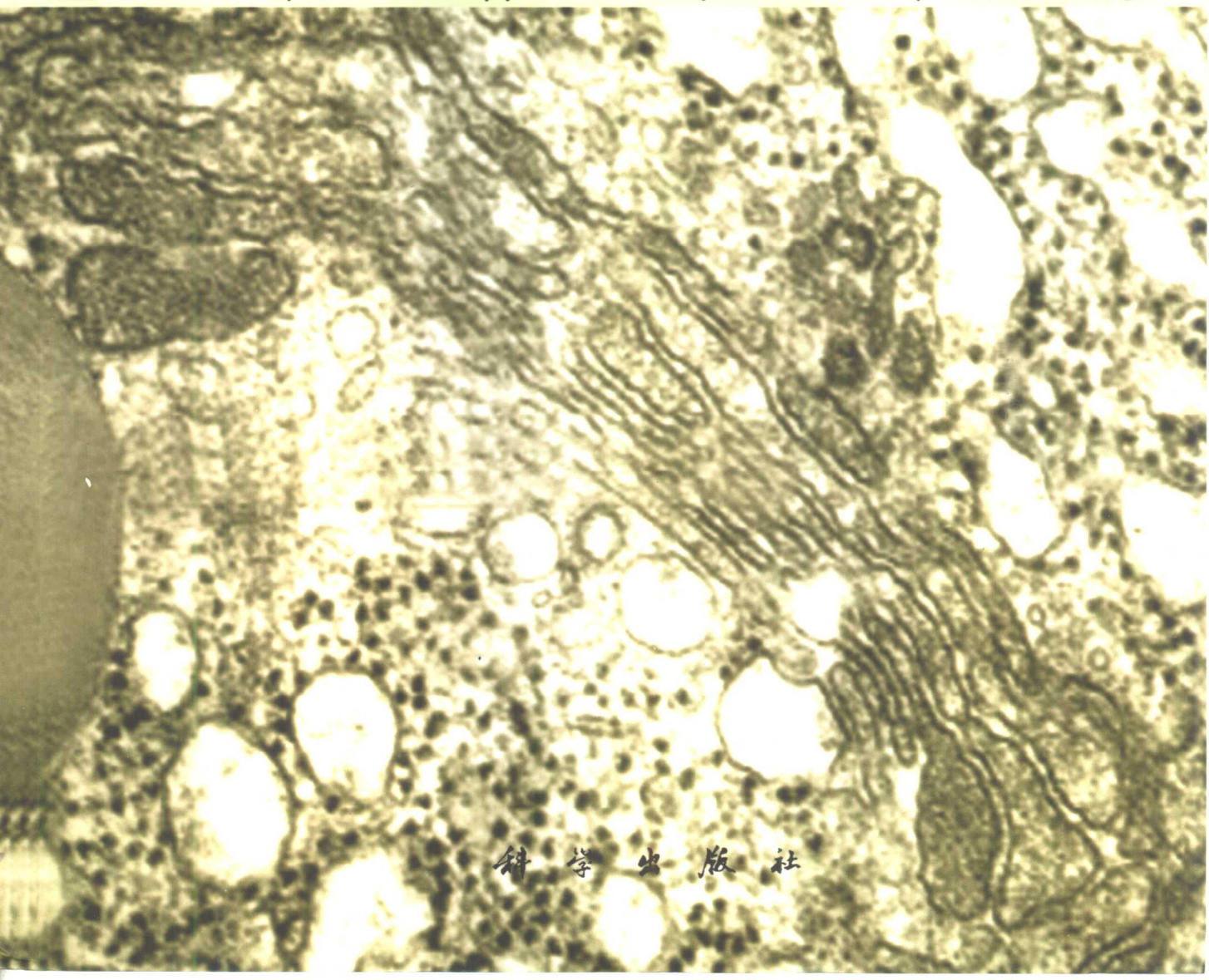


植物体细胞胚发生的分子生物学

崔凯荣 戴若兰 主编

生 ■ 命 ■ 科 ■ 学 ■ 专 ■ 论



科学出版社

内 容 简 介

本书以编著者近 10 年的研究成果为主线,结合国内外有关的研究报道,论述了植物体细胞胚发生的有关细胞学和分子生物学的研究动态。

全书共 12 章,主要内容为:植物细胞培养中的形态发生,体细胞胚发生的细胞学基础,体细胞胚发生的生化基础,植物激素、多胺、多糖、金属离子和活性氧等与体细胞胚发生,体细胞胚发生中基因的差别表达与调控,细胞信号传导与体细胞胚发生,研究体细胞胚发生的计算机技术应用,植物的合子胚发生与体细胞胚发生的比较,体细胞胚发生与作物育种等。

本书是从事植物细胞学、植物胚胎学、植物发育生物学、植物细胞组织培养和生物技术研究人员的一本有益的参考书,也适合综合大学、师范院校和农林院校有关专业的师生教学参考。

图书在版编目(CIP)数据

植物体细胞胚发生的分子生物学/崔凯荣,戴若兰主编.-北京:科学出版社,2000.12

ISBN 7-03-008608-2

I. 植... II. ①崔...②戴... III. 植物学-胚胎学-分子生物学
IV. Q944.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 63406 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号
邮政编码:100717

北京双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2000 年 12 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2000 年 12 月第一次印刷 印张: 14 1/4

印数: 1—2 800 字数: 319 000

定价: 29.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换<环伟>)

前 言

发育生物学一直是生命科学中的一个重要课题。高等动植物的构造无论多么复杂,其发育过程的基本环节仍可归结为细胞的生长和分化。随着分子生物学的迅速发展,发育生物学也进入了分子生物学时代,并已取得了长足的进展。而植物体细胞在一定条件下可分化为胚性细胞,并通过体细胞胚胎发育形成一个完整的植株,这个过程的本质是发育生物学研究的重点问题之一。同样,这一分化与发育的全过程是受一系列基因在时空顺序上表达调控的结果。尽管植物发育生物学的研究比动物起步晚,发展也较慢,但由于植物发育有许多特殊性,如植物的一生受环境因素影响极大,终生能从顶端分生组织分化出各种器官和组织,特别是植物细胞具有全能性,即在离体培养条件下,体细胞可通过器官发生途径或体细胞胚胎发生途径形成再生植株。由于植物体细胞胚发生的研究对植物细胞的生长和分化机制,胚胎发生和基因表达调节与遗传控制等重大理论问题的研究具有重大意义,以及在作物育种中具有重要作用,因而一直受到同行的极大关注。有关研究报告日益增多,研究内容也十分广泛,取得的进展引人注目。

近几年,兰州大学干旱农业生态研究室在国家自然科学基金连续两次面上项目的资助下,较为系统地对多种植物体细胞胚发生的组织胚胎学、细胞学、生理生化基础和基因的差别表达以及表达产物的追踪等进行了研究,并取得了一些重要成果,发表研究论文30余篇。为了便于与国内外同行交流和切磋,促进该项研究的深入,提高研究水平,本书以我们自己的研究成果为主线,结合国内外近10余年来的研究报告进行综述。主要内容是从植物细胞培养中的形态发生开始,在细胞水平和分子水平上探讨体细胞胚发生的程序和分子机制,以及合子胚与体细胞胚发生的比较,并专门介绍了研究植物体细胞胚发生中计算机技术的应用。最后讨论了体细胞胚发生在作物育种、人工种子制作、突变体筛选和转基因中的应用。由于植物种类繁多,在各种植物细胞离体培养中体细胞胚发生的情况又不尽相同,体细胞胚发生的频率差异更加显著,许多问题尚待进一步研究,加之编者水平所限,疏漏和错误之处在所难免,衷心地期待同行们和读者们的指正。

编著者

2000年3月于兰州

编著者(按姓氏笔画排序):

- 王亚馥 教授 兰州大学(第一、二、三、四、五、六、十章)
邢更生 博士 兰州大学(第七、八、九、十二章)
陈 雄 讲师 兰州大学(第一、二、四、五章)
崔凯荣 博士 中科院兰州寒旱环境工程研究所(第三、七、八、九、十一章)
戴若兰 高工 兰州大学(第六、十、十二章)

目 录

前言

第一章 植物细胞培养中的形态发生	1
第一节 植物组织培养与形态发生	1
一、植物细胞培养技术的发展与应用	1
二、形态发生	3
第二节 器官发生	4
一、脱分化	4
二、分化	6
第三节 体细胞胚胎发生	8
一、体细胞胚胎发生的特点与意义	8
二、体细胞胚胎发生的普遍性与发生途径	9
参考文献	11
第二章 体细胞胚发生的细胞学基础	13
第一节 体细胞胚发生的细胞胚胎学过程	13
一、单子叶植物	13
二、双子叶植物	15
第二节 体细胞胚发生的超微结构变化	17
一、胚性细胞的超微结构变化	17
二、体细胞胚的超微结构变化	19
第三节 体细胞胚的起源与遗传稳定性	20
一、单细胞还是多细胞起源	20
二、极性与生理隔离	22
三、遗传稳定性与变异性	25
参考文献	29
第三章 体细胞胚发生的生化基础	31
第一节 体细胞胚发生中酶代谢动态	31
一、三磷酸腺苷酶	31
二、过氧化物酶(peroxidase)和其他酶类	33
第二节 体细胞胚发生中蛋白质代谢动态	36
一、蛋白质含量的变化	36
二、蛋白质组分的变化	38
第三节 体细胞胚发生中核酸代谢动态	42
一、RNA 代谢动态	42
二、DNA 代谢动态	43

参考文献	45
第四章 植物激素与体细胞胚发生	48
第一节 植物激素的种类与作用	48
一、植物激素的种类	48
二、各类植物激素之间的相互作用	49
第二节 生长素和细胞分裂素与体细胞胚发生	49
一、生长素与细胞分裂素对体细胞胚发生的调节作用	49
二、生长素与细胞分裂素对体细胞胚发生的调节作用机制	53
第三节 体细胞胚发生中内源激素的变化	57
一、内源生长素和细胞分裂素的代谢动态	57
二、内源 ABA 含量的变化	59
参考文献	62
第五章 多胺与植物生长发育和体细胞胚发生	65
第一节 多胺类化合物在植物中的分布与生物合成	65
一、高等植物中多胺的分布与活性	65
二、多胺的生物合成	66
第二节 多胺类化合物与植物生长和发育	67
一、多胺对植物生长的促进作用	67
二、光敏素调节与多胺的关系	68
三、多胺与延迟衰老	69
第三节 多胺代谢与环境胁迫和植物激素	69
一、多胺代谢与植物对逆境胁迫的反应	69
二、多胺与植物激素	70
第四节 多胺和乙烯与体细胞胚发生	70
一、多胺与植物体细胞胚发生	70
二、乙烯与植物体细胞胚发生	72
三、体胚发育过程中乙烯、多胺生物合成的相互作用	73
第五节 多胺作用的分子机制	74
一、PA 对生物大分子核酸和蛋白质合成的调节作用	74
二、PA 可提高 DNA 的稳定性	75
参考文献	76
第六章 糖类、金属离子和微量元素与体细胞胚发生	79
第一节 糖类代谢与体细胞胚发生	79
一、糖的种类与作用	79
二、形态发生中糖类代谢的动态	80
三、体细胞胚发生中淀粉消长动态	82
第二节 金属离子和稀土元素与体细胞胚发生	84
一、金属离子在诱导体细胞胚发生中的作用	84
二、植物体细胞胚发生中金属离子的动态分布	85

三、稀土元素对体细胞胚发生频率的影响	86
第三节 微量元素与体细胞胚发生	88
一、体细胞胚发生中几种元素含量的变化	88
二、微量元素对体细胞胚发生的影响	89
参考文献	90
第七章 活性氧与植物体细胞胚发生	92
第一节 生物体内活性氧的产生与作用	92
一、活性氧的产生	92
二、活性氧的毒性和对细胞的损伤	94
第二节 体细胞胚发生中抗氧化系统代谢动态	96
一、体细胞胚发生中抗氧化酶系统活力变化	96
二、抗氧化剂与植物体细胞胚发生	97
第三节 活性氧与细胞分裂和分化	99
第四节 程序性细胞死亡与体细胞胚发生	101
一、程序性细胞死亡的可能机制	101
二、植物中程序性细胞死亡的调控	102
参考文献	105
第八章 体细胞胚发生中基因表达与调控	107
第一节 体细胞胚发生中特定遗传信息的表达	107
一、RNA 的合成	107
二、胚性蛋白质的形成	108
第二节 体细胞胚发生中基因差别表达常用鉴定方法	109
一、蛋白质的双向电泳	109
二、mRNA 差别显示技术	109
三、mRNA 的体外翻译	112
四、Northern 和 Western 分子杂交	112
五、ELISA 检测技术	114
第三节 体细胞胚发生中基因表达的调控	115
一、顺式作用元件与反式作用因子	115
二、体细胞胚发生中基因表达的激素调节	118
三、蛋白质磷酸化与基因表达	120
四、体细胞胚发生中 DNA 的甲基化对基因表达的调控作用	120
五、体细胞胚发生中基因表达的蛋白质和其他因子的调节	121
参考文献	123
第九章 细胞信号传导与体细胞胚发生	126
第一节 细胞的信号系统	126
一、细胞信号系统的分类	126
二、植物细胞信号传导	127
第二节 细胞内信号	129

一、Ca ²⁺ 信使	129
二、双信使	131
三、蛋白质的可逆磷酸化	132
第三节 体细胞胚发生中 Ca ²⁺ 信号系统与激素的信号传导	132
一、Ca ²⁺ 信号系统	132
二、激素的信号传导	133
第四节 体细胞胚发生与信号传导	135
一、细胞分化与信号传导	136
二、细胞增殖与信号传导	137
三、Nod 因子与植物体细胞胚发生	139
参考文献	140
第十章 植物的合子胚发生与体细胞胚发生的比较	142
第一节 胚胎发生程序与生理状态	142
一、胚胎发生程序	142
二、生理状态	143
第二节 控制胚胎发生的基因	146
一、控制极性和不均等分裂的特异性基因	146
二、控制胚胎发育的调控基因	149
第三节 胚的成熟和萌发的分子基础	152
一、合子胚发育和成熟过程的分子基础	152
二、体细胞胚发育和成熟过程的分子基础	154
参考文献	154
第十一章 植物体细胞胚发生与作物育种	158
第一节 体细胞胚发生与原生质体培养	158
一、原生质体培养的程序与意义	158
二、胚性细胞系建立与原生质体培养	161
第二节 体细胞胚形成与人工种子研制	161
一、体细胞胚与人工种子	161
二、人工种子的研制	162
第三节 体细胞胚发生与遗传转化和种质保存	166
一、胚性细胞是遗传转化的良好受体	166
二、胚性细胞系与优良种质保存	167
第四节 胚性细胞系建立与突变体筛选	168
一、体细胞无性系变异	168
二、胚性细胞系建立与突变体筛选	170
参考文献	171
第十二章 计算机技术在研究植物体细胞胚发生中的应用	174
第一节 数字图像处理概述	174
一、图像及其数字处理	174

二、图像的压缩	178
三、图像处理	182
四、图像分析	186
五、彩色和多光谱图像处理	186
第二节 体细胞胚发生中大分子的量化研究	189
一、图像的计算机处理和计量	189
二、大分子的立体计量	189
三、测量误差计算	190
四、DNA、蛋白质和淀粉等大分子量化结果	191
五、植物体细胞胚发生的图像分析	193
第三节 生物组织切片图像的计算机三维重建与体细胞胚发生	196
一、生物组织切片图像的计算机三维重建	196
二、三维重建技术在研究植物体细胞胚发生中应用	200
参考文献	202
索引	205

第一章 植物细胞培养中的形态发生

第一节 植物组织培养与形态发生

一、植物细胞培养技术的发展与应用

植物组织或细胞培养,广义而言是在人工控制下,把植物的一个器官,一种组织或单个细胞从植物体分离后置于适宜的营养和环境条件下,使之继续生长、分化并发育成完整的再生植株的培养技术。早在 20 世纪初,德国著名植物学家 Haberlandt 根据细胞学说的理论就曾预言,植物细胞具有全能性(totipotency)。也就是说每个体细胞像胚胎细胞一样,可以经过体外培养成为一个完整的植株,这是因为植物的每个细胞都含有该个体的全部遗传信息,都具有一套完整的基因组,因而在适宜的条件下可以被诱导生长分化形成完整植株的潜力。Haberlandt 用多种植物叶肉细胞,基髓薄壁组织细胞和表皮细胞等进行离体培养以证实他的设想,但由于当时科学的发展和技术的限制都未获得细胞分裂。直到 30 年代,由于在植物中也发现了激动素(kinetin),这时 White 用番茄根组织离体培养获得成功,建立了第一个无性繁殖系,也称“克隆”(clone)。接着又用烟草茎形成层组织培养也获得成功。Gautheret 和 Nobecourt 用胡萝卜根组织离体培养,经过脱分化(dedifferentiation)产生了大量的愈伤组织(callus),并再分化(redifferentiation)形成了完整植株。40 年代末,Shoog 和中国学者崔徵用烟草茎节段和髓组织离体培养,在培养基中加入适当比例的腺嘌呤(adenine, Ade)和生长素(auxin)可以控制植物组织生长根或芽。从而确立了腺嘌呤/生长素的比例是控制芽和根形成的主要条件之一,这一比例高时产生芽,低时形成根。50 年代中,Miller 等发现激动素促进芽产生的效果比腺嘌呤高出近万倍,于是激动素取代了腺嘌呤,因而建立了激动素/生长素比例控制器官分化的激素模式。现有多种促进细胞分裂的激动素类似物,如 6-苄氨基嘌呤(6-benzyl aminopurine)等,现将这些类似物统称为细胞分裂素(cytokinin)。

在这之前一直认为,细胞离体培养都是通过分别诱导芽和根等器官发生而形成再生植株的。但是到 50 年代末,Steward 等^[1]和 Reinert^[2]几乎同时在胡萝卜根组织单细胞悬浮培养(single cell suspension culture)中发现某些体细胞在形态上转变为与合子胚(zygotic embryo)相似的结构,其发育过程也与合子胚类似,但由于它是从体细胞分化而来,因而称之为体细胞胚(somatic embryo)或胚状态(embryoid),并由此形成了再生植株,直到开花结实(图 1-1)。

这一重大突破不仅进一步证实了植物细胞的全能性,而且为细胞离体培养中研究形态发生机制开拓了一个新的领域。60 年代,一些学者从曼陀罗、烟草、水稻等花粉培养(pollen culture)获得单倍体植株(haploid plant),由此证明性细胞亦具有全能性(图 1-2)。70 年代,Takebe 等又从烟草原生质体(protoplast)培养再生植株。接着 Carlson 等用 NaNO₃ 作融合剂,使粉兰烟草和郎氏烟草叶肉细胞原生质体融合(protoplast fusion),获得了第一个由两个烟草种间体细胞杂交的杂种植株,从而为细胞工程的研究奠定了基础。

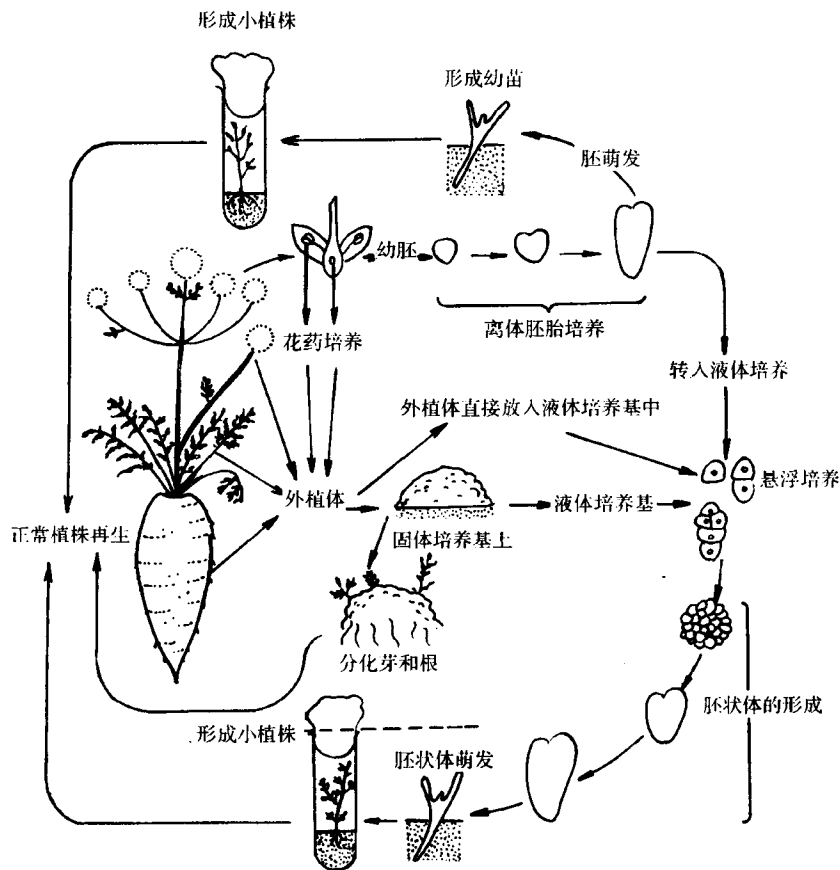


图 1-1 胡萝卜不同部分在不同激素条件下的离体培养

近 20 余年,植物组织和细胞培养技术得到迅速发展,大量植物无论是二倍体细胞或单倍体性细胞以及原生质体离体培养均可获得再生植株。同时由于该技术与分子生物学技术和 DNA 重组技术等结合,使研究内容也发生了根本性变化,并由此应运而生了一门独立的、崭新的遗传学分支学科——植物体细胞遗传学(plant somatic cell genetics)。它是以高等植物体细胞为实验材料,采用细胞培养(cell culture)、细胞融合(cell fusion)和遗传物质在细胞间转移等技术研究真核细胞的基因结构与功能、基因表达与调控、细胞分化与发育机制等。简而言之,植物体细胞遗传学是研究离体培养植物细胞遗传和变异规律的学科。

植物组织和细胞培养技术不仅是植物体细胞遗传学的基础,而且对理论研究和植物基因工程以及农作物品种改良等都具有重大意义。众所周知,植物体内的各种组织或细胞之间是相互作用、相互影响、相互制约的,因此用整体植株来探讨细胞分化等一系列重大理论问题的机制和生理生化过程就比较困难,成为一个极其复杂的问题。此外,细胞突变体筛选和遗传转化以及细胞杂交等方法也无法进行。为此人们就很自然地想到如何去减少这种复杂性,提供可行的研究技术,建立相应的实验体系。植物组织和细胞离体培养不仅减少了相互制约的影响,而且还可在人工控制的条件下,按预期的目标设置一些处

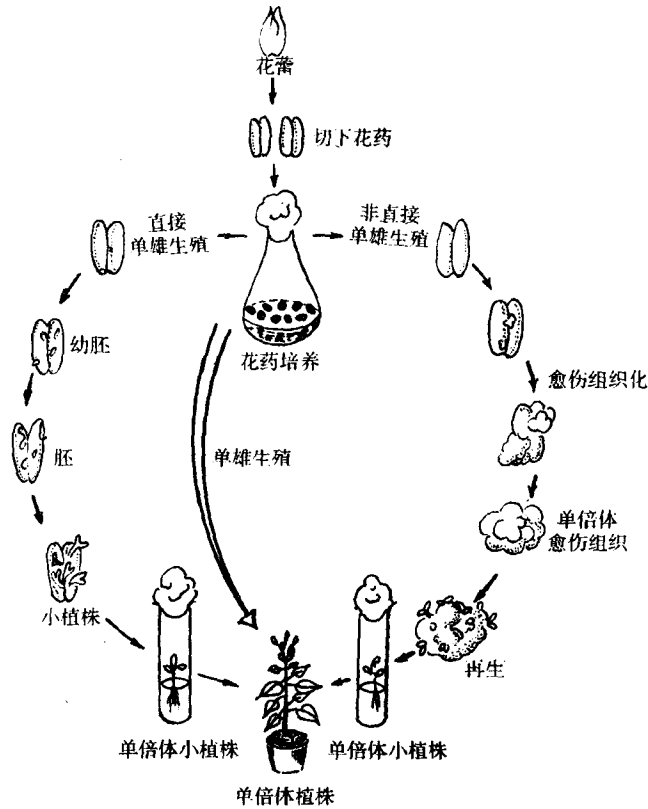


图 1-2 花粉培养及单倍体植株的形成

理,研究细胞分化和发育的规律,器官分化和形态建成在植物体中是如何控制的,内外条件的影响和发育过程中的分子基础,细胞转化与突变体筛选等等。近年来在该领域的研究已取得长足的进展,并显示出强大的生命力和广阔的应用前景^[3-10]。

二、形态发生

植物细胞培养技术的理论研究和品种改良的应用都依赖于长期培养细胞或原生质体的再生植株能力;植物的遗传工程和转基因植株的鉴定亦依赖于转化细胞再生植株的能力;原生质体培养和细胞融合の利用同样依赖于杂种细胞再生植株的频率;无性系变异与突变体筛选也是当培养物有效地再生植株时才成为可能。因此离体培养细胞形态发生(morphogenesis)的研究是首要而关键的问题。

所谓形态发生就是生物个体发育或再生过程中,机体及其器官形态结构的形成过程。在生物学领域内已成为一门学科,而且深入到组织和细胞的形态发生问题。它不同于形态学、生理学和胚胎学,而是在应用这些学科知识的基础上,结合生物化学、生物物理学和遗传学的知识和技术,专门研究形态发生中有关分化、对称、极性和相关性等现象的外界条件因子、内在生理生化及遗传基础,从而了解其机制,以达到控制目的的一门学科。植物组织或细胞离体培养中的形态发生有器官发生(organogenesis)和体细胞胚胎发生(so-

matic embryogenesis)这两种途径形成再生植株。这两种形态发生途径都是以细胞分化为基础的,它包含了组织和器官的形成。已分化的细胞各自组成了不同的组织,一般形态和机能相同的细胞组成同一种组织,然后再由机能相关的组织形成器官。形态发生的最后结果是形成一个发育成熟的完整植株(图 1-3)。

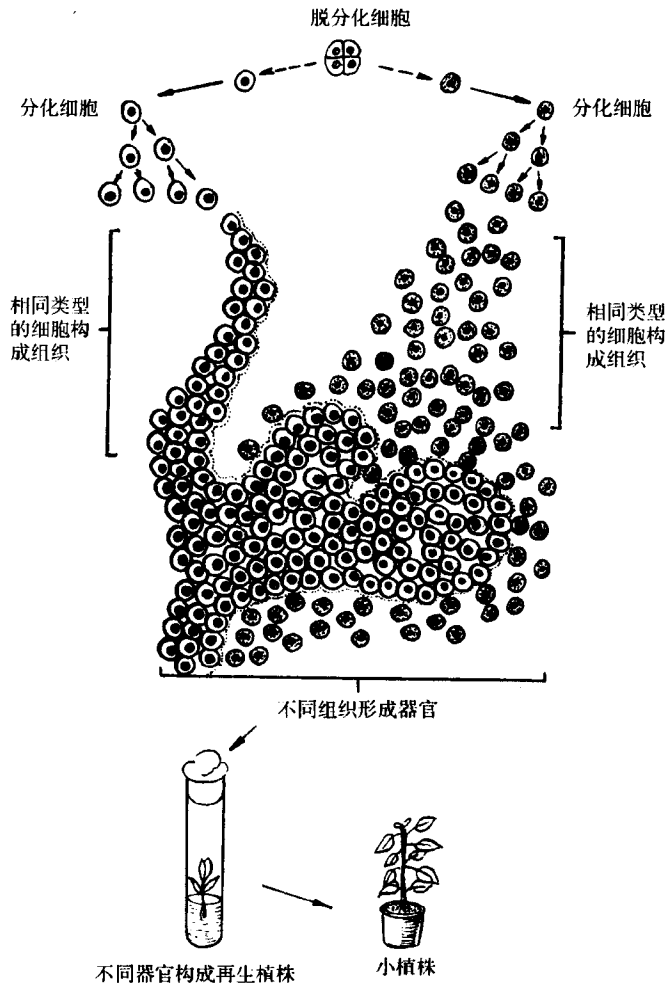


图 1-3 植物细胞形态发生示意图

第二节 器官发生

一、脱分化

植物体是一个具有高度结构的多细胞系统。植物体中的细胞及其组成的不同组织均是高度分化的,它们相互协调而发挥作用,这些分化的体细胞经过分裂后只产生相应的组

织或器官,细胞的全能性不能表达。可见细胞全能性表达潜力首要的条件是该细胞必须处于未分化的原始状态,故原始培养物的形态发生必然包括两个过程:一是原组织或器官中的细胞恢复为原始不分化状态或分生组织细胞状态,即使那些已分化的体细胞产生一种返老还童现象,并再次呈现其分裂机能和分化潜力,这就是脱分化过程。显然脱分化过程的实质是解除分化,逆转细胞的分化状态,使其回到分化前的原始状态,以恢复细胞的全能性。二是从已脱分化的细胞中分化出组织或器官。由于这种组织或器官是从成熟细胞经脱分化而再次分化形成的,所以这是一个再分化的过程,通常简称为分化(differentiation)。

大量研究表明,有结构的组织或器官,如根、茎、叶、幼穗和幼胚等等,当它们与母体组织分离,并在一定的条件下培养,这些细胞可脱分化转变为能迅速增殖的愈伤组织。本室近几年采用了双子叶植物和单子叶植物共 10 余种,取不同组织或器官离体培养都能诱导出愈伤组织^[11-15]。

根据愈来愈多的研究报道,几乎所有的多细胞植物都有诱导产生愈伤组织的潜在可能性。也就是说,诱导愈伤组织的成败关键主要不是实验材料,而是培养条件,其中激素的成分和浓度是最重要的因素。生长素和细胞分裂素对诱导愈伤组织的产生及促进迅速生长是必需的。最常用的生长素是 IAA, NAA 和 2,4-D,使用浓度范围约在 0.01 ~ 10mg/L。最常用的细胞分裂素是 KT 和 6BA,使用浓度范围在 0.1 ~ 10mg/L^[11,13,16]。

从外植体脱分化形成愈伤组织大致可分为三个时期:起动机、分裂期和分化期。起动机是愈伤组织形成的起点。外植体(explant)中已分化的活细胞在外源激素的作用下,通过脱分化的起动机而进入分裂,并开始形成愈伤组织。这时在外观上虽然未见明显变化,但实际上细胞内一些大分子代谢动态已发生明显的改变。绿豆子叶形成愈伤组织的初期 RNA 含量明显增加^[16],枸杞叶片接种后的 12 小时过氧化物酶的活性就开始上升,到 24 小时其酶活性为起始时的一倍^[11](表 1-1)。

表 1-1 枸杞叶片(鲜重)培养过程中过氧化物酶活性及可溶性蛋白质含量的变化

发育时期	愈伤组织的诱导									器官发生		再生苗	
编 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
培养时间(d)	0	0.5	1	2	3	5	7	10	15	25	30	40	50
过氧化物酶活性 $\Delta OD_{470}/(\text{min} \cdot \text{g})$	12.8	16.8	24.0	29.6	35.1	41.8	62.2	33.4	26.0	42.8	54.7	36.1	28.0
可溶性蛋白质含量 mg/g	12.4	10.2	11.9	13.4	15.6	16.7	18.9	14.1	11.2	13.1	15.0	12.1	8.9
酶比活 $\Delta OD_{470}/(\text{min} \cdot \text{毫克蛋白质})$	1.2	1.6	2.1	2.2	2.2	2.2	3.2	2.3	2.3	3.2	3.6	2.2	3.1

由此表明脱分化起始期的实质是在外源生长素诱导下,首先激活了这些细胞中特定基因表达,为进入细胞分裂期的 DNA 复制奠定了基础。分裂期是指外植体切口边缘开始膨大,外层细胞开始细胞分裂,这时细胞核大,核仁明显,可见大量分生细胞团的形成。周边叶肉细胞有³H-尿苷(³H-U)和³H-亮氨酸(³H-L)的掺入,接着³H-胸苷(³H-dT)掺入, RNA、蛋白质和 DNA 的合成量相继达到峰值(图 1-4)。

这些变化表明,原来已分化的细胞正在回复变化为具有分生状态的脱分化的细胞,这

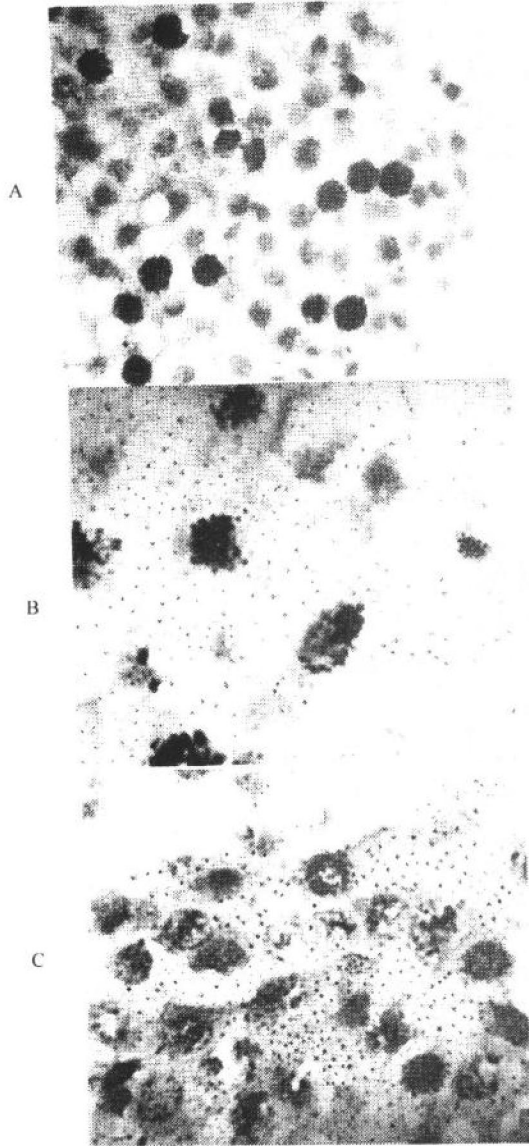


图 1-4 枸杞组织培养脱分化过程同位素示踪实验
 A. $^3\text{H}-\text{dT}$ 渗入细胞核, 示 DNA 合成动态 B. $^3\text{H}-\text{U}$ 渗入细胞核和细胞质中, 示 RNA 合成动态 C. $^3\text{H}-\text{L}$ 渗入细胞质中, 示蛋白质合成动态

时细胞代谢十分活跃, 细胞分裂迅速并形成大量愈伤组织时期。分化期是指愈伤组织形成后期并进入再分化的过程。原在分裂期出现于组织边缘的细胞分裂多呈平周分裂, 从而使创伤形成层的细胞呈辐射状的排列(图 1-5A), 接着内部组织细胞开始分裂, 细胞数目进一步增加, 以致冲出表层形成大量愈伤组织, 从而完成脱分化过程(图 1-5B, C)。

在愈伤组织形成过程中, 从形态上划分为三个时期, 但实际上它们之间的界限不是很严格的, 尤其是分裂期和分化期往往可在同一组织中观察到。时期的划分只是便于愈伤组织形成过程中的细胞生物学和分子生物学的研究, 以揭示脱分化过程的本质。此外, 细胞脱分化的结果在大多数情况下是形成愈伤组织, 但这绝不意味着所有的细胞脱分化的结果都必然形成愈伤组织。相反, 愈来愈多的实验证明, 一些外植体的细胞脱分化后直接分化为胚性细胞而形成体细胞胚。同时还必须注意的是, 多数愈伤组织内的细胞并非是均一未分化的, 因此如将细胞的脱分化和愈伤组织的诱导等同起来显然也是不确切的。脱分化只是组织或细胞在离体培养中, 使原始培养物的分化细胞恢复到有分裂能力的更具可塑性过程。

二、分化

脱分化的细胞在形态发生上具有较大的可塑性, 在适当的条件下可分化出不同的细胞、组织直至完整植株, 这正是细胞全能性的表现。在组织培养中的分化包括不同的水平, 有细胞水平、组织水平、器官水平和植株水平。

(一) 细胞水平的分化: 各种类型的细胞组成的愈伤组织, 随着愈伤组织的生长、反复的细胞分裂, 新的分化又重新开始, 分化出不同的细胞类群, 主要有薄壁细胞、分生细胞、管胞细胞、色素细胞、石细胞、纤维细胞、毛状细胞和细胞丝状体等。

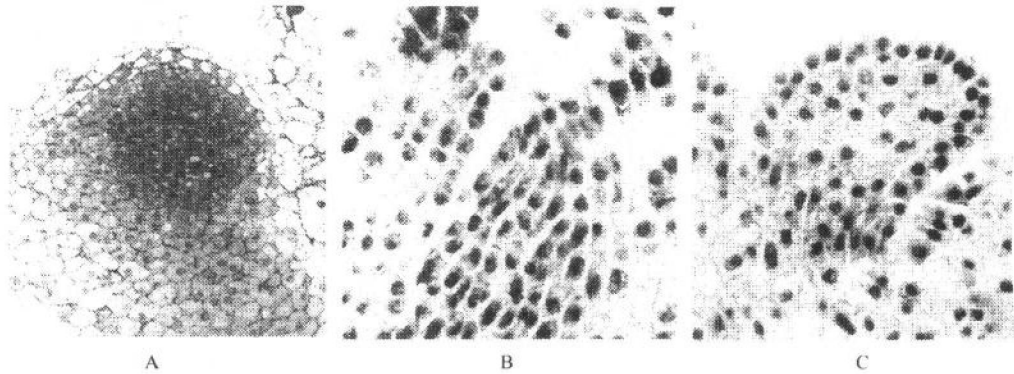


图 1-5 愈伤组织的形成

(二) 组织水平的分化: 当愈伤组织在高水平生长素的条件下, 最常见的是维管组织的分化。松散的愈伤组织内含大量类分生组织或瘤状结构。致密的愈伤组织内组织分化很少, 大多是些高度液泡化的细胞所组成。

(三) 器官水平的分化: 由分化出的不同组织形成各种器官, 如根、茎、叶和芽等。根据起源不同可将器官分化分为两种情况, 一种是直接从外植体的细胞形成器官原基, 继而发育成器官; 另一种是从外植体上先形成愈伤组织, 再在愈伤组织上产生不同的器官原基。

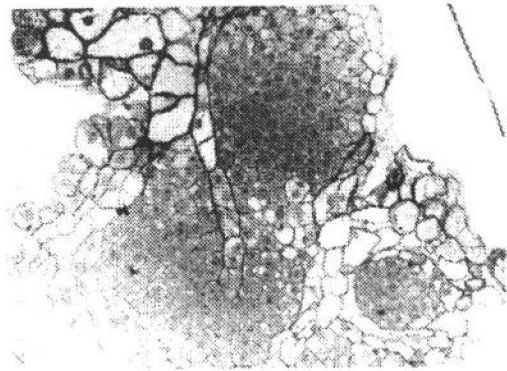


图 1-6 愈伤组织中的分生细胞团

器官原基一般是由一个或一小团分化细胞经细胞分裂形成类分生组织, 其细胞内原生质稠密, 细胞核大(图 1-6)。

在组织培养中最常见的分化器官是根和芽。最好是先诱导分化出芽, 因为形成芽后在其基部很容易形成根。如培养物中先形成根则往往抑制芽的形成。一般的情况, 器官原基与母本组织常保持一定的联系, 而且芽原基多起源于培养物的较表层细胞, 即外起源的; 而根原基多发生在组织较深处, 是内起源的。两者之间一般没有什么联系, 呈现单向极性。

(四) 植株水平的分化: 从理论上讲, 各种植物的体细胞都具有全能性, 离体培养均可形成再生植株。但事实上有些植物很容易, 有些植物则很难。还有些植物细胞离体培养迄今还未获得再生植株。主要是对这些植物再生植株的条件还没有完全掌握。不过已有愈来愈多的植物从组织或细胞培养中成功地分化出完整植株。通过器官发生形成再生植株的方式大体上有三种情况: 第一种情况是在芽形成之后, 在芽的基部长出根而形成完整植株, 这是组织培养中较为普遍的一种植株再生方式。第二种情况是先分化根, 再在根上

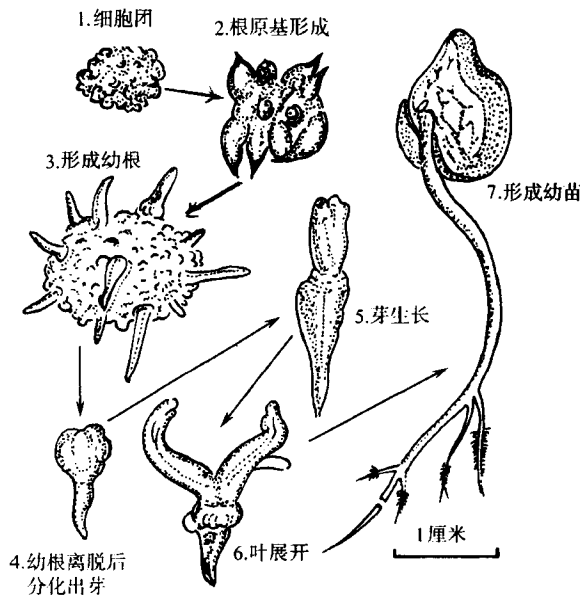


图 1-7 颠茄细胞悬浮培养中先分化根再形成形态发生过程

产生不定芽而形成完整植株。一般说,培养物中先形成根则往往抑制芽的形成。但也有例外,如在颠茄的细胞悬浮培养中,先形成细胞团(图 1-7,1),在细胞团上产生根原基突起(图 1-7,2)当细胞团的细胞生长与扩大后,可明显见到许多像钉状的根分散地附着在细胞团上(图 1-7,3)。这些钉状根可从细胞团上脱落或细胞团解体后,钉状根即分散在液体培养基中,并在根的非根尖的一端分化出不定芽(图 1-7,4)并进一步发育形成完整幼苗(图 1-7,5,6,7)。第三种情况是在愈伤组织的不同部位形成芽和根,再通过维管组织的联系形成完整植株。这种方式发生在多种植物组织培养中,它们的芽和根的分化可以是同时的,也可以略有先后。芽和

根分化后一般是随愈伤组织中已存在的管状分子继续分化维管组织。芽中的维管组织向下分化,并推测芽与根的两端维管组织由此相互连接,成为统一的轴状结构而形成再生植株。

第三节 体细胞胚胎发生

一、体细胞胚胎发生的特点与意义

植物的胚胎发生是从合子开始的。但从 20 世纪 50 年代末 Steward 等发现胡萝卜根细胞离体培养可通过体细胞胚胎发生形成再生植株以来,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胎发生(somatic embryogenesis)或花粉胚胎发生(pollen embryogenesis)。前者系二倍体的体细胞产生的胚状结构,后者则由小孢子或其分裂产物等单倍体细胞产生的体细胞胚,通常简称花粉胚(pollen embryo),可发育成单倍体植株。但体细胞胚或花粉胚都是指在植物组织培养中起源于一个非合子细胞,经过胚胎发生和胚胎发育过程形成的胚状结构。这个定义包括下列几点含义:①体细胞胚是组织培养的产物,只限于在组织培养范围内使用,区别于无融合生殖的胚;②体细胞胚起源于非合子细胞,区别于合子胚;③体细胞胚的形成经历胚胎发育过程,区别于组织培养的器官发生中芽与根的分化^[18]。

在植物组织培养中,诱导体细胞胚胎发生和诱导器官发生相比具有显著的特点:①具有两极性:在体细胞胚发生早期就具有胚根和胚芽两极,胚性细胞第一次分裂多为不均等分裂,形成顶细胞和基细胞,其后由较小的顶细胞继续分裂形成多细胞原胚,而较大的基