

微直流对百合愈伤组织形成及生长的影响

宋小义

(贵州省光电子技术与应用重点实验室 贵州大学 理学院物理系 贵州 贵阳 550025)

摘要: 利用微直流处理接种于培养基中的西伯利亚百合叶片外植体和继代培养的西伯利亚百合愈伤组织。结果表明:0.5 μA 和 1.0 μA 的微直流可使叶片愈伤组织的形成时间明显提前,叶片愈伤组织的诱导率提高;1.0 μA 和 1.5 μA 的微直流具有明显促进愈伤组织生长的效果;超过此范围微直流,则推迟叶片愈伤组织的形成时间,使叶片愈伤组织的诱导率下降,且电流强度越大,抑制效应越明显。

关键词: 百合;愈伤组织;微直流;诱导;生长

中图分类号: S 633. 401 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)06-0138-03

物理刺激对植物细胞(组织)生长的研究是细胞生物学重要课题之一。而微直流可促进多种植物培养组织的生长和分化。例如,微直流可促进烟草愈伤组织的生长和芽的分化^[1-2],提高苜蓿胚状体的发生率^[3]、三叶草原生质体的分裂频率^[4]、小麦原生质体和石防风原生质体形成细胞团的数量^[5-6],以及梨属、李属、大豆属、茄属植物原生质体的成活率、分裂频率和植板率^[7-8]。但目前尚未有将微直流用于处理花卉组织培养的报道。试验将微直流用于处理经过继代培养的百合叶片外植体、百合愈伤组织,研究微直流对花卉组织培养的影响,以期对花卉组织培养提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为西伯利亚百合(*Lilium* \times *Siberia*)组培继代苗(无菌苗)和西伯利亚百合继代培养愈伤组织,由贵州大学林学院组培实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织的诱导和培养 在超净台上将大小一致的组培继代百合苗叶片(叶片长 4 cm,宽 1 cm)接种于 MS 附加 6-BA 2 mg/L、NAA 0.2 mg/L 的培养基上,将继代培养的百合愈伤组织(约 1.302 g)接种于 MS 附加 6-BA 1 mg/L、NAA 0.1 mg/L 的培养基上。每个处理及对照各 20 瓶,每瓶中有叶片 10 片或鲜重为(1.302 \pm 0.005) g 的愈伤组织。微直流处理后,培养在温度为(25 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 的培养室中,每天光照 12 h,光照强度为 1 500 lx。

1.2.2 微直流处理 在 150 mL 的 PC 耐高温塑料制成的带盖三角瓶的底部,固定 1 圈直径为 0.8 mm 的不锈钢丝作为负极,瓶盖中央插进去 1 根相同直径的不锈钢丝作为正极与培养液点接触。电源为自制的稳压稳流直流电源。组培材料接种在瓶内接受微直流处理,每个试验重复 3 次。微直流的处理时间为 405 min,处理强度分别为:CK=0 μA ; T₁=0.5 μA ; T₂=1.0 μA ; T₃=1.5 μA ; T₄=2.0 μA ; T₅=2.5 μA 。

1.2.3 叶片愈伤组织诱导率的测定 西伯利亚百合叶片外植体接种于瓶内后接受微直流处理,从培养第 13 天开始每隔 1 周观察和记录各处理组和对照组叶片出愈情况,统计不同微直流处理叶片随时间的出愈动态和愈伤组织诱导率,共统计到 41 d。愈伤组织诱导率=(叶片产生愈伤组织数量/接种叶片数量) \times 100%;愈伤组织诱导率增加率=[(处理组叶片愈伤组织诱导率/对照组叶片愈伤组织诱导率)-1] \times 100%。

1.2.4 叶片形成愈伤组织相对鲜重率的测定 经 1.2.3 处理培养的百合叶片,第 41 天在超净工作台上用电子天平称量愈伤组织鲜重。每片叶形成愈伤组织的相对鲜重率=[愈伤组织总鲜重/(形成愈伤组织的叶片数 \times 对照组每片叶形成愈伤组织的鲜重)] \times 100%。

1.2.5 愈伤组织相对生长率的测定 超净工作台用电子天平称量接种时和 41 d 培养后愈伤组织的鲜重。愈伤组织生长率=[(培养后愈伤组织鲜重-培养前愈伤组织鲜重)/培养前愈伤组织鲜重] \times 100%;愈伤组织相对生长率=处理组愈伤组织生长率/对照组愈伤组织生长率。

2 结果与分析

2.1 微直流处理对百合叶片愈伤组织发生和形成影响

图 1 为微直流对百合叶片愈伤组织发生和形成的影响。第 13 天统计愈伤组织诱导率, T₁ 和 T₂ 处理组叶

作者简介:宋小义(1964),女,贵州贵阳人,硕士,副教授,现从事物理因素对生物体作用机制的基础研究及物理教学工作。

基金项目:贵州省科学技术基金资助项目(20062003)。

收稿日期:2009-12-20

片愈伤组织诱导率分别比对照组高 91.8% 和 71.2%, T₃、T₄ 和 T₅ 处理组叶片愈伤组织诱导率分别比对照组低 31.5%、37.0% 和 42.5%。第 20 天统计愈伤组织诱导率, T₁ 和 T₂ 处理组叶片愈伤组织诱导率分别比对照组高 81.1% 和 57.5%, T₃、T₄ 和 T₅ 处理组叶片愈伤组织诱导率分别比对照组低 17.3%、30.0% 和 37.9%。随

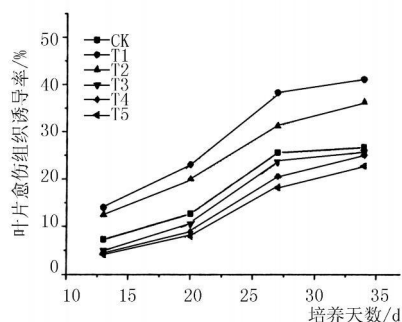


图 1 微直流对百合叶片愈伤组织诱导率的影响

图 2 为微直流对百合叶片诱导愈伤组织生长的影响。在第 69 天对培养物鲜重测量统计, 各处理组愈伤组织鲜重均比对照组高。其中仍以 T₁ 处理组最高, 比对照组增长 26.4%。其它各处理组的增重率随着电流强度的增加而减小, 但 T₅ 处理组愈伤组织鲜重率仍比对照组增长 4.2%。

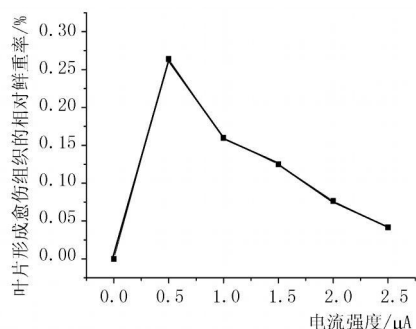


图 2 微直流对百合叶片愈伤组织生长率的影响

结果表明, 微直流处理在一定的电流强度范围内确可促进叶片愈伤组织发生, 加快愈伤组织的形成。而超过了该剂量范围, 则对愈伤组织的发生和形成起抑制作用。所有处理组愈伤组织的增重率均比对照组高, 说明微直流对不同时期愈伤组织的形成和生长的影响不同。

2.2 微直流对百合愈伤组织生长的影响

由图 3 可知, T₁、T₃ 处理组对愈伤组织的生长基本无影响。T₂ 处理组对愈伤组织的生长影响最大, 其愈伤组织鲜重比对照组高 19.6%; 其次为 T₃ 处理组, 比对照组高 10.8%。这表明微直流处理在一定范围内可促进愈伤组织细胞的分裂和生长。但该试验的最佳电流强度与上一试验的最佳电流强度不同。结果表明, 同一品

种不同形态的外植体、愈伤组织的形成和生长有不同的适宜微直流电流强度。

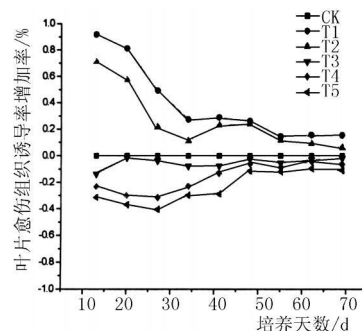


图 3 微直流对愈伤组织生长率的影响

3 结论与讨论

试验结果表明, 较低强度的微直流处理能明显提前百合叶片愈伤组织的发生时间, 较高强度的微直流处理则推迟百合叶片愈伤组织的发生时间; 所有强度的微直流处理都能使愈伤组织细胞的生长增加, 但不是线性关系, 推测这一现象与植物体自身存在微电流有关, 几乎所有正在生长的植物个体或器官都有自身电流, 生长越快, 电流越强^[9]。外加电流可以加强自身电流的作用, 从而促进组织的生长。所以, 外加电流对多种植物组织的生长都有促进作用。

电流促进细胞生长的机理, 与电流产生电位梯度引起的细胞成分重新分布有关, 如膜蛋白电泳^[10]、生长素位移^[11]等。细胞成分重新分布, 达到能够影响细胞生长的状态, 有一个“生物学通频带”问题。从电生理学角度看, 由于细胞表面常带负电荷, 给细胞表面加上一个微安级电流, 加大了膜电位, 使激素传递更快。而且生活细胞受损伤后, 其产生的损伤电流可由此而加强, 促进

信息和物质传递,使受伤部位产生修复应答反应^[1]。而且只有当微直流所加强的电流符合所谓“生物学通频带”时,组织细胞才能产生期望的反应,这便是最适场强。而低于最适场强的微直流所起作用较小,细胞成分的重新分布就达不到影响细胞生长的状态,对细胞生长没有促进作用。高于某场强的微直流则起抑制作用,对细胞结构及细胞成分的分布造成了不可逆的破坏作用。所以,可以认为微直流作为一种环境物理因子,只有通过影响细胞的生理活动而起作用,细胞通过一系列复杂变化调整其生理生命运动才是微直流生物效应的根本原因。而不可能是一种物理运动对生命运动的控制,因为后者远比前者复杂、有序。该试验中受电流作用并影响细胞生长的成分,还有待研究。

有试验证明,静电场促进植物对 Ca^{2+} 的吸收。而 Ca^{2+} 对愈伤组织的发生、形成及生长很重要。当细胞壁中的 Ca^{2+} 被专一性 Ca^{2+} 螯合剂清除或细胞中的 Ca^{2+} 通道被通道阻断剂阻断后,愈伤组织诱导率、愈伤组织鲜重及每块外植体产生愈伤组织的团数都受到影响^[13-14]。作为第二信使, Ca^{2+} 与生长素、细胞分裂素协同作用,调节和启动有关基因的表达,合成核酸,蛋白质,为愈伤组织的发生、形成奠定基础。微直流处理影响百合叶片愈伤组织形成时间和愈伤组织诱导率,影响愈伤组织细胞的生长,可能是细胞壁的 Ca^{2+} 在微电流形成的电场作用下发生了变化,进而调解生长素和细胞分裂素对细胞的作用过程,这只是一个假设,有待试验证明。另外,微直流是否改变了细胞膜上离子通道的特性,进而影响愈伤组织的形成时间、诱导率及生长,也有待进一步的试验验证。

参考文献

[1] Rathore K S, Goldsworthy A. Electrical control of growth in plant tis-

sue cultures [J]. Bio/Technology, 1985(3): 253-254.

[2] Rathore K S, Goldsworthy A. Electrical control of shoot regeneration in plant tissue cultures [J]. Bio/Technology, 1985(3): 1107-1109.

[3] Dijk M, Smish D L, Wilson T J et al. Stimulation of direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* [J]. Plant cell Rep, 1986(5): 468-470.

[4] Zhongyi L, Tanner G J, Larkin P L. Callus regeneration from *Trifolium subterraneum* protoplasts and enhanced protoplast division by low-voltage treatment and nurse cells [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990, 21: 67-73.

[5] 戴群, 夏光敏, 郭光沁. 微直流对小麦原生质体形成细胞团的促进作用 [J]. 植物学报, 1995, 37(2): 162-164.

[6] 戴群, 孔维华. 微直流电对石防原原生质体形成细胞团的影响 [J]. 山东大学学报(自然科学版), 1996, 31(1): 90-93.

[7] Rech E L, Ochatt S J, Chand P K et al. Electro enhancement of division of plant protoplast-derived cells [J]. Protoplasma, 1987, 141: 169-176.

[8] Ochatt S J, Chand P K, Rech E L et al. Electroporation-mediated improvement of plant regeneration from colt cherry (*Prunus avium* X *P. pseudocerasus*) protoplasts [J]. Plant Sci., 1988, 54: 165-169.

[9] Weisenseel M H, Kicherer R M. Ion currents as control mechanism in cytomorphogenesis. In Kiemayer ed., Cytomorphogenesis in Plants [J]. Cell Biology Monographs, 1981(8): 379-399.

[10] Jaffe L F. Electrophoresis along cell membranes [J]. Nature, 1977, 265: 600-602.

[11] Godsworthy A, Rathore K S. The electrical control of growth in plant tissue cultures; The polar transport of auxin [J]. J Exp Bot, 1985, 36: 1134-1141.

[12] Davies E. Action potentials as multifunctional signals in plants: A hypothesis attempting to unify apparently disparate wound responses [J]. Plant, cell and Environment, 1987, 10: 623-631.

[13] 王伯初, 赵虎成, 刘贻尧等. 钙离子在声波刺激菊花愈伤组织生长中的作用 [C] // 生物力学的最新进展—首届中外青年生物力学工作者学术研讨会论文集. 北京: 高等教育出版社, 2001: 162-168.

[14] 余芳, 左德远, 孙大业. 愈伤组织形成过程中钙离子与激素诱导效应的关系 [J]. 实验生物学报, 1991, 24(4): 385-390.

The Effect of Micro-direct Current on the Formation and the Growth of Siberia Lilium Callus

SONG Xiao-yi

(Physics Department of Guizhou University and Laboratory for Photoelectric Technology and Application, Guiyang Guizhou 550025)

Abstract: The leaflet explants and the subculture callus of Siberia Lilium treated with micro-direct current were studied. Results were as follows that Under the treatment of 0.5 μA and 1.0 μA micro-direct current, the forming time of callus of Siberia Lilium leaflets was earlier than the contrast group's and the rate of induction of callus of Siberia Lilium leaflets was increased. The action of 1.0 μA and 1.5 μA micro-direct current was to obviously promote the growth of callus. When the intensity of micro-direct current was higher than the above intensity, the forming time of callus of Lilium leaflets was delayed, and the rate of induction of callus of Lilium leaflets was decreased. The higher the electric current intensity was, the stronger inhibition effect was observed.

Key words: lilium; callus; micro-direct current; induction; growth