

高浓度 6-BA 诱导酸樱桃苗的玻璃化苗内源激素含量变化

高红兵, 唐晓杰, 孟庆繁

(北华大学林学院, 吉林 吉林市, 132013)

摘要:研究了培养基中不同浓度 6-BA 对酸樱桃组培苗玻璃化率及内源激素含量的影响,利用酶联免疫吸附分析法测定正常苗与玻璃化苗愈伤组织和芽中 IAA、GA₃ 和 ZR 含量。结果表明:高浓度 6-BA 导致组培苗玻璃化,当培养基中 6-BA 浓度为 0.5 mg · L⁻¹ 时,组培苗未出现玻璃化苗;当培养基中 6-BA 浓度为 3.0 mg · L⁻¹ 时,组培苗玻璃化率高达 95%。通过玻璃化苗和正常苗内源激素比较发现,玻璃化苗愈伤组织 IAA 和 GA₃ 含量明显高于正常苗愈伤组织中 IAA 和 GA₃ 含量,ZR 含量基本相等;玻璃化苗芽中 ZR 含量远远低于正常苗中 ZR 含量,而 IAA 和 GA₃ 含量基本不变,高浓度 6-BA 导致组培苗内源激素比例失调发生玻璃化。

关键词:组织培养;玻璃化;6-BA;IAA;GA₃;ZR;酸樱桃

中图分类号:S722.3⁺

文献标识码:A

Effect of High Level of 6-BA on the Endogenous Hormones Level Changes in the Vitrification Seedling of *Prunus cerasus*

GAO Hong-bing, TANG Xiao-jie, MENG Qing-fan

(Forestry College of Beihua University, Jilin City 132013, Jilin, China)

Abstract: This paper studied the effects of different levels of 6-BA on the vitrification rate of *Prunus cerasus* and the changes of endogenous hormones level, determined endogenous hormones content in the buds and callus by EnZRyme-linked Immunosorbent Assays. The results showed that the high level of 6-BA would raise the vitrification rate; as 6-BA content was 0.5 mg · L⁻¹, the vitrification rate was 0, as 6-BA content added to 3.0 mg · L⁻¹, the vitrification rate was 95%. In callus of the vitrification seedling, IAA and GA₃ level were higher than that of the normal seedling, ZR content was the same; In buds of the vitrification seedling, ZR level was lower than that of the normal seedling, IAA and GA₃ contents were equal. The high level of 6-BA would cause the dislocation of the endogenous hormones rate in the vitrification seedling.

Key words: tissue culture; vitrification; 6-BA; IAA; GA₃; ZR; *Prunus cerasus*

20 世纪 30 年代发展起来的组织培养技术经过几十年的探索,已经在林业、园林生产上得到广泛应用。但是,试管苗玻璃化现象严重降低组织培养的效率,造成人力、物力和财力的极大浪费,成为当今组织培养技术工业化生产的一大障碍。自 1981 年 Debergh 首先提出“玻璃化作用”的概念以来,探讨组培苗玻璃化原因的报道较多,组培苗培养过程中

湿度、温度和光照都会导致组培苗玻璃化^[1~5],实验表明培养基中 6-BA 浓度是影响试管苗玻璃化的一个重要原因^[6~8],其作用机理还不清楚。

酸樱桃(*Prunus cerasus* L.)是蔷薇科(Rosaceae)李属(*Prunus* L.)经济树木。在国外是园林绿化和美化观赏树种。笔者于 1999 年末从加拿大引进优良品种,利用组织培养技术对酸樱桃快速繁殖技

收稿日期:2005-08-10

基金项目:吉林省科技厅资助项目(20010224-1)“吉林省主要经济、生态林树种引进选育研究—唐棣、酸樱桃优良品种引进及扩繁技术”

作者简介:高红兵(1962—),男,副教授。主要研究方向:植物生理。电话:0432-4640262,Email: gao-hongbing@163.com

术进行研究发现:培养基中 6-BA 浓度与组培苗玻璃化率密切相关。因此,我们利用酶联免疫吸附法测定正常苗和玻璃化苗不同部位内源激素 IAA、ZR 和 GA₃ 含量变化,从植物激素角度了解 6-BA 导致试管苗玻璃化的原因。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为 3 年生酸樱桃苗木。

1.2 外植体的准备

外植体从栽植 3 年生苗木上剪取当年生萌动芽孢,用自来水加一滴洗洁精水溶液清洗材料表面的灰尘,再用自来水冲洗材料表面的洗洁精溶液。在超净工作台上用 0.1% HgCl₂ 表面消毒 8 min,后用无菌水冲洗接种材料 4~5 次。

1.3 培养基

以 MS 作为基本培养基,分别加入 0.1 mg · L⁻¹ IBA 和不同质量浓度的 6-苄基氨基腺嘌呤(6-BA)。

1.4 培养条件

外植体接种后置于培养室内培养,培养温度 23~28 ℃。每日光照 10 h,光照强度 1 800~2 000 lx,培养 30 d 后取样进行植物激素测定。

1.5 激素提取、纯化和定量测定

称取 0.5~1.0 g 新鲜植物材料,用液氮速冻后保存在 -20 ℃ 的低温冰箱中,加样品提取液(80% 甲醇内含 1 mmol · L⁻¹ 二叔丁基对甲苯酚),在冰浴下研磨成匀浆,转入试管中,摇匀后放置在 4 ℃ 冰箱中。4 ℃ 下提取 12 h,1 000 g 离心 15 min,取上清液。上清液过 C-18 固相萃取柱(纯化)。具体步骤是:80% 甲醇平衡柱→上样→收集样品→移开样品后用 100% 甲醇洗柱→100% 乙醚洗柱→100% 甲醇洗柱→循环。将过柱后的样品转入离心管中,用氮气吹干,除去提取液中的甲醇,定容。利用酶联免疫吸附法测定植物激素含量。

1.6 试验处理

试验设 3 个处理,MS + 0.1 mg · L⁻¹ IBA + 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA (处理 1);MS + 0.1 mg · L⁻¹ IBA + 1.5 mg · L⁻¹ 6-BA (处理 2);MS + 0.1 mg · L⁻¹ IBA + 3.0 mg · L⁻¹ 6-BA (处理 3)。

2 结果与分析

2.1 6-BA 对酸樱桃组培苗玻璃化率的影响

不同质量浓度 6-BA 对组培苗玻璃化率的影响

见表 1。从表 1 得出:当培养基中 6-BA 质量浓度为 0.5 mg · L⁻¹,组培苗玻璃化率为 0;6-BA 质量浓度为 1.5 mg · L⁻¹,组培苗玻璃化率为 10%;6-BA 质量浓度为 3.0 mg · L⁻¹,组培苗玻璃化率高达 95%;说明组培苗玻璃化率与培养基中 6-BA 含量成正相关。处理 1、处理 2 和处理 3 的愈伤组织体积分别为 0.057 cm³、0.415 cm³ 和 1.188 cm³,其原因是 6-BA 促进植物细胞的分裂,使愈伤组织发达。

表 1 不同处理酸樱桃组培苗玻璃化率与愈伤组织生长状况

处理	培养瓶数	玻璃化瓶数	玻璃化率/%	愈伤组织发育状况/cm		
				长	宽	高
1	60	0	0	0.42	0.38	0.36
2	60	6	10	0.95	0.78	0.56
3	60	57	95	1.32	1.20	0.75

2.2 内源激素 IAA、GA₃ 和 ZR 含量的变化

我们分别测定了处理 1 中正常苗和处理 3 玻璃化苗中内源 IAA、GA₃ 和 ZR 的含量,其结果见表 2。

表 2 玻璃化苗与正常苗内源激素含量

处理	测定部位	内源激素含量/(ng · g ⁻¹)		
		IAA	GA ₃	ZR
1	正常苗愈伤组织	372.45	130.22	250.60
	正常苗芽	187.57	124.43	253.71
3	玻璃化苗愈伤组织	514.65	506.82	264.91
	玻璃化苗芽	191.83	130.34	62.52

2.2.1 内源 IAA 含量的变化 正常苗愈伤组织内源 IAA 含量为 372.45 ng · g⁻¹,芽中为 187.57 ng · g⁻¹,愈伤组织中 IAA 与芽中 IAA 量比约为 2 : 1;玻璃化苗愈伤组织中 IAA 含量高达 514.65 ng · g⁻¹,芽中 IAA 含量为 191.83 ng · g⁻¹,二者比约为 2.68 : 1,正常苗与玻璃化苗芽中 IAA 含量基本相等,而玻璃化苗与正常苗愈伤组织 IAA 含量比为 1.38 : 1。

2.2.2 内源 GA₃ 含量的变化 正常苗愈伤组织内源 GA₃ 含量为 130.22 ng · g⁻¹,芽中为 124.43 ng · g⁻¹,二者比例约为 1 : 1,玻璃化苗愈伤组织中 GA₃ 含量高达 506.82 ng · g⁻¹,芽中 GA₃ 含量为 130.34 ng · g⁻¹,二者比例为 3.89 : 1,玻璃化苗与正常苗芽中 GA₃ 含量比约为 1 : 1。而玻璃化苗愈伤组织与正常苗愈伤组织中 GA₃ 含量比为 3.89 : 1。

2.2.3 内源 ZR 含量的变化 正常苗愈伤组织和芽中 ZR 含量,分别为 250.60 ng · g⁻¹ 和 253.71 ng · g⁻¹,二者含量比约为 1 : 1,玻璃化苗愈伤组织和芽中 ZR 含量分别为 264.91 ng · g⁻¹ 和 62.52 ng · g⁻¹,二者含量比为 4.24 : 1,玻璃化苗与正常

苗愈伤组织中 ZR 比约为 1 : 1, 而玻璃化苗与正常苗芽中 ZR 含量比为 0.25 : 1。

3 小结与讨论

(1) 正常苗的愈伤组织中 IAA 和 GA_3 与芽中 IAA 和 GA_3 含量比分别为 2 倍和 1 倍, 而玻璃化苗的愈伤组织中 IAA 和 GA_3 与芽中 IAA 和 GA_3 含量比分别 2.68 倍和 3.89 倍; 玻璃化苗愈伤组织中 IAA 和 GA_3 的绝对含量高于正常苗愈伤组织。玻璃化苗愈伤组织中 IAA 和 GA_3 的绝对含量是正常苗愈伤组织 IAA 和 GA_3 含量的 1.38 倍和 3.89 倍。造成上述现象的原因是培养基中高浓度 6-BA。施用外源生长调节剂可以改变内源激素水平, Centeno 等^[9]将在基本培养基中培养 7 d 的猕猴桃 (*Actinidia* sp.) 转移至含 $2.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 和 $0.27 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 培养基上, 叶柄内源激素水平发生显著变化, 内源 IAA 含量表现为顶端低而基部高的特征, 与酸樱桃玻璃化苗芽中 IAA 含量低于愈伤组织中含量结果一致。从表 1 可以看出: 玻璃化苗 (处理 3) 的愈伤组织非常发达, 其体积为 1.188 cm^3 , 是正常苗 (处理 1) 愈伤组织体积的 20 倍。愈伤组织细胞分裂是合成内源激素的场所, 高浓度 6-BA 导致愈伤组织的徒长, 而愈伤组织徒长是造成其中内源激素 IAA、 GA_3 含量高的原因。

(2) 玻璃化苗愈伤组织中 ZR 含量与正常苗愈伤组织中含量基本相等, 而玻璃化苗芽中 ZR 的含量远远低于正常苗中 ZR 的含量, ZR 含量比为 0.25 : 1。Barendse 等^[10]在烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 组织培养中发现, 6-BA 进入植物体内一部分转化为核苷; 有关外源 6-BA 对内源细胞分裂素含量变化影响报道极少, 而且试验结果各不相同, Centeno 等^[9]认为: 在猕猴桃组织培养中, 外源 6-BA 导致猕猴桃叶柄中内源玉米素类细胞分裂素大幅下降; 而 Van den Ende 等^[11]在烟草组织培养中外源 6-BA 导致内源 ZR 含量增加。酸樱桃玻璃化苗芽中 ZR 含量降低其原因可能是外源高浓度的 6-BA 影响了内源 ZR 的合成, 但这一结论有待进一步试验证明。由此可见, 高浓度 6-BA 导致玻璃化苗内源激素比例失调。国外一些学者对植物玻璃苗与正常苗形态解剖结构比较发现, 二者之间存在较大差异^[11~13], 如: 叶表缺少角质层蜡质; 微管束发育不全; 不具有栅栏组织等; 这一现象可能与内源激素比例失调有关。

通过上述试验可以得出如下结论: (1) 培养基中 6-BA 的浓度与酸樱桃组培苗愈伤组织发达程度和玻璃化率密切相关, 随着 6-BA 浓度的增加, 愈伤组织越发达, 当 6-BA 浓度达到 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时, 玻璃化率高达 95%。(2) 通过正常苗与玻璃化苗内源激素含量比较发现, 高浓度 6-BA 加大玻璃化苗愈伤组织中内源激素与芽中内源激素含量的比值, 提高了玻璃化苗愈伤组织 IAA 和 GA_3 含量, 降低了玻璃化苗芽中 ZR 含量, 最终导致组培苗内源激素比例失调, 所以笔者认为: 内源激素比例失调是产生玻璃化现象的重要原因之一。

参考文献:

- [1] 周莉娟, 姜秀勇. 影响香石竹组培苗玻璃化现象的若干原因 [J]. 福建农业学报, 1999(14): 102 ~ 106
- [2] 张晓军. 香石竹离体快繁过程中玻璃化现象的研究 [J]. 牡丹江师范学院学报, 1999(2): 14 ~ 15
- [3] 储成材, 李大卫. 牡丹组织培养中玻璃化现象的出现及初步观察 [J]. 信阳师范学院学报 (自然科学版), 1993, 6(1): 98 ~ 101
- [4] 韩建军. 叶子花组织培养条件与玻璃化的相关性 [J]. 中国林副特产, 2002(1): 48
- [5] 叶祖云, 陈爱萍. 几种因子对香石竹组培玻璃化苗形成的影响 [J]. 宁德师专学报 (自然科学版), 1998, 10(4): 286 ~ 288
- [6] 丰锋, 李红波, 谢建英. 芦荟组织培养中试管苗玻璃化的发生与防止 [J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(5): 449 ~ 451
- [7] 韩美丽, 陆荣生, 黄华艳. 绿巨人组织苗继带代过程中玻璃化苗及细菌污染的消除方法研究 [J]. 广西林业科学, 1999, 28(1): 16 ~ 19
- [8] 李任珠, 杨跃标. 美国芦荟离体培养中玻璃苗的复壮及快速繁殖的研究 [J]. 海南大学学报自然科学版, 2001, 19(3): 240 ~ 245
- [9] Centeno M L, Rodriguez A, Feito I, et al. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actinidia* tissue cultures [J]. Plant Cell Reports, 1996, 16: 58 ~ 62
- [10] Barendse G W M, Croes A F, Bosveld M, et al. Update and metabolism of NAA and BAP in explants of tobacco in relation to *in vitro* flower bud formation [J]. J Plant Growth Regul, 1987, 6: 193 ~ 200
- [11] Van den Ende, Croes A F, Kemp, et al. Development of flower buds in thin layer cultures of floral stalk tissue from tobacco; role of hormones in different stages [J]. Physiol Plant, 1984, 61: 114 ~ 118
- [12] Al Ababneh S S, Shibli R A. Cryopreservation of bitter almond (*Amygdalus communis* L.) shoot tips by encapsulation desiccation and vitrification [J]. Advances in Horticultural Science, 2003, 17(1): 15 ~ 20
- [13] Curtis O F, Shetty K. Growth medium effects of vitrification, total phenolics, chlorophyll, and water content of *in vitro* propagated oregano clones [J]. Acta Horticulturae, 1996, 426: 489 ~ 497
- [14] Schloupf R M, Barringer S A. A review of hyperhydricity in tissue [J]. Plant Growth Regulator Society of America Quarterly, 1996, 23(3): 149 ~ 158