

6-BA对酸樱桃组培苗4种内源激素质量分数动态变化的影响¹⁾

高红兵 王朋飞 刁绍启 曹丽娟

(北华大学,吉林省吉林市,132013)

摘要 研究了6-BA对酸樱桃组培苗中4种内源激素的质量分数动态变化的影响。结果表明:在培养5 d时,6-BA可促进酸樱桃组培苗内源IAA和ZR质量分数的增加,也可促进内源IAA和ZR的生物合成;6-BA对内源GA₃质量分数的影响与IAA和ZR相反,在培养初期,随着6-BA质量浓度的增加,GA₃质量分数下降,其原因可能是高质量浓度6-BA抑制了束缚态GA₃的水解,培养后期GA₃质量分数大幅上升;内源ABA质量分数一直呈下降趋势,随着6-BA质量浓度的增加,下降幅度加大。

关键词 生长素;赤霉素;细胞分裂素;脱落酸;组织培养
分类号 S722.37

Effect of 6-BA on Dynamic Changes of Four Endogenous Hormones Concentrations of *Prunus cerasus* Tissue Culture Seedlings/Gao Hongbing, Wang Pengfei, Diao Shaoqi, Cao Lijuan (Forestry College of Beihua University, Jilin 132013, P. R. China)//Journal of Northeast Forestry University. -2007,35(7). -46~48

An experiment was conducted to study the dynamic changes of four endogenous hormones concentrations in tissue culture seedlings of *Prunus cerasus* treated by 6-BA. Results show that the high concentration of 6-BA promotes the endogenous concentrations of IAA and ZR on the fifth day of cultivation, and also speeds the biosynthesis of IAA and ZR. The endogenous hormones concentration of GA₃ reduces with increasing concentration of 6-BA in the early days of cultivation. The reasons may be that 6-BA restrains the hydrolysis of bound GA₃. The concentration of GA₃ exhibits an obvious increasing tendency in the late days of cultivation. The concentration of ABA shows a decreasing trend and it reduces significantly with the concentration of 6-BA increasing.

Key words IAA; GA₃; ZR; ABA; Tissue culture

酸樱桃(*Prunus cerasus*)为蔷薇科(Rosaceae)李属经济树木。3~6 a开始结果,核果鲜红色至暗红色;果实成熟期早,产量较高,成熟的果园大约每公顷产7 500~22 500 kg;7~10 a进入盛果期,可持续15~20 a,寿命数十年。酸樱桃树姿优美,秋后叶子变为红色,是园林绿化和美化的观赏树种。北华大学于1999年末从加拿大引进优良酸樱桃品种,经过6 a的栽培试验,已在吉林省大面积推广^[1]。由于酸樱桃扦插、嫁接等方法繁殖率均很低,唐晓杰等利用组织培养技术对酸樱桃这一珍贵果树进行了快速繁殖,已经获得成功^[2]。在培养过程中发现,培养基中高质量浓度6-BA会诱导组培苗产生玻璃化现象。关于高质量浓度6-BA诱导组培苗玻璃化报道较多^[3-5],但关于6-BA诱导组培苗玻璃化机理的研究报道则极少。文中旨在通过研究不同质量浓度6-BA对酸樱桃组培苗芽中内源激素质量分数动态变化的影响,为解释高质量浓度6-BA诱导组培苗玻璃化现象的产生提供一些理论依据。

1 材料与方法

供试材料:4年生酸樱桃苗木。

外植体的准备:从栽培4年生苗木上剪取当年生萌动芽孢,剥去芽鳞,用自来水冲洗5~7次;在超净工作台上用70%~75%的酒精浸泡10 s后,用无菌水洗涤2~3次,再放入0.1%的升汞溶液中浸泡8 min,弃升汞,用无菌水洗涤4~5次,接种。

培养基:试验以MS作为基本培养基,共设3个处理:

1) MS+0.1 mg·L⁻¹ IBA+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA(处理1);

2) MS+0.1 mg·L⁻¹ IBA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA(处理2);

3) MS+0.1 mg·L⁻¹ IBA+3.0 mg·L⁻¹ 6-BA(处理3)。

培养条件:芽接种后置于培养室内培养,每个处理培养50瓶,共计150瓶。培养温度23~28℃,每日光照10 h,光照强度1 800~2 000 lx,培养5 d后开始记录、取样,记录芽高和愈伤组织生长状况,芽高为3个培养瓶中芽高平均数。取样部位是组培苗芽和叶,每隔5 d取一次,放入超低温冰箱中保存,然后进行植物激素测定。玻璃化率的统计在培养35 d时进行。

激素的提取、纯化和定量测定方法:称取0.5~1.0 g芽和叶,用液氮速冻后保存在-20℃的低温冰箱中,加入样品提取液(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——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质量分数。

2 结果与分析

酸樱桃组培苗芽的生长情况:试验酸樱桃组培苗芽的生长状况及产生玻璃化苗情况见表1,培养前芽的平均长度为0.5 cm,培养5 d后开始观察记录,芽的生长状况用3个芽最长叶片长度的平均值表示。由表1可以看出,处理1的芽在培养20 d时,叶片长度为1.2 cm,增加1.4倍,未出现愈伤组织;处理2叶片长度增加3.2倍,20 d时出现愈伤组织;处理3叶片长度增加3.7倍,愈伤组织在培育15 d时出现,20 d时较发达。可以看出高质量浓度6-BA会促进组培苗芽的生长和愈伤组织的发育。在培养35 d时进行玻璃化率统计,处理1未出现玻璃化苗,处理2玻璃化率为20%,处理3高达95%。

1) 吉林省科技厅资助项目(20010224-1)。

第一作者简介:高红兵,男,1962年11月生,北华大学林学院,副教授。

收稿日期:2007年2月3日。

责任编辑:李金荣。

由此可以看出,随 6-BA 质量浓度的增加,组培苗玻璃化率增加,当 6-BA 质量浓度达到 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,培养产生的组培苗几乎全部出现玻璃化现象。

表 1 不同处理芽和愈伤组织生长发育及产生玻璃化苗情况

各处理激素质量 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6-BA	叶片长度/cm				愈伤组织生长状况				玻璃化 率/%
		5 d	10 d	15 d	20 d	5 d	10 d	15 d	20 d	
0.1	1.0	0.5	0.6	0.8	1.2	-	-	-	-	0
0.1	2.0	0.5	1.0	1.3	2.1	-	-	-	+	20
0.1	3.0	0.6	1.3	1.8	2.8	-	-	+	++	95

注:“-”表示愈伤组织未出现;“+”表示愈伤组织不发达;“++”表示愈伤组织较发达。

芽中内源 IAA 质量分数的动态变化:由表 2 可以看出,各处理的酸樱桃组培苗内源 IAA 质量分数总体变化呈上升趋势。随着外源 6-BA 质量浓度的升高,内源 IAA 上升幅度加大。在培养 5 d 时,处理 3 内源 IAA 质量分数分别是处理 1 和处理 2 的 1.42 倍和 1.02 倍;培养 10 d 时,处理 3 表现出明显的上升趋势,处理 2 和处理 1 保持原趋势;培养 15 d 时,处理 3 急剧升高,与第 5 天相比上升 15%,而处理 1 和处理 2 维持原趋势;在培养 20 d 时,处理 3 的内源 IAA 质量分数开始大幅上升,较 5 d 时增加 73%,而处理 1 和处理 2 仅分别上升 23% 和 9%。此时,各处理 IAA 质量分数之比为处理 1:处理 2:处理 3 = 1:1.26:2.06,处理 1 质量分数最低,处理 3 最高。

表 2 芽中 IAA、 GA_3 、ZR 和 ABA 质量分数的动态变化

各处理激素质量 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6-BA	培养时 间/d	内源激素质量分数/ 10^{-9}			
			IAA	GA_3	ZR	ABA
0.1	1.0	5	176.744	1 662.757	46.968	248.718
		10	174.948	1 912.381	63.000	233.421
		15	172.194	1 404.904	36.954	130.376
		20	211.488	1 880.425	65.010	130.089
0.1	2.0	5	245.892	1 204.131	58.729	204.246
		10	241.009	1 620.198	71.658	196.057
		15	246.677	1 392.489	59.161	106.285
		20	267.072	2 015.911	88.075	119.945
0.1	3.0	5	250.969	1 250.877	69.986	196.173
		10	256.215	1 552.263	88.363	139.849
		15	288.157	1 536.260	68.219	88.948
		20	434.721	2 690.303	109.651	115.224

芽中内源 GA_3 质量分数的变化:由表 2 可以看出,3 个处理内源 GA_3 质量分数的变化,除了在培养 15 d 时下降外,总体呈上升趋势。在培养 5 d 时,处理 1 内源 GA_3 质量分数分别是处理 2 和处理 3 的 1.38 倍和 1.33 倍,说明高质量浓度 6-BA 在培养初期会影响内源 GA_3 质量分数,这与内源 IAA 质量分数的变化正好相反;在培养 10 d 时,各处理的 GA_3 质量分数均上升,处理 1 上升 15%,处理 2 上升 34%,处理 3 上升 24%;培养 15 d 时,处理 1 下降 36%,下降幅度最大,处理 2 下降 16%,处理 3 质量分数变幅不大;培养 20 d 时,处理 3 内源 GA_3 质量分数大幅上升,增加 75%,处理 2 上升 45%,处理 1 上升 33%。在培养 20 d 时,各处理 GA_3 质量分数之比为处理 1:处理 2:处理 3 = 1:1.07:1.43,处理 1 质量分数最低,处理 3 最高。

芽中内源 ZR 质量分数的变化:由表 2 可以看出,3 个处理内源 ZR 在整个过程中变化趋势一致,在培养 5~10 d 时呈上升趋势,15 d 时下降,而在 20 d 时又开始大幅上升。随着外源 6-BA 质量浓度的增加,内源 ZR 质量分数增大。在培养 5

d 时,处理 3 的内源 ZR 质量分数最高,是处理 1 和处理 2 的 1.5 倍和 1.2 倍;在培养 10 d 时,3 个处理 ZR 均增加约 25%;在培养 15 d 时,3 个处理均下降,处理 1 下降 75%,降幅巨大,处理 2 和处理 3 下降 20%~30%;培养 20 d 时,各处理内源 ZR 开始大幅上升,处理 3 上升 60%,处理 2 上升 49%,处理 1 上升 76%。3 个处理 ZR 质量分数之比为处理 1:处理 2:处理 3 = 1:1.35:1.67,处理 1 质量分数最低,处理 3 最高。

芽中内源 ABA 质量分数的变化:由表 2 可以看出,组培苗芽中内源 ABA 质量分数总体变化趋势是先降后升,在培养 5~15 d 时一直呈下降趋势,20 d 时略有上升。在培养 5 d 时,处理 1 内源 ABA 质量分数最高,分别是处理 2 和处理 3 的 1.22 倍和 1.26 倍。在培养 10~15 d 时,处理 3 ABA 质量分数大幅度下降,10 d 时下降 41%,15 d 时降幅高达 120%;处理 2 在 10 d 时下降幅度较小,在 15 d 时下降达 92%;处理 1 在 15 d 时下降 86%。在培养 20 d 时,3 个处理 ABA 质量分数均小幅度增加,3 个处理 ABA 质量分数之比为处理 1:处理 2:处理 3 = 1.13:1.03:1,处理 1 质量分数最高,处理 3 最低。

3 结论与讨论

随着外源 6-BA 质量浓度的增加,内源 IAA 质量分数随之增加。在培养 5 d 时,处理 3 和处理 2 芽中内源 IAA 质量分数比处理 1 高出约 40%,说明高质量浓度 6-BA 会诱导内源 IAA 的生物合成。陶静等在白桦组织培养中研究发现,外源 6-BA 会促进内源 IAA 和 IPA 的合成^[6],本试验也验证了这一结论。随着培养时间的延长,处理 3 内源 IAA 质量分数在 10 d 时增长加快,15 d 时大幅度增加,此阶段芽生长较快,并出现了愈伤组织(表 1),而芽和愈伤组织^[7]可以合成内源激素,导致处理 3 内源 IAA 质量分数大幅度增加。

在培养初期,高质量浓度 6-BA 会导致内源 GA_3 质量分数的下降。在培养 5 d 时,处理 1 内源 GA_3 质量分数比处理 2 和处理 3 分别高 1.38 倍和 1.33 倍,这种变化规律与 IAA 变化正好相反。芽中内源 GA_3 质量分数的下降可能源于两个原因:一是高质量浓度 6-BA 通过抑制犍牛儿焦磷酸 GA_3 生物合成途径使 GA_3 质量分数下降;二是高质量浓度 6-BA 抑制束缚态 GA_3 水解成游离态 GA_3 。目前还未见到关于高质量浓度 6-BA 抑制内源 GA_3 生物合成的报道,笔者认为 GA_3 质量分数下降的原因可能是后者。从培养 10~15 d 内源 GA_3 质量分数的变化规律来看,处理 1、处理 2 和处理 3 在培养 10 d 时略有上升,而 15 d 时处理 1 内源 GA_3 质量分数则大幅下降,可能由于原来芽中束缚态 GA_3 被消耗殆尽,而内源 GA_3 合成尚未跟上所致。处理 3 在培养 15 d 时,芽的生长速度明显高于处理 2 和处理 1,并且开始出现愈伤组织,内源 GA_3 的合成要快于处理 1 和处理 2,因此下降幅度最小,其次是处理 2,处理 1 下降幅度最大。在培养 20 d 时,处理 3、处理 2 和处理 1 内源 GA_3 质量分数均开始增加,处理 3 增加幅度最大,这是由于芽和愈伤组织快速生长,而芽和愈伤组织是合成 GA_3 的场所,因此导致 GA_3 快速增加。

通过实验可以看出,外源 6-BA 会影响组培苗中内源 ZR 的质量分数,随着 6-BA 质量浓度的增加内源 ZR 质量分数增加。在培养 5 d 和 10 d 时,处理 1、处理 2 和处理 3 ZR 质量分数比约为 1:1.2:1.5。Vanden Ende 等^[8-10]在组织培养中发现,外源 6-BA 会导致内源 ZR 质量分数上升,与本试验结果相吻合。可以肯定,在培养初期高质量浓度 6-BA 会促进内源 ZR 的生物合成;而在培养 15 d 时,内源 ZR 质量分数大幅度下降,推测其原因可能是 ZR 合成前体被大量消耗,造成 ZR 合成减慢导致质量分数下降;在培养 20 d 时,组培苗芽

中ZR继续上升,此时组培苗叶子生长较快,光合作用增强,为ZR合成提供大量原料,使得内源ZR质量分数增加,同时芽和愈伤组织旺盛生长也是导致ZR质量分数增加的原因。

ABA在植物生长发育过程中起抑制生长并促进休眠与衰老的作用,ABA是CTK的拮抗物,它的消长过程与外源6-BA质量浓度完成相反^[11]。通过试验可以看出:在培养5~15d时,ABA的质量分数明显下降,尤其是处理3其下降幅度最大;培养15~20d时,处理1ABA的质量分数小幅度下降,处理2和处理3则略有升高。芽的生长速度与ABA质量分数呈负相关,ABA质量分数越低芽的生长越快。有关内源ABA在组织培养中作用的研究报道很少,随着培养时间延长,内源ABA呈下降趋势,外源6-BA会加快这一进程。

高质量浓度6-BA会诱导组培苗玻璃化已达成共识,通过试验可以看出:处理1组培苗玻璃化率为0,而处理3高达95%。通过处理1和处理3的各内源激素比较来看,在培养初期正常苗(处理1)与玻璃化苗(处理3)各内源激素质量分数之比IAA为1:1.42,GA₃为1.33:1,ZR为1:1.49,ABA为1.27:1;到培养20d时,各激素质量分数比IAA为1:2.05,GA₃为1:1.43,ZR为1:1.69,ABA为1.13:1。从培养5d时开始,正常苗内源IAA和ZR质量分数低于玻璃化苗IAA和ZR质量分数;20d时,二者差距进一步加大,IAA从1:1.42增加至1:2.05,ZR从1:1.49增加至1:1.69。而正常苗内源GA₃和ABA质量分数在培养5d时均高于玻璃化苗,到培养20d时GA₃质量分数比发生巨大变化,从1.33:1降低至1:1.43,ABA从1.27:1降低为1.13:1。总体来看,高质量浓度6-BA导致组培苗内源IAA、GA₃和ZR质量分数的上升和内源ABA质量分数的下降。植物体内IAA、GA₃和ZR具有促进植物细胞生长、分裂和分化等生理作用,而ABA具有抑制生长作用。通过正常苗和玻璃化苗内源激素质量分数的比较可以看出,

(上接45页)倍,0.20 L/(L·min)处理的1.3倍,其差异非常明显;绿芽直径、鲜质量和干质量也在0.10 L/(L·min)处理显著优于0.05和0.20 L/(L·min)处理,而0.05和0.20 L/(L·min)处理无差异。故通气量0.10 L/(L·min)适合绿芽分化和生长。

表6 反应器内通气量对玉兰花绿芽分化的影响

通气量/L·L ⁻¹ ·min ⁻¹	绿芽分化数/个	绿芽直径/mm	鲜质量/mg	干质量/mg
0.05	4.8 c	3.9 b	88.47 b	7.21 b
0.10	8.2 a	17.1 a	107.46 a	13.94 a
0.20	6.1 b	4.6 b	72.67 b	7.30 b

注:同列中不同字母代表差异显著,P<0.05。

3 结语

近年来百合^[5-6]、人参^[7]、马铃薯^[8]等在生物反应器培养中已获得成功,然而由于植物器官培养的复杂性,阻碍着植物器官培养生物反应器的发展进程。故利用多种植物,通过调节反应器的理化因素使反应器内环境达到最佳,同时开发植物器官培养专用生物反应器显得非常重要。从本试验结果可知,利用生物反应器进行玉兰花根状茎和绿芽的诱导效果显著好于传统组织培养方式,3L柱型气升式生物反应器内接入200个根状茎外植体,注入空气0.01 L/(L·min)时有利于根状茎的增殖和绿芽的分化。生物反应器培养是一种比较好的培养方式,它不但可以提高玉兰花根状茎增殖速度,在短期

上述内源激素比例会造成酸樱桃组培苗的快速生长,笔者认为酸樱桃组培苗芽和愈伤组织的徒长是产生玻璃化现象的一个重要原因。

参考文献

- [1] 林宝山. 欧洲酸樱桃品种伊温斯引种栽培试验初报[J]. 中国果树, 2005(6):36-38.
- [2] 唐晓杰, 孟庆繁, 杨振国, 等. 酸樱桃组织培养及快速繁殖技术研究[J]. 北华大学学报:自然科学版, 2004, 5(4):355-357.
- [3] 丰锋, 李洪波, 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.
- [4] 韩美丽, 陆荣生, 黄华艳, 等. 绿巨人组织苗继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.
- [5] 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.
- [6] 陶静, 詹亚光, 由香玲, 等. 白桦组培再生系统的研究(Ⅲ)——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.
- [7] 朱青松, 梅康凤, 王沙生. 外源生长素烟草髓愈伤组织分化和内源IAA含量的影响[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(1):22-25.
- [8] Vanden E, Cross A F, Kemp A, et al. Development of flower buds in the layer cultures of floral stalk tissue from tobacco; role of hormones in different stages[J]. Physiol Plant, 1984, 61:114-118.
- [9] R Zhang, X Zhang, J Wang, et al. The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue expressing an ipt gene[J]. Planta, 1995, 196:84-94.
- [10] Little C E A, Savidge R A. The role of plant growth regulator in forste tree cambial growth[J]. Plant Growth Regulation, 1987(6):137-169.
- [11] 刘桂丰, 杨传平, 温绍龙, 等. 盐逆境条件下三个树种的內源激素变化[J]. 东北林业大学学报, 1998, 26(1):1-3.

内获得大量的外植体,而且也可培养出健康的幼苗。因此,生物反应器培养可为商业化生产提供一种新的途径。目前,虽然能应用生物反应器阶段性的完成每个生长过程,但关于从根状茎的增殖到幼苗的生长阶段的一体化,还需要更进一步的研究。

参考文献

- [1] 卢思聪. 兰花栽培入门[M]. 北京:科学出版社, 1998.
- [2] 罗林会, 曹小路, 董毅. 兰花植物组织快繁研究[J]. 遵义科技, 2003, 31(3):13-15.
- [3] 陈振光. 园艺植物离体培养学[M]. 2版. 北京:中国农业出版社, 1998:182.
- [4] 周立刚, 邦光植. 植物细胞大量培养的工艺学[J]. 生物工程进展, 1991, 11:29-35.
- [5] Lian M L, Chakrabarty D, Paek K Y. Growth of *Lilium oriental* hybrid 'Casablanca' bulblet using bioreactor culture[J]. Sci Horti, 2003, 97:441-448.
- [6] Seon J H, Kim Y S, Son S H, et al. The Fedbatch culture system using bioreactor for the bulblet production of Oriental lilies[J]. Acta Hort, 2000, 520:53-59.
- [7] Asakai I, Li L, Hirofumi M, et al. Production of ginsenoside saponin by cultureing ginseng (*Panax ginseng*) embryogenic tissues in bioreactors[J]. Biotech Lett, 1993, 15:1259-1264.
- [8] Akita M, Ohta Y A. Simple method for mass propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a bioreactor without forced aeration[J]. Plant Cell Rep, 1998, 18:284-247.