

- [14] Tas, P. W. L. and O. H. W. Martini., 1987, *FEBS*, 163:561-567.
- [15] Mart, A. T., et al., 1985, *J. Embryol. Exp. Morph.*, 89(Suppl.):35-51.
- [16] Sripat, C. E. and M. Cuny., 1987, *FEBS*, 162:669-674.
- [17] Audent, R. G., et al., 1987, *Dev. Biol.*, 121:58-68.
- [18] Masui, Y. and C. Markert., 1971, *J. Exp. Zool.*, 177:129-145.
- [19] Gerhart, J., et al., 1984, *J. Cell Biol.*, 98:1247-1255.
- [20] Wasserman, W. J. and Y. Masui., 1975, *Exp. Cell Res.*, 91:381-388.
- [21] Marcel Doree, 1982, *Exp. Cell Res.*, 139:127-133.
- [22] Maller, J. L., et al., 1977, *Dev. Biol.*, 58:295-312.
- [23] Spirack, J., et al., 1984, *Mol. Cell Biol.*, 4:1631-1643.
- [24] Carmen, B., et al., 1985, *Cell*, 43:615-620.
- [25] Smith, B., et al., 1984, *Dev. Biol.*, 102:79-89.
- [26] Reynhot, J. K. and L. D. Smith., 1974, *Cell Differ.*, 2:247-254.
- [27] Gerhart, M., et al., 1984, *J. Cell Biol.*, 98:1247-1255.
- [28] Cyert, M., et al., 1985, *Cell Differ.*, 16 (Suppl.):442.
- [29] Ford, c. c., 1985, *J. Embryol. exp. Morph.*, C 89, Suppl.:271-284

薄层细胞培养在细胞分化研究中的应用

陈永宁 李文安

(中国科学院上海植物生理研究所)

植物细胞分化是一个在时间上、空间上有序进行的过程,不但与自身的生理生化活动有关,也与外界环境因子的变化有关。如果从整株植物水平上来研究其分化发育的机理,由于变化的因素很多,研究起来难度较大。而植物细胞培养技术,采用植物的一部分做外植体,培养在可调节光强、温度,以及可加入不同化学物质的半封闭容器中,是用来研究细胞分化的好方法^[1]。在器官分化的研究工作中,尤其是花芽的分化,利用薄层细胞培养技术的研究比较有特色,作者将已知文献作一介绍。

一、薄层细胞培养的历史

1970年,Tran Thanh Van和Drira^[2]用*Nautilocalyx lynchei* L.作材料成功地进行了薄层细胞培养。在此之前,曾用毛叶秋海棠(*Begonia rex*)作材料尝试薄层细胞培养,但未获得器官分化^[3]。薄层细胞培养采用的外植体

可取自叶脉、叶柄和茎,用镊子从这些部位撕下由表皮层细胞和数层薄壁细胞组成的组织块,因此其组织成分比较简单,这是薄层培养优于其他组织培养的地方。在适宜的培养条件下,芽和根可以直接从外植体上分化出来。据报道,已有十几个属的植物进行过薄层培养^[4,5]。如*Nicotiana*(烟草属),*Begonia*(秋海棠属),*Nautilocalyx*,*Saintparlia*,*Brassica*(芸苔属),*Catharanthus*(长春花属),*Solanum*(茄属),*Torenia*(蓝猪耳属),*Lens radicularis*(兵豆属),*Cichorium*(菊苣属),*Psophocarpus*(四稜豆属),*Vicia*(蚕豆属),*Douglas fir*(黄杉属),*Ochrosia elliptica*(椭圆玫瑰树)等等。其中,在烟草属、菊苣属、蓝猪耳属植物的薄层培养中,除了分化营养芽、根及形成愈伤组织外,还能直接分化出花芽。另外,用菊花花瓣的表皮、落地生根叶片的下表皮进行的薄层培养也有过报道^[6,7]。

二、激素对器官分化的影响

1973年, Tran Thanh Van在烟草(*N. tabacum* W. 38)薄层培养中,通过调节培养基中生长素与细胞分裂素的比例以及糖的浓度,在外植体上直接诱导分化出花芽、营养芽、根及愈伤组织^[8,9]。进一步报道(1974)^[10]表明,用烟草花枝表皮层细胞培养时,诱导各种器官分化的最佳条件是:花芽——IAA 10^{-6} mol/L、Kinetin 10^{-6} mol/L、蔗糖3%;营养芽——IAA 10^{-6} mol/L、6-BA 10^{-5} mol/L、蔗糖3%;根——IBA 10^{-5} mol/L、Kinetin 10^{-7} mol/L、蔗糖1%。以上都培养在光下。而当培养在黑暗中,2,4-D 5×10^{-6} mol/L、Kinetin 10^{-7} mol/L、蔗糖3%,则是愈伤组织形成的最适条件。从上面可见,激素的种类和用量是分化何种器官的关键。

在另一个烟草品种(*N. tabacum* CV. Sam-sun)的果柄薄层细胞培养中,进一步看到了激素对花芽形成的影响^[11]。实验结果表明,花芽的分化主要取决于细胞分裂素类激素的浓度,而生长素类激素的辅助效应则较复杂。在培养的早期, 10^{-6} mol/L的NAA减少花芽的形成和延缓花芽的发育,而在培养的后期, 10^{-6} mol/L的NAA却促进花芽生长。因此,把外植体先在含有低浓度的NAA的培养基中预培养3—5天,然后转移到含有较高浓度NAA的培养基中,效果最好。采用预培养的方式,还确定了激素作用的时间(即先在含有适宜花芽分化的激素浓度的培养基中培养几天,然后转移到不适宜分化的低浓度激素的培养基中)。只要预培养3天,花芽形成率就能达到对照的(一直培养在含有适宜激素浓度的培养基中)一半。

在烟草革新一号和粘烟草的薄层培养中,还观察到激素诱导器官分化时出现的极性现象。培养基中IAA和KT的浓度相等(10^{-6} mol/L)时,花芽原基发生在外植体的形态学下端。KT浓度提高(10^{-5} mol/L)则两端均发生营养芽

原基,KT浓度降低(10^{-7} 或 5×10^{-7} mol/L)则两端发生愈伤组织,极性消失。这种极性现象可能与激素的极性分布和由之引起的生化物质(如成花因子)的移动有关^[12]。

其他三种激素(GA、ABA、乙烯),除GA₃有报道其有抑制花芽分化的作用外^[13],其余两种未见有报道。

三、母体植株生理状态对器官分化的影响

采用开花的烟草植株进行薄层培养,可以诱导分化出花芽、营养芽、根等器官,而采用尚处于营养生长阶段的烟草作材料,却无法诱导分化出花芽^[11,14]。花芽分化率的高低取决于外植体所取的部位。如在同一培养条件下,从花枝部位取的外植体,形成的芽全是花芽,而从基部取的外植体,形成的芽全是营养芽^[9]。这种成花梯度的表现还受外源激素的影响^[15]。当NAA为 10^{-7} mol/L时,成花率从植株基部到顶端是逐步增加的;NAA的浓度为 10^{-6} mol/L时,成花率到了植株中部才开始上升。

母体植株的发育状况也影响成花率。外植体取自有花蕾但尚未开花的烟草时,其成花率高于已开花植株的成花率^[16]。在开花前两天和开花后两天取的外植体,成花率都比较低^[16]。去除茎尖的实验证明成花梯度与植株的发育状况有关,而不是由于茎尖产生成花物质扩散下来造成的^[16]。在这种前提下,植物激素诱导花芽分化的作用可能只是一种“扳机”作用,即给那些已处于生殖生长分化状态的细胞提供了适宜的条件。

此外,在单倍体、亚单倍体烟草的薄层培养中,花芽分化率高于其二倍体的植株,花芽出现的时间也较快^[17,18]。

四、器官分化的起源以及

组织间的相互作用

在烟草的薄层培养中,组织解剖、放射自显影以及电镜观察的结果表明:所有的器官分化和愈伤组织的形成都起源于亚表皮细胞^[4]。

进一步研究表明,在培养中,表皮细胞和亚表皮细胞是同步分裂的,但表皮细胞只有垂周分裂,不能形成分裂中心。只有亚表皮细胞既有垂周分裂,也有平周分裂,故此才能形成分裂中心,进而形成花芽^[19]。但在这个实验中,愈伤组织起源于薄壁组织细胞。在蓝猪耳的薄层培养中,根起源于薄壁组织细胞,芽起源于表皮或亚表皮细胞^[20]。而在 *Nautilocalyx lynchei* 的薄层培养中,芽和根均起源于表皮^[21]。

如果用烟草花枝切段培养,则只有形成层细胞形成愈伤组织和花芽,亚表皮细胞似乎“沉默”了,但离开了亚表皮细胞(即把带有形成层细胞的组织块与亚表皮细胞分离开来培养),形成层细胞只形成营养芽和愈伤组织。而亚表皮细胞与形成层细胞分离后,分化能力就“苏醒”了。这种分离效应很复杂。如蓝猪耳的表皮单独培养时不能成活,但撕下后又放回到茎切段上的表皮能产生愈伤组织并形成芽;亚表皮层薄壁细胞单独培养时,分化出根;与表皮连在一起,则能分化出芽和根^[20]。毛叶秋海棠的表皮层细胞从主叶脉上分离下来后,除了分化芽、根,还能形成单细胞毛^[41]。

五、生化因素对器官分化的影响

1. 多胺 腐胺和十二甲基二胺(*duodecylmethyldiamine*)都存在于开花的烟草中。但在丧失开花能力的杂交烟草的薄层培养中,加入这两种多胺,都未能诱导花芽形成^[4]。

Torrigan 等人^[21]在烟草(*N. tabacum* CV. Samsun)的薄层培养中,测定了外植体中游离型和结合型多胺的量变化。发现在花芽和营养芽大量分化期间,游离型和结合型的腐胺量增加了5—60倍,亚精胺也有增加,但精胺却没有什么变化。腐胺在培养一开始后就迅速上升,是芽分化过程中量最多的多胺,而且高峰出现在花芽或营养芽分化之时。

Galston 等人^[22]的报道指出,在烟草(*N. tabacum* W. 38)薄层培养中:1. 花芽中的亚精胺含量大大高于营养芽;2. 亚精胺生物合成

抑制剂(*cyclohexylamine*)抑制了亚精胺的增加,也抑制了花芽的分化,但促进了营养芽的分化。这种对花芽分化的抑制可加入外源亚精胺来缓解;3. 在那些原本只能形成营养芽的培养中,加入亚精胺能诱导花芽形成;4. 在营养芽分化时,腐胺量占优势,而花芽分化时,亚精胺量占优势。

这些结果虽不一致,但表明多胺与薄层培养中的器官分化有关。

2. 寡聚糖 寡聚糖是细胞壁多糖的降解物,其生物活性近年来颇受关注^[23]。Albersheim 和 Darvill 在烟草薄层培养中加入由假挪威槭(*Sycamore*)细胞壁降解物形成的寡聚糖混合物,其中一组混合物抑制花芽分化,促进营养芽形成。另有一组混合物使原来长营养芽或愈伤组织的外植体分化出大量的根^[23]。寡聚糖也能使原来只长营养芽的外植体分化出花芽^[24]。在组织内部,壁的降解以及产物的类型有可能受到酶或其他物质的控制,这还有待于证实。

3. 碳源 碳源是薄层培养中器官分化所必需的。如果培养基中没有葡萄糖或葡萄糖少于30 g/L,即使其余条件利于花芽分化,在18天内也无芽分化,只是3星期后才有少量芽出现。培养开始后的第六天到第十天,是需碳关键期,这时缺乏葡萄糖就会影响花芽分化^[4]。另有报道,至少需要在有葡萄糖的培养基中预培养2天,才能保证在3星期内有花芽出现。预培养的天数越多,花芽数也越多,最适的天数是10天以上。此外,蔗糖与葡萄糖混合使用的效果比它们各自单独使用好。

外植体超微结构的研究发现:分化花芽的外植体其细胞的质体中积累了大量的淀粉,而分化根的外植体其质体中的淀粉在培养的第一天就显著减少^[25]。

一般认为碳源为器官分化提供能量。花芽的分化可能需要更多的能量。

六、物理因素对器官分化的影响

1. 光 在薄层培养中,光也是器官分化所

需的^[4]。但强光抑制分化,甚至抑制愈伤组织的形成。适于花芽形成的区间是 15 000—90 000 $\text{erg}/\text{cm}^2 \cdot \text{秒}$ 。在使用弱光时(10 000—20 000 $\text{erg}/\text{cm}^2 \cdot \text{秒}$), 625 nm 波长的光对花芽分化有刺激作用,而 475—500 nm 的光刺激营养芽、愈伤组织的形成。也有人报道 400—425 nm 的光能促进花芽形成。从这些报道来看,有些光的波长与光敏色素的吸收波长较接近,但未见有关的详细报道。和需碳关键期相似,培养后的第七天到第十天是需光关键期。如果从第七天起在黑暗中培养,形成的芽全是营养芽,而对照(一直培养在光下)形成的芽全是花芽^[4]。但要是培养基中没有碳源,仅有光照也无用。而在黑暗中培养,只要调整蔗糖与葡萄糖的比例,花芽照样能分化出来。在双二倍体和加倍的单倍体烟草的薄层培养中,也有类似情况^[18]。

用长日照和短日照烟草品种作材料进行薄层培养,花芽的诱导分化一度没有成功,而引起人们对光周期作用的关注^[14]。近年来有人报道短日照烟草品种也能在薄层培养中分化出花芽^[13]。从烟草这个例子看来,光周期对体外开花的影响在于母体。只要母体植株已经开花,其外植体在离体培养中能否分化出花芽与培养的光照周期无关。

2. 温度 单倍体烟草的薄层培养^[26],如果培养温度分成 12°C、22°C、24°C、27°C,花芽形成的数目则随温度上升而增加,而且花芽出现的时间越短。除了培养温度的影响,母体生长环境的温度亦可间接影响器官分化。如毛叶秋海棠的薄层培养。只有当外植体取自生长在 17°C 环境中的母体植株,并培养在 24°C 的条件下,外植体的表皮细胞才能大量分化成单细胞毛^[4]。在蓝猪耳的培养中,36°C 的高温处理使花芽分化延缓。

3. 其他物理因素 薄层培养一般采用加有琼脂的固体培养基。如果把外植体漂浮培养在液体培养基上,则只有营养芽形成,无花芽出现。加入玻璃珠后,能恢复外植体分化花芽的能力。究其原因,可能与玻璃珠防止培养基

酸化有关。因此,不加玻璃珠而调节培养基的 pH 值,也使外植体恢复了分化花芽的能力^[27]。用折叠的滤纸代替玻璃珠,不让外植体直接接触培养基,花芽分化也不受影响^[13]。

其它如培养容器的形状和 CO_2/O_2 的比例都对花芽分化有影响。

七、与器官分化有关的酶

一般认为,植物的分化发育是基因表达变化的结果。现在已知道在许多分化发育的过程中伴随着有关蛋白质的合成及酶的活力变化。在薄层培养中,人们也在寻找与器官分化有关的酶。

Thorpe 等人^[28]研究了烟草薄层培养中的过氧化物同工酶的含量及活性变化,发现酶是梯度分布的,即取自茎顶端的外植体,其酶含量最少,越靠近基部取的外植体,其酶含量越高。基部取的外植体其酶活性是茎顶端外植体的 60 倍左右。培养期间,随着花芽分化,酶活性迅速增加。营养芽、根分化时,也有一个酶活性先上升后下降的过程。Sergeeva 等人研究了烟草(*N. tabacum* Trapezond)中过氧化物酶、IAA 氧化酶与花芽分化的关系,结果与 Thorpe 等人的类似^[29]。由于培养基中加有生长素,所以很难确定这些酶活性的增长是否与器官分化有直接关系。此外,测定内源 IAA 在整株烟草上的分布的结果也表明,烟草茎中并无相应于酶梯度分布的内源 IAA 梯度^[30]。

用同位素标记法测定蛋白质含量及种类变化的实验没有发现与花芽分化密切相关的蛋白质^[31]。

八、结束语

薄层培养已经成为研究细胞分化的一种手段。使用激素、多胺、寡聚糖等化学物质来控制器官分化,以及 DNA 含量分析^[12,32]及酶活性测定等探索性的研究,都是很有意义的,比如可以为进一步认识细胞全能性和决定(totipotence and determination)提供证据。此外,这种

方法也可望用于植物嵌合体的研究。

但是,薄层细胞培养采用的外植体体积小,生化分析时取样有困难,而且到目前为止,为了得到花芽分化,如烟草,必须采用开花的植株,因此准备实验材料的周期比较长,尤其是在没有温室条件下更是如此。

摘 要

在薄层培养中,不同的器官(如花芽、营养芽、根以及单细胞毛)可以从外植体上直接(不经过愈伤组织)分化出来。在烟草的薄层培养中,所有器官都起源于亚表皮细胞。器官的分化受控于植物激素、糖、多胺、寡聚糖等化学物质以及母体植株的生理状态。环境因素(如光)和生化因素(如核酸、酶)对器官分化影响的研究,都还处于探索性研究阶段。

参 考 文 献

- [1] 罗士书, 1978, 植物生理学报, 4:91-112.
- [2] Tran Thanh Van, M., Drira, A., 1970, In: Les cultures de tissus de plantes. Coll. internat. C. N. R. S. 193:169-176.
- [3] Tran Thanh Van, K., Trinh, H., 1978, In: T. Thorpe (ed.) Frontiers of Plant Tissue Culture 1978, Univ. of Calgary Press, Calgary, Alberta, pp. 37-48.
- [4] Tran Thanh Van, K., 1980, In: Indra K. Vasil (ed.), International Review of Cytology, Supplement 11 A, Academic Press, pp. 175-194.
- [5] Tran Thanh Van, K., 1977, In: W. Barz (ed.), Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application, Springer, Berlin, pp. 367-385.
- [6] Bush, S. R. et al., 1976, Amer. J. Bot., 63(6):729-737.
- [7] Bigot, C., 1976, Can. J. Bot. 54:852-867.
- [8] Tran Thanh Van, M., 1973, Nature, 246 (5427):44-45.
- [9] Tran Thanh Van, M., 1973, Planta, 115: 87-92.
- [10] Tran Thanh Van, M., et al., 1974, Planta, 119:148-159.
- [11] Van den Ende, G. et al., 1984, Physiol. Pl. 61:114-118.
- [12] 曹国仪、唐锡华, 1988, 植物生理学通讯, 3:47-49.
- [13] Rajeevan, M. S., Lang, A., 1987, Planta, 171:560-564.
- [14] Bridgen, M. P., R. E., Veilleux, 1985, J. Amer. Soc. Horti. Sci. 110 (2):233-236.
- [15] Croes, A. F., et al., 1985, J. Exp. Bot., 36(172):1771-1779.
- [16] Barendse, G. W. M. et al., 1985, Biologia Plantarum, 27(4-5):408-412.
- [17] Tran Thanh Van, M., 1981, Ann. Rev. Pl. Physiol. 32:291-327.
- [18] Altamura, M. M. et al., 1986, Plant Science, 46:69-75.
- [19] Van den Ende, G. et al., 1984, Physiol. Pl. 62:83-88.
- [20] Chlyah, H., 1974, Pl. Physiol. 54:341-348.
- [21] Torrigiani, P. et al., 1987, Physiol. Pl. 70:453-460.
- [22] Kaur-Sawhney, R. et al., 1988, Planta, 173:282-284.
- [23] Albersheim, P., Darvill, A. G., 1985, Scientific American, 253(3):44-50.
- [24] Tran Thanh Van, K., et al., 1985, Nature, 314:615-617.
- [25] Nassogne, C. et al., 1986, Arch. int. Physiol. Biochim. 94(3):55.
- [26] Hanh, T. T., Tran Thanh Van, K., 1981, Z. Pflanzen. 101(1):1-8.
- [27] Cousson, A., Tran Thanh Van, K., 1981, Physiol. Pl., 51:77-84.
- [28] Thorpe, T. A., et al., 1978, Physiol. Pl., 44:388-394.
- [29] Sergeeva, L. et al., 1985, Biologia Plantarum, 27(4-5):330-333.
- [30] Noma, M., et al., 1984, Pl. Physiol., 75: 257-260.
- [31] Croes, A. F., et al., 1986, Acta Bot. Neerl. 35(3):161-167.