

硝酸银对离体培养烟草叶片愈伤组织形成和芽再生及其脯氨酸和丙二醛含量的影响

王文星 屈山 曹成有* 徐淑坤

东北大学生物技术研究所, 沈阳 110004

摘要 培养基中添加不同浓度硝酸银离体培养烟草叶片的结果表明, 1~5 mg·L⁻¹ 硝酸银可提高烟草愈伤组织的芽分化率, 5 mg·L⁻¹ 硝酸银对芽再生的促进作用最佳, 而高于 10 mg·L⁻¹ 的硝酸银抑制愈伤组织的形成和芽再生。在愈伤组织和再生芽中, 脯氨酸和丙二醛含量均随硝酸银浓度的增加而增加。

关键词 硝酸银; 烟草; 愈伤组织; 芽再生; 脯氨酸; 丙二醛

Effect of Silver Nitrate on Callus Formation and Bud Regeneration of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Leaf *in vitro* and Changes in Their Proline and Malondialdehyde Contents

WANG Wen-Xing, QU Shan, CAO Cheng-You*, XU Shu-Kun

Institute of Biological Technology, Northeastern University, Shenyang 110004, China

Abstract Different concentrations of silver nitrate in the medium were used in leaf tissue culture of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) *in vitro*. The results showed that 1–5 mg·L⁻¹ silver nitrate increased bud differentiation percentages of tobacco callus, especially the concentration of 5 mg·L⁻¹. However, more than 10 mg·L⁻¹ silver nitrates inhibited callus formation and bud regeneration. The proline and malondialdehyde contents in calli and regeneration buds increased with the increase of silver nitrate concentrations.

Key words silver nitrate; tobacco (*Nicotiana tabacum* L.); callus; bud regeneration; proline; malondialdehyde

在植物离体培养中, 硝酸银是一种有效的乙烯活性抑制剂, 它通过竞争性地作用于乙烯作用部位而促进器官发生和体细胞胚胎发生, 且不同的植物品种及器官对硝酸银的反应不同(张鹏等 1997)。据报道, 硝酸银和脯氨酸分别用于农杆菌转化大豆过程中, 均能提高大豆的转化率(刘金华等 2003), 但有关硝酸银加入后不同生长阶段的植物体内脯氨酸和丙二醛是否发生相应变化的报道很少。本文以烟草(*Nicotiana tabacum* L.)叶片为材料, 研究硝酸银对烟草离体培养的影响, 探讨经硝酸银处理的烟草叶片愈伤组织和再生芽过程中脯氨酸和丙二醛含量变化, 以期能为植物组织培养提供参考。

材料与方法

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)种子购自种子公司。选籽粒饱满的烟草种子用 70% 乙醇浸泡 1 min, 无菌水漂洗 2 次, 再用含 2% 活性氧的次氯

酸钠浸泡 20 min, 无菌水漂洗 3 次, 无菌滤纸吸干, 然后将其接种于 MS 培养基中, 1 周后种子长出无菌苗。培养条件为: 恒温(27±1) °C, 光强为 40 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照 14 h·d⁻¹。

取二周龄的无菌苗叶片, 切成 5 mm×5 mm, 接种于诱导愈伤组织培养基(MS 培养基+NAA 2 mg·L⁻¹+3% 蔗糖+0.7% 琼脂, pH 5.8)上。硝酸银浓度有 1、5、10、20、30、50 mg·L⁻¹, 以不加硝酸银为对照。每组 24 瓶, 每瓶接种 3 个叶片。愈伤组织形成率 = 每组形成愈伤组织的叶片数 / 每组接种叶片总数 × 100%。培养条件同上。

挑选二周龄的愈伤组织转移到芽再生培养基上, 其成分与诱导愈伤培养基成分基本相同, 但

收稿 2006-01-09 修定 2006-05-15

资助 国家“十五”科技攻关项目(2005BA517A08)和辽宁省科技基金(20031013)。

*通讯作者(E-mail: caochengyou@163.com, Tel: 024-83687284)。

不含有NAA, 而含有 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA。硝酸银处理浓度有 1 、 5 、 10 、 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 以不加硝酸银为对照。每组 18 瓶, 每瓶接种 3 块愈伤组织。芽分化率=每组分化出芽的愈伤组织块数/每组愈伤组织总块数 $\times 100\%$ 。培养条件同上。

不同植物生长调节剂和硝酸银均用过滤灭菌。脯氨酸和丙二醛含量分别采用酸性茚三酮法和硫代巴比妥酸法测定(李合生等 2000)。测定均重复 3 次, 结果取平均值 \pm 标准偏差。

实验结果

1 硝酸银对烟草愈伤组织形成的影响

烟草叶片接种 7 d 后开始出现愈伤组织。从图 1 可见, 随着培养基中硝酸银浓度的增加, 烟草愈伤组织形成率均呈明显下降趋势, 愈伤组织的形成延迟。与未做处理的相比, 硝酸银浓度高于 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 愈伤组织的形成明显减少。在硝酸银浓度为 30 和 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 仅有部分叶片边缘长出一些白色的愈伤组织, 且基本上不再膨大, 但是所有叶片仍保持绿色而不褐化或枯萎。

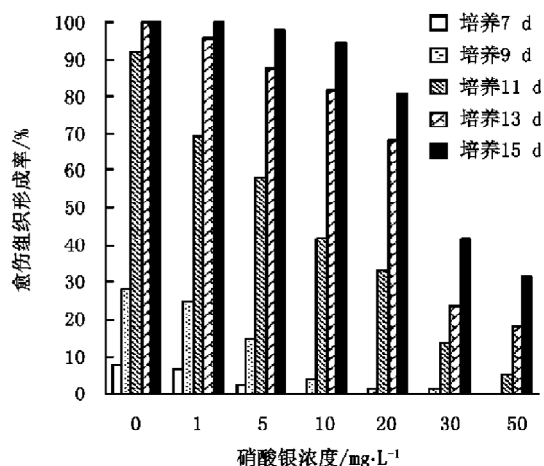


图1 硝酸银对烟草愈伤组织形成的影响

Fig. 1 Effect of silver nitrate on callus formation of tobacco

2 硝酸银对烟草芽再生的影响

愈伤组织接种于芽再生培养基 3 d 后, 出现再生芽。由图 2 可见, 随着培养基中硝酸银浓度增加, 烟草芽分化率均呈先增加后减小的趋势。添加 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硝酸银对芽再生的促进作用最明显,

第 9 天芽分化率达到最大 88.9%。所有再生苗均未出现玻璃化现象。

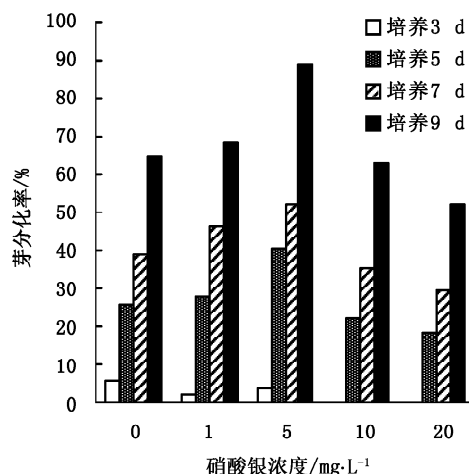


图2 硝酸银对烟草芽再生的影响

Fig. 2 Effect of silver nitrate on bud regeneration of tobacco

3 硝酸银对烟草愈伤组织与再生芽中脯氨酸和丙二醛含量的影响

由图 3 和图 4 可知, 随着培养基中硝酸银浓度的增加, 烟草的愈伤组织与再生芽中脯氨酸和丙二醛的含量变化均呈现不同程度的增加趋势, 但是再生芽中脯氨酸和丙二醛的含量增加幅度均明显高于愈伤组织。与其它处理相比, 硝酸银浓度在 10 和 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 愈伤组织与再生芽中脯氨酸和丙二醛的含量显著增加 ($P < 0.05$)。

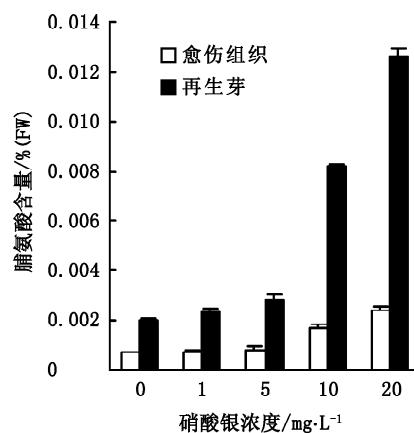


图3 硝酸银对烟草中脯氨酸含量的影响

Fig. 3 Effect of silver nitrate on proline content of tobacco

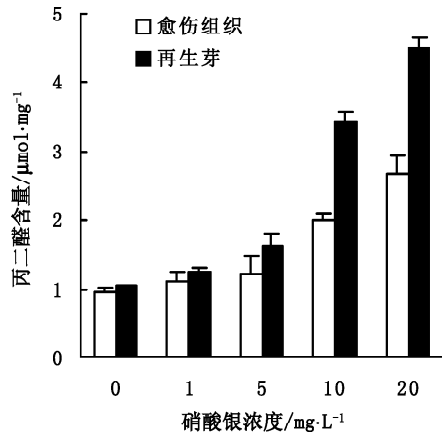


图4 硝酸银对烟草中丙二醛含量的影响
Fig. 4 Effect of silver nitrate on malondialdehyde content of tobacco

讨 论

在植物离体培养中, 植物细胞会产生乙烯并逐渐累积。许多报道表明, 乙烯抑制植物器官发生和体细胞胚胎发生, 而 Ag^+ 可能通过竞争性结合于细胞膜上的乙烯受体蛋白而抑制乙烯的活性, 其作用主要表现为抑制愈伤组织的形成, 增加外植体产生不定芽的数目和提高植株再生频率, 这在多种植物离体培养中已得到证实(张鹏等 1997; Eapen 和 George 1997; 周敏和庄东红 2002; Nail 和 Chand 2003; Ozden-Tokatli 等 2005)。本文结果表明, 添加 $1\sim 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硝酸银能提高芽分化率, 尤以加入 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硝酸银对芽再生的促进作用最明显, 但是 $10\sim 50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硝酸银则明显抑制愈伤组织的形成和芽再生, 这可能是过高浓度的硝酸银对植物有胁迫作用和产生不同程度的毒害作用所致。

脯氨酸和丙二醛的含量常用作抗逆性生理指标。在逆境条件下, 植物体内脯氨酸含量增加。重金属胁迫会引起植物体内的水分失衡, 因而植物处于缺水状态, 并常呈现出脯氨酸含量的增加(Sinha 和 Gupta 2005)。有报道指出, 随着 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 处理时间的延长和处理浓度的增加, 青菜叶片中游离脯氨酸含量明显增加, 其中游离脯氨酸含量增加的时间比细胞膜透性增加明显超前(任安芝等 2000)。Sharma 等(1998)报道, 金属诱

导的脯氨酸积累可能与渗透调节和抗脱水的酶保护有关。在逆境条件下, 植物常发生膜脂过氧化作用, 丙二醛是其最终产物之一, 其含量常用作判断膜脂过氧化程度的指标。已有报道指出, 随着铜胁迫程度的加重, 辣椒体内的丙二醛含量逐渐升高, 表明不同浓度铜处理的叶片膜系统受到不同程度的过氧化损伤(刘景春等 2003)。本文结果表明, $1\sim 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硝酸银对烟草愈伤组织和再生芽中的脯氨酸和丙二醛含量影响不明显, 但是 $10\sim 20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硝酸银处理的愈伤组织与再生芽中脯氨酸和丙二醛含量均显著增加($P < 0.05$), 表明脯氨酸和丙二醛含量变化可在一定程度上反映 Ag^+ 对植物的胁迫程度, 也反映二者在离体培养的烟草抗银胁迫中有协同效应。

参考文献

- 李合生, 孙群, 赵世杰, 章文华(2000). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 258~261
- 刘金华, 王丕武, 武丽敏, 于彦春, 张君, 郝文媛, 姚丹(2003). 脯氨酸、硝酸银对农杆菌转化大豆的影响. 大豆科学, 22 (1): 36~39
- 刘景春, 李裕红, 晋宏(2003). 铜污染对辣椒产量、铜积累及叶片膜保护酶活性的影响. 福建农业学报, 18 (4): 254~257
- 任安芝, 高玉葆, 刘爽(2000). 铬、镉、铅胁迫对青菜叶片几种生理生化指标的影响. 应用与环境生态学报, 6 (2): 112~116
- 张鹏, 傅爱根, 王爱国(1997). 硝酸银在植物离体培养中的作用及可能的机制. 植物生理学通讯, 33 (5): 376~379
- 周敏, 庄东红(2002). 谷氨酰胺和硝酸银对花生幼叶芽再生的促进作用. 植物生理学通讯, 38 (3): 240~241
- Eapen S, George L (1997). Plant regeneration from peduncle segments of oil seed *Brassica* species: influence of silver nitrate and silver thiosulfate. *Plant Cell Tiss Org*, 51: 229~232
- Nail SK, Chand PK (2003). Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine promote *in vitro* adventitious shoot regeneration of pomegranate (*Punica granatum* L.). *J Plant Physiol*, 160: 423~430
- Ozden-Tokatli Y, Ozudogru EA, Akcin A (2005). *In vitro* response of pistachionodal explants to silver nitrate. *Sci Hortic*, 106: 415~426
- Sharma SS, Schat H, Vooijs R (1998). *In vitro* alleviation of heavy metals-induced enzyme inhibition by proline. *Phytochemistry*, 49 (6): 1531~1535
- Sinha S, Gupta AK (2005). Translocation of metals from fly ash amended soil in the plant of *Sesbania cannabina* L. Ritz: effect on antioxidants. *Chemosphere*, 61: 1204~1214