

白花泡桐不定根发生过程中内源激素和 RNA 的变化

秦新民 梁倩华

(广西师范大学生物系, 桂林 541004)

摘要 白花泡桐 (*Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl.) 成年型和幼年型茎切段体外培养时不定根发生过程中内源 IAA、CTK 和 ABA 含量测定表明: 幼年型材料中内源 IAA 和 CTK 的含量在诱导的第 2 天同时达到高峰, 而成年型材料中 IAA 和 CTK 含量的高峰则在第 4 天出现。两种类型切段根原基出现的时间都与其内源 IAA 和 CTK 的高峰一致。幼年型材料的内源 ABA 含量在第 4 天达到高峰, 随后迅速下降。成年型材料中内源 ABA 则逐步下降。成年型和幼年型材料中 RNA 的变化相同, 在诱导的第 2 天稍有下降, 随后显著增加。结果显示, 不定根的发生与其内源激素和 RNA 的变化密切相关。

关键词 白花泡桐; 不定根; 内源激素; 核糖核酸

CHANGES IN ENDOGENOUS PHYTOHORMONE AND RNA IN *PAULOWNIA FORTUNEI* (SEEM.) HEMSL. DURING THE DEVELOPMENT OF ADVENTITIOUS ROOT

Qin Xinmin Liang Qianhua

(Department of Biology, Guangxi Normal University, Guilin 541004)

Abstract The changes in contents of endogenous IAA, CTK, ABA and RNA in the *in vitro* cultural cutting stem excised from mature and juvenile plant of tube plantlet of *Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl. were analysed during the development of adventitious root. The endogenous hormones were measured by HPLC. The results showed that the contents of endogenous IAA and CTK in the stem cutting from plantlet (juvenile state) reached their peaks on the second day of culture, whereas the peaks of endogenous IAA and CTK in stem cutting from mature plant (mature state) appeared on the fourth day. From the stem paraffin sections, it was observed that the emergence time of root primordia was the same as that of endogenous IAA and CTK peaks in two states of cultural materials. However, the variation in endogenous ABA content was different between juvenile and mature states. During the rooting period, the level of RNA in both juvenile and mature states of stem cutting slightly decreased on the second day of culture, and then increased markedly. The origin of root primordia come from some peripheral cells of vascular cylinder, and some cells between vascular bundles as well as some pith cells recovering cell division. But the emergence of

国家自然科学基金资助项目

1995-01-24 收稿; 1995-10-08 修回

root primordia in mature stem cutting was 2 days later than that in juvenile cutting of plantlets, and the number of adventitious root in the former was less than that in the latter.

key words *Paulownia fortunei*; Adventitious root; Endogenous hormones; Ribonucleic acid

在植物组织培养中, 幼年型木本植物生根容易, 而成年型木本植物往往比较困难。不定根的发生受多种内外因素的影响, 而内源或外源激素可能在根原基形成中起关键作用^[1,2]。目前, 关于植物组织培养中不定根分化过程中内源激素水平变化的报道不多, 而且难以人为控制许多植物的脱分化和再分化^[3]。研究成年型与幼年型木本植物不定根发生过程中各种内源激素的含量及变化, 有助于加深对成年型木本植物发根难的机理的认识, 减少实验的随机性和提高成功率。本实验测定了白花泡桐 (*Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl.) 成年型和幼年型试管苗不定根诱导过程中内源 IAA、CTK、ABA 及 RNA 含量的变化, 观察了两者不定根发生的时间、数量和部位, 分析了它们之间的差异, 为其它木本植物不定根的诱导提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料及其培养

成年型材料取已结果的成年树上刚萌发的嫩芽, 去叶, 流水冲洗后用 70% 乙醇擦拭, 再用 0.1% HgCl_2 消毒 10min。无菌水冲洗 4 次后, 将材料切成 0.5-1cm 长的带腋芽茎段, 接种于 $\text{MS} + \text{BA}$ 4mg L^{-1} 的培养基上诱导腋芽丛生。继代培养基与上相同。当丛生芽长至 3-4cm 高时, 剪成单株转至 $\text{MS} + \text{IBA}$ 1.5mg L^{-1} 培养基上诱导生根。

幼年型材料在同株树上采果实, 用 0.1% HgCl_2 消毒后, 无菌水冲洗 4 次, 于超净台上剥取种子, 播于 MS_0 培养基上。待无菌苗长至 3-4cm 高时, 切取带腋芽的茎段为外植体, 丛生芽和不定根的诱导培养基及培养方法同成年型材料。

1.2 石蜡切片

从 0 天开始至不定根出现, 每天取样用 FAA 固定。常规石蜡切片, 厚度为 $10\mu\text{m}$, 番红-固绿染色。

1.3 内源激素的测定

幼年型材料分别取根诱导 0、2、4 和 6 天的试管苗下端 1cm 左右的茎段。成年型材料以根诱导 0、2、4、6 和 8 天的试管苗下端 1cm 左右的茎段为测定材料。内源 IAA、CTK 和 ABA 的分离及提取按丁静等^[4]的方法, 日本岛津 LC-6A 高效液相色谱仪测定, 外标法定量。

1.4 RNA 的测定

取材部位及方法与内源激素测定相同。提取主要参考 Cherry^[5]的方法。用冷甲醇匀浆、离心, 沉淀依次用过氯酸、冷乙醇和醇-醚混合液 (2:1 v/v) 洗涤、离心。沉淀用 KOH 水解、离心, 上清液为 RNA。RNA 的含量用苔黑酚法测定。

2 结果和讨论

2.1 根原基的发生

根原基的发生部位在成年型和幼年型试管苗中基本相同, 主要由部分维管柱的周缘细胞恢复分裂而形成根原基(图版 I: 4)。也可由两个维管束之间的细胞和靠近木质部的部分髓细胞恢复分裂而形成(图版 I: 5,6)。但成年型试管苗的发根能力比幼年型材料差, 前者发根率为 88.00%, 后者为 98.48%。成年型材料发根数为每株 3.63 条, 幼年型的为每株 10.83 条。幼年型试管苗诱导生根 48h 可见根原基形成, 6d 即出现不定根(图版 I: 1-3)。而成年型材料在诱导生根 96h 才见根原基, 8d 时才出现不定根(图版 I: 7,8)。

2.2 不定根发生过程中内源激素的变化

2.2.1 内源 IAA 含量的变化

幼年型试管苗在外源 IBA 的诱导下, 其内源 IAA 水平迅速上升。从 0 天材料中的 $102.53 \mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$ 增加到根原基出现的第 2 天的 $430.00 \mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$, 随后下降(图 1)。成年型试管苗在诱导前期内源 IAA 上升较缓慢, 至第 4 天才达到高峰, 然后下降(图 2)。两种材料内源 IAA 含量的高峰出现时间与根原基出现相一致, 表明根原基的形成阶段需要有较高浓度的内源 IAA。随后内源 IAA 下降, 反映了根原基的形成和伸长对内源 IAA 的需求量的不同, 这与 Meldney 等^[6]在番茄插枝发根后期观察到内源 IAA 水平下降的结果相同。

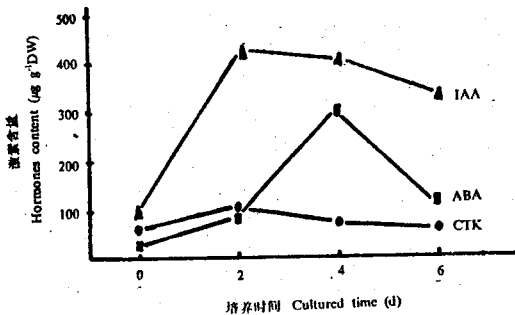


图 1 幼年型白花泡桐茎切段的不定根分化过程中内源激素的变化

Fig. 1 Changes in contents of endogenous hormones during adventitious root formation in stem cutting from juvenile *P. fortunei*

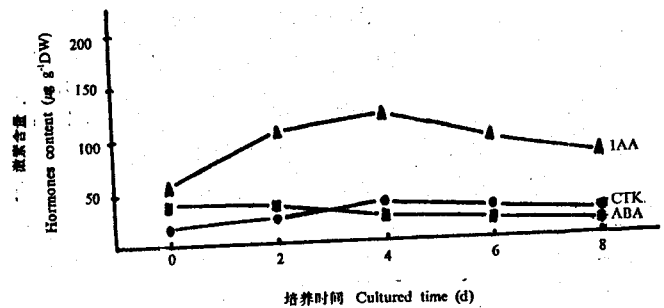


图 2 成年型白花泡桐茎切段的不定根分化过程中内源激素的变化

Fig. 2 Changes in contents of endogenous hormones during adventitious root formation in stem cutting from mature *P. fortunei*

2.2.2 内源 CTK 含量的变化

幼年型试管苗中的 CTK 水平在诱导的第 2 天出现一个高峰($99.39 \mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$) (图 1), 成年型中的内源 CTK 高峰则在第 4 天出现($34.34 \mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$) (图 2)。Skoog 等^[7]在 50 年代就提出根、芽的分化受生长素和激动素比例所调节的观点。在白花泡桐不定根分化过程中, 幼年型和成年型试管苗中 CTK 高峰的出现时间与内源 IAA 相同, 表明内源 CTK 参与了根原基的分化过

程。在外源 IBA 的诱导下, 细胞内有关基因被激活, CTK 合成加强、含量增加, 与内源 IAA 达到某种平衡, 从而诱发根原基的分化。这也可能是通常在诱导培养物生根时一般不需添加细胞分裂素的原因之一。

2.2.3 内源 ABA 含量的变化

幼年型试管苗中的内源 ABA 在诱导前期含量迅速上升, 到第 4 天达到高峰 ($305.45 \mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$), 比 0 天材料 ($35.18 \mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$) 增加 7.68 倍, 随后迅速下降 (图 1)。成年型材料中内源 ABA 在整个不定根诱导过程中则逐步下降, 从 0 天的 $41.66 \mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$ 降至第 8 天不定根出现时的 $20.17 \mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$ (图 2)。陆玲等^[9]报道在黄瓜子叶和石刁柏茎生根时内源 ABA 升高, 并认为 ABA 可以拮抗内源赤霉素而促进材料生根。白花泡桐幼年型试管苗在诱导生根前期内源 ABA 迅速增加, 与上述报道基本一致。至于成年型试管苗中内源 ABA 水平在生根诱导过程中逐步下降的现象, 与其生根的关系尚不清楚。

2.3 不定根发生过程中 RNA 的变化

RNA 含量的变化在幼年型和成年型试管苗中基本相同。在诱导的第 2 天, RNA 水平下降, 随后逐步上升。但两者的增加量相差较大, 幼年型材料从第 2 天的 $5.06 \text{mg g}^{-1}\text{DW}$ 到第 6 天的 $8.01 \text{mg g}^{-1}\text{DW}$, 增加了 58.3%。而成年型材料从第 2 天 ($2.85 \text{mg g}^{-1}\text{DW}$) 至不定根出现的第 8 天 ($3.96 \text{mg g}^{-1}\text{DW}$), 仅增加 39.6% (图 3)。RNA 的这种变化与 Jarvis 等^[9]报道绿豆茎段发根初期 RNA 下降, 随后显著上升的结果相同。根分化初期 RNA 含量的下降可能与根原基形成前需要抑制原有的 RNA 合成程序, 重新启动新的 RNA 合成程序有关^[9]。随后 RNA 的快速增加与根原基形成后, 细胞的快速增殖, 根原基的伸长和生长需要合成大量的蛋白质一致。

综上所述, 白花泡桐成年型与幼年型试管苗不定根发生过程中内源激素和 RNA 变化皆有异同之处。相同点在于: 根原基发生的部位相同; 内源 IAA 和 CTK 的上升相协调, 而且根原基的出现与各自内源 IAA 和 CTK 的高峰时间一致; RNA 变化趋势相同, 在诱导的 0-2 天内下降, 随后增加。差异点主要为: 成年型试管苗的内源激素绝对量比幼年型低得多; 成年型试管苗在外源 IBA 诱导下, 其内源 IAA 和 CTK 增加的量比幼年型材料少, 高峰出现的时间也比幼年型试管苗晚 2d, 这可能是成年型试管苗根原基发生晚及不定根数量少的主要原因; 内源 ABA 在成年型和幼年型试管苗中变化的图式也不同。

参考文献

- 1 Haissing B E. Metabolism during adventitious root primordium initiation and development. *Newzealand Forest Sci*, 1974, 4: 324-335
- 2 Hartman H T. *Plant propagation principles and practices*, 4th. USA: Prentice-Hall Inc, 1983, 246

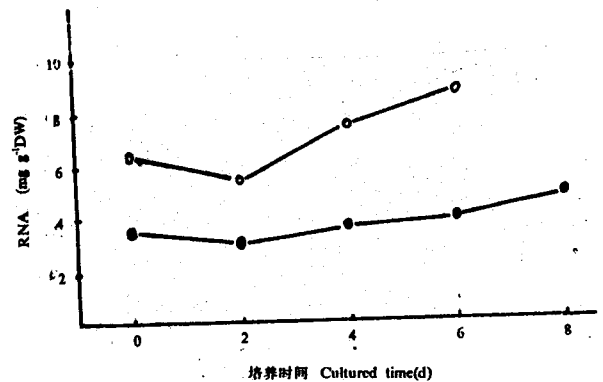


图 3 白花泡桐茎切段的不定根分化过程中 RNA 含量的变化

Fig. 3 Changes in RNA content during adventitious root formation of stem cutting in *P. fortunei*

- — 幼年型茎切段试管苗 Juvenile plant;
- — 成年型茎切段试管苗 Mature plant

- 3 崔徵. 植物激素与细胞分化及器官发生的关系. 细胞生物学杂志, 1983, 5(2):1-6
- 4 丁静, 沈镇德, 方亦雄等. 植物内源激素的提取分离及生物鉴定. 植物生理学通讯, 1979, 5(2):27-29
- 5 Cherry J H. Nuclear acid determination in storage tissue of higher plant. *Plant Physiol*, 1962, 37:670-678
- 6 Maldiney R et al. Endogenous levels of abscisic acid, indole-3-acetic acid, zeatin and zeatin-riboside during the course of adventitious root formation in cutting of *Craigella* and *Craigella* lateral suppressor tomatoes. *Physiol Plant*, 1986, 426-430
- 7 Skoog F, Miller C O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol*, 1957, 11:118-131
- 8 陆玲, 周莹. ABA 与 GA₃ 对黄瓜离体子叶和石刁柏生根的影响. 植物生理学报, 1992, 18(2):174-176
- 9 Jarvis B C, Shannon P R M, Yasmin S. Influence of IBA and cordycepin on root and RNA synthesis in stem cutting of *Phaseolus aureus* Roxb. *Plant & Cell Physiol*, 1983, 24:139-146

图版说明

1. 诱导 2d 的幼年型茎切段横切面, 示根原基的形成(箭头); ×150
2. 诱导 3d 的幼年型茎切段横切面, 示根原基的发育(箭头); ×100
3. 诱导 6d 的幼年型茎切段横切面, 示不定根出现(箭头); ×50
4. 诱导 4d 的成年型茎切段横切面, 示维管柱周缘的细胞恢复分裂形成根原基(箭头); ×100
5. 诱导 4d 的成年型茎切段横切面, 示维管束间的细胞恢复分裂形成根原基(箭头); ×100
6. 诱导 4d 的成年型茎切段横切面, 示髓细胞恢复分裂形成根原基(箭头); ×100
7. 诱导 7d 的成年型茎切段横切面, 示根原基发育(箭头); ×100
8. 诱导 8d 的成年型茎切段横切面, 示不定根出现(箭头). ×100

Explanation of Plate

1. Transverse section of juvenile stem cutting cultured for 2 days, showing the formation of root primordia (arrow); ×150
2. Transverse section of juvenile stem cutting cultured for 3 days, showing the development of root primordia (arrow); ×100
3. Transverse section of juvenile stem cutting cultured for 6 days, showing the emergence of adventitious root (arrow); ×50
4. Transverse section of mature stem cutting cultured for 4 days, showing the root primordia from the peripheral cell of vascular cylinder (arrow); ×100
5. Transverse section of mature stem cutting cultured for 4 days, showing the root primordia from the cells between vascular bundles (arrow); ×100
6. Transverse section of mature stem cutting cultured for 4 days, showing the root primordia from some pith cells which recovered cell division (arrow); ×100
7. Transverse section of mature stem cutting cultured for 7 days, showing the growth of root primordia (arrow); ×100
8. Transverse section of mature stem cutting cultured for 8 days, showing the emergence of adventitious root (arrow). ×100