离体植物花芽和花器官的发育研究进展*

邵宏波

(北京大学生物学系, 北京100871)

初立业

(四平师范学院生物系, 四平136000)

Q949.405

摘要 在近二十几年, 尤其是近十年由于离体培养技术的完善和进一步向精确的层次的发展, 已使得许多种植物花序、花芽和单独花器官以及部分的花器官在体外成功地进行了培养和尝试, 并且对花芽及花器官的离体发育有了更深入的认识, 不同植物的花发育需要不同的植物生长调节剂以及它们的不同配比, 并且不同植物在其花发育所需要的营养因子也存在着相当大的差异性。这种差异性又随植物器官及花发育的不同阶段而受到加大或缩小。通过对正常花及突变体花进行的离体培养实验研究已经对一些花器官发生过程中的调节程序有了新的了解。利用离体培养技术, 包括刚发展起来的薄层细胞培养技术在阐明花发育的机理、形态建成的分子机制以及成花梯度的物质基础等问题上具有广阔的潜力。

关键词 离体培养; 花序; 花器官; 植物生长调节剂; 花发育; 高等植物

THE RESEARCH ADVANCES OF IN VITRO DEVELOPMENT OF PLANT FLORAL BUDS AND ORGANS

Shao Hongbo

(Biology Department, Beijing University, Beijing 100871)

Chu Liye

(Biology Department, Siping Teacher's College)

Abstract In the past more than twenty years, the floral buds and individual floral organs of many plants have been cultured in vitro, from which many general conclusions have been drawn such as: There is large difference in the requirement of plant growth regulators and nutritional factors for flower development of different plants; The difference varies with the different hormonal and nutritional requirements at various stages of organ and floral development. Experimental studies on normal and mutant flowers in vitro have provided insights into some of the regulatory processes in floral initiation and development; Recently-established thin-layer cell culture technique have also offered a precise and convenient method to be applied to study the molecular mechanism of floral development and the matter basis of flowering gradient. In the paper, the authors also pointed out some problems existing now in this field, and the prospect, meanwhile stressing the potential of using the in vitro culture techniques to investigate the problems in this field.

Key words In vitro culture; inflorescence; floral organs; plant growth regulators; floral development; higher plants

*本文承蒙导师曹宗巽教授的鼓励和指导, 特致谢。

高等植物花的发育是一个错综复杂的形态发生过程,在某些情况下,其花发育的过程能够被外部条件^[1,16]所调控,但花发育过程本身却是一个有序的、不同基因差异表达的过程^[7,48-51]。

近十几年来由于对植物细胞全能性研究的不断深入,以及细胞与组织离体培养技术的完善与发展已使得花发育过程中所需要的条件、花发育的生理生化机制以及植物激素、核酸等大分子物质在细胞分化及形态建成中的重要功能方面都有了不断深入的认识^[1,2,4]。同时由于分子生物学及基因工程的理论和技术的迅速发展和完善^[26,42],已使得花发育的研究深入到了分子水平,并在此水平上探讨植物发育过程中遗传信息对发育的时间、空间顺序选择性表达的指导作用^[11],这已成为当前生物科学中研究的热点之一,并将成为“植物发育分子生物学”研究的重要内容^[26]。

利用离体培养技术建立高等植物花发育的体外实验系统将为研究花发育及其形态发生的机制提供众多的优越性^[1-4,16],尤其以花芽及花器官为外植体而建立的离体培养技术所提供的优点最显著,其优点如下:1.通过除去植物其它部分而转移来的物质干扰,可以对花发育过程中的营养物质和植物生长调节物质的直接作用进行研究;2.通过一系列的,对外植体而进行的外科手术实验,可以对完整芽和个别器官发育中的决定事件、调节行为以及它们的再生潜能加以阐明;3.通过这些外科手术的体外操作也可以鉴定一种器官类型对另一种器官类型启动和发育的影响;4.通过培养单个的器官原基能够对任一器官类型的花器官决定实质、时程安排以及其细胞分化的调控行为进行深入的研究;5.可以对花芽的自主性即器官的启动和发育方式是否独立于植物的其它部分,进行检测和研究;6.利用薄层细胞培养技术并结合微量的生理生化技术还可以在10—12天内对同质的细胞如何启动,并进入生殖生长的过程进行追踪研究,并且对性别转变过程中的物质代谢变化研究提供精确的手段^[8,4]。

自从本世纪的六十年代早期以来,已经有多种植物的花芽和器官原基在离体条件下得到了培养(表1),大体上可把所培养的器官原基外植体归纳为三种类型:幼花序型,花芽型及单个花器官型^[4]。通过这些研究,人们已经获得了关于花发育所需求的营养及激素方面的大量基础资料,以及花芽和单个花器官形态发生能力方面的资料。本文着重评述近二十多年来关于离体花芽和花器官发育研究的进展情况,以及在它们发育中不同化学及环境因子对花芽及花器官的影响作用,同时也指出这一领域存在的某些问题及其前景。

一、童期花芽及花序的离体培养

目前大约有三十多种植物的花芽和幼花序都已经得到了离体培养的尝试(表1),但是对不同的花系统来说,所利用的芽外植体的发育阶段和所使用的基本培养基却是不同的,所施加的植物生长调节剂也有区别。

在双子叶草本植物中,早在1942年就有人提出离体培养花芽的设想^[16],但是首次进行成功的花芽培养的报告却是由盖鲁等^[10]报道,培养了黄瓜雄性系、雌性系和两性系的花芽来研究在性器官分化过程中生长物质的作用。把带有发育良好的萼片、花瓣和雄蕊原基的花芽培养在改良的怀特基本培养基上,培养基中加有椰子乳,酪蛋白水解物和蔗糖以及3-吡啶乙酸或赤霉素。从生长情况来看,该种培养基能够促进上述三种类型花芽的生长。在其雄性芽中发现了IAA不仅促进了子房的发育,而且还抑制了雄蕊原基的进一步生长;GA3的

作用刚好与 IAA 相反, 但是必须是在与 IAA 联合施加的情况下, 否则单独使用 GA3 对性器官的生长没有作用, 同时也注意到, 在不存在 IAA 的条件下雄性花芽有发育成子房的趋势并且幼雄性花芽比老的表现出更大的这种趋势, 但是 GA3 或 IAA (单独使用及结合使用) 对潜在的雌性和两性花芽的形态发生起到了阻碍作用。在西葫芦中将其雌性花芽培养在固化的怀特培养基上, 它的发育受到阻碍, 在同样条件下所培养的雄花芽却生长良好, 并且其越小, 雄蕊生长越好。西葫芦无论是单独使用 IAA 或氯苯氧异丁酸* (p-chlorophenoxyisobutyric acid) 或其二者的组合使用均不能影响其芽的性别表达。然而在一年生山靛中对其雌性花序的研究表明 IAA 并不促进雄蕊的发育^[13], 由此可见, IAA 在某些种中促进了子房的发育, 而在其它品种中却促进了雄蕊的发育^[14]。

研究者们对红花楼斗菜花芽进行研究获得了许多有价值的资料。Tepfer等^[10]首先在含有怀特基本培养基的大量元素, 尼许基本培养基的微量元素, 椰子乳, 蔗糖, 维生素, 氨基酸并供给或不供给 IAA、激动素及 GA3 的培养基上培养了其处于不同发育阶段的芽。结果表明在没有任何生长调节剂的情况下, 其花器官的启动依赖于所培养芽的发育阶段。在萼片前期所培养的芽外植体并不生长, 在萼片原基期进行培养的芽仅仅产生花瓣和雄蕊原基, 而在雄蕊原基中期和后期进行培养的芽产生了心皮原基。但是, 这些芽外植体均未生长到沟状心皮原基期, 并且它们花器官的生长也同样受到了限制。在 GA3、IAA 和激动素存在条件下, 其器官启动的方式却是正常的并且它们的生长也得到了促进, 同时萼片的生长也处于正常态, 但是在生长的早期却需要把它们切除才能够使其它花器官的生长不受阻碍; 它们花瓣的发育良好, 花瓣上存在着特征化的短枝, 但是雄蕊的发育不佳, 缺少造孢组织, 在其心皮发育完成之前, 其雄蕊的发育就停止了。

Tepfer等^[15, 17]又进一步地研究了不同浓度的生长调节剂对花器官发育的效应, 浓度为 $2.0-5.0 \text{ mg l}^{-1}$ 的 GA3 可诱导几乎正常的花器官发育: 萼片发育良好, 花瓣为带短枝的杯形, 心皮为直立伸长的形状, 只是雄蕊的发育表现出了有限的生长。当 GA3 浓度为 10.0 mg l^{-1} 时, 萼片进行了过早的伸长生长, 花瓣和雄蕊发育不佳并且心皮的发育也不正常。在不含 GA3 或 GA3 浓度为 10.0 mg l^{-1} 的培养基中所启动的器官原基数要比在 GA3 浓度为 $2.0-5.0 \text{ mg l}^{-1}$ 的培养基中所启动的器官原基数少得多。他们所进行的不同浓度 IAA 实验的结果说明, 浓度 0.5 mg l^{-1} 的 IAA 最有利于花芽的生长。在不含 IAA 以及其浓度很高 (5.0 mg l^{-1}) 情况下, 培养早期阶段的芽并不能启动心皮原基, 但是培养较晚期的芽却在其心皮轮盘的中心处产生了大量的愈伤组织。浓度在 $0.05-0.5 \text{ mg l}^{-1}$ 范围内的激动素最有利于花芽的发育, 并且在整个花芽发育的过程中都是需要的。然而在不存在激动素的条件下, 就会在其外植体顶端区域形成小的、发育不佳的心皮。由此可见, 在椰子乳存在条件下红花楼斗菜花芽的发育需要各种生长调节剂浓度的合适及其比例的平衡。

Bilderback^[18]也在缺乏椰子乳条件下研究了生长调节剂对在 MS 培养基上所培养的红花楼斗菜花芽的效应。研究结果表明所有供试浓度的 IAA 和 GA3 对花器官的启动均无效应, 并且表明激动素对心皮原基的启动是必需的。在以上两项实验中, 关于生长调节剂需求方面的差异很可能与所用培养基中的椰子乳及红花楼斗菜不同的野生种群有关^[15]。但是,

* 一种抗生长素试剂

表1 高等植物离体花发育概况

种	科	外植体(花芽及花序)的发育阶段	培养基*	培养结果	文献
Dicotyledons					
双子叶植物					
<i>Cucumis sativus</i> 黄 瓜	葫芦科	以发育良好的萼片、花瓣、雄蕊原基和心皮为外植体	改良的 WM	产生了正常的雄蕊和子房的成熟花	5,19
<i>Cucumis melo</i> 甜 瓜	葫芦科	利用发育良好的萼片、花瓣、含有小孢子母细胞的雄蕊及心皮原基等外植体	改良的 WM+ IAA+ GA ₃	花粉正常分化,获得了发育较好的子房,但缺少胚珠	7,12 45
<i>Cucubita pepo</i> 西葫芦	葫芦科	含心皮原基的雌性花芽	改良的 WM	雄蕊原基进行了一些生长,但子房未进行发育	11 15 41
<i>Aguilegia formosa</i> 红花楼斗菜	毛茛科	a) 前萼片	WM	a) 外植体死亡	16
		b) 萼片原基	WM	b) 花瓣及雄蕊原基进行了启动,但其生长有限	17 14
		c) 中雄蕊原基	WM	c) 心皮原基进行了启动	42
		d) 晚雄蕊原基	WM+ IAA+ GA ₃ + KT	d) 形成了正常萼片和花瓣,但雄蕊败育,心皮缺少胚珠	
<i>Ranunculus sceleratus</i> 石龙芮	毛茛科	a) 萼片、花瓣和雄蕊原基	改良的 WM+ 2,4-D+ IAA+ KT	a) 心皮分化的胚珠但其它花器官未进行发育。	37
		b) 含小孢子母细胞的花药和含胚珠原基的心皮	同 上	b) 形成花粉,但抑制了子房的生长	38
		c) 含二细胞花粉粒的花药及含成熟胚囊的胚珠	同 上	c) 花器官仅进行了少量的生长	39
<i>Viscaria candida</i> 白石竹	石竹科	从萼片原基到心皮原基阶段	MS+ GA ₃ + IAA	萼片和花瓣正常生长且形成了花粉和胚珠	21 22
			¹ <i>V. cardinalis</i> 红石竹		
<i>Anagallis arvensis</i> 海 绿	报 春 花 科	萼片原基	Tepfer 等人用的培养基	形成了完全正常的花	15 16
<i>Browallia demissa</i> 矮 茄	茄 科	a) 花瓣原基和含小孢子母细胞的花药	NT+ IAA+ CTK+ GA ₃ + TLBA	a) 花瓣进行了有限的生长,小孢子母细胞不能后行减数分裂,胚珠不能启动	8 46
		b) 含小孢子的花药和含胚珠原基的雌蕊	同 上	b) 小孢子不能发育成花粉。	
		c) 含花粉的花药和含胚珠的子房	同 上	c) 花药败育,胚珠正常发育,但缺少胚囊	
<i>Nicotiana tabacum</i> 烟 草	茄 科	萼片原基和花序轴及小枝切段和其表层细胞	LS+ KT 和	形成含花粉和七核胚囊的成熟花	55 1
			MS+ BA+ NAA+ IBA	形成了不同时期的正常的花芽	23 10
			MS+ KT+ NAA	产生了成熟的正常的花	47
<i>Nicotiana affinis</i> 相似烟草	茄 科	花器官均进行了启动	MS+ KT+ NAA		

续表 1

种	科	外植体(花芽及花序) 的发育阶段	培养基 *	培 养 结 果	文 献
<i>Lycopersicon esculentum</i> 蕃 茄	茄 科	萼片原基	改良的 MS + BAP	产生了带有花粉和胚珠 (含发育的胚囊)的 成熟花	13
<i>Cleome iberidella</i> 花叶醉蝶花	白 花 菜 科	幼花芽	NT	发育成完整的正常花	24 25
<i>Begonia franconis</i> 海 棠	秋 海 棠 科	含三个芽的花序, 且第一个芽 含有花被原基, 第二、三个 芽未分化	改良的 Jong等的 培养基 + BA	花被、雄蕊和雌蕊原基 进行了启动和进一步 发育	24 25 27 40
<i>Lamium amplexicaule</i> 宝盖草	唇形科	含有所有的器官原基	MS + KT + GA ₃	生产了成熟花并且花粉 和胚珠进行了分化	15
<i>Salix acutifolia</i> 尖叶柳	杨柳科	含孢原组织的雄蕊	WM + IAA + KT	花粉粒进行了发育	26
<i>Populus balsamifera</i> 香青杨					
<i>Populus trichocarpa</i> 毛果杨	杨柳科	含苞叶和雌蕊原基的芽	改良的 MS + IAA	形成了发育良好的苞片 和雌蕊	20
Monocotyledons 单子叶植物					
<i>Cyperus rotundus</i> 莎 草	莎草科	含不可见的器官原基的芽	WM + CM	形成了含花粉和胚珠 (四核胚囊)的成熟花	43
<i>Haworthia varigata</i> 彩斑十二卷	百合科	含不可见的器官原基的芽	WM + IAA + KT + CM	产生了成熟的花并且含 有正常花被、雄蕊 (含花粉)和雌蕊群	36 15
H. baccata 肉质十二卷					
H. fasciata 扁化十二卷					
<i>Hyacinthus orientalis</i> 风信子	百合科	含有器官原基的花切段及成熟 的花瓣、萼片切段	改良的 MS + KT + IAA	产生了正常的雄蕊和雌 蕊, 并且绝大多数发育 为正常的花和果实	4
<i>Lemna gibba</i> 膨胀浮萍	浮萍科	雌蕊原基阶段(长度为 0.15mm)	Prison等 的培养基	产生了发育完全的花器 官	28, 29 44, 51
L. paucicostata 主脉浮萍					
<i>Zea mays var. sinica</i> 玉米	禾本科	未成熟的雄穗; 含有败育的 雄蕊和雌蕊群原基的小穗	改良的 MS + KT	产生了正常的小穗, 并 且花药含有双核的 花粉	48
<i>Z. mays var. ohio</i> 玉米	禾本科	含未分化的小穗原基的幼雄 穗	改良的 MS + KT	产生了含正常花器官的 小穗, 并且花药中产 生了有活力的花粉	30, 31 50, 52
<i>Z. mays</i> 玉米	禾本科	含未分化小穗原基的未成熟复 穗花序原基 (a) <15mm (b) >15mm	改良的 MS + KT	a) 含发育正常的雄蕊 的雄性小穗得以产 生 b) 产生了含发育良好雌蕊 群的雌性花	32 47 49 52

*WM: 怀特培养基; MS、MS培养基; NT, 厄许培养基; KT, 激动素; LS: LS培养基; CTK: 细胞分裂素。
TLBA: 三碘苯甲酸, 作用类似于 2, 4-D 的生长调节物质, BAP = BA; 6-氨基苄基嘌呤; IBA 吲哚丁酸,
CM: 椰乳。

Bilderback 的研究说明 GA₃ 对发育的启动后期是需要的。在含 GA₃ 条件下,花瓣呈杯形,心皮进行了良好的发育,但雌蕊的发育却是败育的。向含有 GA₃ 的培养基中添加激动素,使得雌蕊原基分化成了短的花丝及花药。在以后的实验中又进一步地证实了 GA₃ 对红花楼斗菜萼片的启动和发育是必要的,GA₃ 的效应是通过增加细胞分裂素来实现的。从以上的实验来看,在红花楼斗菜的花器官的启动,激动素是必需的,而对其花器官进一步发育,GA₃ 也是需要的。

研究者们也研究了甘氨酸及其它氨基酸对楼斗菜花芽发育的效应^[17,18]。实验结果表明在怀特培养基中,甘氨酸抑制早期和中期阶段的花芽生长,而在其它培养基^[18,15] 中发现甘氨酸对早期和中期阶段的花芽具有促进作用,但是抑制晚期阶段的芽生长;另外,γ-氨基丁酸及丙氨酸都是显著地促进花发育的全过程,尤其是心皮的启动和分化阶段^[18];在这两种氨基酸存在下,其花器官生长情况相似于在含有椰子乳培养基上的生长情况;然而,组氨酸却抑制雌蕊原基的形成。这说明培养基对于离体花发育的重要性,以及在不同的发育阶段的花芽需要有相应的营养供给才使其继续发育。

布莱克^[21,22]通过对石竹离体幼芽培养而进行的一系列研究表明:在含椰乳、酪蛋白水解物、肌醇、氨基酸、GA₃ 及 IAA 的 MS 培养基上培养带二个幼叶、萼片或花瓣原基的幼芽,结果其幼芽可发育到成熟态;但是较老的芽(0.3—2.0mm)甚至不携带叶子而含有所有的启动原基的情况下也可以发育为成熟的花。在激素作用方面,布莱克发现 GA₃ 对花萼、花冠、子房及胚珠的发育和花粉的产生均是必需的。而萘乙酸或 IAA 对花萼及花冠的伸长及花粉的产生几乎无效应,激动素显著地抑制花粉的生成。另外,研究者们也报道了 15℃ 条件下更比 25℃ 条件下有利于花萼的生长和花粉形成,在石竹与楼斗菜的情况一样,GA₃ 对它们花器官的离体发育都是需要的。

在石龙芮和矮茄中,研究者们对不同阶段花芽的发育潜能进行了系统的研究。在含有椰乳、酪蛋白水解物、酵母提取物、2,4-D、IAA 和激动素的怀特培养基上培养石龙芮的芽。发现含有萼片和雌蕊原基的芽表现出其萼片的某些增大,花瓣和雌蕊却未进行发育,但其心皮却发育成了胚珠。在含有小孢子母细胞(MMC)的花药和有胚珠原基的心皮的芽中,可以完成其小孢子发生,但其花药不能开裂并且其子房只进行了很小的生长;在含有两细胞花粉和成熟胚囊的芽中,其萼片、花瓣和雌蕊的生长也受到了限制,所以这些芽均未表现出正常的离体花发育。与上述结果相似的情况也在培养不同阶段的矮茄芽中报道过^[16],即在含有尼许培养基的无机盐、IAA、细胞分裂素、GA₃、精氨酸及半胱氨酸的液体培养基中,培养其不同时期的芽。结果表明带有发育良好的萼片、花瓣原基及小孢子母细胞花药的芽只表现出花萼和花冠的有限生长,并且其小孢子母细胞并不进行减数分裂;同时,其胚珠的启动,柱头及花柱的发育均受到抑制;含有小孢子及带有柱头、花柱和胚珠原基的雌蕊的芽可产生发育良好的花冠,但是却不能产生出花粉,而含有花粉粒及胚珠的芽表现出花萼和花冠的正常生长,但是其花药却是枯萎的,而且虽然其胚珠有了良好的发育,但却不含有胚囊。由此可以看出,离体培养的花芽发育潜能在不同的植物种中是存在着显著的差异的,并且该差异也与培养基中所添加的生长调节剂种类和浓度有关。

Hicks 和 Sussex 将含萼片原基的幼花芽首次培养成功,获得了成熟的花^[56]。他们所利用的植物为烟草,培养基为含 4% 蔗糖和 0.01—1.0ppm 激动素的 LS 液体培养基。当在

无激动素条件下, 其芽生长很慢, 但所有花器官原基却都正常的, 向顶端的顺序进行了启动。低浓度 (0.1ppm) 的激动素有着显著的促进效应, 并且它可以诱导正常成熟的花形成。由此这些研究者得出结论, 认为培养烟草属花芽的器官启动并不依赖于外源激素的供给, 但是其芽生长和发育的后期阶段却需要一定的激动素, 并且离体培养花的形态发生与该植物其余部分的特异调节是独立的^[65]。

细胞分裂素类物质对花发育的促进效应也在其它实验系统中得到说明。在醉喋花研究中, 玉米素和苜氨基嘌呤能比其它类的细胞分裂素更有效地促进雌蕊的发育^[24, 26]。在秋海棠花芽的研究中, 细胞分裂素对器官的启动有促进作用^[27, 29]。在含有苜氨基嘌呤的条件下其各种花器官才发生启动, 而在培养基中含有 IAA, ABA, 则不发生花器官的启动。由此可见, 花芽的性别并不是受任何生长调节剂所影响的^[13, 15]。

最近研究表明在所供试的细胞分裂素中, 诱导达到成熟阶段的芽数目, 以苜氨基嘌呤最有效, 而玉米素最无效^[14]。萘乙酸起到了抑制作用, 而 GA3 却起到了增强苜氨基嘌呤效应的作用。有趣的是, GA3 的效应是浓度依赖性的, 并且在不同花器官中也是有变化的。低浓度的 GA3 并不影响萼片和花瓣的生长并且较高浓度的 GA3 却对它们有促进作用; 与此相反, 低浓度的 GA3 却抑制了雄蕊和子房的生长, 而在高浓度的 GA3 情况下却对雌蕊和子房无影响, 并且更高浓度的 GA3 起到了促进作用。所以, 以上事实表明在蕃茄不同花器官的生长及成熟过程中, GA3 的关键水平的重要性。

研究者们进行不同的营养因素及 pH 值对离体花发育的作用的研究。培养于尼许培养基上的醉喋花芽其花瓣的生长与心皮生长相比较, 需要较高浓度的蔗糖^[25]; 同样, 玉米素对芽和雌蕊生长的促进效应, 低蔗糖浓度比高蔗糖更加显著。以硝酸盐方式供给的氮源对花芽和雌蕊的生长是必须的, 但是氨却不是必须的, 但硝酸盐和氨二者的结合供给对它们的生长最有利^[26, 27]。培养基中的 pH 也同样影响蕃茄花芽的发育^[14]。pH 5.8 对花芽成熟最有利, 但是低 pH 值 (3.8 和 4.5) 却显著地增强了萼片、花瓣和子房的生长; 而且蔗糖浓度 3% 时, 花成熟的程度最佳, 但花器官的生长在 4% 蔗糖浓度时才能得到增强。

综上所述, 在离体条件下, 不同种植物的花芽发育有不同的表现行为, 这与使用的培养基组成有部分关系, 但更多地与培养时芽外植体所处的发育阶段有关系^[1, 2, 10, 15]。在不同的植物生长调节剂中, 尤其细胞分裂素对芽生长和发育是必须的或有促进作用; 赤霉素起到了促进效应的作用; 生长素是抑制细胞分裂素所诱导的生长。至于营养方面许多迹象表明它们在培养基中的存在是必要的; 另外, 似乎可以认为培养基中的低 pH 值有利于生长而 5.8 左右的 pH 值却最有利于促进器官的分化和发育^[8, 20]。

在单子叶植物中, 关于花及花序离体培养方面的报告较少, 生长调节剂如细胞分裂素和赤霉素均都强烈地影响着花芽的生长。

将含有六个花原基和十个未成熟花芽的莎草未成熟穗状花序培养在怀特培养基上, 结果发现这些花序中的未成熟花败育了, 而且约有 40% 的穗状花序中, 其花药含退化的造孢组织, 子房产生了败育的胚珠, 仅有二到三个花原基发育为成熟的花。在细胞分裂素存在条件下, 却产生了大量的、含正常花粉发育和大孢子发生的正常花^[28]。在所试验的五种细胞分裂素中, 在促进花发育方面只有苜氨基嘌呤和激动素是最有效的。IAA 反作用于激动素的促进效应。虽然椰乳对小孢子发生有着促进作用, 但是单独或与苜氨基嘌呤组合来供给的

GA₃却不能促进离体小穗的生长。

在供给蔗糖、IAA、GA₃、激动素、维生素、核苷酸和酪胺水解物的培养基上^[20], Hügel^[28]培养了长日膨胀浮萍和短日主脉浮萍的花序原基。结果表明带有0.15mm长雌蕊的花序原基表现出了完全的花器官发育。但是年幼的花序原基并不表现任何的反应。在这两个植物种中,激动素有不同的效应:在主脉浮萍中,激动素促进了雄蕊的发育,但是在膨胀浮萍中它却促进了雌蕊的发育;GA₃也促进膨胀浮萍的雌蕊发育,而GA₃的这种促进效应却为ABA所抑制。单独使用ABA却只抑制了主脉浮萍的雌蕊发育,并且矮壮素和IAA却都促进了膨胀浮萍和主脉浮萍的雌蕊生长。由此可以得出结论:两个亲缘种的花芽对不同的植物生长调节剂可能有很大不同的反应。格瑞森及其同事在一系列的报告中,研究了离体条件下玉米穗和未成熟雄穗的生长需求,以及不同类细胞分裂素对培养的雄穗的效应^[18,17,27-31,43-53]。实验结果表明,在供给激动素的MS液体培养基中,可使所培养的小穗原基发育并完成花器官的正常附属结构;小穗中的雄蕊分化成了四室花药,小孢子发生也进行到了双核花粉期,其减数分裂进程和雄配子体发育都受到了相应的促进作用,并且所有试验的细胞分裂素中,唯有激动素和苄氨基嘌呤效应最强,玉米素最低;另外也证明了离体所产生的花粉是有活力的,可以萌发并具有受精能力的^[31]。即离体产生的种子可以萌发,其幼苗也可以发育成正常的、成熟的植株^[16]。

最近 Bommineni 和格瑞森在研究玉米穗原基的发育方式时发现所取用的原基外植体大小和培养基中激动素浓度的重要性^[31,43,50-52]。在基本培养基中,小于15mm的穗不能产生任何雄性花,但在激动素存在条件下这些原基绝大多数都可以产生雄性花,大于15mm的穗无论激动素浓度多大仅产生雌性花。

单子叶植物花培养的研究进展说明了外植体大小以及生长调节剂的存在,尤其是细胞分裂素的存在对离体花发育均是重要的^[12,43,49]。

二、花器官原基和成熟花器官的离体培养

把单个花器官原基在离体条件下培养可以为研究同类型器官的发育潜能和再生能力,以及不同器官在其发育途径中的稳定性和时程,甚致花器官间的相互依赖关系提供众多的方便条件。

Hicks 在供给激动素的液体培养基中培养烟草幼嫩的、处于减数分裂前期的雄蕊原基^[48]。低浓度(0.1 ppm)的激动素条件下,原基生长受到了限制,而高浓度(1.0 ppm)条件下却导致了不正常结构的形成:即雄蕊上常常产生出可辨认的心皮部分和雄蕊的过度生长。雄蕊上的这种生长一般是由于花药顶端及其远轴端和近轴端组织增生引起的^[16]。由此可见,分离的烟草雄蕊原基并不能产生正常的花器官结构。Hicks 等又进一步地培养了烟草单个或成对的心皮原基以便研究它们后续发育的可能性。成对培养的原基形成了分化良好并含传导组织、胎盘和胚珠的雌蕊,而单一培养的心皮原基仅形成了正常雌蕊一半大小的结构,其中含有心皮,但却是不正常的并且未形成其它类型的器官。由此,研究者们认为:心皮原基表现了某种程度的自主性,并且该自主性在其分离之时就已经决定了。

麦克赫根^[9,34]在SH液体培养基中培养切离的烟草花瓣原基研究其发育潜力,发现切离的花瓣原基开始膨大并发育成熟了,只是其长度稍比活体短。这说明花瓣具有自主发育

的能力。

麦克赫根^[33]又在无激素培养基上, 培养了黄花烟草和烟草的雌蕊原基研究发育的调节行为。他观察到黄花烟草雌蕊可以生长到正常雌蕊, 而烟草的雌蕊原基却不能发育为成熟的结构。另外当花瓣和雌蕊原基相互附着一起时, 雌蕊原基的生长受到剧烈的增强, 但是在萼片存在下却又受到了阻碍。以上研究表明同一植物的不同品种的花器官原基的调节行为存在着很大的差异, 而且不同器官均强烈地影响着其它器官的发育类型和方式^[12]。

贝特森培养切离的黑种草雌蕊, 探讨了胚珠形成过程中的营养需求和生长调节剂的作用^[9]。高浓度硝酸盐促进雌蕊生长和胚珠的形成, 而相应水平的氨却是有害毒作用的^[9], 并且当从培养基中去除氨, 则其胚珠数目增加, 但是以丙氨酸方式供给的低浓度有机氮却促进了胚珠形成和雌蕊生长, 这说明不同形式的氮源对花器官生长或者起促进作用或者是抑制作用的。

Hicks 和 Sand^[64]研究植物激素在雄性不育性表达中的作用, 培养了细胞质雄性不育烟草杂种的未分化雄蕊原基。他们所用的培养基是供给GA3 或 KT 或其二者组合的 LS 培养基。在所有处理组中均表达了该胞质雄性不育系的无花药、类似于柱头的典型的雄蕊表现型。但是 KT 却特异地促进了雄蕊上进行过度的雌性化生长和发育, 而 GA3 却几乎无效应。当把二种激素都供给时, 激动素的效应并不被 GA3 所反作用, 但是在所有的无激素处理组中, 其胞质雄性不育系的表现型均转化成为正常状态。因此, 该雄性不育系的雄蕊在离体条件下具有自主性发育能力而且在个体发育的早期, 它们的发育命运就明显地决定了。

通过对正常蕃茄和雄性不育突变体蕃茄雄蕊原基的培养, 研究者们发现在 BA 和 GA3 存在下, 其突变体雄蕊可以生长到接近正常大小的雄蕊, 但是却不能生长到正常雄蕊的成熟程度, 所培养的突变体雄蕊中, 也表现了某些原突变体的特征^[14]。但是在以上两个基因型的雄蕊中, 均未产生小孢子, 可见这种情况并不象利用完整芽所培养的情况^[13, 14]。因此, 研究者们认为花的其它器官可以为雄蕊中的小孢子发生提供刺激作用^[15]。

总的来看, 不同花的单一花器官原基培养研究说明: 分离的原基需要营养因子和生长物质, 以便进行其生长和发育; 它们花器官的发育途径在早期就已经决定了, 尽管在某些情况下, 分离的原基在发育上是完全自主性的, 但是在大部分情况下它们却部分地依赖于其它的花器官^[14, 15]。

三、花器官原基体外操作的研究

为了进一步研究一种类型的器官原基对另一种器官原基发育的依赖性, 以及不同花器官个体发育的时期, 研究者们对分离的花芽和单个花器官进行了多种的外科手术操作, 现分两个方面加以描述^[58]。

1. 花顶端的外科手术实验

Hicks 和 Sussex^[63]培养了不同发育时期所对切的烟草花顶端, 研究花芽中器官再生的方式。靠近切面端的区域, 其花器官得到了再生并且其再生方式同花芽启动的时期有关。在萼片原基期所对切的芽中, 其二瓣中至少有一瓣可以再生出花瓣和雄蕊原基, 而且所对切成的二瓣均能再生出心皮原基; 在花瓣原基期, 仅产生了雌蕊的再生, 而在心皮原基期, 却丧失了再生能力。这说明: 发育着的花经历着一系列的生理阶段, 它控制着花器官的顺序发生

和最终形成,同时也说明花器官启动的正常顺序是不容易被改变的并且在某一方向继续发育也是受到决定的^[54,55]。

根森在楼斗菜花芽的对切实验中研究了不同时期的芽被预先决定的原基数目^[56]。随芽龄的增加,所产生的器官原基数目成正比例地增加,但是老的芽不具有器官再生能力。在另一项超微结构的研究中,根森观察到在对切的芽中,靠近切面端的细胞中,其淀粉粒大小在开始二天内增加,并在后来的七天内又下降了^[56]。根森认为所对切的芽在开始1—2天内是处于静止状态的,并在此时间内从培养基中吸收蔗糖并且以淀粉形式储存起来。随着新器官再生的继续发生,其淀粉就被消化了并被正在生长的芽细胞利用了。

麦克赫根切离了处于不同发育时期的顶端区域的远侧端部分并且培养了其芽的剩余部分^[56]。进行该研究的目的是在于确定其顶端区域在花器官发生中的作用。如果其顶端区域是一个控制花器官启动的调节系统的一个整合部分,那么器官的启动就绝不会发生。麦克赫根利用去除单个器官的外科手术,也探讨了一种器官类型对另一种器官类型的调节影响^[55]。他发现萼片启动依赖于较低的植物体部分,而且花瓣的启动却依赖于萼片的存在,雄蕊的启动依赖于萼片和花瓣的存在,而且心皮的启动依赖于雄蕊原基。这些观察又进一步地支持了由 Heslop-Harrison 所提出的顺序花器官发生的模型^[1,2,10-12]。

2. 花器官原基的外科手术实验

到目前为止,研究者们已经对烟草花器官进行了所有的外科手术实验。就雄蕊而言,很早期对切的原基常常再生出两个雄蕊,每个都具有四室和花药瓣^[55]。然而,在较老的原基中,其再生能力受到了限制,并且每半个原基均发育为半个具二室的雄蕊。研究者们认为幼雄蕊原基的发育途径并不是固定的,只是在个体发育的较后期才成为固定的^[55,56]。由于在对切成瓣的雄蕊中,其器官类型并不受到影响,因此研究者得出结论:只是其再生潜能而不是其发育途径在较老的原基中已经丧失了^[53]。

研究者们在不同时期进行了烟草花瓣和萼片原基的对切实验^[53,54]。离体培养结果表明,在花瓣中除最老时期的外,每半瓣的远侧端部分均恒定地发育出一个新的花瓣原基,而在所对切成二半的萼片中仅从很年幼的原基中形成了一个萼片。这说明萼片和花瓣均保持有再生的能力,而且在花瓣中其再生能力可以有较长时期的保持性^[56]。

在器官原基的所有对切实验中,所对切的原基所再生的器官具有相同的形状和结构,并且它们同芽中剩余的花器官进行了同步的发育。对于对切成二瓣中的任一瓣的再生来说,并非其二瓣原基都是需要的,而且外科手术的创伤并不干扰它们的发育途径。因此,利用烟草等而进行的各种手术实验证明,在早期阶段,每一花器官类型是相对不稳定的,其发育途径在其个体发育的较后期才变为固定的。但是这些研究结果并未对在发育期间,在什么时候一种器官类型的决定发生提供直接的证据^[55]。

四、突变体和雄性不育系的花培养

目前,研究者们正在利用影响一种或多种花器官发育的突变体来进行花发育遗传调节的研究^[60]。利用这种离体培养技术,可以对正常花芽和突变体花芽的培养及激素需求进行系统的比较研究,同时对花器官发育的基因调控规律进行深入的探讨^[61]。

格瑞森和莱曼研究了黑种草‘单’和‘双’基因型的离体花形态建成^[60]。在 MS 培养基

上, 从萼片前期到心皮原基期培养该二种基因型花的顶端区域。他们观察到这二种基因型的器官启动需要有不同的激素供给, 其‘单’花芽启动和发育为花器官, 不需要在其培养基中添加任何生长调节剂, 但是‘双’花芽却需要有激动素的供给。另外, 培养基中的 GA3 可使‘双’花芽雄蕊和心皮启动, 但是却抑制了‘单’花芽雄蕊的启动。这些研究者们认为 GA3 的不同效应, 反映了两个品系中存在着不同的赤霉素代谢途径。

后来, 莱曼和格瑞森又对黑种草‘单’和‘双’花芽对 GA3、IAA 和激动素的敏感性进行了详细的研究^[81, 82], 其结果表明单独的 IAA 促进了‘单’花芽的花器官数目, 但却对‘双’花芽很少有效应; 向培养基中添加激动素, 增强了所有时期的‘单’和‘双’花芽的发育, 并且发育成的花芽相似于活体上所生长的花芽。然而 GA3 对‘单’花芽的抑制效从未应却不能通过激动素或 IAA 的供给而得到克服。若 IAA 和 GA3 一同供给, 其‘单’花芽产生出雄蕊和蜜腺的区域进行了启动并发育为少数类似于心皮的不正常结构^[81]。在激动素和 GA3 存在下, 其‘双’花芽并没有受到影响, 但是在‘单’花芽中其激动素的促进效应可以完全由 GA3 所逆转。这些研究结果认为黑种草花中的‘双倍性’与赤霉素代谢的改变相关联^[81]。

雄性不育系的花培养在自然条件下, 扁化十二卷和粗糙星裂叶的花可产生不育花粉, Majumdar 在供给 IAA、激动素和 CM 的怀特培养基上培养了上述两种植物的花序^[28], 培养的外植体仅有少数花芽生长到了成熟期, 并且在这样的离体条件下产生了某些有活力的花粉。然而作者却未对单一生长调节剂对雄蕊发育效应的影响做报道。

另外, Hicks 等在供给激动素和 GA3 的 LS 培养基上培养了烟草胞质雄性不育杂种的幼花分生组织^[57], 在此基本培养基中, 花芽保持着小的生长状态, 萼片、花瓣和雄蕊原基进行了启动, 但是其心皮原基却不能启动。然而在仅含有激动素的对照培养基上, 所有四种类型的花器官均以其正常顺序被启动了, 而且其雄性不育性的表现型也得到了表达。添加 GA3 抑制了其激动素所诱导的花器官形成, 而且在液体培养基中所启动的花器官数目存在着变异, 产生了许多畸形结构。由此研究者们趋向利用半固体或固体培养基, 这样较液体培养基更有利, 由于胞质雄性不育系需要激动素才能进行心皮原基的启动, 而其正常的花芽却不需要, 可认为其胞质雄性不育系花芽的表现行为不同于正常的花芽^[56]。

在正常和雄性不育蕃茄突变体的离体生长和发育中, 研究者们也观察到了与上述相似的对不同激素的需求^[57]。在供给 BAP 或 GA3 或其二者同时供给的改良 MS 培养基中, 培养处于萼片原基期的无雄蕊-2 (S1-2/S1-2) 突变体的花芽。在对照组中, 其芽保持着小的生长状态并且仅表现出花瓣和雄蕊原基的启动; 在仅有 BAP 存在下, 所有的原基却都进行了启动, 并且其花芽含有发育好的萼片和小的花瓣, 但是其雄蕊和雌蕊群却是不成熟的; 在含有 BAP 和 GA3 的培养基上, 其突变体芽发育为成熟的花, 并且许多雄蕊具有外胚珠, 这是突变体的一个特征, 尽管正常花芽和 S1-2/S1-2 突变体花芽的离体生长和发育均需要 BAP, 但是 GA3 却仅对突变体花芽发育是必需的^[14]。研究者们还进一步表明在正常蕃茄花中矮壮素和 ABA 均特异地影响雄蕊的发育^[15]。从上述可看出, 对蕃茄雄蕊的发育来说, 赤霉素是必要的, 而且也表明在 S1-2/S1-2 突变体中, 其赤霉素的生物合成或者其代谢受到了影响^[15, 48]。

五、结 束 语

从综述中,可看出所获得的正常发育的花只限于少数种植物,但是许多种植物的幼花芽和幼花序均可以在离体条件下培养并达到其成熟状态;虽然只在很少数的植物中报道过形成了胚珠中的胚囊,但是却在许多种情况下,成功地获得了正常发生的小孢子和花粉,为进一步深入研究花发育的机制提供了方便条件并打下了坚实的基础。

花发育是一个相当复杂的过程,并每个基因型的花对其生长和发育均有其特殊的要求。决定离体培养的花外植体的发育行为的重要因素归纳为以下二个:即离体培养时花的发育时期;培养基的组成及生长调节剂种类和浓度的相对平衡。不同花器官的启动与其生长和分化相比而言,花器官对营养和激素的需求是不同的。

经过近二十多年的研究与探索,已经在离体花发育及花形态发生的研究方面澄清了许多问题,纠正了许多片面的看法,取得了长足的进展。现将利用离体培养技术研究花发育及其形态发生所获得的某些普遍性结论归纳为以下几点:

1. 器官启动、小孢子发生和大孢子发生均起源于分生组织或者培养时存在的其它花器官组织所形成的分裂中心;
2. 生长调节剂,尤其是细胞分裂素以及在某些场合下,赤霉素和生长素均在花器官的启动、生长和发育中起重要作用。在不同种植物中,在相同种植物的不同基因型中以及在同一花的不同花器官之间,它们对生长调节剂的需求均存在着差异;
3. 切离的芽具有相对的自主性,即独立于该植物的其它部分而能进行一定的发育。但是所切离的花芽还是需要在活体情况下由根所供给的细胞分裂素来进行花器官的生长和发育;
4. 花芽和单个花器官的发育途径和方式在它们个体发育的早期就已被决定了;
5. 在绝大多数情况下,很少有逆转回到营养状态的趋势,因此,分离的花芽均表现出显著程度的发育稳定性。由此,可把发育成为花的花芽看作为已决定的或者不可逆地决定的;
6. 在许多种植物中,其花芽或花的单个器官大量地产生了愈伤组织而未产生有组织的发育结构。这种行为多半同培养基中生长物质的临界平衡及外植体的年龄有关;
7. 通过薄层细胞培养技术进一步证实了成花梯度的存在,并且还说明花芽可以直接从不同层次的外植体形成;
8. 植物性别分化过程中找到了几种特异蛋白的变化,并且似乎已表明乙烯与植物瓜类的性别分化关系密切,并被认为是瓜类性别表现的内源调节剂。

尽管有关离体花芽及花器官发育方面已经进行了许多方面的工作,但是对于花发育及花形态发生的机制了解得还是太少。

植物花的发育在其生活史中有着重要的意义,花发育的好坏优劣直接影响到为人类所需要植物部分的产量和质量,利用现代生物工程技术创造高产、稳产、多抗、品质优良的作物种类已成为全球性的攻关项目。这个目标能否达到,这与花发育问题关系密切。在我国目前关于花发育及其基因表达调控研究工作还很少的情况下,应尽力发挥各科研单位和大专院校的优势,通力合作,甚致广泛开展国际间的合作以学习先进的经验和技能,使我国的生物科学在不远的将来赶上并超过发达国家的水平。

参 考 文 献

- [1] 李文安, 1986: 中国科学(B), 10: 1059—1067.
- [2] 李文安等, 1989: 实验生物学报, 22(4): 385—394.
- [3] 孙华榆, 1990: 国外作物组织培养, 26: 108—111.
- [4] 陆文燧等, 1986: 中国科学(B), 5: 491—500.
- [5] 应振土, 李曙轩, 1989: 生物科学动态, 8: 6—10.
- [6] Shenck R., A. C. Hilderbrandt, 1972: Can. J. Bot., 50: 199—208.
- [7] Schrauwen J. A. M. et al., 1989: Sexual Reproduction in Higher plants, Springer-Verlag, 3—8.
- [8] Barendse G. W. M. et al., 1985: Biologia plantarum, 27: 408—506.
- [9] Peterson C. M., 1973: Amer. J. Bot., 60: 381—390.
- [10] Tran Thanh Van M. et al., 1974: Planta, 119: 148—159.
- [11] Tran Thanh Van M., 1980: Int. Rev. Cytology, 11A: 175—196.
- [12] Tran Thanh Van M., 1981: Ann. Rev. Plant physiol., 32: 291—312.
- [13] Rastogi R., V. K. Sawhney, 1986: Plant Sci., 47: 221—229.
- [14] Rastogi R., V. K. Sawhney, 1987: J. Plant physiol., 128: 285—293.
- [15] Rastogi R., V. K. Sawhney, 1989: Plant cell tiss. Org. Cult., 16: 145—172.
- [16] Tepfer S. S. et al., 1963: Amer. J. Bot., 50: 1035—1046.
- [17] Tepfer S. S. et al., 1966: Amer. J. Bot., 53: 148—154.
- [18] Bilderback D. E., 1972: Amer. J. Bot., 59: 525—535.
- [19] Galun E. et al., 1962: Nature, 194: 596—602.
- [20] Bawa K. S., R. F. Stettler, 1972: Can. J. Bot., 50: 1627—1634.
- [21] Blake J., 1966: Nature (London), 211: 990—997.
- [22] Blake J., 1969: J. Exp. Bot., 20: 113—121.
- [23] Majumdar S. K., 1970: Planta, 90: 212—221.
- [24] Jong A. W. de J. Bruinsma, 1974: Z. pflanzenphysiol., 73: 142—151.
- [25] Jong A. W. et al., 1974: Z. pflanzenphysiol., 72: 227—231.
- [26] Bernier G. et al., 1981: The physiology of flowering, CRC press, Florida: 1—79.
- [27] Berghoef J., J. Bruinsma, 1979: Z. pflanzenphysiol., 93: 345—352.
- [28] Hügel B., 1976: Z. Pflanzenphysiol., 80: 283—294.
- [29] Pirson A. F., Seidel, 1950: Planta, 38: 431—439.
- [30] Polowick P. L., R. I. Greyson, 1985: Can. J. Bot., 63: 2196—2205.
- [31] Pareddy D. R., R. I. Greyson, 1985: Plant cell tiss. Org. Cult., 5: 119—128.
- [32] Bommineni V. R., R. I. Greyson, 1987: Amer. J. Bot., 74: 883—989.
- [33] McHughen A., 1982: J. Exp. Bot., 33: 162—181.
- [34] McHughen A., 1977: Ann. Bot., 41: 1073—1081.
- [35] McHughen A., 1980: Bot. Gaz., 141: 389—397.
- [36] Sharma H. C. et al., 1984: Plant cell tiss. Org. Cult., 3: 247—254.
- [37] Konar R. N., A. Konar, 1966: Phytomorphology, 16: 379—386.
- [38] Konar R. N., K. Nataraja, 1964: Phytomorphology, 14: 558—567.
- [39] Konar R. N., K. Nataraja, 1969: Acta Bot. Neerl., 18: 680—687.
- [40] Berghoef J., J. Bruinsma, 1979: Z. pflanzenphysiol., 93: 371—377.
- [41] Rodrigues P. A. S., 1968: Planta, 80: 349—358.
- [42] Karpoff A. J., 1974: Amer. J. Bot., 61: 778—789.
- [43] Mohan Ram H. Y., M. Batra, 1970: phytomorphology, 20: 22—29.
- [44] Hügel B., 1976: Z. pflanzenphysiol., 80: 298—307.
- [45] Porath D., E. Galun, 1967: Ann. Bot., 31: 283—291.
- [46] Ganapathy P. S., 1969: Biologia plantarum, 11: 165—172.
- [47] Deaton M. H. et al., 1984: Hortscience, 19: 509—518.
- [48] Greyson R. I., 1991: Flowering newsletter, 11: 14—16.
- [49] Bommineni V. R., 1990: Plant cell tiss. Org. Cult., 23: 59—66.

- [50] Bommineni, V.R. et al., 1990 : *Maydica*, 35 : 195—201.
- [51] Bommineni, V. R., R. I. Greyson, 1990 : *Plant Sci.*, 68 : 239—247.
- [52] Bommineni V. R., R. I. Greyson, 1990 : *Sex. plant reprod.*, 3 : 109—115.
- [53] Hicks G. S., J. Bell, 1975 : *Can. J. Bot.*, 53 : 231—239.
- [54] Hicks G. S., S. A. Sand, 1977 : *Plant Sci. Lett.*, 10 : 257—264.
- [55] Hicks G. S., I. M. Sussex, 1970 : *Can. J. Bot.*, 48 : 133—141.
- [56] Hicks G. S., 1982 : *Ann. Bot.*, 50 : 291—299.
- [57] Hicks G. S. et al., 1981 : *Can. J. Bot.*, 59 : 1665—1671.
- [58] Jensen L. C. W., 1971 : *Can. J. Bot.*, 49 : 487—494.
- [59] Jensen L. C. W., 1972 : *Can. J. Bot.*, 50 : 1611—1617.
- [60] Greyson R. I., K. Raman, 1975 : *Amer. J. Bot.*, 62 : 531—536.
- [61] Raman K., R. I. Greyson, 1974 : *Can. J. Bot.*, 52 : 1988—1996.
- [62] Raman K., R. I. Greyson, 1978 : *Amer. J. Bot.*, 65 : 180—189.