

TDZ: 一种有效的植物生长调节剂

¹ 徐晓峰 ² 黄学林

¹(珠海市农业科学研究中心 珠海 519070)

²(中山大学生命科学学院 广州 510275)

摘要 人工合成的苯基脲衍生物 TDZ(N_苯基_N'_1, 2, 3_噻二唑_5_脲) 是被广泛用于植物组织培养形态发生的高效生物调节剂。它能诱导外植体从愈伤组织形成到体细胞胚胎发生的一系列不同反应, 具有生长素和细胞分裂素双重作用的特殊功能。近年来通过研究 TDZ 启动的形态发生事件, 人们正逐渐揭示出其内在作用机理。许多研究报告指出 TDZ 通过调节内源植物生长激素起作用, 或者是诱导逆境产生起间接作用。它还能调节细胞膜结构、能量水平、营养吸收和同化作用。本文将探讨 TDZ 几种可能的作用机理, 并概述近年来有关 TDZ 诱导的植物离体形态发生效应研究进展。

关键词 TDZ, 植株再生, 形态发生, 生长素, 体细胞胚胎发生

TDZ: An Efficacious Plant Growth Regulator

¹XU Xiao_Feng ²HUANG Xue_Lin

¹(Zhuhai Agriculture & Science Research Center, Zhuhai 519070)

²(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract TDZ(N_phenyl_N'_1, 2, 3_thidiazol_5_yl_urea) is a substituted phenylurea compound and has emerged as a highly efficacious bioregulant of morphogenesis in the tissue culture of many plant species. Application of TDZ induces a diverse array of cultural responses ranging from induction of callus to formation of somatic embryos. TDZ exhibits the unique property of mimicking both auxin and cytokinin effects on growth and differentiation of cultured explants. The recent approaches applied to study the morphogenic events initiated by TDZ are clearly beginning to reveal the details of a variety of underlying mechanisms. Various reports indicate that TDZ may act through modulation of the endogenous plant growth substances, or as a result of induced stress. The other possibilities include the modification in cell membranes, energy levels, nutrient uptake, or nutrient assimilation. In this review, several of these possibilities are presented and summarized in light of recently published studies on characterization of TDZ_induced morphogenic effects.

Key words TDZ, Regeneration, Morphogenesis, Auxin, Somatic embryogenesis

众所周知, 化学因子特别是植物生长调节剂能调节植物的离体形态发生。在过去几十年间, 人们合成了很多能影响植物生长和形态发生的化合物。其中一种叫 TDZ (苯基脲类衍生物) 的棉花脱叶剂出现以后引起了人们极大的兴趣。近年来, 它作为一种有效的形态发生调节剂在植物组织培养快繁体系中得到了广泛地应用, 其应用范围遍及草本植物到木本植物(周俊彦和郭扶兴, 1990)。20 世纪 90 年代以来, 有关 TDZ 诱导的植物形态发

作者简介: 徐晓峰, 1970 年出生, 男, 博士, 植物学专业, 现在珠海市农业科学研究中心工作。黄学林, 1945 年出生, 男, 教授, 博士研究生导师, 从事植物发育与生理方面的研究。

收稿日期: 2002-04-30 接受日期: 2002-12-09 责任编辑: 孙冬花

生过程研究迅速增加。目前,人们对植物在TDZ介导的形态发生期间所诱导的生理生化反应研究已经取得了一些进展。本文就植物组织对TDZ产生应答后的生理和形态反应变化作一概述,并介绍这些反应产生的有关内在机理。

1 化学结构

从结构上说TDZ完全不同于生长素或腺嘌呤型细胞分裂素。在TDZ分子中有两个功能基团:苯基和噻二唑,用其他的环状结构取代这两个功能基团的任何一个,TDZ都表现出活性下降。此外,对称型的N,N'-2-噻重氮是一种具有类似于细胞分裂素活性的化合物,这说明在TDZ诱导的反应中这两个环状结构起着相互促进的作用(Mok *et al.*, 1982)。TDZ是一种难溶于水的浅黄色晶状化合物,易溶于酒精,也能不同程度的溶于其他有机溶剂,例如:丙酮、苯、DMSO等。

TDZ贮备液经长时期的储存以后仍能诱导生理反应发生。近期的研究表明TDZ分子在长期的储存过程中可以形成短链聚合物。在经高压灭菌的溶液、培养基中或者是在组织培养生长期间可以观察到这种聚合作用。因而TDZ的功效在某种程度上很可能是由于TDZ分子经过贮藏以后形成的短链聚合物以及在培养期间的分子重新释放所引起的。

2 TDZ介导的反应

TDZ能有效的诱导多种类型的反应(表1)。它首先被用于诱导棉花脱叶而不引起叶绿素降低或是叶片水势的改变(Grossmann, 1991)。TDZ引起的脱叶反应似乎局限于锦葵科的几种植物(Grossmann, 1991; Zubkova *et al.*, 1991)。在其他系统中,发现用TDZ处理后能延缓离体叶的叶绿素降解速度(You *et al.*, 1992),抑制六出花属植物*Alstroemeria*的叶片衰老(Ferrante *et al.*, 2002),用TDZ处理的天竺葵植物组织也发现具有较高的叶绿素水平(Visser *et al.*, 1995)。由TDZ介导的生理多样性效应包括对独脚金(*Striga asiatica*) (Babiker *et al.*, 1992)、莠苣(Baskakov *et al.*, 1981)和印度楝树(Murthy and Saxena, 1998)等提高种子发芽率,在梨属植物(*Pyrus* spp.)中发现能替代种子发芽的低温要求(Lin *et al.*, 1994),对苹果能促进萌芽(Wang *et al.*, 1986),刺激马铃薯发芽(Murthy *et al.*, 1998)和南瓜子叶生长(Burkhanova *et al.*, 1984)、气孔毛状物分支形成(Venglat and Sawhney, 1994),增加葡萄花簇量和果重(Reynolds *et al.*, 1992)。TDZ作为诱导形态发生的化学物质,其效应并不仅仅局限于组织培养系统。Sanago等(1995)发现TDZ能诱导温室生长的天竺葵叶冠区不定芽发生和根部组织的再生;花烛属植物(*Spathiphyllum* sp.)植株用TDZ浸泡也产生大量芽(Henny, 1995)。Proctor等(1996)观察发现用TDZ叶面喷施或土壤浇灌,人参主根上有不定芽产生。TDZ和其诱导离体、在体形态发生之间的密切关系是很特殊的,并能提供评估TDZ生化反应的多种实验体系和研究调节植物形态发生的各种因素。

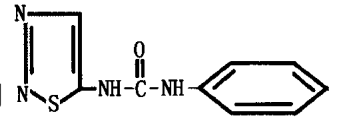


图1 TDZ结构式

Fig. 1 Chemical structure of Thidiazuron

3 TDZ 和离体培养

在植物体内,从理论上来说所有的活细胞通过器官发生或体细胞胚胎途径都具有发育成完整植株的能力(全能性)。脱分化、再分化这种能力主要是由植物体内生长物质调节的,例如生长素和细胞分裂素。在组织细胞培养中 TDZ 是通过单独与其他生长调节物质共同对植物细胞起作用。在植物离体研究中,10 $\mu\text{mol/L}$ 的 TDZ 表现出很高水平的活性(Preece *et al.*, 1991)。植物组织在较短的时期内接触 TDZ 就能有效的刺激植株再生(Visser *et al.*, 1992; Hutchinson and Saxena, 1996a)。

表 1 TDZ 在各种植物中诱导的生理反应
Table 1 The examples of physiological effects mediated by thidiazuron in different species

发育阶段 Stage of development	植物种类 Plant species	生理反应 Physiological response	文献来源 Reference
种子萌发 Seeds germination	独脚金 <i>Striga asiatica</i>	提高发芽率, 并伴随有乙烯生物合成的增加	Gabbar <i>et al.</i> , 1993
	梨属 <i>Pyrus serotina</i>	缩短要求经过低温阶段才能破除种子休眠的时间, 诱导类似丁层积处理后的多肽类物质产生	Lin <i>et al.</i> , 1994
幼苗生长 Early seedling growth	番木瓜 <i>Carica papaya</i> L.	提高种子萌发率	Bhattacharya and Khuspe, 2001
	南瓜 <i>Cucurbita moschata</i> Poir.	加快子叶生长	Burkhanova <i>et al.</i> , 1984
	花生 <i>Arachis hypogaea</i> L.	使子叶变绿变厚, 同时抑制芽和根的生长	Murthy <i>et al.</i> , 1995
	小麦 <i>Triticum aestivum</i> L.	抑制芽的生长	Devlin <i>et al.</i> , 1989
	玉米 <i>Zea mays</i> L.		
	萝卜 <i>Raphanus sativus</i> L.		
萌芽 Bud break and shoot growth	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i> Willd.	1、刺激芽的生长, 使下胚轴缩短和变粗, 加剧花青素积累。降低根和芽的干物质含量。 2、增加茎的直径, 终止芽生长, 抑制萌芽	Murthy <i>et al.</i> , 1998 Devlin <i>et al.</i> , 1989
	苹果 <i>Malus pumila</i> Mill.	诱导萌芽、芽发育、侧芽分化	Wang <i>et al.</i> , 1986
根 Root growth	玫瑰 <i>Rosa hybrida</i> L.		Singh and Syamal, 2001
	燕麦 <i>Avena sativa</i> L.	较低浓度就能使芽变短, 芽鲜重增长到较高水平	Devlin <i>et al.</i> , 1989
	酸橘 <i>Citrus aurantium</i> L.	降低芽生长速率	Murthy <i>et al.</i> , 1998
	苹果 <i>Malus pumila</i> Mill.	增加芽的耐受力 and 山梨(糖)醇含量	Coleman <i>et al.</i> , 1992
叶 Leaves	玉米 <i>Zea mays</i> L.		Devlin <i>et al.</i> , 1989
	萝卜 <i>Raphanus sativus</i> L.		Sanago <i>et al.</i> , 1995
	燕麦 <i>Avena sativa</i> L.	抑制根生长(长度、鲜重、干重), 刺激再生根发育	
	小麦 <i>Triticum aestivum</i> L.		
开花、结果和种子形成 Flowering, fruit, and seed set	天竺葵 <i>Pelargonium ruveolens</i>		
	棉花 <i>Gossypium barbadense</i>	刺激高层的提早形成; 落叶没有表现出水势或叶绿素含量的改变	Grossmann, 1991
拟南芥 Arabidopsis thaliana	六出花属 <i>Alstroemeria</i>	抑制叶片衰老	Ferrante <i>et al.</i> , 2002
	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	在萼片、心皮、气孔上形成毛状物分支, 抑花粉粒和胚珠发育; 增加除雄蕊以外的各种花器官大小。	Venglat and Sawhney, 1994
	葡萄 <i>Vitis vinifera</i> L.	TDZ 能增加花簇量, 浆果重量和可滴定酸度	Reynolds <i>et al.</i> , 1992
玉米 Zea mays L.	苹果 <i>Malus pumila</i> Mill.	用于疏花、疏果, 改善果实大小和平均单果重量; 开花后喷施, 以诱导少籽或无籽果实产生	Murthy <i>et al.</i> , 1998
	玉米 <i>Zea mays</i> L.	增加种子中淀粉粒数量	Murthy <i>et al.</i> , 1998

3.1 愈伤组织诱导

在形态发生的早期阶段,称为愈伤组织的未分化细胞团开始发育。人们通常把生长素加入到细胞培养基中以诱导细胞增殖和愈伤组织生长,人工合成生长素类物质(NAA等)和其他具有生长素活性的植物生长调节物质(2,4-D)已被广泛地用于这一目的。在多种植物培养体系中添加TDZ都表现出能诱导愈伤组织形成(表2),而且大大高于其他植物生长调节物质的细胞增殖速率。

Capelle等(1983)的研究表明TDZ诱导愈伤组织生长的速率是其他植物生长调节剂的30倍;另外,外植体在愈伤组织诱导过程中吸收TDZ的量比其他植物生长调节剂少,因而有人认为植物体内有相当高的内源TDZ活性物质。有关TDZ诱导的愈伤组织类型资料较少,然而较低浓度的TDZ能促进致密型绿色瘤状愈伤组织的形成(Murthy and Saxena, 1998)。

表2 TDZ介导的不同种类的植物离体反应

Table 2 Representative examples of TDZ-mediated *in vitro* responses in different species

培养反应 Culture response	植物种类 Plant species	外植体 Explant	文献来源 Reference
芽形成 Shoot formation	综述		Lu, 1993; Huettelman and Preece, 1993
	花生 <i>Arachis hypogaea</i> L.	叶片 Leaf	Akasaka <i>et al.</i> , 2000
	野仙客来 <i>Cyclamen persicum</i> Mill	叶圆盘、叶柄、花瓣、 花梗 Leaf disks, Petiole, Petal, Pedicel	Karam and Al-Majathoub, 2000
	亚麻属 <i>Linum usitatissimum</i> L.	下胚轴 Hypocotyl	Mundhara and Rashid, 2002
体细胞胚胎发生 Somatic embryogenesis	天竺葵 <i>Pelargonium graveolens</i>	胚轴 Hypocotyl	Visser <i>et al.</i> , 1992
		子叶 Cotyledon	
		幼苗 Seedlings	Qureshi and Saxena, 1992
	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> L.	叶圆盘 Leaf disks	Gill and Saxena, 1993
	花生 <i>Arachis hypogaea</i> L.	幼苗 Seedlings	Saxena <i>et al.</i> , 1992
		幼苗外植体 Seedling explants	Gill and Saxena, 1992
愈伤组织诱导 Callus	葡萄 <i>Vitis vinifera</i> L.	芽切段 Bud cuttings	Murthy <i>et al.</i> , 1998
	棉花 <i>Gossypium barbadense</i>	叶圆盘 Leaf disks	Murthy <i>et al.</i> , 1998
原生质体培养 Protoplasts	葡萄 <i>Vitis vinifera</i> L.	叶圆盘 Leaf disks	Reustle <i>et al.</i> , 1995
	蚕豆 <i>Vicia faba</i>	顶芽 Shoot tips	Tegeder <i>et al.</i> , 1995
	龙胆 <i>Gentiana scabra</i> Bunge	小植株 Plantlets	
	大豆 <i>Glycine max</i> Merr.	子叶 Cotyledons	Murthy <i>et al.</i> , 1998
	草莓 <i>Fragaria ananassa</i> Duch	芽 Shoots	Murthy <i>et al.</i> , 1998
胚修复 Embryo rescue	冬青 <i>Ilex purpurea</i> Hassk.	胚 Embryo	
雄性单性生殖 Androgenesis	橄榄 <i>Olea europaea</i>	花粉囊 Anthers	
	山楂 <i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	花粉囊 Anthers	
孤雌生殖 Gynogenesis	洋葱 <i>Allium cepa</i> L.	胚珠 Ovules	
鳞茎形成 Bulblet formation	洋葱 <i>Allium cepa</i> L.	鳞茎 Bulb	Murthy <i>et al.</i> , 1998

3.2 芽形成

有证据表明 TDZ 对芽(侧芽)萌发和不定芽产生起作用。TDZ 可以诱导从热带果树到块茎作物多种植物的芽产生,利用 TDZ 进行一些植物的快速繁殖前人已有研究(Huetteman and Preece, 1993; Lu, 1993)。一般来说,在培养外植体的培养基里添加高浓度的细胞分裂素能促进芽大量形成,在组织培养时极低浓度的 TDZ 就表现出能促进组织中心部位的生长,并且芽再生效应与其他细胞分裂素相当(Murthy *et al.*, 1998; 徐晓峰和黄学林, 2002)。TDZ 对于木本植物的再生是最有效的(Preece *et al.*, 1991; Baker and Bhatia, 1993),而只有很高浓度的腺嘌呤型细胞分裂素才可能促进木本植物的器官发生。极低浓度的 TDZ 通过去除顶端优势诱导器官发生,从而使得不定芽或侧芽直接在培养的茎尖上形成(Huetteman and Preece, 1993; Lu, 1993)。Mundhara 和 Rashid (2002)的研究发现在黑暗条件下,TDZ 能诱导亚麻下胚轴产生芽,而 BAP 不能诱导芽的产生。另外,TDZ 能有效地诱导腺嘌呤型细胞分裂素类物质无效的植物芽的形成。但是,TDZ 诱导芽变成完整植株也存在一些问题,例如不利于芽延长,生根困难等(Huetteman and Preece, 1993; Lu, 1993)。TDZ 对生长的这种不利影响可以通过在培养基中加入合适的浓度或者增加其在培养组织的作用时间得到改善。

3.3 体细胞胚胎发生

通过改变外加生长素的水平或者生长素/细胞分裂素的比例,能刺激体细胞形成胚组织。研究发现在许多植物种类中 TDZ 能替代生长素和细胞分裂素促进体细胞胚胎发生(Saxena *et al.*, 1992; Visser *et al.*, 1992)。人们在烟草(Gill and Saxena, 1993)、花生(Saxena *et al.*, 1992; Murthy *et al.*, 1995)、天竺葵(Visser *et al.*, 1992)、鹰嘴豆(Murthy *et al.*, 1996b)、印度楝树(Murthy and Saxena, 1998)等例子中都发现了 TDZ 刺激离体体细胞胚胎发生,而且 TDZ 的诱导速率大大高于其他植物生长激素。TDZ 刺激芽或体细胞胚胎产生在其他植物种类中也有记录(Bates *et al.*, 1992)。尽管 TDZ 具有类细胞分裂素的作用,但是以上所涉及的体细胞胚胎发生证据表明,TDZ 通过调节生长素代谢共同起作用。另外, Hutchinson 等(1996)研究表明抑制生长素生物合成和运输就能阻碍 TDZ 诱导的体细胞胚胎发生,这进一步说明了 TDZ 介导的体胚发生是和生长素共同起作用的(Malik and Saxena, 1992)。

3.4 不通过外植体的植株再生

TDZ 是诱导完整小苗产生体细胞胚胎的惟一体系(Malik and Saxena, 1992)。在培养基中加入 TDZ 可以使体细胞胚胎在完整豌豆、花生和鹰嘴豆幼苗不同部位产生,而腺嘌呤型细胞分裂素 BA(N₆-苄基腺嘌呤)只能使芽再生,这表明 TDZ 诱导的体细胞胚胎发生反应是完全不同于细胞分裂素的(Murthy *et al.*, 1998)。尽管完整幼苗培养体系过去被用于繁殖种子较大的豆类植物,如豌豆、刀豆和花生,但是这一系统现在已被用在其他许多种类植物,包括天竺葵(Qureshi and Saxena, 1992)和印度楝树(Murthy and Saxena, 1998)。

3.5 原生质体培养

通过原生质体途径的植株再生一般要经过愈伤组织阶段,而体细胞胚胎发生可以通过原生质体再生细胞获得。Cook 和 Meyer (1981)认为生长素和细胞分裂素对刺激原生质体分裂和生长是很重要的,因而,大多数原生质体培养基都添加生长素和细胞分裂素。在原生质体细胞壁形成初始阶段和细胞分裂期间,添加的 TDZ(与生长素类物质 NAA、NOA、

2, 4-D 配合使用) 浓度在 0.001 到 20 $\mu\text{mol/L}$ 之间(Chupeau *et al.*, 1993; Reustle *et al.*, 1995), 最后完成原生质体愈伤组织的植株再生(Lenzner *et al.*, 1995)。Wallin 和 Johansson(1989) 研究证明 TDZ 维持苹果叶片原生质体分裂效果比 BA 或玉米素好, 在柳树(*Salix viminalis* L.) 原生质体培养中也得到类似的结果(Vahala and Eriksson, 1991)。Chupeau 等(1993) 观察到较低浓度的 TDZ 比腺嘌呤型细胞分裂素效果好。TDZ 对诱导原生质体愈伤组织植株再生的作用似乎强于细胞分裂素类物质反应, 但是这种效应的真正机理仍不清楚。

4 TDZ 调节植物形态发生的机制

在 20 世纪 80 年代早期, TDZ 作为一种潜在的细胞分裂素类物质用于不定芽再生, 并用以阐述其诱导形态发生和植株生长、发育的潜力, 从而引起了人们极大的兴趣。起初, TDZ 主要与其他生长调节物质相结合应用, 例如生长素。Visser 等(1992) 首先描述了 TDZ 可以替代天竺葵组织培养体系对生长素和细胞分裂素的要求。稍后的研究表明 TDZ 在许多植物种类中是具有诱导植株再生作用的唯一生长调节物质(Gill and Saxena, 1993; Murthy and Saxena, 1998)。许多对 TDZ 产生应答的植物种类以前被认为难以诱导植株再生(Murthy and Saxena, 1998), 因而, 在 TDZ 存在条件下产生形态发生的植物种类将会越来越多。

TDZ 处理以后的一系列变化包括具有形态发生能力细胞的重新分化和表达, 重新进入程序化发育阶段, 最后导致形态发生。尽管人们对植株再生所涉及的生理过程还不能完全了解, 并采用了广泛的植物种类和多种技术手段进行研究, TDZ 所引起的生理反应预示了其内在作用机理的多样性。

4.1 TDZ 和植物激素

自从发现植物激素和组织培养中激素调节形态发生的假说以来, 人们已经在植物形态发生领域取得了相当多的研究进展。TDZ 在形态发生中的作用是与内源生长调节物质的代谢紧密相连的。通过使用选择性植物激素抑制剂, 人们已经获悉了 TDZ 诱导的反应和内源植物生长调节物质(尤其是细胞分裂素、生长素、乙烯和 ABA) 之间的关系(Capelle *et al.*, 1983; Mok *et al.*, 1987; Murthy *et al.*, 1995; Hutchinson and Saxena, 1996b)。

4.1.1 细胞分裂素 Mok 等(1982) 参考激素调节植株再生机理, 提出了 TDZ 作用模式的早期解释, 即认为其具有类细胞分裂素物质的活性。在一些生物实验中, 人们得出了 TDZ 作用与细胞分裂素有关的传统效应(Visser *et al.*, 1995)。也有人指出 TDZ 诱导内源细胞分裂素合成或促进其体内积累(Murthy *et al.*, 1995; Hutchinson and Saxena, 1996b)。在 TDZ 和玉米素存在的情况下, 对细胞分裂素的核糖核苷和核苷酸进行标记转化研究表明: TDZ 抑制核苷形成, 而玉米素促进核糖核苷形成核苷, 因而, TDZ 与调节内源细胞分裂素的代谢有关(Mok *et al.*, 1987)。然而, 这些效应在多大程度上与 TDZ 作用有关目前还不清楚。TDZ 具有把组织细胞分裂素依赖型转化为自主型的能力, 这说明 TDZ 与内源细胞分裂素代谢紧密相连(Capelle *et al.*, 1983)。利马豆组织培养一般要求细胞分裂素, 用 TDZ 处理以后可以在无细胞分裂素的培养基上自由生长。即使在转入基本培养基中以后, TDZ 引起的细胞分裂素活化作用仍然能够保持, 这可能是刺激具有 N₆ 类异戊二烯侧链的腺嘌呤型细胞分裂素活性物质合成路径的结果(Capelle *et al.*, 1983)。

对组织培养体系中放射性同位素标记的 TDZ 分析表明 TDZ 结构能完整保持 48 h, 延长培养后其主要代谢物是葡萄糖苷衍生物(Mok and Mok, 1985)。这些发现表明 TDZ 分子对细胞分裂素诱导的组织离体培养生长同样起作用, 但其并没有被分解为腺嘌呤型的细胞分裂素。正如早期的研究结果那样, 类似于细胞分裂素作用的 TDZ 具有特殊结构, 其苯基结构的改变会降低它的活性(Mok *et al.*, 1982), 这暗示 TDZ 作用要求保持其分子的完整结构而不是它的代谢产物。在一些离体系统中, TDZ 替代嘌呤型细胞分裂素并以一种类似于这种细胞分裂素的作用方式引起植物组织应答, 通过使用嘌呤代谢的抑制物进一步确证了这些观察到的现象。在天竺葵(Hutchinson and Saxena, 1996b)和花生(Murthy *et al.*, 1998)中嘌呤类似物 DAP 能抑制 TDZ 诱导的体细胞胚胎发生, 并且这种抑制作用可以被腺嘌呤硫酸盐完全逆转(Hutchinson and Saxena, 1996b)。然而, TDZ 的结构在天然嘌呤型细胞分裂素类物质中并不存在, 且嘌呤型细胞分裂素单独使用不能定向诱导确定的形态发生如体细胞胚胎发生。因而人们对 TDZ 是否可能具有通过不同机制证明的其他性质还不清楚。在竞争性抑制剂存在的情况下, 了解嘌呤型细胞分裂素和苯基脲类物质活性和结构之间关系发现, 从诱导的生物反应说明了这两大类生长调节物质存在共同的作用位点(Iwamura *et al.*, 1980)。Nagata 等(1993)从绿豆幼苗分离到了细胞分裂素特异性结合的蛋白质(CSBP), 这表明苯基脲类衍生物 CPPU 与 CSBP 的固定关系高于 BA。这一发现清楚地表明对于各种类型化合物都存在共同的细胞分裂素特异性结合蛋白质。

4.1.2 生长素类 生长素类物质是植株再生必需的, 其对组织培养时脱分化和再分化的完成非常重要。它能诱导花生体细胞胚胎反应(Baker and Wetzstein, 1994)。然而, 近年来人们发现 TDZ 本身足够诱导花生和印度楝树体细胞胚胎发生(Gill and Saxena, 1992; Saxena *et al.*, 1992; Murthy and Saxena, 1998)。生长在含 TDZ 培养基上的花生幼苗显示了束缚型 IAA 即 β -吡啶基乙胺的增加, 这表明 TDZ 能刺激体内生长素类物质合成(Murthy *et al.*, 1995)。生长素生物合成抑制剂 PCIB 能降低天竺葵(Hutchinson *et al.*, 1996)和花生(Murthy and Saxena, 1998)中 TDZ 诱导的体细胞胚胎发生, 这进一步证明了 TDZ 能刺激体内生长素类物质合成。但是, 生长素绝对浓度不是控制这些体系中体细胞胚胎发生的唯一因素。生长素极性运输抑制剂 TIBA(2, 3, 5-三碘苯甲酸)能减少体细胞胚胎发生(Thomson *et al.*, 1973), 但是它不能降低 TDZ 处理过的组织中生长素浓度(Hutchinson *et al.*, 1996)。

4.1.3 乙烯 乙烯对体细胞胚胎发生既有促进性效应, 也有抑制效应(Biddington, 1992)。在诱导天竺葵体细胞胚胎发生期间, 培养基补充 TDZ 会导致培养器皿上部空间乙烯水平增加(Hutchinson *et al.*, 1997a)。乙烯合成抑制剂 AVG(氨基乙氧基乙烯甘氨酸)能提高天竺葵胚轴组织培养时胚胎反应, 因此这说明乙烯是 TDZ 介导的体内一系列代谢变化的消极副产品(Hutchinson *et al.*, 1997a)。使用外源乙烯或乙烯合成前体 ACC(1-氨基环丙烷-1-羧酸), 能使胚胎发生反应降低到与 TDZ 诱导的组织培养相同水平(Hutchinson *et al.*, 1997a)。

类似地, 用 TDZ 处理棉花叶片后, 乙烯合成量大大增加一直持续到落叶(Suttle, 1985)。乙烯量增加和以下三个方面没有关联: a) 乙烷量增加显示受到化学物质伤害, b) 叶片水势改变显示细胞内部干燥, c) 叶绿素含量降低显示加速叶片衰老(Suttle, 1985)。根据在棉花中观察到的 PCIB 抑制 TDZ 引起的乙烯合成现象, Suttle(1986)认为 TDZ 也会诱

发类生长素物质的代谢反应。自从用生长素处理也会导致乙烯合成量增加的现象发现以来(Murthy *et al.*, 1998), 人们得出了这样的结论: 叶片脱落可能不是 TDZ 处理的直接结果而是 TDZ 诱导生长素应答的结果。

4.1.4 赤霉素 尽管没有 TDZ 调节植物内源赤霉素的相关报道, 但是在天竺葵中使用 GA 生物合成抑制剂(triazoles and ancymidol) 能改善 TDZ 诱导的体细胞胚胎发生(Hutchinson *et al.*, 1997b), 这支持了赤霉素代谢也受到 TDZ 调节的假说。而且, 在 TDZ 存在的情况下豆类幼苗生长表现出矮化生长的特性(Murthy *et al.*, 1998), 用 TDZ 叶面喷施或根施人参和天竺葵植株能显著地降低茎长(Sanago *et al.*, 1995; Proctor *et al.*, 1996)。从 TDZ 诱导的木本植物不定芽产生的植株常常表现出节间缩短的矮化现象(Lu, 1993), 这进一步说明了赤霉素代谢发生变化。由 TDZ 造成的形态特征变化在多大程度上与赤霉素代谢有关仍需进一步研究。

4.2 TDZ 诱导反应所涉及的酶

TDZ 处理后的组织和器官形态上的可见变化是酶动力学改变的结果。Wang 等(1991a) 在研究 TDZ 引起的苹果芽萌发时注意到了与苯酚、过氧化氢酶和过氧化物酶积累有关的酶活性变化。Wang 等(1991b) 在稍后的研究中还发现 TDZ 诱导的几种酶与细胞壁、细胞膜有关, 并导致细胞膜流动性增加。在其他酶动力学研究中, TDZ 能诱导黄化豆类幼苗叶圆盘硝酸还原酶合成(Kulaeva *et al.*, 1982)。Chernyad'ev 和 Kozlovskikh(1990) 发现 TDZ 能诱导 ATP、RubisCO 和戊糖磷酸途径的酶增加。细胞分裂素氧化酶是和 TDZ 诱导的生理反应有关的另外一种重要酶, 它催化细胞分裂素上不饱和类异戊二烯侧链的氧化, 并且是已知的能够使植物体内细胞分裂素不可逆失活的惟一的一种酶。在一些体系里, 发现 TDZ 能抑制细胞分裂素氧化酶活性(Hare and Van Staden, 1994; Chatfield and Armstrong, 1986), 这可能是酶非竞争性机制占优势的结果(Hare and Van Staden, 1994)。

4.3 TDZ 和逆境

近年来越来越多的研究开始用 TDZ 诱导逆境反应解释其生理效应。在 TDZ 存在的情况下, 包括豆类(Murthy *et al.*, 1995) 和南瓜(Burkhanova *et al.*, 1984) 等在内的种子发芽具有特殊的形态特性, 结果造成幼苗生长矮化, 叶色加深, 子叶变厚变绿, 初生根生长减缓而次生根减少。用 TDZ 溶液浸泡过的生长在温室中的天竺葵也有类似的形态变化, 且能诱导出再生根(Sanago *et al.*, 1995)。另外, TDZ 处理组织诱导逆境产生后有一些物理学变化的证据, 表现为伴随有矿质离子和与其他逆境有关的代谢物: 脯氨酸、脱落酸、4-氨基丁酸的累积(Murch and Saxena, 1997)。由于 TDZ 处理而产生的矿质离子积累对于诱导植株再生是很重要的因素, 胡萝卜组织培养中把锌、铜和钠加入到培养基里, 能在缺乏外源生长调节物质的情况下诱导体细胞胚胎发生(Kiyosue *et al.*, 1990)。鉴于以上情况, 我们可以猜测在 TDZ 的作用下组织中有相当高水平的矿物质或其他代谢物的累积, 进而使植株(或外植体) 处于逆境胁迫状态。为了克服这种生理逆境, 植物组织会调节它们的代谢进程, 并导致各种代谢物的积累和产生, 最后完成植株再生。在这种特定情况下, TDZ 处理引起的植株再生现象是植物自身克服逆境胁迫的合适的再生机制的体现(Murch *et al.*, 1997)。

参 考 文 献

- 周俊彦, 郭扶兴, 1990. 苯基脲衍生物的细胞分裂素活性. 植物生理学通讯, **4**: 7~ 13
- 徐晓峰, 黄学林, 2002. 应用正交设计建立青花菜植株的再生体系. 广西植物, **22**: 513~ 516
- Akasaka Y, Daimon H, Mii M, 2000. Improved plant regeneration from cultured leaf segments in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by limited exposure to thidiazuron. *Plant Science*, **156**: 169~ 175
- Babiker A G T, Parker G, Suttle J G, 1992. Induction of *Striga* seed germination by TDZ. *Weed Res*, **32**: 243~ 248
- Baker B S, Bhatia S K, 1993. Factors effecting adventitious shoot regeneration from leaf explants of quince (*Cydonia oblonga*). *Plant Cell Tissue Organ Cult*, **35**: 273~ 277
- Baker C M, Wetzstein H Y, 1994. Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **36**: 361~ 368
- Baskakov Y A, Shapovalov A A, Zhimunskaia N M, 1981. Interrelationship of growth_regulating activity and phytotoxicity of synthetic cytokinins. *Dokl Akad Nauk SSSR*, **267**: 1514~ 1517
- Bates S, Preece J E, Navarrete N E, 1992. TDZ stimulates shoot organogenesis and somatic embryogenesis in white ash (*Fraxinus americana* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **31**: 21~ 29
- Bhattacharya J, Khuspe S S, 2001. *In vitro* and *in vivo* germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. *Scientia Horticulturae*, **91**: 39~ 49
- Biddington N L, 1992. The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regul*, **11**: 173~ 187
- Burkhanova E A, Fedina A B, Baskakov A, Yu A, 1984. A comparative study of the effects of 6_benzylaminopurine, TDZ and cartolin on the grown of intact pumpkin seedlings. *Fiziol Rast (Engl Transl) Plant Physiol*, **31**: 13~ 19
- Capelle S C, Mok D W S, Kirchner S C, 1983. Effects of TDZ on cytokinin autonomy and the metabolism of N6_(DELTA2_isopentenyl)[8_14C] adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Physiol*, **73**: 796~ 802
- Chatfield J M, Armstrong D J, 1986. Regulation of cytokinin oxidase activity in callus tissues of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Great Northern. *Plant Physiol*, **80**: 493~ 499
- Chenyad ev I I, Kozlovskikh A L, 1990. Effects of 6_benzylaminopurine, TDZ, and cartolin on activity of photosynthetic enzymes and ATP content in leaves of perennial grasses. *Sov Plant Physiol*, **37**: 251~ 256
- Chuveau M C, Lemoine M, Chuveau Y, 1993. Requirement of TDZ for healthy protoplast development to efficient tree regeneration of a hybrid poplar (*Populus tremula* × *P. alba*). *J Plant Physiol*, **141**: 601~ 609
- Coleman W K, Estabrooks E N, O Hara M, 1992. Seasonal changes in cold hardiness, sucrose and sorbitol in apple trees treated with plant growth regulators. *J Hort Sci*, **67**: 429~ 435
- Cook R, Meyer Y, 1981. The hormonal control of tobacco protoplast nucleic acid metabolism during *in vitro* culture. *Planta*, **152**: 1~ 7
- Devlin R M, Zbiec I I, Nowicka S E, 1989. The effect of TDZ on some plant growth systems. *Proc Plant Growth Regul Soc*, **16**: 99~ 103
- Ferrante A, Donald A H, Wesley P H, Michael S R, 2002. Thidiazuron—a potent inhibitor of leaf senescence in *Alstroemeria*. *Postharvest Biology and Technology*, **25**: 333~ 338
- Gabbar A, Babiker T, Butler L G, 1993. Enhancement of ethylene biosynthesis and germination by cytokinins and L_aminocyclopropane_L_carboxylic acid in *Striga asiatica* seeds. *Physiol Plant*, **89**: 21~ 26
- Gill R, Saxena P K, 1992. Direct somatic embryogenesis and regeneration of plants from seedling explants of peanut (*Arachis hypogaea*): promotive role of TDZ. *Can J Bot*, **70**: 1186~ 1192
- Gill R, Saxena P K, 1993. Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L: induction by TDZ of direct embryo differentiation from cultured leaf discs. *Plant Cell Rep*, **12**: 154~ 159
- Grossmann K, 1991. Induction of leaf abscission in cotton is a common effect of urea and adenine_type cytokinins. *Plant Physiol*, **95**: 234~ 237
- Hare P D, Van Staden J, 1994. Inhibitory effect of thidiazuron on the activity of cytokinin oxidase isolated from soybean callus. *Plant Cell Physiol*, **35**: 1121~ 1125
- Henny R J, 1995. TDZ increases basal bud and shoot development in *Spathiphyllum* 'Petite'. *Plant Growth Regul Soc Am Quart*, **23**: 13~ 16
- Huetteman C A, Preece J E, 1993. TDZ: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, **33**: 105~

119

- Hutchinson M J, Saxena P K, 1996a. Acetylasalicylic acid enhances and synchronizes TDZ-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium × hortorum* Bailey) tissue cultures. *Plant Cell Rep*, **15**:512~ 515
- Hutchinson M J, Saxena P K, 1996b. Role of purine metabolism in TDZ-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium × hortorum*) hypocotyls cultures. *Physiol Plant*, **98**: 517~ 522
- Hutchinson M J, Murch S J, Saxena P K, 1996. Morphoregulatory role of TDZ: evidence of the involvement of endogenous auxin in TDZ-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium × hortorum* Bailey). *J Plant Physiol*, **149**:573~ 579
- Hutchinson M J, Murr D P, Krishnaraj S, 1997a. Does ethylene play a role in TDZ-regulated somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium × hortorum*) hypocotyls cultures. *In Vitro Cell Dev Biol*, **33P**:136~ 141
- Hutchinson M J, Krishnaraj S, Saxena P K, 1997b. Inhibitory effect of GA₃ on the development of TDZ-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium × hortorum*) hypocotyls cultures. *Plant Cell Rep*, **16**: 435~ 438
- Iwamura H, Fujita T, Koyama S, 1980. Quantitative structure-activity relationship of cytokinin-active adenine and urea derivatives. *Phytochemistry*, **19**:1309~ 1309
- Karam N S, Al_Majathoub M, 2000. In vitro shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum* Mill. *Saentia Horticulturae*, **86**: 323~ 333
- Kiyosue T, Takano K, Kamada H, 1990. Induction of somatic embryogenesis in camot by heavy metal ions. *Can J Bot*, **68**: 2301~ 2303
- Kulaeva O N, Yu A, Baskakov A, 1982. Investigations of cytokinin properties of the defoliant DROP and the herbicide DPX4189. *Fizol Rast (Engl Transl) Plant Physiol*, **29**: 266~ 273
- Lenzner S, Zoglauer K, Schieder O, 1995. Plant regeneration from protoplasts of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiol Plant*, **94**: 342~ 350
- Lin C H, Lee L Y, Tseng M J, 1994. The effect of stratification and TDZ treatment on germination and protein synthesis of *Pyrus scortina* Rehd cv. *Niuali Ann Bot*, **73**: 515~ 523
- Lu C Y, 1993. The use of TDZ in tissue culture. *In Vitro Cell Dev Biol*, **29P**:92~ 96
- Malik K A, Saxena P K, 1992. TDZ induces high frequency shoot regeneration in intact seedlings of pea (*Pisum sativum*). Chickpea (*Cicer arietinum*), and lentil (*Lens culinaris*). *Aust J Plant Physiol*, **19**: 731~ 740
- Mok M C, Mok D W S, Armstrong D J, 1982. Cytokinin activity of N-phenyl-N',1,2,3-thiadiazol-5-ylurea(TDZ). *Phytochemistry*, **21**: 1509~ 1511
- Mok M C, Mok D W S, 1985. The metabolism of [¹⁴C]-TDZ in callus cultures of *Phaseolus lunatus*. *Physiol Plant*, **65**: 427~ 432
- Mok M C, Mok D W S, Tumer J E, 1987. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HorScience*, **22**:1194~ 1197
- Mundhara R, Rashid A, 2002. Stimulation of shoot bud regeneration on hypocotyl of linum seedlings, on a transient withdrawal of calcium: effect of calcium, cytokinin and thidiazuron. *Plant Science*, **162**: 211~ 214
- Murch S J, Saxena P K, 1997. Modulation of mineral and fatty acid profiles during TDZ mediated somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *J Plant Physiol*, **151**: 358~ 361
- Murch S J, Krishnaraj S, Saxena P K, 1997. TDZ-induced morphogenesis of Regal Geranium (*Pelargonium domesticum*): a potential stress response. *Physiol Plant*, **101**: 183~ 191
- Murthy B N S, Murch S J, Saxena P K, 1998. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol*, **34**: 267~ 275
- Murthy B N S, Murch S J, Saxena P K, 1995. TDZ-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Physiol Plant*, **94**: 268~ 276
- Murthy B N S, Saxena P K, 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *Plant Cell Rep*, **17**: 469~ 478
- Murthy B N S, Singh R P, Saxena P K, 1996a. Induction of high frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium × hortorum* Bailey cv. Ringo Rose) cotyledonary cultures. *Plant Cell Rep*, **15**: 423~ 426
- Murthy B N S, Vitor J, Singh R, 1996b. *In vitro* regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.), Stimulation of direct organogenesis and somatic embryogenesis by TDZ. *J Plant Growth Regul*, **19**: 233~ 240
- Nagata R, Kawachi E, Hashimoto Y, 1993. Cytokinin-specific binding protein in etiolated mung bean seedlings. *Biochem Biophys Res Commun*, **198**: 543~ 549
- Preece J E, Huetteman C A, Ashby W C, 1991. Micro and cutting propagation of silver maple. I. Results with adult and juvenile.

- propagules. *J Am Soc Hortic Sci*, **116**:142~ 148
- Proctor J T A, Slimmon T, Saxena P K, 1996. Modulation of root growth and organogenesis in TDZ_treated ginseng (*Prax quinquefolium* L.). *J Plant Growth Regul*, **20**: 201~ 208
- Qureshi J A, Saxena P K, 1992. Adventitious shoot induction and somatic embryogenesis with intact seedlings of several hybrid seed geranium (*Pelargoniumhortorum* Bailey) varieties. *Plant Cell Rep*, **11**: 443~ 448
- Reustle G, Harst M, Alleweld G, 1995. Plant regeneration of grapevine (*Vitis* sp.) protoplasts isolated from embryogenic tissue. *Plant Cell Rep*, **15**: 238~ 241
- Reynolds A G, Wardle D A, Zurowski C, 1992. Phenylureas CPPU and TDZ affect yield components, fruit composition, and storage potential of four seedless grape selections. *J Am Soc Hortic Sci*, **117**: 85~ 89
- Sanago M H M, Murch S J, Slimmon T Y, 1995. Morphoregulatory role of TDZ: morphogenesis of root outgrowths in TDZ_treated geranium (*Pelargonium* × *hortorum* Bailey). *Plant Cell Rep*, **15**: 205~ 211
- Saxena P K, Malik K A, Gill R, 1992. Induction by TDZ of somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut. *Planta*, **187**: 421 ~ 424
- Suttle J C, 1985. Involvement of ethylene in the action of the cotton defoliant TDZ. *Plant Physiol*, **78**: 272~ 276
- Singh S K, Syamal M M, 2001. A short pre_culture soak in thidiazuron or forchlorfenuron improves axillary shoot proliferation in rose micropropagation. *Scientia Horticulturae*, **91**: 169~ 177
- Suttle J C, 1986. Disruption of the polar auxin transport system in cotton seedlings following treatment with the defoliant TDZ. *Plant Physiol*, **86**: 241~ 245
- Tegeger M, Gebhardt D, Schieder O, 1995. TDZ_induced plant regeneration from protoplasts of *Vicia faba* cv. Mythos. *Plant Cell Rep*, **15**: 164~ 169
- Thomson K S, Hertel R, Muller S, 1973. L_V_naphthylphthalamic acid and 2, 3, 5-triiodobenzoic acid in vitro binding to particulate cell fractions and action on auxin transport in corn coleoptiles. *Planta*, **109**: 337~ 352
- Vahala T, Eriksson T, 1991. Callus production from willow (*Salix viminalis* L.) protoplasts. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, **27**: 243 ~ 248
- Venglat S P, Sawhney V K, 1994. Ectopic formation of trichomes and stomata in floral organs of *Arabidopsis thaliana* induced by TDZ. *Can J Bot*, **72**: 671~ 677
- Visser C, Eletcher R A, Saxena P K, 1995. TDZ stimulates expansion and greening in cucumber cotyledons. *Physiol Mol Biol Plants*, **1**: 21~ 26
- Visser C, Qureshi J A, Gill R, 1992. Morphoregulatory role of TDZ. Substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyls cultures. *Plant Physiol*, **99**: 1704~ 1707
- Wallin A, Johansson L, 1989. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of in vitro cultured shoots of a columnar apple. *J Plant Physiol*, **135**: 565~ 570
- Wang S Y, Jiao H J, Faust M, 1991a. Changes in ascorbate, glutathione, and related enzyme activities during TDZ_induced lateral bud of apple. *Physiol Plant*, **82**: 231~ 236
- Wang S Y, Jiao H J, Faust M, 1991b. Changes in metabolic enzyme activities during TDZ_induced lateral bud break of apple. *HortScience*, **26**: 171~ 173
- Wang S Y, Steffens G L, Faust M, 1986. Breaking bud dormancy in apple with a plant bioregulator. TDZ. *Phytochemistry*, **25**: 311 ~ 317
- You S P, Liang S H, Xu L G, 1992. The effect of TDZ on senescence and some physiological processes in detached leaves of barley. *J Hangzhou Univ*, **19**: 352~ 353
- Zubkova N F, Bukashkina Z V, Markina L G, 1991. Defoliating effect of fusicoccin. *Agrokhimiya*, **12**: 86~ 92