植物细胞工程与分子育种技术研究

陆维忠 郑企成 主编

中国农业科学技术出版社

植物细胞工程与分子育种技术研究

陆维忠 郑企成 主编

中国农业科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

植物细胞工程与分子育种技术研究/陆维忠,郑企成主编.—北京:中国农业科学技术出版社,2003.3

ISBN 7-80167-333-6

Ⅰ.植… Ⅱ.①陆… ②郑… Ⅲ.①植物-细胞工程-研究 ②植物育种-研究 Ⅳ.①Q942 ②S33

中国版本图书馆CIP数据核字(2003)第011978号

责任编辑	王涌清
出版发行	中国农业科学技术出版社 北京市中关村南大街12号 邮编:100081 电话:68919711
经　　销	新华书店北京发行所
印　　刷	北京印刷学院印刷厂
开　　本	787mm×1092mm 1/16 印张:29.25
印　　数	1～600册 字数:710千字
版　　次	2003年3月第1版 2003年3月第1次印刷
定　　价	90.00元

《植物细胞工程与分子育种技术研究》

编　委　会

顾　　问：吴光南　朱鑫泉

主　　编：陆维忠　郑企成

副 主 编：马鸿翔　倪万潮　汤日圣　周淼平

编　　委：（以姓氏笔画为序）

万建民　马鸿翔　王海波　刘录祥　刘蔼民

朱至清　汤日圣　余建民　张　旭　杨剑波

陆维忠　陈忠辉　周淼平　郑企成　倪万潮

贾　旭　高东迎　薛启汉

Plant Cellular Engineering and Molecular Breeding

Editing Board

Consultants: Wu Guangnan, Zhu Xinquan

Editors-in-Chief: Lu Weizhong, Zheng Qicheng

Associate Editors-in-Chief: Ma Hongxiang, Ni Wanchao
Tang Risheng, Zhou Miaoping

Members of the Board:

Wan Jianmin, Ma Hongxiang, Wang Haibo,
Liu Luxiang, Liu Aimin, Zhu Zhiqing, Tang Risheng,
She Jianmin, Zhang Xu, Yang Jianbo, Lu Weizhong,
Chen Zhonghui, Zhou Miaoping, Zheng Qicheng,
Ni Wanchao, Jia Xu, Gao Dongying, and Xue Qihan

序

当今世界各国均把生物技术产业作为21世纪最有希望的支撑产业之一。农业生物技术是生命科学与生物技术领域中重要的组成部分，也是生物遗传改良的重要途径和方法。中国农业生物技术学会策划于2003年3月在江苏省苏州市召开“全国作物细胞工程与分子技术育种学术研讨会”。会前共收到来自近40个科研院所和高等院校的专家、教授撰写的论文67篇，很多论文的作者都是在国内外享有盛名的专家、教授。这些高质量的论文，展示着科研领域的最新进展和成果。为此，将论文汇成专集《植物细胞工程与分子育种技术研究》正式出版，这是此次学术研讨会的精萃所在。

本书集中反映了我国农业生物技术近十年内在植物细胞工程技术、分子标记技术和基因操作技术三个领域中取得的重要研究进展和成果。我国植物细胞工程技术历史悠长，其研究领域之广，应用范围之大，一直处于国际领先地位。目前，她已成为农作物种质创新和新品种选育不可或缺的技术。初步统计，“九五”期间育成主要农作物新品种数十个，推广面积累计达1000多万公顷，为我国农业生产发展和产业结构调整作出重要贡献。农作物重要性状的DNA链锁标记研究，是近年来国内外研究的热点之一。从收到的论文中看出，我国在DNA标记研究领域中取得了突破性进展，找到了一批与农作物重要性状紧密链锁的DNA标记，某些标记已应用于聚合多个基因的高效育种的实践之中。我国的基因操作技术虽起步较迟，但近十年发展迅猛。转基因抗虫棉种植面积逐年上升。据统计，2002年我国抗虫棉种植面积已达250万公顷，其中国产抗虫棉面积接近100万公顷。水稻、

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

玉米、小麦、大豆、蔬菜等作物转基因研究也取得关键性进展。一些与农作物重要性状相关基因的分离克隆日趋发展。我国在动物、微生物等各领域的农业生物技术均取得长足进步。此书，仅就植物细胞工程和分子技术方面的论文进行收集。编辑组虽尽力征集，尚有部分新成果和新进展未能收入。时代在前进，科技在发展，各项工作都在创新，编辑工作不足之处，经常是难求无咎。

从总的方面看，本书的出版，将为加快我国农业生物技术领域的研究与发展，对增进农业生物技术的学科繁荣，对推进我国农业生物技术产业化进展，对促进我国农业现代化进程，毋庸置疑地将产生积极的影响。是为序。

中国农业生物技术学会名誉理事长

陈佳贯

2003 年 1 月 28 日

目　　录

一、细胞工程

植物细胞工程的理论基础:细胞全能性学说 …… 朱至清(3)
农作物细胞工程育种:现状与未来 …… 刘录祥等(14)
通过“对话”试验探索离体培养的规律(Ⅰ) …… 王海波等(20)
水稻成熟胚诱导愈伤组织增殖力的遗传分析 …… 张　林等(30)
水稻转基因高效受体系统的建立 …… 刘艳芝等(35)
体细胞无性系变异与小麦赤霉病抗性改良 …… 陆维忠等(39)
小麦幼穗离体培养高效再生系统的初步研究 …… 赵林姝等(48)
小麦耐盐变异系的离体筛选及盐土田间试验 …… 贾敬芬等(53)
优质面包小麦新品种——高优503的选育与产业化 …… 钟冠昌(59)
小麦花培育种效率与从不同杂种世代取材的关系的研究 …… 王成社等(63)
利用小麦与玉米远缘杂交诱导小麦双单倍体的研究(综述) …… 蔡　华等(68)
大麦细胞工程育种研究与展望 …… 黄剑华(74)
小孢子培养技术在大麦遗传改良上的应用 …… 黄剑华等(88)
利用云南自然条件建立油菜高效小孢子培养技术
　　及育种体系 …… 寸守铣等(93)
柑橘细胞工程研究进展(综述) …… 刘继红等(100)
温州蜜柑原生质体培养高频再生体系的建立 …… 付春华等(110)
龙眼体细胞胚胎发生的研究与应用 …… 赖钟雄等(114)
龙眼体胚成熟过程中可溶性糖含量的变化* …… 李冬梅等(120)
荔枝胚性愈伤组织早期体胚发生的同步化调控及其
　　高频率体胚发生* …… 车建美等(126)

石榴种胚的离体培养及四倍体的产生 …… 邵建柱等(131)
细胞工程育种在马铃薯抗病育种中的应用 …… 蔡兴奎等(135)
辣椒不同外植体离体培养再生 …… 董兆龙等(142)
基因型与培养基对辣(甜)椒花药培养的影响 …… 原玉香等(149)
大蒜悬浮培养及有效植株再生 …… 张允刚等(155)
草坪型高羊茅成熟种子离体培养植株再生技术研究 …… 佘建明等(160)

二、分子标记

分子标记及其应用 …… 王 斌(167)
基于遗传作图的新基因发掘 …… 贾继增(182)
小麦赤霉病抗性QTL分子标记及辅助选择研究进展 …… 马鸿翔等(186)
水、陆稻根系性状QTL定位及其与环境互作分析 …… 穆 平等(194)
水稻叶蝉抗性基因回交转育和CAPS标记辅助选择 …… 王春明等(203)
小麦分子连锁图谱构建及抗旱相关QTLs作图…… 景蕊莲等(210)
PCR法快速检测小麦分离早代的优质HMW-GSDx5基因 …… 张晓科等(215)
棉花高品质纤维性状的遗传、分子标记及其分子育种 …… 张天真等(221)
小麦种子基因的表达序列标签分析 …… 李加瑞等(227)
大豆突变基因的遗传分析与分子标记研究 …… 朱保葛(242)
枇杷遗传变异的ISSR标记鉴定 …… 刘 丹(248)
RAPD技术在辣椒品种资源遗传分析中的初步应用 …… 张 璐等(254)
林木遗传图谱研究现状及发展趋势 …… 张 博等(262)

三、基因操作

抗虫棉等转基因农作物产业化进程 …… 崔洪志等(279)
抗冻转基因棉花突变体的初步研究 …… 张保龙等(287)
水稻苯达松敏感致死基因的电子杂交定位及基因预测 …… 向太和等(292)
小麦黄花叶病转基因研究 …… 徐惠君等(298)

BCL、RIP 细胞凋亡基因向小麦中的导入和鉴定 …… 叶兴国等(306)
水稻谷蛋白Gt1 基因在小麦中的表达 …… 陈　豫等(311)
转 mtlD 基因水稻的获得以及耐盐性 …… 张新春等(317)
应用NPT-Ⅱ基因筛选携带溶菌酶转基因水稻花粉
植株初探 …… 许明辉等(325)
花药培养转育玉米PEPC 基因研究…… 高东迎等(329)
粳稻基因枪法转化体系的建立 …… 王景余等(335)
转基因小麦京 411 的选育及其利用…… 徐琼芳等(343)
利用花粉管通道法将编码麦谷蛋白HMW-GS 5+10 基因
导入小麦进行品质改良的研究 …… 王广金等(347)
耐盐基因AtNHX1 转化普通小麦的研究 …… 楚秀生等(354)
携带抗白粉病基因的簇毛麦6VS 端体的流式分选 …… 马有志等(362)
大麦小孢子来源胚状体的遗传转化 …… 陆瑞菊等(369)
玉米单倍体胚诱导与基因枪转化研究 …… 蒋武生等(373)
影响东北玉米自交系基因枪转化的因素 …… 袁　鹰(379)
大豆花粉管通道技术的研究和利用 …… 刘德璞等(383)
大豆体细胞胚胎发生的组织学及转基因技术研究 …… 赵桂兰等(390)
油菜高效转基因平台及无选择基因转化 …… 王敬乔等(395)
油菜转几丁质酶、β-1,3-葡聚糖酶基因的研究 …… 李根泽等(405)
转基因抗草甘膦油菜的实用PCR 检测方法 …… 潘爱虎等(413)
反义ACC 合成酶基因导入番茄的研究 …… 曾黎琼等(419)
植物抗病基因的克隆与研究 …… 文晓鹏等(426)

四、研究简报

内源激素对水稻花药培养的影响研究 …… 张红宇等(437)
应用生物技术聚合水稻多抗性育种的研究(摘要) …… 李梅芳等(441)
外源DNA.直接导入(DIED)法的大豆分子育种成效* …… 雷勃钧(443)
秋水仙碱诱变梨多倍体的研究 …… 孙清荣(449)
用于筛选直链淀粉含量为中等的籼稻品种的分子标记 …… 蔡秀玲等(453)

一、细胞工程

此为试读,需要完整PDF请访问: www.ertongbook.com

植物细胞工程的理论基础:细胞全能性学说

朱至清

中国科学院植物研究所,北京 100093

细胞全能性学说认为,植物的细胞具有发育为胚胎和植株的潜能。细胞和组织培养的实践表明,虽然不是植物所有细胞都具有全能性,但是的确许多类型的细胞可以在离体培养条件下发育为胚状体或者植株。正因为如此,在细胞水平上进行的任何遗传操作,通过细胞培养和植株再生,最终可以将细胞的遗传修饰变成植物的遗传修饰,从而改变了整个植物的遗传特性。此外,植物细胞的全能性使得它们能够在培养条件下无限的分裂和增殖,我们可以利用植物细胞的大量培养的方法,使它们像微生物一样,在生物反应器中生产有用的化合物。因此,我们把细胞全能性学说看作是细胞工程的理论基础。

细胞全能性学说是在细胞学说和组织培养实践的基础上建立起来的。细胞的发现可以追溯到17世纪。1665年英国学者胡克(Robert Hooke)被好奇心所驱使,想知道做瓶塞的软木为什么那么轻,于是就在显微镜下观察软木的切片。他发现,软木是由一个个极小的小室(cell)构成的,从此cell一词在生物学上便被称为细胞。实际上胡克当时看到的仅仅是植物细胞的外壳——细胞壁。后来的研究发现了细胞内部的各种结构,也认识到除病毒和噬菌体以外,种类繁多的生物都是由细胞组成的。1838年德国植物学家施莱登(Matthias Jacob Schleiden)总结了前人的研究结果,提出:"一切植物,如果它们不是单细胞的话,都完全是由细胞集合而成的,细胞是植物构造的基本单位。"与此同时,德国动物学家施旺(Theodor Schwann)在动物学领域提出了相似的观点。他们的观点形成了作为19世纪三大发现之一的细胞学说,这一学说的基本论点是:细胞是生物结构、功能和发育的基本单位。

19世纪末叶,显微技术的改进促使细胞学迅速发展。德国细胞学家Strassburger在1875年首次观察到存在于细胞核内的染色体,不久Hertwig(1876)和Strassburger(1884)在动物和植物中分别描述了受精过程和精卵融合现象。1882年,Flemming观察了蝾螈体细胞分裂时的染色体行为,并第一次用有丝分裂(mitosis)来描述这一过程。Boveri(1892)和Strassburger各自描述了动物和植物的减数分裂过程。通过这一过程,染色体数目减半,从而证实了Weismann(1883)的假设,即有性生殖之前性细胞的染色体的数目减半,而在精卵融合时染色体数目加倍,从而保持生物体细胞内的染色体数目的稳定。1900年孟德尔定律的重新发现使人们认识到染色体实际上是遗传因子的载体。当时的生物学家意识到,既然细胞内具有同样数目的染色体,每个细胞自然就携带了彼此相同的全部遗传因子,因此也应当像受精卵一样,具备分化和发育的潜能。第一次提出这种观点的是德国植物学家Haberlandt,他在1902年发表了著名论文《植物细胞离体培养实验》,距今正好100年。文章指出,作为高等植物的器官和组织基本单位的细胞有可能在离体培养条件下实现分裂分化,乃至形成胚胎和植株。这种见解后来被称为细胞全能性学说(cell totipotency)。该文还报道

了几种植物的细胞和组织的培养试验，但是由于当时的条件所限，都没有成功。

从20世纪30年代起植物组织和细胞培养开始迅速发展，1951年Skoog和Tsui(崔)揭示，在加有IAA和腺嘌呤的培养基上，烟草茎段的髓组织的细胞可以分裂和生长，并且分化形成不定芽。这是人类第一次从离体培养的植物组织诱导出芽和植株。后来Miller等(1955)从DNA的降解产物中分离出6-呋喃氨基嘌呤(激动素)，并发现它不仅可以代替腺嘌呤诱导烟草茎段分化芽，而且诱导芽分化的效力比腺嘌呤高三万倍。这一研究为诱导离体细胞的器官分化提供了有效的方法。此后Muir(1954)利用液体振荡培养烟草和万寿菊(*Tagetes erecta*)愈伤组织的方法建立了悬浮细胞培养物，然后用机械的方法从细胞悬浮液中取出单个细胞，将单个细胞放在滤纸上，在滤纸的下面放置愈伤组织和培养液，首次实现了离体条件下单个细胞的分裂和愈伤组织形成。这种方法后来被称为滋助培养(nurse culture)。1958年Steward培养来自胡萝卜根的悬浮细胞，并成功地诱导单个的悬浮细胞发育为成熟的胚胎，完全证明了Haberlandt提出的细胞全能性学说。至今已经在1 000多种植物上，从各种类型的组织和细胞，甚至原生质体，诱导出胚胎和完整植株，因此植物细胞的全能性的存在已是不争的事实。

1 胚性细胞——植物的干细胞

植物组织培养的大量实践证实了植物细胞全能性学说，但是也告诉我们，并不是植物体内的每一个细胞都具有全能性。一般说来，高度分化或特化的细胞，例如筛管细胞和根冠细胞，已经失去分裂和再分化的能力，即使在离体培养的条件下，也不可能发育成植株。只有那些胚性细胞或分化程度不高的细胞才可具备发育为胚胎或植株的全能性。胚性细胞(embryogenic cells或embryonic cells)一词最早见于在20世纪80年代植物组织培养的文献中，其含义与近年来动物细胞学家提出的胚胎干细胞基本相同。

毫无疑问，被子植物的合子是胚性细胞，植物的早期胚胎细胞也属于胚性细胞。植物的分生组织细胞也是一种胚性细胞或胚胎干细胞。我们知道，植物的发育模式与动物有很大的区别。动物的器官分化是一个有限的过程，在胚胎成熟时器官的分化过程已经完成。而植物的器官分化在某种意义上是一个无限的过程，种子中的胚胎萌发成苗后，在整个生活史中不断地形成新的器官，如根、茎、叶、花和果实，直到生命的终结。多年生植物的器官发生可以年复一年地反复进行，延续数十年乃至数百年。植物连续的器官分化是由顶端分生组织来完成的，可见它们是一种具有全能性的细胞。有些植物的成熟器官和组织中也保留着一些胚性细胞，因为有些类型的植物细胞可以在机体上或培养条件下发育为植株。最典型的例子是落地生根(*Kalanchoe laxiflola*)，其叶片周缘组织特定部位中遗留的胚性细胞能够沿着叶片的四周形成不定芽，然后发育为具有根系的小植株，脱落到地面。有趣的是在许多植物种类上，一些分化程度较高的细胞，例如叶肉细胞、表皮细胞，乃至花粉细胞，仍然可以在离体条件下经过脱分化和再分化过程，形成胚胎或植株。但是分化细胞如何才能恢复胚性，仍然是植物细胞生物学中尚未完全解决的重要问题。细胞全能性和细胞脱分化的分子机理和基因调控，将是21世纪细胞分子生物学的一个重要的生长点。

植物家早就发现，在自然条件下，植物体内的许多细胞可以不断地产生不定胚或芽，表明他们保留着胚性。在自然界表现出胚性的细胞可以分为三大类，即早期胚胎细胞、茎端分生细胞和成熟组织中遗留的胚性细胞。

1.1 合子和早期胚胎细胞

精卵结合产生的合子,合子发育为胚胎,因此合子是真正意义上的胚性细胞。

许多植物的早期胚胎细胞可以通过裂生多胚(cleavage polyembryony)方式产生两个以上的胚(胡适宜,1983),说明它们是一群胚性细胞或者胚胎干细胞。裂生多胚现象普遍存在于裸子植物中。例如松属(*Pinus*)植物的原胚细胞一般会发育出4～8个各自分离的胚胎。由一个原胚裂生的多胚之间存在着竞争,4个胚胎中的一个可以发育为成熟胚,其余的3个渐渐败育,到种子成熟时便看不到任何痕迹。被子植物中裂生多胚现象比较少见。在郁金香、椰子、美洲鹿百合(*Erythronium americanum*)、耳叶报春(*Primura auricula*)和美冠兰(*Eulophia epidendraea*)等植物中曾观察到裂生多胚,它们是从原胚顶部的细胞增生形成的。有些植物可以从胚柄细胞增殖产生多胚,在猕猴桃(*Actinidia chinensis*)、悉辉半边莲(*Lobelia syphilitica*)和外果木(*Exocarpus sparteus*)都记载过这种情况(胡适宜,1983)。胚胎发育到一定阶段只有两端各有一团细胞保持着分生状态,后来发育成为茎端和根端分生组织。

1.2 顶端分生组织中的干细胞(胚性细胞)及其基因调控

植物连续的器官分化是由顶端分生组织来完成的。顶端分生组织是植物胚胎胚芽和胚根顶端的分生细胞团,分别称之为茎端分生组织和根端分生组织。茎端分生组织包含全能性细胞,它们相当于动物的胚胎干细胞(embryonic stem cells),可以不断分裂和分化,形成各种器官。根端分生细胞只能分化出根组织,很像是动物的组织干细胞(tissue stem cells)。

植物的茎端分生组织(SAM)为一半球型结构。外面的两层细胞(T1、T2)组成的结构叫做原套(tunnica),它们能进行垂周分裂,保证分生组织的表面增长,在生长点的基部T2层的细胞也有平周分裂。T1层成为以后器官的表皮组织,T2层衍生的细胞构成皮下组织以及花粉粒和胚珠的生殖细胞。原套的细胞层数随植物种类而异,可以是2层,也可以是1层或3层。原套下面的分生组织的中央部分叫做原体,它由多层细胞组成,分裂时按照多个方向进行。原体发育出茎的皮层、髓和维管系统,以及叶和花器官的最里层细胞(Jenik and Irish,2000)。原套和原体的中央部分统称为分生组织的中央区(central zone),由一团有丝分裂活动不旺盛的胚性细胞(干细胞)组成。而分生组织周围区(peripheral zone)由分裂速度较快的细胞组成,器官原基就在这里产生。中央干细胞分裂后产生两部分,一部分仍然保留在分生组织的中央,叫做干细胞后裔(progeny of stem cells),保持全能性,另一部分叫做子代细胞(daughter cells),将离开中央带逐渐向分生组织周围区移动,它们在周边分化成新的器官原基(徐云远,2002)。综上所述,茎的顶端分生组织的中央带永远存在着全能性的胚性细胞,所以离体培养植物的生长点便可以不断地产生苗和植物体。

拟南芥菜(*Arabidopsis thaliana*)的与生长点的形态和发育模式有关的突变体为研究分生细胞的基因调控提供了试验材料。通过对*stm*突变体的研究发现了一个与维持顶端细胞的分生状态有关的基因。拟南芥菜的*stm*突变体(shoot meristemless)的特点是胚胎发生过程中不能形成茎端分生组织,这一特性的出现是*STM*基因突变的结果。由拟南芥菜克隆的*STM*基因及其推导的编码蛋白的氨基酸序列说明*STM*基因是编码Homeodomain类的*KN*基因家族的一员,很可能是通过转录调控而影响*SAM*的形成。*STM*基因功能是在整个发育过程中保茎端分生组织的结构建成。*STM*基因作用于*WUS*和*ZIL*基因的上游,后两基因在维持分生组织细胞的不分化特性上具有重要的作用(Endrizzi et al.,1996; Long et al.,

1996；许智宏，1997）。

对另一个突变体*wus*的研究揭示了一个维持顶端分生组织中央区的保持干细胞特性的基因*WUS*。*wus*突变体的主要特征是发育迟缓，几片真叶形成后，茎尖变得平坦，主茎的生长也随之停止，这是由于调控细胞全能性的*WUS*基因发生了突变。*wus*突变体的遗传学分析证明，*WUS*基因定位在拟南芥染色体II上。基因克隆和测序的结果表明，它编码一个有291个氨基酸组成的同源异型蛋白(homeodomain protein)。*WUS*基因是干细胞促进途径(stem cell-promoting pathway)中的重要调控成分(Brand et al.，2000；许云远，2002)。*WUS*在拟南芥胚胎的分生组织中就开始表达，RNA原位杂交表明，在16细胞的胚胎中，中央的4个细胞中有*WUS* mRNA存在，而在外周的细胞检测不到。胚胎增大后，仍然是中央的4个细胞中存在*WUS* mRNA。鱼雷胚时期(torpedo stage)，分生组织中有*WUS*的表达，但是在原套的L1和L2层细胞无表达。在胚胎晚期，*WUS*仅在分生组织的L3层(原体的最上一层细胞)之下的几个细胞中表达，这一分布模式一直延续到花分生组织出现。该基因在分生组织三层细胞之下表达，以非细胞自主方式(non-cellautonomous manner)决定其上方细胞的干细胞性质，因此将表达*WUS*的区域看作是一个新的功能单元，叫做干细胞组织中心(Mayer et al.，1998)。*WUS*的表达不仅能够维持细胞处于干细胞状态，还能够激活邻近细胞中的*CLV*基因，促使一部分干细胞分化为器官原基。反过来，*CLV*基因的表达又可以限制*WUS*基因的表达量和表达区域，使分生组织中的干细胞的数目保持恒定(Brand et al.，2000；Schoof et al.，2000)。

*WUS*的功能分析表明，它不仅能够保持茎尖分生组织和花分生组织干细胞状态，而且参与莲座叶形态的的控制(Hamada et al.，2000)以及胚珠的发育(Gross-Hardt et al.，2002)。最近的研究表明，在化学诱导下*WUS*的超量表达或者35S启动子驱动下的组成型表达可以使转基因拟南芥的根或其他部位的体细胞分化出胚状体(Zuo et al.，2002)，说明该基因在植物细胞全能性的表达上起重要的作用。

1.3 植物成熟物器官中遗留的胚性细胞

根、茎、叶、花和果实等植物的器官都是由不同的组织所构成，每一种细胞又有若干类型的细胞组成。这些细胞大多数属于分化细胞，甚至是高度特化的细胞。但是在植物的组织和器官中也保留少数未分化或分化程度不高的细胞，它们可以在自然条件下形成不定胚(adventitious embryo)或不定芽(adventitious bud)，进行无性繁殖。我们把这些能够产生不定胚或不定芽的体细胞定义为遗留的胚性细胞。

1.3.1 被子植物胚囊中的细胞

卵细胞显然是具有全能性的，不过它的全能性只有在与精子结合形成合子后才能实现。卵细胞以外的胚囊分子有时也保留着全能性。一些植物胚囊中的助细胞具有形成胚胎的能力，例如在岩白菜(*Bergenia delavayi*)中，助细胞不经受精可以发育为单倍体的胚胎，因此在受精后的胚珠的切片上时常可以看到胚囊中有两个胚胎，其中大的是合子胚，小的是助细胞胚。在榆属(*Ulmus*)的一些种和韭菜上观察到反足细胞也具有产生胚胎的能力，不过反足细胞胚很难发育为成熟胚。

1.3.2 珠被和珠心细胞

许多植物胚珠中的珠被和珠心细胞，特别是靠近胚囊的珠心细胞具有全能性，能够产生不定胚。在柑橘属、芒果属、仙人掌属、玉簪属、绶草属和金蝴蝶属的一些物种中观察到过珠

心胚。珠心多胚现象在园艺生产中具有重要意义,藉此可以得到与亲本植株完全一样的健壮实生苗。

柑橘属植物是珠心胚现象(每个种子有一个以上的胚)的一个典型例证。在该属的若干物种中,珠心组织在每个种子中能形成1～40个不定胚,其中很多都能发育成熟,在种子萌发之后形成植株。

在芒果的胚珠切片上可以发现,具有胚胎发生潜力的细胞的形态不同于其他的珠心细胞,其体积较大,具有浓厚的细胞质,细胞核的体积也比较大,每一个细胞经过分裂可以形成一个不定胚,在一个胚珠内不定胚的数目从几个到几十个不等。不定胚的发生并不需要传粉的刺激,但是不定胚的发育和成熟必须依靠传粉和受精,因为如果胚珠没有受精,就会败育和脱落,珠心胚自然也不能继续发育。

1.3.3 营养体中的薄壁细胞

一些木本植物具有从根部产生根蘖或从茎上产生不定芽的特性,它们往往起源于根或茎皮层组织中的分化程度较低的薄壁细胞。叶组织产生不定芽的情况也比较常见,前面提到的落地生根就是一个典型的例子。秋海棠属(*Begonia*)和非洲紫罗兰(*Santpaulia ionantha*)的叶柄中也遗留有胚性细胞,不过它们在植物体中不会启动细胞分裂,只有在被人工切断并扦插后,才能产生不定芽。

表皮细胞也是一种薄壁细胞,虽然它与外界接触的一面细胞壁有不同程度的加厚。有些植物的表皮细胞,例如亚麻下胚轴的表皮细胞,在自然情况下能够形成不定芽,而且这些 不定芽是由单个表皮细胞起源的。只要除去幼嫩的亚麻苗的顶芽,沿着下胚轴全长的所有表皮细胞都能形成不定芽,但其中只有一个能长成完整的枝条。在组织培养中能由茎的表皮层细胞形成芽或胚的物种除亚麻外还有石龙芮、胡萝卜、蓝猪耳、烟草和蔓青等。

2 从分化细胞到胚性细胞

近年来发现,动物像植物一样,在成熟组织中也保留着一些干细胞,它们具有重新发育为胚胎(胚胎干细胞)或组织器官(组织干细胞)潜能。但是在动物体中,已分化细胞一般不可能逆转为胚性细胞或干细胞。植物则不同,只要细胞处于生活状态,即使分化程度很高的细胞,也保持着恢复到分生状态的能力。据研究,只有极少数类型的细胞完全失去分裂的能力,例如细胞核已经开始解体的筛管和木质部成分,或者细胞壁厚于2微米的纤维细胞以及细胞壁厚达7微米的管胞细胞。据Gautheret(1966)研究,一个细胞通过脱分化向分生状态回复可能达到的程度,取决于它已有的分化程度。分化程度较低的细胞,如形成层细胞和薄壁细胞,可以脱分化形成营养生长点,然后重新分化,产生器官或植株。而分化程度很高的细胞,如厚壁细胞或纤维细胞最多不过回复到形成层细胞状态,能够分裂形成某些组织,但不可能再生植株。由此看来,被子植物的茎端分生细胞,形成层分生细胞和薄壁细胞属于胚胎干细胞,而其他分化程度高的细胞可以看作是组织干细胞。

在离体培养的条件下,一个分化的细胞转变为分生状态,形成胚性细胞团或愈伤组织的现象称作脱分化(dedifferentiation)。一个已分化细胞若要表现其全能性,形成完整植株,首先要经历脱分化过程,然后再经历再分化(redifferentiation)过程。在大多数情况下,再分化过程是在愈伤组织细胞中发生的,但在有些情况下,再分化可以直接发生于脱分化的细胞中,无须经历愈伤组织阶段。组织培养研究的结果已经揭示,分化细胞的脱分化需要两个条

件：创伤和外源激素。创伤引起的细胞脱分化现象在扦插试验中经常可以见到，例如将秋海棠或非洲紫罗兰的叶柄切断，扦插到苗床上，在适合的温度和湿度下，叶柄中的薄壁细胞就能启动细胞分裂，产生分生细胞团，并由它们分化出小植株。创伤之所以能够诱导细胞的脱分化，主要是由于它使组织中的生长素分布发生了变化，伤口处生长素浓度的提高是细胞开始脱分化的直接原因。在组织培养时，培养基中添加的外源激素对细胞脱分化起着决定性的作用。

2.1 细胞脱分化过程的形态学和生物化学变化

关于离体培养细胞脱分化的形态学变化，曾经有过零星的研究，但并未揭示细胞脱分化过程的全貌。我们曾经以烟草叶片外植体（用于组织培养的组织块）为材料，比较系统地研究了离体培养条件下叶肉细胞脱分化的形态过程（朱至清等，1982，1984）。烟草的叶肉细胞分为两类，即栅栏细胞和海绵细胞。两类细胞在切割刺激和培养基中的NAA和激动素的作用下，都会启动细胞分裂，形成分生细胞团，然后发展为愈伤组织。愈伤组织只出现在外植体切口的部位，说明除了外源激素和培养基因素外，创伤也是分化细胞激动脱分化过程不可缺少的前提。

烟草叶肉细胞脱分化过程可以概括为以下三个阶段：(1)静止的叶肉细胞进行第一次分裂；(2)经过连续几次细胞分裂，叶肉细胞转变为分生细胞；(3)分生细胞形成愈伤组织。

在培养32 h左右，烟草叶片外植体的光学显微镜切片表明，靠近切口处的有些分栅栏细胞和海绵细胞就已经完成了第一次细胞分裂，形成包括在原有栅栏细胞壁之内的两个子细胞。但是外植体的表皮细胞并不发生分裂，以后也不会分裂。可见在烟草的叶片中叶肉细胞具有全能性，而表皮细胞不具备这种特性。

如果外植体细胞均为正常二倍体或单倍体，脱分化细胞的第一次分裂的方式通常是有丝分裂。如果外植体含有高倍化细胞，细胞脱分化的第一次分裂有可能是无丝分裂。在烟草叶片外植体中，绝大多数细胞均为二倍体细胞，栅栏细胞和海绵细胞均以有丝分裂的方式进行第一次分裂。我们在培养16～24 h观察过2 000多个分裂相，它们无一例外都是有丝分裂，从未发现过无丝分裂的现象。在这一实验系统中，无丝分裂只出现在培养20天以后的愈伤组织中，而且出现频率相当低。以往有人认为细胞只有通过无丝分裂才能完成细胞的脱分化，这样的观点显然是缺少根据的。

在叶片外植体离体培养24～32 h，一部分叶肉细胞启动第一次分裂。此时采用酶解压片法制备叶肉细胞的整体压片，可以观察到栅栏组织细胞和海绵组织细胞脱分化第一次分裂的过程。棒状的栅栏细胞的第一次有丝分裂多数情况下细胞板与母细胞的长轴垂直，但也可以与之平行，还可以与之呈一定的角度。海绵组织细胞第一次细胞分裂细胞板的位置具有较大的随意性。细胞群体脱分化和进入分裂的过程是非同步的，一般说来靠近外植体切口处的细胞先开始脱分化，然后逐渐波及到较内部的细胞。

在自然条件下分化细胞通常停止细胞分裂，执行特定的代谢功能，直至死亡。在离体培养条件下，静止的分化细胞脱分化的第一个也是最重要的步骤就是启动第一次细胞分裂，分化细胞一旦开始分裂，就可以连续分裂形成分生状态的细胞群体。如果能够揭露启动脱分化第一次细胞分裂时基因表达的细节，找出细胞脱分化的相关基因，我们就能了解细胞脱分化过程的本质，从而达到精确控制细胞全能性表达的目的。遗憾的是在这一重要领域分子生物学尚未很好地介入。

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com