

生长素和细胞分裂素对平邑甜茶组培苗 PA s和 NO 含量的影响

张 龙, 杨洪强*, 李 强, 孙晓莉, 乔海涛

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018)

摘 要: 以平邑甜茶继代组培苗为试材, 研究了 NAA、BA、ZT 和 6-BA 作用下组培苗的生长、内源多胺 (PA s) 和一氧化氮 (NO) 含量的变化。结果表明, 在 MS 培养基中添加 $0.02 \sim 1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAA 或 BA 后, 外植体鲜样质量增加率和蛋白质含量以及多胺含量和一氧化氮含量均明显增加, 其中浓度在 $0.10 \sim 0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时增加最高; 同样浓度下, NAA 处理的外植体鲜样质量增加率和腐胺含量高于 BA。在 $0.08 \sim 4.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 随着 ZT 或 6-BA 浓度的升高, 外植体鲜样质量增加率、可溶性蛋白含量、多胺含量和一氧化氮含量均逐渐升高; 同样浓度下, 6-BA 处理的外植体鲜样质量增加率和腐胺含量高于 ZT。生长素和细胞分裂素促进组培苗生长与促进内源 PA s 和 NO 的生成相伴随, 组培苗生长动态与内源多胺和一氧化氮含量的变化趋势一致。

关键词: 平邑甜茶; 一氧化氮; 多胺; 生长素; 细胞分裂素

中图分类号: S 661; Q 945 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2009) 07-0953-06

Effects of Auxin and Cytokinin on PA s Content and NO Generation of *Malus hupehensis* Rehd. in Vitro

ZHANG Long, YANG Hong-qiang*, LI Qiang, SUN Xiao-li, and Qiao Hai-tao

(College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Taian, Shandong 271018, China)

Abstract: The effects of NAA, BA, ZT and 6-BA on the growth and the changes on endogenous levels of PA s and nitric oxide were investigated by using regeneration system of *Malus hupehensis* Rehd. in vitro. As a result, the increase rate of fresh weight and the contents of protein, polyamines (PA s) and nitric oxide (NO) increased significantly in MS medium supplemented with $0.02 - 1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA or BA, and the increases were the highest at concentrations of $0.10 - 0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. One more thing, the effects of NAA on the increase rate of fresh weight and putrescine content were higher than that of BA at the same concentration. With the increase concentration of ZT or 6-BA at $0.08 - 4.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the increase rate of fresh weight, protein, PA s and NO contents increased gradually. Moreover, the effects of 6-BA on increase rate of fresh weight and putrescine content were higher than those of ZT at the same concentration. Auxin and cytokinin promoted the growth accompanied with the elevated production of PA s and NO, and the growth dynamics showed the similar trend with the contents of PA s and NO in explants in vitro.

Key words: *Malus hupehensis* Rehd.; nitric oxide; polyamine; auxin; cytokinin

据报道, 生长素类物质 NAA 可提高石竹内源多胺含量的升高 (桂仁意等, 2003), 高水平的内源 BA 则降低内源多胺的总体水平 (Santa-Catarina et al, 2006); 细胞分裂素诱导拟南芥一氧化氮的

收稿日期: 2008 - 12 - 26; 修回日期: 2009 - 04 - 04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671452; 30571285), 高校博士点科研基金项目 (20050434009)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: hqyang@sdau.edu.cn; labft@sdau.edu.cn)

产生 (Tun et al, 2001, 2008)。多胺和一氧化氮均为精氨酸的转化产物 (杨洪强和高华君, 2007), 它们和激素对植物生长发育都有重要影响 (Weyers & Paterson, 2001; Kusano et al, 2008), 但在植物生长调节剂作用下, 内源多胺和一氧化氮的变化与组培苗生长的关系尚未见报道。

平邑甜茶是原产山东平邑县的优良苹果砧木资源, NO外源供体可增加平邑甜茶新根数量, 促进实生苗新根生长 (高华君等, 2008b), 还可促进平邑甜茶外植体增殖、诱导不定芽分化和组培苗生根 (韩小娇等, 2008; Han et al, 2009)。现以平邑甜茶继代组培苗带叶茎段为材料, 研究生长素和细胞分裂素作用下, 组培苗的生长及生长过程中内源多胺和一氧化氮含量的变化, 为进一步揭示生长素和细胞分裂素促进植物生长的机理提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试材和处理

试验于 2008年冬季在山东农业大学园艺科学与工程学院组培室进行。以平邑甜茶继代组培苗的带叶茎段 (0.2~0.3 g) 为外植体, 在 MS基本培养基中加入不同浓度的生长素和细胞分裂素。生长素选用 NAA和 BA, 它们在培养基中的浓度分别设为 0 (对照)、0.02、0.10、0.50和 1.00 mg·L⁻¹; 细胞分裂素选用 ZT和 6-BA, 浓度分别设为 0 (对照)、0.08、0.40、2.00和 4.00 mg·L⁻¹。每瓶中接种 3~4株外植体, 每个处理重复 3次 (3瓶), 培养 7 d取样测定。

1.2 测定方法

多胺含量测定: 采用 Zhao和 Yang (2008) 改进的荧光—薄层层析法, 称取鲜样, 在 5%高氯酸中冰浴下匀浆, 冰浴浸提 1 h (其间摇晃 2次, 每 20 min 1次), 高速 (26 000 g) 冷冻离心 20 min, 取上清液, 用丹磺酰氯丹磺化后薄层层析 (展开剂为氯仿:三乙胺=100:20, 体积比), 层析后硅胶板在紫外分析仪下检出 (激发波长 350 nm) 丹磺酰化多胺, 用乙酸乙酯溶解丹磺酰化多胺, 在荧光分光光度计 (FL-4500) 上定量, Ex=337nm, Em=495 nm。

一氧化氮含量测定: 采用高华君等 (2008a) 改进的鲁米诺—H₂O₂化学发光法。新鲜植物材料在无氧水冰浴中研磨, 4℃下 12 000 g离心 20 min, 取上清液作为提取液立即用 BPCL 超微弱发光测量仪测定化学发光。向发光管中加入 160 μL发光液 (50 mmol·L⁻¹碳酸盐缓冲液, 含 10 μmol·L⁻¹鲁米诺、20 mmol·L⁻¹ H₂O₂、2 mmol·L⁻¹ EDTA, 37℃时 pH 9.72), 快速注入 40 μL提取液, 记录波长 635 nm时 6 s累计发光值。以每 g鲜样质量产生的化学发光量表示 NO相对含量 (1×10⁶ counts·g⁻¹ FW)。测量参数: 调节高压为 800 V, 标准光源发光强度 7 000 counts·s⁻¹, 本底强度 5 counts·s⁻¹, 采样间隔时间 1 s, 测定温度 30℃。

蛋白质含量采用 Bradford (1976) 的方法测定。培养 7 d时测定并计算外植体鲜样质量增加率。

采用 Excel 2003和 SAS 8.0软件进行数据分析, 采用新复极差法进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 生长素和细胞分裂素对组培苗生长量的影响

由图 1, A可见, 培养 7 d时, MS培养基中添加 0.02~1.00 mg·L⁻¹的 NAA或 BA的处理, 外植体鲜样质量增加率均显著增加 ($P<0.05$), 其中添加 0.50 mg·L⁻¹时增加率最高, 与对照差异达到极显著水平 ($P<0.01$); 同样浓度下, NAA处理的外植体增重率高于 BA处理, 其中添加 0.10 mg·L⁻¹时两处理差异达到极显著水平 ($P<0.01$)。添加 ZT和 6-BA也提高了外植体鲜样质量增加率, 在 0.08~4.00 mg·L⁻¹范围内, 外植体质量增加率随着浓度的提高而增加, 在添加 4.00 mg·L⁻¹时升高达到显著水平 ($P<0.05$); 同样浓度下, 6-BA质量增加效果高于 ZT处理 (图 1, B)。

如图 2所示, 在 MS培养基中添加 0.02~1.00 mg·L⁻¹的 NAA或 BA也增加了可溶性蛋白含量,

其中添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时增加值最高 (图 2, A), 差异达到了极显著水平 ($P < 0.01$)。添加 $0.08 \sim 4.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ZT 或 6-BA, 蛋白含量随着 ZT 和 6-BA 浓度的提高而增加 (图 2, B)。

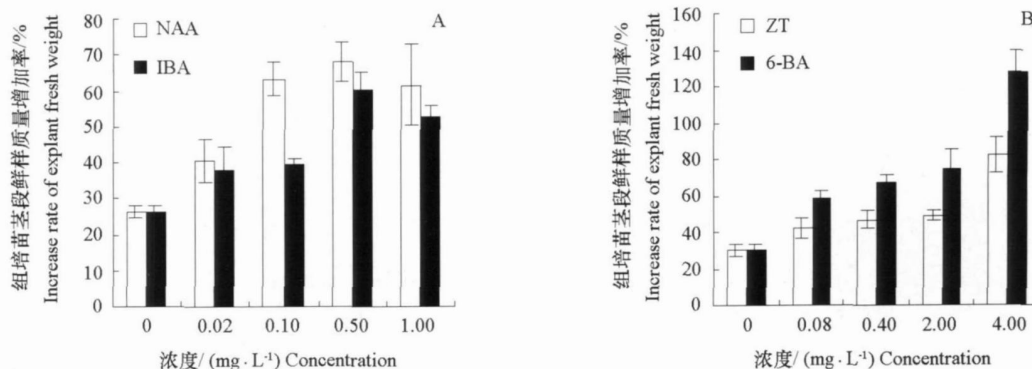


图 1 NAA、IBA、ZT 和 6-BA 对组培苗鲜样质量增加率的影响

Fig. 1 Effects of NAA, IBA, ZT and 6-BA on increase rate of fresh weight *in vitro*

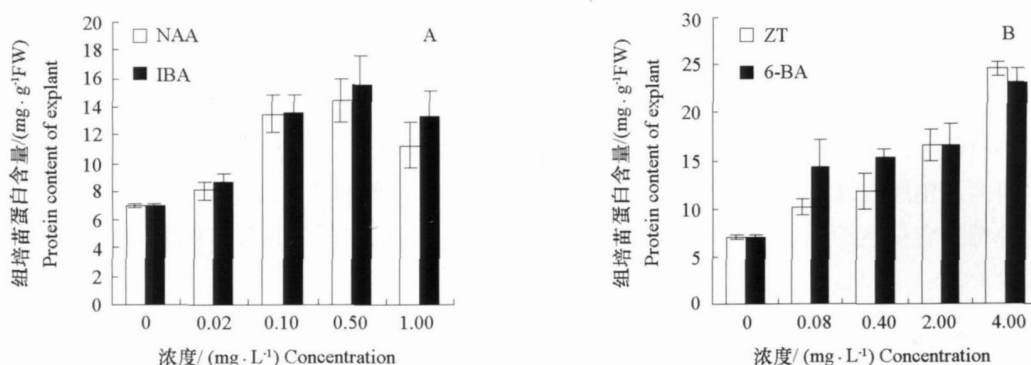


图 2 NAA、IBA、ZT 和 6-BA 对组培苗蛋白含量的影响

Fig. 2 Effects of NAA, IBA, ZT and 6-BA on the protein content *in vitro*

2.2 生长素和细胞分裂素对组培苗内源多胺含量的影响

由图 3 和图 4 可知, 在 MS 培养基中添加 $0.02 \sim 1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAA 或 BA 后, 组培苗内源腐胺和亚精胺含量均明显增加, 其中 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时含量最高 ($P < 0.01$); 在 $0.02 \sim 0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 同样浓度 NAA 的作用效果高于 BA 处理 ($P < 0.01$)。

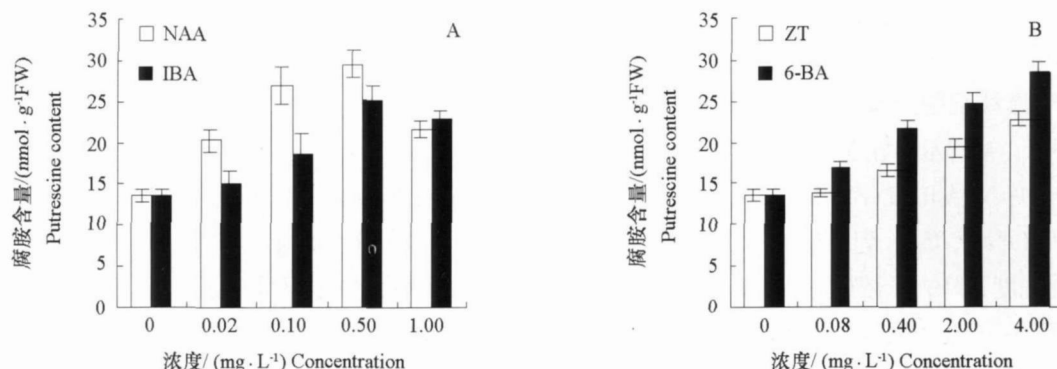


图 3 NAA、IBA、ZT 和 6-BA 对组培苗内源腐胺含量的影响

Fig. 3 Effects of NAA, IBA, ZT and 6-BA on content of free putrescine *in vitro*

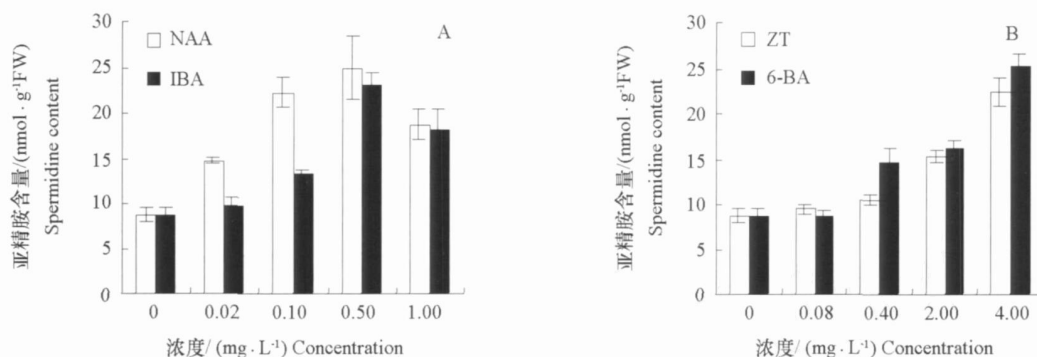


图4 NAA、IBA、ZT和6-BA对组培苗内源亚精胺含量的影响

Fig. 4 Effects of NAA, IBA, ZT and 6-BA on content of free spermidine in vitro

添加 ZT和 6-BA 也增加了组培苗内源腐胺和亚精胺含量 (图 3和图 4), 在 $0.08 \sim 4.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 内源腐胺和亚精胺含量随着浓度的升高而增加, 在添加 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时处理和对照差异都达到极显著水平 ($P < 0.01$)。同样浓度下, 6-BA 增加内源腐胺效果显著高于 ZT ($P < 0.05$); 但除添加 $0.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时外, ZT和 6-BA 对内源亚精胺含量的影响差异不显著。

添加 $0.02 \sim 1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAA 或 BA 同样增加了组培苗内源精胺的含量 (图 5, A), 其中添加 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 处理后组培苗内源精胺含量最高, 处理和对照差异达到极显著水平 ($P < 0.01$); 但同样浓度下, NAA 和 BA 两者对内源精胺含量的影响差异不显著。添加 ZT和 6-BA 同样增加了组培苗内源精胺含量 (图 5, B); 在 $0.08 \sim 4.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 随着 ZT和 6-BA 浓度的提高, 组培苗内源精胺含量逐渐增加; 同样浓度下, ZT和 6-BA 两者的作用效果没有明显差别。

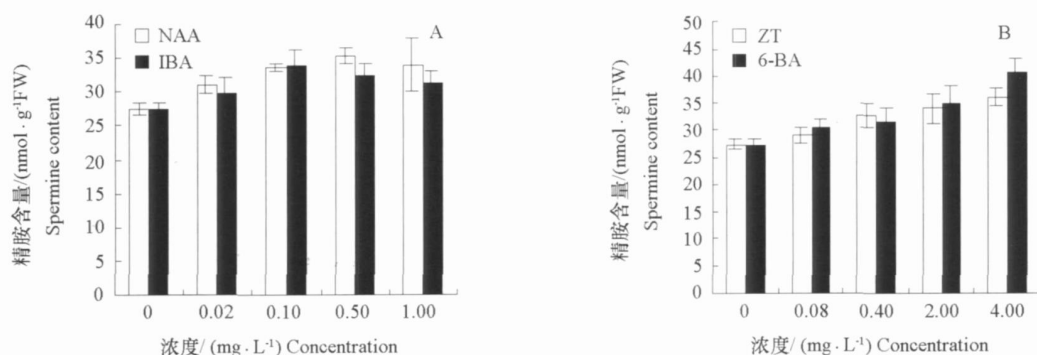


图5 NAA、IBA、ZT和6-BA对组培苗内源精胺含量的影响

Fig. 5 Effects of NAA, IBA, ZT and 6-BA on content of free spermine in vitro

2.3 生长素和细胞分裂素对组培苗一氧化氮含量的影响

如图 6, A 所示, 在 MS 培养基中添加 $0.02 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAA 或 BA 后, 组培苗一氧化氮含量均明显增加; NAA $0.02 \sim 0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 BA $0.10 \sim 1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 组培苗一氧化氮含量增加都达到显著水平 ($P < 0.05$), 但 NAA 浓度超过 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、BA 超过 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 组培苗一氧化氮含量的增加程度下降; 低浓度时 (0.02 和 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), NAA 处理效果显著高于 BA ($P < 0.05$)。

ZT 和 6-BA 也增加了组培苗一氧化氮含量, 在 $0.08 \sim 4.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 组培苗一氧化氮含量随着浓度的提高而增加, 且处理和对照差异达到显著水平 ($P < 0.05$); 低浓度时 ($0.08 \sim 2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), ZT 的处理效果高于 6-BA, 但在浓度为 $4.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, ZT 处理后组培苗一氧化氮含量低于 6-BA 处理 (图 6, B), 两者差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。

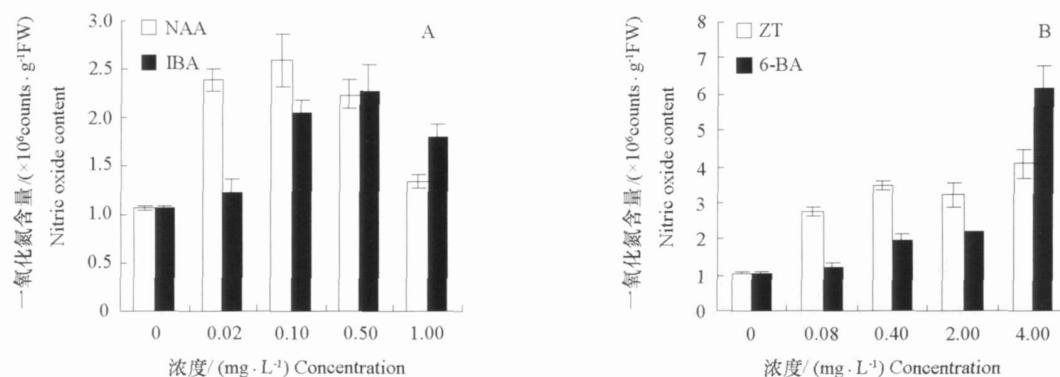


图 6 NAA、IBA、ZT 和 6-BA 对组培苗一氧化氮含量的影响

Fig. 6 Effects of NAA, IBA, ZT and 6-BA on content of nitric oxide in vitro

3 讨论

适宜浓度的生长素对平邑甜茶继代组培苗的生长呈现促进效应。但在生长素诱导的组培苗生长过程中, 组培苗内源多胺含量随着生长素浓度升高而逐渐升高, 生长素浓度超过 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 多胺积累量下降, 与组培苗生长量的变化趋势几乎完全一样。这一方面表明生长素在促进组培苗生长的同时也促进了多胺积累, 另一方面也表明较高浓度的生长素不利于多胺积累。Santa-Catarin 等 (2006) 在 *Ocotea catharinensis* 也发现高水平的内源 IAA 抑制内源多胺总水平的提高。事实上, 高浓度生长素会诱导乙烯的生成, 而多胺和乙烯的合成需要共同的合成前体 S-腺苷蛋氨酸, 两者产生量呈显著负相关 (Li & Wang, 2004), 这应是较高浓度生长素不利于多胺积累的重要原因。

本试验结果显示, 细胞分裂素同生长素一样, 也明显促进组培苗的生长和内源多胺的积累。多胺能够调节 DNA 的复制以及转录和翻译等 (Kusano et al, 2008), DNA 的复制是细胞开始分裂的前提, 生长素和细胞分裂素主要作用是促进细胞分裂, 而组培苗的生长需要细胞分裂作基础, 因此, 生长素和细胞分裂素对组培苗生长的调节, 很可能通过多胺对 DNA 的复制和基因表达的调节而实现。

一氧化氮作为一种信使分子, 参与激素对植物生长发育的调节过程 (Beligni & Lamattina, 1999; Correa-Aragunde et al, 2006)。本研究结果显示, NAA、BA、ZT 和 6-BA 都明显促进了一氧化氮的生成, 这与它们促进组培苗快速生长紧密关联, 因为在快速生长的器官中 NO 含量都很高 (高华君等, 2008a)。一氧化氮与多胺不同, 它是一种活性氮, 和活性氧类似, 寿命比较短, 不能像多胺那样直接调节 DNA, 而主要作为信使分子传递外界刺激 (Lamattina et al, 2003), 因此, 在本试验中一氧化氮应当作为 NAA、BA、ZT 和 6-BA 的信使分子而调节组培苗的生长。

多胺和一氧化氮都可以利用精氨酸为生物合成前体, 在两者都以精氨酸为惟一合成前体且精氨酸供应有限的情况下, 激素诱导的多胺和一氧化氮合成会相互抑制。但是植物内源一氧化氮除了以精氨酸为底物, 通过一氧化氮合成酶途径产生外 (Guo et al, 2003), 还可以硝酸盐为底物, 通过硝酸还原酶途径 (Yamasaki et al, 1999) 合成。MS 培养基中含有硝酸盐, 除可提供底物外, 还能够诱导硝酸还原酶, 这有利于避免一氧化氮与多胺竞争底物精氨酸。而且生长素和细胞分裂素对胡椒硝酸还原酶有激活作用 (Ruiz et al, 2003); 最近 Kolbert 等 (2008) 在拟南芥根系中发现, 生长素能够诱导一氧化氮通过硝酸还原而产生。由此可推测, 生长素和细胞分裂素也可能通过诱导硝酸还原而促进组培苗内源 NO 生成。此外, Tun 等 (2006) 发现多胺能够诱导拟南芥一氧化氮的生物合成, 这样生长素和细胞分裂素诱导组培苗生成的内源多胺 (图 3; 图 4; 图 5) 也可能会促进一氧化氮的生物合成, 从而使平邑甜茶组培苗内源多胺和一氧化氮在生长素和细胞分裂素处理下表现出相似的变化趋势。

References

- Beligni M V, Lamattina L. 1999. Nitric oxide: A non-traditional regulator of plant growth. *Trends in Plant Science*, 6: 508 - 509.
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248 - 254.
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Chevalier C, Lamattina L. 2006. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 57: 581 - 588.
- Gao Hua-jun, Yang Hong-qiang, Du Fang-ling, Zhao Hai-zhou. 2008a. Changes in arginine and nitric oxide levels in *Malus hupehensis* Rehd seedlings during plant development. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 14 (4): 774 - 778. (in Chinese)
- 高华君, 杨洪强, 杜方岭, 赵海洲. 2008a. 平邑甜茶幼苗生长过程中精氨酸和一氧化氮水平的变化. *植物营养与肥料学报*, 14 (4): 774 - 778.
- Gao Hua-jun, Yang Hong-qiang, Zhang Wei. 2008b. Effects of nitric oxide on lateral root formation induced by BA in *Malus hupehensis* Rehd seedlings. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (2): 157 - 162. (in Chinese)
- 高华君, 杨洪强, 张 伟. 2008b. 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.
- Gui Ren-yi, Cao Fu-liang, Shen Hui-juan, Xie Yin-feng. 2003. Effects of plant growth regulators on flowering and changes of contents of endogenous hormones and polyamines during flowering of *Dianthus chinensis* L. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition*, 27: 6 - 10. (in Chinese)
- 桂仁意, 曹福亮, 沈惠娟, 谢寅峰. 2003. 植物生长调节剂对石竹试管成花及内源激素与多胺的影响. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 27: 6 - 10.
- Guo F, Okamoto M, Crawford N M. 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 302: 100 - 103.
- Han X J, Yang H Q, Duan K X, Zhang X R, Zhao H Z, You S Z, Jiang Q Q. 2009. Sodium nitroprusside promotes multiplication and regeneration of *Malus hupehensis* in vitro plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96: 29 - 34.
- 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.
- Kolbert Z, Bartha B, Erdei L. 2008. Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *Journal of Plant Physiology*, 165: 967 - 975.
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y. 2008. Polyamines: Essential factors for growth and survival. *Planta*, 228: 367 - 381.
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G. 2003. Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology*, 54: 109 - 136.
- Li C Z, Wang G X. 2004. Interactions between reactive oxygen species, ethylene and polyamines in leaves of *Glycyrhiza inflata* seedlings under root osmotic stress. *Plant Growth Regulation*, 42: 552 - 560.
- Ruiz J M, Castilla N, Romero L. 2000. Nitrogen metabolism in pepper plants applied with different bioregulators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (7): 2925 - 2929.
- Santa-Catarina C, Silveira V, Tiago S B. 2006. AA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. *Plant Growth Regulation*, 49: 237 - 247.
- Tun N N, Holk A, Scherer G F E. 2001. Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Letters*, 509: 174 - 176.
- 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.
- Tun N N, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh E I, Scherer G F. 2006. Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 47 (3): 346 - 354.
- Weyers J D B, Paterson N W. 2001. Plant hormones and the control of physiological processes. *New Phytologist*, 152: 375 - 407.
- Yamasaki H, Sakihama Y, Takahashi S. 1999. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: New features of an old enzyme. *Trends in Plant Science*, 4: 128 - 129.
- Yang Hong-qiang, Gao Hua-jun. 2007. Physiological function of arginine and its metabolites in plants. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 33 (1): 1 - 8. (in Chinese)
- 杨洪强, 高华君. 2007. 植物精氨酸及其代谢产物的生理功能. *植物生理与分子生物学学报*, 33 (1): 1 - 8.
- Zhao H Z, Yang H Q. 2008. Exogenous polyamines alleviate the lipid peroxidation induced by cadmium chloride stress in *Malus hupehensis* Rehd. *Scientia Horticulturae*, 116: 442 - 447.