

苹果砧木玻璃化过程中内源激素的含量变化

牛自勉 王贤萍 戴桂林

陈霜莹 章德明

(山西省农业科学院果树研究所, 太谷 030800)

(河北省农林科学院昌黎果树研究所, 昌黎 066600)

摘 要 用 HPLC 方法测定了苹果砧木茎尖培养苗玻璃化过程中内源激素的含量变化。结果表明, 玻璃化苗叶片及茎尖中赤霉素(GA_3)、吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)含量极显著降低, 同时细胞分裂素(CTK)含量则显著上升, 在茎叶极度玻璃化时 CTK 含量显著下降。在继代培养过程中, 叶片玻璃化症状出现之前 5~10 天, 已开始了 GA_3 、IAA 的下降和 CTK 的上升过程, GA_3 /CTK、IAA/CTA 比值也急剧下降。培养基高浓度 6-苄基腺嘌呤(6-BA)能引起叶片 GA_3 、IAA 含量下降及玻化出现, 表明苹果砧木茎尖培养玻化现象与 GA_3 、IAA、ABA 及 CTK 含量及比值的急剧变化有关。

关键词 苹果砧木 玻璃化 内源激素 GA_3 IAA CTK

茎尖培养是苹果砧木无性繁育的有效途径, 但培养过程中经常发生玻璃化生理失调现象, 一定程度上制约着茎尖快繁技术的发展。近年来, 国内外对引起苹果属植物组织培养苗玻璃化有关的培养基生长调节剂浓度^[1,3,5,6]、琼脂浓度^[8,9]、酶活性^[4]及生理变化^[4,7,10]等问题进行了一些研究, 但对于玻璃化过程中外植体本身内源激素的含量变化则研究较少。本试验以 2-18 苹果砧木为试材, 探讨了苹果砧木玻璃化发生过程中, 不同类型内源激素的含量变化规律。

1 材料和方法

1.1 材料

选用山西省农科院果树研究所杂交选育的苹果矮化砧木 2-18 为试材, 其母本为国光(*M. pumila* Mill), 父本为河南海棠(*M. honanensis* Rehd)。

1.2 方法

1.2.1 外植体的建立 外植体用一年生休眠枝条, 12 月 5 日剪下枝条, 0~5℃沙藏 120 天, 接种前 20~25℃催芽 72h, 茎尖露白时剥去外层鳞片, 用 0.5%~0.8%漂白粉溶液浸泡 15~20min, 无菌水冲洗后接种于分化培养基上。

1.2.2 培养基 基本培养基为 MS 培养基。分化培养基的生长调节剂种类及浓度为 6-BA $1.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、IBA $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。继代培养的培养基 6-BA $0.7\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、IBA $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。6-BA 处理的培养基浓度分别为 0.4 、 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.3 培养条件 接种的茎尖经 2 周暗培养产生黄化茎尖后转入光照培养, 光照强度为

1600~2000lx,每日连续光照14h,培养温度20~26℃。

1.2.4 内源激素的提取、分离及HPLC分析 称重的鲜样用80%甲醇浸泡,-12℃条件下冷冻保存。样品在0~4℃条件下研磨,在1500r/min离心机上离心5min,上清液过滤,脱色后用旋转蒸发器浓缩至10μl,进行HPLC分析。

HPLC分析的仪器用美国Waters 201高效液相色谱仪,色谱条件为Zorbox ODS柱(250×4.6mm,ID Dupont),流动相为甲醇:乙腈:水(2:6:6 V/V,pH4),检测器为UV 254nm。

2 结果与分析

2.1 玻璃化苗叶片及茎尖内源激素的含量

1992年5月12日测定了继代培养20天时正常苗、玻璃化苗及极度玻璃化苗的GA₃、IAA、CTK、ABA含量(表1)。结果表明,正常叶片GA₃、IAA及ABA含量高,玻化叶片上述三种激素含量极显著降低(P<0.01),极度玻化叶片GA₃、IAA含量极显著低于正常叶和玻化叶(P<0.01)。CTK的变化规律与GA₃和IAA不同,在正常叶片中CTK含量较低,玻化叶片的CTK

表1 不同类型叶片及茎尖内源激素的含量

试 材		内源激素含量(μg·g ⁻¹)			
		GA ₃	IAA	CTK	ABA
叶 片	正常叶	30.23A	20.39A	1.32B	7.67A
	玻化叶	1.88B	3.57B	6.18A	0.37C
	极度玻化叶	0.03C	1.13C	0.35C	1.94B
茎 尖	正常茎尖	12.33A	15.25A	1.10B	3.73A
	玻化茎尖	1.42B	2.16B	5.83A	0.91B
	极度玻化茎尖	0.41C	1.13C	0.31C	0.27B

含量显著高于正常叶,也高于极度玻化叶。叶片极度玻化后,CTK含量显著降低。不同类型茎尖的内源激素变化趋势与叶片内源激素的含量规律相似。

2.2 继代培养过程中叶片内源激素含量的变化

2.2.1 玻化叶片内源激素的变化 1992年4月28日至5月18日,每隔5天测定一次继代培养幼苗玻化过程中叶片内源激素的含量(图1)。结果表明,培养开始时叶片发育正常,其GA₃、IAA、ABA的含量分别为21.37、19.01、1.49、5.17μg·g⁻¹,GA₃/CTK、IAA/CTK的比值则分别为14.34和12.76。在最初培养的5天,叶片中GA₃和IAA开始下降,但变幅较小,CTK和ABA含量相对稳定,叶片内源激素GA₃/CTK、IAA/CTK的比值分别为10.06和10.51,该期继代幼苗浓绿,茎尖开始伸长,外观无玻化症状。继代培养到第10天时,叶片GA₃、IAA急剧下降,CTK含量显著上升,GA₃/CTK、IAA/CTK分别为0.59和0.78,同时ABA含量也显著下降。该期叶片较大,叶姿开张、叶缘轻度卷曲,茎叶淡黄绿色,从植株外观上难以判明玻璃化症状。继代培养到第15天时,叶片CTK急剧上升达7.89μg·g⁻¹峰值,GA₃、IAA及ABA持续下降接近最低点,GA₃/CTK、IAA/CTK的比值分别为0.02和0.25。该期继代幼苗边缘卷曲,新叶变小呈水渍状,叶色淡黄,茎尖呈现半透明水渍状。继代培养到20天时,叶片中GA₃、IAA和CTK均达最低含量水平,ABA则略有回升,这一时期叶片及茎尖均表现半透明状态的极度玻化症状。

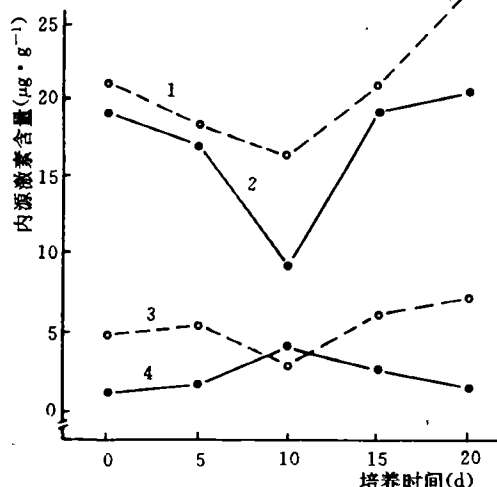
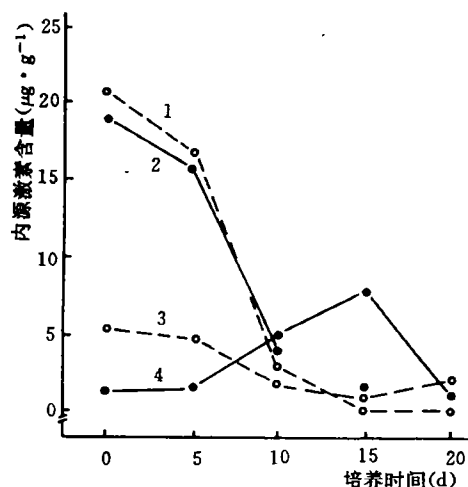


图1 继代培养期间玻化叶片内源激素的含量变化

1. GA₃ 2. IAA 3. ABA 4. CTK

图2 继代培养期间未玻化叶内源激素的含量变化

1. GA₃ 2. IAA 3. ABA 4. CTK

2.2.2 未玻化叶片内源激素的变化 同期测定了未玻化叶片继代培养过程中内源激素的含量变化(图2)。结果表明,培养的前10天,未玻化叶片中的GA₃、IAA及ABA不同程度地下降,但下降比玻化叶平缓,含量值也显著高于玻化叶片($P < 0.01$),这期间CTK含量缓慢上升,10天时达 $3.96 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 的峰值,此后开始下降。10天时叶片GA₃/CTK、IAA/CTK比值分别为4.40和2.31,均明显高于玻化叶,这时叶片淡绿,平展、叶型正常。

继代培养第10天至第20天,未玻化叶片内源激素含量变化与玻化叶相反,这期间叶片GA₃、IAA和ABA变下降为上升,20天时达最高含量水平,而CTK则平缓下降,接近初期水平。叶片的GA₃/CTK、IAA/CTK比值分别达到17.15和12.74,略高于培养初期的比值,叶色由淡绿逐渐变为浓绿色。

2.3 培养基6-BA浓度对叶片内源激素的影响

1992年5月18日,还测定了培养基中6-BA不同浓度处理20天时幼叶的内源激素含量(表2)。结果表明,培养基中高浓度的6-BA含量引起了处理叶片GA₃、IAA及ABA的极显著下降($P < 0.01$)和CTK的显著上升($P < 0.05$),也导致了处理幼苗的玻璃化现象。

表2 6-BA浓度对叶片内源激素含量及玻化的影响

培养基	GA ₃ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	IAA ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	CTK ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	ABA ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	玻化株率 (%)
6-BA 2, IBA 0.5	0.92B	1.58B	1.33a	2.17B	100A
6-BA 0.4, IBA 0.5	23.17A	17.51A	1.05b	4.09A	15.6B

3 讨论

已往的研究表明,苹果属植物继代培养苗玻璃化现象与培养基较高浓度的 6-BA 有关^[1~5],但未进一步分析 6-BA 是否通过影响内源激素 CTK、GA₃、IAA 及 ABA 的含量变化而发生作用。本试验的研究表明,培养基中高浓度的 6-BA 含量,不仅引起了植株的玻璃化现象,同时也导致了继代培养过程中叶片 GA₃、IAA、ABA 含量的显著下降($P < 0.01$)及 CTK 含量的上升,引起了内源激素含量及其平衡的变化。

茎叶中 CTK 含量与植株的正常生长发育密切相关。苹果属植物继代培养过程中,CTK 对植株的正常增殖有促进作用。另一方面,茎叶中 CTK 含量过高,会导致叶片的玻璃化现象。在玻化叶片逐步产生的培养周期中,最初叶片中 CTK 含量为 $1.49 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,培养过程中 CTK 含量持续上升,第 15 天峰值时的含量达 $7.89 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,是最初的 5.36 倍。CTK 的峰值与叶片玻璃化发生的高峰相吻合,表明茎叶中较高的 CTK 含量是影响玻璃化发生的主要诱因。在另一组试验中,未玻化叶片培养前期 CTK 含量缓慢上升,第 10 天峰值的含量为最初的 2.66 倍,其后 CTK 持续下降接近最初水平。在 CTK 出现峰值时叶片绿色变淡,但无玻化症状,可能是叶片中 CTK 含量还不足以引起茎叶玻璃化的质变,从而获得了正常植株。

作为生长抑制剂的 ABA,无论在继代培养初期还是培养结束,正常茎叶中 ABA 含量为 $5.17 \sim 7.67 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,这可能是调节植物平衡生长所必须的含量。试验中 SDC₄₁ 苹果砧木玻璃化发生时,除了 CTK 含量变化之外,茎叶中 ABA 含量大幅度下降,生长抑制剂严重失调,从而难以维持植株的正常生长。在未玻化叶片中,ABA 含量在培养中期略微下降,其后和 GA₃、IAA 一起回升,培养结束时植株叶片浓绿,生长健旺,其 ABA 含量也超过了继代初期的水平,达到培养周期中的最高含量,可见生长抑制剂 ABA 具有抑制玻化发生的作用。

GA₃、IAA 是继代培养过程中活跃变化的内源激素。在本试验条件下,未玻璃化茎叶的 GA₃ 和 IAA 含量高,二者正常生长的临界含量分别为 $16.01 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $9.15 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。当茎叶中 GA₃ 和 IAA 含量低于临界值后仍持续下降时,都不可避免地出现了玻化甚至极度玻化现象。叶片玻璃化的发生周期,实质上是叶片中 GA₃、IAA 持续降解的周期。而且在叶片外观玻化症状发生前的 5~10 天,叶片已开始了 GA₃、IAA 不可逆转的快速降解变化过程。未玻化的正常叶片培养过程中虽然伴有 GA₃、IAA 含量的下降,但这一过程可以逆转,第 10 天后叶片的 GA₃ 和 IAA 含量持续上升,最终超过了接种初期正常叶片的含量水平,获得了叶色浓绿、生长健旺的植株。因此,GA₃ 和 IAA 是维持继代培养苗正常生长的必要因子,虽然培养过程中 GA₃ 和 IAA 一定程度的下降是不可避免的,但如何控制其下降幅度,避免不可逆上升的发生,则是茎尖快繁应该探讨和解决的问题。

上述几种内源激素与玻化发生有关,而本试验提出的 GA₃/CTK、IAA/CTK 比值,反映了内源激素相互平衡的概念,有利于进行不同激素的多重比较。一般情况下,GA₃/CTK、IAA/CTK 比值大于 10 时,茎叶正常;比值在 2~5 之间时,是玻化的临界期。继代培养时应该利用临界期 GA₃/CTK、IAA/CTK 比值多变的特点,通过外界综合措施影响上述比值的回升,以获得正常的继代植株。

一般认为 IAA 对植物幼茎、叶柄等组织木质部的分化有直接作用,GA₃ 对蛋白酶、核酸酶、淀粉酶的生物合成有促进作用^[1]。苹果属植物玻化后通常表现为木质素严重缺乏,蛋白质含量降低^[4]等生理失调症状。在本试验条件下,玻化茎叶表现严重的生理失调,可能与 IAA、GA₃ 急剧降低后细胞组织内部生物合成受阻有关。在苹果砧木 2-18 玻化发生的生长周期中,

玻化症状之前 5~10 天叶片中 GA_3 、IAA 的含量已开始下降。 GA_3 、IAA 的急剧下降可能诱发木质素、蛋白质以及核酸等物质生物合成的失调,从而导致苹果砧木玻璃化现象的出现。

参 考 文 献

- 1 蒲富慎. 国际果树生物技术研究现状. 中国果树, 1987(3): 54~57
- 2 马锋旺, 黄尚志, 雍文等. 楸子离体繁育的研究. 西北农业大学学报, 1988, 16(4): 9~13
- 3 刘庆忠. 落叶果树的微体繁殖. 落叶果树, 1988(2): 25~28
- 4 马锋旺. 苹果离体培养过程中玻化苗的发生及其特征的初步研究. 中国果树, 1989(1): 26~28
- 5 牛自勉, 戴桂林, 李全等. 利用组织培养法繁育苹果无性系砧木. 山西农业科学, 1990(7): 7~9
- 6 Fiorino P, Letouze R. Propagation of apple cultivars. Acta Horticulturae, 1983, 131: 95~99
- 7 Kevers C, Coumans M and Gaspar T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. Physiol Plant, 1986, 61: 69~74
- 8 Pasquletto PL, Zimmerman RH, Fordham I. The influence of cation and gelling agent concentration on vitrification of apple cultivars *in vitro*. J Amer Soc Hort Sci, 1986, 111: 976~980
- 9 Poques M, Boxus P. Vitrification review of literature. Acta Horticulturae, 1987, 212: 156~166
- 10 Standardi A, Micheli M. Control of vitrification in proliferation shoots of M_{26} . Acta Horticulturae, 1988, 227: 425~427

Changes of Endogenous Hormone in Apple Rootstock During Vitrification *in vitro*

Niu Zimian Wang Xianping Dai Guilin

(Institute of Pomology, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taigu)

Chen Shuangying Zhang Deming

(Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Changli)

Abstract Changes of endogenous hormone in leaves and shoot tips in propagation of *Malus pumila* were determined by HPLC. The results showed that the contents of GA_3 , IAA and ABA were very low in vitrified leaves and shoot tips, but CTK contents increased significantly. When plant vitrified heavily CTK contents became very low. During culture period the contents of GA_3 and IAA in leaves decreased and CTK contents increased, meanwhile the rate of GA_3 /CTK, IAA/CTK dropped sharply, about 5—10 days later the symptom of vitrification occurred. Supplying higher concentration of BA in culture medium caused leaves vitrified and led to GA_3 and IAA in leaves dropping. It is concluded that the contents of GA_3 , IAA and CTK and the rate of GA_3 /CTK, IAA/CTK was correlated with the Vitrification of apple rootstocks *in vitro*.

Key words: Apple rootstock; Vitrification; Endogenous hormone ; GA_3 ; IAA; CTK