

中/国/资/源/生/物/研/究/系/列

五加科植物 体细胞胚发生研究

由香玲 曲冠证/著

Progress on Somatic Embryogenesis of
Araliaceae Plants



科学出版社

中国资源生物研究系列

五加科植物体细胞胚发生研究

**Progress on Somatic Embryogenesis
of Araliaceae Plants**

由香玲 曲冠证 著

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书以编著者近 10 年的研究成果为基础,以国内外其他相关的研究报道为参考,论述了有关五加科植物体细胞胚发生的研究动态。全书共分两篇:植物体细胞胚发生及五加科植物简介和五加科植物体细胞胚发生。五加科植物主要包括人参、三七、刺五加、槲木等具有重要经济价值的药用植物,本书主要从影响体细胞胚发生的因素、体细胞胚的扩大繁殖或体细胞胚发生的机理探讨三个方面,论述和介绍了上述五加科植物的体细胞胚发生研究。在本书中,影响体细胞胚发生的内因主要是指外植体本身细胞活力状况,即外植体材料的幼嫩程度;外因主要是指培养基种类、植物生长调节剂的种类和浓度、外植体预处理(如质壁分离预处理、高温处理等)、培养过程中的温光条件等。

本书可作为从事植物细胞学、植物发育学、植物组织培养学等方面研究的研究人员的参考书,同时也适合综合性大学、师范院校和农林院校相关专业的师生参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

五加科植物体细胞胚发生研究=Progress on Somatic Embryogenesis of Araliaceae Plants/由香玲,曲冠证著. —北京:科学出版社,2011

(中国资源生物研究系列)

ISBN 978-7-03-031902-9

I. ①五… II. ①由…②曲… III. ①五加科-体细胞-细胞生长-研究 IV. ①Q949.763.2
②Q942.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 144434 号

责任编辑:张会格 刘 晶/责任校对:朱光兰

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码 100717

<http://www.sciencep.com>

骏杰印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011 年 7 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2011 年 7 月第一次印刷 印张: 8 1/2 插页: 2

印数: 1—1 000 字数: 161 000

定价: 48.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

高等植物的体细胞胚发生是植物无性再生途径之一，也是研究植物有性生殖过程和植物细胞的结构、生理生化、遗传等的良好材料，至今已有大量的植物实现了体细胞胚发生方式的植株再生途径。然而，令许多初涉体细胞胚发生领域的学生及研究者常常感到困惑的是：体细胞胚发生的概念和相关知识都明白，但是当面对一种具体的植物时，体细胞胚发生到底将是一个什么状态？研究过程中，应该怎样去观察发现体细胞胚发生？用什么样的语言和图片去描绘和说明该过程？针对以上问题，我们认为有必要通过多个具体事例，详细介绍体细胞胚的发生过程，供读者参考使用。

五加科植物中包含了大量具有重要经济价值的药用植物，如人参、三七、刺五加等。该科多数植物成熟果实中的合子胚发育不成熟而促使种子的萌发需要长时间的层积处理，致使有性繁殖存在一定的局限性，因而利用体细胞胚发生途径实现植株再生具有重要的意义。在研究者们的共同努力下，到目前为止，大多数的五加科植物已成功获得了体细胞胚诱导方法，并发表了大量相关论文。我们对五加科植物体细胞胚发生的研究也进行了近 10 年。在此过程中，我们观察到许多五加科植物体细胞胚发生的有趣现象，积累了关于五加科植物体细胞胚发生的丰富知识。我们选取了五加科植物体细胞胚发生具有代表性的几种植物，其中包含木本和草本植物，而且这几种植物的体细胞胚发生途径分别具有明显的独特性。本书试图通过具体的事例、各种体细胞胚发生的图片的展示和完整详细的专业性描述，努力使初学者了解体细胞胚发生的过程、实验设计方法和论文写作技巧。

本书出版过程中非常感谢研究生安艳、锡林呼、邢晓宇、姜玲玲对部分文献的整理和翻译，也非常感谢研究生代金玲、谭啸、赵晓妮参与稿件的校对工作。同时感谢国家林业局“948”引进项目（2009-4-26）、国家林业局林业公益性行业科研专项课题（2010040073）和东北林业大学中央高校基金（DL10EA01-03）的支持。

由于本书涉及的知识广泛，加之编著者的水平有限，疏漏之处在所难免，衷心期待同行们和读者们的批评指正。

著 者

2011 年 5 月

目 录

前言

第一篇 植物体细胞胚发生及五加科植物简介

第 1 章 植物体细胞胚发生简介	3
1.1 植物体细胞胚发生研究概况	3
1.2 植物体细胞胚发生的意义	4
1.3 植物体细胞胚发生的机制研究	5
1.3.1 影响体细胞胚发生的内部因素	5
1.3.2 体细胞胚发生的胁迫响应机制研究	6
1.4 问题与展望	12
主要参考文献	12
第 2 章 五加科植物及其组织培养简介	16
2.1 五加科植物生物学介绍	16
2.2 五加科植物的医药和经济价值	17
2.3 五加科植物的细胞组织培养生产次生产物的研究进展	17
2.3.1 五加科植物细胞培养	17
2.3.2 五加科植物毛状根培养	18
2.3.3 五加科植物细胞和毛状根生物反应器大规模培养和产业化生产	19
2.3.4 五加科植物花药和花粉培养	20
2.3.5 五加科植物原生质体培养及体细胞杂交	21
主要参考文献	22

第二篇 五加科植物体细胞胚发生

第 3 章 人参属植物体细胞胚发生研究	27
3.1 人参体细胞胚发生研究	27
3.1.1 人参体细胞胚发生诱导及其植株再生研究	28
3.1.2 人参体细胞胚发生的机制研究	38
3.1.3 小结	48
3.2 三七体细胞胚发生研究	49
3.2.1 三七简介	49

3.2.2 三七体细胞胚发生的研究·····	50
主要参考文献·····	56
第4章 五加属植物体细胞胚发生研究 ·····	59
4.1 刺五加简介·····	59
4.2 刺五加体细胞胚发生研究现状·····	60
4.2.1 刺五加体细胞胚发生、植株再生及生物反应器大量繁殖·····	60
4.2.2 外界因素对刺五加体胚发生的影响·····	76
4.2.3 刺五加体细胞胚胎发生过程中生理变化研究·····	87
4.2.4 体细胞胚发生的机制研究·····	89
4.3 本章小结·····	98
主要参考文献·····	98
第5章 槲木属植物体细胞胚发生 ·····	101
5.1 龙芽槲木简介·····	102
5.2 龙芽槲木体细胞胚发生及植株再生研究·····	102
5.2.1 龙芽槲木体细胞胚发生的外植体材料·····	102
5.2.2 龙芽槲木次生体细胞胚发生及植株再生研究·····	107
5.2.3 龙芽槲木间接体细胞胚发生及其发生过程中三萜皂苷和总黄酮累积 分析·····	114
主要参考文献·····	125
附录 ·····	128
图版	

第一篇 植物体细胞胚发生 及五加科植物简介

第 1 章 植物体细胞胚发生简介

植物体细胞胚是指在离体培养的条件下，诱导植物细胞的全能性表达，进行类似合子胚发育过程形成的胚状结构（崔凯荣和戴若兰，2000；Reinert, 1959a）。植物的体细胞胚发生必然要经历以下两个阶段。一是体细胞胚感受态的获得。已分化了的体细胞获得胚胎感受态，增殖为胚性细胞团。除极个别植物活体有自发产生体细胞胚的能力外，绝大多数自然状态的体细胞都不是胚性的，必须经过一个胚胎感受态的诱导过程（Yarbrough, 1932）。二是体细胞胚的表达。胚性细胞展示它们的胚性感受态，分化成体细胞胚，完成类似于合子胚发育的各个时期的胚胎形态建成，如双子叶植物的体细胞胚胎能够从球形、心形、鱼雷形发育到成熟的子叶形（Jiménez, 2001）。一些植物的胚性感受态需要一个重新分化为胚性愈伤组织的中间过程，之后再进行体细胞胚胎形态建成，这样形成的体细胞胚称为间接体细胞胚。而有的植物组织不需要中间过程，可经细胞诱导，获得感受态，直接建成体细胞胚，这样形成的胚，称为直接体细胞胚（Williams and Maheshwaran, 1986）。

1.1 植物体细胞胚发生研究概况

早在 1902 年，德国著名植物学家 Haberland 就已提出植物细胞全能性学说（cell totipotency）。他认为，高等植物的组织、器官可以不断分割，直到单个细胞。如果每个细胞都具有植物个体一样的性质和能力，那么可以通过植物细胞培养使单个细胞发育成为一个新个体。Steward 等（1958）和 Reinert（1959b）几乎同时在液体培养的胡萝卜悬浮细胞系和固体培养的胡萝卜愈伤组织中获得了体细胞胚，首次完整实现了植物细胞的全能性。这一重大突破为植物离体培养再生植株开辟了一条崭新的途径。之后，许多学者致力于该方面的研究，但进展缓慢，至 1975 年，仅有 13 种双子叶植物、2 种单子叶植物和 8 种伞形科植物诱导成功。与此同时，不定芽诱导成功的植物已达数百种，体细胞胚的诱导远远落后于茎、芽的诱导。甚至许多人认为，除伞形科外，其他植物难以诱导体细胞胚。随着新材料、新技术日新月异地发展，到 1980 年前后，关于体细胞胚的研究也得到了迅速发展。人们在大量植物的组织培养、单细胞悬浮培养、原生质体培养和花粉培养中都观察到体细胞胚或花粉胚的发生（周俊彦，1981）。通过体细胞胚发生途径形成再生植株在高等植物中已经证明是普遍现象，裸子植物、双子叶

植物、单子叶植物中重要科的代表均已见报道。至 1981 年,已在 43 科 97 属 114 种植物中有了体细胞胚发生的报道(周俊彦,1981)。随后,对体细胞胚发生机理的研究不断深入,主要包括细胞学研究、生理生化研究及分子生物学研究等,研究的植物种类也不断扩大,到 20 世纪 90 年代已超过 300 种,并仍在不断增加(郑艳虹和熊庆娥,2003; Kyo, 1982)。近几年来,由于分子生物学技术的迅猛发展及其在体细胞胚研究中的应用,使体细胞胚的研究进入一个崭新的阶段。

1.2 植物体细胞胚发生的意义

植物体细胞胚发生具有多重重要的意义,主要表现在以下几个方面。

(1) 植物体细胞胚发生提供了一种更加有效、遗传相对稳定的植物快速扩繁的途径。植物通过体细胞胚繁殖,克服了器官发育途径中生根培养的环节。而且,通过体细胞胚形成的再生植株的变异性小于器官发生途径形成的再生植株。器官发生途径再生植株需要分别在不同的条件下诱导芽和根,然后再将两部分连成一个整体,因而培养时间长,继代次数多,这就增加了细胞变异的频率。而体细胞胚则不同,可以由单个细胞或小的细胞团直接分化成小植株,大大降低了细胞变异的频率,因此,体细胞胚是制作人工种子的一种首选材料。

(2) 植物体细胞胚发生为研究植物胚胎发育提供了理想模型。植物胚胎发育是一个非常复杂的过程,因为早期胚胎非常小,被母体细胞包围而难以接近,且植物体内各种组织和细胞之间存在相互作用及影响。体细胞胚发生模式在很大程度上克服了上面提到的局限性,且体细胞胚发生重演了合子胚发生的整个过程。因此,利用已有的稳定高效的植物体细胞胚发生体系,深入了解体细胞胚发生的分子机理,了解一些关键因子和关键基因如何影响与调控植物体细胞胚的发生及发育,不仅可解决体细胞胚分化过程中的“瓶颈”,对其发生和发育进行人为调控,也对揭示植物体细胞胚发生这一特定细胞分化过程的本质具有极其重大的意义。

(3) 体细胞胚发生是花药培养和胚乳培养获得再生植株的重要或者必要途径,为植物育种提供了新手段。

(4) 体细胞胚发生有利于转基因植株的生产和推广。单细胞起源的体细胞胚发生一般不会出现嵌合体,而且胚性细胞密度高、质量好、遗传稳定、具有很强的接受外源 DNA 的能力,是理想的基因转化感受态细胞。而且胚性细胞繁殖量大,转化后的胚性细胞即可发育成转基因的体细胞胚及完整植株,因此是转化率和再生率都很高的受体系统,为基因工程、细胞工程等生物技术改良品种提供了良好的实验体系(Mnadal and Datta, 2005)。例如,有学者在水稻中建立了较为完善的农杆菌-胚性愈伤组织转化体系,并获得了转基因植株。张克忠等(1997)以葡萄的花药和花丝为外植体诱导胚性愈伤组织,并以此胚性愈伤组织

作为受体进行农杆菌介导,将苏云金杆菌内毒素蛋白基因转入葡萄胚性愈伤组织细胞,再经过体细胞胚发生获得了再生转基因植株。胚性细胞转化体系扩展了遗传转化体系。

(5) 体细胞胚在种质资源保存中起着举足轻重的作用。体细胞胚是低温保存的良好材料,在适宜条件下可产生再生植株。近年来,植物材料的超低温保存技术得到迅速的发展和完善。例如,胡萝卜、烟草、柑橘、松树等植物的体细胞胚保存均获得成功,并已获得再生植株。大量研究证明,体细胞胚经超低温保存后,仍能在适宜的条件下迅速大量繁殖,再生出新的植株,并保持原来的遗传特性。体细胞胚的超低温保存既可以节约大量的人力、物力和土地,克服长期继代培养导致的再生能力丧失,保持细胞的遗传稳定性,也便于国际间种质资源的交流。因此,体细胞胚超低温保存是长期保存种质资源的理想方法,甚至被认为是实现生物种质永久保存的唯一途径。

(6) 体细胞胚发生过程中众多体细胞无性系变异为突变体的筛选提供了新的来源。基于目前作物种质资源日趋贫乏,体细胞无性系变异无疑是一个重要的遗传变异来源。体细胞无性系变异的机理主要有染色体数目和结构变异、转座因子激活、基因扩增、基因突变、细胞质基因突变及DNA甲基化谱改变等。

1.3 植物体细胞胚发生的机制研究

植物体细胞胚发生是一个复杂的多因素事件,受到多种内、外因素的影响与调节。内因主要包括物种、基因型和外植体类型等;外因主要指各种胁迫因子,如培养基种类、温度、光照等。合适的外植体在适当的外界胁迫因素的作用下诱导体细胞胚发生,而该过程归根结底又是体细胞在各种内外因素的作用下,启动了某些特异体细胞胚发生相关基因表达的表现。因此,该部分主要从体细胞发生的胁迫响应机制和分子生物学基础两方面的研究,展示对体细胞胚发生机制的研究结果,同时分析研究过程中存在的一些问题。

1.3.1 影响体细胞胚发生的内部因素

植物种类和基因型是影响体细胞胚发生的主要内因,对体细胞胚发生有很大影响。不同物种或同一物种的不同基因型之间体细胞胚发生条件和诱导的难易程度都有所不同。Antony 和 Ignacimuthu (2008) 对龙爪粟的 8 个基因型进行体细胞胚发生,发现不同的基因型的体细胞胚发生能力差异明显,相同条件下 GPU 45 基因型的体细胞胚发生率可达 98.6%,而 CO 7 型的发生率仅为 55.3%。在棉花的研究中发现,基因型不同的棉花,体细胞胚诱导率差异显著;在具有胚胎

发生能力的材料中,各品种的发生能力又不同,有的易形成体细胞胚,有的难形成体细胞胚(谢德意等,2007)。对于某些通过杂交获得的植物,如果两个亲本体细胞胚的诱导率都理想,那么它们的杂种后代的诱导率也相应较高,这种现象已在大豆、水稻和玉米花药培养中有过报道。基因型对体细胞胚的诱导和影响是内在的和多效的,不是某一遗传因素就可以决定的,主要原因可能有两个方面:一是不同基因型体细胞胚发生频率不同;二是不同基因型的最适刺激条件不同,从而导致了不同的体细胞胚发生频率(Antony and Ignacimuthu, 2008)。

外植体的类型是影响愈伤组织诱导的另一重要因素。产生体细胞胚的离体培养物是多种多样的,离体的根、茎、叶、下胚轴、花芽、花药、幼苗、子叶、子房中的合子胚、各种单细胞、游离的小孢子、原生质体及体细胞胚本身都有直接或间接产生体细胞胚的能力。一般而言,分生细胞和薄壁细胞较易诱导出愈伤组织。外植体取于植株的各类器官、组织或细胞等,生长在相同条件下的不同类型的外植体,如叶片、叶柄、胚轴、茎尖和花药等在离体培养时对各种培养基或培养条件的反应也会有所不同。在实践中,全能性表达的难易程度在不同器官之间有着很大的差异。由根、下胚轴及茎形成的愈伤组织分化根的频率高;由叶或子叶形成的愈伤组织分化成叶的频率高;由茎端形成的愈伤组织分化成芽和叶的频率高。

外植体类型及生理状态均会对体细胞胚发生产生影响,选择合适的外植体是诱导体细胞胚发生成功的关键因素之一。草莓的花药、花芽、叶片、叶柄、子叶、下胚轴作为外植体时都能诱导出体细胞胚,但诱导率却存在着显著的差异,其中花芽(61.74%)>叶(49.24%)>花药(8.11%)(郑艳虹和熊庆娥,2003)。生理状态,如未熟胚、胚的幼轴(双子叶植物)、子叶(双子叶植物)等生理代谢旺盛而分化程度较低的组织有利于诱导出体细胞胚并形成植株。而发芽中的成熟胚、花器、分生组织、胚乳、营养器官的分化组织比较不容易诱导出体细胞胚,成功率较低,但因外植体来源广泛、方便,故其实际应用的意义更大。但近年来,已经有越来越多关于从成熟胚、叶片等成功地诱导出体细胞胚的报道。大量实验证明,外植体的发育程度也会直接影响体细胞胚的发生,一般生理代谢旺盛而分化程度较低的组织有利于体细胞胚的诱导。

1.3.2 体细胞胚发生的胁迫响应机制研究

诱导体细胞胚发生像诱导植物器官发生一样,到目前为止,还没有统一的诱导各种植物体细胞胚发生的模式(Fehér et al., 2003)。但整体来说,植物生长调节物,特别是生长素和2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸),被认为是最重要的诱导体细胞胚发生的因子(Namasivayam, 2007; Rose, 2004),也是到目前为止

最被广泛研究的胁迫因子。其他如培养基的营养元素之类的化学因子、光因素和固液体培养基等的物理因子都在诱导植物的体细胞胚发生中起着重要的作用。

近年来,另一些胁迫因子,如高温、高浓度盐、重金属离子、渗透胁迫等对植物体细胞胚发生的诱导作用,尤其是对细胞胚性感受态的获得,正越来越引起人们的关注(Fehér et al., 2003; Jiménez, 2001; Lee et al., 2001; Dudits et al., 1995)。对胁迫与体细胞胚发生之间关系的阐述已有很多:Fehér等(2003)认为胁迫是激发细胞胚性感受态的一种动力开关,胁迫既能促进细胞的再分化,又能诱导体细胞胚的形成;Dudits等(1995)认为体细胞胚的发生是离体培养的植物细胞产生的一种过度压力响应和细胞对离体培养过程的一种适应。本节主要从胁迫诱导体细胞胚的生理响应方面,就胁迫方式方法和外植体的生理响应机制的研究状况作一概述。

1. 各种胁迫因子对体细胞胚发生的诱导作用

1) 高浓度 2, 4-D 胁迫因子

大量资料显示(Fehér et al., 2003; Jiménez, 2001; Dudits et al., 1995), 2, 4-D 是用来诱导植物体细胞胚发生最有效、最常用的生长素,大约有 65% 的诱导体细胞胚发生的方案中,单独或与其他植物生长调节剂配合使用了 2, 4-D (Dudits et al., 1995)。有学者认为(Karami and Saidi, 2010),在该过程中, 2, 4-D 作为一种植物生长剂,直接调节细胞内吲哚乙酸(IAA)的代谢,更是一种强除草剂,胁迫诱导了细胞的胚性潜能。2, 4-D 在诱导胡萝卜(*Daucus carota*)体细胞胚发生时,体细胞胚发生需要的 IAA 浓度是其内源自由 IAA 浓度的 103 倍(Ribnicky, 1996)。而且在体细胞胚诱导过程中, 2, 4-D 经常导致活性氧暴发及其相关胁迫基因被诱导(Pfeiffer and Hoftberger, 2011; Davletova et al., 2001)。例如,在 2, 4-D 诱导大豆(*Glycine max*)和马铃薯(*Solanum tuberosum*)子叶的体细胞胚发生过程中,体细胞胚发生与活性氧上调和许多防御基因密切相关(Sharma et al., 2008; Thibaud-Nissen et al., 2003)。因此,高浓度 2, 4-D 在体细胞胚诱导过程中是一种胁迫剂。

2) 重金属胁迫因子

重金属胁迫因子对体细胞胚发生的诱导作用主要在胡萝卜(Kamada et al., 1993; Kiyosue et al., 1990; Kamada et al., 1989; Kiyosue et al., 1989)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)(Ikeda-Iwai et al., 2003)这两种植物的体细胞胚诱导中有较详细的研究。拟南芥体细胞胚诱导过程中,首先将萌发 5 天的顶芽在含有 0.6 mmol/L 镉的培养基中培养 6~24 h 后,转入含有 2, 4-D 的培养基中培

养,产生体细胞胚和愈伤组织。在胡萝卜中,将萌发一周的无菌苗的顶芽在含有 CoCl_2 、 NiCl_2 、 CuCl_2 、 ZnCl_2 、 CdCl_2 (0.25~1.00 mmol/L) 的 MS 培养基中培养一段时间(1~3周)后,转入无激素、无重金属离子的培养基中诱导形成了大量的直接体细胞胚,这些重金属离子作用效果的顺序为 $\text{CdCl}_2 > \text{NiCl}_2 > \text{CoCl}_2 > \text{CuCl}_2 > \text{ZnCl}_2$ 。该研究者认为,镉和镍不是植物生长的基本元素,而铜和锌是基本元素,钴虽然不知道在植物细胞中起什么作用,但是在动物细胞中是合成维生素 B_{12} 的一种成分。因此认为重金属离子诱导体细胞胚与营养方面的因素不相关(Kiyosue et al., 1990)。

3) 渗透胁迫因子

渗透胁迫诱导体细胞胚发生的事例较多,常用的胁迫剂主要有蔗糖、甘露醇、聚乙二醇(PEG)、NaCl等。将胡萝卜萌发一周的无菌苗顶芽、子叶、下胚轴先在含有 0.3~0.7 mol/L 蔗糖的无任何植物激素的 MS 培养基中培养 3 周后,转入含有低浓度蔗糖(0.09 mol/L)的条件下培养 3~6 周后,即可产生直接体细胞胚(Kamada et al., 1993)。黄瓜(*Cucumis sativus* Linn.)子叶经 0.25 mol/L 或 0.35 mol/L 蔗糖处理后全部产生了直接体细胞胚(Lou and Kako, 1995; You et al., 2006)。用 1.0 mol/L 的甘露醇和蔗糖处理刺五加(*Eleutherococcus senticosus*)合子胚后,也在无植物激素的培养条件下诱导产生了体细胞胚(You et al., 2006)。在海枣(*Phoenix dactylifera* L.)中,母树的侧枝顶芽经 60 g/L 的蔗糖和 5%PEG-8000 分别处理及组合处理均诱导产生了直接体细胞胚(Alkhateeb, 2006)。胡萝卜顶芽在 0.2~0.4 mol/L 的 NaCl 处理后,也诱导产生了体细胞胚(Dudits et al., 1995)。蔗糖参与植物的代谢过程,作为植物材料碳源的提供者和维持细胞渗透势的渗透剂。在体细胞胚诱导过程中,普遍认为高浓度蔗糖主要的作用是渗透作用;而 PEG 不参与植物的代谢过程,其主要的作用就是胁迫;此外,NaCl 也能使植物产生胁迫作用。

4) 高温胁迫因子

外植体经一定的高温处理也能诱导产生体细胞胚。将胡萝卜顶芽在无植物激素的培养基上 37℃ 培养 3 周后,转入 25℃ 无外源激素的培养基上培养,产生体细胞胚(Kamada et al., 1989)。处于双核发育期的花粉颗粒先经过 0~7 天 30℃ 高温预培养后,处理 3 天的花粉颗粒进行细胞分裂的数量最高,达 48%,远高于未处理(0 天)的花粉颗粒(1%),从而成功获得了大量的花粉体细胞胚(Kyo and Harada, 1985)。油菜(*Brassica campestris* L.) 3~5 mm 花芽内的小孢子,经 32℃ 暗培养 72h 后诱导形成前期体细胞胚(Pechan, 1989)。

另外,除了上述各种胁迫处理诱导体细胞胚发生外,其他无意识的各种胁迫

也会对体细胞胚的发生产生影响,如外植体材料从母体上分离、无菌处理,切成大小合适的片段,放入人为的培养基中等操作过程中所产生的切割、渗透等胁迫因子。但这些胁迫因子到底对体细胞胚的产生有怎样的作用,到目前为止还未有详细的研究报告。

2. 胁迫诱导体细胞胚发生的生理响应机制

1) ABA 响应机制

重金属、高温、渗透等胁迫能使外植体材料在没有植物激素的条件下诱导产生体细胞胚,研究者们首先想到了脱落酸(ABA)胁迫的响应机制。植物在受到胁迫时,作为植物很重要的响应因子,ABA会快速大量合成,以调节植物的各种生理水平,降低胁迫的危害(Nolan and Rose, 1998)。研究者利用 10^{-4} mol/L的ABA而不是2,4-D处理胡萝卜顶芽40天后,诱导产生了大量的体细胞胚(Nishiwaki et al., 2000)。在苜蓿(*Medicago truncatula*)的体细胞胚发生过程中ABA也起了类似作用。NAA和BA是苜蓿诱导愈伤组织及体细胞胚发生所必需的两种植物激素,而在这两种激素不变的情况下,添加1 μ mol/L的ABA时,增加了每个愈伤组织的体细胞胚数量(Nolan and Rose, 1998)。而且,在胡萝卜的胚性细胞团中ABA的含量比鱼雷期体细胞胚的2.5倍还多,是非胚性愈伤组织团的67.5倍(Kiyosue et al., 1992)。这些事实表明,胁迫产生的ABA与体细胞胚发生有很密切的相关性。

研究认为,在体细胞胚发生过程中,由于胁迫作用产生的ABA启动了一些与体细胞胚发生相关的调控基因,从而使细胞的全能性得以表达。经高浓度糖、NaCl及2,4-D胁迫处理的胡萝卜茎尖诱导体细胞胚发生,与单独使用ABA诱导体细胞胚发生过程相比,发现这两个过程都诱导了体细胞胚发生特别基因C-ABI3和胚性细胞蛋白ECP的表达(Karami and Saidi, 2010; Kikuchi et al., 2006)。同时也发现,在胁迫诱导体细胞胚发生过程中,尤其是体细胞胚感受态的获得,不仅是由于ABA的产生,也是由于胁迫因素直接引起的生理反应所致(Kikuchi et al., 2006)。

2) 生理防卫反应机制

在诱导体细胞胚发生过程中,外植体细胞对各种胁迫的一项重要生理反应就是防卫反应,如胼胝质迅速合成、几丁质酶活性增强和某些热激蛋白大量合成等。

A. 胼胝质沉积

胼胝质的主要成分是 β -1,3-葡聚糖,在高等植物整个正常生长发育的许多

特定部位(细胞板、花粉、花粉管、根毛、筛板、胞间连丝、大小孢子母细胞组织的细胞壁),以及植物受到各种生物和非生物因子胁迫时,都有胼胝质快速而大量合成(Verma and Hong, 2001)。在诱导体细胞胚的过程中,这些胁迫因素能使植物迅速产生大量的胼胝质。这样产生的胼胝质是否与体细胞胚产生相关呢?在刺五加的体细胞胚诱导过程中揭示了其中的相关性。利用 1.0 mol/L 甘露醇或蔗糖溶液处理刺五加合子胚达到细胞质壁分离后,在无激素的培养基中诱导出大量整齐一致的直接体细胞胚。而在处理过程中,由于质壁分离产生了大量的胼胝质。通过组织切片观察到表皮细胞大多各自独立地表现细胞全能性,完成了体细胞胚的发生过程,这表明胁迫处理产生的胼胝质与体细胞胚发生相关。

植物体细胞胚发生过程中也发现了大量的胼胝质沉积,有时伴随着各种预先胁迫处理。Dubois 等(1991, 1990)在诱导菊苣(*Cichorium intybus*)体细胞胚胎感受态时,先将叶片放入甘油(330 mmol/L)和蔗糖(60 mmol/L)的溶液中,35℃黑暗条件下悬浮4天后,放入加有外源激素的培养基中即可诱导产生体细胞胚。外植体在培养到第6天时,一些表皮细胞和下表皮细胞细胞质浓度增大,同时,这些细胞的内壁周围出现了胼胝质,并且一直持续到大约150μm直径的原胚细胞团才消失。研究者认为胼胝质的形成是胚性细胞感受态的标志。该体细胞胚诱导过程中的胁迫因子包含渗透+高温+无光等。在山茶(*Camellia japonica* L.)诱导体细胞胚时,12周龄的叶片首先在1.0 g/L 吲哚丁酸(IBA)中浸泡20 min,然后在MS基本培养基中诱导培养3~10天时,发现有胼胝质与角质的沉积产生。进一步观察发现,胼胝质只在胚性开始的时候存在,而角质在整个体细胞胚发育过程中都存在(Pedroso and Pais, 1995)。类似的胼胝质沉积也在椰子(*Cocos nucifera* L.)体细胞胚诱导中发现,并且,研究者通过超微结构的观察,认为细胞壁的加厚是由于胼胝质的沉积引起的(Verdeil et al., 2001)。在刺五加的胚性愈伤组织中通过激光共聚焦显微镜能观察到大量胼胝质沉淀,而在非胚性愈伤组织中则观察不到(You et al., 2006)。在这些体细胞胚诱导过程中产生的胼胝质,研究者普遍认为起到了信息阻断、生理隔离的作用,类似于小孢子母细胞形成时的胼胝质壁的作用,可以阻断与周围细胞间的信息交流(郝建华和强胜, 2006)。

在菊苣体细胞胚发生诱导过程中,检测并确认了一种胞外38 kDa β -1, 3-葡聚糖酶。研究发现,在胚性感受态获得期,该酶活性是稳定的,而表达期的活性显著增加,推测该胞外酶有可能是一种调控菊苣体细胞从胚性感受态向建成态转变的信使分子(Buchner et al., 2002; Helleboid et al., 2000)。

由此可见,胁迫诱导体细胞胚过程中植物的一项重要生理防卫反应——胼胝质沉积与体细胞胚产生有很大的相关性。

B. 几丁质酶的作用

几丁质大量存在于昆虫和甲壳类动物的甲壳及大多数真菌细胞壁中,是自然界中生成量仅次于纤维素的一类天然聚合物。几丁质酶是一类以 β -1, 4-N-乙酰基葡萄糖-D-氨基葡萄糖蛋白为底物的水解酶。到目前为止,还未找到植物内源的几丁质酶底物,而重金属、渗透压、低温、干旱、病原菌侵染等胁迫能诱导该酶快速累积,从而使植物抗逆性增强(欧阳石文等, 2002)。

许多实验显示了几丁质酶能调节体细胞胚发育过程。例如,在胡萝卜温度敏感型细胞变异系 ts11 中加入一种来自野生型胡萝卜细胞系的 32 kDa 酸性几丁质酶后,该变异系 ts11 能在非适宜温度下越过球形胚继续发育,如果不加入这种几丁质酶,细胞系 ts11 在非适宜温度下则无法越过球形胚时期(Baldan et al., 1997; De Jong et al., 1992)。这种 32 kDa 酸性几丁质酶在鸭茅(*Dactylis glomerata*)体细胞胚发育的全过程中都被检测到(Tchorbadjiva and Pantchev, 2006; Tchorbadjieva et al., 2004)。欧洲云杉(*Picea abies*)中的 CHIA4-Pa 几丁质酶促进了前体细胞胚组织向体细胞胚的过渡(Wiweger et al., 2003)。然而,几丁质酶是否对体细胞的胚性获得起作用,从而诱导产生体细胞胚还未有相关报道。

C. 相关热激蛋白

植物热激蛋白(heat shock protein, HSP)是指在高于植物正常生长温度和其他多种非生物胁迫(盐、干旱、氧、伤害、冷激等)诱导下合成的应激蛋白。与其他有机体和脊椎动物的热激蛋白家族成员一样,具有C端的大约100个氨基酸残基组成的区域,称为热激蛋白域(李妹芳等, 2008)。植物热激蛋白对植物逆境防御起重要作用。

越来越多的试验数据也显示了热激蛋白在细胞增殖和分化中的重要功能。在植物体细胞胚发生过程中,发现了一些相关的热激蛋白。例如,Kitamiya等将胡萝卜子叶经高浓度(450 μ mol/L) 2, 4-D 胁迫处理 2 h 后,接种在无 2, 4-D 的培养基中 2 周后诱导产生了体细胞胚,他们从 2, 4-D 处理的子叶中分离鉴定了与体细胞胚发生关系密切的热激蛋白(Dchsp-1 和 Dcarg-1)(Kitamiya et al., 2000)。Györgyey 等(1991)发现苜蓿细胞团中两类编码小热激蛋白的基因(Mshsp 18-1 和 Mshsp 18-2),能被高温(32~47℃)、CdCl₂ 和高渗透(0.6 mol/L 蔗糖处理)胁迫大量诱导,而该小细胞团在正常悬浮培养条件下体细胞胚发生的早期,能监测到大量的 hsp18 mRNA 表达。同样,在诱导银白云杉(*Picea glauca*)体细胞胚发生过程中特异表达的 3 个编码热激蛋白的基因(PgEM 22、PgEM 27 和 PgEM 29),外植体经高温(37~43℃)、ABA 和高渗透(5%PEG-4000)胁迫处理后也大量表达(Dong and Dunstan, 1996)。这些热激蛋白在体细胞胚发生过程中的特异表达,显示其在离体培养的植物细胞分化过程中的特殊