到其最大值, 不定芽分化以后逐渐变小, 接种后15 d又开始略有回升。

3 讨论

3.1 大白菜下胚轴不定芽再生与内源激素的关系

植物离体培养的器官发生受到植物体内环境和外部培养条件的影响, 其中内源激素的调控非常重要, 外源激素必须通过对内源激素的调节来达到控制器官发生的目的, 各种生长调节物质的水平都通过影响培养物的基因表达从而影响器官分化^[11]。本试验发现, 大白菜下胚轴不定芽再生过程中, 不同激素含量随培养时间发生规律性的变化。外植体接入培养基后, 随着不定芽的诱导, ZRs 和ABA 含量呈上升趋势, 芽原基开始出现时, 含量达到峰值, 表明不定芽的分化诱导可能需要高水平的 ZRs 和ABA; 而 IAA 含量随着不定芽的诱导而逐渐降低, 不定芽分化时开始上升, 表明不定芽的分化可能不

需要高含量的 IAA。

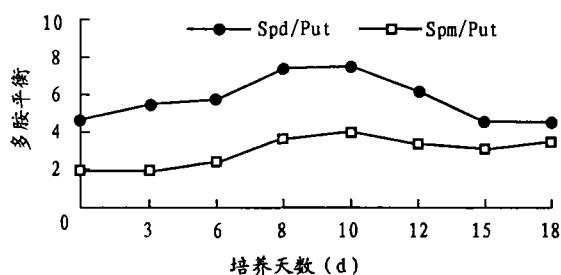


图4 大白菜 (贵龙5号) 下胚轴不定芽再生过程中内源多胺平衡的变化

Fig. 4 Changes of endogenous polyamine balance during shoot regeneration from hypocotyl explants of Chinese cabbage (cv. Guilong 5)

不同种类植物激素的生理效应有着相互促进或相互拮抗的效果, 一种激素的变化往往伴随着多种激素的相应变化, 不定芽再生中引起形态变化的某一个反应往往是多种激素间综合作用的结果, 而不是某一种激素单独作用的结果^[12]。因此, 必须从激素平衡的关系来探讨大白菜下胚轴不定芽诱导分化与激素的相关。多种植物的研究表明, 植物离体培养都遵循器官分化主要决定于外植体内源细胞分裂素和生长素的平衡^[13-15]。近年来在柑橘和苹果等植物上的研究发现, 不定芽再生过程中外植体内源ABA/IAA 值有着规律性的变化^[16-18]。本研究结果表明, 大白菜下胚轴不定芽分化过程中, 无论是ZRs/IAA 值, 还是ABA/IAA 值都呈现出一种动态的变化, 培养前期ZRs/IAA 值和ABA/IAA 值随着培养时间的延长不断增大, 培养8~10 d后达到最大值, 此后快速下降。ZRs/IAA 值和ABA/IAA 值的这种规律性变化体现了不定芽的分化过程: 下胚轴外植体接种到不定芽再生培养基上, 先逐渐产生透明状愈伤组织, 3~4 d后, 愈伤组织迅速膨大, 培养8~10 d出现绿色可见芽点, 接种后15 d呈较大的丛生芽状态。外植体接种15 d, 后ZRs/IAA 值和ABA/IAA 值又开始略有回升, 可能是因为此时不定芽已经分化完毕, 与外植体开始分化不定根有关。

3.2 大白菜下胚轴不定芽再生与内源多胺的关系

多胺是一类广泛存在于植物细胞中的生理活性物质, 近年来关于多胺代谢与高等植物离体形态建成之间的关系已有较多研究, 多胺能影响愈伤组织的形成和生长、不定芽和不定根的形成、体细胞胚的发生和发育、小鳞茎的形成等多种形态发生过程^[19]。田长恩等^[20]报道了甜瓜子叶外植体3种内源多胺含量高峰均发生在不定芽出现之前。本研究也

发现, 大白菜下胚轴外植体接入培养基后, 随着不定芽的诱导, 内源腐胺 (Put)、精胺 (Spm)、亚精胺 (Spd) 含量都呈上升趋势, 芽原基出现时 (接种后第8 d), 含量均达到峰值, 不定芽分化后含量持续下降; Spm/Put 值和 Spd/Put 值的变化趋势也与此相一致。说明了外植体内源多胺含量及其平衡对大白菜下胚轴不定芽再生有重要的调节作用。

关于多胺的作用机制, 有研究认为多胺在调控形态发生时主要起第二信使的作用^[20], 即外因或激素变化引起细胞内多胺变化, 再引起生理变化, 最终影响到形态发生。多胺通过对DNA、RNA 及蛋白质等生物大分子的代谢调节, 在植物细胞的生长、发育、增殖过程中起重要作用。迅速生长的组织中一般都伴有多胺含量的增加, 并且多胺的浓度及其生物合成速度的提高总是先于或与DNA 和蛋白质的增加同时发生。在枸杞、柑橘、水稻、荔枝中都观察到这种现象^[16, 21-23]。田长恩等^[2]在研究甜瓜子叶形态发生时也取得了与此结论相吻合的结果。本试验通过研究大白菜下胚轴不定芽再生过程中内源激素和多胺含量的变化, 可以看出, 外植体接种后内源多胺含量迅速增加, 在芽原基出现时 (接种第8 d) 达到最大值, 此时正是芽原基发生的初期阶段, 说明适于不定芽发生的外源激素配比首先引起了下胚轴外植体内源多胺水平发生显著变化。多胺如何调控基因表达并导致不定芽形态发生的机理, 尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 韩碧文, 李颖章. 植物组织培养中器官建成的生理生化基础 [J]. 植物学通讯, 1993, 10 (2): 1-6.
- [2] 田长恩, 叶蕙, 李人圭, 等. 多胺、可溶性蛋白质及过氧化物酶与甜瓜子叶不定芽发生的关系 [J]. 园艺学报, 1997, 24 (2): 199-200.
- [3] ZHANG F L, TAKAHATA Y, XU J B. Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17: 780-786.
- [4] HACHY J E, SHARMA K K, MOLONEY M M. Efficient shoot regeneration of *Brassica campestris* using cotyledon explants cultured *in vitro* [J]. Plant Cell Reports, 1991, 10: 549-554.
- [5] 卢永恩, 李汉霞, 叶志彪. 两种细胞分裂素对大白菜子叶再生的影响 [J]. 武汉植物学研究, 2003, 21 (4): 361-364.
- [6] 邢德峰, 李新玲, 王全伟, 等. 影响大白菜高效离体培养再生的因素 [J]. 植物生理学通讯, 2003, 39 (5): 220-224.
- [7] CHI G L, LIN W S, LEE J E E, et al. Role of polyamines in de novo shoot morphogenesis from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson *in vitro* [J]. Plant Cell Reports, 1994, 13: 323-329.
- [8] 朱丽华, 张彩琴, 盛小光, 等. 大白菜下胚轴离体不定芽高效再生体系的研究 [J]. 武汉植物学研究, 2005, 23 (5): 427-431.
- [9] 周雯, 郑志富, 陈薄言, 等. 专一识别脱落酸甲酯的单克隆抗体的制备和应用 [J]. 植物生理学报, 1996, 23 (3): 284-290.
- [10] 刘俊, 吉晓佳, 刘友良. 检测植物组织中多胺含量的高效液相色谱法 [J]. 植物生理学通讯, 2002, 38 (6): 596-598.
- [11] 黄学林, 李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控 [M]. 北京: 科学出版社, 1995: 23-25.
- [12] 中国科学院上海植物生理研究所细胞室. 植物组织和细胞培养 [M]. 上海: 科学技术出版社, 1978: 90-98.
- [13] 马晖玲, 张崇浩, 肖尊安, 等. 植物内源激素对原生质体培养的影响 [J]. 北京师范大学学报, 1997, 33 (3): 414-417.
- [14] 陶静, 詹亚光, 由香玲, 等. 白桦组培再生系统的研究 (Ⅱ)——组培过程中内源激素的变化 [J]. 东北林业大学学报, 1998, 26 (6): 6-9.
- [15] 唐玉林, 陈婉方, 周雯. 烟草叶块分化根和芽过程中内源激素水平的变化 [J]. 南京农业大学学报, 1996, 19 (2): 12-16.
- [16] 刘华英. 柑橘体细胞胚发生的细胞学及生理生化特性研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2004.
- [17] 裴东, 郑均宝, 凌艳荣, 等. 红富士苹果试管苗培养中器官分化及其部分生理指标的研究 [J]. 园艺学报, 1997, 24 (3): 229-234.
- [18] 郑均宝, 梁海水, 王进茂, 等. 杨和苹果离体茎尖培养和愈伤组织培养分化与内源IAA、ABA的关系 [J]. 植物生理学报, 1999, 25 (1): 80-86.
- [19] 田长恩. 多胺在离体培养的植物组织形态建成中的作用 [J]. 植物生理学通讯, 1992, 28 (3): 230-232.
- [20] 田长恩, 李人圭, 管和. 多胺与离体培养下甜瓜子叶形态发生的关系 [J]. 植物学报, 1994, 36: 219-222.
- [21] 胡忠, 谢晴宜, 王仑山, 等. 外源多胺对宁夏枸杞离体形态发生过程中可溶性蛋白组分和过氧化物酶同工酶谱的影响 [J]. 兰州大学学报, 2003, 39 (1): 63-68.
- [22] 陈伟, 吕柳新. 胚珠中多胺含量变化与胚胎发育的关系 [J]. 亚热带植物学报, 2000, 8 (3): 229-234.
- [23] 郭枫, 唐锡华. 水稻胚与胚乳分化发育中的内源多胺 [J]. 植物生理学报, 1990, 16 (2): 173-178.

(责任编辑: 林树文)