

甘蔗幼叶脱分化及愈伤组织形成过程中内源细胞分裂素和ABA的变化

李军生

李春瑶

梁倩华

杨继华

(广西工学院轻纺系, 柳州 545005) (广西师范大学生物系, 桂林)

5566.101

摘要 甘蔗幼叶片, 叶鞘和幼茎在含有2.4-D的培养条件下脱分化的情况有明显差异。它们除了在形态学上有区别外, 这三种材料原有的细胞分裂素和ABA的水平明显不同。在幼叶片脱分化及愈伤组织形成过程中, 内源细胞分裂素和ABA的水平也发生了明显变化。据此我们认为在甘蔗组织培养中2.4-D可能通过调节内源激素的水平及其相互作用, 引起培养物中某些生理生化过程发生改变, 从而进行脱分化和愈伤组织形成。

关键词 甘蔗; 组织培养; 内源激素; 玉米素; 玉米素核苷 **细胞分裂素; 脱落酸;**

甘蔗愈伤组织可以在仅含有2.4-D的培养基上诱导形成; 愈伤组织转到分化培养基上继续培养可形成再生植株(韩光禧等1983)。有报道表明内源细胞分裂素水平的升高与细胞分裂活动加强有关(Machenie和Street 1972; Short和Torrey 1972)。此外, 细胞分裂素在胡萝卜体细胞胚胎发生中也有重要作用(Fujmura和Komamine 1975)。ABA除了具有抑制植物生长的作用外, 还具有刺激菊芋细胞分裂和DNA合成(Minocha 1979)以及烟草愈伤组织生长(Kochhar 1979)和烟草花药胚状体产生(Imamura和Karada 1980)。本文通过测定甘蔗叶片脱分化和愈伤组织形成过程中内源玉米素, 玉米素核苷和ABA等水平的变化, 以探讨内源激素的变化与2.4-D诱导甘蔗叶片脱分化及愈伤组织再分化的关系。

材料与方 法

供试甘蔗品种为桂糖11号。取甘蔗尾梢, 经70%酒精表面消毒后于无菌条件下, 分别剥取自生长点0—7cm的负一叶叶鞘, 负二、负三叶叶片, 以及生长点以下1cm长的幼茎作为培养材料。以上材料均切成2mm厚的薄片置于培养基上培养。诱导培养基为含有2.4-D 3 mg/L的改良N₀培养基; 继代培养基的2.4-D浓度降低为2 mg/L; 分化培养基则完全去除2.4-D。外源玉米素、ABA和吲哚乙酸(IAA)通过过滤灭菌添加。培养温度为25℃左右; 湿度60—80%。诱导培养在暗室中进行。分化培养为光培养, 每天光照12小时, 光强度为1200 lux。

内源细胞分裂素和ABA的提取和测定: 内源玉米素、玉米素核苷和ABA的提取按丁静等(1979)的方法进行, 样品经硅烷化处理后, 用HP5890A型气相色谱仪测定, 色谱柱为530 μm ID 硅质柱。普氮为载气, 流量为20 ml·min⁻¹。测定ABA时, 检测室温度290℃; 气化室温度200℃; 柱箱温度, 进样后在160℃恒温4分钟, 然后程序升温到230℃, 升温速度为10℃·min⁻¹。测定细胞分裂素时, 检测室温度改为310℃, 其余同上。进样量为1 μl, 外标法测量。

实 验 结 果

一、不同外植体脱分化的差异 甘蔗幼叶片、叶鞘和幼茎在诱导培养基上培养一天后,

都可见到吸水膨胀、伸长。第四天用解剖镜观察可见到切口附近长淡黄色的愈伤组织。培养五到七天是外植体脱分化细胞分裂旺盛的时期。培养十一天后脱分化完成(表1)。但是这三种外植体产生愈伤组织的类型有明显的差别(表2)。外植体在没有2,4-D的培养基上不能脱分化。胚性愈伤组织转移到分化培养基上培养十五天可形成绿苗,而非胚性愈伤组织不能形成绿苗。

表1. 2,4-D诱导甘蔗叶鞘脱分化的时间进程*

2,4-D诱导时间(天)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
接种数(片)	31	30	31	36	30	26	34	28	25	20	25	22
长愈伤组织数(片)	0	4	6	7	9	12	20	20	19	18	22	21
愈伤组织诱导率(%)	0	13.3	19.4	19.4	30	46.2	58.8	71.4	76	90	88	95.5

*先在诱导培养基上培养,然后转到无2,4-D培养基上继续培养,时间共11天。

三种外植体除了在形态学上明显不同外,它们各自原有的内源激素水平也明显不同(表3)。

二、甘蔗幼叶脱分化过程中内源玉米素、玉米素核苷和ABA水平的变化 从图1、图2可见,内源玉米素、玉米素核苷和ABA水平变化与叶片脱分化有着密切关系。在诱导培养前期,能脱分化的叶片和不能脱分化的外植体,其内源玉米素、玉米素核苷和ABA水平都是逐渐下降的。但是诱导培养三天后,内源玉米素和玉米素核苷总水平的变化与ABA的变化不同。在叶片脱分化细胞分裂旺盛时期,脱分化叶片的内源玉米素和玉米素核苷总水平在第三天开始上升,第七天达到高峰,以后下降,而内源ABA的水平在诱导的前五天一直是下降的,第五天后开始上升。不能脱分化的叶片最初内源玉米素和玉米素核苷总水平稍有回升,但其水平很低,以后逐渐下降,而内源ABA的水平则在第三天开始上升,第五天达到最大,以后又迅速下降。

三、外源玉米素、ABA和IAA分别与2,4-D配

合对甘蔗叶片脱分化的影响 试验

表明外加ABA对叶分化具有抑制作用,并随ABA的处理浓度提高,抑制作用加强,愈伤组织诱导率也逐渐降低,但是外加ABA可以相对提高胚性愈伤组织的比率(表4)。外加玉米素也可以促进叶片脱分化,同时胚性愈伤组织的比率也提高(表5)。IAA的添加对叶片脱分化几乎没有什么作用(表6)。

表2. 幼叶片、叶鞘和幼茎愈伤组织类型的差异*

材料	接种量(片)	愈伤组织诱导率		胚性愈伤组织诱导率	
		(片)	%	(片)	%
叶片	64	58	90.6	40	62.5
叶鞘	39	35	89.7	11	28.2
幼茎	46	38	82.6	3	6.5

*培养时间11天。

表3. 幼叶片、叶鞘和幼茎原有的内源激素水平的比较(单位: $\mu\text{g/g.F.W}$)

材料	ABA	玉米素	玉米素核苷	总水平
叶片	26.02	11.36	3.71	15.07
叶鞘	9.96	9.61	9.22	18.83
幼茎	21.78	19.05	6.27	25.32

表4. ABA和2,4-D对甘蔗叶片脱分化的影响*

激素组合(mg/L)	接种量(片)	愈伤组织诱导率		胚性愈伤组织诱导率		胚性愈伤组织/非胚性愈伤组织
		(片)	%	(片)	%	
2,4-D ₃	64	58	90.6	40	62.5	2.2:1
2,4-D ₃ +ABA _{0.02}	64	60	93.8	37	57.8	1.6:1
2,4-D ₃ +ABA _{0.2}	63	56	88.9	27	42.9	0.9:1
2,4-D ₃ +ABA ₂	113	45	39.8	38	33.6	5.4:1
2,4-D ₃ +ABA ₅	93	12	12.7	9	9.7	3:1

*培养时间11天。

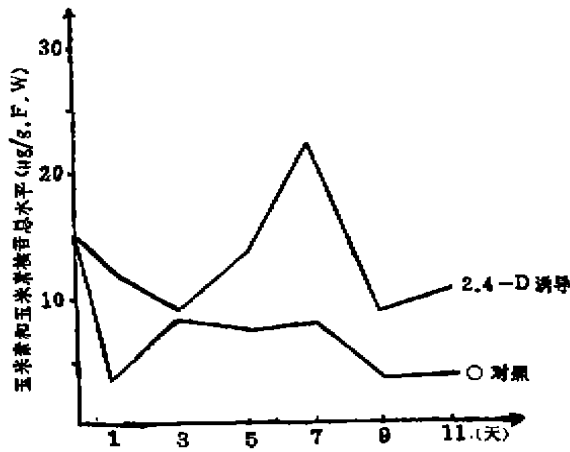


图1 叶片脱分化过程中内源玉米素和玉米素核苷总水平的变化

Fig. 1 Changes of endogenous zeatin and zeatin riboside level during Sugarcane leaf dedifferentiation

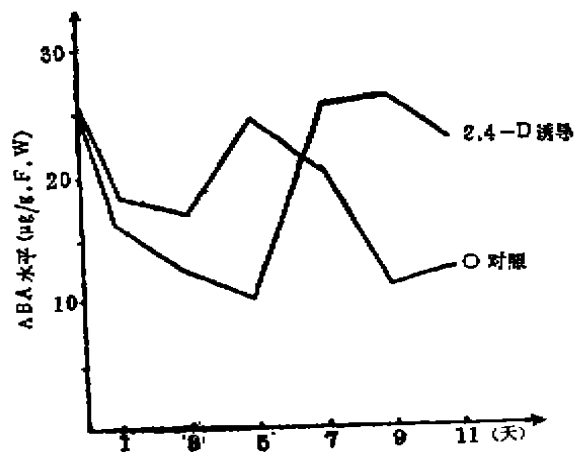


图2 叶片脱分化过程中内源ABA水平的变化

Fig. 2 Changes of endogenous ABA level during sugarcane leaf dedifferentiation

讨论

在植物组织培养中，为了诱导组织细胞脱分化和再分化，通常需要加入适量的外源激素。本实验的结果表明甘蔗外植体在没有2.4-D的培养基上，不能脱分化。但不同植物，甚至同种植物的不同器官或组织所需的激素种类和数量差别很大。许多人认为造成这一差异，可能与材料本身的生理状态特别是内源激素代谢上的不同有关（上海植生所细胞室1978）。本实验结果表明甘蔗叶片，叶鞘和幼茎三种不同的外植体在相同的诱导培养基上脱分化的情况不同。这表明外植体脱分化的差异除了与不同外植体的形态、结构

表5. 玉米素和2.4-D对甘蔗叶片脱分化的影响*

激素组合(mg/L)	接种量	愈伤组织诱导率		胚性愈伤组织诱导率		胚性愈伤组织/非胚性愈伤组织
		(片)	%	(片)	%	
2.4-D ₃	64	58	90.6	40	62.5	2.2:1
2.4-D ₃ +玉米素 _{0.02}	54	42	77.8	36	66.7	6:1
2.4-D ₃ +玉米素 _{0.2}	38	36	94.7	32	84.2	8:1
2.4-D ₃ +玉米素 ₂	33	33	100	25	75.8	3.1:1
2.4-D ₃ +玉米素 ₆	34	30	88.2	26	76.5	6:1

* 培养时间同表4。

表6. IAA和2.4-D对甘蔗叶片脱分化的影响*

激素组合(mg/L)	接种量	愈伤组织诱导率		胚性愈伤组织诱导率		胚性愈伤组织/非胚性愈伤组织
		(片)	%	(片)	%	
2.4-D ₃	64	58	90.6	40	62.5	2.2:1
2.4-D ₃ +IAA _{0.02}	57	51	89.5	31	54.4	1.5:1
2.4-D ₃ +IAA _{0.2}	41	40	97.6	27	65.9	2.1:1
2.4-D ₃ +IAA ₂	37	33	89.2	25	67.6	3.1:1
2.4-D ₃ +IAA ₆	45	45	100	29	66.4	1.8:1

* 培养时间同表4

不同有关外, 还可能与生理状态不同有关。在这里应该指出的是这三种材料原有的内源激素水平的差别可能只造就了这三种材料脱分化不同的结果, 而外植体能否脱分化则取决于2,4-D的诱导以及由此引起的内源激素水平的变化(图1、图2)。三种外植体只有在含有2,4-D的诱导培养基上才能脱分化, 而在不含2,4-D的培养基上不能脱分化, 这说明外植体原有的内源激素只是脱分化的因素之一, 外植体脱分化的完成还需外因的诱导, 因此, 在本实验中, 虽然幼叶片原有的内源细胞分裂素水平比幼茎和叶鞘的低, 而ABA的水平比幼茎和叶鞘的高, 但是以后由2,4-D诱导引起的内源激素水平变化可能有利于愈伤组织的形成, 而叶鞘和幼茎的内源激素水平变化不如叶片的有利于愈伤组织生长发育, 因而叶片的愈伤组织诱导率反而比幼茎和叶鞘的高。

Ernst等(1984)在茴香的细胞培养中发现细胞分裂素水平的升高与细胞分裂素活动加强有关。本实验也有类似的结果。在甘蔗叶片脱分化细胞分裂旺盛时期, 叶片中内源细胞分裂素的水平是逐渐升高的, 而对照的外植体内源细胞分裂素水平是逐渐降低的。此外, 我们还发现在细胞旺盛分裂的前期, 内源ABA水平逐渐下降到最低, 而此时对照的外植体内源ABA水平较高。Inoue等(1979)在水稻愈伤组织培养中观察到2,4-D的浓度提高后, 培养组织中内源细胞分裂素水平提高。据此, 我们认为2,4-D诱导甘蔗叶片脱分化可能是通过引起内源细胞分裂素和ABA水平的变化来进行的。外源玉米素和ABA的添加实验结果可以进一步说明这一点。

目前有关内源激素在植物组织培养中的作用尚未清楚, 有待进一步探讨。

参 考 文 献

- (1) 韩光禧, 陆耀邦等, 1983: 甘蔗愈伤组织和胚性细胞团的诱导和分化因素的研究, 广西农学院学报, (2): 83—94。
- (2) 丁 静, 沈镇德等, 1979: 植物内源激素的提取和生物鉴定。植物生理学通讯, (2): 27—29。
- (3) 上海植物生理研究所细胞室编译, 1978: 植物组织和细胞培养。上海科学技术出版社, P.150—189。
- (4) Ernst D., Oesterhelt D., Schafer W., 1984: Endogenous cytokinins during embryogenesis in an anise cell culture (*Pimpinella anisum* L.). *Planta* 161: 240—245。
- (5) Fujimura T., Komamine A., 1975: Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension cultures. *Plant Sci. Lett.* 5: 359—364。
- (6) Imamura J., Harada H., 1980: Effect of abscisic acid and water stress on the embryo and plantlet formation in another culture of *Nicotiana tabacum* CV. Samsun. *Z. Pflanzenphysiol* 100: 285—289。
- (7) Inoue M., Maeda E., Yoshida R., Oritani T., 1979: On the occurrence of a high content of cytokinins in rice callus tissue. *Plant & Cell Physiol* 20(5): 917—924。
- (8) Kochhar TC. Effect of abscisic acid and auxine on the growth of tobacco callus. *Z. Pflanzenphysiol* 1979, 92: 1—4。
- (9) Machenie IA, street HE., 1972: The γ -cytokinin of culture sycamore cells. *New Phytol* 71: 621—631。
- (10) Minocha SC., 1979: Abscisic acid production of cell division and DNA synthesis in Jerusalem Artichoke tuber tissue cultured in vitro. *Z. Pflanzenphysiol* 92: 327—339。

- [11] Short KC., Torrey JG., 1972 : Cytokinin in production in regulation to growth of pea-root callus tissue. *J. Exp. Bot.* 23 : 1099—1105.

CHANGES OF ENDOGENOUS CYTOKININS AND ABSCISIC ACID (ABA) LEVELS DURING THE SUGARCANE LEAF DEDIFFERENTIATION AND CALLUS FORMATION

Li Junsheng

(Department of Light & Textile Industry, Guangxi Institute of Technology, Liuzhou 545005)

Li Chunyao, Liang Qianhua and Yang Jihua

(Department of Biology, Guangxi Teacher's University, Guilin)

Abstract Young leaf, sheath and stem segments are different in dedifferentiation during sugarcane plant tissue culture in vitro. Leaf segments produce more embryogenic callus than sheath and stem segments. This may be related with the higher level of endogenous ABA and lower level of zeatin and zeatin riboside in leaf than in sheath and stem.

Endogenous levels of zeatin, zeatin riboside and ABA were determined by useness of gas chromatograph during callus induction and formation in sugarcane leaf tissue culture. During the dedifferentiation of leaf segments, the total level of zeatin and zeatin riboside gradually increased along with increasing of cell division, and the level of ABA decreased to the lowest point at 5th day of culture, and then gradually increased from the 5th day on. It appeared that the sugarcane leaf segments dedifferentiation and callus formation induced by 2,4-D may be related with the changes of endogenous levels of zeatin, zeatin riboside and ABA.

Key words sugarcane; tissue culture; endogenous hormone; zeatin; zeatin riboside; abscisic acid (ABA)