

植物生长素与体细胞胚发生

卢爱华^{1,2}, 王永飞¹, 马三梅¹, 李晓东^{2,*}

¹暨南大学生物工程学系, 广州 510632; ²深圳职业技术学院, 广东深圳 518055

The Relationship between Auxin and Somatic Embryogenesis in Plants

LU Ai-Hua^{1,2}, WANG Yong-Fei¹, MA San-Mei¹, LI Xiao-Dong^{2,*}

¹Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ²Shenzhen Polytechnic, Shenzhen, Guangdong 518055, China

摘要: 简要介绍了植物生长素对体细胞胚发育的作用及其调控机制的研究进展。

关键词: 植物生长素; 体细胞胚; 发育; 调控

体细胞胚(somatic embryo)是从体细胞分化而来的, 在形态上与合子胚有相似的结构, 发育过程也与合子胚相似。愈来愈多的研究表明, 在植物体细胞离体培养中, 通过体细胞胚发生途径形成再生植株的现象已十分普遍。由于体细胞胚发生过程重演了合子胚形态发生, 因此深入研究体细胞胚的发生与发育机理对于揭示细胞分化、发育、形态发生与合子胚发育理论问题很有意义。此外, 体细胞胚的发生还为人工种子制作、作物品种改良、优良种质的无性繁殖、转基因受体和突变体筛选等提供良好的实验体系, 因而一直受到极大关注。现已经证明, 植物生长调节剂的诱导和调节是离体培养条件下体细胞转化成胚性细胞的重要诱导因子。其中生长素是诱导体细胞胚发生的关键因素(Dudits 等 1991; 崔凯荣等 2000)。本文介绍植物生长素在体细胞胚发育中的作用及其调控机制。

1 人工合成的生长素类物质与植物体细胞胚发生

人工合成的植物生长素类物质主要包括萘乙酸(naphthalene acetic acid, NAA)和2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)等。它们是多数植物的组织和细胞离体培养所必须的。业已查明, NAA 在胡萝卜(*Daucus carota* var. *sativa* DC.)培养中对体细胞胚的起始和成熟有积极作用。2,4-D通常用于起始胡萝卜和其他一些物种的组织培养。含有2,4-D的培养基通常会导致未分化的愈伤组织增殖, 一旦除去2,4-D, 未分化的细胞团即开始有组织的生长, 最后发展成体细胞胚(Ribnicky 等 1996)。胡萝卜在含有2,4-D的MS

培养基上可以诱导出胚性愈伤组织, 再将这些胚性愈伤组织转移到不含2,4-D的MS培养基中, 就可诱导体细胞胚的形成和发育(Satoh 等 1986)。

DNA的甲基化可引起基因失活(Cedar和Razin 1990)。LoSchiavo等(1991)观察到, 2,4-D的浓度与细胞核DNA甲基化程度有关, 胡萝卜悬浮培养物在含高浓度2,4-D的培养条件下, 细胞核DNA甲基化增加, 基因表达活性下降; 除去或降低2,4-D浓度时, 细胞核DNA的甲基化降低, 从而激活相应基因表达。这说明, 2,4-D是通过影响核DNA的甲基化程度而调控基因表达和体细胞胚发育的, 在高浓度2,4-D条件下, 胡萝卜胚性细胞的发育受抑制。

2 内源生长素与植物体细胞胚形成

尽管外源生长素类物质对植物细胞的体外培养是必须的, 但试验证明, 内源激素代谢和动态平衡在细胞分化中起关键作用。培养的植物细胞中会产生大量的IAA。内源IAA含量在体细胞胚发育的不同时期的水平不同。在小麦(*Triticum aestivum* L.)胚性愈伤组织诱导及分化过程中, 胚性愈伤组织的内源激素含量远高于非胚性愈伤组织, 特别是IAA含量在胚性细胞分化早期明显升高, 同时内源生长素的含量与胚性细胞分化频率密切相关(李雪梅和刘熔山 1994; Fischer-Iglesias 等 2001)。有人在玉米(*Zea mays* L.)未成熟胚胚性

收稿 2008-02-22 修订 2008-04-24

资助 深圳职业技术学院重点课题项目(06KJX012)。

* 通讯作者(E-mail: lxd1819@yahoo.com.cn; Tel: 0755-26019169)。

愈伤组织诱导中见到, 胚性愈伤组织发生前, 内源 IAA 含量呈上升趋势, 伴随着胚性愈伤组织的发生, 内源性 IAA 含量出现峰值, 随后呈大幅下降趋势(付凤玲等 2006)。在大麦(*Hordeum vulgare* L.)的花药培养的脱分化阶段, IAA 含量从刚接种时由高降低, 后再升高, 在再分化阶段呈升高的趋势(徐武等 1995)。Ribnicky 等(2002)等报道, 在胡萝卜细胞的早期合子胚(球形胚)时期, 内源性 IAA 含量增加。另外, 内源激素 IAA 含量的高低影响到不同大豆(*Glycine max* L.)品种愈伤组织诱导和分化的难易, 内源激素 IAA 含量高时, 愈伤组织容易诱导; 同样, 胚性愈伤组织中的 IAA 含量高于非胚性愈伤组织中 IAA 含量, 且外植体在培养的第 6 天愈伤组织中 IAA 的含量达到最大值(郭子彪和盖钧镒 1997)。综上所述, 内源性 IAA 含量的上升或维持在较高的水平是胚性细胞出现的一个共同标志。

在棉花(*Gossypium hirsutum* L.)组织培养的细胞从脱分化开始直到再分化, IAA 含量减少, 而脱分化过程的前期异戊烯腺苷(isopentenyladenosine, iPAs)的含量处于最低, 因此, IAA/iPAs 的比率在再分化前是最大值的。在细胞的再分化过程中, 内源 IAA 水平急剧增加, IAA 与 iPAs 的比率同时增加。据此 Zeng 等(2007)推测, 棉花细胞中生长素和细胞分裂素的动态消长是体细胞胚形成过程中细胞脱分化和再分化的基础。在胡萝卜组织培养中, 外源 2,4-D 促进内源 IAA 大量积累(Michalczuk 等 1992a, b), 由此推测胡萝卜细胞胚胎发生的能力与内源 IAA 水平的升高有紧密的关联, 也表明 2,4-D 作用于细胞并不是直接作为一种生长素关系物质, 而是通过影响内源激素含量变化而发挥作用的。有人认为, 外源生长素必须通过调节内源激素的水平才能发生作用(韩碧文和李颖章 1993)。但 Ribnicky 等(1996)认为, 2,4-D 和 NAA 都可以促进胡萝卜下胚轴愈伤组织的增殖, 但对内源 IAA 浓度影响较小, 外源生长素对诱导胡萝卜下胚轴的愈伤组织增殖及其对下胚轴形成体细胞胚的能力都是必需的。

3 与生长素及其类似物有关的体细胞胚发生过程中的基因表达

体细胞胚发生的本质是基因差别表达的结果, 植物激素在体细胞胚形成中有调节作用。在

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)未分化的分生组织薄壁细胞悬浮培养时, IAA 能促进 RNA 的合成(Cheng 和 Hagen 1971)。在烟草细胞悬浮培养中, 用 2,4-D 处理生长素饥饿的细胞后 15~30 min 或更短的时间内, 细胞中 mRNA 便开始积累, 通过 cDNA 文库差异筛选, 获得 7 种 2,4-D 诱导的 mRNA, 其中的 3 种是生长素初期应答基因, 它们编码的蛋白可能与细胞分裂的起始有关(van der Zaal 等 1987)。用 2,4-D 处理大豆下胚轴后, 15~30 min 内 RNA 水平迅速升高, 处理 2~4 h 后水平最大, 分析这些与 RNA 相对应的 cDNA 表明, 这些 RNA 的增加与某些特定的 DNA 序列的转录活性增加有关(Hagen 等 1984)。

Aux/IAA 基因家族是生长素的初期应答基因, 其编码的 Aux/IAA 蛋白主要是作为转录因子介导生长素的特异反应, 其迅速降解对其介导的生长素反应十分重要。外植体在愈伤组织诱导培养基上培养时, 细胞内的许多激素应答基因受激素的增量调节, 这些基因中有许多编码 Aux/IAA 蛋白(Che 等 2002)。另外, 生长素还可调节 K^+ 通道基因 *ZMK1* 的表达, *ZMK1* 基因已证明在胚胎发育中起作用(Philippa 等 2006)。

4 生长素及其类似物调节体细胞胚发生的机制

生长素受体的研究在生长素的作用机制研究中有重要的地位, 一直受到人们的关注。*TIR1* 基因在整个的植物发育包括胚胎形成过程中均可以表达(Gray 等 1999)。近年来的研究表明, *TIR1* 是生长素的受体; 在体外, 生长素和 *TIR1* 直接结合, 启动 *TIR1* 和 *AUX/IAAs* 的相互作用, 介导 Aux/IAA 蛋白的降解和生长素调节的基因的转录(Dharmasiri 等 2005a)。后来 Dharmasiri 等(2005b)又发现, *AFB₁*、*AFB₂* 和 *AFB₃* 也可以调节 Aux/IAA 蛋白的降解, 参与生长素的反应, 缺乏这 4 种蛋白的植物对生长素不敏感, 显示出与 *mp/arf5* 和 *bd1/iaa12* 突变体相似的胚胎表现型。因此, 他们推测, *AFBs* 和 *TIR1* 介导胚胎发育及植物整个发育过程中的生长素反应。

近年来越来越多的证据显示, 细胞内的 Ca^{2+} 作为第二信号参与生长素的反应(Du 和 Poovaiah 2005)。钙在植物体内与信息的感受、传递和反应密切相关。生长素可以刺激钙的释放, 增加细胞内游离 Ca^{2+} 的浓度。在小麦的叶基培养中, 用

钙的螯合剂“EGTA”处理先用2,4-D处理过的叶基,体细胞胚的形成即受抑制。这种抑制作用可以特异地为 Ca^{2+} 逆转,但不能被其他阳离子如 Mg^{2+} 和 K^+ 所逆转。无论是否有2,4-D存在, Ca^{2+} 载体“A23187”处理后的叶基,均可见体细胞胚的形成;用 Ca^{2+} 的拮抗剂“TMB₈”处理可消除培养基中的 Ca^{2+} ,并导致体细胞胚的数量减少80%;用钙通道阻滞剂“维拉帕米(verapamil)”和“硝苯地平(nifedipine)”,钙拮抗剂“镧”,钙调素抑制剂“氯丙嗪(chlorpromazine)”和“氟奋乃静(fluphenazine)”处理经2,4-D诱导过的小麦叶基后,体细胞胚的形成即抑制。这些表明,钙-钙调蛋白在生长素诱导的体细胞胚形成过程中有偶联作用(Mahalakshmi等2007),暗示2,4-D诱导的体细胞胚形成可能是由钙介导的。

5 结语

体细胞胚的发生是离体培养因素调控的结果。生长素在胚胎发生早期起着决定性作用(Fischer-Iglesias等2001)。虽然生长素受体的发现是生长素研究问题上的一大进步,但体细胞胚发育机制的揭示还有很长的路要走。今后在生长素对体细胞胚发生作用的研究中以下问题值得注意:(1)生长素信号与受体结合后是如何传递并最终影响基因差异表达的;(2)生长素和其他激素是如何相互作用最终调控体细胞胚的发生和形成的;(3)生长素信号和其他的信号途径有什么样的联系。

参考文献

- 崔凯荣,邢更生,周功克,刘新民,王亚馥(2000).植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节.遗传,22(5):349~354
- 付凤玲,冯质雷,渠柏艳,李晚忱(2006).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.核农学报,20(1):10~14
- 郭子彪,盖钧镒(1997).内源激素IAA、ABA对大豆萌发子叶胚性愈伤组织诱导及其分化的调控.大豆科学,16(3):194~198
- 韩碧文,李颖章(1993).植物组织培养中器官建成的生理生化基础.植物学通报,10(2):1~6
- 李雪梅,刘榕山(1994).小麦幼穗胚性愈伤组织诱导及分化过程中内源激素的作用.植物生理学通讯,30(4):255~260
- 徐武,李鸣,李安生(1995).大麦花药培养过程中内源激素的变化.大麦科学,(1):14~16
- Cedar H, Razin A (1990). DNA methylation and development. Biochim Biophys Acta, 1049 (1): 1~8
- Che P, Gingerich DJ, Lall S, Howell SH (2002). Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in *Arabidopsis*. Plant Cell, 14 (11): 2771~2785
- Cheng TY, Hagen GL (1971). Ribosomal RNA precursor synthesis in tobacco tissue culture. Biochim Biophys Acta, 228 (2): 503~508
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005a). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature, 435 (7041): 441~445
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jurgens G, Estelle M (2005b). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. Dev Cell, 9 (1): 109~119
- Du L, Poovaiah BW (2005). Ca^{2+} /calmodulin is critical for brassinosteroid biosynthesis and plant growth. Nature, 437 (7059): 741~745
- Dudits D, Bögre L, Györgyey J (1991). Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. J Cell Sci, 99 (3): 473~482
- Fischer-Iglesias C, Sundberg B, Neuhaus G, Jones AM (2001). Auxin distribution and transport during embryonic pattern formation in wheat. Plant J, 26 (2): 115~129
- Gray WM, del Pozo JC, Walker L, Hobbie L, Risseuw E, Banks T, Crosby WL, Yang M, Ma H, Estelle M (1999). Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. Genes Dev, 13 (13): 1678~1691
- Hagen G, Kleinschmidt A, Guilfoyle T (1984). Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. Planta, 162 (2): 147~153
- LoSchiavo F, Filippini F, Cozzani F, Vallone D, Terzi M (1991). Modulation of auxin-binding proteins in cell suspensions. 1. Differential responses of carrot embryo cultures. Plant Physiol, 97 (1): 60~64
- Mahalakshmi A, Singla B, Khurana JP, Khurana P (2007). Role of calcium-calmodulin in auxin-induced somatic embryogenesis in leaf base cultures of wheat (*Triticum aestivum* var. HD 2329). Plant Cell Tiss Org Cult, 88 (2): 167~174
- Michalczyk L, Cooke TJ, Cohen JD (1992a). Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. Phytochemistry, 31 (4): 1097~1103
- Michalczyk L, Ribnicky DM, Cooke TJ, Cohen JD (1992b). Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. Plant Physiol, 100 (3): 1346~1353
- Philippart K, Buchsenschutz K, Edwards D, Löffler J, Luthen H, Kranz E, Edwards KJ, Hedrich R (2006). The auxin-induced K^+ channel gene *Zmk1* in maize functions in coleoptile growth and is required for embryo development. Plant Mol Biol, 61 (4-5): 757~768
- Ribnicky DM, Cohen JD, Hu WS, Cooke TJ (2002). An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency. Planta, 214 (4): 505~509
- Ribnicky DM, Illic N, Cohen J D, Cooke TJ (1996). The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism (The implications for carrot somatic embryogenesis). Plant Physiol, 112 (2): 549~558
- Satoh S, Kamada H, Harada H, Fujii T (1986). Auxin-controlled glycoprotein release into the medium of embryogenic carrot cells. Plant Physiol, 81 (3): 931~933
- van der Zaal EJ, Memelink J, Mennes AM, Quint A, Libbenga KR (1987). Auxin-induced mRNA species in tobacco cell cultures. Plant Mol Biol, 10 (2): 145~157
- Zeng FC, Zhang XL, Jin SX, Cheng L, Liang SG, Hu LS, Guo XP, Nie YC, Cao JL (2007). Chromatin reorganization and endogenous auxin/cytokinin dynamic activity during somatic embryogenesis of cultured cotton cell. Plant Cell Tiss Org Cult, 90 (1): 63~70