

大葱成熟胚离体再生过程中内源激素的变化

盛艳萍¹ 杨建平^{1*} 张松¹ 齐宪磊² 李新成³

(¹ 山东农业大学园艺学院, 泰安 271018; ² 山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018; ³ 泰安市菜篮子科技园, 泰安 271018)

摘要: 对大葱成熟胚的愈伤组织诱导及分化过程进行了观察, 并对再生过程中内源激素水平进行了测定。研究结果表明: 大葱愈伤组织诱导过程中, ZR在 3 d时含量达峰值, 可能是导致 6 d时增长率最高的主要原因, ABA在此过程中可能为负调控因子。GA₃在愈伤组织分化过程中的含量明显高于继代过程, 说明其对大葱愈伤组织的分化有重要作用。适当高的 6-BA与 NAA比值有利于芽的分化, 但是细胞分裂素类浓度过高时则会对不定芽造成伤害。

关键词: 大葱; 成熟胚; 愈伤组织诱导; 分化; 内源激素

中图分类号: S 633.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 02-0318-03

Studies on the Changes of Endogenous Hormones during the Course of Regeneration from *Allium fistulosum* L. Mature Embryos Culture

Sheng Yanping¹, Yang Jianping^{1*}, Zhang Song¹, Qi Xianlei², and Li Xincheng³

(¹ College of Horticulture, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; ² College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; ³ Tai'an Institute of Vegetable Basket, Tai'an 271018, China)

Abstract: The callus induction and plant regeneration from *Allium fistulosum* L. mature embryos culture were studied in *A. fistulosum* L. and the endogenous hormone changes in this course were analyzed. The callus growth rate reached the highest point at the 6th day after culturing, which might be caused by the maximum concentration of ZR at the 3rd day. ABA was a negative regulation factor in the callus induction. The concentration of GA₃ during callus induction was much higher than that in the multiplication course, which indicated GA₃ was very important in the differentiation period. The appropriate proportion between 6-BA and NAA was beneficial to the shoot differentiation of *A. fistulosum* L., but there was side effect to shoot regeneration if CTK concentration was too high.

Key words: *Allium fistulosum* L.; Mature embryos; Callus induction; Differentiation; Endogenous hormones

1 目的、材料与方法

目前, 关于大葱 (*Allium fistulosum* L. var *giganteum* Madino) 不同组织器官的离体再生方面已有少量报道, 其大多组织器官如花蕾、幼叶等, 都存在诱导率低, 重复性差等缺点, 其中添加的植物生长调节剂种类和水平是重要影响因素之一, 其作用又是通过内源激素水平来体现, 而目前关于大葱再生过程中内源激素的研究还未见报道。本文即以大葱成熟胚为外植体, 分析了其再生过程中内源激素含量的变化, 以期探讨激素对大葱器官发生的作用机制。

以‘章丘大葱’的种子 (即成熟胚) 为试材, 经 70%乙醇漂洗 30~60 s, 0.1%升汞浸泡搅拌 10 min, 无菌水冲洗 3遍, 无菌状态下催芽至芽长 1.0 cm左右, 再将其整个接种于愈伤组织诱导培养基: MS+2,4-D 1.0 mg·L⁻¹+6-BA 2.0 mg·L⁻¹, 暗培养 30 d; 切取愈伤组织 (每个外植体切 1块) 进行继代和分化培养, 继代培养基: MS+2,4-D 1.0 mg·L⁻¹+6-BA 2.0 mg·L⁻¹, 分化培养基:

收稿日期: 2004-04-01; 修回日期: 2004-06-21

*通讯作者 Author for correspondence

MS+NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培养温度为 27°C ，每天光照 16 h，光强 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。于不同时期（图 1~图 3）取材，称质量后，置 -70°C 的超低温冰箱备用，每处理 3 个重复，每重复取 1.0 g。激素测定采用酶联免疫吸附法，试剂盒购自南京农业大学农学系植物激素研究室。测定激素种类为生长素（IAA），细胞分裂素类的玉米素核苷（ZR）、赤霉素（GA₃）和脱落酸（ABA）。

2 结果与讨论

2.1 大葱愈伤组织诱导过程中生长变化情况

接种后 3 d 可见茎盘处开始膨大，根部停止伸长。随着培养时间的延长，膨大处转变为明显的愈伤组织，浅黄色，外面包被一层半透明的白色皱褶物。30 d 时，愈伤组织蜕下白色包被后，表面呈现为稍有突起、有光泽，颜色加深，体积明显增大，直径可达 7 mm 左右。通过对不同时期愈伤组织进行称质量发现，6 d 时愈伤组织增长率急剧上升，达到峰值，后期逐渐下降。

2.2 大葱愈伤组织分化过程中生长变化情况

切取诱导 30 d 时的愈伤组织接种到分化培养基上，5 d 时愈伤组织表面长出黄色瘤状突起；10 d 时部分愈伤组织有绿芽或绿色突起发生；20 d 时约 80% 的愈伤组织分化出芽；以后为芽的伸长生长期，30 d 时个别绿芽可长到 2 cm 左右，但是大部分玻璃化。

2.3 大葱愈伤组织诱导时期内源激素含量变化

如图 1 所示，愈伤组织诱导过程中，各激素含量变化较大。其中 GA₃ 在愈伤组织诱导初期含量急剧下降，中后期基本维持不变，可见大葱发芽时 GA₃ 的需求量较大，而在愈伤组织诱导过程中相对降低，这与 Victor 等对胡萝卜的试验结果一致^[1]。ABA 含量在诱导初期明显下降，中后期也一直保持很低的水平，由此推测 ABA 可能是大葱愈伤组织诱导的负调控因子，其含量的下降有利于愈伤组织的发生。ZR 含量在诱导起始阶段急剧上升，后又明显降低，说明 ZR 的强烈合成有利于愈伤组织的诱导，但是一旦愈伤组织发生，其需求量也随之降低，只需维持愈伤组织的生长即可；其在 3 d 时的强烈合成可能也是导致 6 d 时愈伤组织增长率最高的主要因素，之所以含量与增长率的峰值不在同一时期，可能是其效应的产生需要反应时间和效果的累积。

2.4 大葱愈伤组织继代过程中内源激素含量变化

如图 2 所示，愈伤组织继代过程中，ABA 含量远低于其它 3 种内源激素的水平，基本维持在愈伤组织诱导后期的水平。IAA 和 ZR 含量变化范围基本在 $100 \sim 150 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$ 之间，其中 ZR 在继代 5 d 时处于峰值，可能是刚转移到新鲜培养基上，丰富的营养及调节剂促进了细胞分裂所致。后期 IAA 含量有所下降，GA₃ 含量明显升高，可能与试验中观察到的小部分愈伤组织分化出芽有关。

2.5 大葱愈伤组织分化过程中内源激素含量变化

如图 3 所示，愈伤组织分化过程中，GA₃ 含

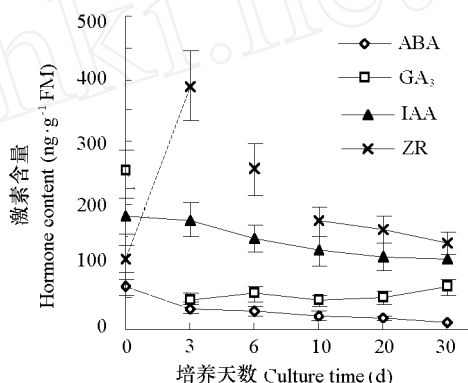


图 1 愈伤组织诱导时期内源激素含量变化

Fig. 1 Changes of endogenous hormones during callus induction

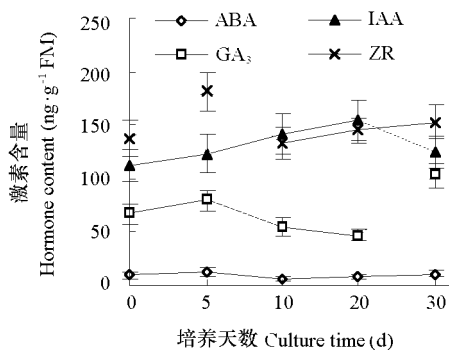


图 2 继代培养过程中内源激素含量变化

Fig. 2 Changes of endogenous hormones content during callus multiplication

量一直呈上升趋势,尤其在分化前期和绿芽伸长期含量上升幅度较大,从开始时的 $67.175 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 升高到 $215.394 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$,增加了 2 倍多,明显高于继代培养过程中的水平,说明 GA_3 对大葱愈伤组织分化有重要作用。在此过程中添加适当浓度的外源 GA_3 能否提高大葱愈伤组织的分化率,还有待于进一步研究。

分化培养 5 d 时,IAA 含量明显下降,而此时正是芽分化的起始期,说明低含量的生长素有利于芽的分化。组培试验也验证了这一点,分化培养时生长素由 $2,4\text{-D } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 换为 $\text{NAA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,即可获得较高的分化率;而当仅降低 $2,4\text{-D}$ 浓度时,也可得到一定的分化率,但分化所需时间加长,可见 $2,4\text{-D}$ 浓度较高时会抑制形态发生过程,这与张和禹等^[2]的结果一致。

分化前、中期,ZR 含量缓慢上升,后期则急剧升高,与不定芽玻璃化同时发生,此时若及时降低 6-BA 浓度,玻璃化症状会逐渐消失,可见高浓度的细胞分裂素易对大葱不定芽造成伤害。同样问题也出现在桑下胚轴组织培养中^[2],说明某些植物愈伤组织在生长调节剂作用下分化了不定芽,其自身产生的内源激素可以满足不定芽生长发育的需要^[3],再添加植物生长调节剂反而适得其反。

参考文献:

- Victor M. Jin 和 Fritz Bangerth. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. *Physiologia Plantarum*, 2001, 111: 389 ~ 395
- 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. *蚕业科学*, 2000, 26 (1): 1 ~ 4
Zhang H Y, Zhao Z L. Changes of endogenous hormones on tissue culture of hypocotyl of mulberry. *Canye Kexue*, 2000, 26 (1): 1 ~ 4 (in Chinese)
- 肖关丽,杨清辉,李富生. 内源激素变化与甘蔗愈伤组织分化绿苗关系研究. *种子*, 2003, (1): 10 ~ 11
Xiao G L, Yang Q H, Li F S. Study on endogenous hormones in sugarcane callus differentiation. *Seed*, 2003, (1): 10 ~ 11 (in Chinese)

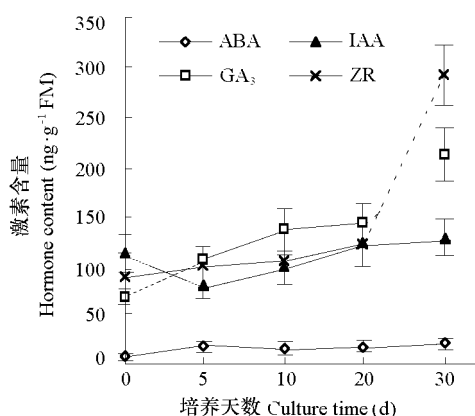


图 3 分化过程中内源激素含量变化

Fig. 3 Changes of endogenous hormones content during the differentiation

欢迎购阅下列新书

- | | | |
|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 1-1 《英汉生物学词汇》(第二版) 99元 | 1-31 《被子植物有性生殖图谱》96元 | 1-54 《生物化学技术原理及应用》(第三版) 45元 |
| 1-7 《PCR技术实验指南》(译) 110元 | 1-32 《基因工程原理》(第二版) 上册 58元 | 1-56 《分子生物学》89元 |
| 1-8 《植物生理与分子生物学》94元 | 1-33 《基因工程原理》(第二版) 下册 78元 | 1-57 《微注射和转基因实验指南》66元 |
| 1-9 《英汉生物学词汇》106元 | 1-38 《植物生殖遗传学》30元 | 1-58 《真核生物转录调控——概念、策略和方法》86元 |
| 1-11 《蛋白质结构分析》(译) 46元 | 1-39 《蛋白质技术手册》33元 | 1-59 《DNA与RNA基本操作技术》52元 |
| 1-13 《蛋白质电泳实验技术》29元 | 1-41 《英汉生物化学及分子生物学词典》88元 | 1-60 《蛋白质组学:从序列到功能》50元 |
| 1-14 《分子遗传学》70元 | 1-43 《分子细胞生物学》78元 | 1-62 《植物基因工程》(第2版) 97元 |
| 1-17 《植物分子遗传学》(第二版) 88元 | 1-44 《现代遗传学原理》77元 | 1-63 《基因组》55元 |
| 1-22 《英汉化学化工词汇》(第四版) 110元 | 1-48 《细胞信号转导》(第三版) 55元 | 1-64 《植物数量性状遗传体系》57元 |
| 1-24 《精编分子生物学实验指南》(译) 123元 | 1-50 《细胞实验指南》(译)(上、下) 244元 | 1-65 《体外培养的原理与技术》165元 |
| 1-25 《植物分子生物学实验指南》(译) 52元 | 1-52 《分子克隆实验指南》(第三版) 187元 | 1-66 《PCR技术实验指南》(第二版)(影印版) 110元 |
| 1-26 《蛋白质纯化与鉴定实验指南》(译) 52元 | 1-53 《生物信息学:序列与基因组分析》82元 | |
| 1-27 《实用分子生物学方法手册》32元 | | |

以上价格已含邮资。购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号《园艺学报》编辑部,邮编:100081。