

植物导管分子分化和形成的生理生化机制

肖静 杨洪强*

山东农业大学园艺学院, 泰安 271018

The Physiological and Biochemical Mechanism of Tracheary Element Differentiation and Formation in Plants

XIAO Jing, YANG Hong-Qiang*

College of Horticulture, Shandong Agricultural University, Taian 271018

提要 从木质素代谢、细胞凋亡、生长素在导管分子分化和形成过程中的作用等方面对近年来植物导管分子分化和形成的生理生化机制研究进展作了介绍。

关键词 木质素; 细胞凋亡; 生长素; 导管分子分化

导管是运输水分和矿质元素的重要器官, 对于植物的生长发育十分重要。导管分子分化和形成一直是人们十分关注的课题之一。近年来, 随着细胞凋亡研究的发展, 人们发现导管分子分化是一个典型的细胞编程性死亡过程(programmed cell death, PCD)^[1]。在导管分子分化中, 原生质体发生PCD、细胞内的各种细胞器均解体消失^[2], 在PCD的末期, 端壁自溶, 最后形成由一系列死细胞组成的输导水分和无机物质的管道——导管。木质素是导管的重要化学组分, 管壁上木质素的沉积对完整导管的形成也十分重要。本文从木质素代谢、PCD及其激素调节等方面, 介绍导管分子分化和形成的生理生化机制研究进展。

1 参与导管分子形成的木质素代谢

木质素作为植物生长发育中的一种次生代谢物质, 在植物的生长发育和抗性中具有重要的生物学功能。在细胞壁木质化过程中, 木质素渗入细胞壁, 填充于细胞壁构架内, 从而加大细胞壁的硬度, 增强了细胞的机械支持力或抗压强度, 促进机械组织的形成, 有利于巩固和支持植物体和水分输导。同时, 由于木质素的独特化学性质, 如水不溶性, 使得木质部具有细胞壁疏水性, 可增强水分的输导能力。

木质素是由4种醇单体(对香豆醇、松柏醇、5-羟基松柏醇、芥子醇)形成的一种复杂的酚类聚合物^[3], 是包围于管胞、导管和纤维等纤维素细胞和厚壁细胞外的物质。木质素的合成途径: 光

合产物经莽草酸途径生成L-苯丙氨酸, L-苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶(PAL)催化下生成肉桂酸, 肉桂酸在阿魏酸5-羟化酶(F5H)等酶的催化下生成阿魏酸等其它有机酸, 然后肉桂酸和其它有机酸在羟基肉桂酸: 辅酶A连接酶(4CL)、羟基肉桂酰辅酶A还原酶(CCR)和羟基肉桂酸脱氢酶(CAD)等酶催化下生成3种单木质醇; 最后这3种单木质醇在过氧化物酶(POD)和漆酶的作用下脱氢聚合, 分别生成对羟基苯基木质素、愈创木基木质素和紫丁香木质素^[4]。导管的形成伴随着木质素的合成, 所以木质素合成途径中的关键酶类如POD、CAD、PAL的特性对于导管分子分化有着重要意义。

管状分子(如导管分子、筛管分子)在整个分化过程中不断合成新物质用于构成特定式样的次生壁, 与此同时, 原生质体内各种细胞器逐渐解体自溶。木质素主要沉积在导管细胞壁和维管束间的纤维细胞中, 导管壁的次生加厚实际上是木质素不断沉积的结果^[5,6]。丛斌和杨茂成^[7]的研究结果表明, 管状分子主要在成熟区分化形成, 在伸长区只有初步的分化和木质素的少量沉积, 木质素是导致根尖细胞分化出管状分子的基础。Ovenp等^[8]发现植物受伤后, 愈伤组织首先形成木

收稿 2003-06-24 修定 2003-10-22

资助 国家自然科学基金(30170655和30270923)。

* 通讯作者(E-mail: labft@sdau.edu.cn, Tel: 0538-8249304)。

质化的薄壁组织细胞, 随后是短导管和创伤树脂道的形成, 而这一过程需要苯丙烷类代谢产物的参与。黄祥辉等^[9]在研究百日草游离叶肉细胞导管分子分化过程中过氧化物酶的催化特性时发现, 在诱导导管分子分化的细胞培养基(含 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NAA, $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的6-BA)中, 导管分子的分化从第3天开始, 第6天达到高峰; 在基础培养基(含 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NAA, $0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的6-BA)中未见导管分子的产生。木质素含量的递增在基础培养基中是低而平稳的, 而在导管分子诱导培养基中第5天迅速增加, 第6天达到高峰。Fukuda和Komamine^[10]在百日草游离叶肉细胞系统中, 以愈创木酚为底物所做的试验结果显示, 过氧化物酶II(POD II)、过氧化物酶III(POD III)活性与木质素合成有关。而黄祥辉等^[9]的实验结果表明, 过氧化物酶I(POD I)的活性, 在导管分子诱导培养基中与基础培养基中相差无几, 但以咖啡酸(CA)为底物的POD III、以阿魏酸(FA)为底物的POD III、以丁子香酚(CAR)为底物的POD II的活性, 在导管分子诱导的细胞培养基中要比在基础培养基中高得多。从抑制动力学特性分析来看, 间苯三酚对过氧化物酶(POD)的抑制属于竞争性抑制, 在培养基中加入间苯三酚, 以CAR为底物的POD II、以CA为底物的POD III、以FA为底物的POD III的活性受到明显抑制, 木质素的合成完全停止, 导管分子也不形成^[9]。朱海英等^[11]在研究丝瓜果实发育中木质素代谢及有关导管分化的生理生化时发现, 丝瓜果实发育期间, 中小维管束数目在8~12 d里迅速增加, 木质素含量在5~8 d之间迅速上升, 这说明随着木质素含量的增加, 薄壁细胞大量分化成导管分子, 再者, 第12天后中维管束数目上升而小维管束数目下降, 说明12 d后主要进行的是维管束内的导管分化。

细胞壁的结构从外到里依次为胞间层、初生壁、第一次生壁(S1)、第二次生壁(S2)和第三次生壁(S3)。以免疫化学法分析木质素亚基单位G和S表明, 在导管细胞中, 野生植株G和S单元在S1、S2和S3中分布不均匀, S2中最多, 杂交子代中G和S单元集中分布在S1和S3上^[12]。贺新强等^[13]在研究杜仲(*Eucommia ulmoides*)次生木质

部分化过程中木质素与半纤维素组分(木葡聚糖、木聚糖)在细胞壁中分布的动态变化时发现, 在形成层及细胞伸展区域, 细胞壁中有木葡聚糖的分布, 而没有木聚糖和木质素的沉积。随着次生壁S1层的形成, 木质素出现在细胞角隅和胞间层, 木聚糖开始出现在S1层中, 此时木葡聚糖则分布在初生壁和胞间层; 随着次生壁S2层及S3层的形成和加厚, 木质素逐渐由细胞角隅和胞间层扩展到S1、S2和S3层, 其沉积呈现出不均匀的块状或片状沉积模式。在次生壁各层形成与其木质化的同时, 木聚糖逐渐分布于整个次生壁中, 而木葡聚糖仍局限分布于初生壁和胞间层。所以说, 随着细胞次生壁的形成与木质化, 细胞壁结构会发生较大变化, 细胞壁的不同区域, 如细胞角隅、胞间层、初生壁和次生壁各层各具有不同的半纤维素组成, 其与木质素等细胞壁组分结合共同构成不同区域细胞壁的分子结构。

Motose等^[14]在研究百日草分离叶肉细胞分化成导管分子的实验中发现, 在微床培养中导管分子的分化频率依赖于局部细胞密度(每一个微床上的细胞密度), 导管分化要求局部细胞密度大于 $5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将固体薄层培养基分为两侧, 一侧细胞密度低(低于 $5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$), 另一侧细胞密度高。当低密度侧的细胞与高密度侧的细胞相接触时, 尽管细胞密度低, 该侧的细胞也能分化为导管分子, 暗示高密度一侧细胞会向低密度一侧细胞释放某种调节物质。如果在高低密度细胞之间插入一层只能让分子量低于25 kD的物质通过的膜, 低密度细胞侧导管分子分化会被严重抑制; 当插入的膜可以让分子量为300 kD的物质通过时, 低密度一侧的细胞导管分子分化不受影响。这表明从高密度细胞处向低密度细胞处释放的能够诱导导管分子分化的物质分子量在25~300 kD之间, 这种物质被认为是木质素。同时, 在不同时间于高低密度细胞之间插入微孔膜的方法证明导管分化需要木质素的时间大致在次生细胞壁加厚之前的12~36 h。

2 细胞凋亡与导管分子分化

PCD是受基因控制的一种主动的死亡现象^[15], 植物体内一些特化细胞分化的最后阶段都要进行

PCD的过程^[16], 管状分子的分化便是一个典型的例子^[1]。王雅清和崔克明^[17]在研究杜仲次生木质部导管分子分化时, 采用原位末端标记法, 检测到个别细胞特异性的DNA断裂, 证明杜仲次生木质部导管分子的分化过程是PCD过程。Fukuda^[18]也提出, 在植物生长发育过程中包含各种类型的细胞编程性死亡过程。最近, 前形成层分化成导管分子的细胞编程性死亡过程也得到了广泛的研究。Obara等^[19]根据百日草液泡破裂启动的核快速降解的研究结果认为, 导管分子分化过程是一种特殊的细胞编程性死亡过程, 在这一过程中, 没有染色质的凝集, 液泡破裂引发细胞核降解。Kuriyama^[20]在研究百日草导管分子分化中液泡膜完整性丢失过程的实验中发现, 液泡膜渗透性的增大发生在细胞次生壁加厚和导管分子的编程性死亡过程中。Hosokawa等^[1]也提出, 在高等植物中, 导管分子分化是一个典型的细胞编程性死亡过程, 它包括一系列的物质合成和细胞结构的解体和自溶: 细胞核逐步变得极不规则, 染色体高度凝集, 有些细胞核的核周腔膨大, 核周腔内存在着包裹有核物质的内膜凸起, 最后, 核膜消失, 核解体。解体后的物质有两种去向: 一是通过纹孔运输到邻近的细胞中, 二是转化成构建自身次生壁的物质, 如导管细胞壁。凋亡的细胞仍保持细胞膜的完整性, 没有细胞内含物的溢出; 某些蛋白酶和核酸内切酶受到激活或抑制等^[21~23]。在某些情况下, 管状分子在PCD的末期, 端壁发生自溶作用, 使得管状分子相连而形成具有重要功能的导管^[19, 21, 22]。在成熟的导管分子中, 核、质体、线粒体、高尔基体和内质网等各种细胞器皆解体消失, 初生壁也部分降解^[24], 所以说导管分子的形成是细胞凋亡的结果。

细胞编程性死亡有不同的类型, 如导管分子的PCD, 胚性细胞的PCD, 空腔PCD等。不同类型的PCD, 液泡蓄积物不同。在导管PCD中, 液泡不含有溶解细胞壁的水解酶, 而在空腔组织形成中, 不仅含有破坏细胞质的酶, 还含有降解胞间质细胞壁的酶。在过敏性坏死(HR)的细胞死亡中, 则含有植保素、多酚和几丁质酶等物质, 不含有引起自体溶解的酶^[21]。

在植物PCD的核酸降解过程中, 核酸内切酶是最重要的执行者和调控者, 参与这一过程的核酸内切酶主要分为两大类, 即Zn²⁺依赖核酸内切酶和Ca²⁺依赖核酸内切酶。ZEN1是从鱼尾菊叶片导管发育组织中分离到的分子量为43 kD的Zn²⁺依赖核酸内切酶, 转基因烟草定位显示此酶能特定地转运到液泡中积累^[25]。其活性与导管分化过程中细胞自溶进程密切相关。采用抑制剂和生化方法的研究结果表明, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase-like proteins, CLPs)也参与高等植物的PCD调控^[26~28]。在分化的鱼尾菊导管中也曾分离到几个分子量为23~30 kD的CLPs, 用caspase的特异性抑制剂处理后, 鱼尾菊导管的发育即受到影响, 其中30 kD的CLPs最适pH为5.5, 推测位于液泡中^[25]。

大量实验表明, 胞质钙升高是细胞凋亡的早期事件, 胞质钙升高通过激活凋亡相关酶和损伤线粒体、内质网、细胞核等途径参与细胞凋亡调控或启动细胞凋亡进程。Groover和Jones等^[29]推测导管形成过程中Ca²⁺质流和丝氨酸蛋白酶可能参与PCD的发生和次生细胞壁的形成。研究导管发育的原位结果表明, Ca²⁺的进入似并不直接诱导液泡破裂, 而是参与分化导管的细胞降解和次生壁加厚。钙离子通道阻断剂和蛋白磷酸酶抑制剂会加速玉米根部细胞在正常低氧条件下的细胞凋亡; 反之, 钙离子螯合剂和蛋白酶抑制剂能抑制低氧条件下的根细胞凋亡。verapamil是Ca²⁺通道抑制剂, 能抑制Ca²⁺进出细胞。李焕秀^[30]在研究生长素运输抑制剂和钙拮抗剂对菜豆下胚轴生长素诱导的导管分化和形成的影响时发现, 当verapamil与生长素同时处理或在生长素处理后24 h紧接着处理菜豆下胚轴时, 导管数大大减少; 若在生长素处理后间隔48 h再用, 则不影响导管的形成。Roberts和Baba^[31]发现生长素诱导木质部的起源需要调钙蛋白。Ca²⁺通道阻断剂以及钙调素拮抗剂均可抑制导管分子的分化^[32, 33], 而李焕秀^[30]的研究也发现, 菜豆下胚轴导管分化需要此物质, 导管形成期间则不需要, 这间接证明在完整植株内, 外源生长素物质诱导的导管分化受Ca²⁺/CaM系统的调节, 生长素的生理效应受到促

进。

3 激素与导管分子分化

五大类植物激素几乎都参与木质部导管分化的控制^[34~36]。生长素是诱导导管分子分化的先决条件^[35, 37], 其极性运输可决定木质部沿植物长轴分化的连续性^[38]。Sheldrake^[39]用外源生长素处理硬材扭叶松(*Picea sitchensis*)的一年生去芽的插条顶端时, 发现它可以促进处理部位以下的形成层活动和木质部的发育, 而且还能促进发育中的导管分子径向扩大^[17]。生长素的这一作用随着树木的年龄而变化。李焕秀^[30]发现, 生长素促进菜豆下胚轴导管极性向下分化, 对向上分化和形成无作用; 在生长素处理前或后用三碘苯甲酸 TIBA 和 verapamil 作不同时间处理时, 发现导管的分化和形成都需要生长素的极性运输和 Ca^{2+} 的存在。在 0~24 h 内用生长素极性运输抑制剂 TIBA 处理, 可完全抑制生长素诱导的导管分化和形成, 所形成的导管数与不作生长素诱导的相近; 在 24~48 h 内使用, 能部分抑制导管的形成; 在 48~72 h 内使用时, 抑制剂的效果减弱; 72 h 后用则完全失去作用。Jacobs^[40]的研究发现, 木质部分化的最初时期生长素起关键作用。有实验表明, 生长素是诱导木质部导管分子分化所必需的^[41, 24]。在植物体内, 生长素运输都有极性传导的特性, Uggla 等^[42]推测决定不同维管组织细胞分化的位置效应是由生长素的梯度分布而非其绝对浓度决定的。

只有当生长素存在时, 细胞分裂素才促进导管分子的分化^[43]。而且在分化早期并不像生长素那么必需^[41, 24]。另外, Paul 和 Russell^[44]的研究结果表明, ABA 明显抑制大麦糊粉层原生质体的 PCD, 而 GA 则加速 PCD, 细胞分裂素过量时明显抑制叶片的细胞凋亡, 但可诱导导管分子的细胞凋亡。

4 结束语

细胞分裂是细胞分化的基础, 两者又是多细胞生物器官和个体发育的基础, 器官的发育通过细胞分裂、细胞分化和细胞死亡 3 种生命活动得以实现。目前, 关于胚细胞分化的研究已比较深入, 关于植物体细胞分化的研究仅限于花芽的分化。尽管早在上世纪 60~70 年代, 木质部导管分子分化的细胞学以及 DNA 含量的变化就有了许多

研究^[45~47], 但只是在以后的 90 年代, 才开始从 PCD 的角度开展研究, 并且多集中于离体培养系统的导管分子和初生木质部, 整体系统和创伤系统中研究次生木质部分化多侧重于维管形成层的活动规律, 至于次生木质部 PCD 的研究则寥寥无几。植物 PCD 的研究刚刚起步。迄今, 人们对导管分子分化的分子机制还不是十分了解, 例如是什么因素决定了细胞向导管分子分化方向, 导管 PCD 和其它类型的 PCD 在分子水平的调控上有什么不同, 导管 PCD 中 DNA 断裂的机制, 导管分子次生壁构建的分子机制等, 都有待进一步研究。

随着对木质部分化研究的逐渐深入, 植物 PCD 研究的进一步发展, 再加上大量动植物细胞凋亡同源性的研究, 人们逐渐认识到, 细胞凋亡的调控机制在生物界中可能具有一定程度的保守性。为此, 我们可以用研究动物细胞凋亡的一些方法去研究植物细胞凋亡, 为“植物导管分子的形成过程是一个编程性死亡过程”的观点从分子水平上提供依据。此外, 我们还可以通过木质素定位研究木质素在植物导管分子形成过程中的作用, 为更深入地了解木质素和植物导管分子形成之间的关系提供理论依据。

参考文献

- 1 Hosokawa M, Suzuki S, Umezawa T. Progress of lignification mediated by intercellular transportation of monolignols during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia* mesophyll cell. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(9):959~968
- 2 Pennel RI, Lamb C. Programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 1997, 9:1157~1168
- 3 Jacqueline GP, Deborah G. Lignin genetic engineering revisited. *Plant Sci*, 1999, 145:51~65
- 4 Ross WW, John JM, Ronald RS. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Plant Mol Biol*, 1998, 49:585~609
- 5 Zhong RQ, Ripberger A, Ye ZH et al. Ectopic deposition of lignin in the pith of stems of two *Arabidopsis* mutants. *Plant Physiol*, 2000, 123(1):59~69
- 6 Hafren J, Fujino T, Itoh T et al. Ultrastructural changes in the compound middle lamella of *Pinus thunbergii* during lignification and lignin removal. *Holzforchung*, 2000, 54(3):234~240
- 7 丛斌, 杨茂成. 小麦根法细胞分化过程中木质素合成及其相关酶的活性变化. *复旦学报(自然科学版)*, 1997, 36(5):550~554
- 8 Ovenp, Torelli N, Vihar B et al. Response of the cambial zone in conifers to wounding. *Phyton Horn*, 1999, 39(3):133~137
- 9 黄祥辉, 刘淑明, 王隆华. 百日草游离叶肉细胞导管分子分化过程中过氧化物酶的催化特性. *植物生理学报*, 1994, 20

- (1):61~69
- 10 Fukuda H, Komamine A. Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary element differentiation in single cells isolated from mesophyll of *Zinnia elegans*. *Planta*, 1982, 155:423~429
- 11 朱海英, 李人圭, 王隆华等. 丝瓜果实发育中木质素代谢及有关导管分化的生理生化研究. *华东师范大学学报(自然科学版)*, 1997, 1(1):87~93
- 12 Gaelle P, Matthieu C, Catherine L et al. Simultaneous down-regulation of caffeoyl-5-hydroxyferulic acid-*O*-methyltransferase I and cinnamoyl-coenzyme A reductase in the progeny from a cross between tobacco lines homozygous for each transgene consequences for plant development and lignin synthesis. *Plant Physiol*, 2001, 126:145~155
- 13 贺新强, 崔克明, 李正理. 杜仲次生木质部分化过程中木质素与半纤维素组分在细胞壁中分布的动态变化. *植物学报*, 2001, 43(9):899~904
- 14 Motose H, Fukuda H, Sugiyama M. Involvement of local inter-cellular communication in the differentiation of zinnia mesophyll cells into tracheary elements. *Planta*, 2001, 213(1):121~131
- 15 Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Brit J Cancer*, 1972, 26:239-257
- 16 Cui KM. Switch and stages of differentiation in plant cells. *Life Sci*, 1997, 9:49~54
- 17 王雅清, 崔克明. 杜仲次生木质部导管分子分化中的程序性死亡. *植物学报*, 1998, 40(12):1102~1107
- 18 Fukuda H. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol Biol*, 2000, 44(3):245~253
- 19 Obara K, Kuriyama H, Fukuda H. Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in zinnia. *Plant Physiol*, 2001, 125(2):615~626
- 20 Kuriyama H. Loss of tonoplast integrity programmed in tracheary element differentiation. *Plant Physiol*, 1999, 121(3):763~774
- 21 Alan MJ. Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol*, 2001, 125(10):94~97
- 22 Heath MC. Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol*, 2000, 44(3):321~334
- 23 于明革, 杨洪强. 植物细胞编程性死亡的调控. *植物生理学通讯*, 2002, 38(5):493~499
- 24 Ross WW, John JM, Ronald RS. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Plant Mol Biol*, 1998, 49:585~609
- 25 Hiroo F. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol Biol*, 2000, 44:245~253
- 26 Young TE, Gallie DR. Programmed cell death during endosperm development. *Plant Mol Biol*, 2000, 44(3):283~301
- 27 Hansen G. Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells. *Mol Plant Microb Interact*, 2000, 13(6):649~657
- 28 Solomon M, Belenghi B, Delledonne M et al. The involvement of cysteine protease and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 1999, 11(3):431~443
- 29 Groover A, Jones AM. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiol*, 1999, 119(2):375~384
- 30 李焕秀. 生长素运输抑制剂和钙拮抗剂对菜豆下胚轴生长素诱导的导管分化而后形成的影响. *四川农业大学学报*, 1993, 11(2):233~237
- 31 Roberts LW, Baba S. Evidence that auxin-induced xylogenesis in *Lactuca* explants required calmodulin. *Environ Exp Bot*, 1987, 27:289~295
- 32 Kobayashi H, Fukuda H. Involvement of calmodulin and calmodulin-binding proteins in the differentiation of tracheary elements in *Zinnia* cells. *Planta*, 1994, 194:388~394
- 33 Roberts AW, Haigler CH. Tracheary element differentiation in suspension-cultured cells of *Zinnia* requires uptake of extracellular Ca^{2+} . *Planta*, 1990, 180:502~509
- 34 Fukuda H. Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47:299~325
- 35 Roberts LW. Hormonal aspects of vascular differentiation. Berlin:Springer-Verlag, 1988. 22~38
- 36 Nelson ND, Hillis WE. Ethylene and tension wood formation in *Eucalyptus gomphocephala*. *Wood Sci Tech*, 1978, 12:309~315
- 37 Aloni R. The induction of vascular tissues by auxin and cytokinin. In: Davis PJ (ed). *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht/Boston/London:Kluwer, 1995. 531~546
- 38 Sachs T. Cell polarity and tissue patterning in plants. *Development*, 1991, (suppl):83~93
- 39 Shelldrake AR. The production of hormones in higher plants. *Biol Rev*, 1973, 48:509~559
- 40 Jacobs WP. The role of auxin in differentiation of xylem around a wound. *Am J Bot*, 1952, 39:301~309
- 41 Church DL, Galston AW. Kinetics of determination in the differentiation of isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans* to tracheary elements. *Plant Physiol*, 1988, 88:92~96
- 42 Uggla C, Moritz T, Sandberg G et al. Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:9282~9286
- 43 Fukuda H. Tracheary element formation as a model system of cell differentiation. *Int Rev Cytol*, 1992, 136:289~332
- 44 Paul CB, Russell LJ. Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *Plant J*, 2001, 25(1):19~29
- 45 Esau KVI, Cheadle R HG. Cytology of differentiation tracheary elements. I. Organelles and membranes systems. *Am J Bot*, 1966, 53:756~764
- 46 Lai V, Srivastava M. Nuclear changes during differentiation of xylem vessel elements. *Cytobiologie*, 1976, 12(2):220~234
- 47 List A. Some observations of DNA content and cell and nuclear volume growth in the developing xylem cells of certain higher plants. *Am J Bot*, 1963, 50:320~329