

张慧君,葛宇,杨先锋,等.内源激素对橡胶树花药体细胞胚发生的影响[J].江苏农业科学,2016,44(7):239-241.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.067

内源激素对橡胶树花药体细胞胚发生的影响

张慧君¹,葛宇³,杨先锋²,李季²,黄天带²

(1. 淮北师范大学生命科学学院资源植物生物学安徽省重点实验室,安徽淮北 235000;

2. 中国热带农业科学院橡胶研究所/农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室,海南儋州 571737;

3. 中国热带农业科学院海口实验站,海南海口 570102)

摘要:以巴西橡胶树花药为外植体,对巴西橡胶树再生过程中不同类型愈伤组织的内源激素含量及比值进行测定。结果表明:过高或过低的内源激素含量和不同内源激素含量比,大多会导致橡胶树外植体在分化过程中出现非胚性愈伤和畸形胚,因此橡胶树花药体细胞胚再生过程与其内源激素密切相关。

关键词:橡胶树;花药;再生;体细胞胚;内源激素

中图分类号: S794.105 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0239-03

高等植物体细胞胚发生是离体生长发育中一个复杂的科学问题,受内外多种因素的影响,目前人们尚未掌握其离体发育规律。植物离体培养过程中植物激素起着重要的调控作用,它们的调控是引起各细胞组织和器官分化的基础,从而维持植物正常的离体发育过程,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很多外源激素的诱导^[1-2]。对于植物离体培养中体细胞胚发育过程,只有胚

性愈伤才能形成正常胚,畸形胚难以形成正常的组培苗,这种情况严重制约了组培苗工厂化的生产和育种的应用。因此,本试验对橡胶树花药组织培养过程中非胚性愈伤和胚性愈伤、畸形胚和正常胚不同内源激素含量进行研究,对建立高效巴西橡胶树体细胞胚再生体系以及种质资源保存具有一定意义。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料以巴西橡胶树优良无性系热研 7-33-97 花药为外植体,花药培养参照 Hua 等的方法^[3],然后分别取培养 60 d 的胚性愈伤组织(简称 a)、非胚性愈伤组织(简称 b)、子叶胚时期的正常胚(简称 c)和畸形胚(简称 d)用液氮速冻,

收稿日期:2015-05-15

基金项目:淮北师范大学博士科研启动费(编号:15600973);现代农业产业技术体系建设专项(编号:NYCYTX-34)。

作者简介:张慧君(1982—),男,黑龙江哈尔滨人,博士,讲师,从事园林植物生物技术研究。E-mail:zhuijun@126.com。

氮源处理。而黄大斌等研究发现,在琼脂培养基上以蛋白胨、酵母汁为氮源处理的菌丝生长速度不如柠檬酸铵、硝酸铵、硫酸铵等无机氮源处理^[7]。因此,如果用琼脂培养基活化樟芝菌种,应采用无机氮源;如果进行樟芝菌丝体的液体发酵生产,则应采用有机氮源。

本研究表明,以葡萄糖为碳源处理的樟芝菌丝产量明显高于麦芽糖、半乳糖处理,且葡萄糖是仅次于天然多糖类物质的碳源。而黄大斌等研究表明,在琼脂培养基上,以葡萄糖为碳源处理的菌丝生长速度快于山梨醇糖、半乳糖、麦芽糖、淀粉处理^[7]。因此,以葡萄糖作为碳源,不但适于樟芝菌种的活化,而且适于樟芝菌丝体的液体发酵生产。

本研究还表明,在樟芝的液体发酵培养基中不需要添加维生素。因此,可以推测在樟芝菌丝生长过程中,菌丝体会合成自身生长所需维生素。

参考文献:

- [1]梁志钦.台湾特有真菌——樟芝的药用价值[C]//中国菌物学会首届药用真菌产业发展暨学术研讨会论文集.江苏南通:中国菌物学会药用真菌专业委员会,2005:76-78.
- [2]浦跃武,熊冬生.樟芝的研究及其应用现状[J].中国医院药学

杂志,2005,25(2):171-173.

- [3]陈体强,李开本,林章余.台湾食(药)用菌发展现状[J].福建农业科技,2000(1):20-21.
- [4]张东柱.台湾特有珍贵药用真菌牛樟芝[J].食药用菌,2011,19(1):33-34.
- [5]宋爱荣,田雪梅.不同装瓶量对樟芝液体深层培养的影响[J].新疆大学学报:自然科学版,2004,21(增刊1):131-133.
- [6]刘华,贾薇,刘艳芳,等.珍稀药用真菌——樟芝深层发酵培养条件的优化[J].微生物学通报,2007,34(1):70-74.
- [7]黄大斌,杨菁,黄进华,等.樟芝生物学特性研究[J].食用菌学报,2001,8(2):24-28.
- [8]黄志伟,程祖铨,谢宝贵,等.樟芝菌丝体的固体培养特性研究[J].中国食用菌,2015,34(2):29-32.
- [9]宋爱荣.台湾樟芝对碳源营养源利用的研究[J].中国食用菌,2002,21(5):41-43.
- [10]宋爱荣.樟芝对氮素营养源利用的研究[J].菌物研究,2004,2(1):45-48.
- [11]陈娟,姜兴华,范青生,等. Plackett-Burman 法筛选樟芝液态发酵培养基碳氮源[J].南昌大学学报:理科版,2010,34(5):466-470.
- [12]凌庆枝,刘国庆,袁怀波. pH 和无机盐对樟芝液体发酵的影响[J].食品科学,2007,28(11):365-369.

置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待测。

1.2 方法

内源激素的测定采用酶联免疫法,采集 4 种类型材料,重复 3 次,1 次 10 个样品材料,于液氮中速冻;用 80% 甲醇溶液匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 提取 8 h,4 000 r/min 离心 15 min;沉淀用 80% 甲醇提取,重复 3 次;合并上清液,然后用氮气吹干,由中国农业大学生物技术实验室提供测试服务,每个指标的测定均重复 3 次。

应用 DPS 软件对试验数据进行统计分析,利用 Excel 2007 作图。

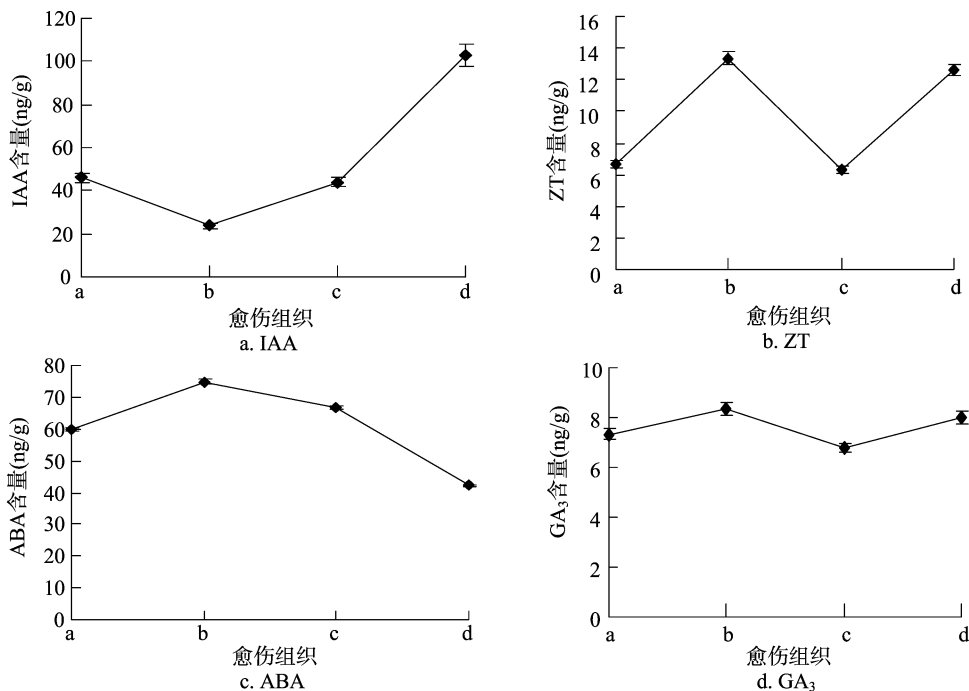


图1 再生过程中4种激素含量在不同愈伤组织中的变化

2.2 内源激素比值的变化

在花药愈伤再生过程中,不同内源激素含量比值在 4 种愈伤组织中是不同的(图 2)。IAA/ZT、IAA/GA₃ 和 IAA/ABA 的含量比在非胚性愈伤组织(b)中最低,ZT/ABA 和 GA₃/ABA 的含量比在畸形胚(d)中最低;IAA/ZT、IAA/ABA 和 GA₃/ABA 的含量比在胚性愈伤组织(a)中最高,IAA/GA₃ 和 ZT/ABA 的含量比分别在畸形胚(d)和非胚性愈伤组织中最高。

3 讨论与结论

许多学者研究表明,在植物离体细胞发育过程中,生长素类物质起重要作用,比如启动细胞分裂和诱导胚性潜力,从而促进外植体早期发育,所以说植物体的各种生理效应是内源激素相互作用的结果^[4-5]。研究表明,细胞分裂素 6-BA 可以诱导水稻花药等愈伤组织以不定芽的形态分化,由愈伤组织形成的出苗率与内源生长素存在负效应,出苗率与内源细胞分裂素存在正效应。这说明一些植物愈伤组织在植物激素作用下所分化的不定芽是受外界诱导从而自身产生的内源激素所影响的,已经可以满足外植体不定芽生长发育的需要^[5-6],再添加其他植物激素反而适得其反。邢登辉等研究

2 结果与分析

2.1 内源激素含量的变化

如图 1 所示,在花药愈伤再生过程中,ZT 在非胚性愈伤组织(b)和畸形胚(d)中含量相对较高,在胚性愈伤组织(a)和正常胚(c)中含量相对较低;IAA 在畸形胚中含量最高,在非胚性愈伤组织中含量最低;ABA 在非胚性愈伤组织中含量最高,在畸形胚中含量最低;GA₃ 含量在各组织中变化趋势与 ZT 相似,在非胚性愈伤组织和畸形胚中含量相对较高,在胚性愈伤组织和正常胚中含量较低。

表明,体细胞胚发生过程中,黄冠草体胚 IAA 含量分别在培养 10、25 d 后达到峰值^[7],这与朱丽华等在大白菜和桑下胚轴愈伤组织不定芽发生过程中的结果^[8-9]类似。前人的研究说明愈伤组织的形成与内源 IAA 关系密切。赖钟雄等发现,龙眼的胚性愈伤组织内源 IAA 含量比非胚性愈伤组织高,从早期的胚性愈伤组织发育到早期子叶胚的过程,其内源 IAA 含量都维持在较高水平,并且在胚性愈伤组织和球形胚 2 个时期出现高峰,而球形胚时期后 IAA 含量降低^[10]。本研究中,从花药体胚的不同愈伤组织的 IAA 含量来看,胚性愈伤组织和正常胚相对于非胚性愈伤组织较高,与前人的结果一致,这可能与愈伤组织形成有关。前人研究表明,胡萝卜再生过程中 GA₃ 含量高可能会抑制其体胚发生。2,4-D 抑制体胚发育是通过维持高含量 GA₃ 来进行的,当减少 2,4-D 含量时,GA₃ 迅速降到适合体胚发育的含量。同样本研究发现,GA₃ 在非胚性愈伤和畸形胚中含量相对较高,在胚性愈伤和正常胚中含量较低。可见在橡胶树花组织培养过程中,形成正常胚时 GA₃ 的含量较低,而在非愈伤组织、畸形胚中相对较高。ZT 含量与 GA₃ 的变化趋势相同,但变化幅度较大,都是在胚性愈伤和正常胚中含量较低。可见,要想获得更多的橡胶树花药组培苗须降低内源 ZT 的含量。

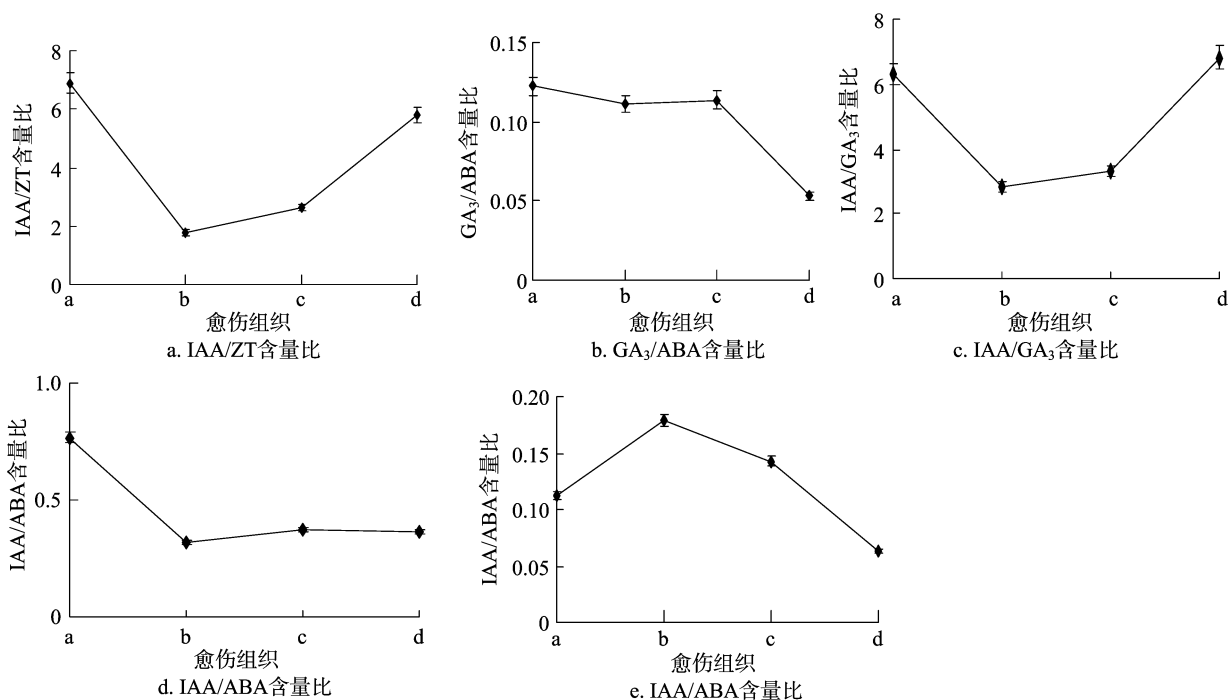


图2 再生过程中不同激素含量比在不同愈伤组织中的变化

通常细胞分裂素与生长素含量比越小越有利于不定根分化,反之有利于不定芽分化。此外,IAA/ABA 比是影响植物再生的关键因素。Berry 等的研究表明,不定芽产生的愈伤组织内 IAA 与 ABA 含量比小于 1^[11-12]。本研究结果表明,在正常胚中 IAA/ABA 的比最高,说明橡胶树花药离体培养时,较高的 IAA/ABA 含量比有利于正常胚的形成。上述结果进一步表明,植物生长调节剂在植物体内的调控作用并不决定于某单一激素,往往都是一种或者几种以上的激素通过联合或拮抗作用共同调节的结果^[13-15]。总之,植物内源激素在橡胶树体细胞胚发生和发育过程中起到重要的作用,过高或过低的 4 种内源激素含量和不同内源激素含量比,大多会导致橡胶树外植体在分化过程中出现非胚性愈伤和畸形胚。但至今仍不知道这些激素通过何种途径来调控巴西橡胶树的作用机制,关于畸形胚及其形成原因以及降低畸形胚发生率等措施等有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Noma M, Huber J, Ernst D, et al. Quantitation of gibberellins and the metabolism of [³H] gibberellin A₁ during somatic embryogenesis in carrot and anise cell cultures[J]. *Planta*, 1982, 155(5): 369-376.
- [2] 何钟佩. 作物激素生理及化学控制[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1997.
- [3] Hua Y W, Huang T D, Huang H S. Micropropagation of self-rooting juvenile clones by secondary somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*[J]. *Plant Breeding*, 2010, 129(2): 202-207.
- [4] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 48-64.
- [5] 肖关丽, 杨清辉, 李富生, 等. 内源激素变化与甘蔗愈伤组织分化

绿苗关系研究[J]. 种子, 2003(1): 10-11.

- [6] Centeno M L, Rodriguez A, Feito I, et al. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures[J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 16(1/2): 58-62.
- [7] 邢登辉, 赵云云, 黄承芬. 皇帽草体细胞胚胎发生及其体胚发生过程中内源激素的变化[J]. *生物工程学报*, 1999, 15(1): 100-105.
- [8] 朱丽华, 张彩琴, 盛小光, 等. 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[J]. *福建农业学报*, 2006, 21(2): 143-146.
- [9] 张和禹, 赵正龙. 桑下胚轴愈伤组织诱导及分化过程中内源激素的变化[J]. *蚕业科学*, 2000, 26(1): 1-4.
- [10] 赖钟雄, 陈春玲. 龙眼体细胞胚胎发生过程中的内源激素变化[J]. *热带作物学报*, 2002, 23(2): 41-47.
- [11] Berry T, Bewley J D. A role for the surrounding fruit tissues in preventing the germination of tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds: a consideration of the osmotic environment and abscisic acid[J]. *Plant Physiology*, 1992, 100(2): 951-957.
- [12] 裴东, 郑均宝, 凌艳荣, 等. 红富士苹果试管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): 24-29.
- [13] Beemster G S, Baskin T I. Stunted plant 1 mediates effects of cytokinin, but not of auxin, on cell division and expansion in the root of *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(4): 1718-1727.
- [14] 张慧君, 陈劲枫. 植物组织培养生理机制的研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(3): 33-35.
- [15] 郭瑾, 薛永来, 杜道林. 植物激素调控拟南芥根系发育的研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(5): 7-10.