

综 述

植物体细胞胚状体的诱导研究及应用^{*}

王傲雪 李景富

(东北农业大学)

植物体外再生有两个类型,一是器官再生,一个是胚状体再生。对于胚状体再生,它主要有两个特点:一是两极性,即在其发生的最早阶段就具有根端和芽端;其二是它与外植体的维管束系统无直接联系,具有完整植株特性,在适宜条件下可长成一个独立的有苗端和根端的植株。相比于器官发生途径,体细胞胚胎发生具有数量多、速度快、结构完整、再生率高等优点,而且为研究植物细胞的分化、发育、全能性表达和遗传转化、突变体筛选提供了良好的基础,因而受到了研究者的重视

1 植物体细胞胚胎发生的概况

最早研究胚状体发生要属美国的 Steward和德国的 Reinert利用胡萝卜贮藏根组织作培养材料,首先观察到来自体细胞组织的胚的启动和发育过程。随后,许多学者对关于体细胞胚胎发生做了大量的研究,除孢子体外,在配子体上(Guha, Maheshwei 1964, Nitsch 1969),叶肉细胞上(Kohlenbach 1965)也开始了胚状体研究。1975年仅有13种双子叶植物,2种单子叶植物及8种伞形科植物诱导成功。1979年,Tisserat统计,体细胞胚胎发生包括了32科,132种植物。1981年周俊彦统计为43科106种植物。1993年统计,已有210种植物成功地诱导出胚状体(范双喜 1993)。就目前的研究文献上看,人们大多数停留在条件的摸索以及生理生化、组织学的研究上,还没对胚状体发生的机理有着清晰的了解。杨和平(1991)提出了大致的生理生化轮廓。植物细胞具有全套基因作为体细胞胚胎发生的分子前提,经过切割或游离,体细胞由于外源理化因子的诱导,内源理化因子发生相应的变化,结果导致一系列酶的活化和钝化,接着RNA合成被活化,在染色质控制下进入活跃的周转,在这之前和同时,新的蛋白质(酶)合成与周转也活跃化,随后就是DNA合成加速,导致细胞的活跃分裂和球形胚的形成。再后,在内外源信息作用下,通过转录与转译水平复杂而精巧的调控,基因在时间上和空间上得以选择性激活和表达,导致细胞生理代谢的阶段性和区域性差异,结果用于形态建成的物质基础不同,于是实现胚胎发生。

近几年来,人们对体细胞胚胎发生的生理生化进行了研究,也可推断出上述结论(刘本叶 1995,陈以峰 1998, Michalczuk 1992, Centeno 1997),但真正证实上述观点是否正确,还要在转录及翻译水平做深入的研究

2 影响植物体细胞胚胎发生的主要因素

2.1 基因型 不同基因型体细胞胚胎发生频率不同,这在研究中的许多作物都有表现,如玉米(Lu 1992),谷子(张树承 1987),水稻(金坚敏 1992),唐昌蒲(Barbarra Sufaniak 1993),大豆(杜鹃 1995)等,刘纪华还在玉米中发现杂种的外植体要比亲本外植体胚性愈伤组织诱导频率

* 收稿日期: 1998-10-15

要高。但刘达明(1994)发现杂种水稻对体细胞胚发生有其制约性。这原因可能有两方面,一是不同基因型体细胞胚胎发生频率不同,二是不同基因型的最适刺激条件不同,导致了不同体细胞胚胎发生频率。

2.2 外植体 外植体的生理状态和发育程度直接影响体细胞胚胎发生,处于生理代谢旺盛而分化程度较低的组织有利于诱导体细胞胚胎的发生。最常用的外植体是合子胚,子叶(Centeno 1997)、花梗(Tribulato 1997)、茎段(Choi 1997)、球茎切片(Barbara 1993)等其它外植体也可诱导体细胞胚胎发生。不仅不同外植体体细胞胚胎发生频率不同,而且同一外植体不同时期亦不同。刘纪华发现玉米胚性愈伤组织采用传粉后12天的幼胚诱导最好,在松属植物中,子叶前期的种胚最适,云杉属植物中子叶期种胚较好(Cheliak 1991)。

2.3 培养基的选择 培养基的状态对植物体细胞胚胎发生并不重要,而培养基中的元素对体细胞胚胎发生起了至关重要的作用。氮素是体细胞胚胎发生所必需的元素。松柏类植物体细胞胚诱导的基本培养的一个特点是,其大量元素中的 NO_3^- 及 NH_4^+ 的总量较低(Attree 1993, Dunstan 1988, Euis 1993)。外加的氮对一些植物也起着至关重要的作用。有些氨基酸对植物胚状体有促进作用,而有些氨基酸对植物胚状体有抑制作用。 Ser 、 Gln 、 Asn 和 Ala 均有利于胚状体发生具有促进作用。Sugan Epan发现 Ser 、 Try 、 Pro 、 Asp 、 Glu 等几种氨基酸对松子(finger millet)的体细胞胚胎的诱导起抑制作用。而且一些含氮化合物如水解蛋白、谷胱甘肽、丙氨酸可代替 NH_4^+ ,但效果不如 NH_4^+ (Wetherell 1976)。

钾的含量亦对某些植物体细胞胚胎发生有重要作用。Brown等(1976)对胡萝卜胚胎发生研究中发现,钾适宜浓度为20M,降至于1M时组织无序生长。氮素水平低的情况下,偏低钾离子浓度影响更加明显。

铁盐也是影响体细胞胚胎发生的一个重要因素。在一些植物中(普通烟草和颠茄)的花粉胚养中,螯合铁盐的效果要比其它铁盐的效果要好。而且在缺铁情况下,胚不能从球形胚发育成心形胚。

另外,培养基中添加椰乳(CW)、水解酪蛋白(CH)、酵母(YE)提取液等天然复合物对体细胞胚胎诱导有效。

2.4 激素 在激素中,2,4-D、ABA是诱导胚性愈伤组织中最常用的激素,但也不完全一样,在大豆中,NAA诱导的效果要好于2,4-D。不同植物对生长素的要求差距很大,对于芦苇、黑麦,及一些禾本科作物,对生长素的要求量很低(0.5~2.5mg/L)。而在大豆、茄科作物,打破了常规使用生长素的浓度,采用大剂量约10mg/L以上的生长素来诱导胚性愈伤组织(薛仁镐 1995,曲桂芹 1996)。细胞分裂素对某些作物胚性细胞的诱导有抑制作用,在大多数禾本科作物上细胞分裂素对胚性愈伤组织的产生没有明显作用,在水稻上适当的KT促进胚性愈伤组织,在大麦上,6-BA也可提高胚性愈伤组织的频率。而在大多数松柏科植物中,细胞分裂素需要一定的浓度。阎贤伟在西洋参研究中不加细胞分裂素效果较好。

在分化培养基中,大多需降低生长素浓度,有许多植物采取无激素的培养基,如欧洲卫茅、马尾松、青扦、红豆草等。

2.5 渗透压 渗透压也影响植物体细胞胚胎发生的效果。在针叶树中体细胞胚成熟,需要较高的渗透压。在玉米培养中,也需要提高蔗糖浓度,来提高渗透压。在大豆培养中,曲桂芹发现,1.5%蔗糖起重要作用,渗透压的原理主要是引起细胞失水,使细胞内含物的升高,直接影响体细胞的成熟(Attree 1987)。但究竟是哪一种或几种细胞内含物起作用,还需进一步研究。

对于植物体细胞胚胎发生,还有其它一些条件,例如加活性炭对松柏类植物体细胞胚胎发

生有一定促进作用。外界光照 温度条件也起着至关重要的作用

3 体细胞胚胎发生的应用

做为胚胎发生的一种特殊现象,体细胞胚胎发生有着深远的意义。它本身具有繁殖快,单细胞起源,两极性优点,使它能在以下几点有所应用。

3.1 遗传转化的基础 载体法转基因已被证明是比较有效的植物转基因方法。由于植物体细胞胚胎发生是由单细胞起源,所以不会出现嵌合体问题,而且胚性愈伤组织高密度、高质量、遗传上稳定 (Shoyama 1997),可一次性获得大量植株,这为载体法转基因技术提供了良好的条件,而且目前常用的基因枪技术,一般也采用胚性愈伤组织,如果能得到胚性愈伤组织,也避免出现嵌合体,而得到大量植株。在大麦 (Mireille 1996)、鸭茅草 (Denchev 1997)、水稻 (刘选明 1994)都通过体细胞胚胎再生进行转基因而获得成功。

3.2 种质保存 胚性愈伤组织可在适宜的条件保存,而其它愈伤组织不能长期保存,Barbara在唐菖蒲的胚性愈伤组织培养 2年,仍保存再生能力,而且在短期内低温保存已被证实,Laine等利用蔗糖和二甲基亚砷 (DM SO)作为低温保存剂,将加勒比松的胚性细胞悬浮系保存在液氮 4个月,融化后的细胞经短期停滞阶段后即继续生长,而且重新建立的培养与非冷冻保存物具有相似的体胚发生能力。Gupta的研究表明,可以在液氮中保存挪威云杉及火炬松的体细胞胚,并且在短时间内,保存的体细胞胚可恢复活力,这对一些多年生木本植物,用此种方法来保存种质是相当有用的。

3.3 快速繁殖 植物在产生胚性愈伤组织时,每一个细胞都发育一个完整植株。而且胚状体具有两极性,可直接生成小植株,避免多次继代培养,造成感染。在胡萝卜、芹菜和苜蓿等作物已建立的良好体细胞胚胎发生体系。建立统一体系必须满足以下两个条件:①体细胞胚很容易诱导和控制;②体细胞胚能很好地维持下来或快速繁殖,遗传上稳定。这其中,基因型是关键。

3.4 人工种子的制备 体细胞胚状体的诱导和发生是制备人工种子的基础。体细胞胚胎外部包上人工胚乳 (大多用海藻酸钠)和人工种皮就可以制备人工种子。美国的植物遗传公司及农业遗传公司已生产这类种子投放市场。

做为人工种子,具有①可大量繁殖转基因植株;②繁殖杂交种,避免年年杂交制种的频繁;③对不能通过有性繁殖的具优良性状植株的繁殖;④对多种名优植物快繁;⑤易于组织培养,免于驯化过程等优点。

人们对体细胞胚胎发生已经进行大量研究,包括花卉、木本等植物,但真正建立体细胞胚胎发生种子和大规模生产还未见报道。它的机理还不甚完整,许多研究工作者还对其生理生化机制做了探讨,期待从中找出它的机理。今后,研究建立体细胞胚胎发生的优化系统外,研究它的生理生化机制,并最终得出其机理将是又一方向,有了理论的成熟,多种植物的体细胞胚胎发生就会逐步建立起来。

(参考文献略)