

# 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节

崔凯荣<sup>1</sup> 邢更生<sup>2</sup> 周功克<sup>2</sup> 刘新民<sup>1</sup> 王亚馥<sup>2</sup>

(1. 中国科学院兰州沙漠研究所 兰州 730000 2. 兰州大学 干旱农业生态国家重点实验室 兰州 730000)

**摘要:**以作者自己的工作为背景,结合国内外近几年的有关报道,综述了几种外源和内源激素对植物体细胞胚胎发生的诱导与调节作用。外源生长素和细胞分裂素是诱导离体培养细胞分化与增殖所必需的,2,4-D 是诱导胚性愈伤组织的重要激素。在体细胞胚胎发生中内源激素含量和代谢的平衡起着关键的作用,而且外源和内源激素对诱导体细胞胚胎发生起相互调节作用。ABA 在提高体细胞胚胎发生频率和质量上具有重要作用,同时,外源与内源 ABA 对体细胞胚胎发生起相互促进作用。本文还较为深入地讨论了这些激素诱导体细胞胚胎发生的可能作用机制。

**关键词:**植物;外源激素;内源激素;体细胞胚胎发生

中图分类号:Q945 文献标识码:A 文章编号:0253-9772(2000)05-0349-06

## The Induced and Regulatory Effects of Plant Hormones in Somatic Embryogenesis

CUI Kai-rong<sup>1</sup>, XING Geng-sheng<sup>2</sup>, ZHOU Gong-ke<sup>2</sup>, LIU Xin-min<sup>1</sup>, WANG Ya-fu<sup>2</sup>

(1. Lanzhou Institute of Desert Research, Academia Sinica, Lanzhou 730000 2. The State Key Laboratory of Arid Agroecology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** The paper summarizes the induced and regulatory effects of a few exogenous and endogenous hormones in plant somatic embryogenesis by our studies and related international reports. The exogenous auxin and cytokinin are necessary to induced differentiation and proliferation of cells of culture in vitro. 2,4-D is an important hormone of induced embryogenic calluses. The contents and the metabolic balances of endogenous hormones have key effects for somatic embryogenesis. In addition, the exogenous and endogenous hormones have mutual regulatory effects for somatic embryogenesis. ABA has an important effect to improving the frequency and quality of somatic embryogenesis. Meanwhile, the exogenous and endogenous ABA have mutual promoted effects for somatic embryogenesis. The paper discusses possible mechanism of hormones-induced somatic embryogenesis in a deep-going way.

**Key words:** plant; exogenous hormone; endogenous hormone; somatic embryogenesis

体细胞转化为胚性细胞的一个重要前提是这些细胞必须脱离整体的约束,而进行离体培养。但仅离体培养并非是胚性细胞发生的充分条件,因为这一转化过程的分子基础是基因差别表达的结果。但基因的差别表达需要一定的内外条件的诱导,也就是说细胞分化必须具有相应的诱导因子。影响细胞分化的因素很多,但其中最重要的是激素的调节作用。

植物激素(plant hormones)是植物体内天然存在的一系列有机化合物,其含量极低,它调控细胞分化和生长的方向与

进程以至植物生命活动的整个过程。植物激素的特点是产生于植物体内特定部位,是植物在正常发育过程中或特殊环境影响下的代谢产物;能从合成部位运输到作用部位;它不是营养物质,仅以很低的浓度产生各种特殊的调控作用。植物激素具选择性,例如吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)主要在分生组织和种子内合成;赤霉素(gibberellin, GA)主要在生长中的种子内合成;脱落酸(abscisic acid, ABA)和乙烯(ethylene)虽能在不同器官内合成,但在成熟、衰老或胁迫环境下能在特殊部位大量产生。

收稿日期:1999-09-07;修回日期:1999-10-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(批准号:39170393,39770375)

作者简介:崔凯荣(1962-),女(蒙),内蒙古人,博士后,助理研究员,专业方向:细胞遗传学;王亚馥(1933-),女(汉),湖北武汉人,教授,博导,专业方向:遗传学,本文通讯联系人。

各类植物激素的生理作用虽具有相对的专一性,但是植物的各种生理效应是不同种类激素之间的相互作用的综合表现<sup>[1]</sup>。植物细胞离体培养,诱导脱分化和再分化过程更非是某类激素单独作用的结果。如茴香(*Foeniculum vulgare*)组织培养中,在不同发育时期,对外源激素的要求不同,幼茎外植体在附加 2, 4-D 的 MS 培养基上诱导脱分化产生大量愈伤组织,在含 6-BA 的条件下,愈伤组织再分化形成颗粒状的胚性愈伤组织。当胚性愈伤组织转入附加 NAA 和 6-BA 的培养基后,体细胞胚生长、发育、形成再生植株<sup>[2]</sup>。拐芹(*Angelica holymorpha*)形成胚性愈伤组织(embryogenic callus, EC)和非胚性愈伤组织(non-embryogenic callus, NEC)的过程中,内源激素 ABA、GA<sub>3</sub>、CTK 和 IAA 水平相继出现高峰<sup>[3]</sup>。这些结果都表明,外源或内源激素对植物细胞离体培养形态发生起着相互的连续性作用。

## 1 生长素与细胞分裂素对体细胞胚胎发生的调节作用

在多数植物组织培养中,外源生长素和细胞分裂素是细胞离体培养所必需的激素。两者不同浓度和比例或先后配合的应用不但可诱导细胞分裂和生长,而且能控制细胞分化和形态建成。众所周知,2,4-D 是诱导体细胞发生的重要激素,早在 60 年代有学者就建立了胡萝卜体细胞胚发生体系。胡萝卜是一个经典的研究体细胞胚发生的好材料,它在含有 2,4-D 的 MS 培养基中就可诱导愈伤组织和胚性愈伤组织的形成,当转移至无 2,4-D 的 MS 培养基中,可诱导体细胞胚的形成与发育<sup>[4]</sup>。因此大量学者以胡萝卜为材料研究了体细胞发生和发育的分子基础和相关基因的表达与调控及其基因的鉴定与克隆等<sup>[5-7]</sup>。

多数植物组织培养诱导脱分化都必需 2,4-D 特别是单子叶植物,如禾本科作物组织培养往往需要较高浓度的 2,4-D。而双子叶植物需要 2,4-D 的浓度一般只有单子叶植物的 1/10~1/20,而且诱导脱分化后还必须及时降低或去掉 2,4-D,胚性细胞才能正常发育。如上面提到的胡萝卜体细胞胚发生系统。又如双子叶药用植物宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)无菌苗接种在 MS+0.2mg/L 2,4-D 培养基上诱导脱分化形成愈伤组织,愈伤组织转入无激素的 MS 培养基上即可诱导体细胞胚性发生<sup>[8]</sup>。实验证明,枸杞胚性愈伤组织形成后,如不及时降低或去掉 2,4-D,则胚性细胞也是不能正常地发育。在三叶草和芹菜的组织培养和细胞悬浮培养中诱导体细胞胚发生,如不及时降低 2,4-D 的浓度,那么球形胚就产生次生胚。当次生胚发育到球形胚后又循环继续形成次生胚,由此形成了分支的球形胚链,从而抑制了体细胞胚的正常发育,而被“锁”在一个特殊的发育阶段<sup>[9,10]</sup>。而单子叶植物如小麦等诱导体细胞胚发生不仅需要高浓度的 2,4-D,还需要细胞分裂素如 KT 的配合应用<sup>[11]</sup>。青杆(*Picea wilsonii* Mast)胚性愈伤组织在改良 59 附加 2,4-D 和 KT 各  $1 \times 10^{-6}$  的培养基上继代 3 年,仍具有旺盛的增殖能力。该胚性愈伤组织转入 1/2 改良 59,附加 ABA $1 \times 10^{-6}$  的分化培养基上约

3 个月左右可分化出大量体细胞胚。体细胞胚分化率达 90% 以上,而且遗传性十分稳定<sup>[12]</sup>。

## 2 生长素与细胞分裂素对体细胞胚胎发生的调节作用机制

由于植物组织或细胞在离体培养条件下往往缺乏合成生长素与细胞分裂素的能力,为了细胞生长、分化和分裂,在多数情况下需要生长素和细胞分裂素两种激素的共同作用。正是由于这两种激素控制着细胞的分裂和分化的方向,促使人们致力于研究它们的最初作用部位,激素的信息传递途径和作用机制等,以揭示细胞脱分化和分化的内在机制。但对这两种激素诱导体细胞胚发生的机制了解甚少,有关细胞分裂素的作用机制的研究报道更是十分贫乏。2,4-D 是诱导多种植物离体培养的体细胞转变为胚性细胞的重要激素<sup>[5-8]</sup>。在胡萝卜细胞培养中,加入 2,4-D 后诱导一些特异性多肽或蛋白质形成,当去掉生长素后,这些多肽和蛋白质也随之消失。但是在已诱导出胚性细胞后,及时除去培养基中的 2,4-D,在胚性细胞进一步分化和发育的同时,释放糖蛋白 GP65(65kDa)。若不除去 2,4-D,这时的胚性细胞只释放糖蛋白 GP57(57kDa),而胚性细胞不能进一步分化和发育,同时胡萝卜的非胚性细胞也只释放蛋白 GP57。显然生长素既可激活某些基因表达产生特异蛋白质,促进体细胞胚的发育,又可抑制这些基因表达,激活另一些基因表达,从而抑制体细胞胚的发育,说明激素对基因表达的调控具有时空特异性<sup>[13-15]</sup>。在枸杞的细胞培养中也观察到 2,4-D 可诱导特异性 67kDa 和 33kDa 蛋白质产生,而 40kDa 蛋白质的形成则是 2,4-D 和 6BA 共同作用的结果,而且这些蛋白质的形成与体细胞胚发生和发育密切相关<sup>[16]</sup>。Loschiavo 等人还观察到 2,4-D 的浓度与核 DNA 甲基化有关,当胡萝卜悬浮培养物在含高浓度的 2,4-D 的培养条件下,其细胞核 DNA 甲基化增加,基因表达活性下降。当除去或降低 2,4-D 的浓度时,核 DNA 便甲基化不足(hypomethylation),因而激活相应基因表达<sup>[17]</sup>。控制核 DNA 的甲基化程度,从而调控基因表达和体细胞胚的发育,因此高浓度 2,4-D 存在的条件下,胡萝卜胚性细胞的发育也受到抑制。Michalczuk 等还注意到尽管 2,4-D 可使胡萝卜胚性、非胚性细胞以相似速率增殖,但不能使非胚性细胞获得胚性,表明 2,4-D 的这一效应可能与培养细胞的内部因子有关<sup>[18]</sup>。有实验证明,2,4-D 是通过改变细胞内源 IAA 代谢而起作用<sup>[19,20]</sup>。水稻(*Oryza sativa* L.)幼穗接种于 MS 附加 2mg/L 2,4-D 的诱导培养基和附加 2mg/L KT 分化培养基,并在胚性愈伤组织诱导过程中观察了结合在生长素外运载体复合物调节位点上的 2,3,5 三碘苯甲酸(2,3,5-triiodobenzoic acid, TIBA)的效应。结果表明,在胚性细胞出现时都伴有较高的内源 IAA 水平,并且在胚性细胞转换时添加外源 IAA 可提高诱导胚性细胞的效果,TIBA 可阻止生长素流出细胞,促使细胞内生长素的积累,从而也提高胚性细胞的诱导率。由此表明水稻愈伤组织内累积或维持较高水平的

IAA 是诱导胚性细胞的一个必需条件,也是胚性细胞出现的标志<sup>[20]</sup>。在胡萝卜胚性细胞系和非胚性细胞系中,2,4-D 含量基本接近,但前者内源 IAA 含量比后者高 13 倍。在体细胞胚发育过程中内源 IAA 含量逐步下降,这时外源 2,4-D 也抑制体细胞胚的发育<sup>[19]</sup>。IAA 在胚性细胞诱导中的作用可能与它迅速激活基因表达有关,生长素诱导的 mRNA 合成具有专一性,不受其他激素的诱导。从生长素处理大豆、豌豆和烟草组织内克隆出相应的 cDNA,而且这些基因的激活在其他生理反应之前就已发生。生长素诱导的这些特殊的 mRNA 可能控制下列不同蛋白质的合成:生长素的受体、生长素的运输载体、控制生长素合成及代谢的酶和直接影响生长的酶等。

生长素控制大豆 cDNA 所转录的两类 mRNA, GH 和 SAUR 已被用于研究这些物质与生长的关系。一方面是将这种 mRNA 翻译的蛋白质制成抗体,来检测植物组织内这种特殊的翻译活动。另一方面采用原位杂交技术 (*in situ* print hybridization) 检测这两种 mRNA 在植物器官组织内的分布以及与生长的关系<sup>[21]</sup>。Yamamoto 等从绿豆下胚轴细胞分离获得 7 种受生长素调控的 cDNA,其中 5 种与已报道的基因相似,例如大豆基因 *Aux22* 和 *SAUR*。另两种是新发现的,它们对生长素及伤害表现相似的反应<sup>[22]</sup>。

细胞分裂素作用机制的研究报道很少,但也有实验表明,细胞分裂素处理离体培养甜瓜细胞后,发现细胞分裂素诱导某些多肽消失,而且这种变化发生在芽分化之前。如在培养液内加入 IAA 或蛋白酶抑制剂,结果阻止这种多肽的消失及芽的分化<sup>[23]</sup>。由此说明细胞分裂素对基因表达的调控与细胞分化的关系。此外发现外源细胞分裂素诱导蛋白的合成,促进 mRNA 合成和多核糖体的形成与活化。细胞分裂素处理大豆细胞 4 小时后,多种 mRNA 量明显增加,而且这些 mRNA 的变化发生在生长和分化反应之前,细胞分裂素活化产物是专一的,大多是细胞分裂必需的蛋白质。这些 mRNA 的表达也同时受生长素的影响。细胞分裂素和生长素共同激活烟草悬浮培养细胞中 *PLS216* 基因的表达,该基因与一个由生长、热激、病原体、重金属等因子调节的基因族有关<sup>[24]</sup>。表明这两种激素的相互作用激活有关基因表达,从而促进细胞的生长、分裂与分化。

现在一般认为激素有可能是通过与相应受体结合后而发挥作用。如生长素的结合蛋白 (auxin-binding protein, ABP) 的研究结果表明,不同组织或细胞内各有不同的 ABP,除了一种膜生长素结合蛋白具有受体功能外,尚不能确定其他结合蛋白是否为真正的受体。如玉米胚芽鞘 ABP 至少有三类:(1)膜生长素结合蛋白;(2)胞液及细胞核内的生长素结合蛋白;(3)生长素极性运输抑制剂 NPA 结合蛋白。这三类 ABP 各有其特性。玉米根部的 ABP 与胚芽鞘的 ABP 相似<sup>[25]</sup>。拟南芥的 ABP 结构与玉米的 ABP 相似<sup>[26]</sup>。此外,*Zucchini* 细胞质膜蛋白成分中有两种多肽已被鉴定为 ABP,它们可能是生长素在细胞间运输的通道<sup>[27]</sup>。Venis 等应用一种人工合成的多肽

及其抗体研究生长素与玉米原生质体结合的变化,发现这种人工合成的多肽序列可能是 ABP 中生长素结合位置的重要组成部分,并证实 ABP 位于质膜的外表面<sup>[28]</sup>。而且质膜上 ABP 的含量随着细胞脱分化和分化过程而发生变化,同时对生长素处理的敏感性亦发生相应的变化。光照等因子处理影响细胞对生长素的敏感性,其敏感性变化的程度与 ABP 含量有相关性。还有生长素与质膜蛋白结合的抑制剂可降低细胞对生长素的敏感性等。由此可见 ABP 与生长素的作用密切相关,而且是位于细胞质膜的外表面,同时具有受体功能。

生长素作用机制还包括刺激在质膜上的  $H^+ - ATPase$  活性,一些实验结果表明,ATPase 的活性可能受生长素与结合蛋白的促进,因此 ATPase 活性的提高可作为生长素受体的生化功能的表现。生长素、ABP 抗体和 ATPase 抗体对烟草原生质体膜电势差的显著影响,说明生长素与受体结合从而促进 ATPase 活性。NAA 处理引起明显的质膜电势差,但同时加入 ABP 的单克隆抗体,NAA 对电势差影响消失,说明质膜含有 ABP,而且是生长素的受体。在同一试验中,另一处理可促进质膜一般功能的真菌毒素 (FC) 代替 NAA,结果是 FC 引起的质膜电势差不受 ABP 抗体的影响,说明 ABP 抗体影响质膜电势的专一性。此外,应用 ATPase 抗体实验结果又表明,质膜电势差由 ATPase 活性所引起,进一步证实了 ATPase 的质子泵作用;ATPase 抗体能显著抑制生长素对质膜电势的影响,表明生长素有促进 ATPase 活性的功能。因此 ATPase 活性的促进是生长素通过与受体结合而产生生理生化效应的重要证据之一<sup>[1]</sup>。

有关细胞分裂素受体的研究报道较少,但发现细胞分裂素主要作用是加强  $Ca^{2+}$  的流入,并与钙调素 (calmodulin, CaM) 的作用相关。生长素亦能刺激钙的释放,增加细胞内游离  $Ca^{2+}$  的浓度。 $Ca^{2+}$  和 CaM 复合体的生理作用和与信息传递中的功能已有大量报道。 $Ca^{2+}$  有两种重要功能:一是直接参与激活 PKC,另一是与钙调素结合形成  $Ca^{2+} - CaM$  复合体,使多种蛋白激酶及其他依赖  $Ca^{2+} - CaM$  复合体的酶活化、进而促进蛋白质磷酸化和细胞反应。 $Ca^{2+}$  和  $Ca^{2+} - CaM$  都有第二信使的作用。

第二信使概念的建立对于植物激素作用机制的研究具有重要的意义。由植物激素的处理到细胞的反应之间确实存在信号的识别与转化系统。钙在植物体内与信息的感觉、传递和反应密切相关,而且生长素和细胞分裂素的作用都与  $Ca^{2+}$  含量和 CaM 的活性相关。 $Ca^{2+}$  和  $Ca^{2+} - CaM$  可能促进植物激素信息的传递,进而调控有关基因表达、产生一些新的 mRNA 和蛋白质,为细胞分裂与分化提供必需蛋白质。

### 3 体细胞胚胎发生中内源激素的变化

#### 3.1 内源生长素和细胞分裂素的代谢动态

由于离体植物细胞在开始往往缺乏合成生长素和细胞分裂素的能力,但是在大多数情况下,这些细胞的分裂和分化以及形态建成过程中又必须有生长素和细胞分裂素两种

激素的共同作用。为此在培养介质中添加不同种类或不同浓度的外源激素诱导形态发生已受到广泛的重视。然而,最关键的是组织内部的和体细胞胚发生部位的内源激素(entogenous hormone)代谢动态和平衡。但有关细胞分化和体细胞胚发生过程中内源激素的变化研究报道较少,近几年有增多的趋势。香雪兰(*Freesia refracta* Klatt)花序外植体离体培养后,只有花序轴的原形态学下端分化出体细胞胚,而在形态学上端无体细胞胚的形成。培养前外植体切段两端的内源 IAA 含量无明显差别,但培养后一段时间,胚发生端 IAA 含量明显高于非胚发生端含量;表明内源 IAA 在体细胞胚发生的诱导过程中起着关键作用<sup>[29]</sup>。同样,在水稻组织培养中胚性细胞的出现是由于 2,4-D 促进了细胞内源 IAA 含量的提高从而诱导胚性细胞的形成,并认为内源 IAA 含量上升或维持在较高水平是胚性细胞出现的一个共同标志。当加入外源 IAA 或阻止生长素流出细胞的抑制剂以提高细胞内 IAA 含量均可促进水稻胚性细胞的形成等实验证实了这一观点<sup>[20]</sup>。早在胡萝卜细胞悬浮培养中发现胚性细胞诱导早期 2,4-D 是必需的,并认为 2,4-D 是通过影响 IAA 结合蛋白而起作用的<sup>[30]</sup>。其实促进 IAA 结合蛋白的形成,可提高细胞对 IAA 的敏感性而达到同样的效果。在小麦胚性愈伤组织诱导及分化过程中,胚性愈伤组织(EC)的内源激素的含量远高于非胚性愈伤组织(NEC)<sup>[31]</sup>。IAA 的含量在分化的前期 EC 明显高于 NEC,内源生长素含量的多少与体细胞胚发生密切相关,大多数植物细胞必须在含有 2,4-D 的条件下,对内源生长素进行调节和平衡才能启动细胞分裂和胚性潜力的诱导,并促进体细胞胚的早期发育。赤霉素(GA<sub>3</sub>)的含量刚好相反,是 NEC 高于 EC。推测 GA<sub>3</sub> 对体细胞胚发生有副作用。

在水稻胚性悬浮细胞系建立过程中,悬浮培养的前期至中期,IAA 和 Zip 含量显著上升,ZRseatin (9R)Z、(9R-5'P)Z、(9G)Z 总称 ZR 含量有所下降。在悬浮培养的中期至后期,IAA 含量继续迅速地上升,Zip 上升和 ZR 下降的趋势变缓。表明内源生长素含量迅速提高为水稻愈伤组织悬浮培养胚性细胞系的建立奠定了基础。细胞分裂素 Zip 含量的增加有利于细胞的增殖和分裂<sup>[32]</sup>。近来还有学者为了确定 2,4-D 对玉米未成熟胚在离体培养条件下诱导体细胞胚发生的作用,用 <sup>14</sup>C 标记 2,4-D,以两个玉米自交系(A188 和 A632)的未成熟胚作为外植体,在培养过程中分析对 2,4-D 的吸收和代谢动态。结果表明:培养 24 小时后,两个自交系的未成熟胚开始吸收 2,4-D,而且两个自交系外植体吸收量存在明显差异。A188 中积累放射性 2,4-D70%,且以游离 2,4-D 形式存在,在 A632 中是 37%,而且 16 小时后 2,4-D 开始与糖和氨基酸结合。在 A632 中 2,4-D 代谢速率高于 A188,这可能是 2,4-D 对两个自交系的影响不同的缘故,因而在组织培养中有不同的反应,也是导致胚胎发生和非胚胎发生的重要因素<sup>[33]</sup>。

### 3.2 内源 ABA 含量的变化与外源 ABA 的作用

脱落酸是在本世纪 60 年代人们研究树木休眠过程中分

离的一类植物激素。长期以来,顾名思义,把诱导植物器官的脱落当作是 ABA 的主要生理功能之一。实际上,乙烯才是导致器官脱落的主要因素,而脱落酸是一种具有全面生理功能的内源激素。它能抑制植物细胞伸长和分裂,诱导种子休眠,防止过早萌发,在植物对各种环境因子如干旱、低温和机械伤害等应答过程中起重要作用。

一些研究结果表明,ABA 对植物体细胞胚的发生与发育具有重要作用<sup>[34]</sup>。在胡萝卜体细胞胚形成过程中,早期在形成胚和不形成胚的细胞中,内源 ABA 都维持在一个低水平,但培养至第 10 天,在形成胚的细胞中 ABA 含量上升到最高值,然后下降。而在不能形成胚的细胞中,ABA 含量一直在增加,到第 13 天时达到最高,然后下降,到第 17 天降到一个低水平<sup>[35]</sup>。我们在建立的枸杞体细胞胚发生体系基础上,研究了体细胞胚发生与发育过程中内源 ABA 的含量变化和外界 ABA 的作用。结果表明,当枸杞愈伤组织转入分化培养后的第 1 天,内源 ABA 含量显著升高,并迅速形成第一个峰值。这时正是胚性细胞启动分化期、胚性细胞大量形成,并有相应的 35kDa 蛋白质出现。分化培养后的第 15 天,内源 ABA 含量达到第二个峰值,这时正是球形胚形成期,而 35kDa 蛋白质组分含量也在此时达到最大值。实验结果还表明,外源 ABA 与内源 ABA 对体细胞胚发生起到相互调节和促进的作用,因而补加适量的外源 ABA 可明显地提高体细胞胚发生的频率与质量<sup>[36]</sup>。还有实验也得到相似的结果<sup>[37]</sup>。

体细胞胚发生的频率和质量不仅是有关理论研究的基础,而且也是制作“人工种子”的重要前提。正是由于人们认识到 ABA 在提高体细胞胚发生的频率和质量方面的重要作用,为此不少学者不仅研究在体细胞胚发生过程中内源 ABA 含量的变化、更多的探讨了外源 ABA 的作用及其机制。证明 ABA 具有促进茛蒿(*Carum carvi* L.)体细胞胚结构正常化的显著效应。在浓度适宜时,ABA 能抑制多种异常体细胞胚的发生,而且 ABA 加入培养基的时间愈早其效应也愈显著。较低浓度 ABA 对保持水稻愈伤组织的胚性结构具有重要意义,可使这种胚性愈伤组织分化出苗率明显提高。并认为 ABA 提高水稻愈伤组织再生率的原因是能有效地诱导胚性愈伤组织的产生。同时在拐芹中 ABA 还和 NAA 共同作用可诱导一些游离氨基酸含量的变化和特异蛋白形成<sup>[37,38]</sup>。

大量实验结果表明,ABA 对某些植物体细胞胚发生的特异基因表达起调控作用,激活相关基因到达,合成贮藏蛋白、晚期胚胎发生丰富蛋白(late-embryogenesis-abundant protein, LEA)和胚胎发生的特异性蛋白<sup>[39,40]</sup>。在鹰嘴豆的体细胞胚发生中,用 ABA 处理可产生三种特异的 cDNA 克隆, mRNA 的体外翻译和 Northern 印迹分析表明,这三种克隆的表达与胚的成熟有关<sup>[41]</sup>。在白云杉的体细胞胚发生中,ABA 处理愈伤组织后不仅提高了体细胞胚发生的频率,并有新的蛋白质合成<sup>[42]</sup>。外源 ABA 对大麦胚的萌发起决定作用<sup>[43]</sup>。ABA 可诱导胡萝卜体细胞胚发生的 DC8 mRNA 水平提高,用 ABA 合成抑制剂氟洛利酮(fluridione)降低 ABA 的合成,结果也影响了

DC8 mRNA 的转录水平。由此表明, ABA 至少部分地在转录水平上对该基因进行调控。ABA 生物合成抑制剂不仅降低内源 ABA 的含量, 而且抑制了体细胞胚发生, 同时外源 ABA 可部分克服这种影响<sup>[44]</sup>。

受 ABA 调控的基因启动区序列一般都存在多个能与特异蛋白因子结合的顺式作用元件, 也称 ABA 效应元件 (ABA responsive element, ABRE)。有人利用 *Cat* 作为报告基因, 在水稻原生质体内研究 *rab16A* 基因启动区介导的瞬时表达, 证明该基因上游 -294 ~ +27 区是受 ABA 诱导表达所必需的序列。他们还将 *rab16A* 基因的 -290 ~ -52 与 CaMV 35S 最基本的的启动子相融合, 发现所构建的嵌合启动子仍具有受 ABA 诱导表达的能力, 暗示该 39 个碱基对中有可能存在一个或数个 ABRE。进一步分析不同基因启动区序列保守性, 发现其中确实存在数个保守性很强的区域。含有 TACGTGGY (Y 为嘧啶核苷酸) 序列的区域 I 是受 ABA 诱导的增强子元件的核心序列, 也是反式作用因子 Taf-1 的结合位点, 与棉花中的 5 种 *lea* 基因, 小麦 *Em* 基因、水稻 *win* 基因启动区的保守序列一致, 还与光调控基因中 GT-box 有同源性<sup>[34, 45]</sup>。

在大麦中 ABA 诱导 *lea* 基因表达的 ABA 效应复合物 (ABA response complexes, ABRC) 也具有以上保守序列, 是由 10bp 的含 ACGT 核心的框 (box) 和 11bp 的上游序列组成, 只需一个拷贝的 ABRC 就足以发生 ABA 的诱导作用<sup>[46]</sup>。以上结果证明, 顺式作用元件 TACGTGGC 在 ABA 诱导的基因表达中起着关键的作用, 而且该序列与哺乳动物中 cAMP 感应因子结合序列 TGACGTCA 相似, 可以同时结合几个反式作用因子<sup>[47]</sup>。而 ABA 有可能直接作为反式作用因子调节基因表达。但也有证据表明, ABA 是先与靶细胞效应部位蛋白因子或受体蛋白相结合, 然后通过细胞的第二信使分子传递信号、激活反式作用因子与顺式作用元件结合, 从而在转录水平上调控基因表达<sup>[34]</sup>。发育信号或环境因子都能诱导 ABA 大量合成, 细胞内高浓度 ABA 可能通过质膜上的受体影响细胞内  $Ca^{2+}$ /CaM 系统,  $H^+$ -ATPase 系统, 导致叶片上气孔的开、闭运动。还可能通过细胞核及核膜上的受体在各个水平上影响许多基因的表达和功能<sup>[45]</sup>。

对大麦的研究结果也证明,  $Ca^{2+}$  在 ABA 诱导基因表达中起重要作用,  $Ca^{2+}$  的浓度可影响 ABA 诱导特异的 RAB 基因表达。在 ABA 含量相同的条件下, 如增加外源  $Ca^{2+}$  的浓度, 则 RAB mRNA 表达水平提高。在大麦糊粉层的原生质体中, RAB 基因表达被  $Ca^{2+}$  通道阻断剂所抑制, 抑制能力与阻断剂浓度相关, 同时  $Ca^{2+}$  的抑制剂或拮抗剂都可抑制 RAB 的表达水平。由此表明, 细胞内  $Ca^{2+}$ -CaM 信息系统对 ABA 诱导基因表达中起着极其重要的作用。它可将信息传递到细胞内的特定效应部位, 引起细胞内一系列信号蛋白的活化与多种信号蛋白的磷酸化, 以及 GTP 和 GDP 结合状态修饰等, 最后是转录因子的磷酸化或去磷酸化, 从而主要地在转录水平上调控基因表达<sup>[48]</sup>。

关于植物激素的作用机制极其复杂, 尽管近几年应用分

子生物学技术, 加速了激素对基因表达调控的研究, 但对植物激素有关的 mRNA 和蛋白质的生理功能了解甚少, 激素是直接作为反式作用因子调节基因表达? 还是与受体结合后才发挥作用? 但是受体的性质与功能的鉴定以及激素与第二信使的关系等都有待深入研究。植物体细胞胚发生系统是研究生长素或细胞分裂素作用机制的较为理想的实验体系。若从信息感受、传递、强化和细胞反应全过程相互结合进行研究, 相信不久会取得更大的进展。

## 参 考 文 献:

- [1] 李宗霖, 周 燮. 植物激素及其免疫检测技术 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1996.
- [2] 郝建平, 周小梅, 李绍清, 等. 茴香组织培养中体细胞胚胎发生的组织细胞学研究 [J]. 实验生物学报, 1995, 28(3): 339 ~ 345.
- [3] 汤国庆, 李文安. 在离体条件下拐芹 (*Angelica polymorpha*) 形成胚性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 ~ 208.
- [4] Satoh S, Kamada H, Harada H, et al. Auxin controlled glycoprotein release into the medium of embryogenic carrot cells [J]. Plant Physiol, 1986, 81: 931 ~ 993.
- [5] Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, et al. Isolation and characterization of a cDNA that encodes ECP31, an embryogenic cell protein from carrot [J]. Plant Mol Biol, 1992, 19: 239 ~ 249.
- [6] Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, et al. cDNA cloning of EP40, an embryogenic cell protein in carrot, and its expression during somatic and zygotic embryogenesis [J]. Plant Mol Biol, 1993, 21: 1053 ~ 1068.
- [7] 朱长甫, 镰田博, 何奕昆, 等. 胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 胚性细胞蛋白分离的研究 [J]. 实验生物学报, 1997, 30(1): 13 ~ 19.
- [8] 崔凯荣, 任红旭, 邢更妹, 等. 枸杞组织培养中抗氧化酶活性与体细胞胚发生相关性研究 [J]. 兰州大学学报 (自然科学版), 1998, 34(3): 93 ~ 99.
- [9] Nadel B L, Altman A, Iiv M. Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspension 2. Early detection of embryogenic potential and the induction of synchronized cell cultures [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1990, 20: 119 ~ 124.
- [10] Parrott W A. Auxin-stimulated somatic embryogenesis from immature cotyledons of white clover [J]. Plant Cell Reports, 1991, 10: 17 ~ 21.
- [11] 王仑山, 高祥群, 王亚馥. 小麦耐盐变异体筛选 I. 小麦体细胞胚性无性系的建立 [J]. 兰州大学学报 (自然科学版), 1993, 29(4): 208 ~ 221.
- [12] 杨映根, 桂耀林, 唐 巍, 等. 青扞愈伤组织在继代培养中的分化能力及染色体稳定性研究 [J]. 植物学报, 1994, 36(12): 934 ~ 939.
- [13] Hadrami E L, Dauac J. Effects of growth regulators on polyamine content and peroxidase activity in *Hebea brasiliensis* callus [J]. Ann Bot, 1992, 69: 323 ~ 325.
- [14] Kiyosue T, Satoh S, Kamada H, et al. Purification and immunohistochemical detection of an embryogenic cell protein in carrot [J]. Plant

- Physiol, 1991, 95: 1077 ~ 1083.
- [15] 王晓哲, 陈雄, 王亚馥. 植物体细胞胚发生中基因表达调控研究的某些现状[J]. 遗传, 1995, 17(增刊): 34 ~ 38.
- [16] 陈雄, 王星, 王亚馥. 激素对枸杞体细胞胚发生及可溶性蛋白质含量和组分的影响[J]. 西北植物学报, 1995, 15(5): 26 ~ 30.
- [17] Mathias R J, Fukui K, Law C N. Cytoplasmic effects on the tissue culture response of wheat (*Triticum aestivum*) callus[J]. Theor Appl Genet, 1986, 72: 70 ~ 75.
- [18] Michalczuk L, Cooke T J, Cohen J D. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis[J]. Phytochemistry, 1992, 31: 1097 ~ 1103.
- [19] Sasaki K, Simomura K, Kamada H, et al. IAA metabolism in embryogenic and nonembryogenic carrot cells[J]. Plant Cell Physiol, 1994, 35: 1159 ~ 1164.
- [20] 陈以峰, 周雯, 汤日圣, 等. 水稻体细胞培养中胚性细胞出现与 IAA 的关系[J]. 植物学报, 1998, 40(5): 474 ~ 477.
- [21] Gee M A, Hagen G, Guilfoyle T J. Tissue-specific and organ-specific expression of soybean auxin-responsive transcripts GH3 and SAURS [J]. Plant Cell, 1991, 3: 419 ~ 430.
- [22] Yamamoto R T, Mori H, Imaseki H. cDNA cloning of indole-3-acetic acid-regulated genes: Aux22 and SAUR from mung bean (*Vigna radiata*) hypocotyl tissue[J]. Plant Cell Physiol, 1992b, 33: 93 ~ 97.
- [23] Leshem B, Ronen R, Soudry E, et al. Cytokinin at a large range of concentrations determines rates of polypeptide metabolism and regeneration in cultured meton cotyledons[J]. J Plant Physiol, 1994, 143: 330 ~ 336.
- [24] Crowell D N, Kadlecsek A T, John M C, et al. Cytokinin-induced mRNAs in cultured soybean cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 8815 ~ 8819.
- [25] Radermacher E, Klambt D. Auxin dependent growth and auxin-binding protein in primary roots and root hairs of corn (*Iea mays* L.) [J]. Plant Physiol, 1993, 141: 698 ~ 703.
- [26] Sitbon F, Ostin A, Sundbery B, et al. Conjugation of indole-3-acetic acid (IAA) in wild-type and IAA-overproducing transgenic tobacco plants, and identification of the main conjugates by fast atom bombardment liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Plant Physiol, 1993, 101: 313 ~ 320.
- [27] Hicks G R, Rice M S, Lomax T L. Characterization of auxin-binding proteins from zucchini plasma membrane[J]. Planta, 1993, 189: 83 ~ 90.
- [28] Venis M A, Napier R M, Barbier-Brygoo H, et al. Antibodies to a peptide from the maize auxin-binding protein have auxin Agonist Activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 7208 ~ 7212.
- [29] 王丽, 鲍晓明, 黄百渠, 等. 香雪兰外植体形态学极性决定的体细胞胚胎发生[J]. 植物学报, 1998, 40(2): 138 ~ 143.
- [30] Loshivao F, Filippini F, Cozzani F, et al. Modulation of auxin-binding protein in cell suspension I. Different responses of carrot embryo cultures[J]. Plant Physiol, 1991, 97: 60 ~ 64.
- [31] 李雪梅, 刘熔山. 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[J]. 植物生理通讯, 1994, 30(4): 255 ~ 260.
- [32] 向太和, 梁海曼, 钟华鑫, 等. 水稻胚性悬浮细胞系建立过程中的生理生化变化 II. 氨基酸、多胺及内源激素的变化[J]. 作物学报, 1997, 23(3): 353 ~ 359.
- [33] Bronsema F B F, Redig P, Vanoostveen W J F, et al. Uptake and biochemical analysis of 2,4-D in cultured zygotic embryos of *Zea mays* L. [J]. Journal of Plant Physiology, 1996, 149: 363 ~ 371.
- [34] Mundy J, Shinozaki K Y, Chua N H. Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice rab gene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 97: 1406 ~ 1410.
- [35] 韩碧文, 李颖章. 植物组织培养中器官建成的生理生化基础[J]. 植物学通报, 1993, 10(2): 1 ~ 6.
- [36] 崔凯荣, 裴新梧, 秦琳, 等. ABA 对枸杞体细胞胚发生的调节作用[J]. 实验生物学报, 1998, 31(2): 195 ~ 201.
- [37] 张栋, 陈季楚. ABA NAA 诱导水稻胚性愈伤组织的研究[J]. 实验生物学报, 1995, 28(3): 329 ~ 336.
- [38] 汤国庆, 李文安. 在离体条件下拐芹 (*Angelica polymorpha*) 形成胚性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 ~ 208.
- [39] Misra S, Attree S M, Leal I. Effect of abscisic acid, osmoticum and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos[J]. Ann Bot, 1993, 71: 11 ~ 22.
- [40] Roberts D R. Abscisic acid and mannitol promote early development maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce[J]. Physiol Plant, 1991, 83: 247 ~ 254.
- [41] Colorado P, Nicolas C, Nicolas G. Expression of three ABA-regulated clones and their relationship to maturation processes during the embryogenesis of chick-pea seeds[J]. Physiologia Plantarum, 1995, 94: 1 ~ 6.
- [42] Dong J Z, Perras M R, Abrams S R. Induced gene expression following ABA uptake in embryogenic suspension culture of *Picea glauca* [J]. Plant Physiol Biochem, 1996, 34: 579 ~ 587.
- [43] Visser K, Vissers A P A, Cagiran M I. Rapid germination of a barley mutant is correlated with a rapid turnover of abscisic acid outside the embryo[J]. Plant Physiol, 1996, 111: 1127 ~ 1133.
- [44] Hatzopoulos P, Fong F, Sung Z R. Abscisic acid regulation of DC8, a carrot embryogenic gene[J]. Plant Physiol, 1990, 94: 690 ~ 695.
- [45] 朱玉贤, 李毅. 现代分子生物学: 脱落酸参与的基因的表达[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997, 248 ~ 251.
- [46] Shen Q X, Zhang P N, Ho T H D. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley [J]. Plant Cell, 1996, 8: 1107 ~ 1119.
- [47] Takahashi Y, Niwa Y, Machida Y. Location of the cis-acting auxin-responsive region in the promoter of the par gene from tobacco mesophyll protoplasts[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 8013 ~ 8016.
- [48] Vandermeulen R M, Visser K, Wang M. Effects of modulation of calcium levels and calcium fluxes on ABA-induced gene expression in barley aleurone[J]. Plant Science, 1996, 117: 75 ~ 82.