

TDZ 对莴苣 (*Lactuca sativa* L.) 器官发生及 乙烯形成的影响

82-94

徐华松 陆祖军 王永繁 黄学林

56/2035

(中山大学生命科学院生物学系, 广州 510275)

摘要 为了研究 TDZ 在植物器官发生中的生理作用, 用不同浓度的 TDZ 替代 MS 中的 BA, 发现仅用 1/50 BA 浓度 (0.1 mg/L) 的 TDZ 处理, 已相当于用 BA 处理所得芽数, 可见它具有很强的细胞分裂素活性; 但是 TDZ 又能显著促进乙烯形成, 较低浓度时抑制莴苣的器官发生, 可能此时乙烯起着主导作用。

关键词 TDZ; 莴苣; 器官发生; 乙烯

Effects of TDZ on organogenesis of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and its ethylene production

Xu Huasong Lu Zhujun Wang Yongfan Huang Xuelin

(Department of Biology, School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275)

Abstract In order to study physiological function of TDZ in plant organogenesis, we used TDZ in different concentration as a substitute for BA in MS. We found that TDZ is the most active cytokinin, only 0.002 mg/L TDZ can get almost equal number of buds promoted in the medium with 0.1 mg/L BA. But the formation of ethylene was found to be promoted greatly. The lower concentration of TDZ inhibited organogenesis of *Lactuca sativa* L., which might caused by ethylene.

Key words TDZ; *Lactuca sativa* L.; organogenesis; ethylene

1980年, 李鹏飞等人⁽¹⁾首次报道了结球生菜莴苣品种“New York 515”的组织培养研究情况, 随后钟仲贤、刘选明等人^(2,3)相继报道了莴苣其他品种的组织培养情况。从这些报道来看, 多以叶片为外植体, 我们以下胚轴为外植体尚未见报道; 而细胞分裂素多以 BA, KT 为主, TDZ (Thidiazuron) 是人工合成的苯基尿衍生物之一, 并具有很强的细胞分裂素活性⁽⁴⁾, TDZ 可诱导许多植物芽的生成, 如它可诱导烟草愈伤组织分化出芽⁽⁵⁾, 在以李子子叶、櫻桃子叶及桃子子叶为外植体也获得了成功⁽⁶⁾, 可在莴苣的组织培养中却未见有关这方面的报道。

通常组织培养是在密闭的容器中进行, 瓶内所累积的气体包括乙烯。研究发现, 乙烯对组织培养物芽的诱导和形成有重要的作用, 而 TDZ 却能促进乙烯的产生⁽⁷⁾, 但是, TDZ 促进乙烯的产生怎样影响莴苣的器官发生仍未搞清楚, 因此本文拟就这些问题进行初步的探讨。

1997-09-08 收稿

第一作者简介: 徐华松, 男, 1967年出生, 讲师, 硕士, 植物生理生化专业, 现在华南农业大学生物技术学院工作。

1 材料与方法

1.1 外植体 试材用莴苣 (*Lactuca sativa* L.) 万利包心生菜种子 (由广州市蔬菜研究所提供) 浸入 70% 乙醇 0.5 min, 再用 0.2% 升汞浸泡 5 min, 立即用无菌水清洗 4 次, 接种于已消毒的 0.6% 琼脂固化的基质上, 培养至一定天数, 在超净工作台上, 切取下胚轴上段 (约 0.5 cm) 为外植体。

1.2 培养基 以 MS + NAA 0.88 + BA 0.1 (mg/L) 为基本培养基, 培养基中加 3% 蔗糖和 0.62% 琼脂, pH 5.8, 1.2 kg/cm² 压力下灭菌 15 min。

1.3 培养条件 培养室温度控制在 25 ± 2℃, 光强为 1 500~2 000 lx, 每天照光 16 h, 培养室湿度保持为 70% 左右。

1.4 TDZ 的使用 以相当于 1/25、1/50、1/100 BA 浓度 (0.1 mg/L) 的 TDZ 代替 MS 中的 BA, 加入 TDZ 时用 DMFO (Dimethyl sulfoxide) 溶解 TDZ 直接加入已消毒的 MS 培养基中 (DMFO < 50 μL/500 mL), 趁琼脂未凝固前, 在超净工作台上均匀分装于无菌的锥形瓶中 (20 mL/每瓶), 待琼脂冷却凝固后, 每瓶接 3 块外植体, 每种浓度的处理平行做 12 瓶, 且重复一次。

1.5 乙烯的测定 将已标定体积的 50 mL 锥形瓶 (内含 20 mL 培养基/瓶) 用于愈伤组织培养及芽的诱导, 培养至 27 d 时, 把三角瓶用医用橡胶密塞 24 h, 然后抽取瓶中气样 1 mL, 用岛津 GC-9A 气相色谱仪测定乙烯, 乙烯测定条件为: 层析柱为 GDX-101 填充玻璃柱, 柱温 90℃, 进样口温度 120℃, N₂ 为载气, 流速为 60 mL/min。每种浓度处理做 4 个平行样品, 且重复一次实验。

1.6 器官发生的观测 外植体接种在基本培养基上, 几天后即可见有愈伤组织从外植体切口处产生, 2~3 d 对实验的情况进行一次详细观察, 并认真记录每一次的详情。培养至 28 d 时, 对愈伤组织的发生率及重量、再生芽数目进行统计。

表 1 TDZ 对万利包心生菜器官发生的影响

Table 1 Effect of TDZ on organogenesis of *Lactuca sativa* L.

TDZ 浓度 Concentration of TDZ (mg/L)	愈伤组织发生 Rate of callus production (%)	愈伤组织量 Weights of callus (g)	芽数 Number of buds (number/tube)
0	100	2.65 ± 0.03	10.36 ± 1.20
0.001	100	3.22 ± 0.24	5.80 ± 0.99
0.002	100	3.70 ± 0.25	10.67 ± 1.12
0.004	100	4.10 ± 0.16	11.00 ± 1.30

TDZ 浓度为“0”表示含 0.1 mg/L BA 为对照。
“0” concentration of TDZ is comparison with 0.1 mg/L BA.

2 结果

2.1 TDZ 处理所得愈伤组织及芽数

经 TDZ 处理后, 5 d 左右有愈伤组织产生, 且是从外植体切口处开始膨胀, 15 d 即可见愈伤组织上有绿色芽点, 随后芽长高。从表 1 可知, TDZ 有利于愈伤组织形成, 即使 0.001 mg/L TDZ (相当于 1/100 BA 的浓度) 产生的愈伤组织量也比对照组多, 浓度越大, 产生的愈伤组织量也越多, TDZ 对愈伤组织的发生率均为 100%, 而且 0.002、0.004 mg/L TDZ (相当于 1/25、1/50 BA 的浓度) 诱导所得芽数均高于对照组。可见, TDZ 具有很强的细胞分裂素活性, 从实验可知, TDZ 活性甚至是 BA 的 100 倍。

2.2 TDZ 对愈伤组织生长及乙烯生成的影响

TDZ 处理所得愈伤组织量高于对照组, 且 TDZ 处理组所产生的乙烯均高于对照。0.001 mg/L TDZ 浓度的再生芽数从表 1 可知最少, 此时乙烯释放量比对照组多 1 倍多, 增加 TDZ 浓度, 乙烯释放量逐渐增大 (图 1), 再生芽数却不随乙烯增加而呈递减趋势。

3 讨论

莴苣的组织培养已有报道^(1,2,3), 万利包心生菜是广州市蔬菜研究所新培育出的一个优良品

种、在华南地区广为栽培, 本文首次报道了它的器官发生; 从已报道过的莴苣组织培养来看, 大多以叶片为外植体, 本研究以下胚轴为外植体成功地获得了再生芽, 这不仅在理论上, 在生产实践上也有应用价值。

TDZ 在芽的再生方面表现出重要的作用, 实验表明: 0.002、0.004 mg/L TDZ 处理所得芽数均多于 0.1 mg/L BA 的。显然, TDZ 能促进植物芽的再生, 但存在一个浓度的选择问题。有报道, 低浓度 TDZ 仅促进腋芽的增殖, 而高浓度即促进腋芽的增殖又提高芽的再生能力^[8,9], 而且从实验中可知, TDZ 与生长素类配合使用效果更好。TDZ 可促进植物组织乙烯的生成^[10,11], Yip 等人^[7]分别用 TDZ 和 BA 处理豇豆胚轴和小麦莠蒿叶, TDZ 的乙烯释放量远大于 BA 的, 正因为乙烯的增加导致这些生理效应。为何 TDZ 浓度低时对万利包心生菜芽的再生有抑制作用? 我们的解释是: TDZ 即使在低浓度时, 其乙烯释放的量大大高于 BA 的 (图 1), 因此, 此时乙烯可能起着主导作用, 导致再生芽数减少。例如黄学林等人^[12]报道, 用 TDZ 替代 B₅H 中的 KT 时愈伤组织变绿变硬, 其体胚发生能力丧失, 且其乙烯生成和 PAL 活性升高, 而乙烯形成酶抑制剂氯化钴可抑制 TDZ 的上述作用, 部分恢复其体胚发生能力。TDZ 浓度高时, 虽然乙烯释放量增大, 但很可能 TDZ 具有很强的细胞分裂素活性, 从而在 TDZ 浓度增加时, 乙烯的释放量递增, 再生芽数却不随乙烯释放量的增大而递减。至于 TDZ 为什么能促进乙烯的产生? 有待进一步研究。

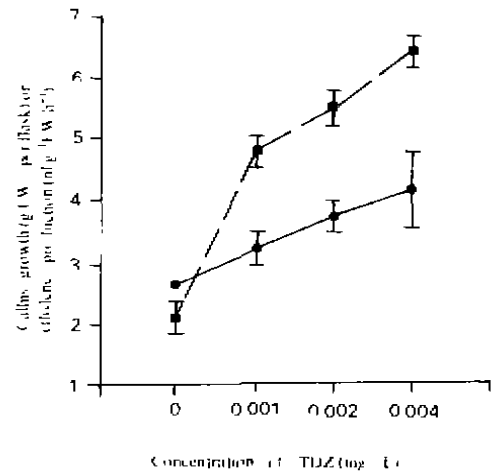


图 1 TDZ 对愈伤组织生长及乙烯释放量的影响
Fig. 1 Effects of TDZ on callus growth and ethylene production of culture tissue of *Lactuca sativa* L.

●—Callus growth ■—Ethylene production

可抑制 TDZ 的上述作用, 部分恢复其体胚发生能力。TDZ 浓度高时, 虽然乙烯释放量增大, 但很可能 TDZ 具有很强的细胞分裂素活性, 从而在 TDZ 浓度增加时, 乙烯的释放量递增, 再生芽数却不随乙烯释放量的增大而递减。至于 TDZ 为什么能促进乙烯的产生? 有待进一步研究。

参 考 文 献

- 李鹏飞, 郭碧霞. 结球莴苣顶芽及叶片组织培养. 华南农学院学报, 1980, 1(3): 39~42
- 钟仲贤. 结球生菜的组织培养. 植物生理学通讯, 1988, 6: 37~38
- 刘选明. 结球生菜叶片器官发生的研究. 湖南农学院学报, 1990, 1(3): 233~240
- Mok MC, Mok DCW, Turner *et al.* Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *Hortsci*, 1985, 22: 1194
- Thomas JC, Katterman FR. Cytokinin activity induced by thidiazuron. *Plant Physiol*, 1986, 81: 681
- Mantes S R, Cordts J M. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica*, and *Prunus cerasus*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1989, 19: 1~11
- Yip Wk, Yang SF. Effect of thidiazuron, a cytokinin-active urea derivative, in cytokinin dependent ethylene production system. *Plant Physiol*, 1986, 80: 515
- Capella SC, Mork DWS, Kirchner SC *et al.* Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism on N₆-(1-isopentenyl) [8-¹⁴C] adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Physiol*, 1986, 81: 681~683
- Chapupa V. Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation. *Biol Plant (praha)*, 1988, 30: 414~421
- Okumoto T, Shandok, Takahashi S *et al.* 4-Pyridylureas are surprisingly potent cytokinins the structure-activity relationship. *Chem Pharm Bull*, 1981, 29: 3749
- Suttle JC. Effect of the detolant thidiazuron on ethylene evolution from mung bean hypocotyl segments. *Plant Physiol*, 1984, 75: 902
- 黄学林, 李筱菊, 傅家瑞等. Thidiazuron 对苜蓿愈伤组织的乙烯生成及其体胚发生的影响. 植物生理学报, 1994, 20(4): 177~181