

烟草叶片脱分化阶段性及培养物呼吸代谢类型的研究

黄旭明 肖敬平

(华南农业大学生物技术学院, 广州, 510642)

摘要 研究发现烟草叶片外植体脱分化是分阶段完成的: 在诱导期 (2d内) 产生的愈伤细胞须通过发育期进入成熟期 (8d后) 才能脱去叶片外植体固有的构型方式的影响. 否则, 未通过发育期的培养体, 在芽分化培养基中只能形成一种倒生的畸形叶状体. 在关键的发育期出现了由水杨基氧肟酸 (SHAM) 敏感途径及 Na_3PO_4 敏感途径加强而构成的类似呼吸跃变现象, 而呼吸商却出现低于 1.0 的低谷, 同时三羧酸 (TCA) 循环的偏呼吸商 (Partial Respiratory Quotient) 也小于 1.0. 在芽分化过程中也发现类似的代谢类型变化. 讨论了这种代谢类型变化的生理意义.

关键词 烟草; 脱分化; 再分化; 呼吸代谢

中图分类号 Q945.1

呼吸代谢不仅向生活细胞提供能量和生命物质合成所需的代谢物, 而且具有调节其它生理过程的功能 (汤佩松, 1979; 汤佩松等, 1991). 关于组织和细胞培养过程中呼吸代谢途径的变化已有报道 (梁厚果等, 1985; 毕玉蓉等, 1987; Fowler, 1971; Thorpe et al., 1973). 但多数的研究都是针对某一两个途径分别进行的. 汤佩松 (1979) 指出细胞胞液及线粒体各主要代谢途径在时间上的运行和作用不是孤立的, 而是由彼此运行强度的消长构成了不同的呼吸代谢类型. 本文旨在探索组织培养过程中脱分化和再分化呼吸代谢多条途径及类型变化, 以揭示呼吸代谢对植物试管培养物全能性实现和器官发生的某些调控规律.

1 材料与方法

1.1 材料

烟草 (*Nicotiana tabacum*), 品种为 K₃₂₆.

1.2 试管培养

1.2.1 脱分化 取完全展开的叶片, 表面消毒后切成 0.8cm^2 小块, 接种在脱分化培养基 ($\text{MS} + 0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}\text{BA} + 2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}\text{NAA}$) 中, 25°C 下遮光培养, 观察愈伤组织形成状况.

1.2.2 脱分化进程对芽分化行为的影响 取不同培养天数 (0, 3, 5, 8 及 15d) 的脱分化培养体转接到芽分化培养基 ($\text{MS} + 2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}\text{BA}$) 上, $34\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光照 $10\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$, 25°C 下培养, 观察分化情况.

1.2.3 芽分化 取脱分化培养 20d 的愈伤组织转接至芽分化培养基中, 培养条件同 1.2.2

1.3 呼吸代谢测定

用瓦氏呼吸计(上海教学仪器厂)在 32℃ 下同时测定耗 O₂ 率 (Q_{O₂})与 CO₂ 释放率 (Q_{CO₂}),并计算出呼吸商 (RQ)(欧阳光察,1985). 在反应瓶中添加 1mmol·L⁻¹ Na₃PO₄ 或 1mmol·L⁻¹水杨基氧肟酸 (SHAM), CO₂ 释放率或耗 O₂ 率减少的部分即分别为 Na₃PO₄ 敏感或 SHAM 敏感途径对 CO₂ 释放率或 O₂ 耗率的贡献,本文记为 ρQ_{CO_2} 或 ρQ_{O_2} . 三羧酸 (TCA)循环对 Q_{O₂}及 Q_{CO₂}的贡献在本文中记为 $\rho Q_{O_2} (TCA)$ 及 $\rho Q_{CO_2} (TCA)$,是用 50mmol·L⁻¹丙二酸对其抑制量表示. TCA循环的偏呼吸商 (Partial Respiratory Quotient PRQ)是指 $\rho Q_{CO_2} (TCA)$ 与 $\rho Q_{O_2} (TCA)$ 的比值. Q_{O₂},Q_{CO₂}, ρQ_{O_2} 及 ρQ_{CO_2} 均以鲜重计算.

2 结果与讨论

2.1 脱分化过程

2.1.1 脱分化培养的生长与分化的观察接种后,外植体部分细胞急剧膨胀,使整个外植体变得弯曲不平(图 1示). 2d内,外植体边缘的一些细胞及部分表皮细胞启动分裂,而使局部加厚并退绿转白. 5d便可以看到突起的愈伤细胞团逐渐形成愈伤组织,鲜重迅速上升,进入对数生长期(图 2). 值得注意的是,取 5d前的培养体转接到芽分化培养基上,发现它们的愈伤细胞尚不能分化出正常的芽,而是形成畸形的,并经常是倒生的叶状体(图 1示); 8d以后的培养体基本形成正常芽. 正常芽比畸形叶状体形成所需的时间长.

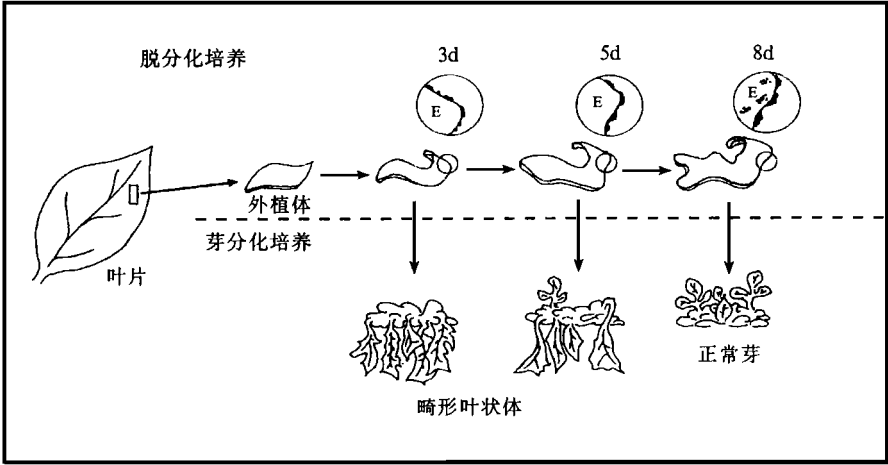


图 1 不同发育阶段的烟草愈伤组织分化能力示意图
E: 放大的外植体局部及生长的愈伤细胞

根据以上结果,脱分化可分为 3个阶段完成. 在 2d内是愈伤组织诱导期. 此期间外植体启动细胞分裂产生愈伤细胞. 余迪求等 (1993) 对此期的外植体作过详细的超微结构观察,并认为细胞分裂的开始就意味着脱分化过程的完成. 但是从愈伤细胞是否已具备全能性表达能力上看,我们的结果表明这个时期脱分化并未完成,而是进入一个愈伤组织发育期. 这期间虽已形成大量的愈伤细胞,但将之转接到芽分化培养基上时,只能形成表现叶片构型的畸形叶状体. 这种叶状体包含新形成的叶肉组织及输导组织,表明此期的愈伤细胞

已具有形成新组织的“细胞分化 (Cytodifferentiation)”能力. 但在已分化细胞之间的特定空间关系上, 仍未脱去叶片外植体固有的“构型 (Pattern Formation)”的影响, 进行正常的芽分化. 因此, 尚不能认为这种愈伤组织已经完成脱分化全部过程. 此期的愈伤组织在生理上仍处于未成熟的发育过程中. 脱分化培养 8d 后, 进入成熟期. 愈伤细胞基本上脱去叶片的构型影响, 具备形成芽构型的能力, 生理上完成了脱分化.

关于细胞全能性, Rashid (1988) 指出, 其完整的概念不仅指细胞的再生能力, 还涉及构型能力. 根据 Wolpert (1970) 及 Wilson (1984) 等人提出的观点, 所谓构型行为乃是待分化为某种器官的分生细胞根据其位置信息 (Positional Information) 作相应的基因表达, 导致特定器官分化. 我们的结果支持这种观点. 同时说明脱分化可能就是愈伤细胞形成, 并丧失其在外植体原有的位置信息的过程.

2.1.2 呼吸代谢类型的变化 在愈伤组织诱导期内, Q_{CO_2} 及 Q_{O_2} 均迅速上升至较高水平; 进入发育期, 再次升高, 到接种后第 6d

形成高峰. 呼吸商则呈下降之势, 在第 6d 降至 0.8 低值 (图 3-A), 提示饱和脂肪酸和 / 或蛋白质参与呼吸代谢. 进入成熟期后, Q_{O_2} 及 Q_{CO_2} 均下降, 呼吸商也恢复到 1.0 左右.

TCA 循环的耗 O_2 贡献 (∂Q_{O_2} (TCA)) 及 CO_2 释放率的贡献 (∂Q_{CO_2} (TCA)) 在发育期均呈下降之势 (图 3-B). ∂Q_{CO_2} (TCA) 在总 Q_{CO_2} 剧增时反而下降, 说明它所需要的中间代谢物受到其它氧化脱羧过程的竞争, 而最可能的是磷酸戊糖途径. 因为 ∂Q_{CO_2} (TCA) 下降较 ∂Q_{O_2} (TCA) 更大, 偏呼吸商 (PRQ) 出现了低至 0.3 的低谷 (见图 3-B). 由于 PRQ 只反映 TCA 循环本身的 CO_2 释放及耗 O_2 比例, 而完整的 TCA 循环的 PRQ 应不小于 1.0, 因此推测, 这是 TCA 循环释放的 CO_2 被重新固定和 / 或其成员回补的结果.

在测定 Na_3PO_4 敏感途径的 CO_2 释放率贡献时, 观察到其值在愈伤组织发育期急剧上升, 紧接着又降到原初水平, 形成一个与总 Q_{CO_2} 同步的高峰 (图 4-A). 而为 Na_3PO_4 抑制的主要途径是磷酸戊糖途径. 由于 TCA 循环的 Q_{CO_2} 是呈下降之势, 说明引起总 Q_{CO_2}

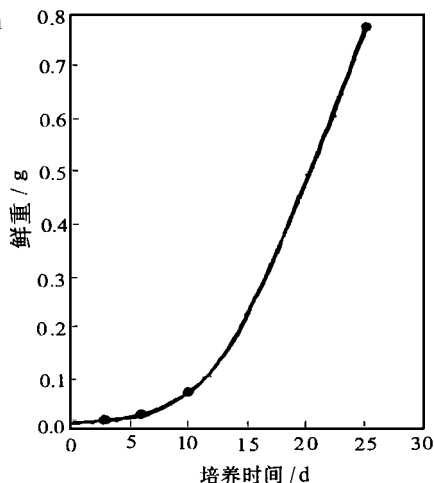


图 2 脱分过程中培养体鲜重变化

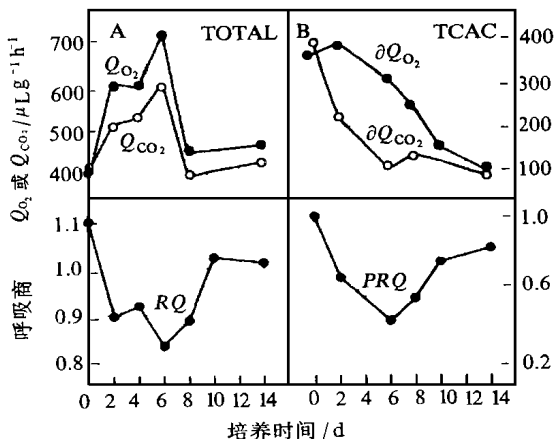


图 3 A 不同时期烟草愈伤组织的 Q_{O_2} 、 Q_{CO_2} 和 RQ 变化

B ∂Q_{CO_2} (TCA), ∂Q_{O_2} (TCA) 及 TCA 循环偏呼吸商 PRQ 的变化

高峰的主要是磷酸戊糖途径. 在末端氧化方面, SHAM 敏感途径, 主要是交替途径的 ∂Q_{O_2} 也出现一个与总 Q_{O_2} 同步高峰 (图 4-B). 由于 SHAM 不敏感途径的 ∂Q_{O_2} 始终保持相对稳定, 可以推断交替途径对总 Q_{O_2} 的高峰起了引发作用.

由以上讨论可见, 愈伤组织发育期的呼吸高峰决不是单纯的 Q_{O_2} 和 Q_{CO_2} 的量变, 而是呼吸代谢类型发生了短暂而带有“冲击”性的质变.

2.2 再分化过程

Thorpe 和 Laishley (1973) 已报导过烟草试管培养体的器官分化阶段出现呼吸高峰. 梁厚果等 (1985) 和毕玉蓉等 (1987) 分别报导了烟草愈伤组织芽分化过程, 抗氰途径和磷酸戊糖途径运行加强. 潘建国 (1990) 也在烟草愈伤组织的预分期间同时观察到上述两种现象. 我们的结果证实了前人的结果, 并进一步发现芽分化过程也伴有一个呼吸商小于 1.0 低谷 (图 5). 这与脱分化愈伤组织发育期的呼吸变化基本一致. 脱分化与再分化两个相反的形态变化过程, 为何出现相似的呼吸代谢类型是值得进一步探索的.

2.3 关于试管培养物生理相变及呼吸代谢类型质变的讨论

根据以上结果, 我们认为外植体细胞实现其全能性, 首先是在脱分化培养基上恢复细胞分裂和细胞分化能力; 然后摆脱母体外植体固有的构型方式的影响, 获得新器官分化的新构型能力; 最后, 在再分化培养基上建立新器官分化的新构型, 形成试管植株. 在这 3 个步骤之间至少存在 2 个性质上相反的生理相变过程: 原有构型的脱去与新构型的建立. 令人感

兴趣的是, 在两个相变过程中均出现了呼吸高峰及呼吸代谢类型的变化. 此外, 黄卫萍 (1991) 在康乃馨试管快繁过程中, 试管小苗成熟前也出现了一个性质基本相同的呼吸高峰. 这 3 种呼吸高峰均是以 Na_3PO_4 敏感的磷酸戊糖途径和 SHAM 敏感的交替途径加强而构成的, 且均伴有呼吸商及 TCA 循环的偏呼吸商小于 1.0 的现象. 这些途径变化

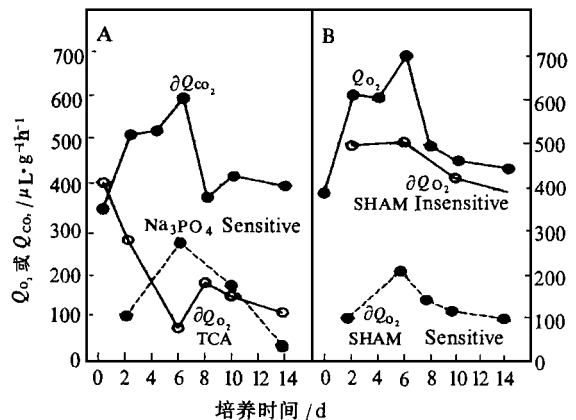


图 4 A 脱分化过程中 Q_{CO_2} 及 Na_3PO_4 敏感途径与 TCA 循环对 Q_{CO_2} 的贡献 (∂Q_{CO_2})
B Q_{O_2} 与 SHAM 敏感及 SHAM 不敏感途径对 Q_{O_2} 贡献 (∂Q_{O_2})

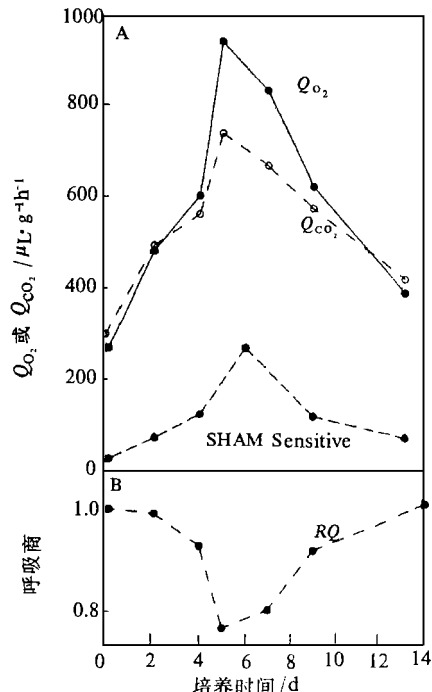


图 5 烟草愈伤组织芽分化过程中 Q_{O_2} , Q_{CO_2} , RQ 及 SHAM 敏感途径对 Q_{O_2} 贡献 (∂Q_{CO_2}) 的变化

构成了一种短暂的冲击性特殊代谢类型。我们认为,它可能是细胞从一种发育生理状态进入另一种状态所必需的。关于其细节和作用机制尚需进一步探索。目前仅能作出某种推测:交替途径作为产热的途径,其加强可满足某种热力学要求,即以较大的热耗散($\Delta W_{TBX} \ll H < 0$)推动序性增加(熵减, $\Delta S < 0$)的过程(汤佩松等, 1991)。由于交替途径较细胞色素途径产生的质子动势($\Delta \mu_H$)低,其加强可能导致细胞液 pH 升高,从而提高一些合成酶系的活性。磷酸戊糖途径的加强则为合成特殊的生理相变物质提供 NADPH,核糖,碱基和酚类等化合物;由于中间代谢物经由该途径的输出加强,就降低了 TCA 循环的输入,因而出现支持该循环运转的 CO_2 暗固定和/或循环成员回补,导致其偏呼吸商下降。

以上结果支持了汤佩松关于呼吸代谢通过多条途径调节植物生理过程的观点。联系到众所周知的种子萌发和果实成熟时发生的类似的呼吸跃变现象,这个问题就更加值得重视了。

参 考 文 献

- 汤佩松. 1979. 高等植物呼吸代谢途径的调节控制和代谢生理功能的相互制约. 植物学报, 21 (2): 93~ 106
- 汤佩松, 肖敬平. 1991. 呼吸代谢对植物细胞生命过程的某些控制方式. 植物学报, 33 (10): 729~ 737
- 梁厚果, 刘良寰, 吴伯冀, 等. 1985. 柳叶烟草愈伤组织分化期间抗氰呼吸的改变. 植物学报, 27 (3): 271~ 276
- 毕玉蓉, 梁厚果. 1987. 烟草愈伤组织分化和芽原基形成期间呼吸代谢途径的改变. 实验生理学报, 20: 109~ 117
- 余迪求, 洪维廉, 陈睦传, 等. 1993. 甜菊叶肉细胞脱分化过程中超微结构的研究. 植物学报, 35 (7): 499~ 505
- 潘建国. 1990. 烟草愈伤组织分化过程中的乙烯峰及其对呼吸代谢的调节: [学位论文]. 广州: 华南农业大学生物技术学院
- 黄卫萍. 1991. 康乃馨微型繁殖过程中的乙烯振荡和呼吸代谢: [学位论文]. 广州: 华南农业大学生物技术学院
- Fowler M W. 1971. Studies on the growth in culture of plant cells the carbohydrate oxidation during the growth of *Acer Pseudeplatanus* L cells in suspension culture. J Exp Bot, 21: 715~ 724
- Rashid A. 1988. Cell physiology and genetics of higher plants Vol 1. Florida: CRC Press Inc, 69 ~ 118
- Thorpe T A, Laishley E J. 1973. Glucose oxidation during shoot initiation in tobacco callus cultures. J Exp Bot, 224: 1082~ 1089
- Wilson J, Wilson P M W. 1984. Control of tissue patterns in normal development and in regeneration. In: Barlow P W, Carr D J, eds. Positional Control in Plant Development. Cambridge: Cambridge University Press, 225~ 228
- Wolpert L. 1970. Positional information and pattern formation. In: Waddington C H, ed. Towards a Theoretical Biology: Vol 3, Draft. Edinburgh: Edinburgh University Press, 198~ 230

STUDIES ON THE PHASES OF TOBACCO LEAF DEDIFFERENTIATION AND RESPIRATORY METABOLISM PATTERNS OF IN VITRO CULTURERS

Huang Xuming Xiao Jingping

(College of Biotechnology, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

The processes of tobacco (*Nicotiana tabacum*) callus initiation, development and redifferentiation, and the associated changes of respiratory metabolism pattern were studied. Dedifferentiation was found to be completed by phases. The callus cells formed during the initiation phase (within 2 days) could not get rid of the influence of the programmed pattern of formation from the mother leaf explants, until they had passed through the development phase and entered the maturation phase (after day 8). Otherwise, the callus cells produced only gravitropic leaf-like bodies on bud differentiating medium. At the crucial development phase, a climacteric-like respiration peak composed of the enhanced SHAM sensitive and Na_3PO_4 sensitive pathways took place, while RQ fell to a low value of less than 1.0. At the same time, TCA cycle contribution to the rate of CO_2 release decreased drastically, causing its partial respiratory quotient (PRQ) also to go down to less than 1.0. During bud primordium formation on differentiation medium, a similar respiratory pattern change was observed. The physiological roles of the metabolism changes were discussed.

Key words tobacco; dedifferentiation; redifferentiation; respiratory metabolism