

植物激素和生长调节剂在果树组织培养中的应用

于亚军¹, 代汉萍², 李宝江²

(1. 大连大学生物工程学院, 116622; 2. 沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161)

中图分类号: S482.8 S66.603.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2002)06-0068-03

在果树植物组织培养的过程中, 植物激素和生长调节剂对于组织离体培养的形态建成及其调控起着十分关键的作用。果树组织培养的成功与否, 除了要选择正确的基本培养基和适合于组培苗生长的光照时间和光照强度, 培养温度及湿度以外, 最主要的影响因素还在于适宜的激素种类和浓度配比。外植体的脱分化、再分化过程, 试管苗根、茎、叶等器官的发生, 往往都需要向培养基中添加植物激素或生长调节剂。大多数果树是多年生木本植物, 组织培养有一定的难度, 目前还存在着部分树种难以快速繁殖, 难以生根, 褐变, 玻璃化等问题。有关果树植物组织培养中激素和生长调节剂的研究, 国内外已先后发表一些文章, 本文充分参考了这些研究情况, 并结合自己的试验发表一点粗浅的看法。

果树的组织培养经常使用生长素、细胞分裂素、赤霉素等激素或生长调节剂, 针对组培苗不同生长时期的特点, 对激素种类和浓度进行的筛选始终是组培工作的重点和难点。

1 生长素

1.1 生长素的不同种类及其使用方法

果树组织培养常用的生长素主要包括: IAA (indole-3-acetic acid 吲哚乙酸), IBA (indole-3-butyric acid 吲哚丁酸), NAA (naphthylene acetic acid 萘乙酸), PAA (phenyl-acetic acid 苯乙酸), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid 2,4-二氯苯氧乙酸), 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxy 2,4,5-三氯苯氧乙酸), 活性大小顺序为: 2,4-D > NAA > IAA。

IAA 和 NAA 属于天然生长素, 合成的化合物比较稳定。IAA 容易在植物体内积累, 使植物中毒, 外加的 IAA 浓度不宜过高。郑正华指出生长素浓度过高会对木本植物芽的增殖起到抑制作用^[1]。当试管苗新梢高达 1 cm (厘米) 以上时, 先切除基部愈伤组织或原来茎段, 将基部浸入 50 mg/kg (毫克/公斤) 或 100 mg/kg (毫克/公斤) 的 IBA 溶液中 4~8 h (小时), 再移到无激素的生根培养基中诱导生根, 或使新梢在含生长素培养基中培养 4~6 d (天) 后, 再转入无激素的培养基中诱导生根^[4], 即所谓的“两步生根法”, 其生根效果往往比直接转入含生长素的培养基中要好。2,4-D 是一种人工合成的生长素, 可诱导愈伤组织形成, Rodriguez (1982) 在 k(1/2) 培

基中添加 2,4-D 0.9~9 mg/L (毫克/升) 和激动素(KT) 0.4~1.0 mg/L (毫克/升), 可以从核桃子叶诱导出愈伤组织^[1]。2,4-D 这种活性较强的生长素要尽可能降低使用浓度, 并与细胞分裂素在配比上达到平衡, 使培养条件较温和, 防止引起遗传变异。

1.2 生长素的作用机理

研究表明, 外加的 IAA 在组织中会很快与细胞的各种化合物发生“耦合”, 实现钝化。加拿大生理学家 W. A. Andreae 发现, 在根部 IAA 与天冬氨酸耦合, 影响植物正常生长。生长素在植物根内的含量相对较少, 外加生长素可对组培苗生根起到一定的作用。两步生根法比一步生根法效果好, 其原因可能是根原基的形成需要生长素的存在, 而根原基形成后的幼根生长并不需要高浓度的生长素, 否则会起到抑制生长的作用。为了避免转移和配置培养基的麻烦, 避免造成浪费, 有人在培养基中加入等克分子浓度的 V_{B2} , 先暗培养一段时间, 诱导根的发生, 再移到光下培养, 见光后由于 V_{B2} 的光氧化使培养基中的 IBA 或 IAA 全部分解, 这样, 利用暗培养和光下培养相结合, 在同一培养基中满足了根的诱导和生长的不同要求^[2]。孙敬三等认为 2,4-D 和 2,4,5-T 能增加 DNA 的合成, 诱导多倍体的产生, 而细胞分裂素可对此起到缓解的作用^[2]。

2 细胞分裂素

2.1 细胞分裂素的种类

细胞分裂素大致可分成两类, 一类是嘌呤型细胞分裂素 (CTK), 另一类是苯基脲型细胞分裂素 (PUD)。CTK 都是腺嘌呤衍生物, 包括: BA (6-Benzylaminopurine 苄基腺嘌呤, 又称 6-BA, BAP), KT (Kinetin, 6-Furfurylaminopurine 6-糠基氨基嘌呤, 即 6-呋喃氨基嘌呤, 又称激动素, KIT, KIN), 2iP (2-异戊烯基腺嘌呤), ZEA (Zearin, 玉米素, 即异戊二烯腺嘌呤, 又称 Z, ZT), ADE (Adenine 腺嘌呤) 等。活性大小顺序是: 2iP > BA > KT。PUD 包括 4PU (N-(4-吡啶基)N'-苯基脲), 4PU-30 ((N-phenyl-N'-(2-chloro-4-phridyl) Urea) N-苯基-N'-(2-氯-4-吡啶基)脲), DPU (N,N'-二苯基脲), TDZ (Thidiazuron N-苯基-N'-1,2,3-噻二唑-5-基脲 N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea)^[5,7,8]。苯基脲型细胞分裂素是一类新型的细胞分裂素, 其中 TDZ 是西德 SCHERING 公司 1976 年宣布合成的植物生长调节剂, 最初用做棉花脱叶剂, 后来发现它还具有高度的细胞分裂素活性, 其应用已扩展到了植物组织培养领域。

2.2 细胞分裂素的使用方法和作用特点

BA 在果树组织培养中发挥着十分重要的作用, 在茎尖分



第一作者简介: 于亚军, 女, 1975 年生, 沈阳农业大学园艺学院 99 级果树遗传育种专业在读硕士研究生, 主要从事园艺植物组织培养方面的研究工作。

收稿日期: 2002-07-08

化培养基和增殖培养基中应用较多,其浓度也因树种、品种、培养阶段的不同而发生较大的变化。例如,增殖培养基中通常要添加细胞分裂素,但长期在含有 BA 的培养基上继代培养的材料(例如,苹果通常在 4 个月)后出现 BA 伤害,改用其它种类的细胞分裂素可能会得到缓解。BA 浓度太大,可能会出现试管苗玻璃化,苹果砧木茎尖继代培养时,BA 浓度不能超过 1.15 mg/kg(毫克/公斤)。另外,细胞分裂素浓度过高往往会引起后效应,抑制根的诱导或出现移栽后侧芽过多的现象。例如,草莓增殖 BA 浓度过高会造成过多的匍匐茎,影响果实大小,有时这种效应会持续两年^[2],在增殖后期要适当降低 BA 的浓度,或改用活性相对 BA 低一些的 KT。细胞分裂素之间可以配合使用,低浓度的 BA 促进山楂芽的分化,提高浓度(1~2 mg/L(毫克/升))可以产生丛状芽,并抑制节间伸长;而 KIN 较高浓度(2~5 mg/L(毫克/升))时促进芽的分化,但不易产生丛状芽,能使节间伸长,叶片展开,形成壮苗,因此可以将二者混用从而收到良好的效果。^[1] 细胞分裂素能抑制生根,在生根培养基中通常除去细胞分裂素而加入一定浓度的生长素。

Niewkerk^[9,10]将苹果品种“Gala”的芽培养在附加不同浓度的 TDZ 或 6-BA 的 LS 培养基上,6 星期后发现 0.1 μmol/L TDZ 和 4.4 μmol/L 6-BA 处理的芽增殖系数相差无几,说明 TDZ 促进芽增殖的效力比 6-BA 大 44 倍。在附加 TDZ 的培养基上形成的新芽较矮,叶片较窄,转移到无细胞分裂素的培养基上后还能增殖一段时间,最后能生根并形成完整的小植株。用较低的浓度代替 6-BA 诱导某些植物侧芽及不定芽增殖,可能是 TDZ 在微型繁殖中的用途。据报道,某些对 6-BA 没有反应的植物,用 TDZ 可诱导增殖^[11]。4PU 和 4PU-30 已经应用在蓝猪耳、杜鹃花、人参等植物的组织培养中,对芽的繁殖能力明显优于 ZEA,2IP 和 BA,例如 4PU-30 在蓝猪耳中诱导器官发生的活性高于 BA12 倍以上^[8],但目前 4PU 和 4PU-30 在果树组织培养中的应用还比较少见。有人将 TDZ 与 BA 混合使用可得到最好的效果^[12],这可能是因为嘌呤型细胞分裂素(CTK)与苯基脲型细胞分裂素(PUD)的作用具有互补性和相互促进作用。在诱导愈伤组织方面,DPU 比 BA,KT 的活性低得多。“自养性”是指许多植物组织培养的一部分细胞在长期的继代培养中逐步获得的独立合成 CTK,而不再依赖外源 CTK 供应的能力。DPU 诱导愈伤组织的活性虽然不如 KT 高,但是经 DPU 一次培养后即可使愈伤组织变成 CTK 自养的了,这是一般的 CTK 不具备的。^[8]

2.3 生长素与细胞分裂素配合使用

生长素能够促进组培苗节间的伸长及根的形成,而细胞分裂素可以使侧芽从顶端优势中解放出来。前面已经提到过,生长素在使用过程中浓度不宜过高,低浓度的生长素就能刺激细胞的扩大,使细胞壁变为可塑性,促进氢离子的释放,细胞壁塑性与酸不稳定键被打开有关。这就是通常所说的“酸生长理论”^[13]。生长素可促进顶端优势,如果使用不当,会使试管苗生长细弱,但新梢长到一定的高度才能生根成苗。为了解决这个矛盾,就要寻找生长素与细胞分裂素配合使用的最佳浓度配比。阎贤伟在《甜樱桃茎尖培养和快速繁殖研究》中提出,在嫩茎的增殖培养阶段,采用生长素含量高(0.2~0.25),低(0.05~0.1)交替使用,而 BA 含量固定的嫩茎增

殖培养基,使嫩茎基部膨大,克服多酚类化合物的影响,减少嫩茎死亡,加快甜樱桃试管苗的繁殖速度^[9]。按照浓度梯度合理设计生长素和细胞分裂素的组合,是增殖的关键。

如果离体培养植物本身的内源生长素可以满足生长和增殖的需要,外加反而会对增殖不利。生长素和细胞分裂素混合后,两种激素的相对含量往往能够决定哪些器官形成^[14]。

3 赤霉素

赤霉素在果树组织培养中应用较多的是 GA₃,对整个植株所起的作用比对离体器官或组织所起的作用更明显^[13](这一点与生长素不同)。GA₃ 可刺激器官生长,却抑制器官发生,在器官形成以后添加 GA₃ 可促进器官或胚状体生长。GA₃ 可抑制不定根的形成,但在根原基形成后,GA₃ 对不定根生长不发生影响^[4]。GA₃ 与 IAA 的作用相拮抗,与 CTK 则相辅相成。GA₃ 高压灭菌易失活,可采用抽滤法灭菌来弥补这一缺点^[4]。GA₃ 与 IAA 都有促进细胞和茎伸长的效应,但 GA₃ 对一些组织可起作用,IAA 却可能无效甚至有抑制作用;反之情况也是如此^[13]。在一些组织中,如果先用 IAA,则 GA₃ 的效果就很小;但如果先用 GA₃,则 IAA 在促进伸长方面会比通常的效应要大一些。这可能是由于在导致刺激长度生长的反应顺序中,GA₃ 在某一部位的作用先于 IAA。GA₃ 既能刺激茎顶端的细胞分裂,也能刺激茎的伸长,LANG 认为这可能是一种辅助效应。GA₃ 确切的作用方式目前尚不清楚,但已经知道其作用是消阻遏基因和刺激 RNA 的合成^[13]。在黑穗醋栗的茎尖培养中,添加了 GA₃,茎尖分化培养基为 MS+BA₂₋₃+GA_{1-1.5},继代培养基为 MS+BA_{1-1.5}+GA₂₋₃^[1]。可见 GA₃ 的浓度有所增加。在黑树莓的茎尖培养中,茎尖分化培养基为 MS+BA_{0.2}+NAA_{0.5-2}(不含 GA₃),继代培养基为 MS+BA_{1.0}+NAA_{0.01}+GA₀₋₁₀(应用了 GA₃)^[14]。这些可能都是应用了 GA₃ 具有刺激器官生长,却抑制器官发生的作用。培养中还发现 GA₃ 的浓度只有在超过 5 mg/L(毫克/升)时才会对黑树莓的增殖有明显的作用,这是由于高压灭菌后 GA₃ 效用被部分降解。

4 玉米赤霉烯酮

据报道,玉米赤霉烯酮在植物组织培养中具有如下效应:1)低浓度(0.01~1 mg/kg(毫克/公斤))促进,高浓度(1~10 mg/kg(毫克/公斤))抑制愈伤组织的形成和生长;2)抑制愈伤组织和切芽生根;3)促进愈伤组织芽发端和胚状体形成;4)促进再生植株和切芽的营养生长,推迟开花。其浓度范围和作用强度因实验材料不同而异^[15]。目前,在果树组织培养中应用得还比较少。

5 油菜素内酯和水杨酸(BR 和 SA)

油菜素内酯和水杨酸在第 16 届 IPGSA 会议上已被纳入植物激素范畴。据报道,在 W4 培养基中添加 0.02 mg/L(毫克/升)的 BR 或 2.0 mg/L(毫克/升)的 SA 后,小麦花药培养愈伤组织分化率分别提高了 30%和 24%,前者能降低白苗分化率 18%;SA 对绿苗分化率无影响,但可增加白苗分化率 50%^[16]。在果树组织培养中也未见过有应用的报道。

6 多效唑(PP333)

多效唑是一种新型的植物生长调节剂,它能抑制植物的生长,促进侧芽分化,增加叶绿素含量、光合强度和有机物质

的积累^[17]。李玉巧等人根据 PP333 对植物生长调节剂的特性, 针对猕猴桃试管苗在继代培养过程中常出现叶黄、苗茎细长瘦弱、移栽成活率偏低等问题, 向培养基中加入了多效唑。实验证明: $MS+BA_{1.0}+NAA_{0.01}+PP333_{0.3-1.0}$ 能适当控制苗的高度, 促进茎粗生长和芽分化并提高叶绿素含量, 提高同化作用效率和苗木移栽成活率。在“首红”苹果的茎尖培养和快速繁殖过程中^[18], 师校欣等将生根培养基中加入 PP333, 即 1/2 改良 $C17+IBA_{0.5}+IAA_{1.0}+PP333_{1.0}+2.5\%$ 食用白砂糖, 通过加入 PP333 及在接种后先进行 5~7 天暗培养再照光, 可使“首红”苹果试管苗生根率由原来的 20% 提高到 87% 以上。在组织培养过程中, 使有效苗小型化是提高生产效率的最主要目标之一。向培养基中加入生长延缓剂, 如 B9、PP333 等, 可使试管苗或嫩枝矮化, 还可增加分枝并促进生根。

7 展望

致瘤农杆菌所引起的冠瘿瘤细胞在组织培养中不需要外加植物激素即可无限地分裂生长, 这是因为 Ti 质粒上有一段特定的 DNA 区域, 称为 T-DNA, T-DNA 长度约为 23 Kb, 其中一段 9 Kb 的高度保守区中已鉴定出几个基因, 基因 1、2 和 4。经转座子突变证明, 基因 1、2 与生长素合成有关, 基因 4 和细胞分裂素合成有关。可选择不同的启动子来控制基因的表达活性, 从而提高植物体内激素的合成, 也可降低体内的激素水平, 从而有效地控制植物的生长发育。采用基因工程的方法, 可人为控制激素在植物体内的合成。例如, 将 *iaaM* 和 *iaaH* 基因从农杆菌 Ti 质粒上克隆下来, 再与组织特异性不同的启动子相结合, 然后通过农杆菌载体整合到矮牵牛的基因组中, 获得了矮牵牛的转基因植株, *iaaM* 基因在所有植物组织中均能表达, 组织中 IAA 和吲哚乙酰胺的含量比未转基因的对照植株增加 10~100 倍^[13]。

今后激素研究可能在以下方面有所突破: 1) 通过对植物激素突变体的遗传学和分子生物学操作, 尽早克隆和分离与五大激素作用相关的基因, 或在植物体中寻找微生物中已知激素作用相关基因的同源序列。这是开展植物激素作用研究的关键; 2) 植物激素作用分子机理的研究是当前的热点, 将从细胞分子生物学与分子遗传学两个方面进行研究; 3) 对转基因植物的研究, 将缩短植物激素在植物生长发育和抗逆中的

作用与植物激素调控农作物生长发育的应用之间的距离。^[19]

参考文献

- [1] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 高等教育出版社, 1986.
- [2] 孙敬三, 桂耀林. 植物细胞工程实验技术[M], 1995.
- [3] 庄恩及. 桃艺新探. 中国农业出版社[M], 1992.
- [4] 万蜀渊. 园艺植物繁育学. 中国农业出版社[M], 1994.
- [5] 陈振光. 园艺植物离体培养学. 中国农业出版社[M], 1995.
- [6] 阎贤伟. 甜樱桃茎尖培养和快速繁殖研究[J]. 园艺学报 Vol. 17, No. 4 Nov. 1990; 275~279.
- [7] Machteld C. Mok et al. Biological and Biochemical Effects of Cytokinin ~ active phenylurea Derivatives in Tissue Culture Systems. HortScience 1987, 22(6): 1194~1197.
- [8] 周俊彦, 郭扶兴. 苯基脲衍生物的细胞分裂素活性[J]. 植物生理学通讯, 1990(4): 7~13.
- [9] J. P. Van Nieuwkerk JP et al. Thidiazuron Stimulation of Apple Shoot Proliferation in vitro. HortScience 1986, 21(3): 516.
- [10] 杨业正. 棉花脱叶剂 TDZ 简介[J]. 植物生理学通讯, 1989(6): 63~64.
- [11] H. R. Kerns et al. Tissue Culture Propagation of *Acer × freemanii* Using Thidiazuron to Stimulate Shoot Tip Proliferation. Hort Science 1986, 21(5): 1209~1210.
- [12] Chalupa V. Biol Plant (Prague) 1987, 29: 425.
- [13] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 第二版, 科学出版社, 1998: 424~425.
- [14] 胡建刚, 黄巧兴, 沈秋云. 黑树莓的试管繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1994(1): 356.
- [15] 姚坤林, 张帆, 孟繁静. 玉米赤霉烯酮在组织培养中的生物效应(简报)[J]. 植物生理学通讯, 1991, 27(1): 29~31.
- [16] 朱广廉. 油菜素甾醇类植物激素的研究进展[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(5): 317~321.
- [17] 李玉巧, 朱鹿鸣. 多效唑对猕猴桃试管苗调节作用的初步研究(刊)[J]. 林业科技通讯, 1989(5): 14~17.
- [18] 师校欣, 高仪, 马宝. 首红苹果的茎尖培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1996(5): 42.
- [19] 缪颖. 植物激素研究中的遗传学和分子生物学方法[J]. 植物生理学通讯, 36 卷第 3 期 2000, 6: 281~288.
- [20] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 中国农业大学出版社, 1995.

果园的冬前管理

进入 10 月份以后, 各种品种的果实陆续采收, 此时, 树体的营养积累大于消耗, 果树进入贮藏营养期, 此期营养物质积累的多少, 直接关系到来年果品的产量和质量。如何才能搞好果园冬前的管理呢? 可从以下方面着手:

秋施基肥 在果树采收后, 施用有机肥料配合氮肥, 可提高树体的营养水平, 为来年的优质丰产打好基础。因为此时正值果树根系的第二或第三次生长高峰, 施入的肥料易被吸收贮藏, 使来年树体健壮, 叶肥花好, 座果增多, 产量提高, 并可提高地温, 防止根系冻害。

防止早期落叶, 保持叶片完好 从果实实收到落叶前, 叶片还有很强的同化能力, 能够有效地增加碳水化合物数量。在落叶前 30 d~50 d(天), 叶面喷施 3%~5% 的尿素溶液 1~2 次, 可明显提高叶片的光合作用, 提高树体营养贮藏水平, 对来年开花结果, 新梢生长也有明显效果。

积肥造肥, 消灭害虫 采果后的枯枝、落叶、杂草应及时处理, 可集中烧毁后深埋, 这样既增加了地下养分又歼灭了潜伏的越冬害虫。

冬季寒冷的地区, 越冬前灌足水, 以提高越冬能力, 减少第二年春季“抽条”现象的发生。

(薛志成, 辽宁辽中县南门街 6 号, 110200)