

不同激素配比对牡丹愈伤组织诱导及生化指标的影响

贾小平, 孔祥生, 李海刚, 孙晓旭, 王磊

(河南科技大学 农学院, 河南 洛阳 471003)

摘 要: 以牡丹组培苗叶片、叶柄为外植体, 设计 5 个不同激素水平的诱导培养基, 在愈伤组织形成过程中对所需激素水平、生化指标变化规律进行研究。结果表明: 叶片、叶柄愈伤组织诱导的最适培养基均为 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L。在 6-BA 浓度一定下, 叶柄愈伤组织诱导率随 NAA 浓度的升高而增高, 褐化率随 NAA 浓度升高而下降; 叶片愈伤组织诱导率及褐化率与 NAA 浓度无明显关联。外植体在不同培养基上愈伤组织诱导过程中可溶性糖、可溶性蛋白、SOD、POD 4 个生化指标随时间变化规律各不相同。

关键词: 牡丹; 愈伤组织; 激素水平; 生化指标

中图分类号: S 685.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)08-0172-04

牡丹是世界著名的观赏花卉之一。因其栽培品种繁多, 适宜温室周年栽培, 所以在我国花卉市场占有重要地位。近年来我国牡丹的栽培面积越来越大, 随之而来的是如何提高牡丹的人工培养成活率。传统的繁殖方法生产周期长, 生产成本低, 同时易导致牡丹感染病毒, 种性下降。为了实现牡丹种植的规模化、工厂化, 降低生产成本, 组织培养是一项有效的途径^[1-3]。

目前关于牡丹的组织培养研究的报道较多, 如腋芽离体快繁、愈伤组织诱导、植株再生、胚培养等, 并取得一定进展, 但还没有关于牡丹组培过程中内在生理、生化变化规律方面的报道。植物组织培养的过程可以看作是一系列基因在时间和空间上顺序表达的过程, 蛋白、酶类等都是基因表达的产物。因此了解植物组织培养过程中生理生化变化规律可以深入认识植物愈伤组

织形成及植株再生的内在生化基础, 为从分子水平揭示愈伤组织的形成、植株再生机理提供前提条件。该研究以‘凤丹白’的组培苗叶片、叶柄为外植体, 比较了二者愈伤组织诱导所需的激素组合及该过程中可溶性糖、可溶性蛋白、SOD 活性、POD 活性 4 个生化指标的变化规律, 为从分子水平揭示牡丹愈伤组织形成机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

牡丹栽培品种‘凤丹白’的组培苗叶片、叶柄为外植体材料。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织诱导培养基配制方法 配制 5 个激素浓度组合的诱导培养基: ① MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.05 mg/L; ② MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L; ③ MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L; ④ MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.3 mg/L; ⑤ MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L。上述诱导培养基中蔗糖浓度为 30 g/L, 琼脂

第一作者简介: 贾小平(1973-), 男, 博士, 副教授, 现从事植物组织培养教学工作。

收稿日期: 2009-10-28

Research on the Tissue Culture of *Acer griseum*

CHEN Li, LI Bing, WANG Mei, NIU Xiao-pai

(Jiyuan Academy of Agriculture Science, Jiyuan, Henan 454650)

Abstract: In this experiment, various explants—tender shoots, leaves and stalk derived from the *Acer griseum* had been used to induce the callus. The results showed that for inducing the callus, the optimized tissue were the egments of tender shoots, secondly were the leaves stalks, finally the leaves; the optimum forum for inducing callus was improve MS+6BA 1.8 mg/L+2,4-D 0.8mg/L+0.6 g/L charcoal, for subculture 80%; for subculture, improving MS+6BA 3.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L+0.6 g/Lcharcoal could increase the propagational coefficient by 3.0.

Key words: *Acer griseum* (Franch.) Pax; explants; tissue culture; callus

粉浓度为 7 g/L, pH 5.8。每个组合配制 400 mL 培养基, 分装于 50 mL 三角瓶中, 每瓶装 25 mL 左右, 每个组合分装 16 瓶, 用封口膜将瓶口封闭, 12 ~ 15 磅高压灭菌 20 min。

1.2.2 外植体的培养与观察 选择牡丹组培苗幼嫩、刚展开的叶片, 垂直于中脉切割成大小相同的两半, 将叶边缘部分切去, 叶面朝下接种于诱导培养基表面。将未木质化的叶柄切割成 1 cm 的小段水平接种于诱导培养基表面。置于人工气候箱中培养, 培养条件为: 温度 25℃, 光照强度 2 000 lx, 光照时间 12 h/d。对所培养材料在培养的第 0、5、11、15、20、25、29、36 天, 分 8 个时间点观察其生长情况, 计算每个时间点外植体的愈伤率(形成愈伤外植体数/总外植体数×100%)、褐化率(褐化外植体数/总外植体数×100%)。

1.2.3 生化指标的测定方法 在培养的第 5、10、15、20、25、30 天分别测定诱导培养基①、②、③上叶片、叶柄外植体中可溶性糖、可溶性蛋白的含量及 SOD、POD 的活性。可溶性糖含量采用蒽酮比色法测定, 可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定, SOD 活性采用氮蓝四唑(NBT)法测定, POD 活性采用愈创木酚法测定。

1.2.4 试验数据分析方法 用微软办公软件 Excel 2003 对所测数据进行处理, 以培养天数为横轴, 以外植体愈伤率、褐化率、可溶性糖含量、可溶性蛋白含量、SOD 活性、POD 活性为纵轴做图。

2 结果与分析

2.1 牡丹叶片、叶柄愈伤组织诱导随时间变化比较

叶柄和叶片属于不同的器官, 诱导愈伤所需的激素浓度可能会有所不同。该研究发现叶片培养 20 d 之内, 所有组合培养基中均没出现愈伤组织, 随着时间的延长各培养基中愈伤组织诱导率表现不同程度增加, 但和 NAA 浓度无明显关联。培养到第 36 天时愈伤组织诱导率最高的激素组合为诱导培养基⑤, 为 33%。叶柄愈伤组织诱导比叶片快, 当培养至第 11 天时部分激素组合开始出现愈伤, 随着时间延长, 除诱导培养基①外各激素组合愈伤率开始增加, 培养到 36 d 时, 愈伤组织诱导率最高的激素组合为诱导培养基⑤为 64%, 在 6-BA 浓度一定下, 随 NAA 浓度的降低愈伤组织诱导率逐渐降低。因此, 叶片、叶柄具有相同的愈伤组织诱导最适培养基(见图 1、2)。

2.2 牡丹叶片、叶柄外植体褐化情况比较

随着培养时间的推移, 各培养基组合中叶片外植体褐化比率发生不同程度的增加, 在第 36 天时诱导培养基②褐化比率最大, 为 45%, 诱导培养基①褐化比率最低, 为 35%。叶柄外植体褐化出现时间比较早, 在培养第 5 天时所有 5 个培养基组合都观察到褐化现象, 培养到第 36 天时褐化率由高到低依次是诱导培养基①>②

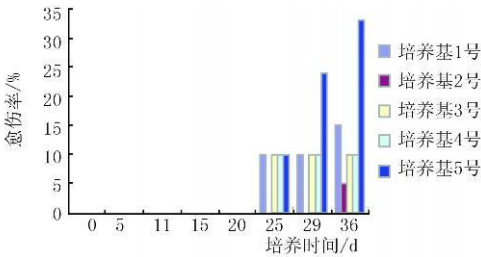


图 1 牡丹叶片愈伤组织诱导随时间变化情况

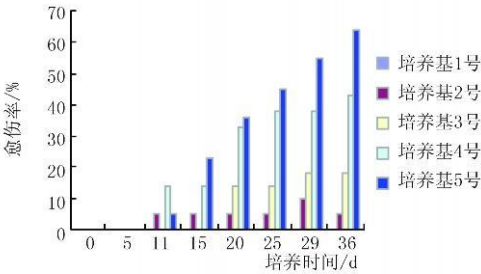


图 2 牡丹叶柄愈伤组织诱导随时间变化情况

>③>④>⑤, 而这 5 个培养基 NAA 浓度正好是由低到高, 由此可见, 在 6-BA 浓度一定的条件下, 在一定浓度范围内, 随着 NAA 浓度的升高, 叶柄的褐化率逐渐降低, 诱导培养基⑤叶柄的褐化率仅为 14% (见图 3、4)。

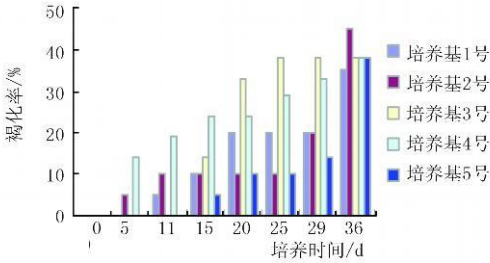


图 3 牡丹叶片外植体褐化情况

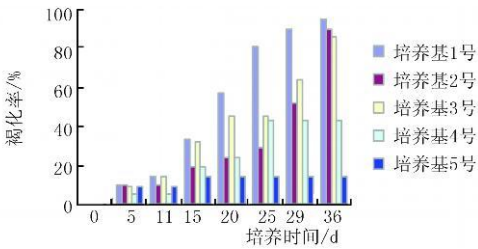


图 4 牡丹叶柄外植体褐化情况

2.3 牡丹叶片、叶柄愈伤组织诱导过程中可溶性糖含量变化比较

在整个愈伤组织形成过程中, 叶片、叶柄可溶性糖含量变化趋势比较一致, 即升高、下降、再升高、再下降,

但是叶片和叶柄在不同激素浓度组合的诱导培养基上愈伤组织形成过程中可溶性糖含量各不相同,其中叶片在培养基②上愈伤组织可溶性糖含量最高,而叶柄在培养基③上愈伤组织可溶性糖含量最高(见图 5、6)。

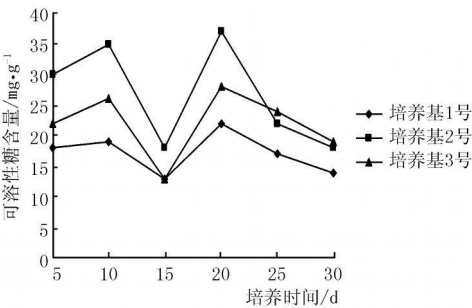


图 5 叶片愈伤组织形成过程中可溶性糖含量的变化

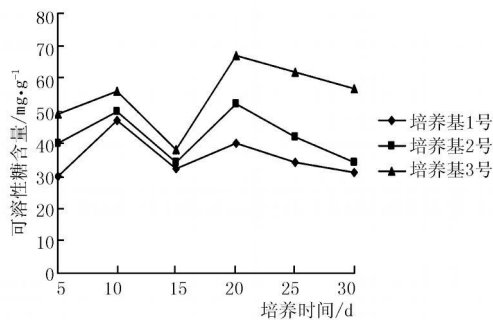


图 6 叶柄愈伤组织形成过程中可溶性糖含量的变化

2.4 牡丹叶片、叶柄愈伤组织形成过程中可溶性蛋白的含量变化比较

叶片、叶柄愈伤组织诱导过程可溶性蛋白含量变化趋势与可溶性糖含量变化趋势相一致,即升高、下降、再升高、再下降;最高可溶性蛋白含量所在激素组合与最高可溶性糖含量所在激素组合也相一致,叶片在培养基②上愈伤组织可溶性蛋白含量最高,而叶柄在培养基③上愈伤组织可溶性蛋白含量最高(见图 7、8)。

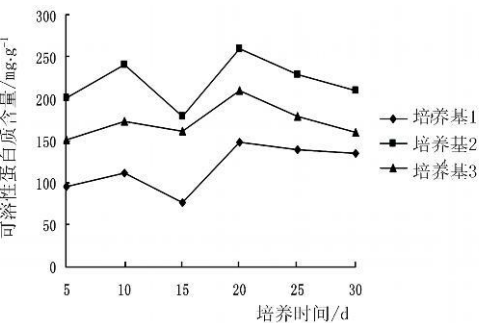


图 7 叶片愈伤组织形成过程中可溶性蛋白质含量的变化

2.5 牡丹叶片、叶柄愈伤组织形成过程中 SOD 活性的变化比较

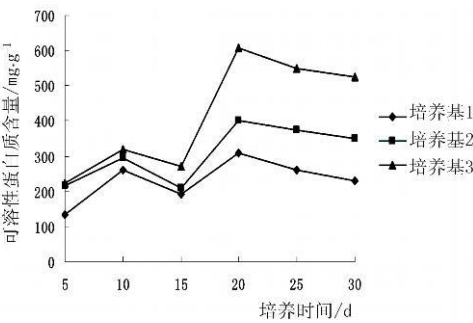


图 8 叶柄愈伤组织形成过程中可溶性蛋白质含量的变化

叶片和叶柄愈伤组织诱导过程中, SOD 活性在第 10 天时都有 1 个峰值,但是不同激素浓度的培养基峰值各不相同,叶片在 3 个不同激素组合的培养基上峰值从高到低依次为培养基②>①>③,叶柄在 3 个不同激素组合的培养基上峰值从高到低依次为培养基②>③>①。在第 20 天时培养基③的叶片 SOD 活性出现第 2 个峰值,而培养基②、培养基③的叶柄 SOD 活性均出现第 2 个峰值。在第 20~30 天,叶片和叶柄 SOD 活性均表现下降趋势(见图 9、10)。

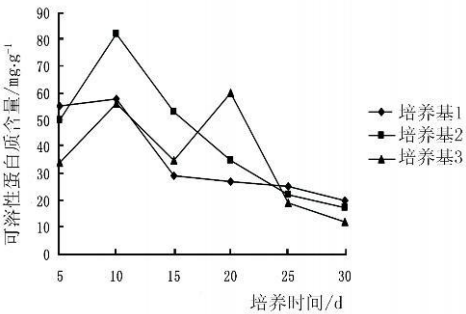


图 9 叶片愈伤组织形成过程中 SOD 活性的变化

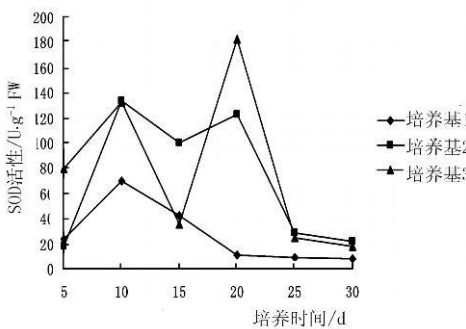


图 10 叶柄愈伤组织形成过程中 SOD 活性的变化

2.6 牡丹叶片、叶柄愈伤组织形成过程中过氧化物酶(POD)活性的变化

叶片和叶柄的 POD 活性整体表现为先上升后下降,再上升后缓慢下降的趋势。在培养的第 10 天和第 20 天,叶片外植体 POD 活性分别出现 1 个峰值。叶柄外植体 POD 活性则在第 10 天 3 个培养基都出现 1 个峰

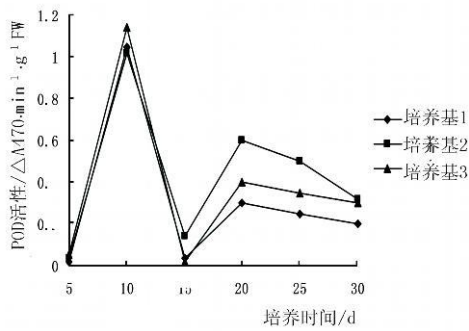


图 11 叶片愈伤组织形成过程中 POD 活性的变化

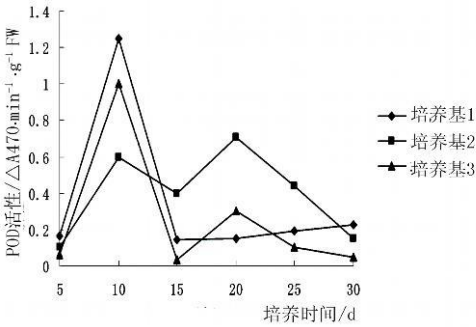


图 12 叶柄愈伤组织形成过程中 POD 活性的变化值,而在第 20 天时培养基②、③的又出现 1 个峰值。在培养到第 20~30 天时,叶片和叶柄 POD 活性变化总体趋势为逐渐下降,仅有培养在培养基①上的叶柄 POD 活性表现为缓慢上升的趋势(见图 11、12)。

3 讨论

一般认为植物不同外植体由于内源激素水平不同,对外源激素的要求也不同。该研究发现牡丹叶片和叶柄外植体愈伤组织诱导最佳激素组合均为诱导培养基

⑤: MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L,产生这种结果的原因一方面可能是因为所设计的激素浓度范围过于狭窄,使试验结果未能真实反映出叶片和叶柄愈伤组织诱导对激素浓度的需求,另一方面可能和培养时间有关系,如果继续延长培养时间,可能会出现不同的结果。

该研究发现,在牡丹叶片和叶柄愈伤组织诱导过程中 SOD 活性出现 2 个峰值,第 1 个峰值与愈伤组织大量增殖有关,第 2 个峰值的出现与培养基中营养物质消耗减少导致细胞老化有关,这是由于成熟、衰老过程中氧自由基活动增强而产生的一种适应现象,即 SOD 的抗衰老作用,与杨和平^[6]、何梦玲^[7]的研究结果相一致。然而 2 个峰值只有第 1 个峰值在所有 3 个激素组合培养基中出现,第 2 个峰值叶片只在培养基③中出现,叶柄在培养基②、③中出现,这可能和不同激素浓度对愈伤的刺激作用不同有关,具体原因有待于做进一步深入研究。

参考文献

[1] 王建国. 中国牡丹[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001: 10-240.
[2] 曾端香, 尹维伦, 赵孝庆, 等. 牡丹繁殖技术[J]. 北京林业大学学报, 2000, 22(3): 90-95.
[3] 高志民, 王雁, 王莲英, 等. 牡丹、芍药繁殖与育种研究现状[J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(4): 75-79.
[4] 成仿云. 牡丹产业化发展的生产栽培技术[J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(增刊): 120-123.
[5] 李玉龙, 吴德玉, 潘淑龙, 等. 牡丹试管苗繁殖技术的研究[J]. 科学通报, 1984(8): 500-502.
[6] 杨和平, 程井辰. 石刁柏体细胞胚胎发生过程中超氧化物歧化酶活性的变化[J]. 植物学报, 1993, 35(6): 490-493.
[7] 何梦玲, 周吉源. 不同光照对喜树细胞培养生长和生理生化特性的影响[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2002, 36(4): 489-493.

Study on Four Biochemistry Index Change Rule During Tree Peony Callus Induction

JIA Xiao-ping, KONG Xiang-sheng, LI Hai-gang, SUN Xiao-xu, WANG Lei

(College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003)

Abstract: Five callus induction mediums with different hormone combinations were designed to compare the hormone proportion suitable for callus induction and biochemistry index change rule during callus formation between leaf and petiole from tree peony tissue culturing seedlings. The results showed that the appropriate medium for leaf and petiole callus induction was: MS+6-BA(2 mg/L)+NAA(0.5 mg/L). At the constant concentration of 6-BA, callus induction rate of petiole rose with the rising of NAA concentration while browning rate giving the reverse trend, no obvious relation was found between callus induction rate, browning rate and NAA concentration for leaf explants. During callus induction, soluble sugar content and soluble protein content gave the same change trend for leaf and petiole explants: rising, decreasing, rising again and decreasing again. SOD activity of leaf and petiole explants both reached the first peak value at the tenth day, at the twentieth day, SOD activity of leaf explants cultured on medium MS+6-BA(2 mg/L)+NAA(0.2 mg/L) reached the second peak value and SOD activity of petiole explants cultured on medium MS+6-BA(2 mg/L)+NAA(0.1 mg/L), MS+6-BA(2 mg/L)+NAA(0.2 mg/L) reached the second peak value. POD activity of leaf and petiole explants gave a change trend of rising, decreasing, rising again and decreasing again except the petiole explants cultured on medium MS+6-BA(2 mg/L)+NAA(0.05 mg/L) which gave a change trend of rising, decreasing, rising slowly again.

Key words: tree peony; callus; hormone combination; biochemistry index