

植物愈伤组织培养中内外源激素效应的研究现状与展望

李代丽, 康向阳

北京林业大学 林木花卉遗传育种教育部重点开放实验室, 北京 100083

[摘要] 综述了外源激素对愈伤组织诱导、分化的影响, 以及内源激素在愈伤组织培养过程中的变化规律。有关愈伤组织培养中外源激素作用的研究日趋细化, 而激素变化与适宜继代周期的关系已成为研究热点。随着分子生物学与同位素标记等技术的引入, 必将促进愈伤组织培养中激素相关基因调控机理的揭示, 以及激素作用位点的精确定位, 从而推动植物愈伤组织培养的迅猛发展。

[关键词] 愈伤组织; 内源激素; 外源激素

[中图分类号] Q945

[文献标识码] A

The Status and Prospect of Exogenous Hormone and Endogenous Hormone Impact in Plant Callus Tissue Culture

LI Dai-li, KANG Xiang-yang

Key Laboratory for Genetics and Breeding of Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

[Abstract] The effect of exogenous hormone and regulation of endogenous one during inducement and differentiation of plant callus tissue were reviewed. Researches on the exogenous hormone during the callus tissue culture became specific increasingly, and the relation between hormone variation and transition period has become the current problem. With applications of molecular biology and isotopes maker, it can be expected to reveal the genic regulation mechanism and to find the action sites of hormone accurately, which will deeply drive the studies of plant callus tissue culture.

[Key words] callus tissue culture; exogenous hormone; endogenous hormone

植物内源激素是植物体内天然存在的有机化合物, 虽然含量很低, 但它们与植物生长发育密切相关, 影响植物生命活动的整个过程。在植物愈伤组织培养中, 外源激素起着传递遗传物质的脱分化、再分化等发育信号的作用, 而外源激素的作用效果与外植体以及愈伤组织本身内源激素的种类和水平有密切关系, 外源激素必须通过内源激素才能发挥其作用^[1]。只有将各种外源激素合理使用, 才能适应外植体对激素的特定要求, 充分发挥激素的调节作用, 诱导愈伤组织的产生并达到分化。而掌握内外源激素在愈伤组织培养中的水平及其相互作用关系, 对于在一定程度上减少外源激素添加的盲目性, 指导植物愈伤组织培养具有重要的意义。

1 外源激素对植物组织培养的影响

1.1 外源激素对愈伤组织诱导的影响

在大多数情况下, 只用生长素 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)就可成功地诱导外植体产生愈伤组织, 其使用范围为 0.001~10/mg/L。但在只含 2,4-D 的诱导培养基上生长的愈伤组织比较松软, 呈黏液化和泡状, 一般不易分化, 且再生频率很低。而转接至诱导培养基和继代培养基后, 采用生长素苯乙酸(NAA)和细胞分裂素培养, 可以改进愈伤组织的质量。如籼稻在含 2 mg/L 2,4-D 的 NB 培养基中能诱导出愈伤组织, 但如再添加 1 mg/L 的

6-糠基氨基嘌呤(KT)和 1 mg/L 的 NAA 后, 从外形上看, 愈伤组织将变得比较致密, 较硬, 颗粒状结构多, 易于分化, 提高了植株的再生频率^[2]。

生长素 NAA 和吲哚乙酸 (IAA) 对植物细胞的毒害作用较轻, 产生的愈伤组织较易分化, 使用范围为 0.001~10 mg/L, 但 IAA 诱导愈伤组织的效果比 NAA 稍差。在愈伤组织诱导阶段, 添加外源生长素应优先考虑采用 NAA、IAA, 如两者都不能完成愈伤组织诱导时, 再考虑采用 2,4-D 诱导。采用 NAA、IAA 诱导愈伤组织时, 一般需要添加一定量的细胞分裂素, 如绿豆、番茄、白菜花、金丝桃、月季等许多植物都能通过添加 NAA、IAA 和细胞分裂素产生愈伤组织^[3-7]。

愈伤组织诱导中常使用的细胞分裂素有 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、噻苯隆(TDZ)、KT 等。6-BA 是最为常用的细胞分裂素, 能促进细胞分裂, 有利于愈伤组织的形态建成; KT 对愈伤组织诱导率的影响不大, 但在诱导培养基中添加 KT 可以改善愈伤组织的质量, 在一定程度上能延缓愈伤组织的衰老, 延缓其器官分化能力的丧失, 从而提高植株再生频率^[8]; TDZ 具有很高的生物活性, 其同浓度的诱导愈伤组织效力高于 6-BA、KT^[9]。虽然愈伤

[收稿日期] 2006-10-13

[基金项目] 北京林业大学研究生自选课题资助基金(05jj045)

[作者简介] 李代丽(1981-), 女, 硕士研究生

[通讯作者] 康向阳, (E-mail) kangxy@bjfu.edu.cn

组织诱导大多需要同时添加生长素和细胞分裂素,但有时单独添加细胞分裂素也可实现愈伤组织的诱导,如外源 TDZ 能诱导黄芩外植体幼茎、子叶柄和下胚轴产生愈伤组织,并且随着培养基中 TDZ 浓度的增加,愈伤组织诱导率不断增加^[10]。通过添加 6-BA 和 TDZ,可完成对槟榔的愈伤诱导^[11]。

1.2 外源激素对愈伤组织分化的影响

在诱导愈伤组织分化阶段,一般需要配合添加生长素和细胞分裂素。由于 2,4-D 对细胞有毒害作用^[12],因此,当使用 2,4-D 诱导脱分化后,一般应降低和去掉 2,4-D,否则往往先生根,不能形成芽的形态分化^[13]。诱导愈伤组织分化最常用的生长素为 NAA 或 IAA。如桑树一年生枝条上部冬芽在 MS 基本培养基上添加 IAA 和 6-BA,形成愈伤组织并产生了芽的分化^[14];中黑防杨的愈伤组织在添加生长素 NAA 和 6-BA 的条件下产生了芽的再分化^[15];藤用 2,4-D 可诱导出愈伤组织,而采用 NAA 和 6-BA 才形成芽的形态分化^[16]。

诱导愈伤组织分化常用的细胞分裂素有 KT 和 6-BA,但两者的作用各有特点。在小叶杨×黑杨杂种后代的花药愈伤组织分化比较试验中发现,使用 6-BA 分化芽多、芽密、成丛状,但苗细高、瘦弱、木质化差;而添加 KT 分化出的芽稀且少,往往长成独棵苗,粗壮木质化程度高^[17]。大多数情况下需要将 6-BA 或 KT 与生长素结合使用才能完成形态建成。刀豆真叶、真叶叶柄、根、茎段和上胚轴产生愈伤组织转移到改良 MS 培养基中(添加 10 mg/L 6-BA、0.5 mg/L NAA、0.5 mg/L IAA)产生芽的分化^[18]。油菜^[19]、竹蔗^[20]、杏^[21]、狗筋麦瓶草^[22]等许多植物产生的愈伤组织都是在生长素配合 6-BA 或 KT 下完成形态建成的。

除了植物激素的性质外,在形态分化过程中,生长素和细胞分裂素的比值对愈伤组织分化的意义更为重要,比值高利于根形成,反之则利于茎芽发生。当 6-BA 与 NAA 比值为 3~6 时,毛白杨愈伤组织芽分化率随着细胞分裂素与生长素比例的增高而升高^[23]。西南桦的茎段、叶、芽产生的愈伤组织在分化培养时,随着 6-BA/NAA 比值的升高,其产生不定芽的数量也相应增加^[24]。

脱落酸(ABA)在植物组织培养中的作用已在多种植物中有研究报道,其中有关 ABA 能促进形态建成的例子较多。如 ABA 处理能提高松树植株再生率^[25];在培养基中补充外源 ABA 能够提高小麦胚性愈伤组织的发生频率^[26]。有关赤霉素(GA)对形态分化影响的认识存在差异。外源 GA₃ 对烟草愈伤组织的芽分化有显著的抑制作用^[27],而在茶树叶片产生的愈伤组织培养中,采用 MS 培养基补加 6-BA、NAA 和 GA₃ 则利于分化出芽^[28],其原因可能与不同材料的愈伤组织中内源激素的含量有关。

2 内源激素水平及其对愈伤组织培养的影响

2.1 内源激素水平及其对愈伤组织诱导的影响

外植体生长素含量较高而细胞分裂素含量较低时,有利于愈伤组织诱导。如王秀红采用 2,4-D 结合细胞分裂素 6-BA 或 KT,从水稻花药、幼胚和花穗诱导愈伤组织,其结果表明 IAA 与诱导率存在正效应、与细胞分裂素存在负效应,即出愈率高的外植体,其内源生长素含量较高,内源细胞分裂素含量较低^[29]。猕猴桃、玉米外植体内源生长素含量也有利于胚性愈伤组织的诱导^[30,31]。愈伤组织的诱导过程是生长素逐步升高的过程,在拐芹脱分化形成愈伤组织过程中,IAA 含量逐渐升高并达到稳定^[32]。

与非胚性愈伤组织相比,胚性愈伤组织含有较高的生长素,如胡萝卜^[33]、象草^[34]等。Rajasekaran^[34]发现,象草胚性愈伤组织中的细胞分裂素比非胚性愈伤组织中的水平低。

对脱落酸和赤霉素的研究相对较少。与胚性愈伤组织发生能力弱的外植体相比,小麦中胚性愈伤组织发生能力强的外植体惟一的特点是脱落酸含量较高^[35]。李雪梅认为小麦胚性愈伤组织中 GA₃ 含量低于非胚性愈伤组织^[36]。在白云杉和胡萝卜中,非胚性愈伤组织中乙烯的含量比胚性愈伤组织中的高^[37]。

2.2 内源激素水平及其对愈伤组织分化的影响

植物愈伤组织分化是内源生长素含量逐步降低、细胞分裂素含量逐步升高的过程。王秀红发现,NAA 和 6-BA 可以诱导水稻花药、幼胚和花穗来源的愈伤组织完成芽的形态分化,其愈伤出苗率与内源生长素存在负效应,而与内源细胞分裂素存在正效应^[29]。烟草中已分化出芽的愈伤组织的内源生长素含量明显低于未形成芽的愈伤组织^[27]。有研究表明,愈伤组织开始分化之前却需要较高的生长素含量。如小麦中形态发生能力强的愈伤组织与形态发生能力弱的愈伤组织相比,惟一的区别是前者的生长素含量较高^[35]。

愈伤组织分化过程也是内源生长素/细胞分裂素的比值逐渐降低的过程,如用 TDZ 诱导的拐芹愈伤组织在转移到空白 MS 培养基上后,第 20 天的 IAA/KT 比值达到最低值,此时愈伤组织表面亦开始出现绿色芽点^[32]。在诱导愈伤组织分化时,需要添加较低浓度的生长素和较高浓度的细胞分裂素,这是因为生长素 NAA 通过促进玉米素的代谢而降低内源细胞分裂素的含量,而细胞分裂素 6-BA 通过促进细胞分裂素的合成而使其含量增加,从而维持了较高的内源细胞分裂素与生长素比值^[38,39]。

在植物愈伤组织的不同发育阶段,脱落酸的含量不同。诱导胡萝卜愈伤组织形态中段,开始前 7 天的 ABA 含量一直处于较低的水平;而从第 7~10 天,其含量逐渐升高,并在第 10 天开始下降;但未具有形态建成能力的体胚则持续升高到第 13 天才下降,不能进行正常的发育^[40]。GA₃ 在大葱愈伤组织分化过程中的含量高于继代过程^[41]。肖关丽将甘蔗愈伤组织分化过程区分为胚性细胞发生、分化苗发生和绿苗长高等阶段,发现 IAA 的合成在胚性细胞大量发生时达到高峰期;而在大量分化出芽时,CTK 达到高峰期;GA₃ 在芽分化 20 天时达到高峰期,它的合成与分化苗的长高密切相关^[42]。El Meskaoui 等认为乙烯的浓度升高降低了黑云杉体胚的发育能力,并且认为只有乙烯的浓度达到一定值时体胚才能正常发育^[43]。

3 问题与展望

20 世纪 50 年代,Skoog 和崔徽发现腺嘌呤与吲哚乙酸的比值是控制芽和根形成的重要条件。当作用效果更为显著的细胞分裂素被发现后,Skoog 和 Miller 进一步提出芽和根的形成受生长素和细胞分裂素相互作用调节的理论,即形成器官的类型受 2 种激素的相对浓度的控制,较高浓度的生长素有利于根的形成而抑制芽的发育,而较高的细胞分裂素则促进芽发育而抑制根的形成^[44]。通过适宜的外源激素配比,可以有效地调节愈伤组织的器官分化。此外,IAA/ABA 或内源细胞分裂素比例等对于衡量外植体胚胎发生能力也有一定的意义^[45],但还需要进一步探索。

在愈伤组织诱导和分化阶段,除了要注意生长素和细胞分

裂素的比值外,激素的种类和浓度也受到重视。随着脱落酸和赤霉酸的发现,现阶段愈伤组织培养激素更加多样化,在培养基中添加3或4种激素的例子越来越多,有关愈伤组织培养中激素影响方面的研究趋于细致化。由于不同种植物的诱导、继代及分化时间不同,需要研究者根据经验,结合愈伤组织的颜色、质地等灵活掌握,研究激素变化与适宜继代周期的关系也已成为人们关注的热点问题。

不同植物愈伤组织形态分化对外源激素的要求有较大差异,这是由于外植体本身内源激素水平存在差异,从而造成对外源激素的培养反应的不同^[69]。目前,对添加的外源激素是否刺激或抑制了某些内源激素的变化,以及外源激素是否必须通过内源激素发生作用等尚未明确^[67]。这是因为酶联免疫和液相色谱或质谱法等激素测定方法对样品量的要求较大,不能检测出较少细胞团之间的细微差异,加之取样条件难以控制等,从而影响了内源激素动态的精准研究。而有关问题的解决,对愈伤组织培养具有重要的指导意义。

近几年植物组织培养技术发展迅速,并开始引入分子生物学技术研究模式植物突变体中与激素相关的基因表达产物^[68],有关研究必将推动已分化细胞再分化中与激素相关基因调控的进展。而应用同位素标记技术可以对激素的作用位点进行精确定位,从而实现组织培养过程的每个发育细节微观上的诊断,达到有效选择激素种类、灵活改变继代周期的目的,也必将促使组织培养技术更为完善。

参考文献

- [1] 颜吕敬. 植物组织培养手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990
- [2] 田文忠. 提高水稻愈伤组织再生频率的研究[J]. 遗传学报, 1994,21(3):215
- [3] 卫志明, 许智宏. 番茄叶组织培养中植株再生的初步研究[J]. 植物学通讯, 1979,(3):10
- [4] 吴沿文. 白菜花的组织培养和快速繁殖[J]. 1995,31(5):359
- [5] 曲春香, 晏锡, 黄连山. 长柱金丝桃的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1990,(2):40
- [6] Amutha S, Ganapathi A, Murugantham M. *In vitro* organogenesis and plant formation in *Vigna radiata*(L.) Wilczek[J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 2003,72:203
- [7] 林娅, 郑玉梅, 刘青林. 影响月季愈伤组织诱导和分化的因素[J]. 分子植物育种, 2006,(6):223
- [8] 杨学荣. 水稻花培育种研究[M]. 北京: 农业出版社, 1983.61
- [9] Thomas JC, Vatteran FR. Cytokinin activity induced by thidiazuron [J]. Plant Physiol, 1986,81:681
- [10] 李焕秀, Murch SJ, Sacena PK. TDZ 诱导的黄芩外植体再生研究[J]. 四川农业大学学报, 2000,18(4):325
- [11] Wang HC, Chen JT, Wu SP, et al. Plant regeneration through shoot formation from callus of *Areca catechu*[J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 2003, 75:95
- [12] Chkanikov DI, Pavlova NN. Proteins responsible for 2,4-D detoxication in resistant plants[J]. Agrokhimiya, 1966,5:115
- [13] Sandal I, Kumar A, Bhattacharya A. Gradual depletion of 2,4-D in the culture medium for indirect shoot regeneration from leaf explants of *Camellia sinensis*(L.) O. Kuntze[J]. Plant Growth Regulation, 2005,47:121
- [14] 马凤桐, 刘玉荣. 成龄桑树冬芽的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1985,(1):34
- [15] 程贵兰, 姜静, 蔡智军. 中黑防杨(美洲黑杨×青杨)的组织培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2004,40(5):585
- [16] Kundu M, Sett R. Regeneration through organogenesis in rattan[J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 1999,59:219
- [17] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986
- [18] 严其成, 杨金水, 边自雄, 等. 刀豆的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1990,

- (6):48
- [19] 顾亨森, 尤华贵, 马佑国, 等. 油菜子叶、下胚轴和根愈伤组织的诱导和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1981,(1):49
- [20] 陈子云, 陈淑芬. 竹蔗组织培养研究简报[J]. 植物生理学通讯, 1981,(1):56
- [21] 李梦玲, 李嘉瑞, 陶正平. 杏叶片离体繁殖研究[J]. 中国农学通报, 2001,17(2):8
- [22] Emma MJ, Sevdalina A, Jos ACV. Callus induction and plant regeneration in the metallophyte *Silene vulgaris*(Caryophyllaceae)[J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 2005,80:25
- [23] 邱明光, 杨雪彦, 周志华, 等. 毛白杨愈伤组织培养成苗的研究[J]. 西北林学院学报, 1991,6(4):29
- [24] 樊国盛, 邓莉兰. 西南桦组织培养研究[J]. 西南林学院学报, 2000,20(3):147
- [25] Reborts DR. Abscisic acid and mannitol promote early development, maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce[J]. Plant Physiol, 1991,83:247
- [26] Brown C, Brools FJ, Pearson D, et al. Control of embryogenesis and organogenesis in immature wheat embryo callus using increased medium osmolarity and abscisic acid[J]. J Plant Physiol, 1989,133:727
- [27] 刘涤, 迟静芬, 刘桂芸. 烟草愈伤组织器官发生过程中外源激素的作用[J]. 植物生理与分子生物学学报, 1986,12(1):104
- [28] 刘德华, 廖利民. 茶树叶片组织培养的初步研究[J]. 福建茶叶, 1989,(2):13
- [29] 王秀红. 水稻不同外植体的组织培养能力及其内源激素分析[J]. 四川农业大学, 2002,5
- [30] 付凤玲, 冯质雷, 渠柏艳, 等. 玉米未成熟胚胚性愈伤组织诱导率与内源激素含量的关系[J]. 核农学报, 2006,20(1):10
- [31] Centeno MI, Rodriguez A, Feito I, et al. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures[J]. Plant Cell Reports, 1996,(16):58
- [32] 汤国庆, 李文安. 在离体条件下拐芹形成愈伤组织和非胚性愈伤组织过程中几种内源激素的变化[J]. 实验生物学报, 1995,28(2):203
- [33] Li T, Neumann KH. Embryogenesis and endogenous hormone content of cell cultures of some carrot varieties (*Saucus carota* L.)[J]. Ber Deutsch Bot Ges, 1985,98:227
- [34] Rajasekaran K, Hein MB, Davis GC, et al. Endogenous growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum[J]. J Plant Physiol, 1987,130:12
- [35] Victor MJ, Bangerth F. Endogenous hormone concentrations and embryogenic in wheat[J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 2001,67:37
- [36] 李雪梅, 刘焰山. 小麦幼胚胚性愈伤组织诱导及分化过程中内源激素的作用[J]. 植物生理学通讯, 1994,30(4):255
- [37] Kumar PP, Joy RW IV, Thorpe TA. Ethylene and carbon dioxide accumulation and growth of cell suspension cultures of *Picea glauca* (white spruce)[J]. J Plant Physiol, 1989,135:592
- [38] Hansen CE, Meins F Jr, Acebi R. Hormonal regulation of zeatinriboside accumulation by cultured tobacco cells[J]. Planta, 1987,172:520
- [39] Alittle CH, Asauidge R. The role of plant growth regulators in forest tree cambial growth[J]. Plant Growth Regulation, 1987,(6):137
- [40] Hiroshi K, Hiroshi H. Changes in the endogenous level and effects of abscisic acid during somatic embryogenesis of *daucus carota* L. [J]. Plant Cell Physiol, 1981,22(8):1423
- [41] 盛艳萍, 杨建平, 张松, 等. 大葱成熟胚离体再生过程中内源激素的变化[J]. 园艺学报, 2005,32(2):318
- [42] 肖关丽, 杨清辉, 李富生. 杨生超甘蔗愈伤组织分化绿苗内源激素变化规律研究[J]. 西南农业大学学报, 2002,24(4):337
- [43] El Meskaoui A, Tremblay FM. Involvement of ethylene in the maturation of black spruce embryogenic cell lines with different maturation capacities[J]. J Exp Bot, 2001,52:761
- [44] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚胎发生的分子生物学[J]. 北京: 科学出版社, 2000
- [45] Centeno ML, Rodriguez R, Berros B. Endogenous hormonal content and somatic embryogenic capacity of *Corylus avellana* L. cotyledons [J]. Plant Cell Reports, 1997,17:139
- [46] 谢从华, 柳俊. 植物细胞工程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004
- [47] 肖关丽. 植物组织培养过程中内源激素研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2001, 16(2):136
- [48] Toering A, Pullman GS. Modeling available 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in a tissue culture medium containing activated carbon[J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 2005,82:179