

张慧君,陈劲枫.植物组织培养生理机制的研究进展[J].江苏农业科学,2015,43(3):33-35.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.010

# 植物组织培养生理机制的研究进展

张慧君<sup>1,2</sup>, 陈劲枫<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学园艺学博士后流动站, 江苏南京 210094;

2. 淮北师范大学生命科学院资源植物生物学安徽省重点实验室, 安徽淮北 235000)

**摘要:**植物形态发生变化时,生理生化特性研究是揭开这一现象的一个重要方面,很多研究已经证实,形态建成的前提是植物生理生化的改变,其生理生化差异导致了不同的形态发生,植物不定芽形成是一个很复杂的现象。本研究就植物组织培养过程中生理生化变化的几个方面加以讨论。

**关键词:**植物组织培养;生理生化;生理机制;形态;不定芽;内源激素

**中图分类号:**Q943.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)03-0033-03

作为植物细胞全能性的一种表达方式,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,并在很多领域中广泛应用。人们对植物不定芽再生的机理及其应用方面做了大量的研究,在不同离体组织培养的养分需求,不同植物对环境因素、培养基成分、添加物质、植物激素的种类和浓度等各因素的需求,不同材料的不定芽增生和生长及不定芽发育机理等方面都得到了很大发展。本研究从植物再生过程中的生理生化角度进行综述,帮助大家了解有关进展。

## 1 植物体细胞胚胎发生过程中的细胞生物学研究

细胞生物学研究体细胞胚发生过程是了解体胚发生过程的重要研究方法,主要通过石蜡切片技术、超微切片技术和组织化学染色研究方法探讨体细胞胚胎发生过程中的形态学建成,观察体细胞胚的发育过程,其中石蜡切片法最常见。目前关于植物体细胞胚胎发生过程的报道越来越多,普遍认为体细胞胚胎发生经历球形胚或原胚、心形胚、鱼雷形胚和子叶胚4个阶段,但对体细胞胚胎发生的起源研究结果不尽一致,既有关于单细胞的报道,也有关于多细胞起源的报道。对植物体细胞胚胎发生的超微结构研究结果普遍显示,在非胚性向胚性细胞的转化过程中,胚性细胞形成厚壁,具有胞质浓、核大、液泡小、核仁大、细胞器丰富、线粒体数量增多、胞间连丝广泛存在等特点。孙丽芳对玉米愈伤组织用石蜡切片组织观察及电镜扫描,结果显示,胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织在细胞内部结构、愈伤组织外部形态和分化能力方面具有明显差异,为以后研究奠定理论依据<sup>[1]</sup>。江荣翠对滇秋木体细胞采用扫描电镜进行观察,结果发现胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织具有明显的形态特征<sup>[2]</sup>;张涛对芸芥研究表明,能产生体细胞胚的胚性细胞具有核大、质浓、染色深、细胞排列紧密等特点,跟周围的细胞有明显的界限<sup>[3]</sup>。

## 2 抗氧化酶类

酶是植物生化反应的催化剂,在胚状体发生过程中起非常关键的调节作用,所有需氧生物都必须依赖氧才能获得能量和维持生命,然而当活性氧浓度超过正常水平时,对生物细胞会产生毒害作用<sup>[4-8]</sup>。有研究报道,生物体为了减轻和防止活性氧损伤,已形成了复杂的氧化反应机制,在植物组织培养的不同阶段,这种抗氧化反应也是不断变化的<sup>[9-14]</sup>。近年来,已有很多关于植物离体培养的研究,结果表明不定根、愈伤组织、不定芽等的形态发生都与过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性有关<sup>[15]</sup>。王亚馥等指出,在枸杞离体培养过程中,POD活性逐渐增强,整个变化过程中出现2个峰值,分别在分生细胞团芽的形成阶段<sup>[16]</sup>。庄东红等的研究结果表明,在组织培养过程中,大白菜子叶POD活性变化随着外植体的分化、不定芽的产生呈增强趋势<sup>[17]</sup>。崔凯荣等在研究枸杞体细胞胚发生过程中发现,随着体细胞的发育,SOD、POD、CAT相互配合来调节胚性细胞的生长分化,这3种酶在枸杞胚胎发生与发育过程中都有不同的变化,变化情况与体细胞的伸长密切相关<sup>[18]</sup>。还有研究认为,体细胞胚发生与发育是大量酶特异性合成及参与代谢的结果,在细胞发育中可以穿透细胞膜,可以减少对细胞的损害,体细胞胚胎的发育与超氧化物自由基的清除密切相关<sup>[19-21]</sup>。许多植物的过氧化物酶活性在体胚发生过程中较强,詹国凤等在大蒜体细胞胚胎发生过程中发现,SOD、POD、CAT活性变化与胚性愈伤组织的诱导及体胚的发育密切相关,POD对体胚的诱导起主导作用,而SOD和CAT在体胚的发育和成熟中起主导作用<sup>[22]</sup>。

## 3 生化物质的变化

在体细胞胚胎发生过程中,可溶性糖含量的变化可能为细胞分裂和发育提供物质和能量基础,并可能预示着新的发育状态即将开始。陈陆琴等将金莲花、合欢茎尖接入分化培养基上后发现,茎尖基部形成愈伤组织,而后愈伤组织分化出不定芽,在培养基中培养的前12 d,可溶性糖含量迅速增加,

收稿日期:2013-12-20

基金项目:淮北师范大学博士科研启动基金(编号:15600973)。

作者简介:张慧君(1982—),男,黑龙江哈尔滨人,博士,从事西甜瓜基因工程研究。E-mail:zhhuijun@126.com。

伴随着不定芽的生长,可溶性糖含量开始缓慢减少<sup>[23]</sup>。从启动愈伤组织开始到形成愈伤组织过程中,可溶性糖含量较低;而从愈伤组织形成开始阶段到愈伤组织分化形成不定芽的阶段,可溶性糖含量较高,这可能是由于可溶性糖为形成不定芽的碳骨架原料,其含量提高可以保证愈伤组织的原料供应。当愈伤组织进行不定芽分化时,由于不定芽原基形成、生长,可溶性糖含量增多,直到器官分化完成后才开始逐渐减少,这也说明可溶性糖在不定芽发生过程中起的主要作用之一是提供碳源<sup>[24]</sup>。詹国凤等在对大蒜体细胞胚胎发生过程进行研究时发现,可溶性糖含量在其细胞脱分化早期出现 1 次高峰,随后迅速下降,在成熟期略有回升,由此得出可溶性糖在细胞脱分化早期出现累积高峰,细胞进入迅速分裂阶段,此时可能为细胞进一步发育提供物质和能量基础;可溶性糖含量在胚成熟期升高,这可能为新的发育阶段提供物质和能量<sup>[22]</sup>。

辛伟杰发现,花烛体胚发生过程中可溶性蛋白质含量在球形胚和成熟胚 2 个时期出现峰值,而从诱导外植体形成胚性愈伤组织时,蛋白质含量降低;脱分化时,外植体细胞内蛋白质降解转化成糖类及其他物质,为胚性细胞的形成提供能量,随着胚性细胞进一步发育,细胞内积累了大量的蛋白质;成熟胚时期,可溶性蛋白质又大量积累,为后期的体胚萌发提供了物质保证<sup>[25]</sup>。齐力旺等发现,落叶松胚性愈伤组织中的游离氨基酸含量明显低于非胚性愈伤组织,特别是游离氨基酸中的精氨酸含量,非胚性愈伤组织中精氨酸为胚性愈伤组织的 4 倍<sup>[26]</sup>。有报道指出,多胺能促进体细胞胚发生,而精氨酸为多胺合成的前体,其含量变化可能与多胺的合成及体细胞胚发生关系密切。

植物形态发生实质上受基因相互调控,是基因之间按时空顺序表达的结果<sup>[27]</sup>。王亚馥等研究发现,在枸杞愈伤组织再分化形成不定芽时,上升的可溶性蛋白质含量为枸杞形态发生提供了必需的物质基础<sup>[16]</sup>。已有大量研究结果表明,在植物体细胞胚胎发生过程中,可溶性蛋白质组分和含量发生改变,尽管有些结果不是很一致,但总的变化趋势是相同的。不同物种中胚性愈伤组织的可溶性蛋白质合成速率和含量远高于非胚性愈伤组织,可见前者代谢活性高于后者。

#### 4 体胚发生中的特异蛋白

蛋白质是基因调控和表达的产物,植物体细胞胚胎发生是植物相关基因按一定时空表达顺序而产生的结果。在体细胞胚胎发育的过程中,从外形、生理上可以分为几个阶段,即原胚、球形胚、心形胚、鱼雷形胚、子叶胚、成熟胚以及再生成苗阶段,植物离体再生中各个时期都必然会存在特异蛋白的表达。Marsoni 等成功地比较了葡萄胚性发生过程中形成的非胚性愈伤组织和胚性愈伤组织蛋白表达差异,发现共有 35 个蛋白点差异表达,且这些蛋白点可能与胚性发生有关<sup>[28]</sup>。这些蛋白既可作为调控因子,又可作为结构蛋白、酶蛋白和贮藏蛋白。孙丽芳利用蛋白质组技术检测了玉米胚性发生相关蛋白的表达情况,共有 42 个蛋白点发生显著变化,质谱成功鉴定 29 个蛋白点,根据蛋白功能将其分为细胞繁殖、翻译与蛋白合成、胁迫响应、信号转导等,因此对体细胞胚胎发生过程中特异蛋白的分析,对优化体胚发生机制、调控体细胞胚胎发生和体胚发生、发育的相关基因克隆与研究、遗传转化等工

作具有重大意义<sup>[1]</sup>。

#### 5 内源激素水平的变化

植物激素是植物体内天然存在的一系列有机化合物,作为执行细胞通信功能的化学信息,在代谢、生长、形态建成等植物生理活动的各个方面均起十分重要的体内信号传导作用;植物体胚发生过程中的生理效应往往是多种激素间相互作用的结果,体胚发育时期不同,内源激素发生的变化不同。植物内源激素含量调控细胞分化和生长的方向与进程,以致于植物生命活动的整个过程,不同的植物种类和外植体都影响着内源因素的变化<sup>[29-30]</sup>。一些研究结果表明,植物愈伤组织的分化是内源生长素含量逐步降低的结果,也是细胞分裂素含量逐步升高的过程。刘涤等在研究烟草离体培养时发现,与未分化出芽的愈伤组织相比,已分化出芽的愈伤组织内源生长素含量明显升高<sup>[31]</sup>;王秀红等研究发现,在 NAA 和 6-BA 等 2 种激素作用下,水稻花药、幼胚和花穗都可以诱导愈伤组织完成芽的形态分化,在内源 NAA 含量增高时,其愈伤出苗率逐渐下降,降低时愈伤出苗率逐渐增高,与内源细胞分裂素刚好相反,然而外源植物激素必须通过对内源激素平衡的调节才发生作用<sup>[32-33]</sup>。经研究发现,在 NAA 和 6-BA 作用下可以诱导水稻花药、幼胚和花穗来源的愈伤组织完成芽的形态分化,其愈伤出苗率与内源生长素存在负效应,而与内源细胞分裂素存在正效应<sup>[34-35]</sup>。植株生长发育过程与植株内源和外源激素的种类、含量及配比等有密切的关系<sup>[36-38]</sup>;裴东等的研究结果表明,内源激素对菊花、水稻愈伤、红富士苹果、南瓜不定芽形成和分化起重要作用<sup>[39-41]</sup>;林士杰等在研究整个不定芽形成的过程中发现,内源激素 ABA 对不定芽的形成有利<sup>[42]</sup>;芽原基的启动分化阶段与较高浓度的 ABA 相伴随,芽原基生长发育阶段与高浓度的 ABA 相关,各种内源激素的代谢和动态平衡在细胞分化中起重要且关键的作用。

在植物体内,内部条件和外部培养条件相互作用,结果导致植物体内器官发生形态变化,内源激素的调控是重要因素之一,植物的外源激素须通过对内源激素的调节来控制器官的生长发育,各种植物生长物质的水平都通过影响植物外植体的基因表达而引起器官分化的。内源激素与受体或载体结合通过不同的信号转导和传递方式来控制不同的生理功能,但其激素在分子水平上通过何种途径来调控植物再生的作用机制仍有待深入研究。

#### 6 问题与展望

总之,在植物组织培养过程中,植株再生途径包括胚状体发生、器官发生和体细胞发生,不同植物和同一植物不同组织或器官的再生途径也不同,且植株再生受外植体生理状态至关重要的影响,这些生理机制仍有待于进一步研究。这些变化是多方面的,由生理变化到内部基因的改变,都是相互作用的结果,这些随着研究的不断深入,分子生物学的蓬勃发展,这一科学问题必将会解决,植物再生的生理机制将在植物工厂化、规模化生产中发挥重要的作用。

#### 参考文献:

[1] 孙丽芳. 玉米胚性组织相关克隆与功能验证[D]. 长春:吉林农

- 业大学,2012.
- [2] 江荣翠. 滇秋木体细胞胚胎发生及其机理研究[D]. 南京:南京林业大学,2010.
  - [3] 张涛. 芸芥体细胞胚胎发生的组织细胞学研究[J]. 园艺学报,2007,34(1):131-134.
  - [4] 许煜泉,史益敏,尹协芬. 番茄离体子叶培养的形态发生及过氧化物酶的动态[J]. 上海农学院学报,1992,10(2):121-126.
  - [5] 张静兰,唐定台,徐桂芳,等. 放线菌素 D 和环己亚胺对激素诱导绿豆子叶脱分化及其核酸、蛋白质代谢的作用[J]. 植物学报,1982,24(5):433-439.
  - [6] 戴均贵,周吉源. 黄芩离体形态发生过程中生理生化特性变化的研究[J]. 华中师范大学学报:自然科学版,1997,31(2):220-224.
  - [7] 屈妹存,刘选明,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,1998,2(4):288-294.
  - [8] Meratan A A, Ghaffari S M, Niknam V. *In vitro* organogenesis and antioxidant enzymes activity in *Acanthophyllum sordidum* [J]. Biol Plant,2009,53:5-10.
  - [9] Batkova P, Pospisilova J, Synkova H. Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during *in vitro* growth and *ex vitro* transfer[J]. Biologia Plantarum,2008,52(3):413-422.
  - [10] Cui K R, Xing G S, Liu X M, et al. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. [J]. Plant Science, 1999,146(1):9-16.
  - [11] van Breusegem F, Vranová E, Dat J F, et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction[J]. Plant Science,2001,161(3):405-414.
  - [12] Papadakis A K, Siminis C I, Roubelakis - Angelakis K A. Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts[J]. Plant Physiology, 2001, 126(1):434-444.
  - [13] Tian M, Gu Q, Zhu M Y. The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus [J]. Plant Sci,2003,165(4):701-707.
  - [14] Zhang S G, Han S Y, Wen H Y, et al. Changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and antioxidant enzyme gene expression during the somatic embryo genesis of *Larix leptolepis* [J]. Plant Cell Tiss Org,2010,100:21-29.
  - [15] Abbasi B H, Khan M, Guo B, et al. Efficient regeneration and antioxidative enzyme activities in *Brassica rapa* var. *turnip* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2011,105(3):337-344.
  - [16] 王亚馥,王仑山,丁惠宾. 枸杞组织培养中形态发生的细胞组织学观察[J]. 兰州大学学报,1989,25(4):88-92.
  - [17] 庄东红,杜虹. 大白菜子叶培养过程中 POD 同工酶和可溶性蛋白质含量的变化[J]. 汕头大学学报:自然科学版,2002,17(1):64-68,73.
  - [18] 崔凯荣,任红旭,邢更妹,等. 枸杞组织培养中抗氧化酶活性与体细胞胚发生相关性的研究[J]. 兰州大学学报:自然科学版,1998,34(3):93-99.
  - [19] Zhang B, Wang H Q, Wang P, et al. Involvement of nitric oxide synthase - dependent nitric oxide and exogenous nitric oxide in alleviating NaCl induced osmotic and oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. Afr J Agr Res,2010,5(13):1713-1721.
  - [20] Srivastav M, Kishor A, Dahuja A, et al. Effect of paclobutrazol and salinity on ion leakage, proline content and activities of antioxidant enzymes in mango (*Mangifera indica* L.) [J]. Sci Hort,2010,125(4):785-788.
  - [21] Zhao Y E. Cadmium accumulation and antioxidative defenses in leaves of *Triticum aestivum* L. and *Zea mays* L. [J]. African Journal of Biotechnology,2011,10(15):2936-2943.
  - [22] 詹园凤,吴震,金潇潇,等. 大蒜体细胞胚胎发生过程中抗氧化酶活性变化及某些生理特征[J]. 西北植物学报,2006,26(9):1799-1802.
  - [23] 陈陆琴,王关林,李洪艳,等. 彩萼石楠的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2005,41(1):58.
  - [24] 张良波. 屋顶长生草离体培养及其形态发生的细胞学与生理生化变化的研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2004.
  - [25] 辛伟杰. 花烛体细胞胚胎发生及相关生理生化研究[D]. 南京:南京农业大学,2006:42-46.
  - [26] 齐力旺,李玲,韩一凡,等. 落叶松不同类型胚性和非胚性愈伤组织的生理生化差异[J]. 林业科学,2001,37(3):20-29.
  - [27] Pan Z Y, Zhu S P, Guan R, et al. Identification of 2,4-D - responsive proteins in embryogenic callus of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) following osmotic stress[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2010,103(2):145-153.
  - [28] Marsoni M, Bracale M, Espen L, et al. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera* [J]. Plant Cell Reports,2008,27(2):347-356.
  - [29] Ali A, Ahmad T, Abbasi N A, et al. Effect of different concentrations of auxins on *in vitro* rooting of olive cultivar 'Moraiolo' [J]. Pakistan Journal of Botany,2009,41(3):1223-1231.
  - [30] Feng J C, Yu X M, Shang X L, et al. Factors influencing efficiency of shoot regeneration in *Ziziphus jujuba* Mill. 'Huizao' [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2010,101(1):111-117.
  - [31] 刘涤,迟静芬,刘桂芸. 烟草愈伤组织器官发生过程中外源激素的作用[J]. 植物生理学报,1986,12(1):104-108.
  - [32] 王秀红. 水稻不同外植体的组织培养能力及其内源激素分析[D]. 雅安:四川农业大学,2002.
  - [33] Leshem B. Polarity and responsive regions for regeneration in the cultured melon cotyledon[J]. Journal of Plant Physiology,1989,135(2):237-239.
  - [34] Aida M, Ishida T, Fukaki H, et al. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup - shaped cotyledon mutant [J]. The Plant Cell,1997,9(6):841-857.
  - [35] Aida M, Ishida T, Tasaka M. Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis embryogenesis*: interaction among the CUP - SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes [J]. Development,1999,126(8):1563-1570.
  - [36] Centeno M L, Rodriguez A, Feito I, et al. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures [J]. Plant Cell Reports,1996,16(1/2):58-62.
  - [37] Valdés A E, Ordás R J, Fernández B, et al. Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons [J]. Plant Physiology and Biochemistry,2001,39(5):377-384.
  - [38] Wang X H, Shi X Y, Wu X J, et al. The influence of endogenous hormones on culture capability of different explants in rice [J]. Agric Sci China,2005,4(5):343-347.
  - [39] 裴东,郑均宝,凌艳荣,等. 红富士苹果试管培养中器官分化及其部分生理指标的研究[J]. 园艺学报,1997,24(3):229-234.
  - [40] 邵继平. 声波刺激对菊花愈伤组织内源激素 IAA 和 ABA 动态变化的实验研究[D]. 重庆:重庆大学,2003.
  - [41] 田春英,邵建柱,刘莹,等. 红富士苹果叶片不定芽再生中激素、多胺和 NO 含量的变化[J]. 园艺学报,2010,37(9):1403-1408.
  - [42] 林士杰,姜静,冯昕,等. 黑林1号杨组培叶片不定根的发生与内、外源激素关系的研究[J]. 林业科技,2006,31(1):8-11.