

多胺诱导大豆子叶节愈伤组织形成丛生芽的机理研究

高凤鸣, 胡文婷, 苏国兴

(苏州大学 基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123)

摘要:以栽培大豆幼苗子叶节愈伤组织为材料,研究多胺氧化降解产物 H_2O_2 在大豆子叶节愈伤组织丛生芽形成中的作用。结果表明:浓度为 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 3 种外源多胺 (Put, Spm 和 Spd) 都能显著促进大豆子叶节愈伤组织分化形成丛生芽,其中 Spd 的作用最显著,Put 和 Spm 作用次之,而亚精胺合酶抑制剂 - 环己胺 (CHA) 对大豆子叶节丛生芽的形成有较强的抑制作用。与此对应的是,外源多胺处理促进了子叶节外植体的二胺氧化酶 (CuAO) 活性和 H_2O_2 含量水平。有趣的是,用多胺氧化酶抑制剂 - 氨基胍 (AG) 和 H_2O_2 清除剂 DMTU 分别处理,也可显著抑制多胺对大豆子叶节愈伤组织分化形成丛生芽的促进作用; AG 和 DMTU 在丛生芽分化上的作用,可能与 AG 处理导致外植体 CuAO 活性和 H_2O_2 水平的降低,以及与 DMTU 清除 H_2O_2 的作用有关。研究结果暗示多胺降解产物 H_2O_2 可能参与多胺对大豆子叶节愈伤组织丛生芽的诱导。

关键词:大豆子叶节;过氧化氢;多胺氧化降解;丛生芽

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.06.1006

Study on the Mechanism of Clump Bud Generation Induced by Polyamines in Soybean Cotyledon Node Callus

GAO Feng-ming, HU Wen-ting, SU Guo-xing

(School of Basic and Biological Science, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: Cotyledon node callus of soybean seedlings was used to study the role of hydrogen peroxide from polyamine degradation in induced generation of clump buds in soybean cotyledon node callus. The results showed that three of the exogenous polyamines significantly enhanced clump buds formation of soybean cotyledon node callus, $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Put was more effective than Spm, but less than Spd. Meanwhile cyclohexylamine (CHA), an inhibitor of Spd synthase, displayed a strong inhibitory effect on the formation of clump buds. Accordingly, activity of diamine oxidase and levels of hydrogen peroxide in the explants of cotyledon node were greatly increased. Interestingly, polyamine-increased differentiation of clump buds was strongly reduced after the application of diamine oxidase inhibitor-aminoguanidine (AG) and H_2O_2 scavenger - dimethyl thiourea (DMTU), respectively. Probably, the effects of AG and DMTU on clump buds differentiation were associated with decreases in CuAO activity and the level of H_2O_2 caused by AG treatments, and H_2O_2 scavenging by DMTU. These results suggest that hydrogen peroxide from polyamine degradation is potentially involved in inductive formation of clump buds in soybean cotyledon node callus.

Keywords: Soybean cotyledon node; Polyamines oxidative degradation; Hydrogen peroxide; Clump buds

生物有机体内的多胺是一类带正电荷的小分子多聚阳离子。常见多胺主要有精胺 (Spm)、亚精胺 (Spd) 和它们的合成前体物质 - 腐胺 (Put)。多胺不仅与植物的形态建成、防御响应、气孔开关、叶片衰老、开花、授精和逆境胁迫响应有着密切的关系,而且还参与了植物体内的信号转导过程^[1]。多胺参与植物形态建成已有大量报道,如在红富士叶片不定芽诱导形成的前期,发现有多胺的积累^[2]; Spd 可使芹菜悬浮细胞加速分化,形成幼苗^[3]; Put 或 Spd 能诱导蓝猪耳茎段外植体不定芽的分化,而亚精胺合酶抑制剂对 Put 诱导不定芽的分化有强烈的抑制作用^[4];但多胺诱导不定芽生成的作用机理仍不清楚。

植物细胞的分裂分化过程有 H_2O_2 参与,它与种子萌发、细胞壁发育、根的向地性、根生长和不定根形成、气孔运动,以及细胞衰老与程序化细胞死亡有关^[5]。 H_2O_2 是一种重要的多胺氧化降解产物^[6]。我们的前期工作证实,多胺可诱导大豆子叶节愈伤组织不定芽的分化^[7]。但多胺降解产物 H_2O_2 是否参与多胺对大豆子叶节愈伤组织丛生芽的诱导作用国内外鲜有报道。

为此,现以吉林小粒 7 号大豆子叶节愈伤组织

为材料,采用外源多胺、多胺氧化酶抑制剂和H₂O₂清除剂处理,研究多胺氧化降解及其产物H₂O₂在大豆子叶节愈伤组织分化形成丛生芽中的作用,以期深入认识多胺调节植物细胞分化的作用机理,在农业生产上为多胺调节不定芽的发生提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以吉林小粒7号大豆种子为材料,由吉林省农业科学院提供。试验所用药品多胺(Put、Spd、Spm)购自Sigma公司,环己胺(CHA)和N,N-二甲基硫脲(DMTU)购自Fluka公司,N,N-二甲基苯胺和4-氨基氨替吡啶购自国药集团。紫外可见分光光度计为日本岛津UV-2600/2700。

1.2 方法

1.2.1 大豆子叶节愈伤组织培养 选取大小均一、种皮完整的大豆种子,用蒸馏水冲洗5~6次后,于超净工作台中用1%升汞(75%的酒精配制)消毒8 min,然后用无菌水冲洗7~8次。将消毒后的种子接种于1/2 MS萌发培养基上,每瓶接种6~8粒。接种后,置于温度为(25±2)℃的恒温培养箱中在黑暗条件下培养。培养5 d后,选取萌发状态较好且长势一致的无菌苗,切去下胚轴,保留1~2 mm,靠近子叶节处切去真叶部分,并剥去种皮,作为子叶节外植体。

把切好的子叶节外植体接种到愈伤组织诱导培养基(MS培养基+0.5 mg·L⁻¹6-BA+0.025 mg·L⁻¹IBA+30 g·L⁻¹蔗糖+6 g·L⁻¹琼脂)上,外植体平放在固体培养基表面,子叶节平的一面向下,每瓶接种4个。光周期为12 h光/12 h暗,光照强度2 800 lx,温度控制在(25±2)℃。子叶节外植体在愈伤组织诱导培养基上培养10 d后形成明显的愈伤组织。

1.2.2 外源处理 把外植体转入新鲜的丛生芽诱导培养基(MS培养基+0.5 mg·L⁻¹6-BA+0.025 mg·L⁻¹IBA+30 g·L⁻¹蔗糖+6 g·L⁻¹琼脂)中,在新培养基中添加下列各种处理液:(1)0.5 mmol·L⁻¹多胺(PAs, Put、Spd和Spm);(2)0.01,0.1,1.0 mmol·L⁻¹环己胺(CHA);(3)0.1 mmol·L⁻¹氨基胍(AG)+0.5 mmol·L⁻¹PAs;(4)0.5 mmol·L⁻¹PAs+1.0 mmol·L⁻¹N,N-二甲基硫脲(DMTU)。

1.2.3 丛生芽分化率的统计 外植体丛生芽分化率(%)=分化出丛生芽的外植体数/外植体总数×100。

1.2.4 CuAO活性的测定 参照刘俊等^[8]方法,用

N,N-二甲基苯胺/4-氨基氨替吡啶显色法,测定外植体CuAO活性,酶活力单位以“U·min⁻¹·g⁻¹FW”表示。

1.2.5 H₂O₂含量的测定 参照Su等^[9]的方法,并略作修改。称取外植体鲜重2.0 g,加2 mL冷丙酮和少量石英砂,在冰浴中,快速研磨成匀浆。收集匀浆物,4 000 r·min⁻¹离心10 min(4℃),上清液即为H₂O₂提取液。吸取1.0 mL H₂O₂提取液,加入0.1 mL 20% TiCl₄浓盐酸溶液和0.2 mL浓氨水,摇匀后经2 000 r·min⁻¹离心10 min,弃上清液,用冷丙酮冲洗沉淀3次,以除去色素。加入2 mmol·L⁻¹的硫酸5.0 mL,待沉淀溶解后测定波长415 nm处的光密度值。以每克植物鲜重的微摩尔数(μmol·g⁻¹)表示H₂O₂的含量。

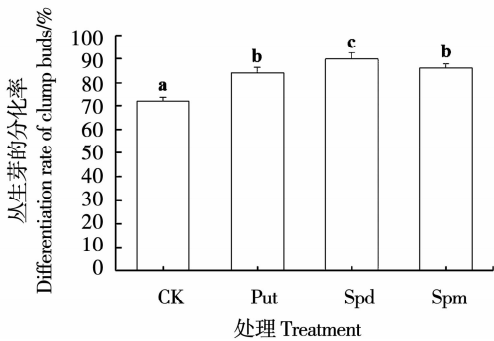
1.3 数据分析

使用SPSS 10.0将3组相同处理的材料进行平行测定,用测得的平均值在不同处理间进行Duncans测验,比较不同处理间的差异显著性,并用Excel 2003软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 外源多胺对大豆子叶节丛生芽分化率的影响

以0.5 mmol·L⁻¹外源多胺处理大豆子叶节外植体愈伤组织,生长9 d后统计外植体丛生芽的分化率(图1),发现3种外源多胺处理都能促进丛生芽的分化,其中以Spd的效果最好;与对照相比,0.5 mmol·L⁻¹ Put、Spm和Spd处理后,丛生芽的分化率依次增加了16.7%、25.0%和19.4%,差异达显著性水平(P<0.05)。



不同小写字母表示处理间0.05水平差异显著,下同。

Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level, the same below.

图1 外源多胺对大豆子叶节愈伤组织丛生芽分化的影响

Fig. 1 Effects of exogenous PAs on clump buds of soybean cotyledon node callus

2.2 CHA 对大豆子叶节愈伤组织丛生芽分化率的影响

亚精胺合酶抑制剂 - 环己胺 (CHA) 能够抑制多胺的生物合成。如图 2 所示, 与对照相比, 不同浓度 CHA 都抑制丛生芽的诱导, 随着浓度的升高, 丛生芽的诱导率依次下降 61.0%、69.4% 和 81.9%, 差异达显著性水平 ($P < 0.05$)。

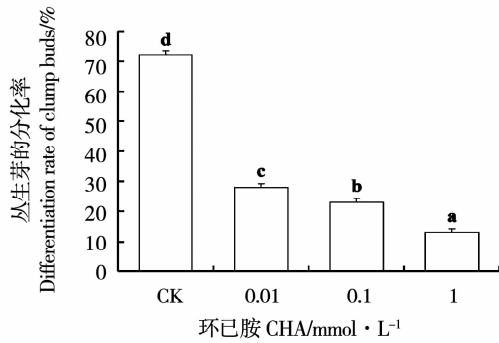


图 2 CHA 对大豆子叶节丛生芽分化的影响
Fig. 2 Effects of CHA on the clump buds of soybean cotyledon node callus

2.3 外源多胺处理对大豆子叶节外植体 CuAO 活性影响

分析多胺处理后大豆子叶节外植体二胺化酶 (CuAO) 活性结果如图 3 所示, 0.5 mmol \cdot L $^{-1}$ Put、Spd 和 Spm 处理后, 外植体内 CuAO 活性分别是对照的 2.1、1.7 和 1.6 倍 (图 3), Put 处理后的 CuAO 活性显著高于 Spd 和 Spm 处理, Spd 和 Spm 处理间差异不显著 ($P > 0.05$)。前人的研究表明, H $_2$ O $_2$ 参与了愈伤组织的分化, 而它是 CuAO 作用产物之一^[10]。多胺处理促进 CuAO 活性, 暗示 CuAO 可能参与了多胺对大豆子叶节愈伤组织丛生芽的诱导。

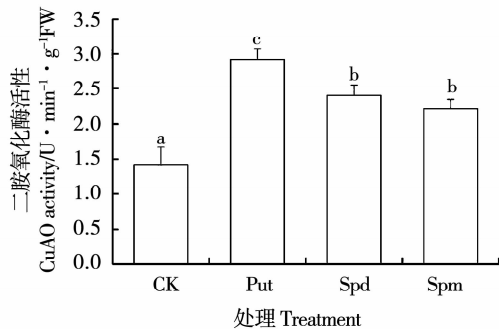


图 3 外源多胺对大豆子叶节外植体内 CuAO 活性的影响

Fig. 3 Effects of PAs treatments on the activity of diamine oxidase in soybean cotyledon node explant

2.4 外源多胺处理对大豆子叶节外植体 H $_2$ O $_2$ 含量影响

多胺处理后子叶节外植体的 H $_2$ O $_2$ 含量结果如图 4 所示, 0.5 mmol \cdot L $^{-1}$ Put、Spd 和 Spm 都能够促进 H $_2$ O $_2$ 含量增加, 与对照相比, H $_2$ O $_2$ 含量分别是对照的 1.2、1.1 和 1.1 倍 (图 4), 差异达显著性水平 ($P < 0.05$)。其中, Put 的效果最好, 这可能与它是 CuAO 最适作用底物有关。对比图 3 时发现, 多胺处理后的 H $_2$ O $_2$ 含量变化与 CuAO 活性变化相对应 (图 3)。

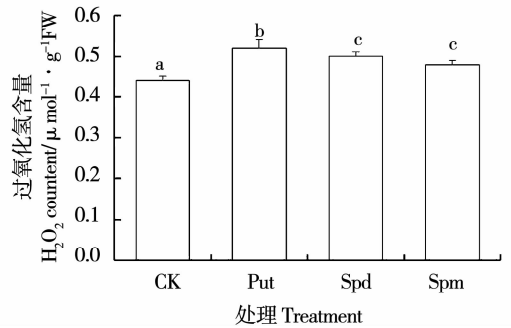


图 4 外源多胺对大豆子叶节外植体内 H $_2$ O $_2$ 含量的影响

Fig. 4 Effects of PAs treatments on the the contents of H $_2$ O $_2$ in soybean cotyledon node explant

2.5 PAs 和 AG 同时处理对大豆子叶节愈伤组织分化形成丛生芽的影响

氨基胍 (AG) 是 CuAO 专性抑制剂, 用 0.1 mmol \cdot L $^{-1}$ AG 和 0.5 mmol \cdot L $^{-1}$ PAs (Put、Spd 和 Spm) 分别或同时处理大豆子叶节愈伤组织, 统计丛生芽分化率 (图 5), 与对照相比, AG 处理后分化率下降 25.0%, 与单独多胺处理相比, 丛生芽的分化率依次下降 28.6%、28.9% 和 39.5%。所得结果与图 1 和图 3 相符, 表明 CuAO 在多胺促进愈伤组织分化形成丛生芽中发挥作用。

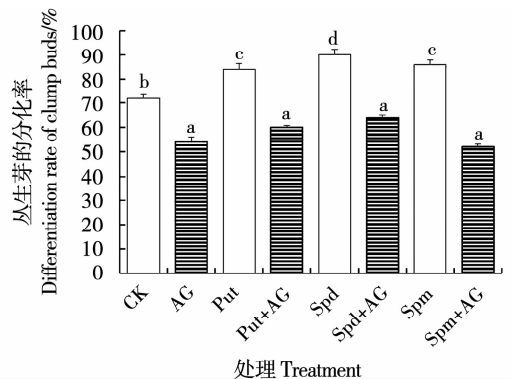


图 5 PAs 和 AG 同时处理对大豆子叶节愈伤组织分化形成丛生芽影响

Fig. 5 Effects of PAs and AG treatments on the clump budding formation of soybean cotyledon node callus

2.6 AG 处理对大豆子叶节外植体 CuAO 活性和 H₂O₂ 含量的影响

测定 AG 处理后大豆子叶节外植体 CuAO 活性变化如图 6 所示,与对照相比,AG 处理后,外植体内 CuAO 活性明显降低了 75.6%,3 种 0.5 mmol·L⁻¹ PAs(Put、Spd 和 Spm)和 0.1 mmol·L⁻¹ AG 同时处理,CuAO 活性相当于多胺单独处理的 14.4%、13.3%和 13.6%。

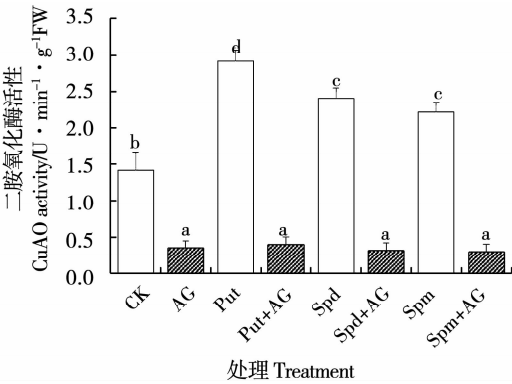


图 6 PAs 和 AG 同时处理大豆子叶节外植体 CuAO 活性影响

Fig. 6 Effects of PAs and AG treatments on the activity of diamine oxidase in soybean cotyledon node explant

图 7 是 0.1 mmol·L⁻¹ AG 和 0.5 mmol·L⁻¹ PAs (Put、Spd 和 Spm)共同处理后,大豆子叶节 H₂O₂ 含量的变化,发现与对照和单独的 PAs 处理相比,AG 处理 H₂O₂ 含量依次降低了 20.5%、25.0%、20.0%和 18.8%。

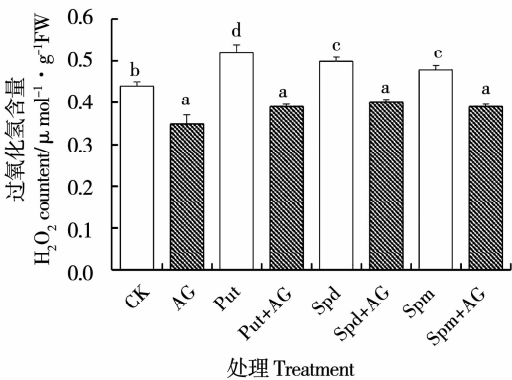


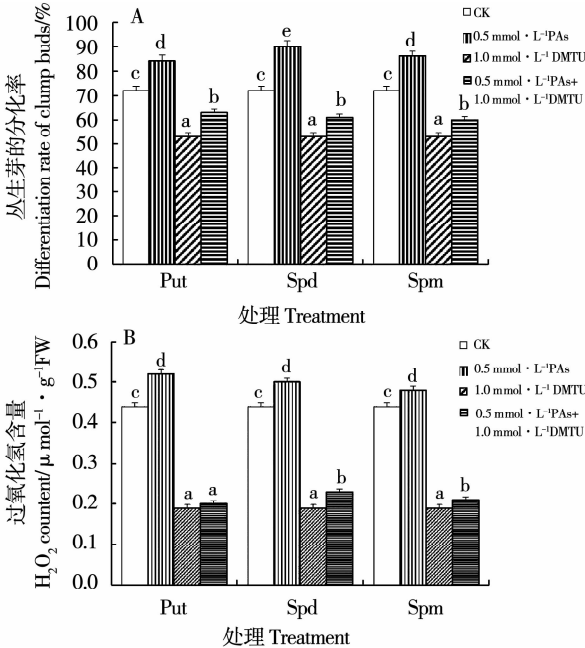
图 7 PAs 和 AG 同时处理对大豆子叶节外植体 H₂O₂ 含量影响

Fig. 7 Effects of AG and PAs treatments on the the contents of H₂O₂ in soybean cotyledon node explant

2.7 DMTU 对大豆子叶节愈伤组织丛生芽分化率和 H₂O₂ 含量的影响

N,N-二甲基硫脲(DMTU)是一种常用的H₂O₂清除剂。用 1.0 mmol·L⁻¹ DMTU 单独处理子叶节

愈伤组织,发现可显著抑制丛生芽的分化,起到与 AG 相似的作用;而用 0.5 mmol·L⁻¹ PAs 和 1.0 mmol·L⁻¹ DMTU 同时处理,与单独用多胺处理相比,也可明显抑制多胺对丛生芽的促进作用(图 8A)。暗示多胺促进大豆子叶节愈伤组织分化形成丛生芽可能与 H₂O₂ 有关。如图 8B 所示,1.0 mmol·L⁻¹ DMTU 处理,与对照相比,外植体 H₂O₂ 含量下降 43.2%;0.5 mmol·L⁻¹ PAs (Put、Spd 和 Spm)和 1.0 mmol·L⁻¹ DMTU 同时处理,与 PAs 单独处理相比,分别降低了 61.5%、54.0%和 56.3%,差异极显著(P<0.01)。



A: 丛生芽分化率; B: 过氧化氢含量
A: Differentiation rate of clump buds; B: H₂O₂ contents

图 8 PAs 和 DMTU 同时处理对大豆子叶节愈伤组织分化形成丛生芽和过氧化氢含量的影响

Fig. 8 Effects of PAs and DMTU treatments on the clump buds formation of soybean cotyledon node callus and on H₂O₂ contents in soybean cotyledon node explants

3 结论与讨论

多胺对植物生长发育的调节作用,一般认为与其多聚阳离子性质有关,其可与 DNA、RNA、磷脂、酸性蛋白及细胞壁组分相互作用,在维持 DNA、RNA 结构、细胞膜的稳定、蛋白酶活性上起调节作用^[11]。然而,随着人们对多胺氧化酶和二胺氧化酶性质、活性水平调节以及基因表达的不断认识,越来越多的证据表明,PAs 分解代谢与植物生长发育过程有关。除中间产物有重要的生理作用外,多胺氧化降解产生的次生信号 H₂O₂,参与了细胞壁的硬化过程、防御基因的表达激活和程序性细胞死亡的

诱导等^[5],此外它还参与了对非生物胁迫的响应和植物生长发育如大豆侧根的发生过程^[9,12]。

本试验用3种外源多胺 Put、Spm 和 Spd,对大豆子叶节愈伤组织进行处理,发现可不同程度地促进丛生芽的分化(图1),而不同浓度的多胺生物合成抑制剂环己胺(CHA),对丛生芽的分化有不同程度的抑制作用(图2)。表明多胺参与了大豆子叶节愈伤组织丛生芽的分化。这与田春英等^[2]在红富士苹果叶片不定芽再生过程中的结果相符。多胺的这种作用,可能与其促进二胺氧化酶活性和增加多胺降解产物 H_2O_2 含量有关。因为多胺处理可显著增加二胺氧化酶活性和 H_2O_2 水平(图3和图4)。不难发现,多胺对丛生芽分化的促进作用 Spd 效果最好,而 Put 处理后的二胺氧化酶活性最高,产生的 H_2O_2 最多,这种不一致性可能与它们所形成不同的降解产物,以及这些降解产物在丛生芽的分化过程中不同的作用有关。多胺氧化降解产物 H_2O_2 参与了大豆子叶节愈伤组织丛生芽的分化的推测,被随后的实验所证实。二胺氧化酶专性抑制剂氨基胍(AG)处理,在强烈抑制二胺氧化酶活性,降低 H_2O_2 的同时,可显著降低3种多胺对丛生芽分化的诱导作用(图5、图6和图7)。而 H_2O_2 清除剂 N,N-二甲基硫脲(DMTU)处理,随着外植体内 H_2O_2 水平的降低,也可显著降低3种多胺对丛生芽分化的促进作用(图8)。

上述结果表明,多胺促进大豆子叶节愈伤组织分化形成丛生芽可能与其氧化降解有关,多胺氧化降解产物 H_2O_2 可能参与了丛生芽的形成。Tian等^[13]在培养基中添加外源 H_2O_2 ,可提高草莓愈伤组织分化形成芽的百分比,暗示 H_2O_2 与草莓愈伤组织形态再生过程相关,并且可能是作为信号分子参与芽原基的形成,也支持本研究的结论。

参考文献

- [1] Kusano T, Yamaguchi K, Berberich T, et al. Advances in polyamine research in 2007[J]. *Journal of Plant Research*, 2007, 120(3): 345-350.
- [2] 田春英, 邵建柱, 刘莹, 等. 红富士苹果叶片不定芽再生中激素, 多胺和 NO 含量的变化[J]. *园艺学报*, 2010, 37(9): 1403-1408. (Tian C Y, Shao J Z, Liu Y, et al. Changes of hormones, polyamines and NO content during regeneration of adventitious buds from in vitro leaves of red fuji apple[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2010, 37(9): 1403-1408.)
- [3] Altman A, Levin N, Cohen P, et al. Polyamines in growth and differentiation of plant cell cultures [M]//Zappia V, Pegg A E. *Progress in polyamine research*. New York: Plenum Press, 1988, 559-572.
- [4] Tanimoto S, Matsubara Y, Ishioka N. Significance of spermidine in the initiation of adventitious buds in stem segments of torenia [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1994, 35(7): 1071-1077.
- [5] Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signalling [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(5): 388-395.
- [6] Yoda H, Yamaguchi Y, Sano H. Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(4): 1973-1981.
- [7] 胡文婷. 多胺氧化降解在大豆子叶节分化形成不定芽和不定根中的作用[D]. 苏州: 苏州大学, 2012. (Hu W T. The role of polyamine oxidative degradation in the adventitious budding and adventitious rooting of soybean cotyledon node[D]. Suzhou: Soochow University, 2012.)
- [8] 刘俊, 刘友良. 盐胁迫下大麦幼苗多胺的种类和状态与多胺氧化酶活性的关系[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2004, 30(2): 141-146. (Liu J, Liu Y L. The relations between polyamine types and forms and polyamine oxidase activities in barley seedlings under salt stress [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004, 30(2): 141-146.)
- [9] Su G, Zhang W, Liu Y. Involvement of hydrogen peroxide generated by polyamine oxidative degradation in the development of lateral roots in soybean [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2006, 48(4): 426-432.
- [10] 田敏, 韩凝, 边红武, 等. 草莓愈伤组织再生能力与活性氧代谢水平相关性研究[J]. *园艺学报*, 2004, 31(3): 372-374. (Tian M, Han N, Bian H W, et al. The possible relationship between the regeneration capacity and reactive oxygen species in the strawberry calli [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31(3): 372-374.)
- [11] Bouchereau A, Aziz A, Larher F, et al. Polyamines and environmental challenges: recent development [J]. *Plant Science*, 1999, 140: 103-125.
- [12] Cona A, Rea G, Angelini R, et al. Functions of amine oxidases in plant development and defence [J]. *Trends in Plant Science*, 2006, 11(2): 80-88.
- [13] Tian M, Gu Q, Zhu M Y. The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus [J]. *Plant Science*, 2003, 165: 701-707.