外源腐胺对石刁柏愈伤组织胚性能力的影响

陈小飞[1]，萧浪涛[1,*]，鲁旭东[1,3]，刘素纯[1,2]

湖南农业大学[1] 湖南省植物激素与生长发育重点实验室，[2] 食品科技学院，长沙 410128；[3] 孝感学院生命科学技术学院，湖北孝感 432000

提要：石刁柏胚性愈伤组织继代过程中，添加浓度为 10 mg·L^{-1} 的外源腐胺能有效地保持愈伤组织的胚胎发生能力，并减少愈伤组织的褐化，但不能提高愈伤组织的体细胞胚的诱导率。腐胺处理过的胚性愈伤组织的内源腐胺含量明显提高。这可能是外源腐胺保持细胞胚性、降低褐化程度的原因。

关键词：石刁柏；愈伤组织胚胎发生能力；褐化；内外源腐胺

Effects of Exogenous Putrescine on Embryogenic Competence in *Asparagus officinalis* L. Calli

CHEN Xiao-Fei[1], XIAO Lang-Tao[1,*], LU Xu-Dong[1,3], LIU Su-Chun[1,2]

[1]Hunan Provincial Key Laboratory of Phytohormones and Development, [2]College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; [3]School of Life Science and Technology, Xiaogan College, Xiaogan, Hubei 432000, China

Abstract: *Asparagus officinalis* embryogenic calli, subcultured on media with 10 mg·L^{-1} exogenous putrescine, exhibited longer embryogenic competence and less browning. However, induction of somatic embryos was not promoted by application of exogenous putrescine. Compared with the non-putrescine treatment (control), embryogenic calli pretreated with putrescine exhibited a high level of the endogenous putrescine. It is suggested that exogenous putrescine could prompt calli embryogenic competence and reduce calli browning due to the accumulation of endogenous putrescine.

Key words: *Asparagus officinalis*; callus embryogenic competence; browning; exogenous and endogenous putrescine

石刁柏的组培、器官发生、胚状体发生和生化组成等生理生化问题的研究已多有报道(赵洁和程井辰 1992；赵洁等 1992；蒋琳和陆仕华 1996；李可峰等 2006)。石刁柏因品种和基因型不同，离体培养条件要求差异较大。我们实验室从美国引入石刁柏优良品种 ‘UC800’ (*Asparagus officinalis* L. cv. UC800)，并建立了稳定的体细胞胚(简称体胚)发生培养体系(陈小飞等 2006；鲁旭东等 2006)。此外，多胺在植物体内参与细胞增殖、分化、衰老、抗逆和形态发生等一系列生理生化反应(Martin 和 Ames 1962；Martin-Tanguy 2001)。石刁柏离体培养过程中，我们观察到石刁柏继代培养基中添加一定浓度的外源腐胺(putrescine，Put)可保持继代胚性愈伤组织的胚性，且能有效地降低愈伤组织的褐化现象，现报道如下。

材料与方法

石刁柏(*Asparagus officinalis* L.)胚性愈伤组织(embryogenic callus，EC)的诱导参照陈小飞等(2006)和鲁旭东等(2006)文中的方法。初始愈伤组织和胚性愈伤组织的诱导培养基分别为 MS+KT 0.5 mg·L^{-1} (单位下同)+2.4-D 2 和 MS+NAA 0.5+2.4-D 10。胚性愈伤组织继代培养基为：MS+NAA 0.5+2.4-D 10+Put 0~15。诱导出的胚性愈伤组织在加有 Put 20~40 的 MS 培养基上诱导体胚发生，7 d 后转入不加生长调节物质的 MS 培养基。以不加 Put 的为对照。用体视显微镜观察体胚的发育

收稿 2007-02-13 修定 2007-03-28

资助 教育部留学生基金(教外司 1999363)和国家自然科学基金(30540019)。

* 通讯作者(E-mail：ltxiao@hunau.net；Tel：0731-4635259-8001)。

过程，定期取样检测。内源多胺含量检测参照刘俊等(2002)文中的方法。

实验结果

1 外源 Put 对石刁柏胚性愈伤组织胚胎发生能力的影响

胚性愈伤组织在继代培养基上继代后转入胚胎发生培养基上诱导体胚的结果表明，胚性愈伤组织经几次继代后体胚发生能力逐渐降低，继代5次后体胚发生能力基本丧失(表1)；而在培养基中加入一定浓度的Put，继代5次后部分愈伤组织仍可产生体胚，添加10 mg·L^{-1} Put的愈伤组织在继代5次后仍有41.7%的胚性愈伤组织可产生体胚，说明外源Put能保持胚性细胞的胚性。

在添加Put的培养基中继代的胚性愈伤组织色泽鲜亮、颗粒大小均匀(图1-a)。继代6次后，不加Put培养的胚性愈伤组织褐化明显，质地疏松(图1-b)，甚至产生粘液，这种愈伤组织转移到分化培养基后不能诱导出体胚。在继代培养基中加有Put的愈伤组织，经过继代后其褐变的程度低于不添加的(表1)，能诱导出体胚(图1-c)，说明Put在一定程度上能够防止愈伤组织褐变。

2 外源 Put 对胚性愈伤组织体胚诱导率的影响

为了探讨体胚诱导过程中外源Put处理是否对体胚诱导率有影响，以在含有10 mg·L^{-1} Put的MS培养基上继代不同次数的胚性愈伤组织为材料诱导体胚。统计体胚诱导率的结果表明，诱导体胚时培养基中Put浓度在20~35 mg·L^{-1}范围内添加与否的诱导率相差不大(表2)，而且当Put浓度达到40 mg·L^{-1}时，体胚发生率低于不加Put的，说明高浓度Put对体胚发生有抑制作用。

3 外源 Put 对胚性愈伤组织内源多胺含量的影响

为了验证外源Put是否通过调节内源多胺保持细胞胚性，检测继代次数不同的胚性愈伤组织中的内源多胺含量。结果显示，胚性愈伤组织中内源Put和亚精胺(spermidine，Spd)含量在继代过程中逐渐下降(图2)，2种多胺在C_0和C_6中的含量差异非常明显(超过50%)，而精胺(spermine，Spm)

表1 不同浓度Put对石刁柏胚性愈伤组织胚胎发生能力的影响

Table 1 Effects of putrescine treatment at various concentrations on callus embryogenic competence in *A. officinalis*

Put浓度 /mg·L^{-1}	接种数量 / 瓶	产生体胚的比例 / %				愈伤组织褐变率 /%
		C_1	C_2	C_4	C_5	C_6
0	12	58.3	50.0	8.3	0	66.7
5	12	66.7	58.3	25.0	16.7	41.7
10	12	91.7	75.0	58.3	41.7	16.7
15	12	83.3	75.0	33.3	33.3	25.0

C_1、C_2和C_4~C_6分别表示继代1、2和4~6次的胚性愈伤组织。

图1 胚性愈伤组织(a)、逐渐褐化的胚性愈伤组织(b)和成熟的体胚(c)

Fig.1 Embryogenic callus (a), embryogenic callus browned gradually (b) and mature somatic embryos (c)

表2 Put处理对石刁柏体胚诱导的影响

Table 2 Effects of putrescine treatment on somatic embryogenesis induction in *A. officinalis*

Put浓度/mg·L^{-1}	产生胚状体数/个·g^{-1}(FW)			
	C_0	C_1	C_4	C_6
0	18	13	3	0
20	19	12	4	0
25	22	14	5	3
30	20	13	4	3
35	18	11	5	1
40	10	8	2	0

C_0表示不继代的胚性愈伤组织；C_1、C_4和C_6分别表示继代1、4和6次的胚性愈伤组织。

含量变化不大。经外源Put处理过的胚性愈伤组织中内源Put含量在继代过程中都高于不加Put的，在C_2、C_4和C_5中内源多胺含量差异分别为23.5%、42.5%和47.2%；但Spd和Spm含量受外源Put的影响很小。

4 外源Put对体胚诱导过程中内源多胺代谢的影响

在含有10 mg·L^{-1} Put的MS培养基上继代1次的胚性愈伤组织，转入加有25 mg·L^{-1} Put的MS培养基上诱导体胚发生，7 d后转入不加生长调节物质的MS培养基上继续培养，每周取样检测内源多胺含量。如图3所示，在体胚诱导过程中，愈伤组织中内源Put含量一直呈下降趋势，28 d时降到最低值。Spd和Spm含量在培养的35 d内，有一个下降、上升、再下降的过程。与不加Put的相比，经Put处理的愈伤组织中3种内源多胺含量除Put高于不加Put的以外，Spd和Spm含量变化规律不明显，在体胚接近成熟时(35 d)不加Put的内源Spd和Spm含量比加Put的高。

讨 论

胚性愈伤组织的质量是体胚诱导的关键因素，继代培养胚性愈伤组织是种质资源离体保存的一条重要途径；但胚性愈伤组织继代保存往往

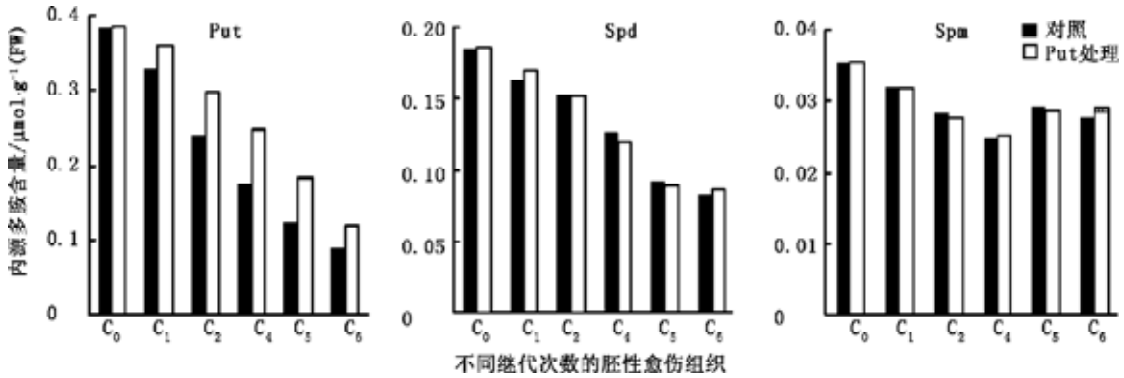

图2 胚性愈伤组织继代过程中外源Put对内源多胺含量的影响

Fig.2 Effects of putrescine treatment on endogenous polyamine contents during embryogenic callus subculture

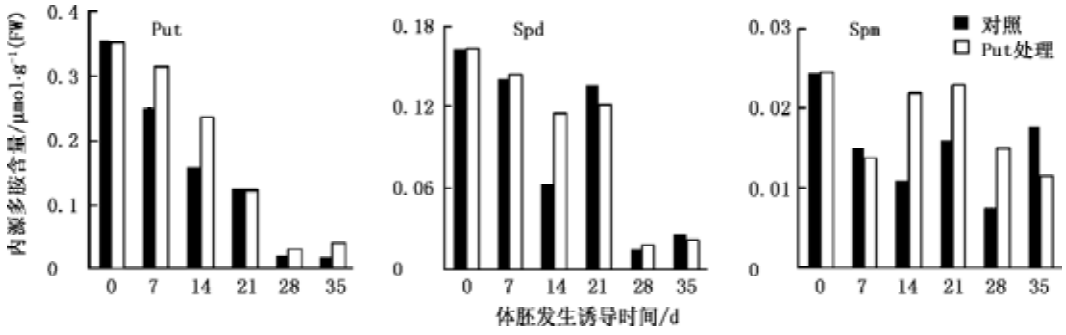

图3 体胚诱导过程中外源Put对愈伤组织内源多胺含量的影响

Fig.3 Effects of putrescine treatment on endogenous polyamine contents during somatic embryo induction

伴随着胚性的丧失(黄璐和卫志明1999)。石刁柏胚性愈伤组织在继代过程中用Put处理后一定程度上延缓了胚性的丧失。内源多胺含量检测显示，Put可提高胚性愈伤组织中内源Put含量。Yadav和Rajam (1998)在茄子离体培养中曾观察到，高胚性的叶原基顶端区域的多胺尤其是Put的含量高于胚胎发生能力低的叶基部区域，经Put处理4~7 d的叶原基能明显改善其胚胎发生能力，这暗示外源Put可能通过提高内源Put含量促进细胞胚性的获得和保持。最近，Silveira等(2006)报道，3种外源多胺对南洋杉(*Araucaria angustifolia* Bert.)胚性培养物的生长、形态进程和一氧化氮(nitric oxide，NO)合成有着不同的影响，Put可有效促进胚性培养物释放NO，胚性细胞比悬浮细胞积累更多的NO。因此，他们推测Put可能通过调节NO的生物合成保持胚性悬浮细胞极性(Silveira等2006)。

较多的研究认为，外源Put能促进体胚发生(胡忠等2001；Yadav和Rajam 1997, 1998)。但也有报道认为，外源Put并不能提高体胚的诱导率或促进体胚发生(Meijer和Simmonds 1988；Calheiros等1994)。本文结果也显示，外源Put对胚胎发生诱导率的影响不明显。这可能与植物物种或基因型有关。石刁柏离体培养过程中，外源Put能减少胚性愈伤组织的褐变。在松(*Pinus virginiana* Mill.)中已经证明，外源Put能促进褐化培养物转变成正常细胞，并能促进植株再生；褐化的愈伤组织其Put、Spd和Spm含量都远低于非褐化的愈伤组织(Wei和Ronald 2004；Wei等2004)。本文试验也得出相同的结果(图2中C_0、C_6)，而且经外源Put处理过的胚性愈伤组织中Put含量远高于未作Put处理的(最高差距达47.2%，降幅也低于未作Put处理的)。

要进一步阐明Put在保持胚胎发生能力、降低褐化程度中作用的机制，可从2个方面着手：一是将外源多胺处理和多胺生物合成抑制剂处理结合起来；另一个是用分子手段克隆和表达与Put合成和分解代谢相关的基因，如鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase，ODC)、精氨酸脱羧酶(arginine decarboxylase，ADC)、二胺氧化酶(diamine oxidase，DAO)的基因等，弄清Put在胚胎发生过程中的代谢网络，有望揭示Put的作用机制。

参考文献

陈小飞, 萧浪涛, 鲁旭东, 童建华(2006). 石刁柏胚性细胞诱导过程中的内源激素和多胺含量变化. 植物生理学通讯, 42 (5): 826~830

胡忠, 王仑山, 郭光沁, 郑国锠(2001). 多胺对宁夏枸杞愈伤组织器官发生和体细胞胚发生的影响. 实验生物学报, 34 (3): 191~196

黄璐, 卫志明(1999). 不同基因型玉米的再生能力和胚性与非胚性愈伤组织DNA的差异. 植物生理学报, 25 (4): 332~338

蒋琳, 陆仕华(1996). 生长调节剂对石刁柏悬浮培养细胞的生长和多糖含量的影响. 植物生理学通讯, 32 (1): 23

李可峰, 韩太利, 董贵俊, 刘杰(2006). 用形态与分子标记研究石刁柏种质资源遗传多样性. 植物遗传资源学报, 7 (1): 59~65

刘俊, 吉晓佳, 刘友良(2002). 检测植物组织中多胺含量的高效液相色谱法. 植物生理学通讯, 38 (6): 596~598

鲁旭东, 萧浪涛, 刘素纯, 刘华英, 陈小飞(2006). 2,4-D对石刁柏愈伤组织诱导的影响. 安徽农业科学, 34 (21): 5546~5548

赵洁, 程井辰(1992). 石刁柏愈伤组织形态发生能力及器官发生的研究. 武汉植物学研究, 10 (4): 328~332

赵洁, 周吉源, 程井辰(1992). 化学因子对石刁柏胚状体发生的影响. 植物生理学通讯, 28 (2): 113~115

Calheiros MBP, Vieira LGE, Fuentes SRL (1994). Effects of exogenous polyamines on direct somatic embryogenesis in coffee. R Bras Fisiol Veg, 6 (2): 109~114

Martin-Tanguy J (2001). Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). Plant Growth Regul, 34 (1): 135~148

Martin RG, Ames BN (1962). The effect of polyamines and of polyusize on phenylalanine incorporation. Proc Natl Acad Sci USA, 48 (12): 2171~2178

Meijer EGM, Simmonds J (1988). Polyamine levels in relation to growth and somatic embryogenesis in tissue of *Medicago Sativa* L. J Exp Bot, 39 (6): 787~794

Silveira V, Santa-Catarina C, Tun NN, Scherer GFE, Handro W, Guerra MP, Floh EIS (2006). Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. ktze. Plant Sci, 171 (1): 91~98

Tang W, Newton RJ (2004). Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). Plant Sci, 167 (3): 621~628

Tang W, Newton RJ, Outhavong V (2004). Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. Physiol Plant, 122 (3): 386~395

Yadav JS, Rajam MV (1997). Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongena* L. associated with differential morphogenetic capacity: efficient somatic embryogenesis with putrescine. J Exp Bot, 48 (8): 1537~1545

Yadav JS, Rajam MV (1998). Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. Plant Physiol, 116: 617~625