

诱导植物体细胞胚发生的几个因素研究

木合热皮亚·艾尔肯, 张富春

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘 要:植物体细胞胚胎发生及植株再生能力受多种因素的影响。该文综述了植物体细胞胚胎发生的影响因素, 包括培养方式、植物基因型、外植体来源、培养基成分等, 以期对植物遗传研究和转基因研究提供理论参考。

关键词:体细胞胚胎发生; 影响因素; 外植体来源

中图分类号:Q 943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)03-0194-04

植物体细胞胚胎发生系统不仅是植物快速繁殖的一种手段, 而且也是研究植物遗传学、建立转基因工程体系、植物生理生化、植物发育过程中的基因表达和调控机制的前提之一。然而, 经前期国内外科研工作者的不懈努力, 对于高等植物建立比较有效地体胚发生和再生体系, 获得了相当数量的再生植株, 但由于对再生植株发生过程中的机理不清楚, 激素之间调配不恰当等一些原因, 使再生效率不高。1902 年德国植物学家 Haberlandt 证明植物细胞有全能性, 这一学说是现在所有植物组织培养体系的理论基础。也预示了在适当的培养条件和培养方式下高等植物细胞转化为体细胞胚的潜在可能性。

1 培养方式对体细胞胚产生的影响

培养方式分为固体培养、固液交换培养和悬浮培养 3 种。

目前体细胞胚诱导及植株再生使用的固体基本培养基分为 MS、1/2MS、MA、MT、White 培养基、MSB₅、SH 等几种, 一般采用较多的是 MS 基本培养基。李福安等^[1]研究比较了 MA 和 MS 2 种基本培养基对龙牙楸木幼芽胚胎发生的影响, 证明 MS 是诱导龙牙楸木体细胞胚胎发生的最适基本培养基。不同的植物种类对基本培养基的选择也有物种特异性。如柑橘在 MT 固体培养基的愈伤组织生长速度与体细胞胚胎发生之间的比率为最佳^[2]。紫花苜蓿愈伤组织在改良的 SH 大量元

素和 MS 微量元素的培养基上能直接分化成大量胚状体^[3]。而对楸树体细胞胚胎发生和子叶胚萌发成完整幼苗的最佳培养基比较时发现, 4 种基本培养基(MS、1/2 MS、NM、N₆培养基)中, 1/2MS 为最佳诱导培养基^[4]。

虽然固体培养是组织培养时普遍采用的培养方式, 但植物外植体在固体培养基上只能吸收其周围的营养物和激素, 不能充分吸收培养基其它部位的营养成分。也有人采用固-液-固培养方式获得了分化能力强的胚性愈伤组织和高质量的体细胞胚。杨映根等^[5]以青杉的胚性愈伤组织为材料, 比较液体悬浮于半固体 2 种培养方式对胚性愈伤组织增殖和体细胞胚发生的影响, 在固-液-固培养基上体细胞胚发生频率达到 93%。

植物悬浮培养, 即在液体培养基里震荡培养单细胞或小细胞团的培养方法, 因为培养周期短, 操作较方便, 重复性好, 同步控制等优势已经成为生物技术中最有用的研究手段之一^[6]。曹景林等^[7]把棉花胚性愈伤组织振荡培养使其充分分散后过滤再振荡培养获得发育同步的胚状体。王旭英^[8]经 4 个多月就可得到分散性好生长快的悬浮细胞培养物。此外, 因为悬浮培养转化效率高, 能够以最小的重排转移大块的 DNA, 整合的转基因拷贝数相对较低, 稳定表达和容易继代等优势, 故悬浮培养细胞也是获得大量转基因株系的重要来源^[9]。

2 植物基因型对体细胞胚产生的影响

前期的很多研究都表明, 通过体细胞胚胎发生得到再生植株具有很高的基因依赖性, 换句话说, 很多植物类型中只能某些品种才能具有体细胞胚产生能力^[10]。比如, 棉属的不同棉种之间及同一棉属不同品种之间体细胞胚胎发生植株再生能力存在着很大的差异^[11], 国外品种中, 珂字棉最容易形成体细胞胚和再生, 爱字棉和斯字棉较难再生, 岱字棉不能再生; 国内品种中, 与黄河流域的品种比较, 长江流域的品种获得胚性愈伤组织较难, 植株再生能力相对较弱, 只有很少一部分品种可以

第一作者简介:木合热皮亚·艾尔肯(1986-), 女, 在读硕士, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: muherepiya@163.com.

责任作者:张富春(1962-), 男, 博士, 教授, 现主要从事植物分子生物学等研究工作。E-mail: zfcxju@sina.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30960035); 新疆生物资源基因工程重点实验室开放课题资助项目(XJDX0201-2010-01)。

收稿日期:2012-10-22

得到再生苗^[12-13]。模式植物小麦的体细胞胚发生也存在较高的基因依赖性。梁竹青等^[14]用9个冬小麦春系材料进行离体培养,发现不同基因型之间诱导体细胞胚的频率有显著差异。而姚庆荣等^[15]研究基因型对木薯体细胞胚胎发生也发现供试的6个品种之间体细胞胚胎发生率相差极大。因此,选择胚胎发生能力较强的品种诱导体细胞胚胎发生是植物再生体系建立的关键之处。

3 外植体对体细胞胚产生的影响

植物的每一个活细胞都能产生体细胞胚,但大部分研究中都利用生长活跃,生理代谢旺盛的细胞或者组织器官作为外植体^[16]。有的组织和器官形成愈伤组织但不能诱导出体细胞胚。以楸树无菌苗子叶、下胚轴、叶片、茎段和根系为外植体,不同外植体的不仅愈伤诱导率存在显著差异,而体胚诱导率也存在极显著差异,以子叶体胚诱导率最高,为10.69%;茎段和根系虽然能诱导愈伤组织但均未能诱导出体细胞胚胎^[4]。不仅是不同组织甚至是组织不同部位诱导胚性愈伤组织也有着差异。宁夏枸杞胚性愈伤组织的诱导和体细胞胚发生时相对于根尖部位,根基部的切段更容易诱导胚性愈伤组织的形成^[17]。

4 培养成分对胚胎发生的影响

针对不同类型的植物或者同一植物的不同品种,培养基成分也应有所改变。影响体细胞胚胎发生的众多元素中,植物的基因型和外植体取材的部位以及基本培养基中附加的植物生长调节剂、金属离子、碳源都不同程度的影响。

4.1 激素及生长调节物质

适当的选择培养基中的植物激素是诱导体细胞胚胎发生的决定性因素,也是影响植物再生的主要因素^[18]。植物体内激素可分为生长激素、细胞分裂素、脱落酸、赤霉素和乙烯等5类。组织培养时激素种类选择不当,如激素浓度过低或过高都会对植物细胞的生长和代谢产物的形成有抑制作用。培养基中加入的植物激素的种类,浓度及激素之间的配比都强烈影响胚性愈伤组织的诱导率,许多研究证明,生长素与细胞分裂素配合使用比单独使用诱导效果好^[19]。因为生长素和细胞分裂素之间有一定程度的相互协同作用^[20]。这些配合中以KT与2,4-D的配合使用较多。在苜蓿体细胞胚诱导中KT 0.25 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L诱导出体细胞胚^[3,21]。方智振等^[21]研究龙眼体细胞胚胎发生的同步化控制时发现,2,4-D与KT配合使用体细胞胚胎发生效率比单独使用2,4-D的效果好。

大多数植物体细胞胚胎发生是在生长激素2,4-D的诱导下产生的,特别是禾谷类植物在诱导愈伤组织和

胚性愈伤组织过程中均须添加2,4-D^[22]。但胚性愈伤组织向发育胚状体和再生苗时,培养基中不需添加2,4-D,这说明2,4-D的作用有阶段性,在诱导胚性愈伤组织阶段促进,而在胚状体发育成完整植株阶段抑制^[23]。比如,诱导花生体细胞胚的培养基中必须要加2,4-D,但球形胚变成鱼雷胚的时候一定要把2,4-D去掉^[24]。还有科学家在2,4-D诱导体细胞胚的机制发现,2,4-D是诱导一些特异蛋白质形成,2,4-D的浓度与DNA甲基化有关,通过改变细胞内源IAA代谢而起作用,因而诱导体细胞胚胎发生^[25]。

BA是促进胚性愈伤组织和体细胞胚的发生。BA与生长素组合对体胚诱导的效果优于只添加生长素的培养基^[26-27]。在含6.66 mmol/L BA,6.78 mmol/L 2,4-D的培养基上阿拉胶的胚性愈伤组织快速扩繁^[28]。GA₃对龙眼体胚发育表现出负作用^[29],这与在大部分植物中GA₃抑制体细胞胚的正常发育^[30]的结论是一致的。还有棉花胚胎发生时大部分将KT和IBA配合使用^[31]。这些例子说明植物基因型不同,所选择的生长激素和细胞分裂素不同,但二者配合使用最有效。

4.2 各种离子对体细胞胚成熟的影响

目前确定了以下17种高等植物必需营养元素:氮(N)、磷(P)、钾(K)、钙(Ca)、镁(Mg)、硫(S)、铁(Fe)、锰(Mn)、锌(Zn)、铜(Cu)、钼(Mo)、硼(B)、氯(Cl)、碳(C)、氢(H)、氧(O)和镍(Ni)^[32]。由于植物对它们的需要量不同以及同种植物不同阶段的耗量不同,所以应针对具体试验目的考虑这些离子的浓度。N作为各种氨基酸、维生素、蛋白质和核酸的重要组成部分,对体细胞胚发生有一定的影响。培养基中氮主要以铵态氮,硝态氮2种形式被利用,无论哪种,张万军等^[3]、韩晓玲等^[33]分别证明高氮含量对植物体细胞胚胎发生和发育有重要的促进作用。磷参与细胞呼吸能量储存转化与释放等重要的生命活动,并常以KH₂PO₄、NaH₂PO₄等盐的形式供给。钾与碳水化合物的合成,转移以及氮素代谢等有密切关系,主要由KCl、KNO₃、KH₂PO₄等提供^[34]。大部分植物体细胞胚胎发生机制研究中主要考虑的都是氮源和一些金属离子。宁夏枸杞,在添加Ca²⁺和AgNO₃时,能有效地促进胚性愈伤组织的生长,甚至形成的体细胞胚数几乎可达到对照中的2倍^[35]。在未加任何激素的分别添加CoCl₂、NiCl₂、CuCl₂、ZnCl₂、CdCl₂均可诱导胡萝卜体细胞胚发生以及成熟^[36]。

4.3 碳源对胚萌发的影响

在植物组织培养中糖类不仅为培养物提供能量,而且是培养物渗透环境的主要调节者^[37],在植物组织培养中多使用葡萄糖、蔗糖和麦芽糖。小分子量的糖类(如蔗糖)可以渗入活细胞内,使体细胞胚呈现脱水现象,从而促使体细胞胚成熟^[38]。在很多植物体细胞胚萌发过

程中低的浓度蔗糖有利于体细胞胚形成和幼胚的萌发,随着蔗糖浓度增加,抑制体细胞愈伤组织,萌发率必然会也有降低趋势,但蔗糖浓度过低时易形成畸形苗^[39-40]。

在组织培养中经常出现胚性愈伤组织褐化情况,棉花、马铃薯、大豆等一些多酚类植物组织培养研究者首先考虑碳源的最适浓度。麦芽糖作为碳源,与葡萄糖和蔗糖相比能更有效的抑制植物细胞的褐化并促进体细胞胚胎发生,提高多酚类植物胚状体萌发以及促进根的生长^[41]。

5 结语

随着植物组织培养以及应用的发展,植物体细胞胚胎发生也即开始走向大规模的应用阶段,同时研究工作也更加深入和扎实。通过与常规育种、良种繁育和遗传工程技术相结合,在植物改良中发挥了重要的作用。现在已经发展了胡萝卜,并在菊苣、苜蓿、拟南芥、针叶树类等模式植物以及花生、小麦、棉花、橙子等经济作物和药用植物的体细胞胚发生方面有了较为深入的研究。不过,体细胞胚胎发生是多种内、外因素的影响与调节相互作用的产物,除了该综述讨论的基因型、外植体类型、碳源以及植物生长调节剂以外,还有温度、各种重金属离子胁迫、干旱胁迫、盐胁迫,以及活性炭等因素,均有待进一步研究。

参考文献

- [1] 李福安,李建民,李喜文,等. 培养因素对龙牙楸木体细胞胚胎发生的影响[J]. 四川大学学报,2004,12(6):1260-1263.
- [2] 张俊娥. 柑橘愈伤组织生长速度与体细胞胚胎发生的关系[J]. 广西植物,2010,30(5):682-685.
- [3] 张万军,王涛. 紫花苜蓿愈伤成苗高频再生体系的建立及其影响因素的研究[J]. 中国农业科学,2002,35(12):1597-1583.
- [4] 江荣翠,彭方仁,谭鹏鹏. 楸树体细胞胚胎发生研究[J]. 林业科技开发,2010,24(1):51-54.
- [5] 杨映根,谷瑞升,郭仲琛. 青杆胚性细胞悬浮培养中影响体细胞胚发生因素的研究[J]. 云南植物研究,1999,21(1):114-120.
- [6] 孙敬三. 植物细胞工程实验技术[M]. 北京:科学出版社,1995:35-83.
- [7] 曹景林,张献龙. 棉花高效体细胞胚发生及同步控制培养体系研究[J]. 作物学报,2008,34(2):224-231.
- [8] 王旭英. 杂交梗稻的胚性愈伤组织及胚悬浮细胞培养[J]. 菏泽学院学报,2005(2):54-55.
- [9] Ishida Y, Ohta H S, Hiei Y, et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Nat Biotechnol,1996,14(6):74-75.
- [10] 孙敬三. 植物细胞工程实验技术[M]. 北京:科学出版社,1995:35-83.
- [11] Chi J N, Li X H, Wang X F, et al. The factors affecting on somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton[J]. Mianhua Xuebao (Acta Gossypii Sinica),2004,16(1):55-60.
- [12] 武秀明,刘传亮,张朝军,等. 棉花体细胞胚胎发生的研究进展[J]. 植物学通报,2008,25(4):46-47.
- [13] 蔡小宁,吴敬音,余建明. 陆地棉胚性愈伤组织诱导和植株再生[J]. 江苏农业学报,1997(13):225-230.

- [14] 梁竹青,高明尉. 不同小麦基因型对体细胞组织培养的反应[J]. 中国农业科学,1986(2):42-48.
- [15] 姚庆荣,郭运玲,孔华,等. 胞胚胎发生及植株再生研究[J]. 中国生物工程杂志,2008,28(12):52-56.
- [16] Shou H, Frame B R, Whitham S A, et al. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium* mediated transformation [J]. Mol Breeding,2004,13(1):13-18.
- [17] 胡忠,徐艳,高欢欢,等. 影响宁夏枸杞愈伤组织体细胞胚发生的因素[J]. 汕头大学学报,2006,11(4):21-22.
- [18] Małgorzata D, Trojanowska G A, Ujczak A, et al. Beata Garbaciak. Hormone-response mutants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. impaired in somatic embryogenesis[J]. Plant Growth Regul,2006,11(49):183-197.
- [19] 王辉,顾兴芳,张圣平. 预处理和外源激素对黄瓜未授粉子房的胚状体诱导的影响[J]. 华北农学报,2008,23(增刊):50-53.
- [20] 谢友菊,陈璐,戴景瑞. 玉米体细胞胚状体诱导及其植株再生的研究[J]. 遗传学报,1988,13(2):113-119.
- [21] 方智振,赖钟雄. 龙眼体胚发生中期发育同步化的初步调控[J]. 中国农学通报,2009,25(1):152-155.
- [22] 崔凯荣,陈克明,王烧哲,等. 植物体细胞胚胎发生研究的某些现状[J]. 植物学通报,1993,10(3):14-20.
- [23] 冯大领,李伟,张洁,等. 黄山栎树体细胞胚的发生和组织学观察[J]. 植物生理学通讯,2009,9(9):855-858.
- [24] 肖显华,林荣双,王庆华,等. 2,4-D 诱导的花生体细胞胚发生的组织学研究[J]. 植物学通报,1999,16(6):691-695.
- [25] 谢友菊,陈璐,戴景瑞. 玉米体细胞胚状体诱导及其植株再生的研究[J]. 遗传学报,1988,13(2):113-119.
- [26] 宁国贵,吕海燕,张俊卫,等. 梅花不同外植体离体培养及体细胞胚诱导植株再生[J]. 园艺学报,2010,37(1):114-120.
- [27] Rashmi M, Nanda, Rout G R. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia arabica*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2003,73:131-135.
- [28] Hutchinson M J, Krishna R S, Saxena P K. Inhibitory effect of GA₃ on the development of thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium* · *Hortorum* Bailey) hypocotyl cultures[J]. Plant Cell Rep, 1997(16):435-438.
- [29] 赖钟雄,陈春玲. 龙眼体细胞胚胎发生过程中的内源激素变化[J]. 热带作物学报,2002,6(23):41-47.
- [30] Takeno K, Koshioka M, Pharis R P, et al. Endogenous gibberellin-like substances in somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* · *Vitis rupestris*) in relation to embryogenesis and the chilling requirement for subsequent development of mature embryos[J]. Plant Physiol,1983,73:803-808.
- [31] 迟吉娜,马峙英,韩改英,等. 陆地棉组织培养体细胞胚胎发生技术改进[J]. 棉花学报,2005,17(4):195-200.
- [32] 何念祖,孟赐福. 植物营养原理[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987:317-318.
- [33] 韩晓玲,王冰雪,林雪,等. 小冠花高效体细胞胚胎发生与植株再生的研究[J]. 西北大学学报,2006,3(3):420-423.
- [34] 胡笃敬,董任瑞. 植物钾营养的理论与实践[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1993:61-95.
- [35] 胡忠,徐艳,高欢欢,等. 影响宁夏枸杞愈伤组织体细胞胚发生的因素[J]. 汕头大学学报,2006,11(4):21-22.
- [36] Kiyosue T, Takano K, Kamada H, et al. Induction embryogenesis in carrot by heavy metal ions[J]. Can J Bot,1990,68:2301-2303.
- [37] 丁世萍,严菊强,李道薄. 糖类在植物组织培养中的效应[J]. 植物学

农耕科普园的建设与效果评估

高 瞻, 谭远军, 莫亚鹰, 张鹏翀, 陈丽丽

(杭州植物园, 浙江 杭州 310013)

摘 要:农耕教育对拓展中小学生素质教育, 促进人才培养具有重要意义。杭州植物园建立农耕科普园, 从农作物展示和农耕体验二方面开展农耕科普教育, 展示了粮食作物、蔬菜作物、纤维作物和油料作物, 以及轮作、间作制度和生物固氮。现以问卷调查的形式对农耕科普园的效果进行评估, 对农耕体验活动的参与度、认同度和科学性等进行了分析。

关键词:植物园; 农耕科普园; 农耕教育; 效果评估

中图分类号:S-01 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)03-0197-04

为贯彻落实《中华人民共和国科学技术普及法》, 继承和弘扬中国传统农耕文化, 进一步加强青少年科普教育, 杭州植物园于2010年建立了农耕科普园。农业是人类赖以生存和发展的基础, 农耕文化就是植根于农业生产和社会生活而形成的思想意识形态和价值观念^[1]。中国是世界三大农业起源中心之一, 拥有几千年的农业栽培历史。农耕文化是中国传统文化的重要组成部分, 是中华民族核心价值观的重要精神文化资源^[2]。杭州

植物园的农耕科普园主要从农作物展示、农耕制度展示和农事体验三方面向青少年及市民普及中国传统农耕文化。开展农耕科普教育既可以宣扬博大精深的中华文化, 又可以延伸中小学课堂教育、提高青少年的动手能力, 还可以培养中小學生树立正确的人生观、价值观。

1 杭州植物园的农耕科普园

1.1 农耕科普园的建设

杭州植物园农耕科普园位于桃花园景区以南(北纬30°15', 东经120°07'), 占地2 205 m², 属于亚热带季风性气候, 年平均气温17.5℃, 平均相对湿度70.3%, 年降水量1 454 mm, 年日照时数1 765 h, 土壤以红壤和黄壤为主, pH在4.9~6.5之间, 肥力适中。农耕科普园主要以展示中国传统农耕文化, 突出“农作物展示与科学体验”特色, 将农作物栽培、科普教育和体验农事活动等融

第一作者简介:高瞻(1973-), 女, 浙江杭州人, 本科, 工程师, 研究方向为植物科普与园林植物。E-mail: gaozhan0730@163.com.

基金项目:杭州西湖风景名胜区杭州植物园公众教育模式创新与功能提升建设资助项目(2009-009)。

收稿日期:2012-10-17

通报, 1998, 15(6): 42-46.

[38] 王立忱. 影响植物体细胞胚成熟因素的研究进展[J]. 防护林科技, 2009(1): 40-43.

[39] 马菊兰, 张博. 培养基、蔗糖和激素对苜蓿花药愈伤组织诱导的影响[J]. 新疆农业科学, 2007, 44(6): 839-844.

[40] 周思君, 伊光初, 张开旺, 等. 大豆体细胞胚胎发生影响因素的研究[J]. 植物学通报, 1992, 9(2): 38-43.

[41] 周琳, 马志卿, 冯俊涛, 等. 雷公藤生物碱制品对小菜蛾和菜青虫的控制效果[J]. 西北农林科技大学学报, 2006, 34(12): 169-173.

Study on Several Factors of Inducing Somatic Embryogenesis of Plant

Muherepiya · AIERKEN, ZHANG Fu-chun

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

Abstract: Somatic embryogenesis and plant regeneration affected by a variety of factors. The major factors influencing plant somatic embryogenesis, including plant culture conditions, genotypes, explant source and maintenance of cultures were briefly reviewed, hoping to provide a good theoretical reference for genetic research and transgenic studies in the future.

Key words: somatic embryogenesis; influencing factors; explant source