

# 花卉体细胞胚胎发生研究进展 Studies of Flowers Somatic Embryogenesis

蔡汉权<sup>1</sup>, 林珊珊<sup>2</sup>, 赖钟雄<sup>2\*</sup>

CAI Han-quan<sup>1</sup>, LIN Shan-shan<sup>2</sup>, LAI Zhong-xiong<sup>2</sup>

(1. 广东韩山师范学院, 广东潮州 521041; 2. 福建农林大学园艺植物生物研究所, 福建福州 350002)

(1. Hanshan Normal college, Chaozhou, Guangdong, 521041, China; 2. Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian, 350002, China)

**摘要:**综述花卉体细胞胚胎发生途径、体细胞胚胎发生过程的生理生化变化及其影响因素、体细胞胚胎发生与胚性基因的表达和花卉体细胞无性系变异等方面的研究进展,植物体细胞胚胎发生研究在基因工程体细胞融合、细胞突变体诱导、人工种子、杂种合子胚的挽救、种质保存、苗木快速繁殖等诸多方面有着广阔的应用前景,也是遗传学、转基因工程体系、生理生化、植物发育过程的基因表达和调控、功能基因组研究等方面一个必不可少的新兴研究系统。

**关键词:**花卉 体细胞胚胎 生理生化 胚性基因 无性系变异

中图分类号:Q945.6 文献标识码:A 文章编号:1002-7378(2006)02-0104-04

**Abstract:** This paper summarizes the progress on the studies of the somatic embryogenesis, the changes of physiological and biochemical in the somatic embryogenesis, the relationship of somatic embryogenesis and embryogenic gene, and the clone variation in flower. The studied of somatic embryogenesis would be importance for somatic cell fusion, individual cell induction, artificial seeds production, hybrid zygote embryo saving, genetic resources preserving and in vitro multiplication and so on. It's also a new system for genetics, transgene, physiological and biochemical changes and the gene expression, gene expression regulation and the genome functions in the process of plant development study.

**Key words:** flower, somatic embryogenesis, physiological and biochemical, embryogenic gene, clone variation

植物组织培养中从各种器官、组织以及悬浮培养的培养细胞和原生质体都可以诱导形成类似合子胚的培养物,它们结构与合子胚相似,但与合子胚起源不同,因此称为不定胚或胚状体(Embryoid),而由体细胞诱导的胚状体称为体细胞胚胎(Somatic Embryo),简称体胚<sup>[1]</sup>。胚状体的诱导为人工种子研制、单倍体育种、品种改良、优良种质的无性繁殖、植物转基因和突变体筛选等提供了材料和技术基础,具有重要实用意义,同时体细胞胚胎发生过程重现合子胚形态发生的特性,是细胞全能性表达的一种

方式,因此研究体细胞胚胎发生与发育机理对于揭示细胞与合子胚的分化、发育、形态发生等理论问题亦有重要意义。国内外学者在植物体细胞胚胎发生研究领域内做了很多工作,并取得了不少研究成果<sup>[2-5]</sup>。本文对体细胞胚胎发生途径、体细胞胚胎发生过程的生理生化变化及影响因素、体细胞胚胎发生与胚性基因的表达和花卉体细胞无性系变异等方面进行了综述。

## 1 体细胞胚胎发生的途径

Sondahl 等<sup>[6]</sup>把体胚发生方式概括为两种:一是从组织或细胞直接发生,不经过愈伤组织,称为直接体胚发生;二是经过愈伤组织阶段再分化为体胚,称为间接体胚发生。体细胞胚胎发生途径如图 1 所示<sup>[6]</sup>。

收稿日期:2006-03-28

作者简介:蔡汉权(1967-),男,广东潮州人,讲师,主要从事植物组织培养的教学和研究工作。

\* 通讯作者:男,博士,研究员,博士生导师, E-mail: Laizx01@163.com。

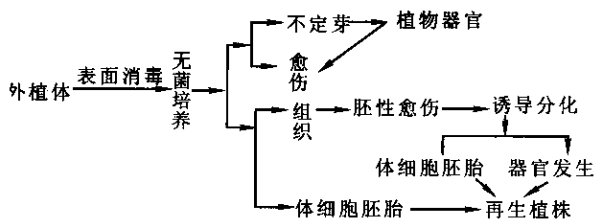


图1 体细胞胚胎发生途径

### 1.1 间接发生途径

由翠荣等<sup>[7]</sup>分别用仙客来 (*Persicum* Mill) 种苗的子叶和叶柄作为外植体,诱导不定芽的发生,研究了愈伤组织和不定芽形成过程中的组织细胞学变化,对两种不同外植体不定芽发生过程中的切片观察表明,两种外植体的组织脱分化始于维管束周围的维管束鞘细胞,随后开始分裂的是与其临近的薄壁细胞并能很快形成胚性分生细胞团。陈一华等<sup>[8]</sup>用拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 种子萌发长出无菌苗,并用幼根诱导形成胚性愈伤组织,由愈伤组织诱导体细胞胚胎发生,并研究了拟南芥体细胞胚胎发生体系中的体细胞类减数分裂。可以采用间接发生途径产生胚状体的花卉还有:长寿花 (*Jonquilla* Linn.)<sup>[9]</sup>、黑节草 (*Candidum* Wall. ex Lindl.)<sup>[10]</sup>、菊花 [*Morifolium* (Ramat.) Tzvel.]<sup>[11]</sup>、爬山虎 [*Tricuspidata* (Sieb. et Zucc.) Planch.]<sup>[12]</sup>、水晶掌 (*Harworthia cymbiformis* var. *triebnet* poelln)<sup>[13]</sup>、丽格海棠 (*Halliana* Koehne)<sup>[14]</sup>等。

### 1.2 直接发生途径

曹静等<sup>[3]</sup>采用白鹤 (*Acuta* Lour.) 花序为外植体,接种在以 MS 为基本培养基,附加 4~5mg/L 6-BA 的培养基上,经 25d 的黑暗培养,由外植体表面直接发生大量的体细胞胚胎,体胚发生频率达 96.5%,且无畸形胚出现,达到短期内高速繁殖白鹤芋的目的。可以采用直接发生途径产生体胚的花卉还有皇冠草 (*Echinodorus amazonicus*)<sup>[15]</sup>、金花茶 (*Camellia chrysantha*)<sup>[16]</sup>等。

## 2 体细胞胚胎发生过程中的生理生化变化及影响因素

花卉体细胞胚胎发生过程中伴随着一系列生理生化变化,这些变化在形态变化之前即已发生,在胚状体发生中的生理生化变化较之形态变化更为敏感。关于植物体细胞形态发生中生理生化变化的许多研究发现:蛋白质与核酸含量在细胞脱分化与再分化时将发生明显的规律性变化,奠定形态发生与建成的物质基础<sup>[17]</sup>。体细胞形态发生是一个复杂的代谢转换过程,必然涉及到多种代谢途径与多种酶

的变化<sup>[15,18]</sup>。另外植物体细胞在离体条件下的形态发生过程及发生类型是通过激素作用调节的,而激素是通过调控基因表达、细胞内代谢反应而起作用。但是关于激素在形态发生中的作用机理的研究,目前依然存在很多困难。因为植物细胞的基因调控机理尚不完全明确,而形态发生过程包括了极其复杂的生理生化变化,从本质上阐述这一过程还需更深入的探索。

### 2.1 蛋白质和核酸、活性氧在体胚发生中的变化

体细胞胚胎发生过程不仅有蛋白质、核酸含量的变化,而且有特异的胚性蛋白的形成或消失。屈妹存等<sup>[19]</sup>在四倍体龙牙百合 [*L. brownii* (F. E. Brown ex Mill) var. *viridulum* Baker] 形态发生的蛋白质、核酸与淀粉含量研究中,发现这些物质含量变化的消长曲线与形态发生的进程协调一致,证实了蛋白质与核酸含量在细胞脱分化与再分化时将发生明显的规律性变化的观点。核酸与蛋白质的新合成可能是形态发生历程的“信号”,而糖类物质则是通过及时提供能量与碳源影响形态发生。

活性氧在生理代谢过程中起着重要的调控作用。邢更妹等<sup>[18]</sup>指出植物早期的胚性细胞中 ATP 酶反应产物主要沉积于质膜和液泡膜上,后期 ATP 酶活性转入细胞内,液泡和细胞核中,而且在胚性细胞壁加厚处有活跃的 ATP 酶活性反应。SOD 活性与胚性细胞分化密切相关,胚性细胞具有较强的抗氧化能力,在胚性细胞分化和发育过程中存在程序性细胞死亡 (PCD),活性氧在诱发植物 PCD 的过程中起重要作用<sup>[17]</sup>。

### 2.2 乙烯和多胺在体胚发生中的作用

乙烯是广泛分布于植物体内而对其生长发育有多种调节功能的物质,目前对它们在植物组织培养过程中的生理生化作用已受到重视<sup>[20]</sup>。赤霉素、多胺等在体细胞胚胎发生中也有重要作用,研究表明多胺可能是类似“cAMP”那样的第二信使,作为植物激素的媒介而起作用,它参与体胚的发生,愈伤组织的形成,不定根、不定芽及花芽分化等植物离体培养的形态建成过程<sup>[21]</sup>。

低水平乙烯有利于胚性能力的启动或表达,高水平乙烯抑制体胚发生,高水平多胺促进体胚发生,与乙烯相互制约<sup>[22]</sup>。对于乙烯在离体植物形态发生中生理作用的研究大多采用乙烯生物合成、作用抑制剂来进行的,这为确定乙烯的生理作用提供了一定的线索,但这些外源添加剂往往是非专一性的,或者其本身还有一些与乙烯无关的生理作用。

### 2.3 内源激素所起作用

各种内源激素的代谢和动态平衡在细胞分化中也起着重要而关键的作用。内源 IAA 含量上升并维持在较高水平是胚性细胞出现的一个共同标志<sup>[23]</sup>。外源 ABA 有利于体胚发育和成熟<sup>[24]</sup>。邢更妹等<sup>[18]</sup>认为在体细胞胚胎诱导过程中内源激素起着关键性作用。在香雪兰 (*Freesia refracta*) 花序外植体离体培养中发现,培养前外植体切段两端的 IAA 含量无明显差别,但培养一段时间后,胚发生端(形态学上端)IAA 的含量明显高于非胚发生端(形态学下端)<sup>[2]</sup>。大量实验验证了 2,4-D 在胚性愈伤组织的诱导中起着重要作用,有实验结果表明,2,4-D 通过改变细胞内源 IAA 代谢而起作用<sup>[20]</sup>。

余茂德等<sup>[25]</sup>在桑 (*Alba* Linn.) 离体再生过程中内源激素变化的研究中,发现内源激素的变化与桑离体器官的发生之间显示出密切的关系,实验还发现在添加 AgNO<sub>3</sub> 后,ABA、IAA、iPAs 浓度降低,DHZR<sub>s</sub> 和 ZR<sub>s</sub> 的浓度比对照有所提高,推测 AgNO<sub>3</sub> 在桑组织培养中,可能通过调节内源激素的含量与比例,影响形态发生。

### 2.4 生长调节剂对体胚发生的影响

植物体内的内源激素平衡受外源生长调节物质的影响,生长调节剂的使用在调节植物形态发生中具有重要作用。韩碧文<sup>[26]</sup>把体细胞发生与激素的关系归结为 3 种情况:(1)不需加任何生长调节剂,(2)必需加生长素和细胞分裂素,(3)只需加生长素类。刘明志等<sup>[27]</sup>设计了 15 种不同配比的激素组合研究 2,4-D 和 6-BA 对百合鳞片叶器官发生和体细胞胚胎发生的影响,结果表明:在 MS 培养基上,BA 可诱导外植体直接分化不定芽;2,4-D 可直接诱导体细胞胚胎发生,其中 4.0mg/L 2,4-D 诱导体细胞胚胎发生的频率最高;当培养基中同时含有 BA 和 2,4-D 时,既出现不定芽,又出现体细胞胚胎。

焦海华<sup>[28]</sup>将继代培养的愈伤组织,接种到多种培养基上,进行胚状体的分化培养,其中以 MS+ZT1.0mg/L+2,4-D0.5mg/L 效果最好。陈雄等<sup>[29]</sup>以宁夏枸杞 (*Barbarum* Linn.) 无菌苗叶片为材料,发现不同激素处理、可溶性蛋白质含量、组分和体细胞胚胎发生频率均有一定的差异,三者之间存在着相关性。

## 3 体细胞胚胎发生与胚性基因的表达

体细胞胚胎发生,归根到底是体细胞在各种内外因素的作用下,启动了某些特异基因的表达,表现

为胚性蛋白的产生。体细胞胚胎发生中基因表达的研究有两种方式,即分离体胚发生中的基因并鉴定该基因的功能;或是从非胚性组织中分离一些基因,进而了解这些基因的表达差异及其在体胚发生中的作用<sup>[20]</sup>。崔凯荣等<sup>[30]</sup>发现在枸杞胚性愈伤组织和早期胚体中有特异基因的表达,这种基因在胚性愈伤组织中没有表达,表明它是胚胎发生相关性基因,这种基因的表达对胚胎发生具诱导和促进作用。目前研究得比较清楚的有以下几种基因:编码晚期胚胎发生丰富蛋白(LEA)的基因、体细胞胚胎分泌蛋白基因、脂体跨膜蛋白基因、与翻译有关的延伸因子 EF-1 的基因和 ATP 合成酶亚基的基因、另外还有体胚发生中的“非胚性基因”等<sup>[31]</sup>。但国内对于花卉体细胞胚胎发生过程中的基因表达领域的研究尚未见报道。

## 4 花卉的体细胞无性系变异

体细胞无性系泛指任何形式的体细胞培养所再生的植株,而体细胞无性系变异则指体细胞无性系再生植株与亲本比较所表现的变异<sup>[32]</sup>。花卉体细胞无性系变异研究的植物种类虽然不多,但几乎都发现了在离体培养中存在着不同程度的变异,其变异性状以花色、花期、叶色、株型等观赏性状为主,并广泛地表现在离体培养的再生植株上<sup>[33]</sup>。体细胞无性系变异受多种因素影响,如外植体的来源、外源激素、继代培养的时间、再生植株的方式、外植体细胞中预先存在的变异等<sup>[32]</sup>。

Skirvin 等<sup>[34]</sup>在 5 个品种的香叶天竺葵 (*Graveolens* L'Herit.) 离体无性繁殖试验中,发现新品种“Rober's Lemon Rose”(1950)就比老品种“Old fashion Rose”(1774)具有更显著的变异,证明了外植体类型影响了体细胞无性系变异的发生。Sunderland<sup>[35]</sup>在研究纤细单冠菊 (*Haplopappus gracilis* gray) 时指出,在含 2,4-D 的培养基中的悬浮培养物 6 个月之内可由完全二倍体状态变为完全四倍体状态。

陈金慧等<sup>[36]</sup>在杂交鹅掌楸 (*Chinense* (Hemsl.) Sarg.) 体细胞胚胎发生研究中发现基因型对体细胞无性系变异有明显影响。利用化学诱变的方法可以提高体细胞无性系变异的频率。相关研究在草萱草 (*Fulva*. Linn.)<sup>[37]</sup>等花卉中都见有报道,并获得了不少有用突变体。

## 5 结束语

影响体细胞胚胎发生的因素很多,基因型与生

理状态可能比激素的作用更为关键。玫瑰 (*Rugosa* Thunb.) 的幼胚、胚珠、花丝均可产生胚状体,但体细胞胚胎发生率差异很大,幼胚为 80%,胚珠 17%,花丝 13%<sup>[37]</sup>。另外 pH 值、活性炭、AgNO<sub>3</sub>、胁迫等都可以影响体细胞胚胎的发生<sup>[38,39]</sup>。

体细胞胚胎是理想的外源基因受体,体胚发生的研究在基因工程、体细胞融合、细胞突变体诱导、人工种子、杂种合子胚的挽救、种质保存、苗木快速繁殖等诸多方面有着广阔的应用前景,也是遗传学、转基因工程体系、生理生化、植物发育过程中的基因表达和调控、功能基因组研究等方面一个必不可少的新兴研究系统。随着植物体细胞胚胎发生及其机理的不断阐明,对于理解高等植物胚胎发生过程中的形态建成、组织分化以及植株再生,在理论和实践上均有重要价值。目前国内对花卉体细胞胚胎发生的研究还处于比较初级的阶段,对涉及到体胚发生过程基因表达、细胞信号转导机理等方面的研究都还没有见到报道,因此还需要后人在这方面付出更多的努力。

#### 参考文献:

- [1] 郑艳红,熊庆娥. 植物体细胞胚胎发生的研究进展[J]. 四川农业大学学报,2003,21(1):59-63.
- [2] 王丽,鲍晓明,黄百渠,等. 香雪兰外植体形态学极性决定的体细胞胚胎发生[J]. 植物学报,1998,40(2):138-143.
- [3] 曹静. 白鹤芋花序体细胞胚胎发生及植株再生的研究[J]. 农业生物技术学报,1995,3(3):81-85.
- [4] 林汉章,鲁雪华,陈扬春. 非洲紫罗兰胚状体发生的扫描电镜观察[J]. 福建农业学报,1987(2):85-86.
- [5] 周丽依,曹静. 园艺植物体胚发生及植株再生技术研究[J]. 热带作物学报,1998,19(2):15-19.
- [6] SONDAHL M R, MONACO L C, SHARP W R. In vitro methods applied to coffee[M]//THORPE TA. Plant Tissue culture. New York: Academic Press, 1981:325-347.
- [7] 由翠荣,曲复宁,崔龙波,等. 仙客来 (*Cyclamen persicum* Mill) 组织培养中不定芽形态发生的组织细胞学研究[J]. 烟台大学学报:自然科学与工程版,2002,15(4):273-279.
- [8] 陈一华,张丽华,耿玉轩,等. 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 体细胞胚胎发生体系中的体细胞类减数分裂研究[J]. 遗传学报,2000,27(10):888-895.
- [9] 陈超,王桂兰,田立民,等. 长寿花胚性愈伤组织的诱导及胚状体再生[J]. 园艺学报,2004,31(2):249-251.
- [10] 何静波,郑光植,王世林. 黑节草原胚体的繁殖[J]. 云南植物研究,1982,4(2):117-118.
- [11] 戚贤军. 利用菊花花蕾诱发胚状体发生的快繁体系研究[J]. 浙江林业科技,2003,23(4):12-14.
- [12] 冯大领,李云,孙振元. 爬山虎体细胞胚的发生及组织学研究[J]. 北京林业大学学报,2004,26(4):98-100.
- [13] 黄清俊,丁雨龙,甘习华. 水晶掌胚状体发生的超微结构观察[J]. 电子显微学报,2005(1):74-78.
- [14] 达克东,张松,高东升,等. 丽格海棠叶片培养胚状体发生和植株再生[J]. 园艺学报,2001,28(2):88-89.
- [15] 邢登辉,赵云云,黄承芬. 皇冠草体细胞胚胎发生及其体胚发生过程中内源激素的变化[J]. 生物工程学报,1999,15(1):100-105.
- [16] 庄承纪,梁汉兴. 金花茶子叶在离体培养中胚状体的发生和小植株的形成[J]. 云南植物研究,1985,7(4):446-457.
- [17] 崔凯荣,邢更生,周功克,等. 体细胞胚发生的生化基础[J]. 生命科学,2001,13(1):28-33.
- [18] 邢更妹,李杉,崔凯荣,等. 植物体细胞胚发生中某些机理探讨[J]. 自然科学进展,2000,10(8):14-22.
- [19] 屈姝存,刘先明,周朴华,等. 百合鳞片细胞形态发生中生理生化特性研究[J]. 生命科学研究,1988,2(4):288-294.
- [20] 金慧,施季森,诸葛强,等. 植物体细胞胚胎发生机理的研究进展[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2003,27(1):75-80.
- [21] 黄学林,李筱菊. 乙烯和多胺的生物合成与植物体细胞胚胎发生[J]. 植物生理学通讯,1995,31(2):81-85.
- [22] 刘华英,萧浪涛,何长征. 植物体细胞胚发生与内源激素的关系研究进展[J]. 湖南农业大学学报,2002,28(4):350-354.
- [23] 邢登辉,赵云云,黄承芬. 皇冠草体细胞胚发生及其体胚发生过程中内源激素的变化[J]. 生物工程学报,1999,15(1):98-103.
- [24] KAMADA H, HIROSHI HARADA. Changes in the endogenous level and effects of ABA during somatic embryogenesis of *Daucus carrot* L [J]. *Plants&Cell Physiol*,1981,22(8):1423-1429.
- [25] 余茂德,杨金富,徐立,等. 桑离体再生过程中内源激素变化的研究[J]. 蚕业科学,2003,29(1):28-31.
- [26] 韩碧文,刘淑兰. 植物离体体细胞胚胎发生[J]. 植物生理学通讯,1988(10):9-15.
- [27] 刘明志,林雪艳. 激素对百合植株再生的影响[J]. 广西植物,2002,22(2):167-170.
- [28] 焦海华. 不同植物生长调节物质对一品红器官发生的效应[J]. 黄冈师范学院学报,2002,22(3):34-36.

- [13] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科技出版社,1986.
- [14] 李均裕. 岩黄连注射液治疗肝炎 464 例疗效分析[J]. 中成药研究,1987,2(6):19.
- [15] 方绳新,董咸峰,揭盛华,等. 岩黄连注射液治疗急性黄疸型肝炎 40 例[J]. 医药导报,2001,20(9):567.
- [16] 任仲轩. 岩黄连治疗病毒性肝炎 33 例疗效分析[J]. 临床荟萃,2003,18(2):94-95.
- [17] 李向阳. 岩黄连注射液治疗高胆红素血症 54 例[J]. 现代中医药,2003(5):30.
- [18] 孙兆翠. 岩黄连注射液配合介入疗法治疗原发性肝癌的疗效观察及护理[J]. 青海医药杂志,2003,33(4):39-41.
- [19] 袁卫平,洪坚善,赵荫农,等. 岩黄连对肝癌介入化疗栓塞后肝损害的治疗[J]. 广西医科大学学报,2002,19(2):257-258.
- [20] 蒋水元,胡兴华,赵瑞锋,等. 岩黄连引种栽培研究[J]. 广西植物,2002,22(5):469-473.
- [21] 韦目阔,陆金相. 岩溶山地岩黄连高产栽培技术[J]. 广西农业科学,2004(1):24.
- [22] 何金祥. 岩黄连茎基腐病的分离鉴定及防治[J]. 广西植物,2003,23(5):473-475.
- [23] 陈祖强. 广西栽培与野生岩黄连的质量比较研究[J]. 广西植物,1993,12(2):188-190.

(责任编辑:韦廷宗 邓大玉)

(上接第 107 页)

- [29] 陈雄,王星,王亚馥. 激素对枸杞体细胞胚发生及可溶性蛋白质含量和组分的影响[J]. 西北植物学报,1995,15(5):5-8.
- [30] IMMERMANN JL. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants[J]. Plant cell,1993,5:1411-1423.
- [31] 崔凯荣,邢更生,王亚馥. 利用 mRNA 差别显示技术分析枸杞体细胞胚发生早期基因的差别表达[J]. 遗传,1998,20(5):16-19.
- [32] 朱自清. 植物细胞工程[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [33] 刘青林,田砚亭,吴涤新. 花卉的体细胞无性系变异及其在育种上的应用[J]. 北京林业大学学报,1992,14(2):90-97.
- [34] SKIRVIN RM, JANICK J. Tissue culture-induced variation in scented Pelargonium spp[J]. Jour Am Soc. Hort. Science,1976,101:282-290.
- [35] SUNDERLAND N. Nuclear cytology[M]//HE STREET. Plant Tissue and Cell Culture. Berkeley: University of California Press,1977:177-205.
- [36] 陈金慧,施季森,诸葛强,等. 杂交鹅掌楸体细胞胚胎发生研究[J]. 林业科学,2003,39(4):51-55.
- [37] LIU J R, CHOI P S, MIN S R, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in immature zygotic embryo, ovule, and anther filament cultures of Chinese cabbage [J]. Scientia-Horticulture (Netherlands),1998,72(2):151-155.
- [38] DIAS J S, MARTINS M G. The effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different Brassica oleracea morphotypes [J]. Scientia Horticulture,1999,82:299-307.
- [39] 高莉萍,包满珠. 月季的植株再生及遗传转化研究进展[J]. 植物学通报,2005,22(2):231-237.

(责任编辑:韦廷宗)