Ethephon及2,4-D對白化蘆筍幼苗細胞分化之影響

The Effect of Ethephon and 2,4-D on the Cellular Differentiation of Etiolated Asparagus Seedlings

張喜寧　韓小蓉

by

Doris Chi-nu Chang and Shau-ron Han

摘　要

七天大白化蘆筍幼苗經Ethephon，2,4-D 或二者之混合液噴灑後，於一週之內，其外表雖無異常之變化，但於顯微鏡下可見其莖部組織經處理後，其皮層細胞擴大，其皮層層數減少，且其週圍維管束層細胞之木質化加速。

電子顯微鏡觀察，經處理者其次生細胞壁之增厚加速，且高濃度之Ethephon或／及2,4-D 處理更會引起細胞質中粗內質網之變形，以及 polysomes 數量之減少。

前　言

目前臺灣加工用之蘆筍材料有白、綠二種，而蘆筍材料的老化爲食品加工業者所面臨之難題，其中尤以白蘆筍較爲嚴重，但眞正促進白蘆筍老化之控制因素，仍未達完全瞭解之階段。吾人僅知白蘆筍之質地一般較綠蘆筍爲粗，故常須削皮才能食用。又本人所作蘆筍嫩莖之切片（未發表），發現白、綠二種蘆筍在構造上有差異；即白蘆筍嫩莖於近表皮處有一整環相當明顯已木質化之週圍維管束纖維層，而綠蘆筍嫩莖之纖維層則不明顯，更少有木質化之現象。造成這種構造上差異之原因甚有價值加以探討。最近Haard等人[8]報導說乙烯會誘致蘆筍嫩莖異構過氧化酵素（ isoperoxidase ）之形成，而促進木質素之合成，故造成蘆筍之老化。本人推測，由於白蘆筍須在覆土之下生長，覆土所給與之壓力甚有可能會促進蘆筍體內乙烯之產生，且由於覆土之故，乙烯之散發較難。故白蘆筍之構造及質地，可能深受乙烯之影響。本文之目的即在探討乙烯對蘆筍細胞分化之影響，以求瞭解乙烯與蘆筍纖維木質化之關係。

材料及方法

由臺灣南部所得之臺灣省產一代Mary Washington之蘆筍種子先行浸於溫水中48 小時，再選飽滿之種子播於裝有乾淨細沙之四吋缽中，並置於25°C 恒溫箱中，保持充分水分之供給，並維持黑暗狀態。然後選取發芽率整齊之七天大白化蘆筍幼苗作如下三種處理及一種對照。

對照：以小型塑膠噴壺裝蒸餾水噴灑於植株上，直到噴液下滴爲止。

處理：

A. Ethephon（即2-chloroethyl-phosphonic acid ）處理—分別以50,500及1000ppm三種濃度噴灑至噴液下滴爲止。

B. 2,4-D處理 — 分別以50,500及1000 μM三種濃度依上法噴灑。

本文原載於中國園藝第二十一卷第一期

C. Ethephon及2,4-D混合處理——分別以Ethephon及2,4-D混合成50＋50，500＋500及1000＋1000（ppm＋μM）三種混合濃度處理幼苗。

處理係在僅裝有一盞5W小綠燈之暗室中進行，處理後之植株其缽上皆覆以包有鋁箔之暗色塑膠盆爲蓋，以確保黑暗，並仍置於25°C之恒溫箱中。

經以上處理後一、三及七天分別由各組取樣多株植株，並一律切取根部以上2.5-3.0 cm之莖部組織，分別作普通顯微鏡及電子顯微鏡樣品之固定。

1. 普通顯微鏡切片：蘆筍組織先經FAA 固定後，再經TBA 系列脫水，最後封埋在石臘中。一律以普通切片機作成10 μ橫切面切片，並作下列二種染色：

   A. Safranin及Delfield's Hematoxylin[13] 雙重染色，此爲普通染色切片。木質化之部位將呈紅色。

   B. 螢光染色——以0.1% cotton blue 溶於0.1N K_3PO_4之溶液作螢光染色[15]，木質化之部位將顯出螢光。

2. 電子顯微鏡切片：蘆筍組織先經Karnovsky's固定液固定四小時[14]，再以2%四氧化鋨作後固定一小時[18]，經過乙醇之系列脫水，環氧丙烷爲過渡溶劑，最後封埋在Epon 中。以杜邦公司出品之鑽石刀在Sorvall MT-2B上切成超薄切片。僅取厚度在60-150nm之淡金色或灰色切片置於300mesh之銅網目上，並以飽和之醋酸鈾醯（ uranylacetate ）[19]及Reynolds之鉛染色劑[10]作雙重染色。最後以臺大農學院之Hitachi-HU 12電子顯微鏡觀察，並以照片爲記錄。

結　果

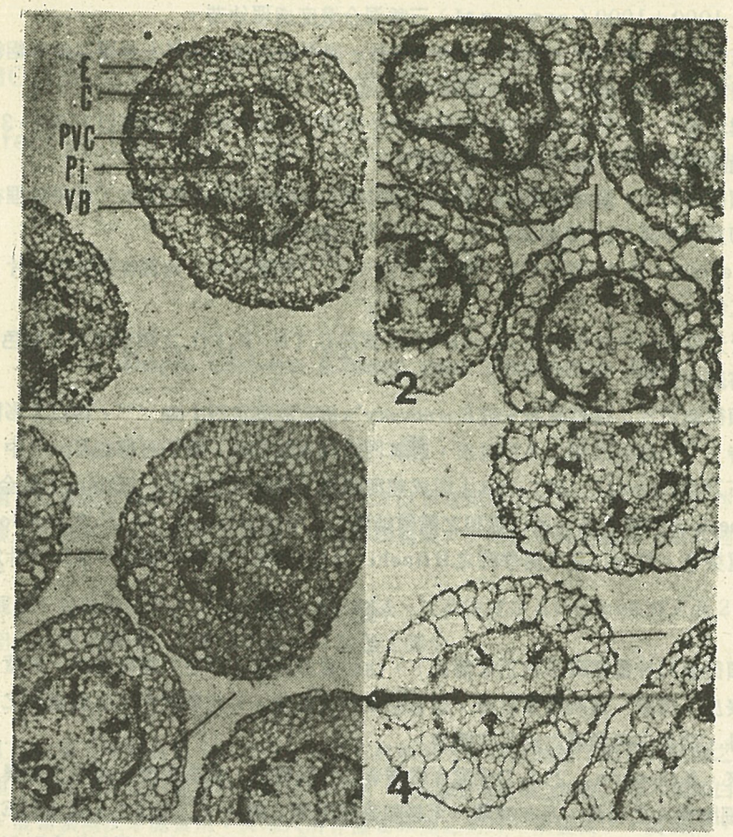
由普通顯微鏡切片觀察顯示在正常情況下，白化蘆筍幼苗在一至二週株齡時，其莖部構造橫切面由外向內依次爲表皮、皮層、週圍維管束層、維管束及髓五部分。且此期間內，各種處理之植株，在外表上除正常之長高外，並無任何顯著之變化或差異。

一般說來，Ethephon，2,4-D或混合處理者之效果相近，僅有程度上極小之差異。經處理者，於各種濃度皆有細胞增大之現象，且在處理一天後即表現出來（圖一、二及三）。其中以Ethephon及混合處理者，在低濃度（即50 ppm E＋50 μM 2,4-D）下即現效果（圖二），例如約有50%皮層細胞變大，且皮層層數減少（圖一、二），而2,4-D 處理者則需到500 μM 或以上才有類似之效果。但無論何種處理，一達有效濃度後，濃度之再增高並未發現有效果增加之現象。其中Ethephon及2,4-D 各別處理者，除了濃度不影響效果外，未見有隨着處理後天數之增加，大細胞數目續增之趨勢。但混合處理者則在處理七天後，其皮層細胞由應有之五、六層小細胞變成二層大細胞（圖四）。外表上則處理與對照之直徑相差不顯著。

螢光切片顯示在正常狀況下，維管束在株齡八天時已有部分木質化（圖五），且在一週之內，維管束之木質化漸增（圖五、七）。而週圍維管束層在一週內，由全未木質化之柔膜細胞（圖五）一變而成爲多層且強烈木質化之週圍維管束纖維層（圖七）。但Ethephon，2,4-D或二者之混合處理者則皆稍有促進週圍維管束層細胞木質化之傾向（圖五、六、七及八），且以處理七天後之效果最爲明顯（圖八）。但Ethephon或／及2,4-D處理對維管束之木質化並無顯著之影響（圖五、六、七及八）。

電子顯微鏡觀察則見Ethephon或／及2,4-D處理者皆在處理一天後即可見有次生細胞壁之增厚現象（圖九、十），且隨着處理後天數之增加，次生細胞壁之增厚現象更爲顯著（圖十、十一、十二及十三）。當植株達十四天大時，既使對照組亦可見有許多木質化之細胞壁（圖十三），此現象與螢光照片所見者相符（圖八）。

經Ethephon或／及2,4-D 處理後，除了次生細胞壁之增厚在程度上稍有增加之外，尚可發現在處理七天後高濃度處理會引起部分粗內質網之變形（圖十二），且細胞質中polysomes之數目亦會減少（圖十二）。



圖一：八天大對照白化蘆筍幼苗莖部橫切面普通染色切片，顯示其構造由外向內爲表皮、皮層、週圍維管束層、維管束及髓五大部分。隨着株齡增加至14天大時，除週圍維管束層稍加厚外，其餘構造無多大變化。（X120）

Fig. 1. Cross section of stem region of 8-day-old control etiolated asparagus seedlings, containing epidermis(E), cortex(C), perivascular cylinder(PVC), vascular bundle(VB)., and pith(Pi). When increase in age to 14-day-old, not much change in structure, except perivascular cylinder becomes thicker.(X120)

圖二：經Ethephon（50ppm）處理一天後之白化蘆筍幼苗莖部，顯示處理會引起皮層細胞之變大（↑），且皮層層數減少。低濃度之Ethephon與2,4-D混合處理者亦有相同之反應。（X120）

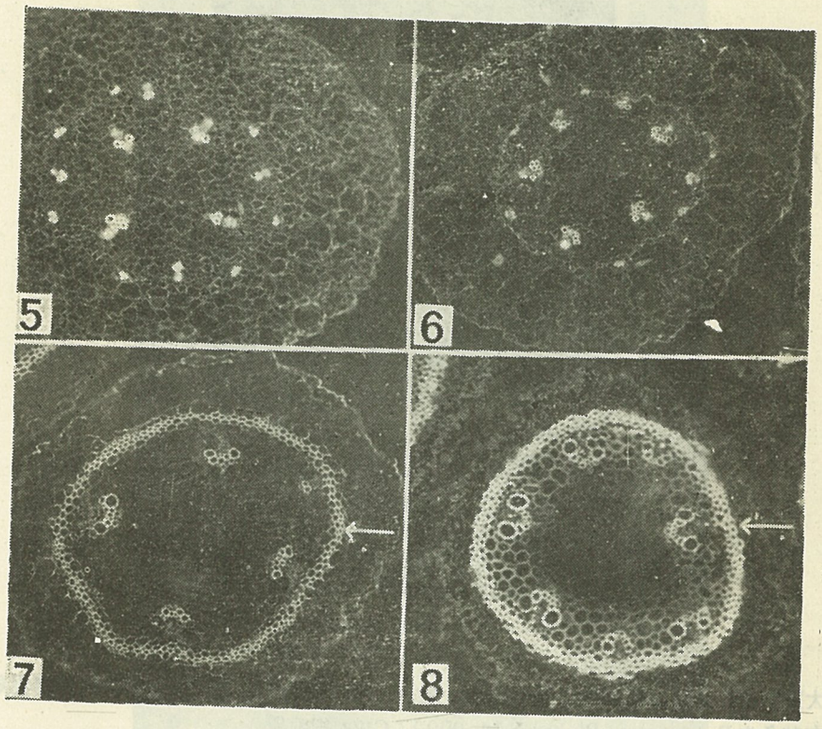
Fig. 2. One day after Ethephon（50ppm）treated etiolated asparagus seedlings. Note the enlargement of cortex parenchyma, and the reduction in cortex layers(↑). Ethephon and 2,4-D mixture（50ppm＋50μM）shows same type of responses.（X120）

圖三：經2,4-D 500μM或更高之濃度處理三天後之白化蘆筍幼苗莖部，顯示處理效果亦在使皮層細胞變大，皮層層數減少（↑）。（X120）

Fig. 3. Three days after 2,4-D（500μM or higher conc.）treated etiolated asparagus seedlings. Note the same effect as Ethephon treated samples（Fig.2）.（X120）

圖四：經Ethephon及2,4-D混合處理（50ppm＋50μM）七天後之白化蘆筍幼苗莖部，顯示其皮層細胞幾乎全部變大，且層數顯著減少（↑）。（X120）

Fig. 4. Seven days after Ethephon and 2,4-D mixture（50ppm＋50μM）treated etiolated asparagus seedlings. Note the enlargement of most of the cortex parenchyma, and the highly reduction in cortex layers(↑).（X120）



圖五：八天大對照白化蘆筍幼苗螢光顯微照片，顯示其維管束已有部分木質化，但週圍維管束層則全未木質化。（X160）

Fig. 5. Fluorescence micrograph of 8-day-old control etiolated asparagus seedling. Note only the vascular bundles being partially lignified.(X160)

圖六：經Ethephon 1000ppm 處理一天後之白化蘆筍幼苗莖部，顯示稍可促進週圍維管束層細胞之木質化。（X160）

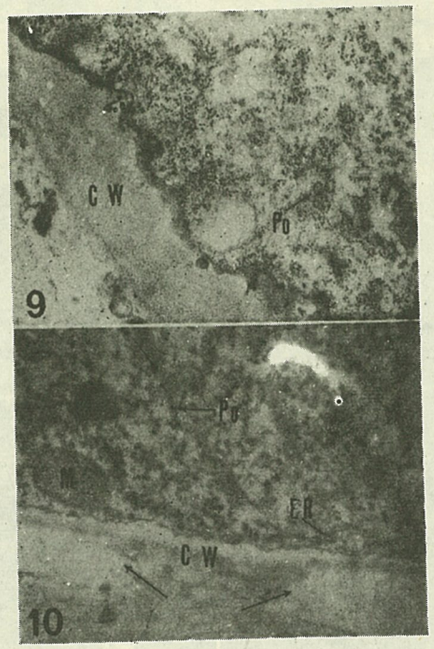
Fig. 6. One day after Ethephon（1000ppm）treated etiolated asparagus seedling.Note cell lignification of perivascular cylinder being enhanced.(X160)

圖七：十四天大對照白化蘆筍幼苗螢光顯微照片，顯示在自然狀況下，週圍維管束細胞已呈強烈木質化(↑)。（X160）

Fig. 7. Fluorescence micrograph of 14-day-old control etiolated asparagus seedling. Note the highly lignified perivascular cylinder(↑).(X160)

圖八：經Ethephon 50ppm（或更高濃度）處理七天後之白化蘆筍幼苗細胞，顯示Ethephon 處理有強烈促進週圍維管束木質化之作用(↑)。(X160)

Fig. 8. Seven days after Ethephon (50ppm or higher conc.) treated etiolated asparagus seedling. Note the lignification of perivascular cylinder cells being strongly enhanced (↑). (X160)



圖九：八天大對照白化蘆筍幼苗莖部之微細構造，顯示其細胞壁仍未見有次生細胞壁之增厚現象，且細胞質中有甚多之Polysomes (P_0)。(X14,000)(CW：細胞壁)

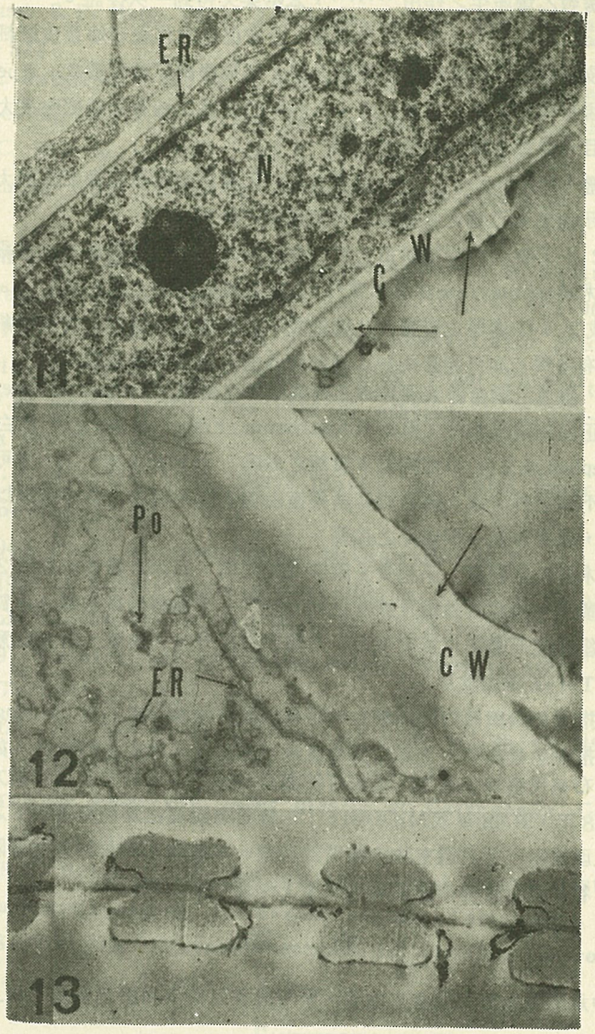
Fig. 9. Fine structure of stem region of 8-day old control etiolated asparagus seedling. Note no thickening of the secondary cell wall, and the abundance of polysomes (P_0) in the cytoplasm. (X14,000)(CW: cell wall)

圖十：經Ethephon,2,4-D或混合處理一天後之白化蘆筍幼苗，顯示處理會加速其次生細胞壁之增厚(↑)。(X14,000)(CW：細胞壁；M：粒線體；L：脂肪)

Fig. 10. One day after Ethephon, 2,4-D or both mixture treated etiolated asparagus seedling. Note the enhancement of secondary wall thickening(↑). (X14,000)(CW: cell wall; M: mitochondria; L: lipid)

圖十一：經Ethephon(500ppm)處理七天後之白化蘆筍幼苗縱切面，顯示其次生細胞壁之增厚現象已相當顯著(↑)，又細胞質中粗內質網形狀正常，polysomes 數量亦多。(X7,000)(ER：內質網；N：核)

Fig. 11. Seven days after Ethephon (500ppm) treated etiolated asparagus seedling. Note the secondary wall thickening(↑), the normal rough ER, and the abundance of polysomes in the cytoplasm. (X7,000)(ER: endoplasmic reticulum; N: nucleus)



圖十二：經高濃度Ethephon(1000ppm)處理七天後之白化蘆筍幼苗，顯示有次生細胞壁之木質化及增厚(↑)，並有部分粗內質網成小球狀，且細胞質中之內含物及 polysomes 顯著減少。(X7,000)

Fig. 12. Seven days after high concentration of Ethephon (1000ppm) treated etiolated asparagus seedling. Note the secondary wall thickening(↑), the vesicular configuration of rough ER, and the highly reduction of polysomes in the cytoplasm. (X7,000)

圖十三：高度木質化細胞壁之微細構造。(X7,000)

Fig. 13. Fine structure of highly lignified cell wall. (X7,000)

討　論

本實驗結果顯示Ethephon及2,4-D之效果相似，此本屬於預料中。因2,4-D是一種人造Auxin，且早已有證據證明它有誘致乙烯產生之作用[10,11]，本結果又得到一次佐證。

本實驗發現Ethephon,2,4-D或二者之混合處理，皆有促進白化蘆筍幼苗皮層細胞變大且層數減少之作用，此結果應是由於皮層細胞分裂受阻，但細胞之擴大却被藥劑促進所造成。Apelbaum & Burg[2,3]在白化豌豆幼苗上亦發現有同樣效果。長久以來，人們早已知道乙烯有延長細胞擴大之作用。它不僅對新分裂之細胞有此作用，且可促進老細胞的再擴大[5]。

在外表上並未發現經Ethephon或2,4-D處埋過之白化蘆筍幼苗有特殊部位膨大之現象。此觀察與豆類作物不同[6,10]，表示蘆筍對乙烯之反應可能比豆類較不敏感。

Ethephon或/及2,4-D對白化蘆筍幼苗之另一作同爲在促進其週圍維管束層細胞之木質化。在自然狀況下，維管束細胞，尤其metaxylem亦有木質化，且隨着株齡漸增（圖五及七）。但維管束細胞在本實驗似乎不受Ethephon或2,4-D處理之影響。此結果表示白化蘆筍之週圍維管束層細胞與維管束之木質部細胞在化學構造上可能有差異，亦可能是由於乙烯較難滲透入維管束所造成。

最近Haard等人[8]發現乙烯會誘致蘆筍嫩莖異構過氧化酵素（isoperoxidase）之形成而引起木質素之合成。本實驗結果正與此發現相符，但却與Apelbaum, Fisher及Burg[4]在白化豌豆幼苗上所發現者相反。他們聲稱Ethephon或2,4-D會抑制木質部之形成（xylogenesis），並可使纖維木質化作用完全免於發生。除了作物不同之外，本人還認爲其結果僅由徒手切片而來，似乎不足以完全採信。欲知乙烯對豌豆細胞分化之影響，似有作進一步切片之必要。

本實驗對於細胞壁木質化之觀察，係用螢光顯微照相技術，此因木質素可吸收260-280nm之光波，而在460-480nm發出螢光，故在紫外燈及適當之濾光鏡下，可觀察到細胞壁上木質化之部位[9]。此法甚爲簡便且迅速。新鮮組織或石臘切片皆可使用，木質化之部分又甚清晰，所須注意者卽如欲照相，應選高速率軟片，例如柯達Tri-X黑白軟片。

近來已有許多證據指出如給與植物體以壓力，將會促進植物體內在乙烯（endogenous ethylene）的急劇產生[1,7]，故本人推測生長在培土下之白蘆筍質地可能深受乙烯含量的影響。如果培土之目的僅爲遮光，則應可用黑色塑膠布來代替培土遮光，此法可使蘆筍生長中免於承受外在的壓力，因而可能會改善白蘆筍的品質。早在1958年，Homna及McArdle[12]曾報導說長在黑色塑膠布下之白蘆筍品質優良，可省却培土費用而降低生產成本，並且還有防除雜草的功效。又德國亦有在黑色塑膠隧道中栽培蘆筍之報導[17]。臺灣如欲求白蘆筍品質之改善則應在栽培技術上作進一步之研究。

致　謝

本實驗在進行期中承蒙馬主任溯軒多方指導，吳昭祥及王銘琪同學亦曾在技術上多方協助，特在此一併致謝。

參考文獻

1. 張珍田. 1972. 加壓對豌豆發芽生理化學之影響，臺大農化研究所碩士論文. 41p.
2. Apelbaum, A., and S. P. Burg. 1972. Effect of ethylene on cell division and deoxyribonucleic acid synthesis in *Pisum sativum*. Plant Physiol. 50: 117-124.
3. Apelbaum, A., and S. P. Burg. 1972. Effects of ethylene and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on cellular expansion in *Pisum sativum*. Plant Physiol. 50: 125-131.
4. Apelbaum, A., J. B. Fisher, and S. P. Burg. 1972. Effect of ethylene on cellular differentiation in etiolated pea seedlings. Amer. J. Bot. 59(7): 697-705.

5. Crocker, W., P. W. Zimmerman, and A. E. Hitchcock. 1932. Ethylene-induced epinasty of leaves and the relation of gravity to it. Contrib. Boyce Thompson Inst. Plant Res. 10: 191-195.
6. Eisinger, W. R., and S. P. Burg. 1972. Ethylene-induced pea internode swelling. Plant Physiol. 50: 510-517.
7. Goeschl, J. D., L. Rappaport, and H. K. Pratt. 1966. Ethylene as a factor regulating the growth of pea epicotyls subjected to physical stress. Plant Physiol. 41: 877-884.
8. Haard, N. F., S. C. Sharma, R. Wolfe, and C. Frenkel. 1974. Ethylene induced isoperoxidase changes during fiber formation in post-harvest asparagus. J. Food Sci. 39: 452-456.
9. Hepler, P. K., and D. E. Fosket. 1970. Lignification during secondary wall formation in coleus: An electron microscopic study. Amer. J. Bot. 57: 85-96.
10. Holm, R. E., and F. B. Abeles. 1967. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced ethylene evolution: its role in soybean hypocotyl swelling. Plant Physiol. 42: 530-531.
11. Holm, R. E., and F. B. Abeles. 1968. The role of ethylene in 2,4-D-induced growth inhibition. Planta 78: 293-304.
12. Homna, S., and F. J. McArdle. 1958. Black plastic for white spear production. Amer. Vegetable Grower 6(5): 45.
13. Johansen, D. A. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill. N. Y.
14. Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyle-glutaraldehyde fixation of higher osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27: 137A-138A.
15. Martin, F. W. 1959. Staining and observing pollen tubes in style by means of fluorescence. Stain Technol. 34: 125-128.
16. Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208-212.
17. Tepe, W. 1969. Growing asparagus under plastic at Geisenheim. Gemüse 5: 23-24. (Hort. Abs. 39(3)# 4653, 1969)
18. Trump. B. F., and R. E. Bulger. 1966. New ultrastructural characteristics of cells fixed in a glutaraldehyde-osmium tetraoxide mixture. Lab. Invest. 15: 368.
19. Watson, M. L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4: 475-478.

Summary

Seven-day-old etiolated asparagus seedlings were sprayed with Ethephon, 2,4-D or both mixture. Within one week, no significent morphological changes could be observed. But under the microscope, the stem region showed the enlargement of cortex parenchyma, and the reduction of cortex layers. Also the lignification of perivascular cylinder was enhanced.

Electron micrographes showed that Ethephon or/and 2,4-D treatment enhanced the secondary wall thickening and the lignification of the cell wall. High concentration treatment even caused the formation of vasicular ER, and the highly reduction of polysomes in the cytoplasm.