

麝香石竹玻璃苗与正常苗的生理特性差异*

周菊华 陈秀玲 钟华鑫 梁海曼
(杭州大学生物系, 杭州 310028)

Q949.745.8

摘要 诱导麝香石竹茎段外植体产生不定芽的分化, 所得到的正常苗与玻璃苗的生理特性明显有差异。表现在玻璃苗的鲜重、干重、粗纤维和叶绿素含量与正常苗相比显著降低; 玻璃苗的可溶性糖含量增加38%, 而蔗糖含量下降63%, 束缚水含量显著增高, 自由水含量明显降低; 玻璃苗的淀粉酶总活性也明显升高, 碱性和中性区过氧化物酶同工酶活性显著提高而酸性区的同工酶活性有所下降。然而, 玻璃苗和正常苗形成时的芽分化频率以及伸长生长量之间无明显区别, 结果表明, 麝香石竹试管苗的玻璃化可能是在碳水化合物代谢、氮代谢和水分存在状况等发生生理异常的情况下在芽分化启动后的生长过程中发生的, 而不是在芽分化启动时已经决定的。

关键词 麝香石竹; 玻璃苗; 生理特性

PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTIC DIFFERENCES BETWEEN VITREOUS SHOOTS AND NORMAL SHOOTS OF CARNATION

Zhou Juhua, Chen Xiuling, Zhong Huaxin and Liang Haiman
(Department of Biology, Hangzhou University)

Abstract There were a series of physiological characteristic differences between vitreous shoots and normal shoots regenerated from the stem explants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Salmon Staealm). As compared with normal shoots, the fresh weight, dry weight, crude fibre and chlorophyll contents of vitreous shoots of carnation lowered obviously; the soluble sugar content of vitreous shoots increased by 38%, and sucrose content decreased by 63%; the bound water content of vitreous shoots heightened apparently, and the free water content lowered notably; the total amylase activity of vitreous shoots rose markedly, and the peroxidase isozyme activities in the basic and neutral regions ascended strikingly and those in the acidic region descended. However, there were not obvious differences of bud differentiation frequencies and shoot growth speeds in the forming of normal shoots and vitreous shoots. The results showed that the vitrification of carnation regenerated shoots occurred probably in their growth course after the starting of bud differentiation, not in the initiation of bud differentiation when they suffered the physiological disorder of carbohydrate metabolism, nitrogen metabolism, water content conditions and so on.

Key words: Carnation; vitreous shoots; physiological characteristics

* 浙江省自然科学基金资助项目。

试管苗玻璃化是一种影响植物离体无性繁殖的形态、生理异常现象。有关玻璃苗的形态结构特点已有不少报道^[3, 5, 10, 13], 例如玻璃苗的叶片变宽或狭窄、厚、半透明、褶皱的和/或卷曲的、易破碎, 缺乏功能性气孔器和栅栏组织, 茎细长或矮粗、肿胀状, 顶端分生组织原体原套结构异常等。就玻璃苗的生理特性也开展了一定的研究^[3, 4, 10, 12], 主要涉及玻璃苗的含水量状况、叶绿素含量、离子水平以及过氧化物酶、苯丙氨酸解氨酶等酶的活性的变化。然而, 这些研究所用的植物材料比较分散, 而且还有众多的性状没有涉及。为此, 本文以已有若干报告的麝香石竹为试验材料进行多方面的试管苗玻璃化时的生理特性分析, 以便进一步了解玻璃苗发生的原因以及为更有效地克服试管苗的玻璃化现象提供线索。

材料与 方法

一、试验材料

继代培养在 MSK (MS-1/2NH₄NO₃ + KNO₃) + KT1.0mg/l 培养基上的麝香石竹 (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Salmon Stasalm) 试管苗, 取其 1 cm 长的中部茎段 50 段作外植体, 接种在 MSK + KT 3.0mg/l + NAA 0.5mg/l 培养基上诱导不定芽的分化。培养条件同前文^[6]。

培养 15 天, 将诱导形成的试管苗分为正常苗和玻璃苗两类, 分别统计测定芽分化频率和苗高度, 并都进一步用于生理特性的分析。试验重复 3 次。

二、生理特性测定方法

1. 鲜重、干重和含水状况的测定: 正常苗和玻璃苗的鲜重直接称量法测定, 干重采用烘箱烘干法 (先 120℃ 15min, 后转入 60—80℃ 烘至恒重) 称量测定, 并计算得总含水量。

在 20℃ 下, 自由水含量使用 WZS-1 型阿贝氏折射仪测定浓蔗糖溶液夺取试管苗自由水后的浓度改变来确定。由总含水量减去自由水量得束缚水的含量。

2. 粗纤维含量的测定: 取试管苗, 同上述法烘干后用 1.25% 硫酸煮沸 0.5h, 过滤。残渣用热蒸馏水冲洗后, 再用 1.25% NaOH 煮沸 0.5h, 过滤于滤纸上, 蒸馏水和乙醇分别冲洗 3 次, 80℃ 烘至恒重。计算样品中的粗纤维含量。

3. 可溶性糖和蔗糖含量的测定: 用蒽酮比色法测定试管苗的可溶性糖含量。二硝基水杨酸法测定还原糖含量以及经 6N HCl 沸水浴水解、NaOH 中和处理后的总可溶性糖含量, 藉此计算样品中的蔗糖含量。

4. 叶绿素水平的测定: 分光光度法测定正常苗和玻璃苗的叶绿素 a、b 含量。

5. 淀粉酶和过氧化物酶的同工酶电泳: 取试管苗, 用 0.05M Tris—甘氨酸缓冲液提取酶液。电泳方法参照方国伟等^[1]。凝胶用 I₂—KI 试剂负染法显示淀粉酶同工酶带, 联苯胺—愈创木酚染色液显示过氧化物酶同工酶带。凝胶显色后立即绘图和分别用 560nm、580nm 扫描记录。

结果与 讨论

一、玻璃苗与正常苗的分化和生长的差异

当诱导麝香石竹茎段外植体产生不定芽时, 所形成的正常苗和玻璃苗的芽分化频率、及

其伸长生长之间没有明显的差异(图1)。这说明试管苗玻璃化发生时,其分化能力、伸长生长没有明显的改变。有可能,试管苗的玻璃化是在随后芽的生长过程中发生的,而不是在芽分化启动时已经决定的。

表1 正常苗和玻璃苗的粗纤维含量
Table 1 Crude fibre contents of normal shoots and vitreous shoots

粗纤维含量	正常苗	玻璃苗
Crude fibre content	Normal shoot	Vitreous shoot
毫克/克鲜重 mg/g-FW	43.96 ± 0.40	23.81 ± 3.58
毫克/克干重 mg/g-DW	549.63 ± 3.30	418.10 ± 51.26

表2 正常苗和玻璃苗的糖含量
Table 2 Sugar contents of normal shoots and vitreous shoots

	可溶性糖含量 Soluble sugar content (mg/g-FW)	蔗糖含量 Sucrose content (mg/g-FW)	蔗糖/可溶性糖 Sucrose/Soluble sugar
正常苗 Normal shoot	11.52 ± 0.80	7.60 ± 0.57	0.66
玻璃苗 Vitreous shoot	18.73 ± 0.19	2.81 ± 0.05	0.15

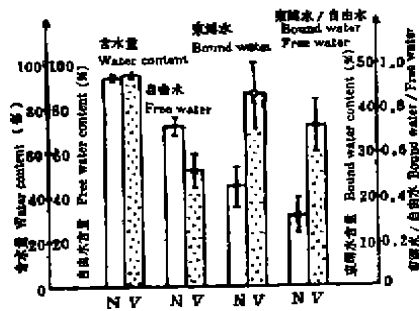
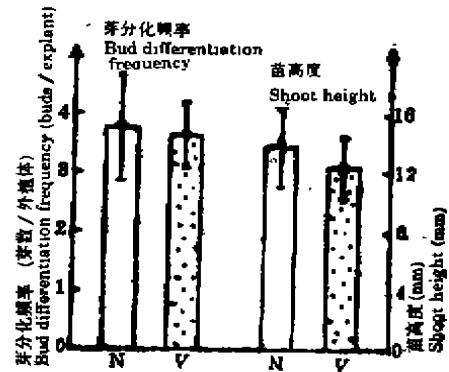


图3 正常苗和玻璃苗的含水状况差异
Fig. 3 Differences of water content conditions between normal shoots and vitreous shoots



N: 正常苗 V: 玻璃苗(下同)
N: Normal shoot V: Vitreous shoot (the same as follows)

图1 正常苗和玻璃苗的分化、生长差异
Fig. 1 Differentiation and growth differences between normal shoots and vitreous shoots

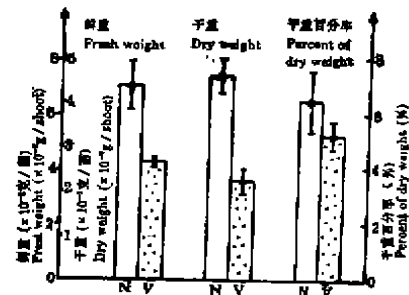


图2 正常苗和玻璃苗的鲜重、干重和干重百分率差异

Fig. 2 Fresh weight, dry weight and dry weight percent differences between normal shoots and vitreous shoots

二、鲜重和干重的差异

从图2可以看出,与正常试管苗相比较,玻璃苗的鲜重和干重明显降低,分别下降了约40%和52%;而干重百分率没有明显的降低。以上事实说明,玻璃苗的伸长生长虽没有发生显著的变化,但鲜重和干重的增长明显下降,这说明麝香石竹玻璃苗变得较为细长、纤弱。

三、粗纤维含量的差异

表1显示,不论以鲜重计还是以干重计,玻璃苗的粗纤维含量都比正常苗显著降低,表明玻璃苗的纤维素等合成过程受到阻抑。玻璃苗的粗纤维含量降低可能是玻璃苗植株的输导组织发育不全、肿胀状和易破碎的原因之一。

四、糖含量的差异

从表2可以看出,玻璃苗的可溶性糖含量比正常苗增加了38.50%,而蔗糖含量下降了63.03%,蔗糖占可溶性糖的比率也比正常苗明显降低。这说明玻璃苗的糖代谢发生障碍,降解加快,利用滞缓。

五、叶绿素水平的差异

由表3可知,玻璃苗的叶绿素水平比正常苗显著降低,叶绿素总量、a和b含量分别下降了63.62%,63.62%和63.64%,即叶绿素a与b的比例没有发生改变。这与前人报告^[3,10]的结果一致。通常叶绿素含量和蛋白质含量是正相关的,因此,玻璃苗的叶绿素水平的下降可能也反映了蛋白质含量的降低。Phan和Lettouze(1983)^[9]也指出玻璃苗的蛋白质含量显著降低。这表明玻璃苗的氮代谢可能也发生异常。

六、含水量状况的差异

从图3可以明显得知,与正常苗相比较,玻璃苗的总含水量没有明显的增高,但水分存在状况差异显著,即玻璃苗的自由水含量降低(约28%),而束缚水含量增加(约48%),表明玻璃苗的生理代谢水平可能下降。这一现象也可以是导致细胞肿胀、植株呈半透明状的原因之一。Kevers等(1984)^[10]也报告玻璃化植株的细胞过度含水,Kevers和Gaspar(1986)^[12]又报告玻璃化植株的细胞间隙增加,过多的水分分布在这细胞间隙。所以,玻璃苗的含水状况发生了明显的变化是可以肯定的。然而正常苗和玻璃苗的这种水分存在形式和分布状况的差异,是试管苗玻璃化的原因还

表3 正常苗和玻璃苗的叶绿素水平
Table 3 Chlorophyll levels of normal shoots and vitreous shoots

	叶绿素总量 Total content of chlorophyll ($\mu\text{g/g-FW}$)	叶绿素a含量 Content of chlorophyll a ($\mu\text{g/g-FW}$)	叶绿素b含量 Content of chlorophyll b ($\mu\text{g/g-FW}$)	叶绿素a/b Chlorophyll a/b
正常苗 Normal shoot	253.2	158.6	94.6	1.68
玻璃苗 Vitreous shoot	92.1	57.7	34.4	1.68

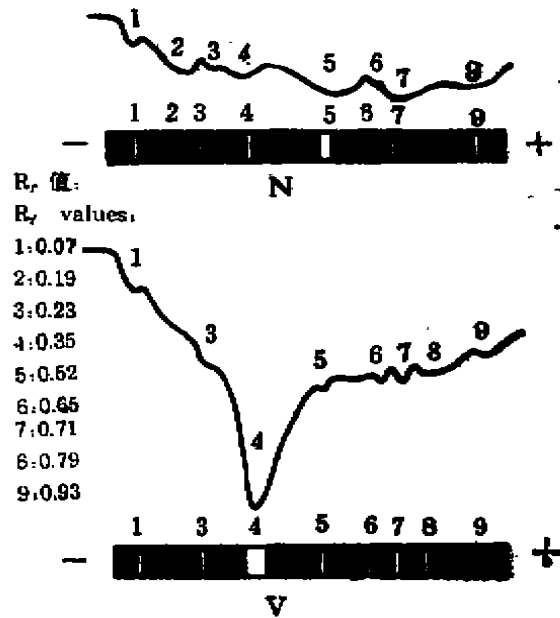


图4 正常苗和玻璃苗的淀粉酶同工酶谱
Fig. 4 Amylase isozyme patterns of normal shoots and vitreous shoots

是伴随的结果仍有待于深入研究。

七、淀粉酶和过氧化物酶的同工酶谱差异

玻璃苗的淀粉酶同工酶谱与正常苗的相比，酶带数目没有多大区别，但酶的总活性明显升高，特别表现在酶带“4”的活性特别强（图4）。这可能是玻璃苗的可溶性糖含量显著增加的原因，从而造成玻璃苗的束缚水含量增加、代谢降低，进一步可能引起玻璃苗的粗纤维含量、叶绿素水平、鲜重和干重发生下降。因此，碳水化合物代谢异常可能是麝香石竹玻璃苗产生的原因之一。

图5显示，正常苗和玻璃苗的过氧化物酶同工酶谱存在明显的差别。玻璃苗的碱性区多一条带“2”，酸性区缺少带“7”及中性区缺少带“5”，而碱性区酶带“4”和中性区酶带“6”的活性显著比正常苗要高。即麝香石竹玻璃苗碱性过氧化物酶同工酶加强、酸性过氧化物酶同工酶减弱，这与前人的报道^[3, 10]是一致的。联系到碱性过氧化物酶具有IAA氧化酶的功能^[8, 11]、并反映了内源IAA水平^[7]，故玻璃苗的碱性区酶带“2和4”活性的剧升可能反映了内源生长素水平的降低。此外，罗紫娟等（1986）^[2]指出外源供应BA会使中性过氧化物酶同工酶出现新带，因而玻璃苗的中性区酶带“6”活性的剧升可能反映了内源细胞分裂素水平的升高。这表明试管苗发生内源生长素水平下降和内源细胞分裂素水平上升时可能易于出现玻璃化。所以，过氧化物酶同工酶谱的改变及其所反映的内源生长素和细胞分裂素水平的变化，在试管苗玻璃化发生中的作用是值得深入研究的。

综合上述结果显示，麝香石竹茎段外植体试管苗的玻璃化可能是在碳水化合物代谢、氮代谢和水分存在状况等生理代谢出现失调而导致形态异常的情况下在芽分化启动后的生长过程中发生的，而不是在芽分化启动时已经决定的。

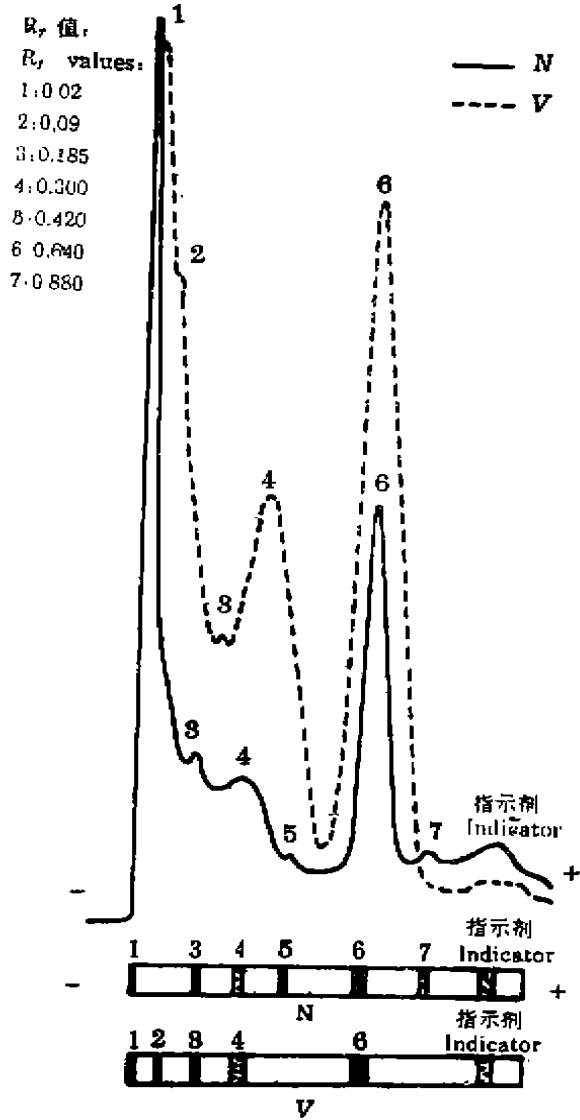


图5 正常苗和玻璃苗的过氧化物酶同工酶谱
Fig. 5 Peroxidase isozyme patterns of normal shoots and vitreous shoots

参 考 文 献

- [1] 方国伟、梁海曼, 1985: 低温预处理影响水稻花药培养效率的机理初探。《植物生理学报》, 11(4): 366—380。
- [2] 罗紫娟、陈立业、梁 庄, 1986: 甘蔗组织培养中 2, 4-D 对过氧化物酶同工酶的影响。《云南植物研究》, 8(1): 67—72。
- [3] 卜学贤、陈维伦, 1987: 试管植物的玻璃化现象。《植物生理学通讯》, (5): 13—18。
- [4] 刘思颖、王泰哲, 1988: 丝石竹玻璃苗的研究。《园艺学报》, 15(4): 272—276。
- [5] 郭在红、母锡金、陈维伦, 1989: 某些因素对玻璃苗形成的影响和玻璃苗在形态解剖上的特点。《植物学通报》, 6(8): 151—155。
- [6] 周菊华、林证明、梁海曼, 1990: 控制瑞香试管苗玻璃化的研究。《园艺学报》, 17(8): 229—232。
- [7] Thorpe, T. A., 1978: Physiological and biochemical aspects of organogenesis in vitro. In *Frontiers of Plant Tissue Culture* (Thorpe, T. A. ed.), pp. 49—58.
- [8] de Forchetti, S. M. and H. A. Tigier, 1983: Effect of dicarboxylic acids on the peroxidase — IAA oxidase isozymes of soybean callus. *Physiol. Plant.* 59: 355—358.
- [9] Phan, C. T. and R. Letouzé, 1983: A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and of hydroxycinnamate: CoA ligase activity of normal and 'vitreous' plants (*Prunus avium* L.) obtained in vitro. *Plant Sci. Lett.* 31: 323—327.
- [10] Kevers, C., M. Coumans, M. -F. Coumans-Gilles and Th. Gaspar, 1984: Physiological and biochemical events leading to vitrification of plant cultures in vitro. *Physiol. Plant.* 61: 69—74.
- [11] Ueng, P. P. and J. M. Daly, 1985: Comparison of indol-3-acetic acid oxidation in peroxidase from rust-infected resistant wheat leaves. *Plant Cell Physiol.* 26: 77—87.
- [12] Kevers, C. and Th. Gaspar, 1986: Vitrification of carnation in vitro: changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels. *Physiol. Veg.* 24: 647—654.
- [13] Werker, E. and B. Leshem, 1987: Structural changes during vitrification of carnation plantlets. *Ann. Bot.* 59: 377—385.