

乙烯利、ACC、AOA 和 AgNO₃ 对绿豆下胚轴插条不定根形成的作用

王金祥^{1,2}, 潘瑞炽²

(1. 华南农业大学资源与环境学院, 广东广州 510642; 2. 华南师范大学生命科学学院, 广东广州 510631)

摘要:以绿豆下胚轴插条为实验材料,研究了乙烯利、ACC、AOA 和 AgNO₃ 对其不定根形成的影响。结果表明:乙烯利和 ACC 能促进绿豆下胚轴插条的生根,最适浓度分别为 50 μmol/L 和 10 μmol/L; AOA 和 AgNO₃ 明显抑制不定根形成,随浓度增加,抑制作用增强。插条离体后 24 h 内对 ACC 的促进作用和 AOA 的抑制作用敏感。插条在 0-6 h 和 18-24 h 用 ACC 处理,在 0-2 h 和 22-24 h 用 50 μmol/L 乙烯利处理的生根效果好。乙烯在不定根形成的诱导期和起始晚期起促进作用。

关键词:乙烯;不定根;绿豆

中图分类号: Q945.32

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395 (2004) 06-0506-05

Effects of Ethephon, ACC, AOA and AgNO₃ on Adventitious Root Formation in Mung Bean Hypocotyl Cuttings

WANG Jin-xiang^{1,2}, PAN Rui-chi²

(1. College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Effects of ethephon, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), aminioxyacetic acid (AOA) and AgNO₃ on adventitious rooting in mung bean hypocotyl cuttings were studied. Results indicated that ethephon and ACC promoted adventitious root formation in mung bean hypocotyl cuttings, the optimal concentrations being 50 μmol/L and 10 μmol/L respectively, whereas AOA and AgNO₃ significantly inhibited adventitious rooting, and the effect of which were dose-dependent. The promoting effect of ACC and the inhibitory effect of AOA on the cuttings excised after 24 hours were sensitive. The rooting effects were best in treatment with 10 μmol/L ACC for 0-6 hours and 18-24 hours, and in treatment with 50 μmol/L ethephon for 0-2 hours and 22-24 hours. It is concluded that the promoting effects of ethephon and ACC on adventitious rooting were at induction stage and late initial stage.

Key words: Ethylene; Adventitious roots; Mung bean

1933 年科学家们就发现乙烯能促进多种植物不定根的形成^[1]。然而乙烯对植物插条生根的作用却不尽相同,即使用同一实验材料,就有促进^[2-4]、抑制^[5,6]和不起作用^[7] 3 种结果,这可能是所用材料的品种、年龄和生理状况、插条培养时的光照条件和湿度、施加药剂的浓度以及插条浸泡深度不同造成。Jarvis^[8]将不定根形成过程分为 4 个时期,即诱

导期、起始早期、起始晚期及生长发育期。根据我们的解剖学实验结果,这 4 个时期分别为插条离体后 0-12 h、12-20 h、20-48 h 和 48-72 h^[9]。然而到目前为止,有关乙烯对绿豆插条不定根形成的不同时期的作用研究尚未见报道。

乙烯利(ethephon)是乙烯释放剂,1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid,

ACC) 是乙烯合成前体, 氨基乙酸(aminioxyacetic acid, AOA)抑制乙烯的合成, AgNO₃ 中的 Ag⁺ 有抑制乙烯的生理作用。我们以绿豆下胚轴插条为实验材料, 探讨乙烯利、ACC、AOA 和 AgNO₃ 对绿豆插条生根的影响及乙烯作用的敏感时期, 为将来研究乙烯调控绿豆插条不定根发生的分子机制, 信号转导和相关乙烯响应基因的时空表达打下基础。

1 材料和方法

材料和试剂 市售绿豆 (*Phaseolus radiatus* L.) 种子。ACC 和 AOA 为 SIGMA 公司产品, AgNO₃ 和乙烯利为国产分析纯, 所有试剂均用蒸馏水配制。

插条制备 挑选饱满的绿豆种子, 用清水冲洗 2 h, 再用 0.1% NaClO 消毒 30 min 后冲洗几分钟; 然后在水中浸泡 12 h, 播种在湿沙中, 28±2℃ 黑暗 36 h 后转到光照培养箱中培养 3 d, 温度为 28±2℃, 相对湿度为 80%, 光照时间为 16 h d⁻¹ (56.5 μmol m⁻² s⁻¹)。选取长势、子叶大小、下胚轴粗细一致, 苗高 8–9 cm 的幼苗, 切去子叶下 4 cm 以下的下胚轴和根系, 即得生根实验插条。

诱导生根 将插条浸在盛有不同处理液, 液面高 3 cm 的 9 ml 盘林西林瓶中; 每瓶 5 个插条, 每

处理 3 瓶, 对照为蒸馏水处理。除特别指出外, 乙烯利、ACC、AOA 和 AgNO₃ 处理时间均为 24 h, 然后将插条的基部用自来水冲洗以除去沾在表面的药剂, 插入装蒸馏水的盘林西林瓶内, 培养 5 d, 每天更换蒸馏水; 插条在光照培养箱中培养, 温度为 28±2℃, 相对湿度为 80%, 光照时间为 16 h d⁻¹ (56.5 μmol m⁻² s⁻¹); 6 d 后统计生根数, 统计长于 1 mm 的根。实验重复 3 次, 用 EXCEL 2000 软件分析处理数据。

2 结果和分析

2.1 乙烯利、ACC、AOA 和 AgNO₃ 对绿豆插条不定根形成的影响

乙烯利是乙烯的释放剂。用 0.01–50 μmol/L 乙烯利处理绿豆下胚轴插条 1 d 均能促进绿豆插条的生根, 且随乙烯利浓度增加, 促进效果越强; 高于 50 μmol/L 则抑制生根。50 μmol/L 乙烯利的促进作用最强, 平均生根数为 12.67±1.00 条, 为对照的 152%, 经邓肯氏检验, 与其它浓度处理的差异均达显著水平 (p≤0.05) (图 1)。

用 0–100 μmol/L ACC 处理绿豆插条 24 h, 和对照比, ACC 处理均能促进绿豆下胚轴插条的生根, 且生根快。以 10 μmol/L 的促进效果最好,

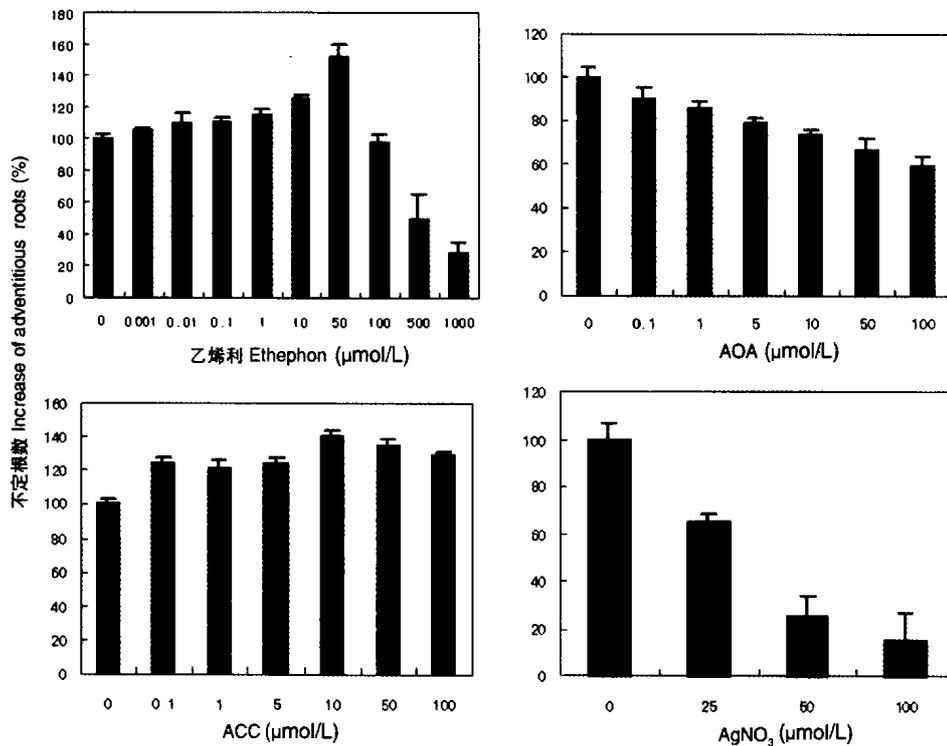


图 1 不同浓度乙烯利、ACC、AOA 和 AgNO₃ 对绿豆插条生根的影响

Fig.1 Effects of ethephon, ACC, AOA and AgNO₃ on adventitious rooting in mung bean hypocotyl cuttings treated after 24 hours

50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 次之(图 1)。这与 Liu 等^[10]的结果一致。ACC 是乙烯合成的前体,能增强 ACC 氧化酶的活性,用 ACC 处理,可通过增加乙烯的合成而促进生根。

实验表明,0–100 $\mu\text{mol/L}$ 的 AOA 处理均抑制绿豆下胚轴插条的生根,随浓度的增加,其抑制效果越明显,100 $\mu\text{mol/L}$ 处理绿豆下胚轴插条 24 h,生根数只是对照的 60%(图 1)。已知 AOA 是 ACC 合酶的抑制剂,AOA 处理后使绿豆下胚轴中 ACC 的量减少,从而抑制其不定根的形成。

用不同浓度的 AgNO_3 处理绿豆下胚轴插条 24 h,均明显抑制不定根形成,且浓度越高,抑制作用越强(图 1)。50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ AgNO_3 处理插条,浸泡部位变黑,表皮受到伤害;25 $\mu\text{mol/L}$ AgNO_3 处理的插条生根数低于对照,生根范围大于对照(数据未列出),可能是 AgNO_3 引起植物组织坏死,下胚轴浸泡部位表皮受到伤害,诱导形成根原基部位上移,扩大了生根范围。 Ag^+ 有两方面的效应:一是 Ag^+ 是重金属离子,象一些有毒化合物一样,促进乙烯的形成^[10],从而使生根范围扩大;二是 Ag^+ 能抑制乙烯的生理作用^[10]。因此, AgNO_3 抑制绿豆插条的生根是 Ag^+ 综合作用的结果。而 Liu 等^[10]研究表明,向日葵下胚轴插条离体后 3 h 内用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 AgNO_3 处理,明显促进其不定根原基的形成。我们的结果与此不一致,可能是实验系统不同的缘故。

2.2 乙烯利和 ACC 在不同时期对绿豆插条不定根形成的作用

在第 1 天和第 2 天用 10 $\mu\text{mol/L}$ ACC 或 / 和 100 $\mu\text{mol/L}$ AOA 组合处理绿豆下胚轴插条,以蒸馏水处理为对照,然后用蒸馏水处理 4 d。结果表明,ACC 和 AOA 处理顺序对绿豆插条生根有很大的影响。第 1 天用 ACC 处理的插条生根数增加 14%;而第 2 天用 ACC 处理的也促进不定根的形成,增加 11%,均与对照差异显著 ($p \leq 0.05$)。用 ACC 处理 2 d 明显促进不定根的形成,为对照的 177%。而用 AOA 处理则抑制生根,用 AOA 处理 2 d 的生根数仅为对照的 55%(表 1)。说明插条离体 24 h 内对 ACC 和 AOA 的作用敏感;且 AOA 能部分抵消 ACC 促进生根的效果。AOA 抑制乙烯的合成;这从反面表明乙烯在插条离体后第 1 天对不定根发育很关键。

表 1 不同时期 ACC 和 AOA 对绿豆插条生根的影响
Table 1 Effect of ACC and AOA treated at different hours on rooting of mung bean hypocotyl cuttings

处理 Treatment		生根数 Number of adventitious roots	
0–24 h	24–48 h		
H ₂ O	H ₂ O	8.07±0.40 (100%)	c
H ₂ O	ACC	8.96±0.38 (111%)	b
ACC	H ₂ O	9.25±0.20 (114%)	b
H ₂ O	AOA	4.83±0.42 (60%)	e
AOA	H ₂ O	3.90±0.23 (48%)	f
ACC	ACC	14.32±0.78 (177%)	a
ACC	AOA	6.31±0.38 (78%)	d
AOA	AOA	4.47±1.39 (55%)	ef

具有不同字母的表示差异显著 ($p \leq 0.05$)。Different letters within column indicate significant differences at $p \leq 0.05$ by Duncan's multiple range test

为了进一步明确乙烯作用的最佳时期,我们在 0–6 h, 6–12 h, 12–18 h 和 18–24 h 四个时段,分别用 10 $\mu\text{mol/L}$ ACC 处理绿豆插条,发现 0–6 h 和 18–24 h 这两个时段对 ACC 的作用敏感,此时生根数较多(图 2A)。插条离体后 0–6 h 和 18–24 h 分别对应不定根形成的诱导期和起始晚期。因为 ACC 是乙烯合成的前体且能提高 ACC 氧化酶的活性,因此我们推断 ACC 在插条离体后的 0–6 h 和 18–24 h,也就是不定根形成的诱导期和起始晚期起关键的调节作用。乙烯利释放乙烯的速度很快,在插条离体后 0–2 h, 2–4 h, 4–6 h, 18–20 h, 20–22 h, 22–24 h 等时段用乙烯利处理插条,结果表明 0–2 h 和 22–24 h 的生根数较高(图 2B),可见插条离体后 0–2 h 和 22–24 h 是乙烯作用的最佳时期。在插条脱离母体后的诱导期,乙烯可能促进更多的维管束间细胞脱分化而进入有丝分裂周期,但有待进一步实验证实;起始晚期是根原基细胞分裂的时期,乙烯能促进细胞周期蛋白基因的表达^[11]而促进根原基的形成。

3 讨论

ACC 促进绿豆插条生根的结果与 Rivo 等^[4]的结果一致,而与 Jusaitis^[5]的结果相反;可能是因为 Jusaitis 所使用的 ACC 浓度为 1 mmol/L,浓度过高,而我们使用的 ACC 浓度范围为 0–100 $\mu\text{mol/L}$ 。ACC 能加快细胞分裂素的分解,降低生根区细胞分裂素的含量^[12],ACC 是乙烯合成的前体,能促进乙

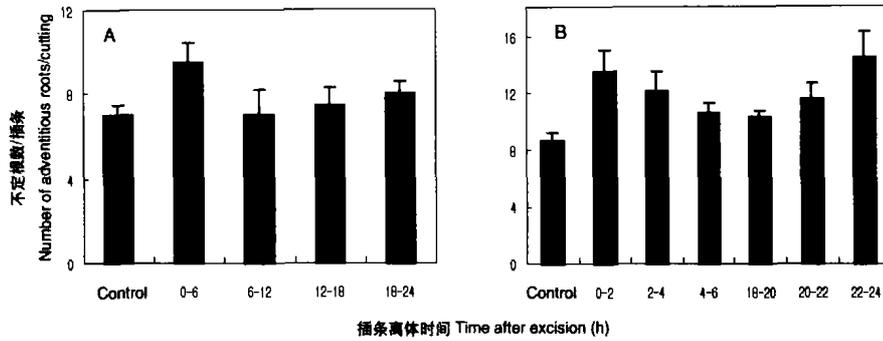


图 2 10 $\mu\text{mol/L}$ ACC (A) 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 乙烯利 (B) 在不同时段处理对绿豆插条生根的影响
Fig. 2 Effect of 10 $\mu\text{mol/L}$ ACC (A) and 50 $\mu\text{mol/L}$ ethephon (B) treated at different times on adventitious rooting in mung bean hypocotyl cuttings

烯的合成; ACC 促进绿豆插条的生根是否是通过增加生根区组织乙烯含量或者改变其它植物激素的含量和比例, 有待研究。

实验表明 AOA 能抑制绿豆插条不定根的形成。Robbins 等^[3]报道 10 $\mu\text{mol/L}$ 氨基乙烯基甘氨酸 (aminoethoxyvinylglycine, AVG) 处理绿豆插条 24 h, 插条生根数减少 39%; 处理 6 d, 插条生根数几乎降为 0。可见 AVG 和 AOA 一样, 都是抑制乙烯的合成, AOA 和 AVG 抑制绿豆插条生根是通过减少乙烯的合成而实现的。AgNO₃ 中的 Ag⁺ 可取代金属蛋白质中的金属离子, 使金属蛋白无法与乙烯结合, 从而抑制乙烯的作用^[13]。这表明绿豆下胚轴插条生根过程受乙烯的正调控。

Jarvis^[8]认为乙烯在绿豆插条不定根形成的诱导期起抑制作用, 在起始晚期起促进作用; 而我们的结论是乙烯在诱导期和起始晚期都促进插条生根。我们认为可能有以下原因:

插条离体后 0-6 h 可能是导致不定根形成的生理反应关键时期, 此时外施乙烯可能加强某些和根原基启动有关的基因活动; 在插条离体后 18-24 h, 细胞分裂旺盛^[9], 外施乙烯可能刺激插条内源乙烯的合成, 促进某些细胞周期蛋白基因的表达而促进细胞分裂^[11]; 在插条离体后第 3 d (48-72 h), 内源乙烯的功能可能是促进表皮细胞的死亡^[14]和提高纤维素酶的活性^[15], 有利于根突出表皮, 因此乙烯在绿豆插条不定根形成的诱导期、起始晚期和生长发育 3 个时期起作用。乙烯在不定根形成的诱导期作用明显还可能在于它能加快细胞分裂素的分解, 降低生根区细胞分裂素的含量^[13], 改变生根组织内生生素 (indoleacetic acid, IAA) / 细胞分裂素 (cytokinin, CTK) 比值和组织细胞对生长素的敏感性^[16]; 而生长

素是和不定根形成密切相关的植物激素; 乙烯能与过氧化物酶结合, 提高可溶性过氧化物酶的活性, 在受到伤害的情况下, 碱性过氧化物酶具有 ACC 氧化酶的活性^[17], 它产生的 H₂O₂ 能与 ACC 反应, 非酶促地形成乙烯^[18]; 这些都有利于维管束间薄壁细胞脱分化。在不定根形成的起始晚期, 乙烯能增加细胞壁物质的合成、转运和分泌^[19]; 从而促进细胞分裂和根原基的成长壮大。乙烯在绿豆插条生根的诱导期和起始晚期起明显促进作用, 暗示不定根的发育是一个高度程序化的过程, 在这两个时期某些关键的基因可能受乙烯的高度调控。对绿豆插条生根过程乙烯响应基因的克隆和功能分析将有助于人们揭示其中的奥秘。

Jusaitis^[9]提出假说: 植物生根需要组织内乙烯量达到一个最低值, 且乙烯量在某一阈值内时, 植物生根不受影响; 如果受某种因素影响 (如外施乙烯或乙烯抑制剂), 使内源乙烯量超过或低于阈值都对生根有抑制作用; 如果生根组织内源乙烯量未达到阈值, 通过外施药剂促进乙烯的产生则表现为促进生根。我们的实验结果证实了最后一种情况。

参考文献

- [1] Zimmerman P W, Hitchcock A E. Initiation and stimulation of adventitious roots caused by unsaturated hydrocarbon gases [J]. Contr Boyce Thomp Inst, 1933, 5:351-352.
- [2] Krishnamoorthy H N. Promotion of rooting in mung bean hypocotyls cutting with ethrel, an ethylene releasing compound [J]. Plant Cell Physiol, 1972, 11:979-982.
- [3] Robbins J A, Kays S J, Dirr M A. Enhanced rooting of wounded mung bean cuttings by wounding and ethephon [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1983, 108:325-329.
- [4] Riou J, Yang S F. Ethylene and auxin-ethylene interaction in adventitious root formation in mung bean (*Vigna radiata*) cuttings

- [J]. *J Plant Growth Regul*, 1989, 8:131-141.
- [5] Jusaitis M. Rooting response of mung bean cuttings to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and inhibitors of ethylene biosynthesis [J]. *Sci Hort*, 1986, 29:77-85.
- [6] Geneve R L, Heuser C W. The relationship between ethephon and auxin on adventitious root initiation in cuttings of *Vigna radiata* [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1983, 108:330-333.
- [7] Mudge K W, Swanson B T. Effect of ethephon, indole butyric acid and treatment solution pH on rooting and ethylene levels within mung bean cuttings [J]. *Plant Physiol*, 1978, 61:271-273.
- [8] Jarvis B C. Endogenous control of adventitious rooting in non-woody cuttings [A]. In: Jackson M B. *New Root Formation in Plants and Cuttings* [M]. The Netherlands: Martinus Nijhoff Publisher, 1986. 191-222.
- [9] Wang J X (王金祥). Study on the hormonal control of adventitious root formation at different stages in mung bean hypocotyl cuttings [D]. Guangzhou: South China Normal University, 2002. 20-23. (in Chinese).
- [10] Liu J H, Mukherjee I, Reid D M. Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings III. The role of ethylene [J]. *Physiol Plant*, 1990, 78:268-276.
- [11] Lobiecke R, Sauter M. Adventitious root growth and cell-cycle induction of deep water rice [J]. *Plant Physiol*, 1999, 119:21-29.
- [12] Bollmark M, Eliasson L. Ethylene accelerates the breakdown of cytokines and thereby stimulated rooting in Norway spruce hypocotyl cuttings [J]. *Physiol Plant*, 1990, 80:534-540.
- [13] Pan R C (潘瑞焱), Wang X J (王小菁), Li N H (李娘辉). *Plant Physiology* [M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2001. 188-189. (in Chinese).
- [14] Mergmann H, Sauter M. Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124:609-614.
- [15] Linkins A E, Lewis L N, Palmer R L. Hormonally induced changes in the stem and petiole anatomy and cellulase enzyme patterns in *Phaseolus vulgaris* L. [J]. *Plant Physiol*, 1973, 52:554-560.
- [16] Liu J H, Reid D M. Auxin and ethylene-stimulated adventitious rooting in relation to tissue sensitivity to auxin and ethylene production in sunflower hypocotyls [J]. *J Exp Bot*, 1992, 43(254): 1191-1198.
- [17] De Jaeger G, Boyer N, Bon M C, et al. Thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica*: early events in ethylene biosynthesis pathway [J]. *Biochem Physiol Pflanz*, 1987, 182:49-55.
- [18] Gaspar T, Penel C, Hagege D, et al. Peroxidases in plant growth [A]. In: Lobarzewski J, Greppin H, Penel C, et al. *Differentiation and Development Processes — In Biochemical Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases* [M]. Geneva: Univ Geneva, 1991. 249-280.
- [19] Ingemarsson B S M. Ethylene effects on peroxidases and cell growth patterns in *Picea abies* hypocotyl cuttings [J]. *Physiol Plant*, 1995, 94:211-218.