

石刁柏胚性细胞诱导过程中的内源激素和多胺含量变化

陈小飞 萧浪涛* 鲁旭东 童建华

湖南农业大学湖南省植物激素与生长发育重点实验室, 长沙 410128

提要 用高效液相色谱法分析石刁柏愈伤组织胚性细胞诱导过程中不同时期内源激素和多胺含量的结果表明, 在胚性细胞诱导过程中, Put和GA₃一直呈上升趋势, 胚性细胞出现时, IAA、Put和GA₃含量都达到最高水平, 显示高含量的IAA以及高比例的Put/(Spd+Spm)可能有利于胚性细胞的形成。

关键词 石刁柏; 胚性细胞; 内源激素; 内源多胺

Changes in Endogenous Phytohormone and Polyamine Contents during Embryogenic Cells Induction of *Asparagus officinalis* L.

CHEN Xiao-Fei, XIAO Lang-Tao*, LU Xu-Dong, TONG Jiang-Hua

Hunan Provincial Key Laboratory of Phytohormones and Development, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Abstract The changes in endogenous phytohormone and polyamine contents during embryogenic cells induction of *Asparagus officinalis* L. were analyzed by HPLC. The results showed that Put and GA₃ contents increased during embryogenic cells induction. IAA, Put and GA₃ contents reached the highest level when embryogenic cells began to appear. It indicated that the high level of IAA and high ratio of Put/(Spd+Spm) were maybe advantageous to embryogenic cells induction of *A. officinalis*.

Key words *Asparagus officinalis* L.; embryogenic cell; endogenous phytohormone; endogenous polyamine

体细胞胚胎发生过程可分为胚性细胞诱导和胚胎发育2个阶段, 前者是体细胞胚发生过程中的关键步骤, 胚性愈伤组织质量高低直接影响体胚发生发育状况(陈以峰等1998)。胚性愈伤组织也是种质资源离体保存、外源基因转化以及体细胞融合的理想材料。植物激素的调节作用是体细胞胚胎发生过程中最重要的因素, 一般认为生长素是诱导体细胞胚发生的关键因素, 内源IAA含量上升或维持在较高水平可能是胚性细胞出现的一个共同标志, 但也有与此观点不同的报道(Auborio等1989; 王丽等1998)。多胺能促进植物细胞生长、分化和增殖, 并参与胚胎发育、花芽分化、延缓衰老等生命活动(Walden等1997; Wallace等2003)。关于离体培养中内源激素和多胺含量变化的研究较多(张木清和余松烈1996; 田长恩1992; 黄学林和李筱菊1995; 林红和程井辰1991; 崔凯荣和刑更生2000), 但在胚性细胞诱导过程中将激素和多胺结合起来考虑的报道尚少。本文以石刁柏(*Asparagus officinalis* L.) 'UC800'为材料, 用高效液相色谱(HPLC)分析了

胚性细胞诱导过程中内源脱落酸(ABA)、玉米素(ZT)、吲哚乙酸(IAA)、赤霉素3(GA₃)和内源腐胺(Put)、亚精胺(Spd)、精胺(Spm)的含量变化。

材料与方法

外植体为长10 cm左右的石刁柏'UC800'(*Asparagus officinalis* L. cv. UC800)嫩茎, 经0.1%升汞消毒8~10 min, 无菌水洗后切成切段, 接种在MS+1 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+2 mg·L⁻¹ 2, 4-D培养基上(MS培养基加3%蔗糖、0.8%琼脂, pH 5.8, 下同), 于40 μmol·m⁻²·s⁻¹光照下培养诱导初始愈伤组织, 每日光照时间16~18 h。25 d左右, 转入MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+10 mg·L⁻¹ 2, 4-D培养基上继续培养。分别在接种0、10、25、35、70和85 d取材测定。外植体用接种0 d表示。

收稿 2006-04-29 修定 2006-08-21

资助 国家自然科学基金(30540019)和教育部留学生基金(教外司1999363)。

*通讯作者(E-mail: ltxiao@hunau.net, Tel: 0731-4635259-8001)。

内源激素的提取纯化参照王若仲等(2002)的方法。多胺的提取和处理参照Flore和Galston (1982)的方法。内源激素和内源多胺测定均用HPLC分析。内源激素测定以乙腈、三乙胺和超纯水为流动相,恒流 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长为 254 nm (ZT、ABA)或 270 nm (IAA、 GA_3),柱温 35°C 。内源多胺测定以甲醇:水(V/V=64:36)为流动相。检测波长为 230 nm ,流速 $0.7\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 30°C 。

实验结果

1 石刁柏愈伤组织诱导胚性细胞

接种3 d的外植体两端开始膨大,10 d的茎切段两端开始有绿色愈伤组织出现,25 d左右时形成大量致密、坚硬、表面光滑的愈伤组织,此时将愈伤组织转入胚性愈伤组织诱导培养基上,第70天开始有胚性细胞形成,第85天左右有较多的胚性细胞形成(图1)。

2 石刁柏胚性细胞诱导过程中的内源激素含量变化

如图2所示,4种激素中的ZT和 GA_3 含量较高,ABA和IAA水平相对较低。诱导后不同阶段的激素水平也有差异。在整个诱导过程中,ABA和ZT水平变化幅度不大,ZT在转入胚性细胞诱导培养基上10 d后(第35天)达到顶峰,其后各阶段都比这一时期低。ABA则在胚性细胞开始出现时(第70天)达到最高峰。在整个诱导过程中,IAA和 GA_3 有相似的变化趋势,即胚性细胞诱导阶段(35~85 d)明显高于初始愈伤组织诱导阶段(0~25 d),第70天达到最大值,之后略低于这一水平。70 d时,IAA和 GA_3 比25 d时的分别高出147.23%和107.709%;此时,胚性细胞开始出现,说明IAA和 GA_3 含量的增加与胚性细胞的出现有关。IAA在初始愈伤组织形成过程中一直保持较低水平,转入诱导培养基上10 d后(第35天)即迅速上升,直至胚性细胞出现。

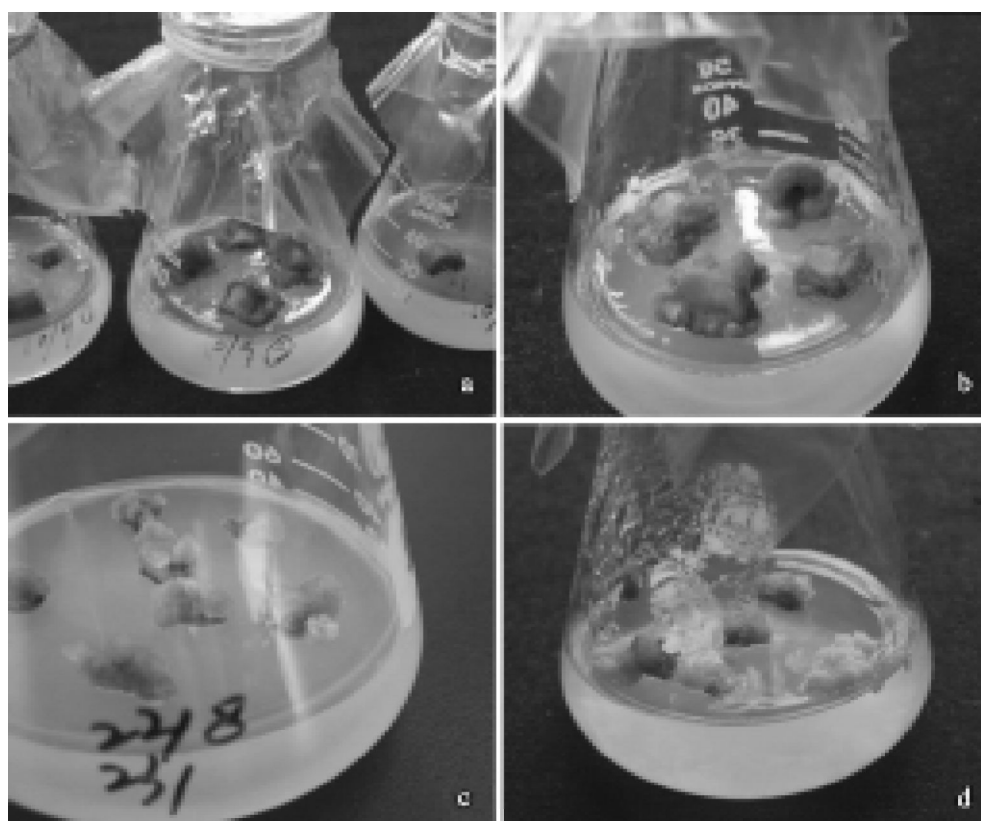


图1 石刁柏胚性细胞诱导过程

Fig. 1 Embryonic cells induction of *A. officinalis*

a: 外植体开始产生愈伤组织; b: 愈伤组织大量形成; c: 胚性愈伤组织开始形成; d: 较多胚性愈伤组织形成。

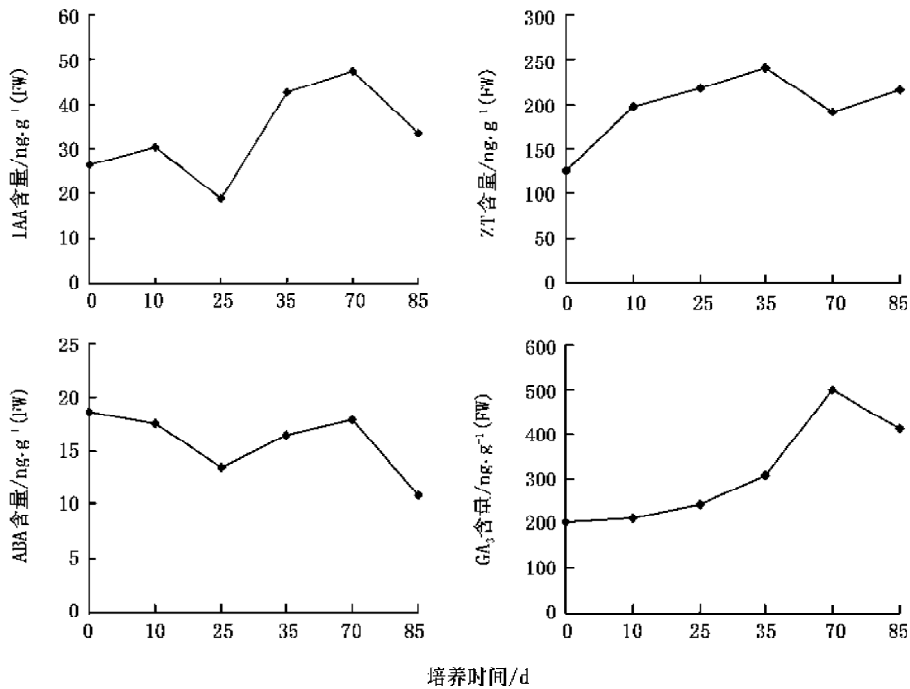


图2 石刁柏胚性细胞诱导过程中内源激素含量变化

Fig. 2 Changes in endogenous phytohormones contents during embryogenic cells induction of *A. officinalis*

3 石刁柏胚性细胞形成过程中的多胺含量变化

如图3所示,愈伤组织胚性细胞诱导的不同时期,Put和Spd含量都高于Spm,Put占的比例最大,Put变化趋势决定总多胺的变化趋势。从接种开始到愈伤组织胚性细胞出现,Put含量一直呈上升的趋势,尤其是在愈伤组织转入诱导培养基后几乎呈直线上升,在胚性细胞开始出现(70 d)时达到最高[613.46 nmol·g⁻¹ (FW)],一直持续到大量胚性细胞产生时(85 d),仍保持在589.14 nmol·g⁻¹ (FW)的水平。从外植体接种直至35 d,Spd水平一直下降,接种3 d内降幅最大,3~35 d期间都是缓慢下降,胚性细胞出现时略有回升。35 d后Spm水平一直低于25 d前的水平,胚性细胞出现时最低,这暗示低水平的Spm可能有利于愈伤组织胚性细胞出现。在愈伤组织胚性细胞诱导过程中,3种多胺比值[Put/(Spd+Spm)]一直呈不断上升趋势,25~35 d时的上升幅度最大(超过3倍),70 d时的比值为25 d的3.082倍。

讨 论

细胞胚性能力的获得主要取决于细胞的分

化,而细胞分化是细胞内原有信息清除或更变的结果。紫花苜蓿脱分化的细胞只需用NAA和2,4-D短时间刺激(几分钟)即可进行胚胎发育(Pasternak等2002)。2,4-D普遍都被看作是诱导胚性的有效物。前人在水稻中的研究结果表明,水稻胚性细胞出现与IAA有直接关系,愈伤组织中积累较多的IAA是胚性细胞形成的一个必需条件(陈以峰等1998)。石刁柏愈伤组织胚性细胞出现时GA₃和IAA都保持在一个相对高的水平,而且IAA在愈伤组织转入高浓度2,4-D(10 mg·L⁻¹)的培养基上10 d后(即培养全程的第35天)即升高,显示2,4-D是诱导细胞转变成胚性细胞的有效因子。至于其作用的机制,有不同的说法:有人认为是通过改变内源IAA起作用(邢更妹等2002),也有人认为是影响IAA结合蛋白起作用的(Nag等2001)。从本文结果来看,前一个说法的可能性较大。但2,4-D究竟是如何作用的,尚待进一步研究。诱导胚性愈伤组织用高浓度的2,4-D(10 mg·L⁻¹,一般为2.2 mg·L⁻¹以下),这在文献中较少报道。Pasternak(2002)等发现,紫花苜蓿原生质体在不同浓度2,4-D的培养基上会分化成形态和大小等特征不同的胚

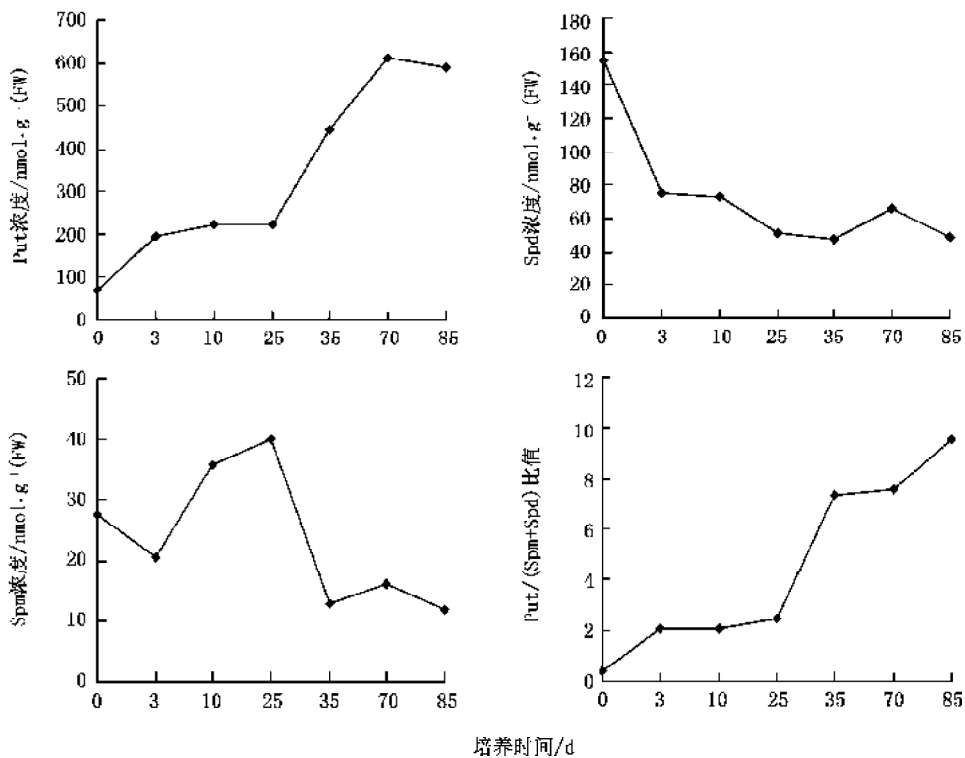


图3 石刁柏胚性细胞诱导过程中的内源多胺含量变化

Fig. 3 Changes in endogenous polyamine contents during embryogenic cells induction in *A. officinalis*

性和非胚性细胞, 而且在培养4~5 d时, 原生质体内源 IAA 水平都出现瞬时上升, 但具有胚性特征的细胞其 IAA 峰要出现早些。关于 GA₃ 的作用, 目前研究得较清楚的是促进植物茎和叶生长、解除种子和块茎等的休眠、促进萌发等。最近, Asahina 等(2002)发现, 子叶产生的 GA₃ 是黄瓜、马铃薯胚轴切割后重新形成组织时细胞分裂所必需的。本文中, GA₃ 含量从培养开始到胚性细胞大量出现一直呈增加趋势(图2), 显示 GA₃ 可能参与细胞的分裂和增殖。

多胺也参与植物细胞增殖和分化调控(王丽等1998; Walden 等1997; Wallace 等2003), 调节细胞增殖的多胺主要是 Put。有报道显示, Put 是通过调节细胞周期影响细胞增殖的, 主要作用在 G₁ 到 S 期(Maki 等1991)。据邢更妹等(2002)报道, 枸杞继代的愈伤组织开始启动分化时, Put 含量即迅速上升, 并形成第1个峰值(为对照的3倍), 胚性愈伤组织形成期 Put 含量也维持较高水平, 因而他们认为此时 Put 含量升高与细胞启动分化和胚性细胞形成有关。本文结果也表明, 在诱导石刁

柏胚性细胞过程中, 愈伤组织转入诱导培养基上后 Put 含量即剧增, 胚性细胞形成的整个过程均保持高水平, 而 Spd 和 Spm 则是低水平。胡萝卜胚胎发生过程细胞转入胚性培养基上也表现出类似的结果(Montague 等1978), 说明高比例的 Put/(Spd+Spm) 有利于胚性细胞的形成。

S-腺苷蛋硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM) 是乙烯和多胺合成共同的前体, 合成的酶分别是1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)和氨基氧化乙酸(aminooxyacetic acid, AOA)。在燕麦叶片和黑松体胚发育过程中, ABA 通过减少 ACC 酶合成来调节乙烯形成(E1 Meskaoui 和 Tremblay 2001)。ACC 合成减少后, 细胞内的 SAM 转向 Put 合成, 因此 Put 水平增高。本文结果显示, 在愈伤组织转入胚性细胞诱导培养基上后, ABA 和 Put 两者的变化趋势一致(图2和3), 说明可能与此也有关。当然, Put 呈直线上升的趋势, 也可能与分解代谢减弱或是转化成 Spd 的量减少有关(图3)。但前人大多认为内源 IAA 和 Put 两者可能起协同效应(Tiburiso 等1989,

邢更妹等 2002)。本文结果也表明, 在诱导石刁柏胚性愈伤组织过程中Put和IAA的变化趋势类似(图2和3), 也说明Put和IAA有协同效应。但其间具体机制待进一步研究。

参考文献

- 陈以峰, 周燮, 汤日圣, 张金渝, 梅传生(1998). 水稻体细胞培养中胚性细胞出现与IAA的关系. 植物学报, 40(5): 474~477
- 崔凯荣, 邢更生(2000). 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节. 遗传, 22(5): 349~354
- 黄学林, 李筱菊(1995). 乙烯和多胺的生物合成与植物体细胞胚胎发生. 植物生理学通讯, 31(2): 81~85
- 林红, 程井辰(1991). 植物激素对几种禾本科植物外植体的胚胎发生及形态发生途径的影响. 植物生理学通讯, 27(2): 117~119
- 田长恩(1992). 多胺在离体培养的植物组织形态建成中的作用. 植物生理学通讯, 28(3): 230~232
- 王丽, 鲍晓明, 黄百渠, 郝水(1998). 香雪兰外植体形态学极性决定的体细胞胚胎发生. 植物学报, 40(2): 138~143
- 王若仲, 萧浪涛, 蔺万煌, 曹庸, 卜晓英(2002). 亚种间杂交稻内源激素的高效液相色谱测定法. 色谱, 20(2): 148~150
- 邢更妹, 黄惠英, 王亚馥(2002). 枸杞体细胞胚发生过程中内源多胺代谢动态的研究. 西北植物学报, 22(1): 84~89
- 张木清, 余松烈(1996). 多胺对渗透胁迫下甘蔗愈伤组织诱导和分化的作用. 植物生理学通讯, 32(3): 175~178
- Asahina M, Iwai H, Kikuchi A, Yamaguchi S, Kamiya Y, Kamada H, Satoh S (2002). Gibberellin produced in the cotyledon is required for cell division during tissue reunion in the cortex of cut cucumber and tomato hypocotyls. *Plant Physiol*, 129: 201~210
- Auborion E, Carron MP, Michaux-Gerriere N (1989). Atmospheric gases and ethylene synthesis in somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 21: 31~35
- El Meskaoui A, Tremblay FM (2001). Involvement of ethylene in the maturation of black spruce embryogenic cell lines with different maturation capacities. *J Exp Bot*, 52(357): 761~769
- Flores HE, Galston AW (1982). Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol*, 69: 701~706
- LoShiavo F, Filoppini F, Cozzani F, Vallone D, Terzi M (1991). Modulation of auxin binding proteins in cell suspensions. I. Different responses of carrot embryo cultures. *Plant Physiol*, 97: 60~64
- Maki H, Ando S, Kodama H, Komamine A (1991). Polyamines and the cell cycle of *Catharanthus roseus* cells in culture. *Plant Physiol*, 96: 1008~1013
- Montague MJ, Koppenbrink JW, Jaworski EG (1978). Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. I. Changes in intracellular content and rates of synthesis. *Plant Physiol*, 62: 430~433
- Nag S, Saha K, Choudhuri MA (2001). Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting. *J Plant Growth Regul*, 20(2): 182~194
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Van Onckelen HA, Dudits D, Fehér A (2002). The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiol*, 129: 1807~1819
- Sasaki K, Shimomura K, Kamada H, Harada H (1994). IAA metabolism in embryogenic and nonembryogenic carrot cells. *Plant Cell Physiol*, 35: 1159~1164
- Tiburcio AF, Gendy CA, Van Tran Thanh K (1989). Morphogenesis in tobacco subepidermal cells: putrescine as marker of root differentiation. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 19: 43~54
- Walden R, Cordeiro A, Tiburcio AF (1997). Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol*, 113: 1009~1013
- Wallace HM, Fraser AV, Hughes A (2003). A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J*, 376(1): 1~14