

植物组织和细胞培养 参 考 资 料

第 四 集

西北植物研究所
情报资料室
细胞室细胞杂交组

1983. 8

目 录

1. 豌豆茎端愈伤组织的器官发生 ... O. L. Gamborg 等 1—6
2. 豌豆茎停止生长期间过氧化酶的变化 ... M. G. Gardiner 等 7—11
3. 发芽绿豆子叶中过氧化物酶活性的激素调节 ... J. P. S. Dendsay 等 8—18
4. 在植物组织中激素引起的过氧化物酶的抑制 ... R. Ockerse 等 19—21
5. 豌豆的过氧化物酶同工酶 ... B. Z. Siegel 等 22—31
6. 来自豆科植物九叶槐蓝的组织培养物的再生植株 ... S. Bharal 等 32—36
7. 由不同遗传品系的豌豆愈伤组织再生完整植株 (简报) ... R. L. Malmberg 37—40
8. 豆科植物的组织培养和红三叶草愈伤组织的再生植株 ... G. C. Phillips 等 41—43
9. 胡萝卜和绿藻细胞培养物的原生质体融合 ... L. C. Fowke 等 44—49
10. 单倍体油菜茎外植体的再生植株 ... G. R. Stringam 50—53
11. 单倍体油菜叶片愈伤组织的再生植株 ... G. R. Stringam 54—57
12. 从单倍体油菜的长期的愈伤组织培养物中得到再生植株 ... M. D. Sacristan 58—62

13. 氨基酸和钱对于悬浮培养细胞生长的影响

O. L. Gamborg 63—70

14. 以铁盐为单-氮源培养植物细胞 O. L. Gamborg 等
71—77

15. 在黑种草的离体雌蕊中胚珠形成的营养条件

C. M. Peterson 78—82

16. 离体培养下单倍体植物细胞的优先生长 N. Gupta 等
83—84

17. *Panicum mixiacum* L. 和 *P. miliara*

Lamk 组织培养物中的体细胞胚胎发生和植株再生

T. S. Rangan 等 85—88

豌豆茎端愈伤组织器官发生

O. L. Gamborg F. Constabel & J. P. Shyluk

摘 要

对于来自豌豆 (*Pisum Sativum* L. cv. Century) 茎端细胞的愈伤组织中形成的苗进行了观察。将株龄4天的苗端浸软, 并将产生的细胞的团块接种在琼脂培养基上, 在4-6周内含有 $0.2-0.5 \mu\text{M}$ 的6-BA和 $1 \mu\text{M}$ NAA的培养基中形成了愈伤组织并产生了芽。但是大部分愈伤组织产生一个苗或较多的苗, 根的形成无规律, 通过这些程序所得到的植株生长到成熟期开花结果。

序 言

在离体条件下所培养的细胞通过胚胎发生 (Halperin 1970, Gamborg 等 1971) 或通过化学诱导器官发生 (Hildebrandt 1970) 而得到了再生植株 (Hildebrandt 1970, Winton 1971, Fridborg 1971, Murasugi 等 1972)。但是, 在许多经济重要的品种中植株成长的频率低, 或不可能有器官发生 (Shimada 等 1969)。

虽然有几种的细胞进行离体培养, 但是由豆科植物的细胞得到芽和植株尚无适当的方法。Torrey (1967) 年报告了豌豆愈伤组织中根的形成。Hildebrandt 等 (1963) 观察到了来自豌豆茎端愈伤组织的芽的生长。

我们研究了豌豆苗端愈伤组织的形态发生潜能，而且观察到芽的形成 (Gamborg 等 1972)。本文我们报告关于生长激素对形成芽的作用，并报告在这种生长激素存在的情况下有关氮源、总氮量及蔗糖对芽形成的作用。此外，进行通过显微检查分化细胞来阐明芽发育顺序的尝试。

材 料 和 方 法

植物材料

田间豌豆 (*Pisum Sativum*, L. cv *Century*) 用 2% 的 Javex (1% 次氯酸钙) 表面灭菌 20 分钟。无菌水冲洗并在塑料盘中的双层无菌滤纸上在暗处 28°C 下发芽。从 3—4 天的苗上切离的苗端 (2—3 mm) 在无菌条件下用解剖刀加一滴无激素的培养基。细胞团块 (总体积 2—4 mm³) 接种在 Erlenmeyer 烧瓶 (见图 1) 中的琼脂培养基上，用 Parafilm 密封和培养。

培养基

培养基以 0.8% 琼脂固化，或在含有 B₅ C Gamborg 等 (1968) 或 M₅ (Murashige 和 Skoog 1962) 培养基的无机盐和微量元素及与 B₅ 培养基相同的维生素。NAA 进行了重结晶，而 BA 没有进一步纯化。

培养条件

采用了两种培养条件。一是培养皿，温度保持在 26°±1°C 之间，18 小时光照和 6 小时黑暗。光源为冷白荧光灯，光照强度 2000 勒克司。另一安排是植物培养箱 (控制环境, Winnipeg)，型号 EF7，备有光照和温度设施。光周期由 18 小时的荧光灯照 (4000 勒克司) 和 6 小时黑暗所组成，光照时的温度每小时逐渐降低约 4°C，到 15°C 为 6 小时的暗周期。相对湿度保持 70%。

实验重复四次或五次。

组织学

植物材料在4%的 *Gluteraldehyde* 缓冲液中 4°C 下固定36小时, 用 *methoxyethanol* 分级脱水, 石蜡包埋, 切片厚 $10\mu\text{m}$ 用 *Delafield* 氏苏木精 (Feder 和 O'Brien 1968) 染色。

结果和讨论

生长激素在一定的培养基中对豌豆细胞的器官发生和植株生长的影响列于表 I 中, 在4-6周继代培养基中产生了芽。B5 培养基比 MS 培养基产生的芽多而茁壮。B5 培养基的总氮是 ($\text{NH}_4 + \text{NO}_3$) 是 27 mM , MS 的总氮是 60 mM , 蔗糖是在两种培养基中分别为 2% 和 3%。

在愈伤组织上形成了芽而且经常成簇出现 (图1)。在一些芽或产生芽的愈伤组织上产生了根, 但与生长激素浓度无关。

表 I BA 浓度、BA 和 NAA 在豌豆细胞中对芽形成的影响。第一个实验中, B5 和 MS 培养基含有 10^{-6} M NAA, 第二个实验中, B5 培养基补加 NH_4NO_3 1.3 克/升, 蔗糖 3% (表2, 实验 IV)。环境条件; A = 植物培养箱, 18 小时光照 (4000 勒克斯) / 6 小时黑暗, 25°C / 15°C ; B = 培养室, 18 小时光照 (2000 勒克斯) / 6 小时黑暗, 26°C 。数据是按照四瓶培养材料的发芽数表示的。生长周期 8 周。第二次实验的环境条件为 A。

环境条件	培养基	BA, μM				
		0	0.2	0.4	1.0	2.0
A	B5	4 ³	4	4	3	4
	MS	3	2	3	3	2
B	B5	4	4'	4	2	4
	MS	2	无愈伤组织或芽			

NAA μM	BA, μM					
	0	0.2	0.4	1.0	2.0	5.0
0	0	3	4	3 ²	4	4
1.0	2	3	3'	2	3	3
5.0	1'	0	0	1	4'	3

1. 1个苗具根

2. 2个苗生根

3. 3个苗生根

表1 结果表明, NAA为 0.1 和 5 μM 时 BA 对苗形成的影响。在不列生长条件下, 缺少 BA 能够形成苗, 但混合物实际上提高了愈伤组织上形成苗的频率和数量。增加 NAA 没有必要, 而且抑制芽的形成。过量的生长素抑制芽的发生, 细胞不能控制 NAA 的总量, 因为在植物细胞中, 这种混合物不会很快地发生分解代谢。

表2 数据说明碳氮比的变化对反应发生的影响。B5 培养基作对照在两种蔗糖的水平上补加不同量的 NH_4NO_3 。NAA 和 BA 在所有实验中是相同的。结果表明, 如果蔗糖浓度增加到

3%，较高氮素有良好效果。在高氮浓度下形成苗的频率，尤其是苗的生长状况比较好。蔗糖为2%时增加氮素没有明显效果。

在此种条件下根的生长频率较低而且生根是无规律的，但在全部实验中好象发生在几个苗上。

表2 无机氮的浓度在两种水平的蔗糖上对豌豆细胞形成苗的影响。在两种环境中（见表1）生长周期是60天，数据按四瓶培养瓶含苗数表示，培养基： B_3 含 $25 \text{ mM } KNO_3$ 和 $1 \text{ mM } (NH_4)_2SO_4$ ，激素浓度： 10^{-6} M NAA 和 $5 \times 10^{-7} \text{ M BA}$ ，环境条件同表1

实 验	补加 混合物	总 N 量 mM		环境条件			
		NO_3^-	NH_4^+	A		B	
				2%蔗糖	3%蔗糖	2%蔗糖	3%蔗糖
I	0	25	2	4	3	3	2
II	NH_4NO_3	30	7	4	4	1	3
III	NH_4NO_3	35	12	2	4	1	4
IV	NH_4NO_3	40	17	1	4	0	4
V	$NH_4NO_3 + NH_4Cl$	35	23	0	2	0	1

Hildebrandt 等 (1963) 观察了培养在具有椰乳培养基上的豌豆茎愈伤组织上面的生长。在我们的培养基中就芽的生长而言，椰乳显然是不需要的。

苗原基产生（图2A）了与芽和互生叶腋原基发育来的苗端一样的正常结构，在原形成层束内发现了螺旋导管。在许多芽的维管束形成层中产生的纹孔胞排列成节或束（图2B），这种初生组织上次生生长的证据好象是激素引起的。细胞分裂素和生长素一起被认为促进分生组织活化引起芽胞形成（Torrey和

Fosket (1970)。

根发生愈伤组织中，然后伸贯穿过细胞群（图2 C, D）。豌豆细胞分化成根由 Torrey (1967) 用根尖作为外植体的研究中观察到了。

从3—4星期的芽中得到的连续切片看不出初生软导组织和次生软导组织（根和苗）的维管束细胞之间的联系。但是，在晚期，芽中形成的管状细胞和愈伤组织细胞中的纹孔管胞是连续的。在一些实验中曾得到的完全植株，根苗齐全的植株已得到发根（图1）。一些植株转入蛭石和砂盆中，并在温室中生长到成熟。移植以后，这些植株产生了粉红色瘤状物，这种瘤状物有一种活动能力的固氮系统（LaRue 和 Kurg 1973）。

本资料说明，从豌豆细胞中容易得到苗，通过诱导产生的植株虽然好像同一来源，但染色体组型尚未确定。

与芽有联系的愈伤组织可以进行继代培养，同时可产生另外的芽，这种程序虽然是可行的，但就根的发生状况而言需要改善无性繁殖的方法。

参考文献 10 篇、图版2（略）。

译自 *physiol. plant.*

30:125—128,

1974.

豌豆 (*Pisum sativum*) 茎停止

生长期间过氧化物酶的变化

Michael G. Gardiner & Robert Deland

摘 要

在完好的豌豆上胚轴中细胞停止生长伴随可溶性过氧化物酶和细胞壁过氧化物酶的增加。这些过氧化物酶通过凝胶电泳分离成四种细胞壁同工酶和十种细胞质同工酶。过氧化物酶活性的增加是由于细胞壁和细胞质的某种同工酶和十种细胞质同工酶。过氧化物酶活性的增加是由于细胞壁和细胞质的某种同工酶的增加，而不是出现新的同工酶的结果。这种过氧化物酶的增加和生长速度降低之间的反相关表明，过氧化物酶在细胞停止生长中起有作用。

序 言

过氧化物酶虽然广泛存在于植物体中 (E. C. 1, 1, 1.7) 但是它们的作用仍不清楚。在细胞生长停止方面，由细胞质过氧化物酶水平和生长速度之间的负相关 (已有报导 (1-3)) 以及生长抑制剂例如乙烯 (4, 6) 所引起的过氧化物酶的增加支持了这种可能存在的作用。过氧化物酶影响 IAA 的氧化⁷，影响木质素⁸的聚合及乙烯的生物合成⁹。每种作用能够抑制细胞的增长但是没有可靠的证据表明过氧化物酶的增加是在细胞停止生长之前还是之后。

在细胞壁和细胞质中都有过氧化物酶,^{4,10} 每毫克过氧化物酶同工酶还要多^{1,4,10}。过氧化物酶总量的增加可能是由于细胞壁和叶分细胞质过氧化物酶增加的结果。每一叶分过氧化物酶的增加可能是由于所有的同工酶普遍增加, 某种已有的同工酶的增加, 或新的同工酶出现的结果。说明伴随细胞停止生长的过氧化物酶变化的平质的资料是没有的。关于 *Pisum Sativum* 的平报告是在以下实验中得到的

结 果

茎段生长用记录 (仪) 来控制最后的长度及允许生长 0—27 小时做为完全将苗部分的鲜重。图 1 表明生长长度在 0—18 小时之间几乎呈直线, 但是达到 24 小时之间突然停止 (指直线)。个别生长如同标有记号的茎段一样可延续到全周期增加的鲜重, 但是它的最高生长速度是在 0—24 小时之间。Cleland 和 Karlsson¹¹ 以及 Chrispeels¹² 等亦得结果支持了这些论据。

细胞质过氧化物酶特有活性的增加持续到整个 72 小时 (图 2a) 以上。但是, 当鲜重的主要成分显示出来时, 细胞质过氧化物酶在第 6 小时内降低了大约 30%, 其余在 72 小时内保持不变 (图 3)。Birecka 和 Galston³ 得到了类似的结果。相反, 细胞壁过氧化物酶的特有活性约延缓 6 小时之后增加了 (图 2b)。当细胞壁过氧化物酶在细胞壁干重 (图 2c) 或叶分鲜重 (图 3) 的基础上表现出现时这种延缓更明显。

可溶性酶谱和细胞壁酶谱的测定表明均有 4 条共同的同工酶 (A1, A2, C1 和 C2)。可溶性叶分也含有一些阴离子同工酶 (A3—A8)。如果由于一种或几种同工酶活性的增加, 那末每种酶谱的相应高峰能够测定出来。0, 24 和 48

小时酶谱的比较表明，细胞壁中酶的增加主要是由于两种同工酶A1和A2的增加。但是在细胞质中这两种同样的同工酶没有增加。在这一部分中酶的增加主要由于同工酶A3、A4和A5和A6，同工酶A7最初是主要酶带，随着时间而减少。一种新的明显的同工酶A8也出现了，但活性较小。

讨 论

植株中过氧化物酶的水平 and 生长速度有反相关的趋势。例如，豌豆茎中较多的成熟组织生长速度很低，具有高含量的可溶性过氧化物酶。^{1, 2, 13}矮小豌豆和谷物，生长速度都很低每高品种比较起来有高水平的可溶性过氧化物酶。^{3, 4, 15}用GA₃处理这些矮小豌豆，促进了生长速度，而降低了过氧化物酶的水平。生长素抑制豌豆茎和菸草茎段中过氧化物的特异同工酶的合成，但促进了生长。^{16, 17}用己稀处理豌豆茎，导致过氧化物酶含量的增高，而降低了生长速度^{4, 18}。

尽管这些资料支持了可能存在于过氧化物酶与生长速度之间的因果关系，但是他们不能认为是结论性的两个理由。极少例外，^{4, 18}首先只有可溶性过氧化物酶的鉴定表明，细胞同样含有联合胞壁和束薄胞壁的过氧化物酶。^{4, 18-21}另外可溶性过氧化物酶的变化，仅仅是由于过氧化物酶集中的变化，而不是酶的实际含量的变化。其次，关于生长速度和过氧化物酶变化时间的报道是没有的，因而这种变化时间是在过氧化物酶变化之前，还是与生长速度的变化同时发生是不能确定的。本研究过氧化物酶同工酶的完整酶谱注意了时间和细胞停止生长的相互关系，这些变化同时发生的事实表明，过氧化物酶的变化包含在细胞停止生长之中，无论如何，至少一种别的因素表现出与生长速度的类似相

质性。这就是缚束于细胞壁的含有蛋白质附加部分的羧基脯氨酸。^{11, 22} 虽然附加部分的作用尚未确定, 但它得到了这些蛋白质可使细胞壁由于多矿交联度变粘的观点的支持这种交联现在已得证明²⁴。Sadava 和 Chrispee²² 证明乙烯所产生的生长抑制物对蛋白质附加部分合成的连接是明显的。因而细胞停止生长可能不是单一因子的影响, 可能是一系列因子包括过氧化酶引起的木质化、生长素的破坏及蛋白质附加物引起的细胞壁的硬化的影响。

实 验

植物材料。豌豆变种 *Alaska* 的幼苗除了给予短时绿光和凉水或作下记录外, 在暗处 26° 下生长 7 天将第三节长度为 25—35 mm 的植株选出来。

生长测量。在第三节间相距 10 mm 用印度墨水记上两个符号。上面(较高)的标记正好位于弯曲处的下面。植株放回到暗处 0—12 小时。时时测量标记范围之间标记大小(尺寸)和至芽之间的距离。

酶的制备。将标有记号的部分切下并在含蔗糖 10% 的 ml 10 mM Tris 缓冲液 (PH 8.0) 均化皿中均匀。在 1500g 下离心 5 分钟收集细胞壁。用 1 ml 同样的溶液再磨碎并离心混合两种上层液, 在 4800g 下离心 30 分钟去掉膜状小皿液用作可溶性过氧化物酶的鉴定, 因为膜状小皿液的过氧化物酶含量很低, 故弃去。细胞壁在含有 0.1% 脱氧 α 的 50 mM Tris (PH 8.0) 溶液中重复磨碎 (4 次) 进一步净化, 离心收集, 最后以水洗滌。然后用 1 ml 200 mM Carls 萃取 1 小时,

通过离心将残渣分开，收集于滤纸上预先称重。上清液以1000
体积的10 mM Tris (pH 8.0) 为背景进行分析。初步的实验
表明， CaCl_2 萃取可以分离细胞壁过氧化物酶的85—90%。
透析过的氯化钙萃取物称为细胞壁部分。

测定。在3 ml 过氧化物酶混合物中含有0.3 mM的邻联
(二) 茴香胺 (O-dianisidine), 3.3 mM H_2O_2 和50 mM
的醋酸钾 (pH 5.4)。补加20 μl 酶萃取物反应突然出现，
在460 nm处25°C下测定氧化邻联(二) 茴香胺的出现，
从开始斜度可以推算出反应速度：酶活单位是按酶每吸收1个单
位/分的变化而确定的。蛋白质用Lowry等²⁵的方法推算。

电泳。电泳在5×125 mm 聚丙烯酰胺凝胶中进行。凝
胶含有7.5%的聚丙烯酰胺和5%交联剂以及370 mM Tris
缓冲液，pH 8.3。用1%过硫酸铵和TME D完成聚合作用。
在10%蔗糖和0.001%溴酚兰中制成试样，直接放在凝胶表
层上面。使用50 mM 硼酸的电极缓冲液，pH 8.3，温度约
14°C下，每块3 mA 恒定电流下进行分离(跑电泳)。阴离子
同工酶的分离从开始直到溴酚兰标记染料移至大约90 mm处为
止，但是阳离子(正离子)同工酶需要6小时电泳，因为他们
的迁移率在这种pH条件下较低。电泳后取出凝胶直接放在过氧
化物酶测定混合物中染色30分钟，接着用分光密度计记录着色酶带。

译自 *phyto chemistry* 1974 Vol. 13
p: 1095—
1098

发芽绿豆子叶中过氧化物 酶活性的激素调节

J. P. S. Dendsey 和 R. C. Sachar

摘 要

在发芽后 72 小时离体的绿豆子叶中观察到过氧化物酶活性增高 (22 — 35 倍) 的情况。酶活性的提高与六种新的多种类型过氧化物酶的出现有关。超最适浓度的生长素 ($1 \text{ A}A, 10^{-4} \text{ M}$, 10^{-3} M) 造成高于对照 (2 — 4 倍) 的另外的过氧化物的酶活性的增加。用乙烯利代替生长素不能提高过氧化物酶的活性, 有人以为生长素的反应不是乙烯调解的现象。赤霉素 (GA_3) 和激动素 ($Kinetin$) 也不能改变过氧化物酶活性及其离体子叶中过氧化物酶的多种类型。但是, 用脱落酸 ($ABA, 100 \mu\text{g}/\text{me}$) 处理子叶强烈抑制 (87%) 过氧化物酶的活性, 而这种反应实际上被生长素所抵抗。放线菌素 D ($Actinomycin D$) 和放线菌酮 ($Cycloheximide$) 在对照和生长素处理过的子叶中都急剧降低过氧化物酶的活性, 这就表明了发芽的子叶中提高过氧化物酶的活性 需要翻译和转录。

引 言

在一些植物组织中, 乙烯影响着过氧化物酶活性的调节机制。乙烯在棉花叶片 (1), 芒果切片 (2), 山芋根部 (3), 马铃薯葡萄茎端 (4), 豌豆上胚轴 (5) 和完全的菸草植株中 (6) 提高了过

氧化物酶的活性。但是，在烟草的离体叶片中⁽⁷⁾，乙烯具有抑制过氧化物酶活性的作用，而在胡萝卜组织中产生的损害过氧化物酶的活性不是乙烯的影响⁽⁸⁾。

也有生长素提高过氧化物酶活性的报道。由于高浓度的生长素促进了乙烯的释放，所以有人认为对过氧化物酶活性起刺激作用的生长素是乙烯调解现象^(9, 10)。生长素处理离体的绿豆籽苗⁽¹¹⁾和菟豆苗切段⁽¹²⁾导致刺激乙烯的产生。Sakai 和 Imaseki⁽¹³⁾报告了用 IAA 处理绿豆籽苗提高 14C-蛋氨酸结合乙烯的作用。在棉花植株中，乙烯增加的早出现生长素对过氧化物酶和 IAA-氧化酶活性的刺激有关⁽¹⁰⁾。菟豆苗的生长受生长素的两个阶段的控制。原始细胞的扩大是一种真正的影响（第一阶段）而且与过氧化物酶活性的降低有关。第二阶段由生长素诱导的乙烯产物调节，而且包括细胞壁增厚以及过氧化物酶活性的增强。生长素的这种第二个反应是由外施乙烯的应用引起的。因此，菟豆苗中生长素和乙烯的作用明显地可以区别开来^(14, 15)。在小麦胚芽鞘⁽¹⁶⁾和菟豆茎节中^(17, 18)，应用外施生长素抑制了过氧化物酶的活性。在烟草髓部组织的培养物中补充生长素同样抑制了两种阳极过氧化物酶同工酶⁽¹⁹⁾。在少数情况下用生长素调节过氧化物酶活性不受乙烯的影响。在烟草髓下组织中，通过生长素抑制多种类型的过氧化物酶不是由于应用乙烯而发生的⁽⁶⁾。反之，在山芋根下中，乙烯促进了过氧化物酶的活性，但生长素则无此种反应⁽⁸⁾。

在本文中，我们报告了离体绿豆子叶中过氧化物酶活性的增强是由于生长素而增强的，同时由于应用了脱落酸 (ABA) 而抑制了过氧化物酶的活性。

结果和讨论

发芽子叶中的过氧化物酶活性

定期的研究结果表明，在离体的发芽子叶中过氧化物酶的活性比贴附于秧苗的子叶相对地要高。多型形的过氧化物酶的丙酮酰胺凝胶电泳图式在离体子叶和贴附于秧苗的子叶中也不同（图1）；离体子叶显现多而活性较强的酶带。因此离体子叶比未离体子叶的酶活性高可以认为是多种类型的过氧化物酶质型和酶的差异。发芽后72小时离体子叶中的过氧化物酶活性增加2—3.5倍，这就伴随着显现六种另外的多种类型的过氧化物酶。

用生长素和脱落酸调节 过氧化物酶活性

应用 GA_3 ($10^{-7} M$, $10^{-5} M$) 或激动素 (Kinetin) ($10^{-7} M$, $10^{-5} M$) 于发芽的离体子叶上不能改变过氧化物酶的活性。离体发芽子叶在 IAA 存在的情况下证明了过氧化物酶活性的有效增加。发芽72和96小时增高 IAA 浓度对过氧化物酶活性具有逐渐的促进作用。合成生长素 ($\alpha, 4 - D$) 证明了在过氧化物酶活性增高的情况下含有较多的 IAA。发芽达48小时，酶活性的促进和植物生长物质的刺激作用都有相同的范围，而在发芽72小时时， $\alpha, 4 - D$ 可使酶活性增加一倍，而 IAA 可促进酶活性增加3倍。一般说来，IAA 能够增高酶活性约4~5倍，若是 $\alpha, 4 - D$ 酶的活性可提高4~8倍。