

植物激素与细胞分化及形态发生的关系

崔 激

(中国科学院植物研究所)

一、分化的概念

分化(differentiation)的定义,广义地说是一种类型的细胞在形态上、生理上以至生物化学上转变成另一类型的细胞,而这种变化不同于适应,是不可逆的。一切生物,包括动物、植物、微生物都有分化过程。在微生物中对分化过程研究得较多的是粘菌,曾为此召开过几次专门的国际会议。动物中研究得较多的是海胆、蛙和鸡;而低等植物中对伞藻作了大量的工作,较清楚地阐明了核质对形态发生的作用。

高等植物的分化(或称之为生长发育)过程从形态上和生理上可以分为三个阶段:①从受精卵分化为胚,一般称为胚胎发生(embryogenesis);②胚进一步生长和分化形成营养体,称为营养器官发生或营养生长(vegetative organogenesis or vegetative growth);③营养体分化形成花,称之为生殖器官发生或生殖生长(reproductive organogenesis or reproductive growth)。高等植物各个分化阶段机理的研究以整体植物作对象时存在很多困难。近几十年以来,由于植物细胞、组织及器官培养技术的发展,证明了植物细胞的“全能性”(totipotency),即植物体细胞或性细胞,在人为控制的培养条件下都有可能重新形成新的个体。一般说,从已经分化的细胞或组织首先要经过一个脱分化(dedifferentiation)的过程。使其回复到胚性细胞的状态,而一般的结果是经脱分化后,细胞分裂产生无组织的(unorganized),无明显极性的愈伤组织或细胞团,这类细胞的特点是大而不规则,高度液

泡化,没有次生细胞壁和胞间联丝。整个组织是比较松散的,从表面以下约5—10个细胞是分生的中心,细胞明显的小些,有了胞间联丝和果胶质,这些中心是愈伤组织的主要生长部位。愈伤组织在一定的培养条件下又可以经过胚胎发生(embryogenesis)形成双极性的胚状体,或经过器官发生(organogenesis)形成单极性的芽或根,进而重新形成完整的植株,这后一段过程一般称为再分化(redifferentiation)。到目前为止,我们已经有数百种植物的细胞、组织经过培养后能再形成植株。这就为在离体条件下研究植物的分化过程提供了良好的实验系统。

另外,近几十年的研究工作也证明,在调节控制脱分化和再分化的过程中,除了植物材料本身的特性以及营养、光照、温度等外界条件外,植物激素起着十分重要的作用^[25,26,30]。这一点从细胞和组织培养的历史中也可以清楚地看到,在三十年代IAA发现后才有可能得到稳定的愈伤组织培养物;五十年代由于细胞分裂素类物质的发现,才有可能使许多双子叶植物的器官分化得以控制;而2,4-D的应用使一大批单子叶植物(特别是禾谷类)能再生成植株,并且它在诱导体细胞胚胎发生中也起着重要作用。因此很自然地,对植物激素或植物生长物质调节控制具有全能性的植物细胞的脱分化和再分化过程的研究成了当前植物发育生物学的重要课题。当然植物激素对植物分化的作用不仅仅局限于对离体条件下脱分化和再分化的调节和控制。现已证明五大类植物激素,即生长素(auxins),赤霉素(gibberellins),细胞分裂素(cytokinins),脱落酸(abscisic

acid) 和乙烯(ethylene)几乎都和植物分化有着密切的关系。如生长素和细胞分裂素对营养器官的发生和生长有着密切的关系,赤霉素和脱落酸对花器官形成,乙烯对衰老和成熟都起着重要的作用。最近 Trewavas^[33] 曾经指出植物生长物质在可塑性的发育中起着很直接和非常重要的作用。

二、植物激素与木质部发生 (xylogenesis)的关系

导管是蕨类植物、被子植物和裸子植物共有的一种特殊细胞,它构成了输导组织木质部。在植物细胞培养和组织培养过程中,细胞分化最明显的现象就是从薄壁细胞分化出管状的导管,它也是最容易鉴别的细胞类型。Dale-ssandro 和 Roberts^[9] 报道 葛 苳 茎 的 髓 部 用 IAA、NAA, 2,4-D 处理后形成的木质部样式不同,用 5 毫克/升 IAA 加 0.1 毫克/升激动素处理后形成的木质部呈垂直网状,而用 0.5 毫克/升 NAA 加激动素处理者为平面网状。Forest 和 McCully^[10] 研究过烟草髓极性与木质部发生的关系,用 IAA 和蔗糖处理形态上端,可以形成维管束,但倒置时不用任何处理即能形成。他们认为,木质部发生与植物体内许多物质有关,但是 IAA 起着最重要的作用。至于它的作用机理,Fosket^[12] 用 Coleus 茎切段为材料研究了生长素对木质部发生的作用与 DNA 合成需要的时间的关系,至少三天才出现木质部,但第二天 DNA 合成已经大量增加,生长素在培养 24 小时就发生了作用。

至于细胞分裂素对木质部发生的作用,不象生长素那样明显,有的植物如菊芋只加 IAA 就行,因为内源细胞分裂素已经够用。Fosket 和 Torrey^[11] 用大豆愈伤组织为材料,激动素小于 $10^{-8}M$ 就能促进细胞分裂,但不诱导木质部发生。大于 $5 \times 10^{-8}M$ 才能促进木质部发生,提高浓度,形成更多。IAA 加玉米素或激动素都产生同样数目的细胞,但后者的形成效率比

前者低 40%。Dale-ssandro 和 Roberts^[9] 比较了不同细胞分裂素的作用,结果是玉米素 > 激动素 > 6-苄基腺嘌呤。Wright 和 Northcote^[38] 研究了生长素、细胞分裂素的比例和浓度与木质部发生的关系, NAA/激动素的比值为 0.5/20 时有木质部发生和根形成,而浓度降低为 0.025/0.4 时,只有木质部发生,没有根。其它植物激素如赤霉素、乙烯和脱落酸对木质部发生一般有抑制作用。

三、植物激素与胚胎发生的关系

Steward 等^[27] 首先使悬浮培养的胡萝卜愈伤组织产生了胚。随后很多人在组织培养中观察到有胚状体。但是对胚胎发生的研究并不很多。因为培养的体细胞组织,虽能形成根或芽,而不太容易形成胚。所以对激素与胚胎发生的关系的研究,也不象对器官形成研究那么多。

在组织培养中胚胎发生一般被加入的 2,4-D 所抑制,例如 $1 \mu M$ 2,4-D 就能抑制野胡萝卜的胚胎形成。Rao 等人^[20] 报道,当培养基中去掉 2,4-D 或其它生长素时,可以促进胚胎发生。加入细胞分裂素或抗生长素如 2,4,6-T 均能促进胚的形成。Fujimura 和 Komamine^[13] 研究过各种生长调节物质对悬浮培养的胡萝卜组织胚胎发生的作用,他们观察到 2,4-D 和 IAA ($> 10^{-10}M$) 抑制胚胎发生,而玉米素在 $10^{-7}M$ 则有促进作用。但其它细胞分裂素如激动素和 6-苄基腺嘌呤却无效或基本上是抑制的。GA₃ 和 ABA 对胚的总数也没有影响。

胚胎发生与营养有密切关系,有的培养基当去掉 2,4-D 时有胚胎发生,但有的培养基并不如此。Steward^[28] 指出椰子乳有利于胚胎发生。此外酪蛋白水解物及其它还原态氮化物也都能明显地加速胡萝卜组织的胚胎发生。Reinert 等^[21] 研究过胡萝卜细胞在培养过程中失去胚胎发生能力的问题,他们观察到愈伤组织在 MS 培养基中比在 White 培养基中生长快,失去胚胎发生能力也快,他们认为这是逐

渐失去了新鲜组织的形态发生物质。Warchok等^[36]报道长期培养的胡萝卜组织,加入 $0.1\mu M$ 激动素可恢复其胚胎发生能力,但浓度太高则无效或有抑制作用。最近Vasil^[34]报道了2,4-D对禾谷类植物体细胞胚胎发生的重要作用。在MS培养基中加25毫克/升2,4-D可以形成愈伤组织,一旦转移到无2,4-D的培养基上,就能产生胚状体。从现有的材料来看,胚胎发生还不是一个能完全控制的过程。虽然生长素与细胞分裂素的比值,氮与碳水化合物的比值等都能影响其发生,但这些因素之间的相互关系还很不清楚。

四、植物激素与器官形成的关系

由于近几十年来植物细胞和组织培养技术的进展,许多高等植物的细胞、组织和各种外植体可以分化并通过根芽的形成重新长成植株。而控制这一过程的植物激素起着极其重要的作用,在五大类植物激素中又以生长素和细胞分裂素的作用最大,而其它三类激素在个别情况下也有明显作用。

三十年代后期刚发现生长素后不久,人们就开始研究它对器官发生的作用。Gautheret^[14]报道,适当浓度的IAA可以诱导胡萝卜外植体形成根原基。White^[37]的研究指出杂种烟草肿瘤组织,可以在不加IAA的White固体培养基上长期生长而不分化,但一旦转移到液体培养基中就能形成芽。Skoog^[24]发现如在液体培养基中加入0.2毫克/升IAA,就抑制了杂种烟草肿瘤组织的芽的分化,而这种抑制作用又可被加入适量的 $KH_2PO_4 \cdot H_2O$ 、 $FeSO_4$ 和蔗糖所逆转。但Skoog和崔激^[25]1947年继续用同样的材料重复以前的实验时未能得到同样的结果,接着就改用烟草茎形成层作材料,他们发现在White培养基中加入腺嘌呤可以促进生芽,加入IAA或NAA可以促进生根,并提出了两者的不同比例可以调节生芽或生根的观点^[25]。Skoog和Miller^[26]用激动素代替腺嘌呤进行了相同的实验,并得到相同

的结果,进一步提出了激动素和生长素的比例决定根芽分化的理论。此后很多植物生理学家研究了细胞分裂素/生长素比例与器官分化的关系。大量的实验结果表明这种理论在组织培养的实践(特别是对双子叶植物的器官分化)具有较普遍的意义^[4,39]。王熊和罗士韦^[1]用烟草作材料,在MS培养基上加BA 2ppm,14天就可分化出芽来,而加2,4-D 1ppm则不分化。陈维伦等^[6]报道山新杨叶外植体在玉米素 $10^{-6}M$ 或BA $10^{-6}M$ 和IAA $10^{-8}\sim 10^{-6}M$ 或NAA $4\times 10^{-6}M$ 的MS培养基上,芽的分化可达70—100%,而激动素对生芽无效。王凯基等^[2]对几种木本植物愈伤组织形成和器官分化的研究表明它们所需的激素种类和剂量虽有很大的差别,但芽的分化仍需要高比例的细胞分裂素。

在很多禾谷类作物的组织培养中发现用较高浓度的生长素(尤其是2,4-D)诱导形成愈伤组织,当培养在除去生长素,或适当浓度的活性较低的生长素中时,就可以诱导芽的形成,Nitsch等^[18]用LM培养基附加 $10^{-5}M$ 2,4-D培养水稻愈伤组织,可以生根,一旦转入无生长素的培养基时就能产生芽。Mastler和Halden^[17]以NAA代替2,4-D培养高粱愈伤组织,在光下它很快转绿,并形成了芽。Rangan^[10]将小米愈伤组织从含生长素的培养基转移到没有生长素的培养基,一个星期内就形成了芽。最近Vasit^[34]得到了类似的结果。

在另一些例子中关于激素比例控制器官分化的问题出现完全相反的情况。Saunders等^[22]发现苜蓿对生长素及细胞分裂素的反应很特殊,在有2,4-D和细胞分裂素的培养基中,可以形成愈伤组织,一旦转入不加上两种激素的培养基中就能分化。有趣的是必须在先前的培养基中加入2,4-D才能在后来的培养基有芽的形成。Walker等^[36]也报道把苜蓿的愈伤组织转移到无激素的培养基上时,分化的情况与原来培养基中的激素比例有关系。如果愈伤组织是在高细胞分裂素/生长素比例的培养

基中形成的,易于生根,而在高生长素/细胞分裂素比例的培养基中形成的,则生芽。

由此看来,分化与激素的关系同植物的遗传性有着密切的关系。Linsmair等^[16]报道不同的烟草品种的分化能力不一样,他们用五个品种做实验,用相同的生长素/细胞分裂素比例,结果有的品种形成很多芽,有的形成较少的芽,有的完全不生芽。Fosket^[12]曾认为各种愈伤组织分化时对激素的要求不同,主要是受内源激素的影响。

应该指出,绝大多数关于生长素和细胞分裂素对器官分化的作用及两者之间的比例关系的影响都是用外源激素所做实验获得的结果,而内源激素的情况则研究得很少。如果组织内生长素或细胞分裂素水平较高,如肿瘤组织本身能合成生长所需的激素,则不需要外源激素。又如大豆愈伤组织的细胞分裂素较少,不加外源细胞分裂素就不能生长。所以不能因为某些实验中外源激素不能引起分化而简单地否定生长素和细胞分裂素在植物细胞、组织、器官分化中的重要作用。只有深入地研究了内源激素的作用机理后,我们才可能对植物激素和分化的复杂关系有更深入和统一的认识。这也是当前植物分子生物学研究的重要内容之一。

五、有关植物激素和分化的一些生物化学研究

利用细胞和组织培养技术已积累了大量有关植物激素调节控制细胞分化和形态发生的相互关系的观察结果。而且它们具有一定的规律性和普遍性,这就为进一步深入的研究提供了可靠的基础,同时在细胞、组织和器官等培养的工作中已发现,细胞分化和形态发生受着各种因素的影响,往往呈现复杂的有时甚至是矛盾的现象,另外至今仍有很多植物还不能使用已知手段控制它们的脱分化和再分化,因此深入研究是迫切需要的。至今在激素控制分化的生物化学方面已积累了一些资料。

Fosket^[12]用 $2.9 \times 10^{-7}M$ 的IAA处理coleus,三天后木质部才分化,而DNA合成从第二天就开始了。加入5-氟尿嘧啶可以抑制DNA合成和木质部的分化,但必须在处理后三天内使用才有作用,如DNA合成高峰已过,再作处理就无抑制作用。Holm和Key^[15]用 $10^{-4}M$ 的2,4-D处理大豆下胚轴,可以使大豆下胚轴DNA合成提高九倍。Torrey和Fosket^[31]培养根的皮层,培养基中只有IAA时仅能形成愈伤组织,但是没有导管形成。加入激动素后三天就有DNA合成,5—7天出现导管。因此他们认为生长素和激动素结合使用时不但促进了DNA的合成,而且进一步诱导了导管的形成。Simpson和Torrey^[23]也指出IAA或2,4-D加激动素才能诱发DNA的合成,引起细胞分裂和导管的分化。Zeroni和Hall^[40]认为是生长素影响了合成DNA模板的活性,使更多的基因组作用于转录。Trewava^[33]最近的研究指出生长素处理后,膜的透性发生变化,在DNA合成之前有12—16小时的延滞期,处理3小时后就有4种新的非组蛋白成分出现,9小时后有8种,15小时后有20种,21小时后有40种,而可溶性蛋白的变化不大。但是Chen等^[7]报道2,4-D处理后核内DNA变化不大,而DNA:RNA:蛋白质三者之间的比例发生了很大变化,对照为1:3.1:11,而处理为1:5.4:21.7。

关于植物激素诱导离体情况下器官发生中的生化变化也有了相当多的报道。生物化学和组织化学的工作表明,器官发生期间的核酸与蛋白质合成是必需的^[6]。3H-胸腺嘧啶24小时就参入到将来分化出芽的烟草表皮层组织里,而此时对照中还看不到显著的变化,四天以后将要形成芽原基的细胞出现了更强烈的参入^[32]。Chlyah^[7]研究了秋海棠叶切段中根和芽分化中RNA碱基成分的变化,发现IAA诱导根形成时A/G降低,BA诱导芽形成时A/G提高,说明形成不同器官需要不同的RNA。电泳的实验也说明,一些小分子蛋白的

增加与器官分化有关。此外还发现了不少与器官发生有关的酶活性和同功酶的变化。这些酶包括核糖核酸酶, α -淀粉酶, 过氧化氢酶, 过氧化物酶, 磷酸酶, 谷氨酸-草酰乙酸转氨酶, 丙氨酸氨肽酶, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶, 苹果酸酶等。因为过氧化物酶活性涉及 IAA 的代谢, 所以这个酶的活性和同功酶的变化受到了较多的注意^[1,3,29]。关于糖代谢, 在器官形成之前淀粉的积累已有许多报道。Thorpe^[29]的研究还表明在烟草愈伤组织分化芽时, 需要很高的能量, 糖代谢和呼吸速度都大大提高, 磷酸己糖途径被激活。

研究激素在分化中的作用, 在当前还存在着很大的困难, 原因之一是虽然已发现激素对分化起着极为重要的作用, 但至今对于激素的作用机理的研究还是相当不足的, 而且分化过程中还包含着多种激素的调节以及它们之间的相互作用。另一个重要原因是关于真核生物的基因调控还存在很多问题, 而分化过程(特别是形态发生过程)包括了极其复杂和多样的生化变化, 从本质上阐述这一过程是极其艰难的。当前应利用分子生物学和生物化学的研究成果和实验技术积极开展这方面的研究, 进一步积累有关的资料。预计在不久的将来可能有所突破。

参 考 文 献

- [1] 王熊、罗士韦, 1981, 植物学报, 7, 71-82.
- [2] 王凯基、张丕芳、倪德群, 1981, 植物学报, 23, 97-103.
- [3] 王洪新、崔激, 1981, 植物研究所, 集刊第一期(在印刷中).
- [4] 刘涂、迟静芬、刘桂云, 1980, 实验生物学报, 13, 223-229.
- [5] 张静兰、唐定台、徐桂芳、牛立仙、崔激, 1982, 植物学报, 24, 433-439.
- [6] 陈维伦、郭东红、杨善英、崔激, 1980, 植物学报, 22, 311-315.
- [7] Chlyah, A., 1971, *Phyton*, 28, 23-26.
- [8] Chen, Y. M. et al., 1975, *Plant Physiol.*, 56, 78-82.
- [9] Dalessandro, G. and Roberts, L. W., 1971, *Amer. J. Bot.* 58, 378-385.
- [10] Forest, J. C. and McCully, M. E., 1971, *Can. J. Bot.* 49, 449-452.
- [11] Fosket, D. E. and Torrey, J. G., 1969, *Plant Physiol.* 44, 871-880.
- [12] Fosket, D. E., 1970, *Plant Physiol.* 46, 64-68.
- [13] Fujimura, T. and Komamine, A., 1975, *Plant Sci. Lett.* 5, 359-364.
- [14] Gautheret, R. J., 1938, *Acad. sci. Paris* 206, 125-127.
- [15] Holm, R. E. and Key, J. L., 1971, *Plant Physiol.* 47, 606-608.
- [16] Linsmair, E. M. and F. Skoog., 1965, *Physiol. Plant.* 18, 100-127.
- [17] Masteller, V. J. and Halden, D. J., 1970, *Plant Physiol.* 45, 362-364.
- [18] Nitsch, J. P., Nitsch, C., Hamon, S., 1968, *Compt. Rend. Soc. Biol.* 162, 309-376.
- [19] Rangan, T. S., 1976, *Z. Pflanzenphysiol.*, 78, 208-216.
- [20] Rao, P. S., Handro, W., and Harada, H., 1973, *Physiol. Plant.* 28, 458-463.
- [21] Reinert, J. and Backs, D., 1968, *Nature*, 220, 1340-1341.
- [22] Saunder, J. W., Bingham, E. T., 1975, *Amer. J. Bot.* 62, 850-855.
- [23] Simpson, S. F. and Torrey, J. G., 1977, *Plant Physiol.* 59, 4-9.
- [24] Skoog, F., 1944, *Amer. J. Bot.* 31, 19-24.
- [25] Skoog, F. and C. Tsui., 1948, *Amer. J. Bot.* 35, 782-787.
- [26] Skoog, F. and C. O. Miller., 1957, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118-131.
- [27] Steward, F. C., Caplin, S. M. and Miller, F. K., 1958, *Amer. J. Bot.* 45, 705-708.
- [28] Steward, F. C., Kent, A. and Holsten, R., 1964, *Science*, 143, 20-27.
- [29] Thorpe, T. A., 1978, *Physiological and biochemical aspects of organogenesis in vitro*. In "Frontiers of plant Tissue Culture" pp. 49-58.
- [30] Torrey, J. G., 1968, *Hormonal control of cytodifferentiation in agar and cell suspension cultures*. In "Biochemistry and physiology of plant Growth Substances", ed. F. Wightman and Setterfield, pp. 843-855.

- [31] Torrey, J. G. and D. E. Fosket., 1970, *Amer. J. Bot.* 57, 1072-1080.
- [32] Tran, T. V. M., et al., 1976, *Can. J. Bot.* 53, 553-559.
- [33] Trewavas, A. J., 1979, The dynamics of meristem control by growth substances. In "Differentiation and The Control of Development in Plants, pp. 39-56. Ed. George, E. C.
- [34] Vilma Vasil and Indra K. Vasil., 1981, *Bioscience*, 31, 246-248.
- [35] Wachok, Z. S. and Wetherell, D. F., 1972, *Experientia (Basel)*, 28, 104-105.
- [36] Walker, F. A., Poli, C. Yu, Shirley, J., Sato and E. G. Jaworski. 1978., *Amer. J. Bot.* 65, 654-659.
- [37] White, P. R., 1939. *Amer. J. Bot.* 26, 59-64.
- [38] Wright, K. and Northcote, D. H., 1973, *Cell Sci*, 12, 37-53.
- [39] Zee, S-Y, et al., 1978, *Z. Pflanzenphysiol.* 90, 115-163.
- [40] Zeroni, M. and M. A. Hall., 1980, *New Series*, 9, 511-586.

细胞超微结构的立体学定量分析技术进展

戴志强 胥彬

(中国科学院上海药物研究所)

立体学(stereology)是一门既年轻而又古老的方法学科。它起源于二千多年前的天象观察;基本原理是十九世纪法国地质学家Delesse和英国显微镜学家Sorby各自在几何概率论和拓扑学基础上提出的。第一届国际立体学会议(1961)对其命名所下的定义是二维图像的三维解释或二维空间的三维推断^[1,2]。近二十年来,立体学与电子显微术相结合,在冶金、生物、医学等领域的形态定量研究中占据了重要的地位。

随着近代细胞生物学的深入,对细胞超微结构电镜图像的解释已日趋复杂。通常进行的定性观察有一定的局限性,往往伴随程度不一的主观偏差,有时必须结合其它实验手段获得的资料,才能说明问题^[2]。为此,用电子计算机作图像处理的三维重构技术(傅利叶重塑法、连续切片等)相继引入电镜术。但相比之下,立体学定量分析技术更为简便而实用。它不需要昂贵的投资和复杂的运算技术,只要满足若干制样条件,选用适当的测试系统(test systems 见图1),对一定数量的细胞电镜图像所包含的二维信息作点、线、面数学测定,而后按立体

学公式运算,便可用表积、体积、长度、厚度、数量、大小分布等十几种参数来描述有关细胞器的特征^[2-4](部分立体学公式测算举例见图2)。近年来,立体学在细胞超微结构定量研究中获得较广泛的应用^[5-7]。现将其主要进展分述如下:

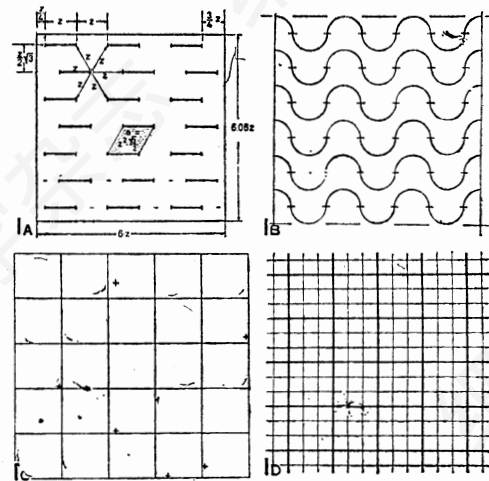


图1 立体学定量分析测试系统

- A. 多用测试系统
- B. 曲线测试系统
- C. 随机点方格测试系统
- D. 双重方格测试系统