

植物组织培养中器官建成的生理生化基础

韩碧文 李颖章

(北京农业大学生物学院, 北京 100094)

ORGANOGENESIS IN VITRO, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS

Han Bi-wen Li Ying-zhang

(Beijing Agricultural University, College of Biological Sciences,

Beijing 100094)

组织培养中器官发生可通过外植体诱导愈伤组织形成, 随后出现根、芽分化, 也可通过外植体直接分化根、芽。无论哪条途径, 愈伤组织诱导和原基的形成是十分重要的, 这一过程被称为脱分化过程。脱分化过程从细胞分裂的启动开始, 经过分裂形成拟分生组织或分生组织中心, 随后形成器官原基。器官原基的形成受外界因素和体内生理生化因素的调节, 本文结合我们课题组工作对国内外这方面的新进展作一简单介绍。

外源激素对器官建成的调节

一般说, 器官诱导对激素的需要是必不可少的。但不同外植体要求不同, 不同的激素作用也不同。曾经在紫苏茎段培养中发现生长素 (IAA) 有抑制花芽分化的作用, 而对营养芽分化有促进作用。相反, 在苜蓿、蓝猪耳和短日性烟草的外植体培养中发现, 这些植物的花芽分化受适当浓度 IAA 促进。后来在苜蓿愈伤组织培养中发现, 高浓度的生长素和低浓度的细胞分裂素刺激芽的形成; 相反, 有利于根的形成。刘涤等[2]报道单独用 IAA 抑制烟草愈伤组织形成芽, 加入 BA 后, 随 BA 浓度升高, 形成芽的数量增多。

我们观察到花生子叶单独用 IAA 诱导, 只生根, 不生芽[6]。红花子叶经 2,4-D (0.25—2 mg/L) 诱导, 则 100% 产生愈伤组织, 没有器官分化。而经 IAA 和 NAA 的诱导, 有根的分化 (未发表资料)。NAA 诱导菊苣外植体形成根, 而 IAA 诱导芽的形成[7]。苋莧叶柄经 2,4-D 诱导, 有胚状体分化[3,11]。IAA、IBA 对花生和核桃芽上根的发生有诱导作用。

对于花生胚芽的诱导, 细胞分裂素是必需的, 但不同种类、不同浓度其效果不同: BA 最有效, ZT 次之, KT 效果不显著, 0.2—2 mg/L 的 BA 可 100% 诱导生芽。对于诱导花生外植体营养芽的分化, BA 的效果大于 KT。对于诱导花芽的分化, KT 的效果大于 BA[5]。同样我们在烟草薄层培养中也有此结果[8]。类似于 Tran Thanh Van 报道的, 烟草花茎薄层培养 10^{-6}

mol/L KT诱导形成花芽, 10^{-5} mol/L BA诱导营养芽的形成[24,25]。

器官发生过程中, 外源激素之间的相互作用很微妙, 现将我们实验室这几年来研究所得结果列于表1。

表1 外源激素配比对器官建成的影响

外植体	生长素浓度mg/L	细胞分裂素浓度mg/L	分化情况	参考文献
花生: 子叶	NAA: 0.5	BA: 2	60% 芽	[6]
	2	2	20% 芽	
	IAA: 0.5	BA: 5	60% 芽	
	2	5	87% 芽	
红花: 幼叶及顶芽 子叶	NAA: 0.1	BA: 0.5	45% 芽	(未发表资料)
	NAA: 0.1	BA: 0.5	20% 芽	
核桃: 茎尖 叶	NAA: 0.5	BA: 1.0	芽	[4]
	NAA: 0.1—0.5	BA: 0.1—1.5	愈伤组织	
茛苢: 叶柄	2,4-D: 0.5		胚状体	[3]
烟草薄层培养:	NAA: 5×10^{-7} — 10^{-6} mol/L	BA: 10^{-5} — 10^{-6} mol/L	营养芽	[8]
	NAA: 10^{-6} mol/L	BA: 10^{-7} mol/L	根	
	2,4-D: 10^{-7} mol/L	BA: 10^{-6} mol/L	花芽	
	NAA: 10^{-6} mol/L	KT: 10^{-6} mol/L	根、愈伤组织	
菊苣薄层培养:	IAA: 10^{-6} mol/L	BA: 10^{-6} mol/L	营养芽	
	NAA: 10^{-6} mol/L	BA: 10^{-6} mol/L	根	
	NAA: 10^{-6} mol/L	KT: 10^{-6} mol/L	根	
	2,4-D: 5×10^{-7} — 10^{-6} mol/L	BA: 10^{-6} mol/L	愈伤组织	

生长素和细胞分裂素的平衡对于诱导原基的形成非常重要, 但该平衡不是原基发育始终所需要的。如在胚状体发生中, 培养早期胚性细胞的诱导需高浓度的生长素存在, 而后期胚性细胞的发育需较低或不需生长素[11,12]。Van der Krieken等[26]报道在诱导烟草花芽形成中, 培养的前2天对BA的需要及前5天对NAA的需要很明显, 随后两者的存在没有决定性作用。

有报道GA在一些植物的愈伤组织培养中对诱导根的形成有促进, 如GA刺激豌豆愈伤组织中根的形成; 对芽的发生常有抑制作用, 如GA₃抑制烟草愈伤组织培养中芽的型成[2]。但我们在核桃胚培养中及大丽花的芽诱导中发现GA是不可缺少的[1,4]。

脱落酸(ABA)对芽的形成的效应没有一致规律。ABA刺激秋海棠叶片外植体上芽的形成, 而对烟草愈伤组织上芽的形成无效, 但抑制豌豆愈伤组织根的形成。

器官建成的生理生化基础

(一) DNA、RNA和蛋白质的合成: 在器官建成中, DNA、RNA、蛋白质的合成都有所增加。在诱导绿豆子叶形成愈伤组织中, 初期有明显的RNA增加, 后期DNA略有增加。总

的RNA含量的增加主要是25S和18S的rRNA^[9]。另有报道诱导烟草愈伤组织形成芽,RNA和蛋白质均有增加^[23]。Renaudin等^[21]在诱导矮牵牛愈伤组织形成芽中,测定了蛋白质含量的变化,发现在培养的第14天,形成芽的愈伤组织中蛋白质含量达到高峰,随后有所下降。培养5周后,形成芽的愈伤组织中蛋白质含量是没有器官分化的愈伤组织的5.7倍。通过烟草薄层培养,发现诱导形成花芽原基的细胞内DNA含量明显高于营养芽原基和愈伤组织^[10]。Leshem等^[17]测定了甜瓜子叶在不同培养条件下器官的形成与其子叶内贮藏蛋白的关系,发现分子量在20—25kD的多肽与器官发生紧密相关,子叶培养在含生长素的培养基上,体内20—25kD多肽出现在3天以上,则子叶形成根,若子叶不表现出该多肽的存在,即使培养在含生长素的培养基中也不形成根。子叶培养在含细胞分裂素的培养基上,体内20—25kD多肽的存在少于3天,则子叶形成芽。可见,多肽可以作为根、芽器官发生的参数。

(二) 碳水化合物的代谢和利用: Thorpe等在烟草愈伤组织诱导芽的实验中,发现淀粉积累的高峰出现在拟分生组织形成之前,通过测定淀粉代谢中有关酶的活性,表明淀粉的积累是合成活性增加的结果,而在拟分生组织和原基形成时淀粉有所下降是由于淀粉的利用速度的增加所致。Thorpe等认为淀粉和游离糖可能是作为形态建成过程中迅速可利用的贮藏的能源^[14,22,23]。

形成芽的愈伤组织比不形成芽的愈伤组织有较高的呼吸作用。在形成芽的组织中苹果酸代谢有关的酶活性高于非器官形成的组织,可产生更多的NADP,NADPH的利用更完全^[23],这表明在器官建成组织中要求更高的还原能力。

(三) 氮同化和氨基酸代谢: 形成芽的组织比不形成芽的组织有较高的全氮、蛋白氮、亚硝态氮。而且具有高的硝酸还原酶活性,但亚硝酸还原酶的活性在两者中是相同的。另外,在形成芽的组织中氨基酸的水平高于非芽形成的组织^[22]。

(四) 同工酶: 红花子叶外植体脱分化过程中发生了过氧化物酶活性与同工酶谱及酯酶同工酶谱的变化。过氧化物酶活性在培养18天时达到最大,以后开始下降,24天又上升。同工酶条带在18天时也随之增加,以后减少,但在30天出现了原来未有的条带(阳极端),阳极端过氧化物酶同工酶带与IAA降解有关。红花组织容易生根也许与此有关。红花组织的酯酶同工酶随脱分化而逐渐减少,而且在不同激素作用下产生特异酶带,所以可作为脱分化和再分化的指标^[12]。

(五) 内源激素: 在培养介质中外源激素的平衡对于形态建成的重要性已受到重视。然而,最关键的是组织内部的和器官形成部位的生长调节剂的平衡。但到目前为止,有关分化时内源激素的变化的资料较少,这可能是由于测定方法上的困难限制了这方面的进展。(1) 生长素: 我们用酶联免疫法(ELISA)检测烟草不同茎段表皮薄层中的IAA含量,证明在花茎中IAA含量为营养茎中的2倍。用同样方法我们测定了绿豆下胚轴切段生根中内源IAA的变化,在插条切下初期内源IAA含量有所下降,随后迅速上升,至根原基出现后达到最高水平,为原水平的10倍。在烟草中,形成芽的组织比愈伤组织内源IAA含量明显下降,而内源CK的含量形成芽的组织为愈伤组织的4倍,所以,CK/IAA的比值在形成芽的组织中和愈伤组织中相差很大,形成芽的组织中CK/IAA的比值高得多^[2]。(2) 细胞分裂素: Bollmark等^[13]测定了在豌豆切枝生根中,内源iPA和ZR在切枝基部不定根的形成中的变化,开始在切枝中iPA和ZR含量均有下降,然后维持在一低水平,2—3天后,当根原基发育时,两者都迅速升高。我们在绿豆下胚轴切

段生根中测定了内源ZR+ZT的变化,发现ZR+ZT水平在切枝初期亦有一下降,但在根原基出现之前,其上升较慢。这说明生长素和细胞分裂素对不定根和芽的形成有调节作用。(3)赤霉素:不同的组织对外源GA的反应不同,这可能与内源GA水平不同有关。烟草愈伤组织含GA类似物,所以外源GA对其器官建成有抑制作用,而拟南芥愈伤组织器官的形成受GA的刺激,可能其组织内源GA水平较低^[22,23]。大丽花的芽分化受GA促进,可能也是因其内源GA的不足所致。Noma等^[19]报道,外源GA₃对胡萝卜胚状体的形成也有抑制作用。而细胞内部,形成胚和不形成胚的细胞中内源GA的含量和种类有很大差异,在形成胚的细胞中,含低水平的GA₁,但GA_{4/7}的含量较高,不形成胚的细胞中GA₁含量高,而GA_{4/7}的含量较低。这说明器官发生对不同种类GA敏感性不同,胡萝卜胚状体的形成受内源GA₁的抑制,但对GA_{4/7}的敏感性较小。(4)脱落酸:诱导胡萝卜形成胚状体时,在培养的前7天,也就是胚状体诱导期,形成胚和不形成胚的细胞中,内源ABA都维持在一低水平,在胚状体发育期,内源ABA的变化出现不同,在形成胚的细胞中,在培养的第10天,ABA含量上升到最高值(26ng/g鲜重),然后下降,到第13天时,降低到8ng/g鲜重;而在不形成胚的细胞中,ABA含量一直在增加,到第13天达到最高(80ng/g鲜重),然后下降,到第17天降低到一低水平。所以说ABA在胚状体发育期有很重要的作用^[16]。(5)乙烯:在形成芽的愈伤组织中比不形成芽组织中产生的内源乙烯要少,在芽形成中培养早期(0—5天)比后期乙烯产生得多,黑暗中生长的组织比光下的组织产生的乙烯要多得多。乙烯在芽形成中有二个相反的效应:在培养早期(0—5天)内源或外源乙烯抑制器官发生;但后期(5—10天)外源乙烯或提高内源乙烯的产生加速原基的形成^[22]。因此,如果在分化的早期减少内源乙烯的产生,在拟分生组织和原基的形成过程中增加乙烯的产生,可以提早原基的发生,使其向芽的发育更快和更同步。

细胞学和组织学研究

我们在烟草薄层培养中观察到外植体培养24—48小时后,接近培养基的几层薄壁细胞的细胞核离开细胞壁,移向细胞中央,核膨大,细胞质变浓。培养3—5天后,发生分裂。与此同时,外皮层细胞发生垂周分裂,其中有的分裂细胞,细胞质浓,核质比大,分裂活跃,直接的营养芽和花芽在此起源^[8]。这与Tran Thanh Van等的研究结果一致。另外,Tran Thanh Van和Dien使用放射自显影技术于烟草表皮层,发现³H-胸腺嘧啶在24小时内渗入形成芽的组织中,而对照中很少^[25]。在蓝猪耳茎段也得到同样结果。

最近,Mersch等^[18]观察了在烟草薄层培养中诱导花芽和根的形成中的有丝分裂的活性变化。发现外植体培养3—4天在亚表皮层发生有丝分裂,在第6天,有丝分裂达到高峰,随后在第6天到第11天之间情况有所不同,在根形成中,有丝分裂在第6天后仍维持高频率,而在花芽形成中在第6天后,细胞分裂频率有所降低,第9天和第10天,又开始增加。引起花芽和根形成的有丝分裂的不同变化的原因还不清楚。

Thorpe等^[23]用组织化学法研究了烟草愈伤组织中芽的形成。在拟分生组织和芽原基形成中,RNA和蛋白质染色加深,有趣的是,在形成芽的部位,组织中淀粉大量积累并且随后又消失了。辐射松形成芽的子叶外植体有脂肪和蛋白质的贮藏^[14,23]。我们在红花的组化切片上看到了油滴的积累和消失与芽原基的形成有关,莨菪的胚状体分化与淀粉积累有关,

而核桃则积累油滴。这说明不同植物器官建成与胚胎建成时对能量的利用是不同的。贮藏物的积累利用是细胞分化中的普遍特性。

组织间与细胞间的相互关系

Chlyah^[15]发现在蓝猪耳茎段上芽分生组织发生于表皮, 根分生组织起源于维管组织。而表皮和维管束之间的薄壁组织没有表现出形态建成的潜势。然而, 将茎段的不同组织分离, 进行分别培养就会表现出不同的形态建成类型: 表皮单独培养则死亡, 而将它离体后再放回原来的位置上, 就有愈伤组织形成并有芽的形成。亚表皮薄壁细胞单独培养形成根, 如果和表皮一同培养则形成芽和根。我们对烟草不同组织进行分别培养情况则不完全相同, 亚表皮薄壁细胞单独培养只发生外植体的膨胀, 没有根分化; 去表皮后, 再将表皮复位, 然后一起培养, 则外植体可直接分化芽^[8]。同样Pélissier等^[20]在向日葵下胚轴薄层培养诱导胚状体时发现, 培养下胚轴的不同组织发生不同形态建成: 完整的下胚轴薄层可形成愈伤组织和胚状体; 而去表皮后的下胚轴薄层只形成愈伤组织, 没有胚状体; 离体后的表皮, 再和下胚轴薄壁组织一同培养则又有胚状体出现。由此可见, 细胞之间的相互联系对形态建成有调控作用。Williams等^[27]从单层或多层、单个或多个细胞起源的体细胞胚胎发生方面观察了细胞间的相互作用; 培养幼嫩的组织, 整个组织都保留有分裂的能力, 则从多层细胞起源形成胚状体; 培养的外植体只有表皮未成熟, 其它组织成熟, 则只从幼嫩的一层表皮上起源形成多细胞的胚状体; 培养的外植体较老, 只有个别的表皮细胞未成熟, 则只从未成熟的表皮细胞起源形成单细胞起源的胚状体; 若培养的组织完全成熟, 则胚胎发生只有通过愈伤组织诱导, 发生再决定。那么, 在器官发生中, 组织间和细胞间的相互作用的实质是什么? 信息, 物质交换如何等, 到目前我们还了解很少, 这一系列问题有待我们做进一步探讨。

结 束 语

器官建成是一复杂的、受多种内、外因素调控的过程, 通过至今已40多年的研究, 对一些调控因素有了初步了解, 但对在分子水平上的调控却了解甚少。现已开始注意到有关生理、生化变化, 发现在器官建成中有核酸和蛋白质的合成, 并且在这一过程中内源激素的变化非常重要, 但由于测定方法上的限制, 这方面工作进展较慢。碳水化合物在形态建成中有二方面作用: 提供能量(ATP)和作为渗透调节剂。原基的形成是一需高能量的过程, 表现在有淀粉的积累和利用。这一过程也需高的还原能力(NADPH), 氮同化和氨基酸代谢证明了这一点。

由于通常组织培养取材上的限制, 一些组织的形态建成的能力被其在组织中的地位掩盖了, 所以找到一个真正合适的实验体系对于了解器官发生是至关重要的, 由此才能真正使我们对器官建成的研究进入到一新的领域。

参 考 文 献

- [1] 韦三立等, 1990, 北京农业大学学报, 16 (4): 381—385
- [2] 刘 涤等, 1986, 植物生理学报, 12 (1): 104—108。
- [3] 刘淑兰等, 陈正华主编: 人工种子, 第十二章。1990, 高等教育出版社。
- [4] 刘淑兰、韩碧文, 1986, 北京农业大学学报, 12: 143—148。
- [5] 吴 琦、韩碧文, 1983, 实验生物学报, 169 (2): 119—125。
- [6] 李爱民、吴 琦, 1988, 植物学通报, 5 (3): 143—145。
- [7] 李颖章、韩碧文, 1990, 北京农业大学学报, 16 (4): 436。
- [8] 章美云、韩碧文, 1989, 植物学通报, 6 (2): 86—89。
- [9] 崔 激等, 1984, 中国科学B辑, 10: 910—914。
- [10] 曹国仪、唐锡华, 1989, 植物生理学通讯, (3): 47—49、
- [11] 韩碧文、刘淑兰, 1988, 植物生理学通讯, (1): 9—15。
- [12] 靳占忠、韩碧文, 1989, 植物生理学通讯, (3): 15—18。
- [13] Bollmark, M. et al., 1988, *J. Plant Physiol.*, 132: 262—265.
- [14] Brown, D. C. M., 1986, In: I. K. Vasil (ed.): *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of plants*, Vol. 3, pp. 49—65. Academic Press, New York.
- [15] Chlyah, H., 1974, *Plant Physiol.*, 54: 341—348.
- [16] Kamada, H. et al., 1981, *Plant & Cell Physiol.*, 22 (8): 1423—1429.
- [17] Leshem, B. et al., 1990, *J. Plant Physiol.*, 137: 155—159.
- [18] Mersch, G. et al., 1990, *Can. J. Bot.*, 68 (11): 2501—2508.
- [19] Noma, M. et al., 1982, *Planta*, 155: 369—376.
- [20] Pelissier, B. et al., 1990, *Plant Cell Reports*, 9: 47—50.
- [21] Renaudin, J. P. et al., 1991, *Physiol Plant.*, 82: 48—56.
- [22] Thorpe, T. A., 1983, In: L. D. Owens (ed.): *Genetic Engineering, Applications to Agriculture*, pp. 258—303. (Beltsville Symposium 7) Rowman & Allanheld, Totowa.
- [23] Thorpe, T. A., 1981., In: *Advances in Cell Culture*, Vol. 1, pp. 213—239.
- [24] Tran Thanh Van, K., 1980, In: *International Review of Cytology, Supplement 11A*, pp. 175—194.
- [25] Tran Thanh Van, K., 1977, In: W. Barz, E. Reinhard and M. H. Zenk (eds.), *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application*, pp. 367—385. Springer-Verlag, Berlin.
- [26] Van der Krieken, W. M. et al., 1990, *Plant Physiol.*, 92: 565—569.
- [27] Williams, E. G. et al., 1986, *Annals of Botany*, 57: 443—462.