# 五加科植物细胞工程研究进展

# 聂 福,张美萍,孙春玉,蒋世翠,王 义

(吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:从愈伤组织培养、花药和花粉培养、发状根培养、原生质体培养及体细胞杂交、大规模细胞培养等方面综述了国内外五加科植物的研究现状。分析了存在的问题并提出了解决策略,以期为开展五加科植物的深入研究奠定基础。

关键词: 五加科; 细胞工程; 组织培养中图分类号: S 567.1<sup>+</sup>9 文献标识码: A

文章编号: 1001-0009(2010)07-0206-04

五加科植物分为 80 属,包含 900 个品种,主要分布于温带和热带。在我国现有 23 属,160 种<sup>11</sup>,它们大多数生长于深山大森林中。随着森林的破坏,五加科植物野生资源破坏严重,现已稀少,也很难收集。并且,五加科部分植物生长周期长,常规的形态学和数量性状的研究在时间上和空间上都存在着很大局限性。而细胞离体培养体系的出现,为研究五加科植物形态发生和次生代谢调控过程及机制提供了技术手段,为种质资源的创新和遗传育种奠定理论实验基础。

# 1 愈伤组织的诱导及培养

生物技术中的愈伤组织,原指植物在受伤之后于伤口表面形成的一团薄壁细胞,在组培中则指人工培养基上由外植体长出来的一团无序生长的薄壁细胞,在体积大时才称为愈伤组织<sup>21</sup>。1964年,我国罗士韦教授开始了人参愈伤组织的培养,并取得了初步成功。其后,各国相继开展了人参、西洋参愈伤组织培养的研究。1978年,朱蔚华等人开展人参组织培养系统研究,证明了培养基、外源激素、培养基天然补充物、水质等因子对愈伤组织诱导和生长有影响。郭生桢,李蕙芝等<sup>33</sup>人以 MS, N6, B5等7种培养基并附加了2.4 D 激动素,水解蛋白等从人参的根、茎,叶、叶柄、花序基部、花瓣和嫩果等9个组织部位诱导出愈伤组织,并说明叶片诱导率最高,诱导愈伤组织的最佳激素是0.5~2 mg/L2,4-D。金英善等<sup>41</sup>进行了东北刺人参的组织培养探索,在不同激素的培养基种诱导出了愈伤组织,并证明2.0 mg/L的BA

和 0.2~1.0 mg/L 的 NAA 可以获得数量较多,质量较好的愈伤组织,叶所产生的愈伤组织颜色较深,数量也较少,并在初代培养时易产生不定根。郑光植等<sup>[5]</sup> 在诱导三七愈伤组织的 MS 培养基中加入不同激素和各种添加剂,证明了可以提高愈伤组织的生长率和总皂甙含量,使三七愈伤组织的生长速率达 220 mg。L<sup>-1</sup>。d<sup>-1</sup>,是原初培养愈伤组织(54.0 mg(DW)。L<sup>-1</sup>。d<sup>-1</sup>)的 4倍。愈伤组织中总皂甙含量高达 13%,是原初培养愈伤组织(5.37%)的 2.4倍,为原植物的 3倍。邢朝斌等<sup>6</sup>以刺五加成熟种子为材料,通过离体培养诱导产生愈伤组织,利用 RAPD 分子标记方法,在 DNA 水平上分析无菌苗和愈伤组织的遗传变异。

#### 2 花药和花粉培养

花药和游离小孢子培养(或花粉培养)是诱导单倍 体植物的重要方法之一,通过无菌操作技术,接种在人 工培养基上,以改变花药内花粉粒的发育程序,诱导其 分化,并连续进行有丝分裂,形成细胞团,进而形成一团 无分化的薄壁组织——愈伤组织,或分化成胚状体,随 后使愈伤组织分化成完整的植株,称为花药培养。在花 药培养基础上发展花粉培养技术,把小孢子从花药中分 离出来,进行人工培养,称为小孢子培养或者花粉培 养[3]。对五加科来说关于花药和花粉的报道稍晚, 杜令 阁等[7] 建立了人参体细胞无性系, 通过 MS、B5、N6、 Miller改良怀特、尼许等6种培养基,加入不同浓度和种 类的激素培养人参花药并诱导出愈伤组织,而且连续4 a 获得花粉植株,并证明低温预处理可以明显提高愈伤组 织的诱导率但是处理 12 d 以上反而诱导率下降。另外, 邵启金等《对人参花药植株再生及无性系建立亦进行 了类似研究,认为附加了 2.4-D 5 mg/ L+KT lmg/L+ 蔗糖 3%的 N6, Heller 培养基诱导人参花药植株效果较 好, GA 和 LH 对人参花药愈伤组织的分化有良好作用。 之后,段承俐,张智慧等[9]对三七的花药愈伤组织诱导 进行探索,通过不同浓度的生长调节剂进行三因素四水

第一作者简介. 聂福(1984), 男, 吉林长春人, 硕士, 研究方向为植物细胞工程。

通讯作者: 王义(1964), 男, 副教授, 博士, 研究方向为药用植物生物技术及长白山药用植物开发。 E-mail: wanglaoshi2007 @tom.

基金项目:长春市科技局资助项目(2007GH31)。

收稿日期: 2010-01-11

平的正交试验,并确定在 MS 基本培养基中附加2,4-D 2.0 mg/L+BA 1.5 mg/L+IAA0.5 mg/L+蔗糖 6%的 条件下, 花药愈伤组织的诱导率达到最高。

# 原生质体培养及体细胞杂交

原生质体是指去除细胞壁的具有生命力的裸露细 胞,这种裸露的细胞仍然具有细胞的全能性。原生质体 培养就是以这种裸露的细胞原生质体作为外植体进行 离体培养。讲行原生质体培养的主要目的,是实现遗传 转化、基因瞬时表达、远缘物种的体细胞杂交、外源 DNA 染色体或细胞器的导入,从而对受体植物进行遗传性状 的改良。原生质体培养和体细胞杂交技术一直是植物 细胞工程的重要研究领域。在分离原生质体的材料选 择、培养基与培养环境控制、体细胞杂交技术等方面进 行了大量研究,建立了原生质体培养和体细胞杂交的技 术程序[101]。 五加科植物原生质体培养方面的研究最 初见于 Ham 等<sup>12</sup> 用人参幼叶, 幼根和上胚轴进行原生 质体分离,但得到的数量很少,无法进行培养。邢朝斌 等13 报道用纤维素酶和果胶酶对刺五加幼叶进行原生 质体分离。程强、丁家宜等[14] 以人参的愈伤组织为材 料, 经酶解获得大量原生质体, 并用浅层静止培养法获 得大量细胞团,最后获得原生质体来源的愈伤组织。高 利19 以5 a 生西洋参为材料, 研究了纤维素酶种类和浓 度等对西洋参原生质体游离的影响,并探讨了西洋参叶 肉原生质体在 KM8P, MS 基本培养基的分裂情况。目 前相当多药用植物在原生质体培养上存在技术困难,需 进一步加强多学科交叉研究以及技术集成和创新。

自 1972 年 Carlson 16 首次获得粉蓝烟草和郎氏烟 草的体细胞杂种,实现了烟草种间杂交,1978年 Melchers[17] 将马铃薯与番茄进行原生质体融合,首次获得了 属间体细胞杂种植株以来,体细胞杂交已在许多植物的 种内、种间、属间甚至科间成功实现而且由于体细胞杂 交技术的不断完善,利用细胞融合技术,还获得了一些 特异的新种质, 如细胞质雄性不育水稻、细胞质雄性不 育烟草等。五加科植物体细胞杂交方面的研究较少,石 英俊[18] 等的研究用比色法和 HPLC 法分别测定西洋参 和胡萝卜体细胞融合培养愈伤组织中多糖和人参皂苷 Rb1 含量。杨晶[19] 等初步探讨人参与胡萝卜在共培情 况下进行原生质体融合,通过胡萝卜的快速生长特性提 高人参产量。目前长期的近缘杂交可导致作物基因资 源扁乏,转向亲缘关系较远的物种间的体细胞杂交是解 决这一问题, 寻求携带优良性状基因的必要途径之一。

## 4 发状根培养

发状根培养又被称为转基因器官培养,是一条利用 生物技术生产次生代谢产物的新的有效途径, 很适用于 有价值的次生代谢产物的生产。目前国内学者将发根 培养技术应用于药用植物方面的研究。先后成功地对绞 股蓝、人参、西洋参等20多种药用植物进行发状根诱导。 但五加科来说,诱导人参发状根的报道较多,1987年,日 本学者 Yoshilawa 等<sup>20</sup> 首次在人参愈伤组织上诱导发 根获得成功,并从发根中分离出人参皂苷,此后世界各 国学者展开了关于人参培养条件、皂苷含量等方面的报 道。1999年,王冲之,丁家宜河等以西洋参胚为材料,用 含 Ri 质粒的发根农杆菌菌株及经过胡萝卜提取液处理 的该菌株感染无菌苗切段,在外加萘乙酸6 mg/L的 MS 琼脂培养基培养后获得发根。PCR结果表明, T-DNA 整合到西洋参基因组中。之后王冲之[22] 等分析了6种 液体培养基对西洋参皂甙含量的影响,并说明1/2MS毛 壮根生长的最差, SJ-1 生长的最好。2000 年, Yang 等[2] 通过由人参发根诱导的胚性愈伤组织获得了再生植株 并且获得具有强分生能力根系的转化植株。刘峻、丁家 官等[2]利用含有 Ri 质粒的发根农杆菌感染人参发状根 诱导,并首次从人参带叶幼茎处诱导出毛状根发状根, 在无激素 B5 培养基上生长并失去向地性,利用 PCR 证 实农杆菌 Ri 质粒所含有 rolc 序列已整合到人参转化株 的染色体组中。另据报道,人参发根具有转化多种有机 化合物的能力。在各种反应器中,波浪式反应器最利于 人参发根的生长, 定期补充和更新培养基以及长期培养 可以提高人参发根的产率和合成人参皂苷的能力。 2008 年王建华, 薛健, 赵寿经等<sup>[3]</sup> 采用 L<sub>2</sub> (3<sup>4</sup>)正交试验 设计方法研究了 2,4-D、KT 和 6-BA 3 种植物生长调节 物质在人参发根愈伤组织诱导中的作用。优选出人参 发根愈伤组织诱导的最佳培养基为 MS+2,4-D 1 mg/L+ 6BA 0.1 mg/L;人参发根愈伤组织生长的最优培养基为 MS+2, 4-D 1.5 mg/L+KT 1.5 mg/L。Seo 等[20] 报道 对于刺五加用下胚轴的胚根外植体诱导毛状根比单独 用胚根培养高,并证明固体 MS 培养基种加入 IAA 有利 于毛状根生长和繁殖。

#### 大规模细胞培养

自从 1956年 Routine 和 Nickel 首次提出用植物组 织培养生产次生代谢产物, 在短短的几十年里, 研究工 作飞速发展,植物大规模细胞培养受到国内外研究者们 的广泛关注。2002年,Jeong Gwi-Jack 等27 通过用大容 量瓶,泡罩塔生物反应器和空气搅拌器培养人参发状 根,并得出泡罩塔生物反应器和空气搅拌器毛壮根生长 量是大容量瓶的三倍之多,泡罩塔生物反应器和空气搅 拌器毛壮根生长量大约是 1:1。Jeong 等[2829] 的试验表 明,经过39 d 的培养,在5 L 的生物反应器中,发根的生 物量是接种时的 55 倍; 经过 40 d 的培养, 在 19 L 的生 物反应器中,发根的生物量是接种时的38倍。Abdullah Mohammad Shohael 等<sup>[30-31]</sup>人研究刺五加体细胞胚在生 物反应器培养中不同温度和不同光照对次生代谢产物 和抗氧化酶活性的影响,并指出低温可以增强其耐低温 性,增强细胞膜稳定性。在暗光培养 SOD、CAT 的最低,在蓝光下 G-POD 的活性活性最低,在红光 SOD、G-POD、CAT 的活性最高。Hu 等<sup>32</sup> 的研究发现,在1 L气泡柱反应器和同心管空气提升式反应器中,使用改良MS 培养基后,三七细胞的密度,人参皂苷的产量比摇瓶培养中的高。Woragidbumrung等<sup>33</sup> 研究发现,添加50%改良的MS 培养基在1 L 同心管空气提升式生物反应器中,三七的细胞生长速率和的三七生长速率、人参皂苷和人参多糖的产量比MS 培养基高很多。

#### 6 形态发生

形态发生是植物的外部形状和内部结构的起源、发 育和建成的过程。高等植物是一类高度进化的生物有 机体,由于植物体的分化而显出各种特化的机能和结 构, 如在外部分化出各种器官, 在内部则形成能执行不 同功能的各类细胞、组织和组织系统。植物形态发生有 两条途径,一是器官发生途径,是指植物的离体器官在 培养条件下的组织或细胞团(愈伤组织)分化形成不定 根、不定芽等器官的过程。二是体细胞胚胎发生途径。 体细胞胚胎发生途径和合子胚胎发生途径类似、是指体 细胞在特定条件下,未经性细胞融合发育成新的个体的 过程。 五加科植物的愈伤组织较容易发生不定根分化, 并且在分化出不定根之后很难再分化不定芽。由于通 过器官发生途径的再生植株变异率比较大,稳定遗传性 差, 所以体细胞胚胎发生途径再生植株是近来研究的热 点。体细胞发生途径归纳为直接途径和间接途径。直 接途径是从外植体表皮、原生质体的细胞团直接发育而 成,间接途径则是外植体首先脱分化形成愈伤组织,从 愈伤组织外层或内部发生胚性细胞团后进一步分化形 成体细胞胚。1968~1974年, Butenko 等[34] 和 Jhang 等35 最早研究人参和西洋参的器官发生和体细胞胚胎 发生,并进行了化学分析。之后各国学者对人参体细胞 胚胎进行了研究。Chio等[36]通过根、叶、茎、花芽、合子 胚等产生的愈伤组织诱导了体细胞胚胎发生,证明了不 同外植体所产生的愈伤组织都可诱导体细胞胚胎发生。 Lim 等[37] 发现叶柄是诱导愈伤组织的最佳材料, 而对于 诱导胚性愈伤组织来说,合子胚或幼嫩的小苗为最佳材 料,它们不仅诱导周期短,而且诱导率高。A saka 等[38] 将人参胚性组织经过高温处理后培养在高糖浓度 (100 g/L)的培养基(MS)上,产生了大量的人参胚状体, 其数量是常规蔗糖浓度(30 g/L)所产生的 10 倍左右,葡 萄糖与蔗糖具有相似的效应而甘露糖则无,将高糖浓度 培养基上产生的人参胚状体培养在常规蔗糖浓度的培 养基上可再分化成正常的小植株。Choi 等<sup>39</sup> 和邢朝 斌40 通过间接或者直接由愈伤组织获得刺五加体细胞 胚胎发生,并筛选出 MS 为诱导刺五加体细胞胚胎最适 合培养基,并说明在刺五加中既可以经过愈伤组织阶段 再分化出胚状体,也可以不经过愈伤组织而在肿大的子叶及胚轴上直接分化出胚状体。之后桂耀林等<sup>[4]</sup>报道,在再生培养基中使用麦芽糖取代蔗糖后,更有利于体胚的萌发,并获得大量体细胞胚胎,证明麦芽糖可能作为一种催熟因子诱导停滞在前期的体胚发育至成熟的体胚,从而有利于体胚的萌发。

#### 7 存在的问题及解决策略

虽然对五加科植物进行了大量研究,但仍存在着许多问题。一是研究主要集中于基础探索阶段,如愈伤组织培养体系和体细胞、性细胞以及原生质体全能性的证实等,虽取得成绩,但对有关植物细胞全能性表达和内在机制的调控等未进行更深入的研究;二是植物培养的操作复杂、烦琐、培养周期长、在培养中易出现褐化现象、体细胞胚胎的个体差异大、移栽成活率低、遗传转化程序复杂等问题,使其很难应用于大规模生产实践;三是若应用于生产实践中,如进行无性快速繁殖,常常会遇到无性系变异产生,甚至失去植物正常分化能力等诸多现象;四是对于五加科植物研究的相对不平衡性,学者主要倾向于研究五加科植物药理、药性等方面,对于遗传转化和再生体系研究很少。

五加科植物作为药用植物的重要组成部分,需求量日益增加,因此对五加科植物细胞工程的研究工作势在必行。深入研究五加科植物细胞全能性表达和内在机制的调控,建立高效稳定的悬浮体系,加强愈伤组织与细胞分化的研究,建立适当的培养体系满足于生物反应器生产五加科药用成分的要求,从而为五加科植物大规模生产奠定坚实的基础。

## 参考文献

- [ ]] 向其柏 Callen D. 中国五加科花粉形态研究[ J]. 植物研究, 1988 3 (1); 13.
- [ 2] 孙敬三, 朱至清, 王海波, 等. 植物细胞工程实验技术[ M]. 化学工业出版社, 2006: 140.
- [3] 郭生桢 李蕙芝,潘景丽,等. 人参愈伤组织诱导[J]. 西北植物研究 1982, 2(2): 116-123.
- [4] 金英善 曹后男. 东北刺人参愈伤组织诱导[J. 延边大学农学学报, 2003, 25(1): 16-19.
- [5] 郑光植 王世林. 三七愈伤组织的培养[J]. 云南植物研究 1989, 11 (3): 255-262.
- [6] 刑朝斌 沈海龙 刺五加成熟种子的愈伤组织诱导及其 RAPD 分析 [J]. 种子, 2003, 25(1):16-19.
- [7] 杜令阁 侯艳华,常维春,等. 人参花粉植株的诱导及体细胞无性系的建立[J]. 中国科学(B集), 1987(1); 35-41.
- [8] 邵启金, 李安生, 魏蓉萱. 人参花药植株再生及无性系的建立[J]. 科学通报, 1986, 31(2): 143.
- [9] 段承俐 张智慧, 文国松, 等. 三七花药培养的研究 I. 愈伤组织的诱导[]. 云南农业大学学报, 2004, 19(5): 510-513.
- [10] Yagishi H, Landgre M, Forsberg J et al. Production of asymmetric hybrids between Arabidopsis thaliana and Brassica napusutilizing an efficient protoplast culture system [J]. Theor Appl Genet 2002 104:959-964.

- [11] 陆柳英, 莫饶 李开绵. 植物体细胞无性系变异技术的研究进展[]]. 广西农业科学, 2007, 38(3): 238-243.
- [12] Harn C. Studiyon the tissue culture of panaxginseng. Proceedings [D] . Of International Ginseng Symposium, 1974; 9-22.
- [13] 刑朝斌, 沈海龙. 赵星宇, 等. 刺五加幼叶原生质体的分离法[]] 植物 生理学通讯 2006 42(2):288-290.
- [14] 程强, 韩碧文, 丁家宜. 人参原生质体培养再生愈伤组织[3]. 北京农 业大学学报, 1988(1); 25-29.
- [15] 高利.西洋参叶肉原生质体的游离与培养[J].安徽农业科学,2007, 35(23): 7194-7195.
- [16] Carlson P S. Parasexual interspecific plant hybridization, Proc [J]. Natl. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 2292.
- [17] Melchers L. Lazar Gand Maliga P. Isolation of somatic hybrids by cloning Nicotiana heterokaryons in nurse culture J. Plants, 1978, 143, 29.
- [18] 石英俊,牟彩萍,巩丽丽,等.西洋参与胡萝卜体细胞融合愈伤组织 中有效成分分析[J]. 山东中医药大学学报, 2006(1): 78-81.
- [19] 杨晶, 张美萍, 王义, 等. 人参与胡萝卜共培养研究及其原生质体融 合的初步研究[], 2008, 29(1): 55.
- [20] Yoshikawa T, Furuta T. Saponin production by cultures of Panax ginseng transformed with Agrobacter-ium rhizogens [J]. Plant Cell Rep. 1987 (6): 449-453.
- [21] 王冲之,丁家宜. Ri 质粒转化西洋参的研究. 西洋参毛状根培养系 统的建立及鉴定[J]. 药物生物技术, 1999, 6(2): 80-84.
- [22] 王冲之,丁家宜,不同培养基及外源激素对西洋参毛壮根生长和皂 甙含量的影响[J. 植物资源与环境学报, 2001, 10(4): 1-4.
- [23] Yang D C, Choi Y E. Production of transgenic plants via A groba cterium rhizogenes-mediated transformation of Panax ginseng [J]. Plant Cell Rep. 2000, 19: 491-496.
- [24] 刘峻, 丁家宜. Ri 质粒转化人参系统的建立与鉴定[ ]. 中国中药杂 志, 2001, 26(2):95-99.
- [25] 王建华, 薛健 侯春喜, 等. 人参发根的愈伤组织诱导[]]. 吉林农业大 学学报 2008 30(5):700-704,711.
- [26] Seo J W, Shin C G, Choi Y E. Mass prodution of adventitions roots of Eleu the rococcus sessiliflous through the bioreactor culture [ J]. Plant Biotechnol, 2003, 5(3): 187-191.
- [27] Jeong Gwi-tack, Don-Hee Park. Studies on mass production of transformed by A. rhizogeneswere compared between flask and acrated column or stirred bioreactor [ J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2002, (98-100) spring: 1115-1127.
- [28] Jeong G T, Park D H, Ryu H W, et al. Optimum conditions for transformed panax girseng hair roots in flask culture [J] . Appl Biotechmol 2002,

- Spring (98-100): 1129-1139.
- [29] Jeong G T, Park D H, Hwang B, et al. Comparisn of growtch characteristics of pannax ginseng hairy root invarious bioreactors [ J . Appl Biochem Biotechnol 2003 Spring (105-108): 493-503.
- [30] Abdullah Mohammad Shohael, Mohammad BabarAli, Yu K W, et al. Effect of temperature on secondary metabolites Production and antioxidant enzyme activities in Eleutherococcus senticosus somatic embryos [J]. Plan Cell. Tissue and Culture. 2006; 5-6.
- [31] Shohael A M, Ali M B, Yu K W, et al. Effect of fight on Oxidative stress secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in Eleutherococcus senticosus somatic embryos in bioreaetor [J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 1179-1185.
- [ 32] Hu W W, Yao H, Zhong J J. Improvement of Panax notoginseng cell culture for production of ginseng saponin and polysaccharide production in high density cultivation in pneumatically agitated bioreactors [ J] . Biotechnol Prog, 2001, 17(5): 838-846.
- [33] Woragiolbumrung K, Penporn S T, Yao H, et al Impact of conditional medium on cell cultures of Panax notoginseng in an airlift bioreactor [ J]. Process Biochem, 2001, 32(7); 209-213.
- [34] Butenko R.G., Brushwitzky I.V., Slepyan L.I. Organogenesis and somatic embryogenesis in the tissue culture of panax ginseng C. A. Meyer [ J] . BOT ZH, 1968(7): 906-913.
- [35] Jhang J J, Staba E J, Kim J. American and Korean ginseng tissue cultures: growth chemical analysis and plant production [J]. In Vitro, 1974(9):
- [36] Choi Y E. Ginseng [J]. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 2007, 61; 149-168.
- [37] Lim H T, Lee Hs, Eriksson T. Regeneration of panax ginseng C. A. Meyer by organogenesisand nuclear DNA analysis of regenerants [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1997, 49, 179-187.
- [38] Asaka I, Li I, Hrotani M, et al. Mass production of Ginseng (Panax ginseng) embryoids on media containing high concentrations of sugar [ J. J Med Plant Res, 1994, 60(2); 146-148.
- [39] Choi Y E, Kim J W, Yoon E S. High frequency of plant production via somatic embryogenesis form callusor cell suspension cultures in Eleutherococcus senticosus [ J] . Ann of Bot, 1999, 83; 309-311.
- [40] 邢朝斌, 沈海龙, 赵丽娜, 等. 刺五加的体细胞胚胎发生研究[1]. 中草 药, 2006, 37(5); 769-772.
- [41] Guo Z C, Gui Y L. Plant Somatic Embryogenesis and A rtificial Seed [ M] . Beijing: Science Press, 1990.

# Advances in Studies on Plant Cell Engineering of Araliaceae

NIE Fu, ZHANG Mei-ping, SUN Chun-yu, JIANG Shi-cui, WANG Yi (College of Life Sciences, Jilin Agricultere University, Changchun, Jilin 130118)

**Abstract:** This article introduced the situation of the Araliaceae plant cell engineering home and abroad, including the callus tissue culture, anther and pollen culture, hairy root culture, protoplast culture and somatic cell hybrid, large-scale cell culture and the morphogenesis of the culture. And the article the problems exists and suggests some solving strate-

**Key words**: A raliaceae; cell engineering; tissue culture