

# 影响胡萝卜体细胞胚建成关键因素的研究进展

刘佳娜, 于丽杰, 李婉婷  
(哈尔滨师范大学生物学系, 哈尔滨 150025)

**摘要:** 利用体细胞胚对胡萝卜进行离体再生, 具有数量多、速度快、成苗率高、染色体稳定等优点。影响胡萝卜体细胞胚发生的因素很多, 主要集中于基因型、外植体、激素配比、基本培养基等方面。对影响胡萝卜体细胞胚建成关键因素进行综述, 以为提高胡萝卜体细胞胚的诱导频率、建立高效的胡萝卜离体再生体系和以胡萝卜为受体的植物遗传转化体系提供参考。

**关键词:** 胡萝卜; 体细胞胚; 离体再生  
**中图分类号:** Q944.4      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1002-2767(2008)02-0007-04

## Progress on the Key Factors of Influencing the Establishment of Carrot Somatic Embryogenesis

LIU Jia-na, YU Li-jie, LI Wan-ting  
(Biologicalogy Department of Harbin Normal University, Harbin 150025)

**Abstract:** There are many advantages to regenerate carrot by using somatic embryogenesis, such as large quantities, quickness, high efficiency of shooting and stability of chromsomes. Genotype, explant, the ration of planthoremones, the basic medium are the main factors influcing carrot somatic embryogenesis. On the purpose of increasing the inducible frequency of carrot somatic embryogenesis, giving reference to high efficiency of carrot regeneration and transformation, the author reviewed the main factors influcing the establishment of somatic embryogenesis and its current progress.

**Key words:** Daucus carota; somatic embryo; regeneration

胡萝卜 (*Daucus carota* L. *Var.* *Sativa* DC.) 为伞形花科重要的蔬菜作物, 其贮藏根具有发达的韧皮部且富含胡萝卜素, 营养十分丰富, 因而在世界各地被广为栽培, 占蔬菜生产总量的 3%, 年产达 1 350 万 t<sup>[1]</sup>。

胡萝卜进行离体培养时, 具有很强的体细胞胚发生能力。体细胞胚的再生途径具有发生数量多、速度快、结构完整、植株成苗率高和染色体倍性稳定的特点, 是植物遗传转化的一个理想受体系统。胡萝卜的贮藏根非常耐储运, 其发达的韧皮部在表达外源重组蛋白方面具有优势, 因此在植物生物反应器研究领域常常被选作受体植物。

随着植物生物技术的迅猛发展, 许多研究者对胡萝卜的体细胞杂交、遗传转化、再生系统等研究领域给予了越来越多的关注。国内外研究者在探讨胡萝卜体细胞胚的成因时, 发现许多试验因素均可以影响胡萝卜体细胞胚的发生频率。因此, 通过对影响胡萝卜体细胞胚发生频率的因素进行文献综述, 以期建立高效的胡萝卜体细胞再生系统提供有价值的参考。

1 外植体对体细胞胚发生的影响

外植体来源及外植体的发育时期对能否产生体细胞胚至关重要。同一基因型的不同外植体其体细胞胚的发生能力有明显差异, 这与不同外植体的分化程度和脱分化能力不同有关。如选用下胚轴、子叶、叶柄、贮藏根等作外植体时, 胚状体的诱导率不同, 诱导出的愈伤组织状态也不一致。外植体太幼嫩或太老化, 均只能产生一种柔软松散而没有结构的非胚性愈伤组织, 这种愈伤组织不能被诱导产生体细胞胚。

收稿日期: 2007-11-11  
基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(C0014); 黑龙江省教育厅“黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力资助计划”资助项目  
第一作者简介: 刘佳娜(1982-), 女, 山东人, 在读硕士, 从事植物分子生物学研究。Tel: 13244576139; E-mail: ljn2005-2008@163.com。  
通讯作者: 于丽杰, E-mail: yulijie1961@126.com。

尹文兵等人在诱导胡萝卜愈伤组织时,采用胡萝卜子叶、下胚轴和直根形成层作为外植体,经过 30 d 观察,发现三种外植体经过培养均被诱导出了愈伤组织。其中以子叶为外植体的出愈率达 67%,获得的愈伤组织多数呈浅黄色,生长旺盛,质地松散,含水量大,分散性好,仅有个别愈伤组织色泽发暗。以下胚轴为外植体的出愈率达 100%,并且愈伤组织生长旺盛,呈黄色,比较疏松,分散性良好。以直根形成层为外植体的出愈率很低,获得的愈伤组织色泽较暗(有些带褐色),生长缓慢,质地较硬,分散度差<sup>[2]</sup>。

在杨宁、郭勇的实验中,选取胡萝卜贮藏根的皮层、木质部及韧皮部为外植体,发现从韧皮部诱导出的愈伤组织有较好的生长效果<sup>[3]</sup>。

以往的实验中,胡萝卜组织培养主要以根髓部组织为外植体,近年来的研究表明,以胡萝卜下胚轴为外植体出愈率要高于子叶和贮藏根。

## 2 基因型对体细胞胚发生的影响

胡萝卜的基因型是影响其离体培养再生能力的重要因素,不同品种之间在产生体细胞胚的能力方面有很大差别。

陈书霞比较了 4 个胡萝卜品种 AC101、AC93、华育 1 号、新透心红诱导率的平均值,认为在诱导胚性愈伤阶段,同一激素条件下不同品种愈伤组织的诱导频率和生长水平是基本一致的;但是转至不含激素的 MS<sub>0</sub>培养基上以后,体细胞胚的发生频率却有显著差异。四个供试品种(系)的体细胞胚发生率分别为 98%、5%、0%和 78%,其中 AC101 的再生能力显著高于其它品种(系)<sup>[4]</sup>。

张娅等的实验中,品种 Carol 的再生频率高达 91%,金笋五寸和改良黑田七寸只有 50%和 8%<sup>[5]</sup>。杨艳梅的实验中,红秀 CT、黑田五寸参的再生苗形成频率远远高于新透心红(76%和 61%)<sup>[6]</sup>。

从以上研究结果可以看出,胡萝卜体细胞胚的发生对基因型有很大的依赖性,不同品种体细胞胚的诱导率不同,基因型对体细胞胚再生起决定作用。

## 3 激素对体细胞胚发生的影响

### 3.1 外源激素

培养基中外源激素是影响胚性愈伤组织诱导和继代培养的重要因素,不同的激素种类、浓度及其组合对体细胞胚的诱导率有显著影响。

已有的研究结果表明,在培养基中加入 2, 4-D、6-BA、BA、KT、ABA 等,会影响体细胞胚的发生<sup>[6-10]</sup>。在体细胞胚的诱导上,多数研究肯定了 2, 4-D 在低浓度时可以促进体细胞胚的形成,但却

妨碍体细胞胚的进一步发育。

Halperin 将胡萝卜体细胞胚的发生分为胚性愈伤组织的诱导和体细胞胚的形成及发育两个阶段。

研究工作表明,在胡萝卜体细胞胚发生的第二阶段,即体细胞胚的发育和成熟阶段,2, 4-D 的存在具有抑制体细胞胚形成的作用,使发育成熟的体细胞胚数目明显减少。在该阶段必须降低培养基中 2, 4-D 的浓度,甚至完全除去 2, 4-D,胡萝卜的胚性愈伤组织才能产生大量的体细胞胚<sup>[11-12]</sup>。

在胡萝卜体细胞胚发生的第一阶段,即促进外植体细胞脱分化形成胚性愈伤组织阶段,培养基中生长素类物质则是必不可少。研究工作表明,2, 4-D 是诱导胡萝卜转变为胚性细胞的有效因子<sup>[13]</sup>。在杨艳梅等的报道中,培养基中加入 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 2, 4-D,体细胞胚的诱导率可达 84%<sup>[14]</sup>。

但 Michalczuk 在研究中发现,2, 4-D 并不能使非胚性细胞获得胚性,这表明 2, 4-D 可能参与培养细胞内部因子的相互作用<sup>[15]</sup>。

许多植物的体细胞胚发生需要生长素和细胞分裂素的共同作用,单独加入生长素即可诱导胡萝卜体细胞胚发生,但加入低浓度的玉米素可大大提高其体细胞胚的发生频率并使其同步化<sup>[16]</sup>。细胞分裂素在胡萝卜体细胞胚的诱导研究中使用较多的是 6-BA 和 KT,且多为多种激素协同使用<sup>[11]</sup>。有些试验给出了相反的结果,例如 Kamada 和 Harada 就曾报道细胞分裂素对胡萝卜体细胞胚诱导有抑制作用<sup>[12]</sup>。

生长素和细胞分裂素两类物质的相对浓度控制着根芽的分化模式,2, 4-D 和 KT 的不同比例影响植株再生途径的变化,培养基中 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 2, 4-D 倾向于体细胞胚发生途径,而 0.2 mg · L<sup>-1</sup> KT 和 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 2, 4-D 则有利于器官发生途径<sup>[14]</sup>。

### 3.2 内源激素

外源激素通过内源激素起作用,植物激素,尤其是脱落酸(ABA)充当了主要的细胞间化学信号分子,对诱导抗逆境基因的表达及体细胞胚的建构具有重要作用。Kamada 等在胡萝卜细胞离体培养中,发现内源 ABA 含量一直保持比较低的水平,但从非胚性细胞转化为胚性细胞阶段,却伴随着内源 ABA 的增加<sup>[17]</sup>。

脱落酸(ABA)在体细胞胚形成过程中的作用很特殊。Naraganeswamy 等在研究工作中发现,ABA 会抑制胡萝卜体细胞胚的发育,但却有利于柑桔、黄连、黄芩等植物体细胞胚的成熟<sup>[10]</sup>。

对胡萝卜组织培养中 ABA 含量的测定表明,

培养初期, 内源 ABA 浓度很低, 约  $8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 培养 7 d 后 ABA 的含量明显增加。在 7 d 后向培养基中加入 ABA 虽然会抑制胡萝卜体细胞胚产生的频率, 但却有利于正常胚的发育。因而, 在适当时期加入低浓度的 ABA 将有利于体细胞胚的成熟<sup>[10]</sup>。

#### 4 培养基对体细胞胚发生的影响

在胡萝卜体细胞胚诱导和分化中, 胡萝卜基因型的不同决定了所用愈伤组织培养基中成分的不同。基本培养基成分对胚性愈伤组织的诱导率和质量均有显著影响, 一般认为 MS 培养基对体细胞胚的发生更为有利。

杨艳梅等发现在激素相同条件下, 改良 MS 培养基较 B5 培养基有利于胚性愈伤组织诱导, 并且愈伤组织生长速度快<sup>[14]</sup>。黄绍兴等研究了不同的蔗糖浓度对胡萝卜体细胞胚的诱导、生长与发育的影响, 结果表明含 3% 蔗糖的培养基最有利于诱导胡萝卜体细胞胚, 5% 以上蔗糖对体细胞胚的诱导具有明显的抑制作用<sup>[18]</sup>。

我们的实验室工作表明, 适宜的培养基因基因型而异, 不能用一种培养基来适应所有的基因型。相同的诱导培养基上诱导的愈伤组织在不同的分化培养基上分化率不一样, 不同诱导培养基上诱导的愈伤组织在相同的分化培养基上分化率也不一样。活化氧、毒素、高浓度盐和一些化学物质可诱发启动细胞程序性死亡, 也影响体细胞胚的诱导和分化率, 因此培养基组分的优化是提高组培效率的一个重要因素。

##### 4.1 含氮化合物

相同基因型相同部位的外植体, 培养于不同的培养基上, 其产生体细胞胚的频率也不相同。

许多实验表明, 在培养基中加添水解酪蛋白 ( $500 \sim 1\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 或酵母提取物 ( $500 \sim 1\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 有利于体细胞胚的发生。对培养物供应足够的还原性氮是诱导体细胞胚发生的另一重要条件, 在胡萝卜离体培养中, 以浓度为  $5 \sim 55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的硝酸盐作为唯一氮源时, 平均每个培养物上只形成 1 个体细胞胚; 但  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的氯化铵加到培养基中就可以明显促进体细胞胚的诱导<sup>[19]</sup>。

Dougall 和 Verma 的实验显示, 野生胡萝卜悬浮培养时, 可以将铵作为唯一氮源<sup>[20]</sup>。诱导其它植物体细胞胚发生时, 需要还原性氮的报道也不少<sup>[21-22]</sup>。这主要是因为外源氮和氮的代谢物与体细胞胚发生的调节基因的表达有关<sup>[23]</sup>。

##### 4.2 金属离子

在张焱如等<sup>[24]</sup>的实验中, 用重金属离子直接诱

导胡萝卜体细胞胚, 根据所需浓度和处理时间判断出供试化合物的效果, 其顺序为:  $\text{CdCl}_2 > \text{NiCl}_2 > \text{CoCl}_2 > \text{CuCl}_2 > \text{ZnCl}_2$ 。镉(Cd)和镍(Ni)是植物生长的非必需元素, 而铜(Cu)和锌(Zn)为必需元素, 钴(Co)是动物细胞中  $\text{VB}_{12}$  的成分, 但在植物中的作用尚不清楚。此结果表明, 重金属离子可诱导体细胞胚的产生。重金属离子对由体细胞诱导产生体细胞胚的能力与营养元素无相关性。

##### 4.3 培养基状态

培养基的状态对体细胞胚的高频率诱导也具有一定的影响。一般认为液体培养基在胚的发育和成熟阶段更有利于体细胞胚的大批量生产, 因为它具有培养物与周围营养物接触充分、利于通过分级筛选达到同步培养、利于更换培养基、利于搅拌或振荡以保证供氧量等优点。

此外, 在培养基中补充活性炭、 $\text{AgNO}_3$ 、乙烯、多胺、Vc、半胱氨酸等物质有利于体细胞胚的诱导与分化<sup>[25]</sup>; 外界光照、温度条件、组织培养时间等因素也不同程度地影响体细胞胚诱导和分化频率。

#### 5 展望

基因型、外植体、培养基成分及外源激素对胡萝卜体细胞胚的诱导和分化产生显著影响, 这些因素之间还存在未知的协同效应。因此, 今后胡萝卜体细胞胚的研究需要从大量优良自交系中筛选理想基因型; 寻找一些新的成分加入培养基并进一步优化组培条件, 增强体细胞胚的发生能力和试管苗的抗逆性; 提高移栽成活率; 开展胡萝卜基因组学研究并结合突变技术寻找控制胡萝卜体细胞胚发生的基因, 探索体细胞胚发育的分子调控机制; 并利用遗传转化技术改造一些农艺性状好但体细胞胚发生率低的自交系, 建立胡萝卜高效再生系统, 推进人工种子和基因育种的产业化。

##### 参考文献:

- [1] Hole C C. Carrots[C]//Zamski E, Schaffer A A. Photoassimilate Distribution in Plants and Crops pp. New York: Marcel Dekker, 1996: 671-690.
- [2] 尹文兵, 李丽娟, 黄勤妮 等. 胡萝卜愈伤组织的诱导及细胞悬浮培养研究[J]. 山西师范大学学报, 2004, 18(2): 71-76.
- [3] 杨宁, 郭勇. 胡萝卜细胞培养产生胡萝卜素的研究[J]. 广西植物, 1999, 19(1): 84-88.
- [4] 陈书鑫, 程智慧, 李霞. 胡萝卜转化再生的激素条件研究[M]. 园艺学进展, 蔬菜(第六辑). 西安: 陕西科学技术出版社, 2001: 368-374.
- [5] 张娅, 曾君祉, 周志勇 等. 胡萝卜组织培养和高效遗传转化体系的建立[J]. 植物学通报, 2005, 22(增刊): 37-42.
- [6] 杨艳梅. 胡萝卜高效再生体系的建立及其轮状病毒免疫相关蛋白基因的遗传转化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士论文, 2004.

[ 7 ] 张建铭, 谈锋. 植物体细胞胚的高频率诱导[ J ]. 生物技术通报, 1996(4): 8-11.

[ 8 ] 郑回勇, 郑金贵, 许明, 等. 胡萝卜再生体系及高效遗传转化体系的建立[ J ]. 广西农业科学, 2002(5): 237-241.

[ 9 ] 石琰, 沙广利, 黄粤. 胡萝卜高效再生和遗传转化体系的建立[ J ]. 青岛科技大学学报, 2005, 26(3): 197-204.

[ 10 ] 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( 自然科学版 ), 2002, 28(4): 349-354.

[ 11 ] Arnholdt-Schmitt B. Physiological aspects of genome variability in tissue culture. Growth phase-dependent quantitative variability of repetitive BstNI fragments of primary cultures of *Daucus carota* L[ J ]. Theor Appl Genet, 1995, 91(5): 816.

[ 12 ] Kamada H, Harada H. Studies on the organogenesis in carrot-tissue culture. I . Effects of growth regulators on somatic embryogenesis and root formation[ J ]. Z. Pflanzphysiol 1979, 91: 255-266.

[ 13 ] Dusits D, Bogre L, Gyorgye Y. Molecular and cellular approaches to the plant embryo development from somatic cells in vitro[ J ]. J Cell Sci, 1991, 99: 473-482.

[ 14 ] 杨艳梅, 刘玲, 巩振, 等. 胡萝卜高效再生体系的建立[ J ]. 华北农学报, 2004, 19(1): 10-12.

[ 15 ] Michalczuk L, Cooke T J, Conen J D. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis [ J ]. Phytochemistry, 1992, 31: 1097-1103.

[ 16 ] Komamine A, Kawahara M, Matsumoto M, et al. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell culture : physiology, biochemistry and molecular analysis [ J ]. In vitro Cell Dev Biol, 1992, 28(1) : 11.

[ 17 ] Kamada H H H. Changes in the endogenous level and effects of ABA during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L[ J ]. Plants and Cell Physiol, 1981, 22(8): 142-143.

[ 18 ] 黄绍兴, 王慧中, 黄美娟. 蔗糖浓度对胡萝卜体细胞胚生长与发育的研究[ J ]. 科技通报, 1995, 11(2): 111-113.

[ 19 ] 胡适宜. 被子植物胚胎学[ M ]. 北京: 高等教育出版社, 1982: 237-247.

[ 20 ] Dougall D k, Verma D C. Growth and embryo formation in wild carrot suspension culture with ammonium as a sole nitrogen source[ J ]. In Vitro, 1978, 14: 180-182.

[ 21 ] Motoike S Y, Skirvin R M , Norton M A, et al. Somatic embryogenesis and long term maintenance of embryogenic lines from foxgrape[ J ]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2001, 66: 121-131.

[ 22 ] Tremblay L, Tremblay F M. Effect of gelling agents, ammoniumnitrate and light on the development of *Picea mariana* (Mill) B. S. P. (black spruce) and *Picea rubens* Sarg. (red spruce) somatic embryos[ J ]. Plant Sci., 1991, 77: 233-242.

[ 23 ] 崔凯荣, 陈克明, 王晓哲, 等. 植物体细胞胚发生研究的某些现状[ J ]. 植物学通报, 1993, 10(3): 14-20.

[ 24 ] 张姝如, 刘志萍, 韩杰, 等. 用重金属离子诱导胡萝卜体细胞胚发生[ J ]. 内蒙古农业科技, 1999(6): 15-16.

[ 25 ] Bronwyn R, Framo Huixia Shou, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system[ J ]. Plant Physiol, 2002, 129: 13-22.

(上接第 6 页)

[ 8 ] Redaelli R, Pogna N E, Ng P K W. Effects of prolamins encoded by chromosomes 1B and 1D on the rheological properties of dough in near-isogenic lines of bread wheat[ J ]. Cereal Chemistry, 1997, 74(2): 102-107.

[ 9 ] Popineau Y, Cornec M, Lefebvre J, et al. Influence of high Mr glutenin subunits on glutenin polymers and rheological properties of gluteins and gluten subfractions of near-isogenic lines of wheat Sicco[ J ]. Journal of Cereal Science, 1994, 19(3): 231-241.

[ 10 ] 张延滨, 祁适雨, 肖志敏, 等. 适用于我国小麦品质育种的 SDS-PAGE 方法[ J ]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 1997(5): 60-63.

[ 11 ] 张延滨, 祁适雨, 肖志敏, 等. 不连续麦醇溶蛋白酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳(APAGE)的研究[ J ]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 1997(6): 70-73.

[ 12 ] Jones S S, Cadle M M. Effect of variation at Glu-D1 on club wheat end-use quality[ J ]. Plant Breeding, 1997, 116(1): 69-72.

[ 13 ] 张延滨, 辛文利, 孙连发, 等. 小麦 2+12 和 5+10 亚基近等基因系间面粉品质差异的研究[ J ]. 作物学报, 2003, 29(1): 93-96.

[ 14 ] Zhang Yan-bin, Sun Lian-fa, Xin Wen-li, et al. Effect of HMW-GS 5+10 on quality parameters in four leading wheat cultivars[ J ]. Agricultural Science in China, 2003, 2(5): 483-488.

[ 15 ] Lü X B, Zhang Y B, Song Q J, et al. Qualitative difference between HMW-GS 5+10 and 2+12 NILs of four spring wheat cultivars with high-quality genetic background[ J ]. Agricultural Science in China, 2004, 3(8): 568-574.

[ 16 ] 张延滨, 辛文利, 孙连发, 等. 17+18 亚基对黑龙江省小麦品种烘烤品质影响的初步研究[ J ]. 麦类作物学报, 2004, 24(1): 40-43.

[ 17 ] 陆艳, 马传喜. 小麦品种麦谷蛋白亚基的遗传变异分析[ J ]. 安徽农业大学学报, 2000, 27(2): 126-130.

[ 18 ] 毛沛, 李宗智, 卢少源. 小麦遗传资源 HMW 麦谷蛋白亚基组成及其与面包烘烤品质关系的研究[ J ]. 中国农业科学, 1995, 28(增刊): 22-27.

[ 19 ] 张延滨. 黑龙江省主要小麦品种及品系的 HMW 麦谷蛋白亚基分析[ J ]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 1999, 15(3): 93-97.

[ 20 ] Kolster P, van Eeuwijk F A, van Gelder W M J. Additive and epistatic effects of allelic variation at the high molecular weight glutenin subunit loci in determining the bread-making quality of breeding lines of wheat[ J ]. Euphytica, 1991, 55: 277-285.

[ 21 ] 张莉丽, 张延滨, 宋庆杰, 等. 龙辐麦 3 号小麦品种 HMW-GS Null 和 1 近等基因系间品质差异的研究[ J ]. 中国农业科学, 2007, 40(9): 1864-1870.

[ 22 ] 张莉丽. 小麦 Glu-A1 位点 HMW-GS Null 与 1 和 2\*, Glu-B1 位点 HMW-GS 7 与 7+8 近等基因系间品质差异的初步研究[ J ]. 黑龙江农业科学, 2006(3): 8-10.