

乙烯释放剂克服香石竹试管苗玻璃化的研究^{*}

张昆瑜

潘建国^{*}

侯任昭

(农学系)

(农业生物系)

摘要 用香石竹 (*Dianthus caryophyllus* L.) 为试验材料, 乙烯前体 ACC 和乙烯释放剂乙烯利为生长调节剂进行试验。试验结果表明, ACC 对克服香石竹试管苗玻璃化有显著效果, 并能一次成苗, 正常试管苗的诱导频率达 98%。从外部形态观察, 茎叶充实度好, 根系发达; 茎横切面显微观察, 茎内厚壁组织发达, 细胞排列紧密; 生理指标测定结果, 蛋白质、干物质、叶绿素含量均高于玻璃苗, 干物质为玻璃苗的 1.7 倍, 叶绿素为玻璃苗的 5.5 倍。乙烯利培养的试管苗生长情况与 ACC 培养的相近。添加 ACC、乙烯利的培养瓶中, 乙烯释放量明显高于对照, 说明乙烯对克服香石竹试管苗玻璃化有良好作用。

关键词 香石竹; 玻璃苗; ACC; 乙烯利

植物试管苗玻璃化在组织培养中普遍存在, 很多草本和木本植物的试管苗均有玻璃化现象。据报导, 玻璃苗因其体内含水量高, 干物质、叶绿素、木质素含量低, 角质层、栅栏组织等发育不全, 吸收与光合功能不全, 移栽难以成活。玻璃苗的出现成为试管苗生产的一大障碍^[1,2]。近年来, 国内外学者对植物试管苗玻璃化进行了研究, 以图弄清其形成原因及寻求有效的防止方法。据报导, 玻璃苗的形成与很多因素有关, 如培养基成分和水势等。目前多通过增加琼脂、蔗糖含量及增减某些元素的浓度来降低玻璃苗的比率^[1,2]。但任何一种方法均未能有效地克服玻璃苗的产生。我们认为, 玻璃苗的形成可能与生长调节剂密切相关。根据文献报导, 乙烯对玻璃苗形成的影响有二重性: 正常苗的内源乙烯促进木质化和导管分化; 逆境, 如水渍, 诱导的乙烯, 推测抑制生长素等从而诱导玻璃苗^[3]。但这种推测尚无试验根据。本试验选用玻璃化严重的香石竹为试验材料, 乙烯前体 ACC 和乙烯释放剂乙烯利为生长调节剂进行试验, 以求检验乙烯对香石竹试管苗玻璃化的影响及利用乙烯释放剂克服香石竹试管苗玻璃化的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 香石竹, 别名: 康乃馨; 麝香石竹。

1.1.2 供试生长调节剂 ACC ($\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} \\ | \\ \text{H}_2\text{C} \end{array} > \text{C} < \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ | \\ \text{COOH} \end{array}$ 1-氨基环丙烷-1-羧酸, 结晶体, 由

^{*} 1990 届硕士研究生, 现在广州市土产茶叶公司工作。

1990 年 7 月 14 日收稿

暨南大学化学系有机化学试验室合成); 乙烯利($\text{CL}-\text{C}(\text{H})_2-\text{C}(\text{H})_2-\text{P}(\text{OH})_2$, 2-氯乙基膦酸, 缩写: CEPA, 由北京农药二厂生产, 纯度 40%)。

1.2 试验步骤和方法

1.2.1 不同生长调节剂的对比试验

1.2.1.1 ACC 与几种组织培养中常用生长调节剂的对比试验 设 9 个处理, 以 MS 为基本培养基, 分别添加各种生长调节剂: (1) $\text{ACC}_1\text{mg/L}$ (单位下同); (2) $\text{BA}_2 + \text{NAA}_{0.1}$; (3) $\text{BA}_1 + \text{NAA}_{0.1}$; (4) $\text{BA}_{0.1} + \text{NAA}_{0.1}$; (5) $\text{KT}_2 + \text{NAA}_{0.1}$; (6) $\text{KT}_1 + \text{NAA}_{0.1}$; (7) $\text{KT}_{0.1} + \text{NAA}_{0.1}$; (8) NAA_1 ; (9) $\text{NAA}_{0.1}$ 。琼脂 0.75%, 蔗糖 3%, pH6。取正常试管苗一节带叶茎段为试验材料, 每处理 20 瓶, 每瓶 5 个材料, 重复 3 次。接种后置于温度 $25 \pm 3^\circ\text{C}$ 、光照强度 2 000 lx, 每天光照 8 h 的培养室中。

1.2.1.2 乙烯利与 ACC 的对比试验 设 2 个处理: (1) $\text{MS} + \text{CEPA}_2$; (2) $\text{MS} + \text{ACC}_2$ 。琼脂、蔗糖浓度和 pH 值与上同, 试验材料、方法和培养条件亦与上同。

1.2.2 乙烯释放量的测定 取 4 周龄正常试管苗第 3 节带叶茎段, 培养于分别添加 2mg/L ACC、CEPA、BA 的 MS 培养基中, 并设 MS 基本培养基为对照, 每处理 4 个重复。培养瓶为带胶盖 50 ml 三角瓶, 培养基容积为 20 ml, 每瓶 6 个材料, 材料容积为 5 ml, 每瓶空间容积为 25 ml。接种后第 2、3、4、5、6、7、8、10、11、14、16 d 抽取培养瓶中气体, 每次每瓶抽气 1 ml, 然后注回 1 ml 无菌空气, 再用胶纸密封瓶盖, 抽出的气体用排水法保存于饱和盐水中, 然后用 HITACHI663-30 型气相色谱仪测定乙烯释放量。

1.2.3 正常苗与玻璃苗茎横切面结构观察 取 ACC_1 培养的正常苗和 BA_2 培养的玻璃苗第二节茎段横切, 在 40 倍光学显微镜下观察其内部结构, 并在 10 倍光学显微镜下照相。

1.2.4 正常苗与玻璃苗的生理生化指标测定 取 ACC_1 培养的正常苗和 BA_2 培养的玻璃苗地上部进行各项指标的测定: 含水量、干物质含量用重量法, 叶绿素含量用分光光度法, 蛋白质含量用凯氏定氮法 (KJEL-AUTO 定氮仪)。

2 试验结果

2.1 各种生长调节剂对香石竹试管苗生长的影响

2.1.1 ACC 与几种组织培养中常用生长调节剂的对比 据对 4 周龄试管苗观察结果 (表 1), ACC 与其他生长调节剂培养的试管苗生长情况有明显差异。添加 ACC_1 的处理 (1), 98% 为生长良好的正常苗, 苗色浓绿, 茎叶健壮、充实, 根系发达, 茎基无愈伤组织, 根、茎组织紧密相连 (图版 1, 2, 3); BA 浓度较高的处理 (2), (3), 全是芽丛状玻璃苗, 苗色淡绿, 叶厚大、卷曲、质极脆, 茎粗短, 基部愈伤组织明显膨大, 无根 (图版 4); BA 浓度较低的处理 (4), 玻璃化程度较轻, 多为无根半玻璃苗, 即使产生少量根, 也因茎基愈伤组织的阻隔以致根茎不能相连; 含 KT 的处理 (5), (6), (7), 玻璃化程度较同浓度的 BA 轻; 含 NAA 的处理 (8), (9), 根多而长, 但地上部细长纤弱, 充实度也较差, 茎基亦有愈伤组织。

表1 ACC与几种组织培养中常用生长调节剂培养的试管苗生长情况对比*

处理	项目	苗 质	株高 (cm)	侧芽数 (条)	茎基愈伤	根数 (条)
(1)	ACC ₁	正常苗	4.8	1.2	无	14.4
(2)	BA ₂ +NAA _{0.1}	玻璃苗	2.8	16.3	大	0
(3)	BA ₁ +NAA _{0.1}	玻璃苗	3.0	15.2	大	0
(4)	BA _{0.1} +NAA _{0.1}	半玻璃苗	3.5	4.2	小	1.6
(5)	KT ₂ +NAA _{0.1}	半玻璃苗	3.8	3.3	中	0
(6)	KT ₁ +NAA _{0.1}	半玻璃苗	4.1	2.5	中	0.5
(7)	KT _{0.1} +NAA _{0.1}	半玻璃苗	4.3	2.1	小	1.8
(8)	NAA ₁	半玻璃苗	5.2	1.2	中	14.8
(9)	NAA _{0.1}	半玻璃苗	5.5	1.3	小	11.5

*表中各数据为300株4周龄试管苗平均值,愈伤组织大小:大为1 cm³±;中为0.5 cm³±;小为0.3 cm³以下。

2.1.2 乙烯利与ACC的对比 据初步试验结果看,乙烯利培养的试管苗地上部生长与ACC培养的相近,但根较少较长。

2.2 乙烯释放量的测定结果

试验结果(图1),MS+CEPA₂的乙烯释放量最高,平均值为对照的4.7倍,MS+ACC₂次之,平均值为对照的2.8倍,MS+BA₂的平均值与对照相同。MS+ACC₂的乙烯释放量比对照高,说明乙烯前体ACC已被植物吸收并在体内转化为乙烯,MS+CEPA₂的乙烯释放量最高则是因为其瓶中既有植物体释放的乙烯,也有培养基中乙烯利释放的乙烯。再者,各处理乙烯释放量均出现2个高峰,2个峰均以MS+CEPA₂为最高,MS+ACC₂次之,MS+BA₂则比对照稍低,第一个高峰出现在芽开始明显增长前,第二个高峰出现在根开始明显增长前。

2.3 正常苗与玻璃苗茎横切面结构的差异

显微观察结果(图版5,6),发现正常苗茎皮层与韧皮部间有一轮完整而排列紧密的厚壁组织,其细胞壁明显加厚;玻璃苗在此部位只有极少数壁加厚不明显的细胞零星分布。另发现玻璃苗茎皮层的薄壁细胞明显比充实苗大,且排列疏松。

2.4 正常苗与玻璃苗生理生化指标的差异

测定结果(表2),玻璃苗含水量高,干物质、蛋白质含量低,特别是叶绿素含量甚低;正常苗则含水量低,干物质、蛋白质含量高,特别是叶绿素含量明显高于玻璃

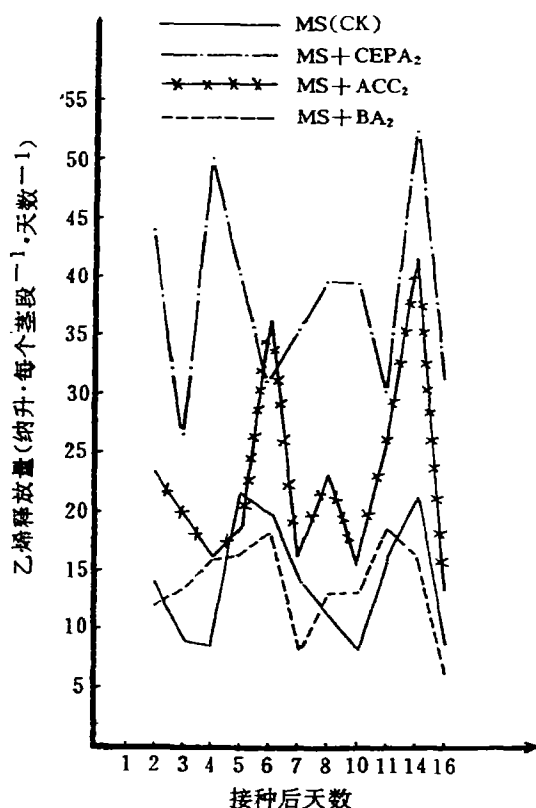


图1 添加不同生长调节剂培养瓶中的乙烯释放量

苗。这与前人的报导是一致的。

表2 正常苗与玻璃苗生理生化指标比较

项目 材料	含水量 (%)	干物质含量 (%)	蛋白质含量 (%)	叶绿素含量 (mg/g 鲜叶)
玻璃苗	93.50	6.50	31.58	0.15
正常苗	89.20	10.80	34.07	0.83

3 讨论

3.1 生长调节剂是影响香石竹试管苗玻璃化的重要因素,乙烯释放剂作生长调节剂是克服香石竹试管苗玻璃化的有效途径。试验结果表明:细胞分裂素作生长调节剂,香石竹试管苗易出现玻璃化现象,在一定浓度范围内,细胞分裂素的分化力越强,浓度越高,玻璃化程度越严重。我们认为,这主要是由于细胞分裂素使香石竹细胞分裂过快,侧芽分化过盛,影响了植物体内干物质积累及组织、器官发育。ACC和乙烯利作生长调节剂,在相同培养条件下,能产生根茎叶发育良好的正常苗,证明乙烯对香石竹试管苗的干物质积累及组织、器官的发育有利。可见,生长调节剂与苗质有密切关系,用乙烯释放剂作生长调节剂,再加上在培养过程中,按照香石竹的生理特性给予适宜的条件,如适当增加光强、降低温度及增减培养基中的某些成分等,将可有效地克服香石竹试管苗的玻璃化现象。

3.2 乙烯克服试管苗玻璃化的机理是复杂的。本试验结果,添加ACC和CEPA的培养瓶中乙烯释放量明显高于对照,且乙烯释放量的2个高峰分别出现在芽和根开始明显增长前,说明乙烯对芽和根的形成和发育有促进作用。Miller等(1984)报导乙烯前体ACC和乙烯利可促进莴苣愈伤组织的木质部分化^[4]。我们发现在烟草愈伤组织分化时,ACC可促进过氧化物酶和苯丙氨酸裂解酶的活性,加强磷酸戊糖途径和抗氰交替途径,前两个酶是促进木质素合成和细胞壁形成的关键酶,这可解释ACC培养的正常苗厚壁组织较玻璃苗发达的现象;磷酸戊糖途径与叶绿素前体的合成有关,这可解释ACC培养的正常苗叶绿素含量高于玻璃苗5.5倍的现象;抗氰交替途径则降低了ATP的合成,从而抑制了过度的主动吸水,提高了蛋白质和干物质的含量,这可解释ACC培养的正常苗蛋白质和干物质含量高于玻璃苗的现象。这些可作为乙烯抑制试管苗玻璃化的机理的初步解释。

某些报导认为,玻璃苗比正常苗释放更多乙烯^[3],表面看来似乎同本试验结果相矛盾,其实不然,乙烯被认为是植物体进行适应逆境的生理信号,玻璃化的基本原因是培养基水势过高,培养器皿内空气湿度过大,导致试管苗处于水渍逆境中,因而产生较多的应逆乙烯,因此,这一现象是玻璃化的后果,而不是玻璃化的原因。

致谢 本文承蒙肖敬平教授指导完成,韩惠珍副教授、张桂权讲师帮助制片拍片,暨南大学化学系郭书好副教授提供ACC,深表谢意。

参 考 文 献

- 1 卜学贤, 陈维伦. 试管植物的玻璃化现象. 植物生理学通讯, 1987 (5): 13~18
- 2 刘思颖, 王泰哲. 丝石竹玻璃苗的研究. 园艺学报, 1988 (4): 272~276
- 3 Gaspar, T. C. Kevers, P. Debergh, L. Macne, M. Pagues and P. Boxus, Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects, in *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol. 1, General Principles and Biotechnology, 1987, 152~166. ed. J. M. Bonga and D. J. Durzan
- 4 Miller A. R., W. L. Pengelly and L. W. Robert. Induction of xylem differentiation in *Lactuca* by ethylene, *Plant Physiol.* 1984, 75, 1165~1166

STUDIES ON THE PREVENTION OF VITRIFICATION
OF IN VITRO CULTURE OF CARNATION BY USING ETHYLENE RELEASERS

Zhang Kunyu

Pan Jianguo

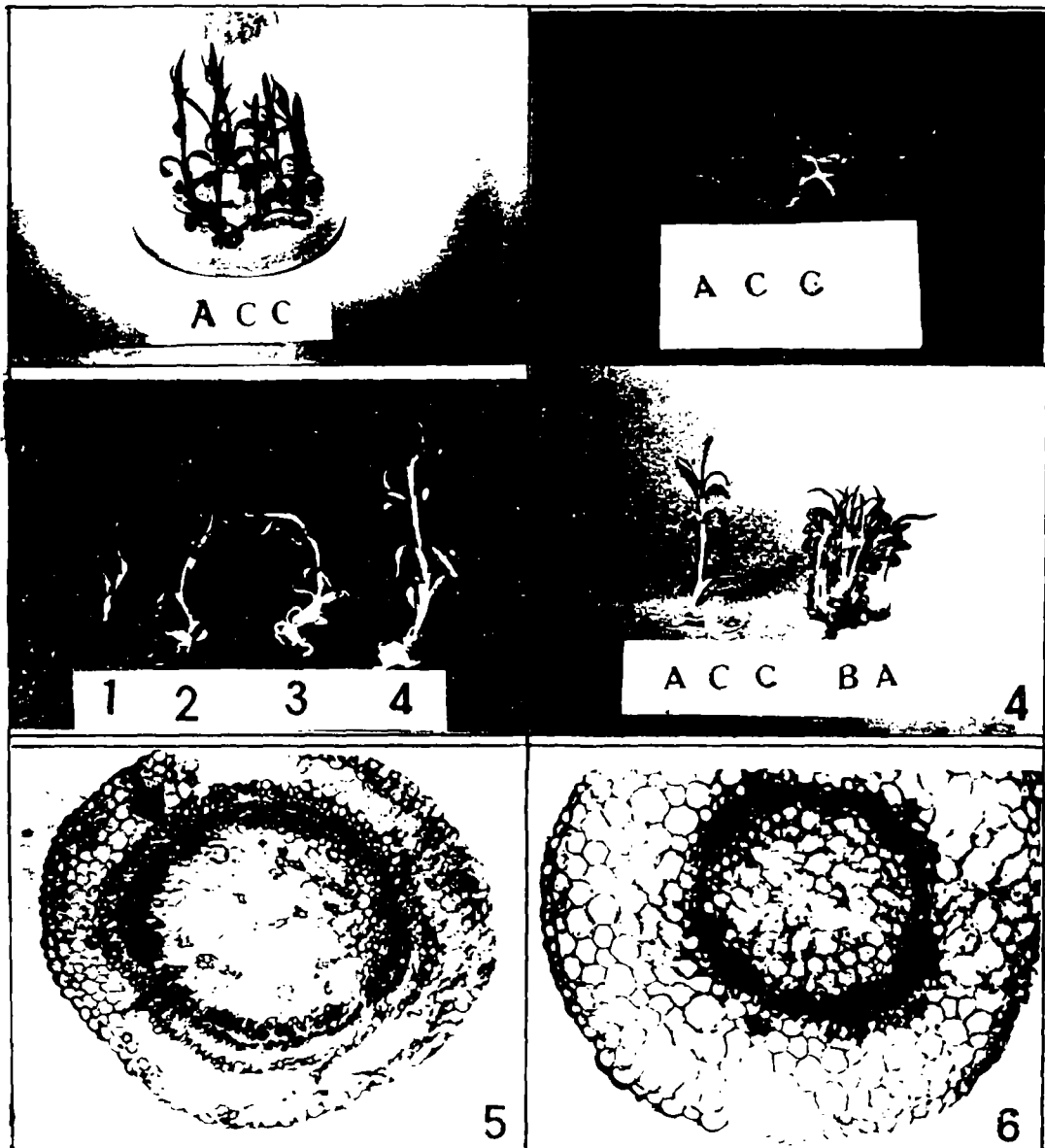
Hou Renzhao

(Department of Agronomy)

(Department of Agrobiolgy)

Abstract Experiments were carried out with carnation by using ethylene releasers as growth regulators supplemented in the media. Results showed that ACC, the immediate precursor of ethylene, exhibited significant effect on preventing the vitrification of in vitro culture of carnation, and obtaining full-grown plantlets without subculture. The induction frequency of normal plantlets was 98%. A compact stem and leaf and good root system was observed in in vitro culture. Under microscopical examination, closely arranged cells and well developed sclerenchyma tissue were found in cross sections of the stem. Biochemical analysis revealed that the dry matter and chlorophyll contents were higher than those of vitrified ones by 1.7 and 5.5 times, respectively. The growth of plantlets induced by CEPA were similar to those by ACC. The quantity of ethylene released in the culture tubes where the media was supplemented with ACC or CEPA was found to be much higher than that in the control tubes, implying that ethylene had good effect on vitrification prevention.

Key words Carnation; Vitrified plantlets; ACC; Ethylene releasers



图版

- 1 ACC₁ 培养的香石竹试管苗地上部生长情况
- 2 ACC₁ 培养的香石竹试管苗根系生长情况
- 3 ACC₁ 培养的香石竹试管苗各时期生长情况 (左→右: 接种后 1 周、2 周、3 周、4 周)
- 4 ACC₁ 培养的正常苗与 BA₂ 培养的玻璃苗外部形态对比 (左: 正常苗, 右: 玻璃苗)
- 5 ACC₁ 培养的正常苗茎横切面结构 (10×, 箭头所指为厚壁组织)
- 6 BA₂ 培养的玻璃苗茎横切面结构 (10×)