

# TDZ 在植物组织培养中的作用\*

徐华松 徐九龙 黄学林

(中山大学生物系, 广州 510275)

**摘要** TDZ 是具有很强细胞分裂素活性的苯基脲衍生物, 它对植物芽的增殖和再生、体细胞胚胎发生等有重要的作用。本文对发现 TDZ 具有这些作用以来的近 20 年的研究作一评述。

## EFFECT OF TDZ ON PLANT TISSUE CULTURE

Xu Huason Xu Jiulong Huang Xuelin

(Department of Biology, Zhong Shan University, Guangzhou 510275)

**Abstract** TDZ (thidiazuron), the most active cytokinin-like substance is one of phenylurea and has been shown important effect on shoot proliferation and shoot organogenesis or somatic embryogenesis, and so on. This article has evaluated the studies on TDZ since its effect had discovered about 20 years.

TDZ (thidiazuron, 噻二唑苯基脲) 是人工合成的苯基脲衍生物之一, 1976 年 Schering A G 最初用来作为棉花的落叶剂, 随后, Mok 等发现 TDZ 具有很强的细胞分裂素活性<sup>(1)</sup>, 浓度很低的 TDZ 能促进利马豆 (Lima bean) 愈伤组织生长。以后 TDZ 在植物芽的器官发生、体细胞胚胎发生等中的作用相继被发现。TDZ 是苯基脲衍生物中在植物组织培养上最具潜力。本文对 TDZ 在植物组织培养中的作用作一综述。

### 1 TDZ 与芽的增殖和再生

#### 1.1 TDZ 与芽的增殖

Kerns 和 Meyer 发现极低浓度的 TDZ (0.005~5 $\mu$ m) 可促进槭树离体芽的增殖; Nieuwkerk 等也发现低浓度 TDZ 促进苹果树离体芽的增殖。周俊彦等发现, 用 TDZ (0.02mg/L) 和 BA (1.0mg/L) 处理榕树的离体芽进行对比实验, TDZ 处理所得芽、苗数相当或超过 BAP 处理的, TDZ 的浓度仅为 BAP 的 1/50。用油菜、红花槭、紫荆、朴树、椴木、苹果等为材料所做实验中也得到类似结果, TDZ 浓度范围在 0.000 001~10  $\mu$ m, 由此可见, TDZ 具有极高的细胞分裂素活性, 促进芽的增殖。TDZ 在对木本植物的离体芽增殖时具有很显著的促进作用。

1995-04-20 收稿

\* 中山大学生物系九一级张海容同学参与部分工作, 特此致谢!

## 1.2 TDZ与芽的再生

Thomas 用 TDZ 来诱导烟草愈伤组织已分化出芽,但其活性低于 BAP、高于 KT<sup>(2)</sup>。Bates 等用 10  $\mu\text{m}$  TDZ 处理白蜡树的子叶获得了再生芽, 但用 BA 或玉米素诱导未能成功。Mante 等人用 5~12.5  $\mu\text{m}$  诱导李子子叶、樱桃子叶及桃子子叶<sup>(3)</sup>, Fiola 等用 5  $\mu\text{m}$  的 TDZ 诱导悬钩子子叶<sup>(4)</sup> 均获得了再生芽, 用相同浓度的 TDZ (5 $\mu\text{m}$ ) 和 BA (5 $\mu\text{m}$ ) 处理悬钩子子叶, 得到芽的再生率和中途退化率分别是 76.5%、8.8% 和 18.8%、13.5%。显然, TDZ 对植株芽的再生具有促进作用。在诱导芽再生时所用 TDZ 浓度范围为 0.001~100  $\mu\text{m}$ , TDZ 临界浓度的确定在芽的繁殖和再生中至关重要, 例如: 低浓度 TDZ 或许仅仅促进腋芽的增殖, 而高浓度的 TDZ 可能既促进腋芽增殖又提高芽的再生能力<sup>(5, 6)</sup>。选用的浓度因不同植物种类而异, 与生长素配合使用效果更佳。

## 2 TDZ与愈伤组织的发生

Bruce 等用了 500 多种豚的衍生物处理烟草茎髓细胞, 发现约有 300 种能诱导细胞分裂<sup>(7)</sup>; 用番木瓜为材料的实验中, 0.002 mg/L TDZ 的愈伤组织诱导系数可大于 2.0 mg/L 2ip 的, TDZ 的活性是 2ip 的近千倍; Huettelman 用 1~50  $\mu\text{m}$  的 TDZ 能促进黑胡桃的愈伤组织形成而抑制腋芽生长; Ashby 等用 1  $\mu\text{m}$  以上的 TDZ, 同样可促进银枫树愈伤组织生长而抑制腋芽生长; 我们用 1  $\mu\text{m}$  TDZ 处理莴苣子叶, 产生的愈伤组织的量明显大于用 0.2 mg/L BA 的 (未发表); 但 1000  $\mu\text{m}$  TDZ 可能抑制黑胡桃愈伤组织生长, 该浓度也是白蜡树的致死剂量<sup>(8)</sup>。因此, 选用 TDZ 应该注意其浓度大小。

## 3 TDZ与体胚发生

Steward 认为全能性是体细胞在其生命周期中的基本特性, 体细胞胚胎发生是比器官发生增殖速率更快、效果更好的一条植株再生途径。早期曾研究过野胡萝卜<sup>(9)</sup>、玉蜀黍、小麦的体胚发生, 愈伤组织和体胚发生通常是用 2, 4-D 或其他一些生长素诱导产生的; 而在其它一些植物中, 例如旱芹<sup>(10)</sup>、蕃茄<sup>(11)</sup> 中, 体胚发生需要生长素和细胞分裂素同时存在。

1992 年 Saxena 等首次用 TDZ (10  $\mu\text{m}$ ) 诱导出完整花生幼苗的体胚发生<sup>(12)</sup>, Visser 等把 TDZ (0.2~10 $\mu\text{m}$ ) 与 IAA (1 $\mu\text{m}$ ) 和 BAP (8 $\mu\text{m}$ ) 与 IAA (1  $\mu\text{m}$ ) 配合使用来处理天竺葵下胚轴, 发现 BAP 与 IAA 诱导体胚产生的效率低于 TDZ 与 IAA 的; 而 Bates 等人把 TDZ (0.1 $\mu\text{m}$  或 1.0 $\mu\text{m}$ ) 与 2, 4-D (10  $\mu\text{m}$ ) 结合使用, 能诱导出白蜡树的体胚发生<sup>(13)</sup>; 白蜡树的体胚发生曾报道过用 BA 和 2, 4-D 来诱导。显然, TDZ 能代替 BA, 诱导天竺葵、白蜡树、花生的体胚发生, 且浓度低于 BA。用 TDZ 来诱导体胚发生, 对黑胡桃、悬钩子、葡萄<sup>(14)</sup> 等植物也曾报道过, 最近, 周俊彦等又成功地用 TDZ (0.009  $\mu\text{m}$ ) 与 2, 4-D 诱导乌菟莓的体胚发生, 虽然用细胞分裂素 BA (0.23  $\mu\text{m}$ ) 与 2, 4-D 同样可以诱导出乌菟莓的体胚发生, 但用 TDZ 的浓度仅为 BA 的 1/25。

有关 TDZ 诱导植物体胚发生成功的报道没有 TDZ 诱导植物芽增殖和再生那么普遍, 说明 TDZ 诱导植物体胚发生的能力低于 TDZ 诱导芽的增殖和再生的能力。

## 4 TDZ与生根

从 Fasolo 等人<sup>(15)</sup> 和 Yusnita 等人<sup>(16)</sup> 的实验结果来看, TDZ 似乎并未抑制不定芽的

生根。Gray 和 Benton 在生根培养基中分别加  $0.5 \mu\text{m}$  TDZ 和  $5 \mu\text{m}$  BA, 对圆叶葡萄的不定芽进行生根对比实验, TDZ 和 BA 处理的生根率分别是 8% 和 34%。Preece 和 Imel 用  $10 \mu\text{m}$  TDZ 和  $25 \sim 75 \mu\text{m}$  2ip 对杜鹃花进行生根对比实验, TDZ 和 2ip 的生根率分别是 0% ~ 73% 和 74% ~ 100%<sup>[17]</sup>。可见, TDZ 降低了生根率。

## 5 TDZ 与原生质体培养

TDZ 用在这方面的报道较少, Marie 等在培养基中加入 TDZ ( $0.05 \mu\text{m}$ ) 与 2, 4-D ( $14 \mu\text{m}$ ), 是维持白杨树正常原生质体诱发细胞团产生所必需的<sup>[18]</sup>; Mccown 等先用基因枪把外源基因打到白杨树中, 培养在含 TDZ ( $0.1 \mu\text{m}$ ) 的培养基中, 发现 TDZ 有利于外源基因整合到受体中去。Serres 等在大果越桔上用 TDZ ( $1 \mu\text{m}$ ) 做的实验中也得出同样结果<sup>[19]</sup>。

从几例成功的实例中, 可知道 TDZ 在原生质体培养及外源基因导入等方面起着重要的作用。

## 6 TDZ 引起的一些特殊生理现象

### 6.1 促进乙烯的产生

Suttle 用 TDZ 处理豇豆黄化苗下胚轴, 4 小时后乙烯释放量明显高于对照, 并且组织中游离 ACC 含量、ACC 合成酶和乙烯形成酶 (EFE) 都高于对照, Suttle 也曾用  $100 \mu\text{m}$  TDZ 处理棉花幼苗, 24 h 内乙烯释放量即大幅度增加, 并证明乙烯释放量的增加纯由 TDZ 作用所引起, 而与组织受伤或加速衰老无关<sup>[20]</sup>。Yip 等人用豇豆下胚轴和小麦萎蒿叶为材料, 发现 TDZ 诱发乙烯产量的增加可与 IAA 和  $\text{Ca}^{2+}$  协同进行, 乙烯释放量的增加远大于 BAP<sup>[21]</sup>。黄学林等人<sup>[23]</sup>用 TDZ 处理苜蓿叶柄, 发现愈伤组织变绿变硬, 出现管状分子和芽原基分化, 体胚发生能力丧失, 同时伴有乙烯生成, 但乙烯形成酶 (EFE) 的抑制剂  $\text{CoCl}_2$  可逆转 TDZ 的上述作用, 并恢复愈伤组织的体胚发生能力。

### 6.2 玻璃化

玻璃化现象易发生于培养基中生长素与细胞分裂素不平衡的培养或植物细胞壁纤维化程度较差的组织中, 常伴有乙烯的积累, TDZ 的浓度增加到一定程度可使玻璃化发生率提高<sup>[23]</sup>。玻璃化现象的产生对植物组织培养十分不利, 克服的办法除控制 TDZ 的浓度外, 把产生了玻璃化的芽再转入芽增殖培养基中, 但只是一种补救办法。

### 6.3 扁化现象

扁化现象的特征是几个芽合并在一起成扁平状, 常发生在 TDZ 处理时间过长的培养基中, 曾对银枫树<sup>[24]</sup>、白蜡树等有过类似的报道, 有人认为苯基脲衍生物是导致扁化现象的主要物质。是否正确? 是将来值得探讨的问题。

## 7 TDZ 具有高细胞分裂素活性作用机理的探讨

TDZ 在芽的增殖与再生、愈伤组织的生长、体细胞胚胎发生以及原生质体培养等方面起着一定的作用, 其机理怎样? Capelle 等认为 TDZ 可以引起细胞分裂素的积累或合成<sup>[25]</sup>, Thomas 和 Kafferman 实验证明 TDZ 可诱导细胞分裂素的生物合成, 并发现 TDZ 可抑制内源生长素的降解<sup>[26]</sup>, Capelle 等发现, TDZ 可使 CTK 核糖核苷酸迅速转变为核苷, 而玉米素则正好相反, 一般认为 CTK 核苷的活性高于 CTK 核苷酸<sup>[27]</sup>。Mok 和

Mok 曾用<sup>14</sup>C 标记 TDZ 后加入培养基中诱导黄豆的愈伤组织, 培养 33 天后, 大部分标记物仍在 TDZ 分子上, 部分 TDZ 被黄豆组织糖基化, 可能失活或暂时贮存起来, 一旦转到新的培养基, 组织中结合的 TDZ 就释放出来<sup>[28]</sup>。

以上对 TDZ 具有的高细胞分裂素活性机理作了部分解释, 但仍有不完善的地方, 尤其在分子水平上尚未有实验证据和解释。

## 参 考 文 献

- 1 Mok Mi, Mok Dws, Arnstrong D T *et al. Phytochemistry*, 1982, **21**: 1509 ~ 1511
- 2 Thomos J C. *Plant physiol*, 1986, **81**: 681
- 3 Mantes, Scorza R, Cordts J M. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 1989, **19**: 1~11
- 4 Fioal J A, Hassan M A, Swaita H J *et al. Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 1990, **20**: 223~228
- 5 Chapupa V. *Biol. Plant (Praha)*, 1988, **30**:414~421
- 6 Van Nieunkerk S P, Zimmerman R H, Ford haml. *Hortscience*, 1986, **21**: 516~518
- 7 Bruce M I *et al. Rroc Roy Soc*, 1964, **165**: 245
- 8 Preece J E, Bates. In: Ahuja M K Woody Palnt Biotechnology. NATD AST Series, 1991, **210**:37~44. Plencem Press, New York
- 9 Halperin W, Wethere 11 D F. *Amer. J. Bot*, 1964, **51**: 274~283
- 10 Williams L, Collin H A. *Amer. Bot*, 1976, **40**: 325~332
- 11 Zapata E J, Sink K C. *Genet*, 1981, **59**: 265~268
- 12 Praveenk,Saxena, Kamal A *et al. Palnt*, 1992, **187**: 421~424
- 13 Sharon Bates, John E, Preece *et al. Navarrette. J. W. Van Sambeek & Gerald R. Gaflny. Palnt cell. Tiss. and Org. Cult*, 1992, **31**: 21~29
- 14 Matsuta N, Hirabaga Shi T. *Plant Cell Rep*, 1989, **7**: 648~687
- 15 Fasolo F, Zimmerman R H, Fordham I. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 1989, **16**:75~87
- 16 Yusnita S, Geneve R L, Kestes S T. *J. Environ. Hort*, 1990, **8**: 177~179
- 17 Preece J E, Imell M R. *P. J. M. Hybrids Scientia Hort*, 1991, **48**: 159~170
- 18 Marie-Christine Chupeau, Michel Lemorine, Yucs Chupeau J. *Palnt Physiol*, 1995, **144**: pp 601~609
- 19 Serres R. Strang E. MC cake D. Russell D Mahs D & MC Cown B. *J. Amer. Soc. Hort Sci*, 1992, **117**: 174~180
- 20 Suttle J C. *Plomt Physiol*, 1984, **75**: 902
- 21 Yip W K *et al. Plant Physiol*, 1987, **80**: 515
- 22 黄学林, 李筱菊, 傅家瑞等. 植物生理学报, 1994, **20**(4): 367~372
- 23 Ziv M. *In Vitro Cell Del. Biol*, 1991, **27**: 64~69
- 24 Preece J E, Huettemom C A, Ashby W C *et al. J. Amer. Soc. Hort Sci*, 1991, **126**: 142~148
- 25 Capella S C, Mork D W S, Sandra C *et al. Plant Physiol*, 1983, **73**:796~802
- 26 Thomas J C, Katterman F R. *Plant Physiol*, 1986, **81**: 681~683
- 27 Mok Mi, Mok Dws. *Physiol Plant*, 1985, **65**: 427~432