

内源激素 IAA ABA 对大豆萌发子叶胚性愈伤组织诱导及其分化的调控^{*}

郭子彪^{**} 盖钧铭

(南京农业大学大豆研究所, 江苏南京, 210095)

摘 要

内源激素 ABA IAA 含量的高低影响到不同大豆品种愈伤组织诱导和分化的难易, 内源激素 IAA 含量高, 愈伤组织容易诱导; 内源激素 ABA 含量高, 愈伤组织却容易分化。在分化培养过程中取不同时期的胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织, 测定其 ABA IAA 含量, 发现胚性愈伤组织的 ABA 和 IAA 高于非胚性愈伤组织, 并且均在培养的第 6 天达到最大值。然而, 非胚性愈伤组织的 ABA / IAA 的比值较胚性愈伤组织晚 2 天达到最大值。

关键词 大豆; 愈伤组织; 内源激素; 体细胞胚胎发生

近年来, 随着酶联免疫、放射免疫测定激素技术的发展, 分化与脱分化组织内源激素的研究有了很大起步。许多研究表明, 在外植体分化与脱分化过程中, 内源激素的变化和使用外源激素诱导的结果基本一致。这说明培养基中施加外源激素可调节组织内源激素的变化, 从而诱导分化与脱分化的进行^[1]。内源 IAA 是下胚轴上不定根形成的控制因素之一, 在其形成根的组织中的积累是激发根原基产生的先决因素^[2]。内源 ABA 在调节体细胞胚胎方面也起着重要作用^[3]。本文在以前工作的基础上, 研究了大豆种子萌发子叶胚性愈伤组织诱导过程中内源 IAA 和 ABA 的动态变化。以求探明内源激素 IAA ABA 对大豆萌发子叶胚性愈伤组织的诱导及分化的调控作用, 从而提高胚性愈伤组织的分化频率及体细胞胚胎发生频率。

材料与方 法

供试材料为洪引 1 号、南农 73-935 科丰 6 号、南农 88-48 选取无菌苗的子叶为外植体。将子叶切成上、中、下三段 (远胚轴为上段, 近胚轴为下段), 分别接种于盛有 MS 并

^{*} 国家自然科学基金资助项目。

^{**} 现在中国科学院遗传研究所博士后流动站工作。

本文于 1997 年 1 月 27 日收到。 This paper was received on Jan. 27, 1997.

附有外源激素(灭菌前 pH为 5. 8)培养基的三角瓶中,培养温度为 25± 2℃,12小时光照(3000Lx),诱导 20天后继代培养,每隔 20天挑选胚性愈伤组织用于继代培养,继代 5个月,共 8代。诱导培养基为: MS+ 2. 5mg /L BA+ 2mg /L IAA+ 2mg /L KT+ 500mg /L CH(水解酪蛋白)+ 3%蔗糖;继代培养基为: MS(大量元素)+ B₆(微量元素)+ 0. 5mg /L 2, 4- D+ 1mg /L Pro(脯氨酸)+ 1% 甘露醇+ 300mg /L CH+ 3%蔗糖;分化培养基为: MS+ 2mg /L 2, 4- D+ 0. 1mg /L KT+ 500mg /L CH+ 3%蔗糖。实验过程中根据不同的研究目的,改变培养基的成分(详见下文)

内源激素采用南京农业大学植物生理室所提供的酶联免疫 (ELISA)试剂盒测定^[4]。

结果与分析

1. 不同大豆品种内源激素含量对愈伤组织诱导、分化的影响

在大豆组织培养中,不同品种的子叶形成愈伤组织的速度和产生芽的多少不尽相同(表 1)。分析其内源激素含量发现,IAA 含量高 ABA 含量低的大豆品种“科丰 6号”,其子叶外植体所产生的愈伤组织生长速度较快;但 IAA 含量较低,ABA 含量较高的大豆品种“洪引 1号”“南农 73- 935”所产生的愈伤组织却较易分化,产生较多的不定芽。这说明高含量内源激素 ABA 有利于愈伤组织的脱分化,从而产生更多的不定芽。内源激素在大豆组织培养中,由于不同品种的内源激素含量有差异,因而也就表现出了不同品种外植体分化与脱分化的难易。以不同大豆品种的萌发子叶为外植体培养的结果发现,内源激素 IAA 含量高,而内源激素 ABA 含量相对较低的大豆品种,其愈伤组织的诱导表现为出愈天数少,生长速度较快,但最终愈伤组织脱分化所产生的不定芽数却较少。

表 1 不同大豆品种萌发子叶内源激素的含量对愈伤组织诱导及分化的影响

Table 1 The endogenous hormone contents of cotyledons of germinated soybean							
品 种 Variety	接种数 No. of explant inoculated	出愈率 Callus induction	出愈天数 Days of forming callus	愈伤组织 生长速度 Growth rate of callus	产芽多少 No. buds	ABA	IAA
洪引 1号	30	28	10. 5	+	+++	23. 41	18. 01
南农 73- 935	30	27	10. 5	+	+++	23. 19	17. 91
科丰 6号	50	43	80	+++	+	19. 64	23. 10
南农 88- 48	50	44	8. 5	++	++	25. 64	21. 43

注: 1)+ 生长慢,++ 生长较快,+++ 生长快 1)+ grow slowly,++ grow fast,+++ grow very fast
2)+ 产芽少,++ 产芽较多,+++ 产芽多 2)few buds,++ many buds,+++ very many buds

2 分化培养过程中两类愈伤组织的内源激素含量的变化,在分化培养中是取不同时期的胚性和非胚性愈伤组织,测定其 IAA 和 ABA 的含量,我们发现 (1)内源激素 ABA 在胚性愈伤组织中的含量始终高于非胚性愈伤组织,而且二者有明显的差异。(2)开始培养的 4- 6天内,ABA 含量缓慢增加,4- 6天内迅速增加,第 6 天达到高峰,之后又迅速下降(表 2 图 1)。作者认为胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织在分化培养过程中内源 ABA 水平的这种明显的升降过程,可能是在体细胞胚胎诱导初期,愈伤组织内相对高含量的

ABA有利于体细胞胚胎的形成。这与已报道的 ABA在根原基诱导初期,低含量的 ABA有利于不定根的形成,而相对高含量的 ABA则抑制生根的结果正好相反。本试验中确实也发现了非胚性愈伤组织较胚性愈伤组织容易生根,而且所形成的体细胞胚胎数也远远低于胚性愈伤组织。另外,从两类愈伤组织的内源 IAA含量的变化可以看到,在最初培养的 0~6天内,IAA含量逐渐增高,到第 6天达到最大,以后随着培养时间的延长,IAA含量呈递减的趋势,这说明 IAA在愈伤组织的分化过程中有可能起主导作用(表 2 图 2)。

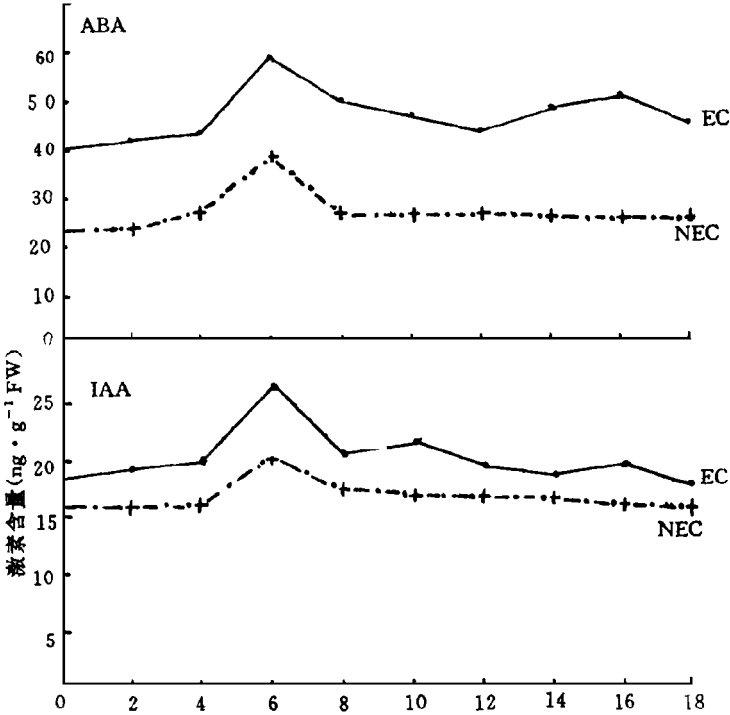


图 1 分化培养过程中两类愈伤组织的内源激素含量

Fig. 1 Endogenous contents of non- and embryogenic calli
表 2 分化培养过程中两类愈伤组织内源激素的含量

Table 2 The endogenous hormone contents of non- and embryogenic callus during differentiation culture

分化培养时间					分化培养时间				
Time of differentiaton culture(days)	ABA		IAA		Time of differentiaton culture(days)	ABA		IAA	
	EC	NEC	EC	NEC		EC	NEC	EC	NEC
0	40.01	23.38	18.38	15.99	10	46.63	26.20	21.60	16.93
2	41.63	23.55	19.35	16.00	12	43.33	26.36	19.59	16.87
4	42.87	26.71	19.90	16.21	14	48.20	25.65	18.70	16.72
6	58.70	38.18	26.66	20.22	16	50.45	25.36	19.67	16.21
8	49.64	26.57	20.55	17.53	18	45.10	25.21	17.84	16.03

注: 胚性愈伤组织 (EC) Embryogenic callus(EC) ;
非胚性愈伤组织 (NEC) Nonembryogenic callus(NEC)

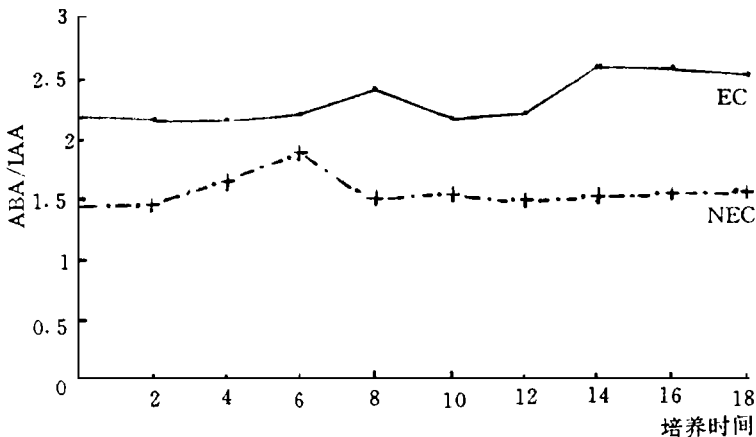


图 2 分化培养过程中两类愈伤组织内源激素含量的 ABA/IAA 比值

Fig. 2 ABA/IAA ratio of non- and embryogenic calli

3. 分化过程中胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织内源 ABA/IAA 值的变化

从图 2 ABA/IAA 比值的变化曲线可以看出,在分化培养过程中 ABA/IAA 比值始终保持着胚性愈伤组织高于非胚性愈伤组织的趋势。随着培养时间的延长,ABA/IAA 值逐渐增加,胚性愈伤组织的 ABA/IAA 值在第 8 天达到第一个最大值;非胚性愈伤组织的 ABA/IAA 值在开始培养 0~6 天内也一直呈递增趋势,只是到第 6 天就达到了最大值,比胚性愈伤组织的 ABA/IAA 最大值出现的时间晚 2 天。这说明在胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织分化过程中,ABA 含量可显著提高,而 IAA 含量则有暂时的降低过程,以致使 ABA/IAA 值增大,有利于体细胞胚胎的形成。因此,在培养过程中可通过添加适量的外源激素对内源激素间的 ABA/IAA 值进行调节,从而有利于体细胞胚胎的发生。提高体细胞胚胎发生的频率

讨 论

在组织培养中,外植体对激素的不同反应很可能与材料本身的生理状况,植体受体的多样性^[5]以及内源激素的合成和代谢上的差异密切相关^[6]。刘淑兰等发现^[2],从芝麻胚性愈伤组织到子叶形几个主要发育时期,IAA 含量逐渐降低,到子叶形时 IAA 含量降至最低点,而子叶形胚到根发生时期 IAA 含量又逐渐升高,并且非胚性愈伤组织中 IAA 和 ABA 的含量高于胚性愈伤组织。梅传生等认为^[3],ABA 对水稻离体培养材料再生率的调控有促进作用,并且能够促进体细胞胚胎发生。高水平的内源 ABA 与胚性能力的启动或表达有关,并在调节胚胎发育方面扮演着特定的角色。然而,外源激素是只调节内源激素的变化,还是直接参与诱导过程还不清楚。较易分化的大豆品种外植体,其内源激素 IAA 含量也较高,因此可以推测不同大豆品种所产生愈伤组织的内源激素含量的高低与体细胞脱分化形成体细胞胚胎的难易有关。在分化过程中,胚性愈伤组织的 ABA 含量以及 ABA/IAA 的比值高于非胚性愈伤组织。这说明植物激素对愈伤组织的诱导及器官分化的影响是不可忽视的^[7-8]。

因此,通过对大豆体细胞胚胎发生与内源激素的关系研究,可以根据大豆的外植体来源不同在培养基中施加不同浓度的外源激素,对其所产生愈伤组织的内源激素进行调节,从而提高胚性愈伤组织的分化频率及体细胞胚胎发生的频率。

参 考 文 献

- [1] 何道一,程炳嵩, 1992,植物组织培养材料分化与脱分化过程中的生理生化变化,山东农业大学学报, 23(3): 327~ 331
- [2] 刘淑兰, 1990,中国植物生理学第五次全国会议论文摘要汇编, 168
- [3] 梅传生,汤日圣,张金渝等, 1994,脱落酸对水稻离体培养植株再生率的调控,农业生物技术学报, 2(1): 96~ 98
- [4] 吴颂如,陈婉芬,周燮, 1988,酶联免疫法(ELISA)测定内源激素,植物生理通讯, 88 553
- [5] 柯善强, 1987,植物细胞的遗传全能与组织培养形态发生控制,武汉植物学研究, 5(3): 303~ 313
- [6] 彭艳华,刘成运, 1991,脱落酸与胚胎发育的关系及作用方式的研究进展,武汉植物学研究, (3): 289
- [7] 王凯基,倪德祥,张丕方等, 1981,植物激素对驳骨丹茎愈伤组织生长和器官再生的作用,实验生物学报, 14 (4): 337~ 341
- [8] Okazawa, Y. 1967, Effect of auxin and kinetin on the development and differentiation of potato tissue cultured in vitro, *Physiol. Plant*, 20 862~ 869

EMBRYOGENIC CALLUS INDUCING AND DIFFERENTIATING REGULATED BY EUDOGENOUS IAA AND ABA

Guo Zibiao Gai Junyi

(*Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095*)

Abstract

The contents of endogenous hormones, IAA and ABA, affected the callus inducing and differentiating. The higher contents of endogenous IAA and ABA were easier to callus inducing and differentiating respectively. While callus differentiating, the results of ABA and IAA showed that the embryogenic callus (EC) were higher than that of non-embryogenic callus (NEC), and reached a peak at the sixth day after culture. Therefore, the ratio of endogenous ABA to IAA in nonembrogenic callus (NEC) was later two days to reach a peak than that of+ embryogenic callus (EC)

Key words Soybean; Callus; Endogenous hormone; Somatic embryogenesis