

# 红富士苹果叶片不定芽再生中激素、多胺和 NO 含量的变化

田春英<sup>1,2</sup>, 邵建柱<sup>1</sup>, 刘莹<sup>1,3</sup>, 徐继忠<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>河北农业大学园艺学院, 河北保定 071000; <sup>2</sup>承德市农业广播电视学校, 河北承德 067000; <sup>3</sup>承德石油高等专科学校, 河北承德 067000)

**摘要:**以红富士苹果继代试管苗叶片为试材, 对光、暗培养条件下叶片不定芽再生过程中内源激素、内源多胺及 NO 含量变化进行了测定。研究结果表明: 暗培养下内源 ZR 和 ABA 及内源多胺的水平显著高于光培养。叶片接种初期诱导细胞启动分化时 ZR、IAA 和 ABA 含量较高, 细胞旺盛分裂期及芽原基形成期 ZR 和 ABA 含量较高而 IAA 含量较低。与光培养相比, 暗培养下 ZR/IAA 和 ABA/IAA 均较高。在叶片接种初期(0~7 d)内源腐胺(Put)、精胺(Spm)、亚精胺(Spd)以及内源多胺总量均达到峰值, 并且在不定芽分化时期内源多胺含量始终维持在较高水平。与光培养相比, 暗培养叶片的 NO 含量较高。红富士苹果叶片不定芽再生与其内源激素、多胺和 NO 含量密切相关。

**关键词:** 苹果; 叶片; 不定芽再生; 内源激素; 内源多胺; 一氧化氮

**中图分类号:** S 661.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X(2010)09-1403-06

## Changes of Hormones, Polyamines and NO Content During Regeneration of Adventitious Buds from *in Vitro* Leaves of Red Fuji Apple

TIAN Chun-ying<sup>1,2</sup>, SHAO Jian-zhu<sup>1</sup>, LIU Ying<sup>1,3</sup>, and XU Ji-zhong<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China; <sup>2</sup>Agricultural Broadcasting and Television College of Hebei, Chengde, Hebei 067000, China; <sup>3</sup>Chengde Petroleum College of Hebei, Chengde, Hebei 067000, China)

**Abstract:** This study was conducted with leaves collected from the test-tube plantlet of Red Fuji apple as the experimental materials. Changes of hormones, polyamines and NO during *in vitro* regeneration of adventitious buds were studied under light and dark culture. The results indicated that the contents of ZR, ABA and polyamines under dark culture were higher than that under light culture. The hormone (ZR, ABA and IAA) contents in leaves had the high level during the early stage of inoculation, and the higher level of ZR and ABA, the lower level of IAA were found at the stage of cell division and bud primodium formation. Meanwhile, the ratios of ZR/IAA and ABA/IAA under dark culture were both higher than that under light culture. During the initial stage of inoculation, the endogenous polyamines contents had reached peak, and the contents was also in higher level at the stage of adventitious buds differentiation. During the culture of leaves *in vitro*, the contents of NO under dark culture kept higher than

收稿日期: 2010-01-25; 修回日期: 2010-08-09

基金项目: 河北省科技厅项目(01820196D)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xjzhxw@126.com)

that of light culture. It is obvious that adventitious bud formation from *in vitro* leaves of Red Fuji apple was closely associated with contents of endogenous hormones, polyamines and NO.

**Key words:** apple; leaves; regeneration of adventitious bud; endogenous hormone; endogenous polyamine; nitric oxide

激素与多胺是植物生长发育的重要调节物质,在器官离体培养过程中起重要作用。邵继平(2003)和裴东等(1997)的研究表明,内源激素对菊花、红富士苹果愈伤组织形成和分化起重要作用;朱丽华等(2006)和 Chi 等(1994)报道大白菜下胚轴不定芽再生与内源多胺含量及其平衡关系密切;外源精胺能显著提高‘中椒 5 号’和‘湘研 10 号’辣椒不定芽的伸长率(杨国顺等,2003);然而,对叶片离体培养过程中内源激素和内源多胺的研究相对较少。

NO 在诱导植物不定根形成中具有重要作用(Pagnussat et al., 2002),但在不定芽形成中的作用报道亦相对较少。

本试验中以红富士苹果继代试管苗为材料,研究其叶片不定芽再生过程中叶片内源激素、内源多胺及 NO 的含量及变化趋势,旨在探讨内源激素和内源多胺等在不定芽再生过程中的作用,以期调控叶片再生不定芽提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验于 2008 年 3 月至 2009 年 5 月进行,材料为河北农业大学生物技术实验室保存的红富士苹果(*Malus domestica* Borkh. ‘Red Fuji’)无菌继代试管苗。

试验所用继代培养基为 MS + BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,附加白砂糖  $35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂  $6.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  及 PVA  $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,高压灭菌前培养基调 pH 值至 6.0。再生培养基为:MS + TDZ  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 白砂糖  $35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  + 琼脂  $6.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 1.2 叶片接种培养与处理

取继代培养 25 d 左右的红富士苹果试管苗顶部 2 ~ 4 叶位正在伸展或已展开的幼嫩叶片作为外植体,且叶片大小、形状和色泽基本一致,使外植体在生理状态上基本保持一致。每个叶片垂直主脉横切 3 刀,不切断叶缘,远轴(叶片背面)面向下接种于再生培养基上,每瓶接种 8 片叶。叶片接种后(除光培养处理外)先在黑暗条件下培养 3 周,然后转到光下培养;培养温度  $(25 \pm 3) ^\circ\text{C}$ ,光强约为  $2000 \text{ lx}$ ,光周期 14 h/10 h。

叶片接种于以后,置于光照和黑暗条件下培养,黑暗培养的叶片培养 21 d 后转至光下培养;然后对各个处理分别取接种培养 0、3、7、14、21、28 d 的叶片用液氮速冻,置于  $-70 ^\circ\text{C}$  冰箱中保存待测。

### 1.3 生理指标的测定

内源激素的测定采用酶联免疫法,试剂盒由中国农业大学生物技术实验室提供;内源多胺测定参照杨浚等(1998)的薄层—荧光测定法,NO 测定参照高华君等(2008)的鲁米诺— $\text{H}_2\text{O}_2$  化学发光法测定。

每一指标的测定均重复 3 次,应用 DPS 软件对试验数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 内源激素含量及比值的变化

#### 2.1.1 光、暗培养条件下内源激素含量的动态变化

光、暗培养条件对内源激素含量变化的影响见图 1。由图 1, A 可以看出, 暗培养条件下内源 ZR 含量的变化是接种后含量急速上升, 接种后 3 d 时含量达到第 1 次峰值, 含量为  $18.25 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ , 是未接种之前含量的 1.5 倍, 以后下降; 14 d 时出现第 2 次峰值, 含量为  $17.5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 。光培养条件下内源 ZR 含量也在 3 d 达到高峰, 以后逐渐下降, 暗培养条件下的 ZR 含量显著高于光培养的含

量。由图 1, B 可以看出, 暗培养条件下叶片接种后内源 IAA 含量呈先升高再降低再升高的趋势, 在 3 d 时含量达到高峰, 含量为  $74.67 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ , 较高的含量持续到 7 d, 7 ~ 21 d 含量下降; 光培养条件下的变化与暗培养的有一定的差异, 且在 14 ~ 21 d 光培养的含量显著高于暗培养的。

由图 1, C 可以看出, 暗培养条件下内源 ABA 含量急速上升, 3 d 含量达到峰值, 含量为  $93.6 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ , 以后含量下降, 7 ~ 28 d 相对稳定, 暗培养的含量显著高于光培养的。

由图 1, D 可以看出,  $\text{GA}_3$  的变化与前 3 种激素不同, 表现为叶片接种培养后含量急速下降, 到 14 d 时有所升高, 在 3 ~ 21 d 范围内光培养的高于暗培养的。

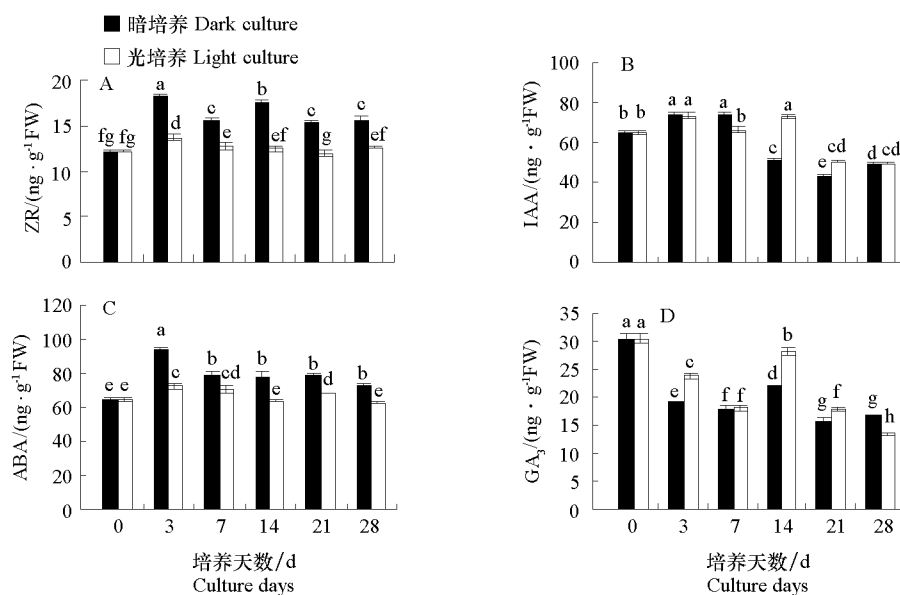


图 1 叶片不定芽再生过程中光照条件对内源激素含量变化的影响

不同小写字母表示  $P < 0.05$  水平上差异显著。下同。

Fig. 1 Effects of light condition on changes of endogenous hormone contents during adventitious buds regeneration from leaves

Different small letters indicate significant difference at  $P < 0.05$ . The same below.

#### 2.1.2 ZR/IAA、ABA/IAA 的变化

内源激素平衡的变化见图 2。叶片接种后暗培养条件下内源 ZR/IAA、ABA/IAA 的比值均呈上升降低再上升再降低的趋势, 在 3 d 和 21 d 各出现峰值; 光培养条件下二者的比值变化与暗培养的有所区别, 并且在 3 d、14 ~ 28 d 的比值显著低于暗培养的。

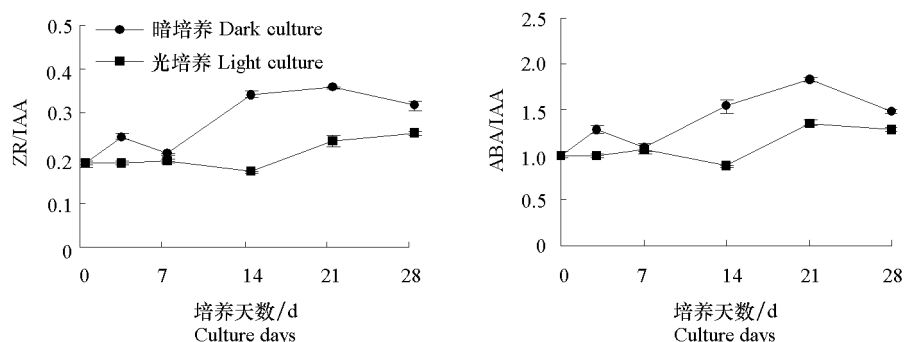


图2 叶片不定芽再生过程中内源激素平衡的变化

Fig. 2 Changes of endogenous hormone balance during adventitious buds regeneration from leaves

## 2.2 内源多胺含量变化

光、暗培养条件对内源多胺变化的影响见图3。由图3可以看出,叶片接种培养以后,内源腐胺(Put)精胺(Spm)亚精胺(Spd)以及内源多胺总量的变化均呈先升高后降低的趋势,腐胺和多胺总量的峰值出现在第3天,精胺和亚精胺的含量高峰出现在第7天,之后有所减低但是与未接种之前比,一直保持在较高的含量水平,且暗培养的含量显著高于光培养的。

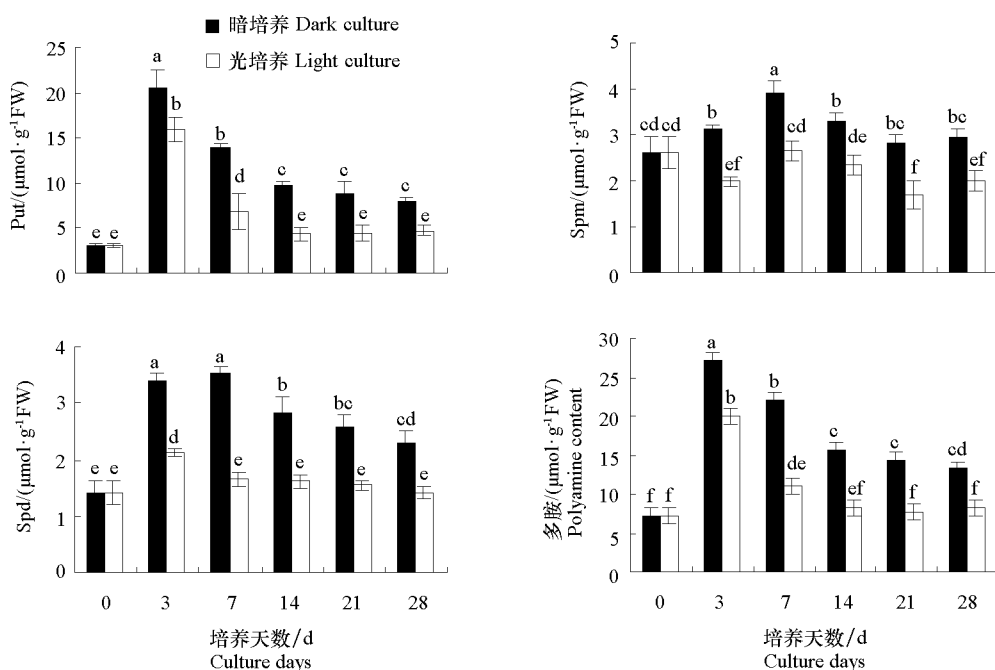


图3 叶片不定芽再生过程中光照条件对内源多胺含量变化的影响

Fig. 3 Effects of light condition on changes of endogenous polyamine contents during adventitious buds regeneration from leaves

## 2.3 NO 含量变化

不定芽再生过程中叶片 NO 含量及变化见图4,叶片接种培养以后 NO 含量迅速上升,在7 d 和28 d 时 NO 含量出现两次峰值,暗培养的含量显著高于光培养的。

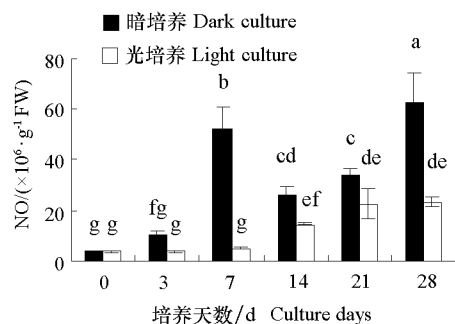


图4 叶片不定芽再生过程中 NO 含量的变化

Fig. 4 Changes of NO contents during adventitious buds regeneration from leaves

### 3 讨论

#### 3.1 内源激素与不定芽再生的关系

田春英 (2009) 对红富士苹果离体叶片再生条件的研究表明, 暗培养及培养基中激素种类及含量对叶片再生起着极为重要的作用, 叶片接种后直接光培养, 不产生或者产生极少的愈伤组织, 再生率和出芽数均为 0; 叶片接种后先进行 3 周的暗培养, 再生率和出芽数分别为 87.04% 和 5.1 个; 培养基中添加 TDZ 的效果优于添加 BA; 叶片接种 4 d 左右细胞开始启动分化, 以后进行旺盛分裂, 到 14 d 时即形成芽原基, 21 d 时外植体上形成肉眼可见的不定芽。本试验结果表明, 叶片接种培养第 3 天内源 ZR、IAA 和 ABA 含量均达到峰值, 且暗培养显著高于光培养, 说明高水平的 IAA、ABA 和 ZR 可以促进叶片细胞分化的启动或表达。随着不定芽形成过程的进展, IAA 含量逐渐降低, ZR、ABA 含量一直保持较高水平, 说明不定芽的形成需要高水平的 ZR 和 ABA 及低水平的 IAA。朱丽华等 (2006) 在大白菜下胚轴不定芽发生过程中也发现了相似结果。

植物体的各种生理效应是内源激素相互作用的结果 (肖关丽和杨清辉, 2001)。通常生长素与细胞分裂素比值越大越有利于不定根分化, 反之有利于不定芽分化。此外, ABA/IAA 比值是影响不定芽再生的关键因素, 裴东等 (1997) 的研究表明, 产生不定芽的愈伤组织内 IAA 与 ABA 的比值小于 1。本研究结果表明, 暗培养条件下叶片内源 ZR/IAA 和 ABA/IAA 的值在叶片细胞启动分化期及不定芽原基形成期比值均处在较高水平, 而光培养条件下则显著降低, 表明较高的 ZR/IAA 和 ABA/IAA 值有利于不定芽的形成。

#### 3.2 内源多胺与不定芽再生的关系

陈春玲和赖钟雄 (2006) 报道龙眼体细胞胚胎发生过程中内源多胺的变化先于形态学的变化, 内源多胺含量高峰及比值高峰均发生在不定芽出现前。Tian 等 (1994) 报道甜瓜子叶外植体内源多胺含量高峰出现在不定芽发生之前。本研究结果表明, 叶片再生过程中, 3 种内源多胺 (Put、Spm、Spd) 含量峰值都是出现在叶片接种初期 (0~7 d), 即不定芽原基出现以前, 腐胺高峰出现在细胞分裂的启动期; 同时在不定芽再生过程中内源多胺含量一直处于较高水平, 且暗培养的内源多胺含量显著高于光培养的, 因此不定芽的诱导与高水平的内源多胺含量密切相关, 较高水平的内源多胺对红富士苹果离体叶片不定芽的发生非常有利。

#### 3.3 NO 与不定芽再生的关系

韩小娇等 (2008) 对平邑甜茶叶片不定芽再生及 NO 效应的研究中发现, 在培养基中添加 NO

供体硝普纳 (SNP) 以后, 可以极显著地诱导平邑甜茶叶片不定芽分化。此外, 还有研究表明, 细胞分裂素可诱导拟南芥一氧化氮的产生, 这可能与细胞分裂素能快速刺激 NO 的产生有关 (Tun et al., 2008)。本研究发现不定芽再生过程中, 叶片接种初期及后期不定芽形成时 NO 含量均处在较高水平, 且暗培养下含量显著高于光培养的。可见, NO 与叶片不定芽再生关系密切。

## References

- Chen Chun-ling, Lai Zhong-xiong. 2006. The changes of the contents of endogenous polyamines in the process of somatic embryogenesis from embryogenic callus in longan. *Journal of Fujian Agricultural and Forestry University: Natural Science Edition*, 35 (4): 381–383. (in Chinese)
- 陈春玲, 赖钟雄. 2006. 龙眼体细胞胚胎发生过程中内源多胺的变化. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 35 (4): 381–383.
- Chi G L, Lin W S, Lee J E E, Pua E C. 1994. Role of polyamines in de novo shoot morphogenesis from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 13 (6): 323–329.
- Gao Hua-jun, Yang Hong-qiang, Zhang Wei. 2008. Effects of nitric oxide on lateral root formation induced by IBA in *Malus hupehensis* Rehd. seedlings. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (2): 157–162. (in Chinese)
- 高华君, 杨洪强, 张伟. 2008. 一氧化氮在吲哚丁酸诱导平邑甜茶幼苗侧根形成中的作用. *园艺学报*, 35 (2): 157–162.
- Han Xiao-jiao, Yang Hong-qiang, You Shu-zhen, Duan Kai-xuan, Zhang Xin-rong, Zhao Hai-zhou. 2008. Adventitious shoot regeneration from leaves of *Malus hupehensis* and effects of nitric oxide. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (3): 419–422. (in Chinese)
- 韩小娇, 杨洪强, 由淑贞, 段凯旋, 张鑫荣, 赵海洲. 2008. 平邑甜茶叶片不定芽再生及 NO 的效应. *园艺学报*, 35 (3): 419–422.
- Pagnussat G C, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L. 2002. Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology*, 29: 954–956.
- Pei Dong, Zheng Jun-bao, Ling Yan-rong, Yuan Yan-xi, Xu Zhen-hua. 1997. Studies on the organ differentiation and some relative physiological indexes in the culture *in vitro* of Fuji apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 24 (3): 229–234. (in Chinese)
- 裴东, 郑均宝, 凌艳荣, 员彦席, 徐振华. 1997. 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. *园艺学报*, 24 (3): 229–234.
- Shao Ji-ping. 2003. Studies of soundwave on the change of the endogenous hormone IAA and ABA of chrysanthemum callus [M. D. Dissertation]. Chongqing: Chongqing University. (in Chinese)
- 邵继平. 2003. 声波刺激对菊花愈伤组织内源激素 IAA 和 ABA 动态变化的实验研究 [硕士论文]. 重庆: 重庆大学.
- Tian Chan-gen, Li Ren-gui, Guan He. 1994. Relationship between polyamines and morphogenesis in cotyledons of *Cucumis melo* L. cultured *in vitro*. *Acta Botanica Sinica*, 36 (suppl.): 219–222.
- Tian Chun-ying. 2009. Studies on regeneration mechanism of adventitious buds from leaves *in vitro* of Red Fuji apple [M.D. Dissertation]. Baoding: Hebei Agricultural University.
- 田春英. 2009. 红富士苹果离体叶片不定芽再生机理研究 [硕士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Tun N N, Livaja M, Kieber J J, Scherer G F. 2008. Zeatin-induced nitric oxide (NO) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants of NO biosynthesis and of two-component signaling genes. *New Phytologist*, 178: 515–531.
- Xiao Guan-li, Yang Qing-hui. 2001. Advances in endogenous hormones of plant tissue culture. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 16 (2): 136–138. (in Chinese)
- 肖关丽, 杨清辉. 2001. 植物组织培养过程中内源激素研究进展. *云南农业大学学报*, 16 (2): 136–138.
- Yang Guo-shun, Xie Bing-yan, Jiang Fang-ling, Wang Xiao-wu, Lu Xiang-yang, Liu Zhi-min. 2003. Effects of polyamine and ABA on regeneration from cotyledon of pepper. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (5): 603–605. (in Chinese)
- 杨国顺, 谢丙炎, 蒋芳玲, 王晓武, 卢向阳, 刘志敏. 2003. 多胺与脱落酸对辣椒子叶再生的影响. *园艺学报*, 30 (5): 603–605.
- Yang Jun, He Ping-qing, Yu Bing-gao. 1988. Thin-layer chromatography and fluorometry for plant polyamines. *Plant Physiology Communications*, (6): 63–66. (in Chinese)
- 杨俊, 贺平清, 俞炳昊. 1988. 植物多胺的薄层—荧光测定法. *植物生理学通讯*, (6): 63–66.
- Zhu Li-hua, Zhang Cai-qin, Sheng Xiao-guang, Zhu Yue-lin. 2006. Changes of endogenous hormones and polyamines contents during *in vitro* adventitious shoot regeneration from hypocotyls explants of Chinese cabbage. *Fujian Journal of Agricultural Science*, 21 (2): 143–146. (in Chinese)
- 朱丽华, 张彩琴, 盛小光, 朱月林. 2006. 大白菜下胚轴不定芽再生过程中内源激素和内源多胺含量变化. *福建农业学报*, 21 (2): 143–146.