

禾本科植物体细胞胚发生与器官发生的 激素调控研究进展

赵琦¹, 王文国^{2*}, 王跃华¹, 王胜华³

(1. 成都大学 生物产业学院, 四川 成都 610106; 2. 农业部沼气科学研究所, 四川 成都 610041;
3. 四川大学 生命科学学院, 四川 成都 610065)

摘要: 综述了禾本科植物组织培养中外源激素对体细胞胚发生和器官发生 2 种再生途径的调控研究进展, 重点讨论了在同一外植体中通过激素配比对 2 种再生途径的调控。并对这种调控在体细胞无性变异育种、遗传转化和快繁与脱毒中的应用与存在的问题进行了分析。

关键词: 禾本科植物; 体细胞胚发生; 器官发生; 激素调控

中图分类号: Q942 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)02-0006-05

Advances of Researches in Hormonal Regulation of Gramineae Somatic Embryogenesis and Organogenesis

ZHAO Qi¹, WANG Wen-guo^{2*}, WANG Yue-hua¹, WANG Sheng-hua³

(1. Faculty of Biotechnology Industry, Chengdu University, Chengdu 610041, China; 2. Biogas Institute of Ministry of Agriculture, Chengdu 610041, China; 3. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: In this article, the exogenous hormonal regulation of Gramineae somatic embryogenesis and organogenesis was discussed. And the regulation of hormone combinations on the somatic embryogenesis or organogenesis in same explants was especially discussed. And the applications and limitations of somatic embryogenesis and organogenesis in somaclonal variants breeding, genetic transformation, micropropagation and detoxification were also discussed.

Key words: Gramineae; somatic embryogenesis; organogenesis; hormonal regulation

禾本科植物不仅是人类重要的粮食来源, 而且在园林绿化、畜禽饲料、生态恢复、工业原料和生物质能源等方面也起着重要的作用。随着社会需求、环境变化等矛盾的日益突出, 人类对禾本科植物需求量越来越大, 对其品质改良的要求也越来越迫切。而组织培养技术为其遗传改良提供了新的途径, 以组织培养为基础的体细胞无性系变异育种、遗传转化育种等技术在禾本科植物中已经取得很大的进展^[1]。但由现有的组织培养技术引起的诸如遗传转化中的变异、嵌合体等问题仍在一定程度上影响组织培养育种技术的发展, 获得多种组织再生途径是

解决这些问题的有效手段之一。为此, 综述了外源激素在对禾本科植物再生途径调控效应方面的研究进展, 以期对禾本科植物组织培养技术的进一步发展与应用提供理论基础和思路。

1 禾本科植物的体外再生途径

体细胞胚发生与器官发生是植物离体再生的主要途径。体细胞胚发生经历与合子胚相似的阶段, 形成两极性的体细胞胚, 然后形成完整的植株; 而器官发生一般是先形成单极性的芽端, 再诱导生根。2 条途径具有一定的差异, 可以用于不同的领域^[2]。20

收稿日期: 2013-08-26

基金项目: 四川省科技创新苗子工程项目(2013RZ0017)

作者简介: 赵琦(1981-), 男, 四川成都人, 讲师, 博士, 主要从事植物发育与植物天然产物研究与教学。E-mail: zhaoqi@cdu.edu.cn

* 通讯作者: 王文国(1982-), 男, 山东临沂人, 副研究员, 博士, 主要从事植物资源方面的研究。E-mail: 6daomu@163.com

世纪 70 年代末以前,大多数学者认为器官发生是禾本科植物的主要再生途径^[3]。然而在水稻、高粱、小麦、玉米等作物未成熟的组织中获得体细胞胚发生后^[4],Vasil^[5]提出了大部分禾本科植物体外再生途径为体细胞胚发生的观点。大量研究表明,禾本科植物的体细胞胚发生包括直接体细胞胚发生和间接体细胞胚发生^[6-12]。一些组织切片和扫描电镜观察结果表明,禾本科植物的体细胞胚发生过程要经历类似合子胚的球胚、梨胚、盾片胚、成熟胚的发育阶段^[10,12-13]。而近些年的一些研究表明,器官发生途径在禾本科植物中仍然存在^[14],包括直接器官发生和间接器官发生 2 种形式^[7,15-20]。目前,关于禾本科器官发生的研究主要集中在甘蔗^[7-8,16]和一些草类,如金发草(*Pogonatherum paniceum*)、牛筋草(*Eleusine indica*)、画眉草(*Eragrostis curvula*)等^[15-20]。

2 体细胞胚发生和器官发生途径的应用

2.1 体细胞无性系变异的应用

植物组织培养过程中可能会产生一定的体细胞无性系变异^[21]。最初认为这些突变是不利的,自从在甘蔗的再生植株中发现一些有益的变异可以用来育种后,体细胞无性系变异育种便被用于禾本科植物目标性状突变体的筛选等^[21-22]。

体细胞胚发生和器官发生过程中都可以产生体细胞无性系变异。但在早期曾认为以不定芽再生的植株变异多,而以体细胞胚再生的植株相对较少,Vasil 等^[23]甚至认为,体细胞胚发生形成的植株不会发生变异。但是近年来的研究发现,体细胞胚发生过程中不但会产生变异,而且由于培养时间较长会产生比器官发生较多的变异^[24]。不经过愈伤组织阶段的直接器官发生或直接体细胞胚发生途径产生的变异要少于经过愈伤组织阶段的间接发生途径^[8]。

禾本科植物的愈伤组织一般具有较强的继代耐受性,在继代过程中,愈伤组织受持续的激素刺激,容易产生突变,从而易于获得耐性植株。如金发草愈伤组织继代 2 a 以上仍具有较高的再生率,可用于耐旱突变体的筛选^[25-26]。目前已经在禾本科植物中利用体细胞无性系变异筛选到大量优良的突变体,如抗病甘蔗^[21]、耐盐芦苇(*Phragmites communis*)^[27]等。

2.2 在遗传转化中的应用

植物的遗传转化要求植物再生过程有较高的遗传稳定性。对禾本科植物来说,无论基因枪转化还是农杆菌介导的转化,一般都要经过愈伤组织培养阶段,这会使发生遗传改变的机率增大。另外,虽然

大多数学者认为禾本科植物的体细胞胚发生是单细胞起源的,但在愈伤组织中,体细胞胚多是以细胞团或球胚阶段存在^[10],这也使产生嵌合体的机率增大。这些对遗传转化都是不利的,寻找不经愈伤组织的直接植株再生方法是较为理想的途径。通过器官发生的方式获得遗传转化后再生植株的方法已经在玉米等禾本科植物上取得良好的应用^[28]。但是目前水稻等禾本科植物遗传转化过程中经过愈伤组织的再生途径仍被较多的应用^[29]。

2.3 在快速繁殖与脱毒技术中的应用

快速繁殖与脱毒技术主要用于一些以无性繁殖为主的植物,禾本科植物繁殖以种子繁殖为主,所以该技术对禾本科植物中的应用相对较少。但是对于甘蔗等作物,该技术仍是主要的繁殖方式。甘蔗属于长期连作作物,易积累传播病害,目前利用快繁技术对甘蔗进行脱毒和规模化繁殖在国内外已得到广泛的应用,能够较好地控制病害。该技术一般以保持较高遗传稳定性的直接器官发生途径为主^[8]。快速繁殖技术在一些竹类上也有较多的应用^[30]。

3 外源激素对体细胞胚发生和器官发生途径的调控

一般来说,只有少数植物既存在体细胞胚发生,又存在器官发生^[31]。能够以器官发生再生的植物很难发生体细胞胚,反之亦然^[32]。由于单子叶植物的组织、器官不利于再分化^[33],利用外源激素调控禾本科植物 2 种再生途径将更加困难。

3.1 外源激素对体细胞胚发生途径的调控

2,4-D 是禾本科植物体细胞胚发生所必需的生长调节剂,其主要作用是诱导胚性愈伤组织形成,而高浓度的 2,4-D 又抑制体细胞胚发育,使愈伤组织中的体细胞胚处于球胚或球胚以前阶段,必须将其降低或去除后才能使体细胞胚发育完全^[10]。对于大部分禾本科植物来说,2,4-D 质量浓度以 2 mg/L 为最佳^[12],但也有较高浓度的报道^[34]。

6-苄基腺嘌呤(6-BA)等细胞分裂素不能诱导体细胞胚的形成,但是可以增强 2,4-D 诱导体细胞胚的效果^[10]。一些其他的生长调节剂如氯苯氧基乙酸(chlorophenoxyacetic acid)^[16,35]、除草剂毒莠定(picloram)^[9]等也可诱导禾本科植物体细胞胚的形成。

对于禾本科植物,利用 2,4-D 进行直接体细胞胚诱导较困难,一般是采用非常用的生长调节剂,如

诱导鸭茅叶肉直接体细胞胚发生用的是麦草畏(dicamba)^[6],诱导雀稗花轴的直接体细胞胚形成采用的是毒莠定与激动素(KT)的组合^[9]。

3.2 外源激素对器官发生途径的调控

诱导直接器官发生应用最多的是萘乙酸(NAA)和细胞分裂素。如 6-BA 可以诱导金发草不定芽的形成,NAA 可以诱导器官性愈伤组织的形成^[12,15];在甘蔗中,NAA 与低浓度的细胞分裂素(BA、BAP、KT 等)诱导叶片直接器官发生^[33]。

3.3 外源激素对同一物种内 2 种再生途径的调控

同一物种内 2 种再生途径的存在包括在同一块愈伤组织中获得 2 种再生途径和在同一外植体中通过控制激素配比而获得体细胞胚发生和器官发生分别存在 2 种情况^[36]。

2 种再生途径可能在愈伤组织被诱导后就出现分化,也可能在继代培养或再生过程中产生分化。一般较低浓度的生长素会诱导出既有器官发生又有体细胞胚发生的愈伤组织,如由 1~2 mg/L 的 2,4-D 诱导的牛筋草愈伤组织^[36-37]和 0.1~1 mg/L 的 2,4-D 诱导的金发草^[12]愈伤组织。另一方面,降低继代或分化培养基中的生长素或蔗糖浓度也会获得

器官和体细胞胚同时发生,如将在含有 2,4-D 和 12% 蔗糖的培养基上获得的玉米愈伤组织转移到含有 2% 蔗糖的培养基中后,会有绿色的器官组织产生,而继代培养 2 a 后,一部分愈伤组织变成胚性愈伤组织^[38];在继代培养基中降低 2,4-D 和 6-BA 的含量可以调控对野牛草(*Buchloe dactyloides*)再生途径的调控^[39];将甜龙竹(*Dendrocalamus hamiltonii*)经 1.0~3.0 mg/L 2,4-D 诱导出的愈伤组织放在含有 2 mg/L BA、1 mg/L KT、1 mg/L NAA 的 MS 培养基上诱导出体细胞胚发生和器官发生同时存在^[40]。

对于通过控制激素配比诱导同一类型外植体获得体细胞胚发生和器官发生分别发生的报道相对较少,一般来说,高浓度的生长素单独或附加一定低浓度的细胞分裂素趋向于诱导体细胞胚发生,而单独细胞分裂素或高浓度细胞分裂素附加低浓度的生长素趋向于诱导器官发生^[36]。由表 1 可见,诱导体细胞胚发生的生长素主要为 2,4-D,质量浓度一般在 1 mg/L 以上,氯苯氧基乙酸(4-CPA)、毒莠定等也具有一定的诱导能力。诱导器官发生的主要为细胞分裂素,如 BA、BAP、TDZ、KT 等。

表 1 激素对比对禾本科植物同一外植体器官与体细胞胚分别发生的调控

物种	外植体	诱导方式	再生方式	参考文献
雀稗(<i>Paspalum scrobiculatum</i>)	成熟的合子胚	1~5 mg/L 2,4-D	胚性愈伤组织	41
		20 mg/L 2,4-D 诱导 11 d 后转移到无激素的培养基中	胚性愈伤组织	
		20 mg/L 2,4-D 诱导 2~7 d 后转移到无激素的培养基中	丛生芽	
	颖果	0.5 mg/L 和 1 mg/L TDZ	丛生芽	18
		1 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L BA	胚性愈伤组织	
格兰马草(<i>Bouteloua gracilis</i>)	芽尖	1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BA	器官性愈伤组织	20
		2 mg/L BA + 1 mg/L 毒莠定附加或不加 40 mg/L 腺嘌呤		
		2 mg/L 2,4-D + 0.25 或 0.50 mg/L BA 1 mg/L 2,4-D + 0.50 mg/L BA		
甘蔗(<i>Saccharum</i> spp. interspecific hybrids)	芽尖	4 μmol/L BA 或 KT + 10~40 μmol/L NAA	丛生芽	16
		10 μmol/L 氯苯氧基乙酸 + 10 μmol/L NAA	体细胞胚发生	
金发草(<i>Pogonatherum paniceum</i>)	颖果	0.02~0.05 mg/L 2,4-D 或 0.1~20 mg/L NAA	器官发生	12
		大于 2 mg/L 2,4-D	体细胞胚发生	
大麦(<i>Hordeum vulgare</i>)	颖果	2 mg/L 2,4-D + 2.5 mg/L KT	器官发生	35
		2 mg/L 4-CPA + 2.5 mg/L KT	体细胞胚发生	
		2 mg/L 毒莠定 + 2.5 mg/L KT		
		2 mg/L 毒莠定 + 2 mg/L 4-CPA + 2.5 mg/L KT		
臂形草(<i>Brachiaria brizantha</i>)	颖果	4 mg/L 2,4-D 或 3 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L BA + 300 mg/L 水解络蛋白	体细胞胚发生	42
		3 mg/L BAP + 0.3 mg/L NAA	器官发生	

4 问题与展望

目前虽然已在部分禾本科植物中通过激素调控实现了体细胞胚发生与器官发生的同时发生或分别发生,但是在一些重要的粮食作物如水稻、小麦、玉米等中关于这一方面的报道却极少,尤其是关于调控体细胞胚发生和器官发生分别发生的报道更少。而且在目前研究中,主要工作集中于描述激素调控 2 种途径的现象,而对其调控分子机制的研究极少。随着理论和研究方法的不断突破,其在禾本科植物中的控制机制也将进一步被阐明,弄清这些关于控制体细胞胚发生与器官发生的机制将更有利于在更多的禾本科植物中实现对这 2 种发生途径的调控,从而根据实际需要选择再生方式,使植物组织培养技术更好地应用于植物育种工作中。

参考文献:

- [1] Rout G R, Mohapatra A, Mohan Jain S. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects[J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24: 531-560.
- [2] 朱至清. 植物细胞工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [3] Flick C E, Evans D A, Sharp W R. Organogenesis[M] // *Handbook of plant cell culture: Vol. 1*. New York: Macmillan Publishing Co., 1983: 13-81.
- [4] Ammirato P V. Embryogenesis [M] // *Handbook of plant cell culture: Vol. 1*. New York: Macmillan Publishing Co., 1983: 82-123.
- [5] Vasil I K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses[M] // *Plant tissue culture*. Tokyo: Japanese Association of Plant Tissue Culture, 1982: 107.
- [6] Conger B V, Hanning G E, Gray D J, et al. Direct embryogenesis from mesophyll cells of orchardgrass[J]. *Science*, 1983, 221: 850-851.
- [7] Franklin G, Arvinth S, Sheeba J, et al. Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) midrib segment explants [J]. *Plant Growth Regulation*, 2006, 50: 111-119.
- [8] Lakshmanan P. Somatic embryogenesis in sugarcane- An addendum to the invited review 'sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities' [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2006, 42: 201-205.
- [9] Kaur P, Kothari S L. *In vitro* culture of kodo millet: Influence of 2, 4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, 77: 73-79.
- [10] 王大元. 禾谷类植物的细胞培养和体细胞胚胎发生[J]. *细胞生物学杂志*, 1984, 6(1): 16-20.
- [11] Wang M S, Zapata F J, De Castro D C. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature seed and young inflorescence of wild rice (*Oryza perennis* Moench) [J]. *Plant Cell Reports*, 1987, 6: 294-296.
- [12] Wang W G, Zhao X G, Zhuang G Q, et al. Simple hormonal regulation of high efficiency somatic embryogenesis and/or organogenesis in mature caryopsis cultures of *Pogonatherum paniceum* (Lam.) Hack. (Poaceae) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2008, 95(1): 57-67.
- [13] Li R, Bruneau A H, Qu R. Improved plant regeneration and *in vitro* somatic embryogenesis of St Augustinegrass [*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze] [J]. *Plant Breeding*, 2006, 125(1): 52-56.
- [14] Bhaskaran S, Smith R H. Regeneration in cereal tissue culture: A review [J]. *Crop Science*, 1990, 30: 1328-1336.
- [15] 王文国, 王胜华, 庄国庆, 等. 岩生植物金发草的离体快速繁殖[J]. *植物生理学通讯*, 2006, 42(3): 482.
- [16] Lakshmanan P, Geijskes R J, Wang L F, et al. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture [J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25: 1007-1015.
- [17] Yemets A I, Klimkina L A, Tarassenko L V. Efficient callus formation and plant regeneration of goosegrass [*Eleusine indica* (L.) Gaertn.] [J]. *Plant Cell Reports*, 2003, 21: 503-510.
- [18] Vikrant, Rashid A. Induction of multiple shoots by thidiazuron from caryopsis cultures of minor millet (*Paspalum scrobiculatum* L.) and its effect on the regeneration of embryogenic callus cultures [J]. *Plant Cell Reports*, 2002, 21: 9-13.
- [19] Ncanana S, Brandt W, Lindsey G. Development of plant regeneration and transformation protocols for the desiccation-sensitive weeping lovegrass *Eragrostis curvula* [J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 24: 335-340.
- [20] Aguado-Santacruz I G A, Cabrera-Ponce J L, Olalde-Portugal V, et al. Tissue culture and plant regeneration of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H. B. K.) Lag. ex Steud [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2002, 37: 182-189.
- [21] Phillips R L, Kaeppler S M, Oihoft P. Genetic instability of plant tissue culture: Breakdown of normal

- controls[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91: 5222-5226.
- [22] Mahlanza T, Snyman S J, Watt M P, *et al.* Towards the *in vitro* generation of somaclonal variant plants of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) for tolerance to *Fusarium sacchari* toxins[J]. South African Journal of Botany, 2012, 79: 196-196.
- [23] Vasil I K, Scowcroft W R, Frey K J. Plant improvement and somatic cell genetics[M]. New York: Academic Press, 1982.
- [24] Chawla H S. Introduction to plant biotechnology[M]. 2nd eds. USA: Science Publishers, 2002.
- [25] Wang W G, Wang S H, Wu X A, *et al.* High frequency plantlet regeneration from callus and artificial seed production of rock plant *Pogonatherum paniceum* (Lam.) Hack. (Poaceae)[J]. Scientia Horticulturae, 2007, 113(2): 196-201.
- [26] 王文国, 赵小光, 王胜华, 等. PEG 胁迫对不同培养方式下金发草愈伤组织再生能力的影响[J]. 生物工程学报, 2007, 23(2): 337-342.
- [27] Xu X M, Ye H C, Li G F, *et al.* Comparison of some characteristics between *Phragmites communis* and its salt tolerant variant[J]. Acta Botanica Sinica, 2000, 51: 1126-1130.
- [28] Li B, Wei A Y, Song C X, *et al.* Heterologous expression of the *TsVP* gene improves the drought resistance of maize[J]. Plant Biotechnology Journal, 2008, 6: 146-159.
- [29] Toki S, Hara N, Ono K, *et al.* Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice[J]. Plant Journal, 2006, 47: 969-976.
- [30] 刘正娥. 3 种丛生竹快速繁殖技术研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2012.
- [31] Phillips G C. *In vitro* morphogenesis in plants—recent advances[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2004, 40: 342-345.
- [32] Zuo J, Niu Q W, Ikeda Y, *et al.* Marker-free transformation: increasing transformation frequency by the use of regeneration promoting genes [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13: 173-180.
- [33] Gill R, Malhotra P K, Gosal S S. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2006, 84: 227-231.
- [34] Dey T, Bhattacharya S, Ghosh P D. Somatic embryogenesis from rhizome explants of *Cymbopogon winterianus* [J]. Biologia Plantarum, 2010, 54(2): 325-328.
- [35] Bouamama B, Salem A B, Youssef F B, *et al.* Somatic embryogenesis and organogenesis from mature caryopses of North African barley accession “Kerken” (*Hordeum vulgare* L.) [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2011, 47(2): 321-327.
- [36] 王文国. 金发草 (*Pogonatherum paniceum*) 体细胞胚发生与器官发生的激素调控 [D]. 成都: 四川大学, 2007.
- [37] Yemets A I, Klimkina L A, Tarassenko L V. Efficient callus formation and plant regeneration of goosegrass [*Eleusine indica* (L.) Gaertn.] [J]. Plant Cell Reports, 2003, 21: 503-510.
- [38] Lowe K, Taylor D B, Patryan, *et al.* Plant regeneration via organogenesis and embryogenesis in the maize inbred line B73 [J]. Plant Science, 1985, 41: 125-132.
- [39] Fei S Z, Riordan T, Read P. Stepwise decrease of 2, 4-D and addition of BA in subculture medium stimulated shoot regeneration and somatic embryogenesis in buffalograss [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 70: 275-279.
- [40] Zhang N, Fang W, Shi Y, *et al.* Somatic embryogenesis and organogenesis in *Dendrocalamus hamiltonii* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2010, 103: 325-332.
- [41] Vikrant, Rashid A. Somatic embryogenesis or shoot formation following high 2, 4-D pulse-treatment of mature embryos of *Paspalum scrobiculatum* [J]. Biologia Plantarum, 2003, 46: 297-300.
- [42] Cabral G B, Carneiro V T C, Lacerda A L, *et al.* Somatic embryogenesis and organogenesis in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2011, 107: 271-282.