

細胞工程原理

山东农业大学生命科学学院

- 1. 细胞工程

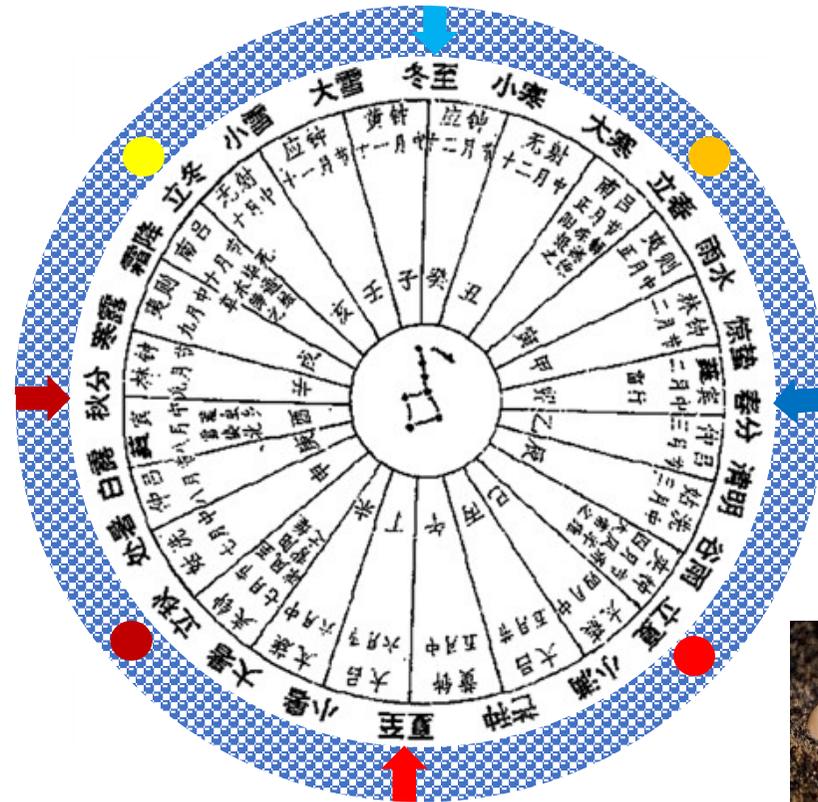
- 在细胞水平上进行的**教学、科研、生产**操作（包括细胞培养、遗传转化、植株再生、物质生产等）。

自然与社会科学交叉融合
创新生成的系统工程

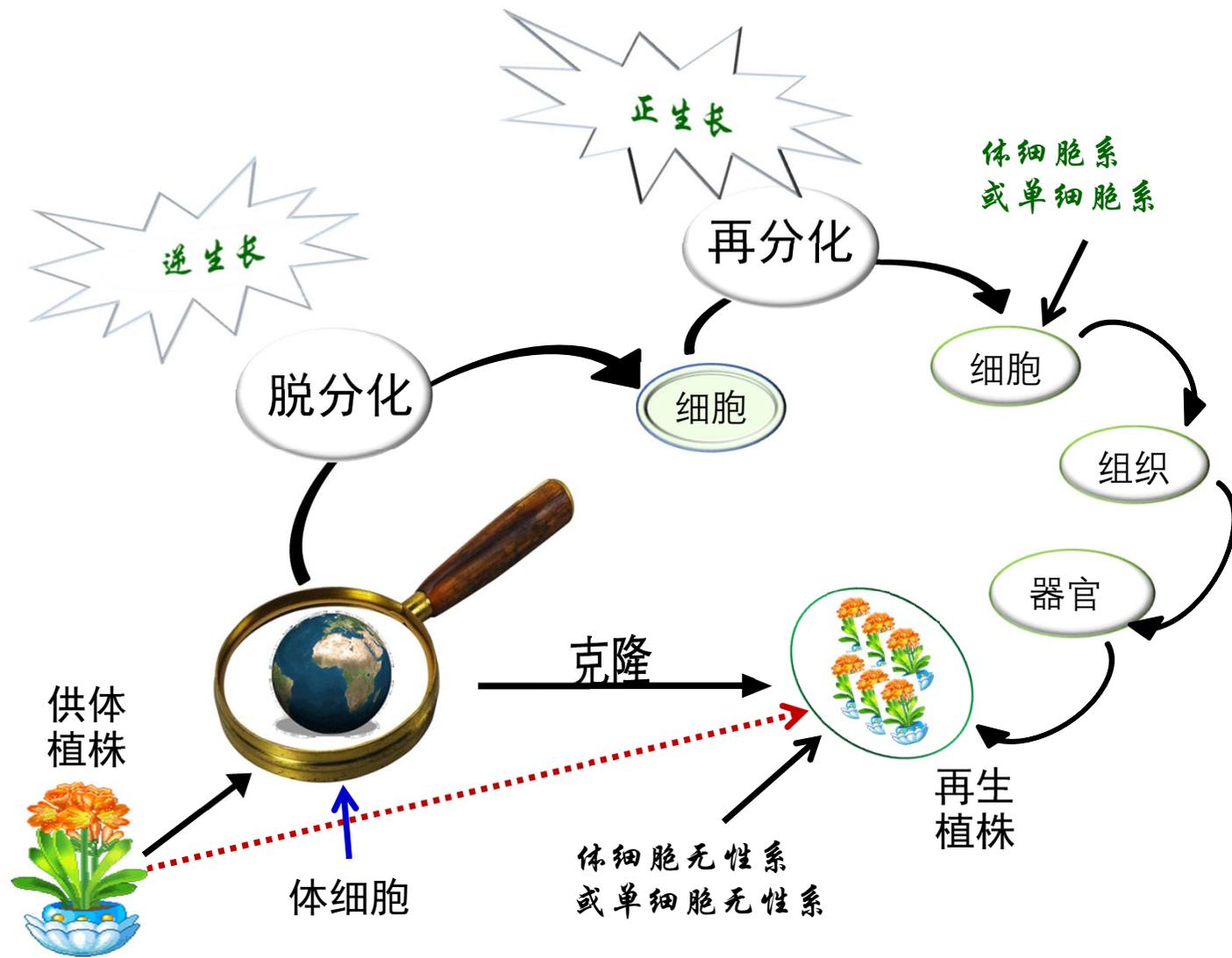
梦想载体
实验平台



认识 理解 探索 利用



期种
盼下
繁一个
花细
似锦胞
,
希期
望待
硕枝
果繁
累累叶
茂



• 2. 植物组织培养

从植物体或人工培养物上取得实验材料，接种在**人工模拟**生态环境中诱导培养，保持存活. 生长. 发育，直到再生完整的植株(或新的细胞、组织、器官)，继而以此生产目的物质。

• 3. 此概念所包含的信息

◆ 组培三个层次

◆ 外植体

◆ 人工调控因子

◆ 直接产物的几种形式及最终目的

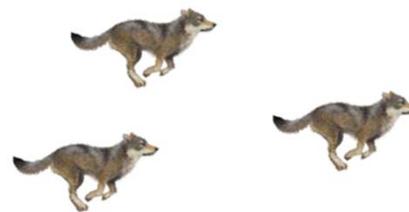
◆ 取材及作用

◆ 人工模拟细胞生存环境

◆ 组培发展三个阶段

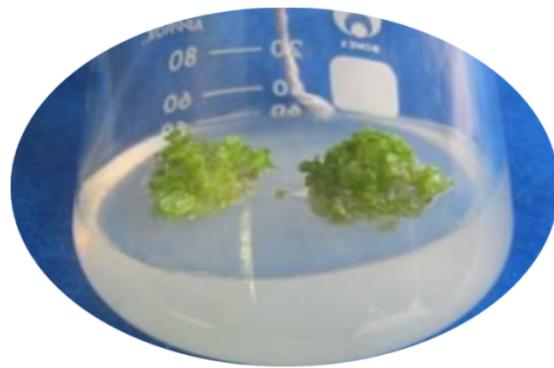
4. 植物离体培养三个层次的比较

培养层次	部分培养因素				
	培养基	培养状态	激素	光照	难易
细胞	液体	悬浮运动	必需高浓度	暗培养	较难
组织	固体	表面静止	需要有例外	需要	一般
器官	固体	表面静止	不需要少量	需要	较易



• 5. 植物组培5种类型 (根据培养材料不同)

- 愈伤组织培养
- 悬浮细胞培养
- 原生质体培养
- 器官组织培养 (胚、花药等)
- 茎尖组织培养



最基本的组织培养形式。除部分的茎尖、器官培养外，其他培养形式都要经愈伤组织培养再生植株。

- 6. 植物组培理论基础

- 核心理论依据是**植物细胞全能性**。

- 离体细胞具有生命的特征属性，在全能性的基础上，提供合适的营养和环境条件，离体细胞经历**脱分化和再分化**，可再生植株。



- **7. 脱分化**

- 一个成熟的植物细胞重新获得某种分生能力，转变为某种分生状态。

或：一个成熟的植物细胞转变为**某种分生状态**进而**分裂增殖**形成愈伤组织。

- **8. 再分化**

- 脱分化了的植物细胞进行分化形成再生植株(细胞、组织或器官)。

脱分化(dedifferentiation);再分化(redifferentiation)

第1节 植物细胞全能性

只要有一个**完整的膜系统**和一个有**生命力的核**，即使已高度分化(成熟)的植物细胞，也还**保持着恢复分生状态的能力**。

- 将分化组织中不分裂的相对静止的细胞接种在能促进其增殖的培养基上，细胞便进入分裂状态。

一、植物细胞全能性

- 1. 植物细胞全能性的概念
- 任何具有**完整细胞核和膜系统**的**活**植物细胞，都拥有形成一个完整植株所必需的**全部遗传信息**。
- 细胞全能性的实现必须经过**脱分化和再分化**两个过程。
- 在某些情况下，细胞的分裂、分化和发育并不导致细胞中**遗传信息的丢失或不可逆变化**，只是遗传信息的调控有改变。

- **2. 全能性概念的说明** (不同学者阐述的侧重点与切入角度不同)
- **◆有的强调遗传物质的价值或意义，重视遗传的物质背景(基础)及细胞结构的完整性(或重要性)。**
- **◆有的重视实践的价值，事实无言，克隆已经在很多植物上取得成功。**
- **◆本概念从理论与实践两个方面对全能性进行全面阐述。**

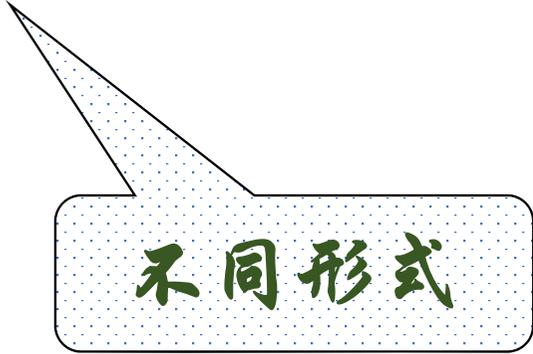
- 3. 全能性的提出

- ◆1902年，提出**植物细胞全能性**理论，即植物体细胞具有在适当条件下不断分裂和繁殖、发育成完整植株的能力。
- ◆1970年，解释为：每一个细胞具有该植物的全部遗传信息，具有发育成完整植株能力。

- ◆1980年，解释为：植物细胞带有该植物的**全部遗传信息**，在适当条件下可表达出该细胞所有遗传信息，分化出植物体所有不同类型的细胞，形成不同类型的组织和器官，再生完整植株。
- ◆再生植株(细胞、组织、器官)及次生物质产生等，都是细胞全能性的表现，只是**表现形式不同**、或者说**基因表达内容不同**、或者说**活跃的基因不同**而已。

• 4. 植物细胞全能性的讨论

- ◆植物细胞全能性是一种可能性，是细胞的一种固有自然属性，要使其变为现实，就必须把细胞从植物有机体的严密控制环境中解放出来，使其处于某种自由的状态（如离体的游离状态），给予适当条件刺激（诱导）。



不同形式

- ◆ 植物体的全部活细胞都是由细胞分裂产生的，每个细胞都包含着**整套遗传基因**。

受到植株、器官或组织环境的**束缚**，致使植株中不同部位的细胞仅表现出一定的形态和功能。

细胞遗传潜力并未消失，一旦**脱离原器官或组织的束缚**，并在一定的条件下培养，就可实现其全能性。



- ◆目前技术水平有限，无法使所有的离体植物细胞都实现全能性，多数情况下离体细胞全能性的实现是**分生组织等全能性保持较好的细胞**。
- ◆离体条件下，摆脱了供体**(组织、器官或完整植株)**的束缚，离体细胞生命特征属性的表现过程和形式都将发生变化：

- **新陈代谢**

主要依靠培养基提供碳源，没有或很少进行光合作用。

- **调控能力**

培养物从自养转变为异养状态。

- **生长发育**

离体细胞可改变原来生长发育方向或进程(如胚胎发生、脱分化等)。

- **遗传进化**

离体培养可增加培养物的变异性，快速扩增某些变异等。

- ◆生物有机体总是处在严格有序的动态平衡（系统）之中，任何内环境的改变必然使旧的平衡打破而达到新的平衡。
- ◆植物体是由各个层次如基因水平、细胞水平、组织水平、器官水平构成的生命大系统，各系统内和系统间的协调运行，是维持植物生长的先决条件，其动态平衡关系还制约其发育进程。

一种相对稳定生命运动状态

- ◆离体细胞摆脱了植株的控制，破坏了(脱离了)原生命系统中固有的平衡关系，细胞自身的生命系统获得了独立和自由。细胞作为生命活动的基本单元（单位），在一定条件下仍将按原有的平衡关系(中所决定的)进行生命活动，表现(或表达)其全能性。
- ◆离体培养条件应使细胞处于像原来有机体状态下所处的平衡关系中，更重要的是需满足细胞向其他方向分化所需的各种平衡关系，以达到(实现)培养目的。

二、植物细胞的分化

• 分化

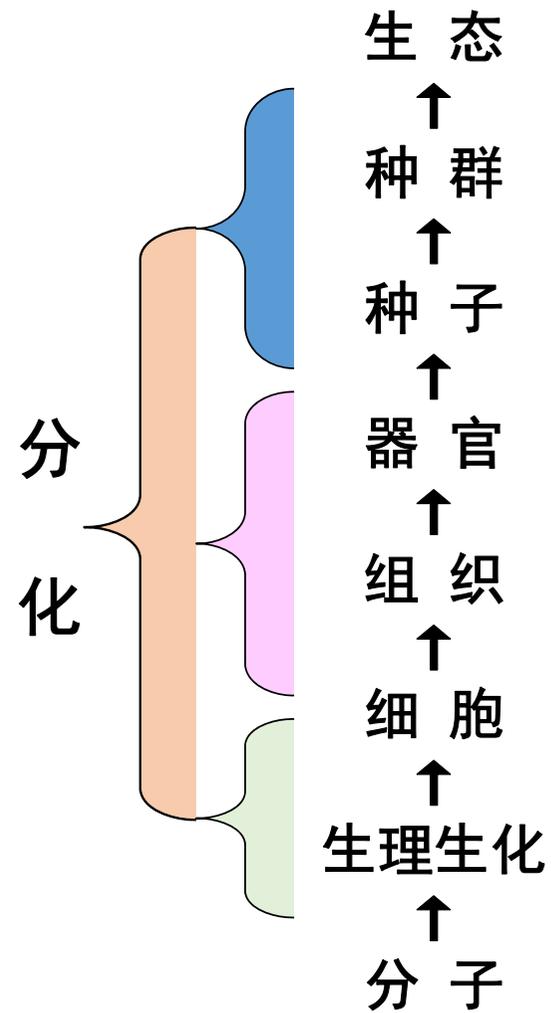
植物体各个部分出现异质性(或异质性分化)的现象。

◆传统意义上讨论分化问题，仅仅结合生物体的产生、生长、发育展开。

◆可以在细胞、组织或器官水平上表现出来，如细胞分化、组织分化、器官分化。

◆现在讨论分化问题，分别向微观和宏观进行了延伸，形成了大分化的新理念。

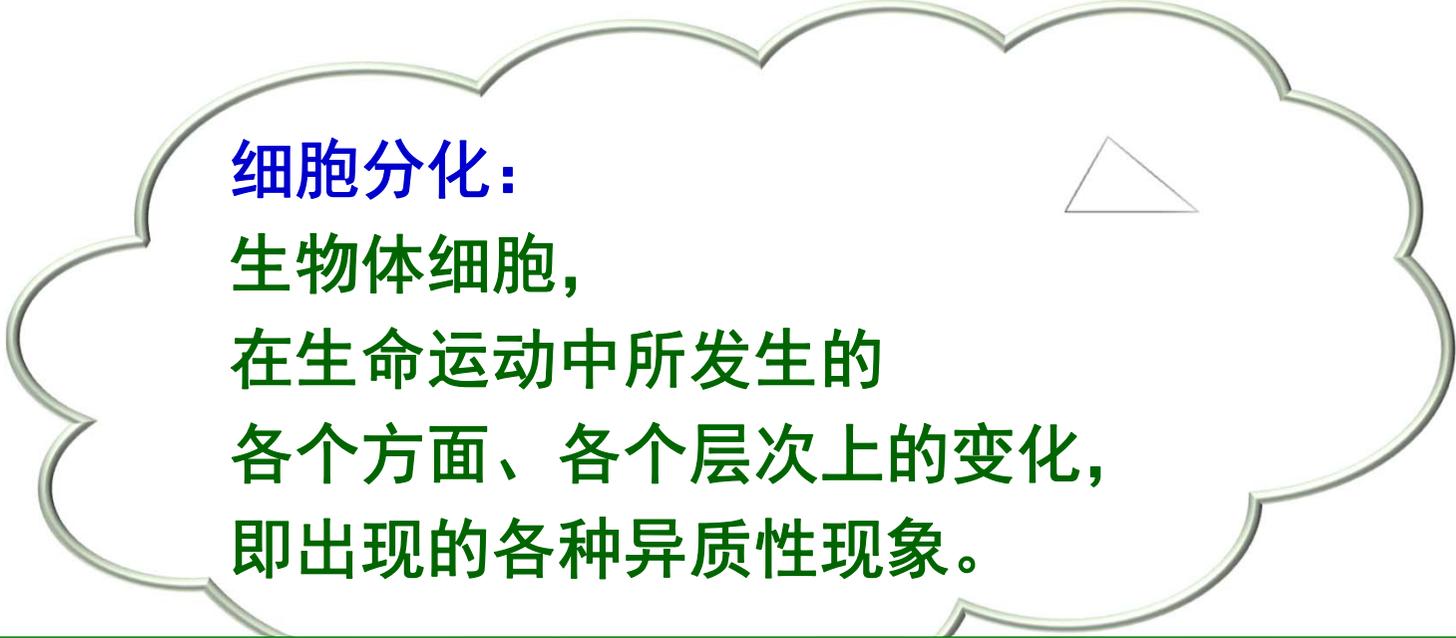
分化
是客观存在
呈现多样性
具有包容性
伴随其它生命活动



• 细胞分化

指细胞结构、功能或发育方式的改变。

- ◆ 是组织和器官分化的基础，是离体培养植株再生的基础。
- ◆ 是生物发育的核心问题，是基因选择性活化或阻遏的结果。基因的活化或阻遏使细胞在结构、生理生化特性上发生改变，导致细胞的分化。



细胞分化：

生物体细胞，
在生命运动中所发生的
各个方面、各个层次上的变化，
即出现的各种异质性现象。

-
- 一个成熟细胞，通常仅有5%~10%的基因处于活化状态(同时?)。细胞通过什么方式，使大部分遗传信息不再表达，而仅有小部分特定基因活化，使细胞执行特定功能？此问题尚待进一步阐明。

- **利用离体培养揭示细胞分化的规律和机理主要表现在：**
- **① 细胞分化可分为形态结构及生理生化分化**
 - ◆ 形态结构分化之前往往先出现生理生化分化。
 - ◆ 基因活化表现为合成不同的酶或蛋白质分子。

- ②基因(组)关闭的情况(一种推测?)

生长发育过程中的植物不存在部分基因(组)永久关闭的情况，只要条件合适细胞全能性即可表现出来。

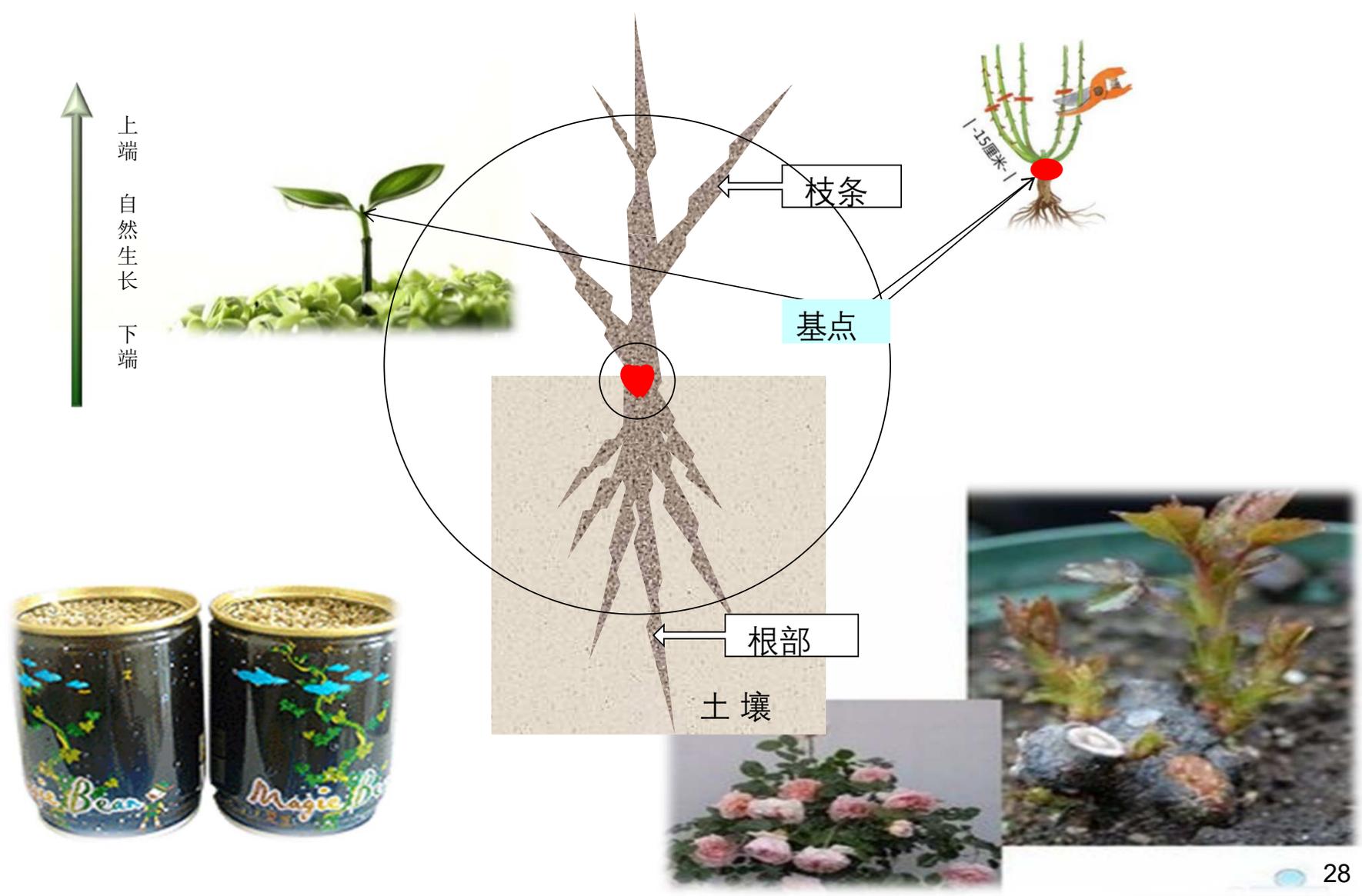
- ③细胞分化途径的决定

在完整植株中，细胞分化途径一旦被决定，通常不易改变，但离体培养可以通过脱分化而丧失这种决定。

- ④生物极性

- 植物有机体（器官. 组织. 细胞）在不同轴向上存在某种形态结构、物质组成和生理生化等方面的差异（与分化关系密切）。
- 极性一旦建立常难以逆转，如：
 - ◆茎切段再生芽常发生在材料的 **远基端** 。
 - ◆根切段形成芽常发生在材料的 **近基端** 。

根的发生则总是与此相反



- **⑤生理隔离在细胞分化中的作用**
- 在低等植物中表现明显并已证实，高等植物有待研究。
- **◆胡萝卜悬浮细胞的生理隔离是胚发生的前提条件，胚状体并非由游离的单个细胞直接形成，问题复杂。**
- **◆在柑橘未受精胚珠的珠心组织形成的胚性愈伤组织中，形成胚状体的原始细胞被厚的壁包围，无胞间连丝。**

生理隔离又称机械隔离

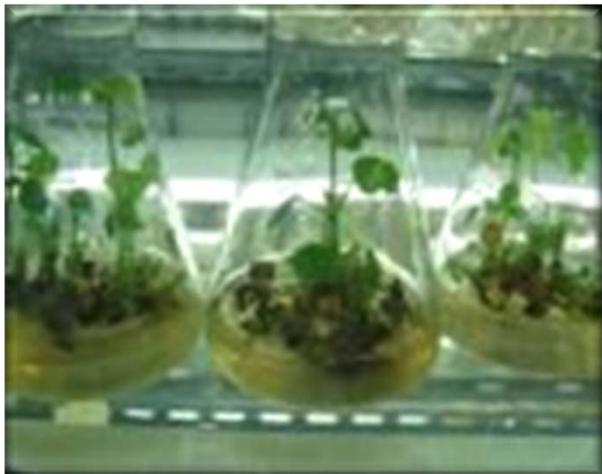
- **⑥细胞分裂对细胞分化有重要作用**
- 特定的细胞分裂可导致特定的细胞分化。
- 细胞质对细胞分化有作用。
- 在细胞分化中，核质之间、不同组织和器官之间存在复杂关系。
- **⑦生长调节剂对细胞生长. 分裂. 分化的作用**
- 根或芽的分化产生，取决于生长素与细胞分裂素的比值，**比值高**促进生根，**比值低**促进生芽，**二者相等**时倾向于无结构方式生长，即**控制器官分化的激素模式**。

- **⑧核染色体和DNA对细胞分化的作用**

- 细胞分化中常见染色体多次复制而细胞不分裂所形成的核内多倍性和多线染色体。
- **如：**菜豆属的几种植物胚柄细胞形成多线染色体，推测与胚胎发育代谢有关。
- DNA的差异复制在一些生物的分化发育中起重要作用。

三、冠 瘿 瘤

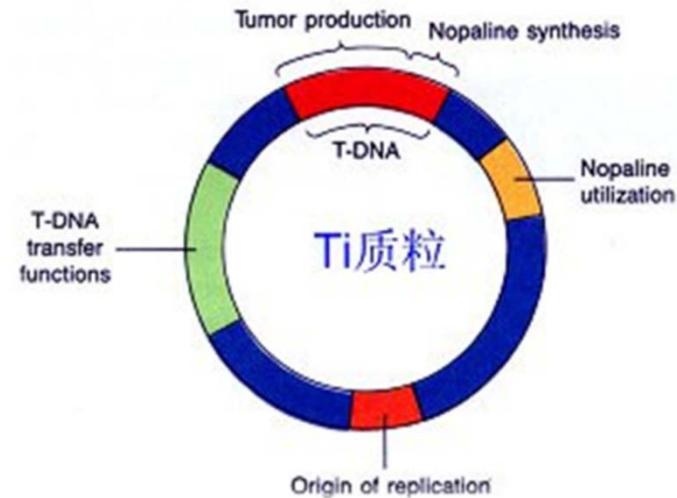
- 冠瘿瘤的形成是植物细胞分化研究中的一个特殊问题。
- 冠瘿瘤是受伤植物经土壤根癌农杆菌感染而异常分化形成的愈伤组织，进而生长形成的肿瘤。



- 双子叶植物和裸子植物，均可诱发冠瘿瘤，而单子叶植物则较困难。
- 某些无性增殖的冠瘿瘤的培养物，经过一定的处理，**可转化为正常细胞。**



- 冠瘿瘤可作为离体研究细胞分化的实验体系，尤其适宜于对细胞分化基因调节机理的研究。
- 肿瘤的形成与该菌所带的致瘤质粒有关。
- 致瘤质粒即 **Ti质粒**



致瘤质粒 (tumour inducing plasmid)

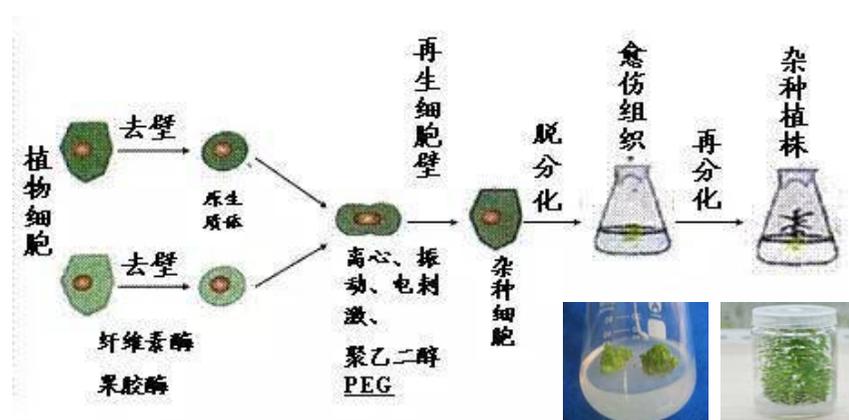
- 核酸分子杂交等研究证实，该菌转化形成的植物肿瘤细胞核DNA中，含有T-DNA。
- 正是T-DNA的插入，使系列生物合成系统逐渐活化，特别是生长素、分裂素、一些含氮化合物和肌醇等的合成，促使细胞恶性生长而致瘤。
- 这进一步说明了植物激素在这种异常细胞分化中的作用。
- 同时，T-DNA可随细胞分裂而传递，甚至可通过有性世代传递到子代中。

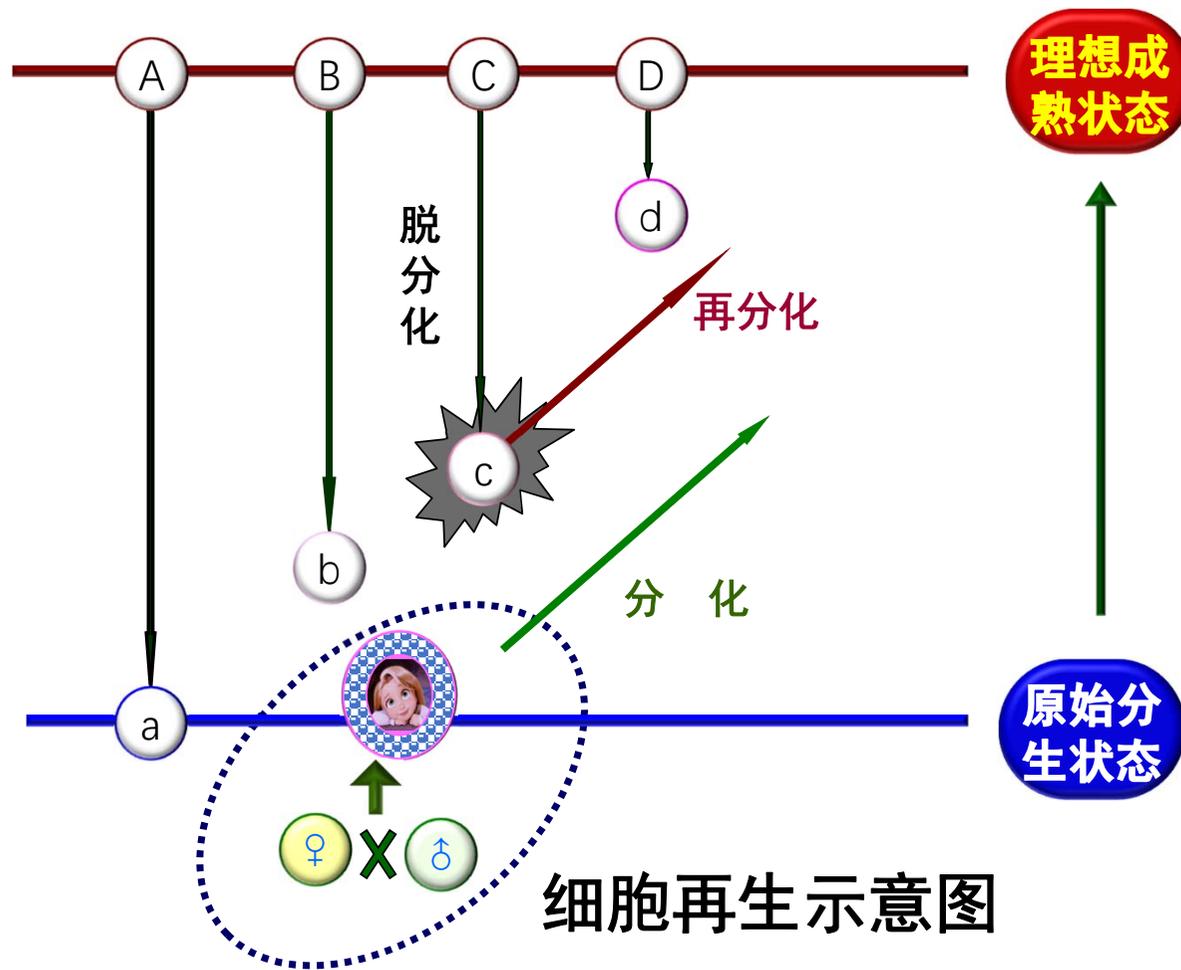
T-DNA, 即一段Ti质粒的DNA, 即转移DNA。

第2节 离体植物器官的发生

一、脱分化和再分化

- 1. 脱分化（也称去分化）
- 离体培养条件下生长的细胞经过**分裂或不分裂**逐渐失去原来的结构和功能而恢复（到某种）分生状态，形成无组织结构的细胞团或愈伤组织或成为具有（某些）未分化细胞特性的细胞的过程。





• 关于脱分化

- ①离体培养细胞脱分化大多需经过细胞分裂产生子细胞，进而增殖形成细胞团或愈伤组织。
- 也有一些离体培养细胞不需经细胞分裂，只是本身细胞可以获得某种分生能力而恢复分生状态，即可再分化。



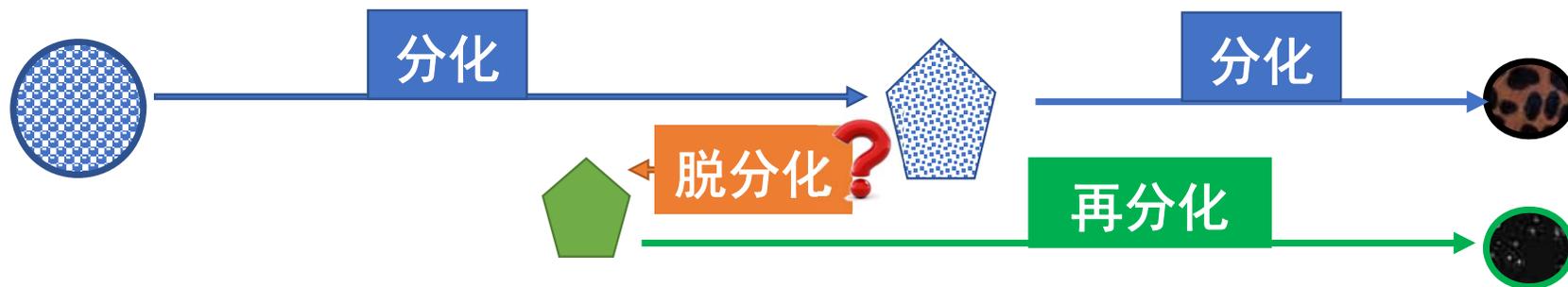
- ②细胞脱分化并非离体培养所特有，而是植物界常见的现象。
- 秋季树木落叶，叶柄基部已分化的薄壁细胞恢复分生能力，形成离层细胞。
- 根的中柱鞘已分化的薄壁细胞恢复分生能力增生的细胞向外突起，形成根原基。



- ③在自然情况下，植物任何正在生长的部位如果受到虫伤、病伤、机械损伤等，局部的细胞因受到创伤刺激，则内源生长素进行调控而启动脱分化，恢复分生能力，形成愈伤组织。



- ④脱分化形成愈伤组织，对受伤的组织起保护作用，有利于伤口的快速修复愈合，也是植物体的一种自我修复能力。
- ⑤离体培养的细胞，要实现其全能性，首先要经历脱分化恢复分生状态，然后再分化。



- ⑥脱分化是分化的**逆**过程。
- 与细胞分化一样，脱分化的机理尚未清楚阐明，人们已经积累了诱导脱分化期间的细胞学及生理生化方面变化的一些资料，这些变化改变了细胞原有的生理状态，引起细胞分裂。

诱导脱分化期间可能发生的变化

- 膜透性的改变
 - 细胞核的增大
 - 内质网范围扩大
 - 多核糖体形成
 - 气体交换率增加
 - 乙烯产物增加等
- 不同基因活化引起的生长激素的分解或合成
 - 过氧化物酶增加
 - 蛋白质和酚类物质合成活跃

- **2. 再分化**
- 离体培养的植物细胞和组织可以由脱分化状态重新进行分化，形成一种或多种新类型的细胞、组织、器官和完整植株。
- 脱分化的细胞再分化有两种方式：

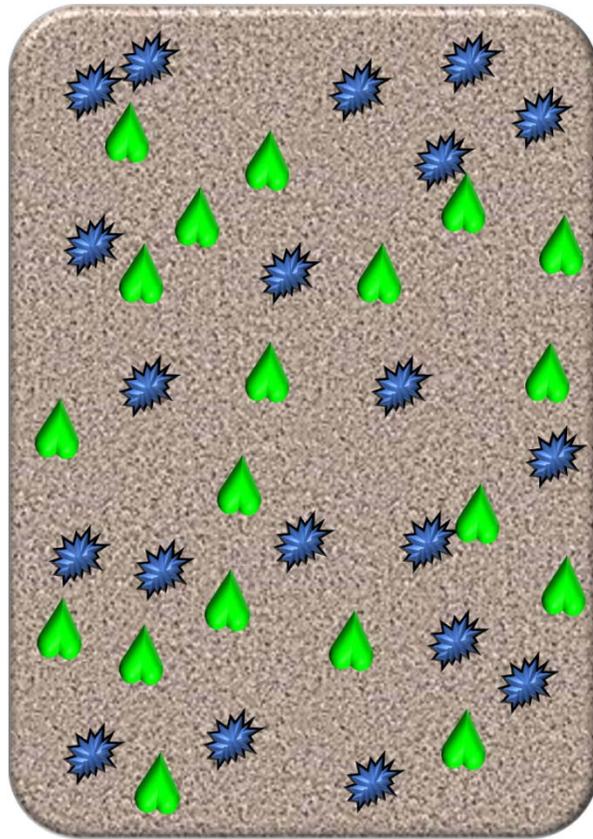
器官发生方式
胚胎发生方式

- (1)器官发生方式

芽和根在愈伤组织的不同部位分别独立形成，形成时间不一致，为单极性结构，里面各有维管束与愈伤组织相连，在芽和根之间并没有共同的维管束连接。

- 可从三个方面来理解：

- ◆发生的部位完全独立
- ◆发生的时间完全独立
- ◆发生的次序完全独立



🟢 可能发生芽的部位

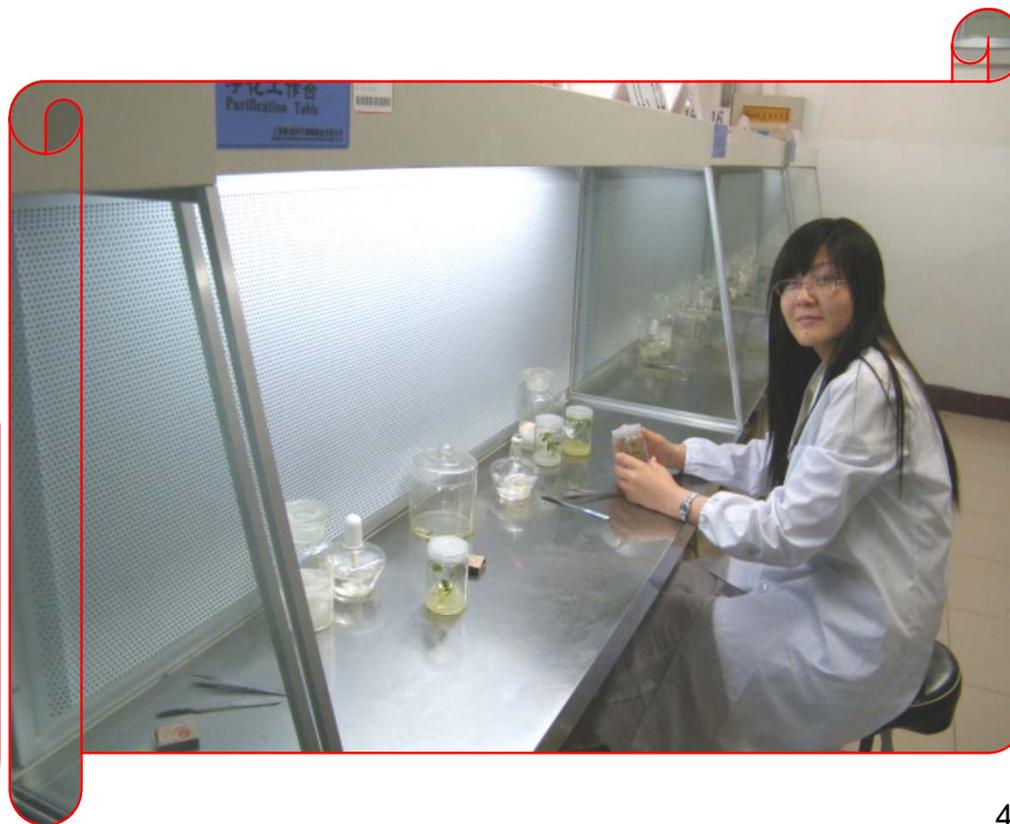
🌟 可能发生根的部位

■ 愈 伤 组 织

器官发生方式示意图

- 愈伤组织中器官的发生情况很复杂:

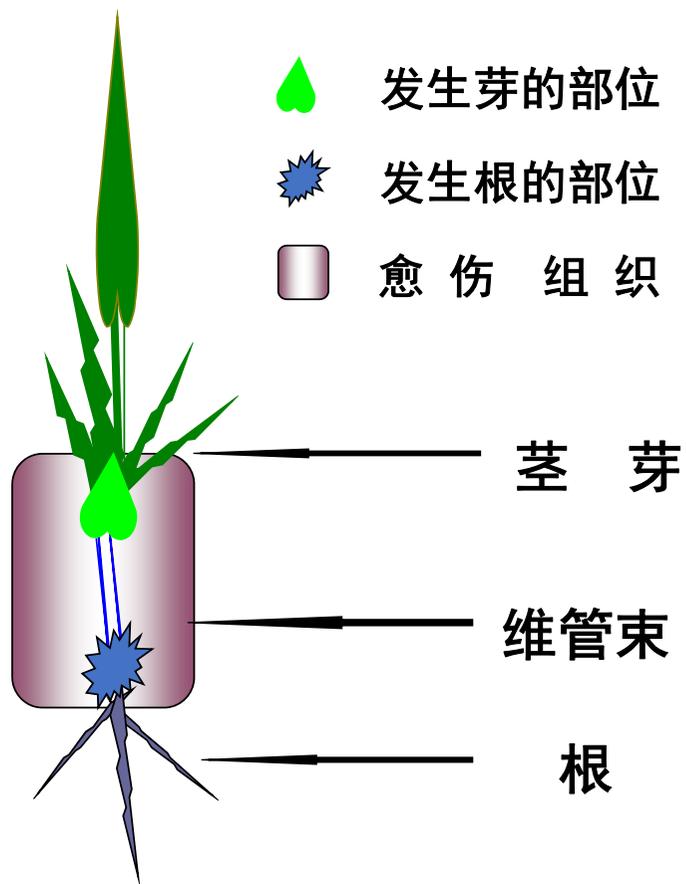
- ◆ 具有不可确定性
- ◆ 具有不可预期性
- ◆ 看起来杂乱无章
- ◆ 受多种因素影响



要关注两个问题：

- 对于给定的芽的发生部位总能找到一个在物理意义或生物学意义上最近的根的发生部位（已经，正在，即将）。
- 对于给定的根的发生部位总能找到一个在物理意义或生物学意义上最近的芽的发生部位（已经，正在，即将）。





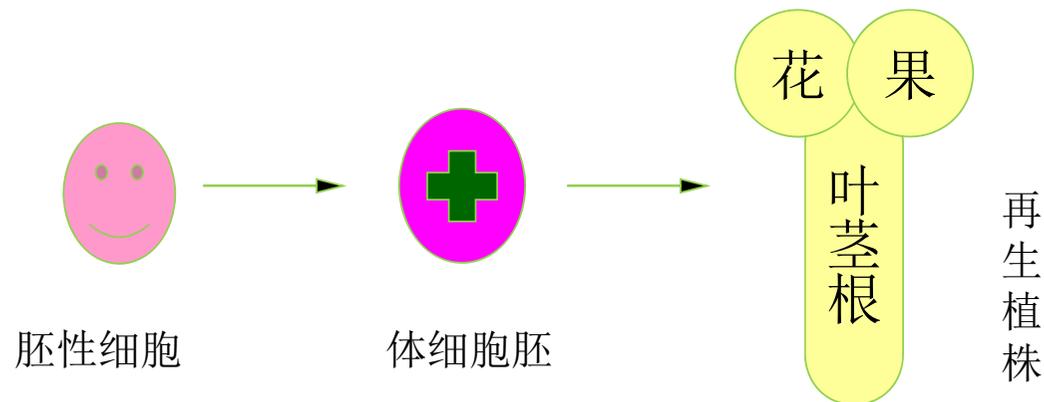
器官发生方式示意图

在组织培养的过程中，相邻的芽点与根点所产生的维管束之间会逐渐对接，将二者连接起来，形成一个完整的再生植株。



• (2)胚胎发生方式

- 愈伤组织里面或表面形成很多体细胞胚，其发育与合子胚相似，成熟体细胞胚的结构也与合子胚相同，体细胞胚是双极性的，有共同的维管束贯穿两极，可脱离愈伤组织在无激素培养基上独立萌发。



- **一般认为：**

- ▶ **愈伤组织中的不定芽起源于一个以上的细胞。**
- ▶ **体细胞胚起源于一个细胞，长成的植株各部分遗传组成应一致，不存在嵌合现象。**
- ▶ **但在此类再生植株中也发现了嵌合体，认为体细胞胚也可能起源于一个以上的细胞。**
- ▶ **多数植物体细胞胚结构典型，但小麦等植物幼龄体细胞胚的盾片常变大变绿，出现早熟萌发现象**

- **通过体细胞胚途径再生植株的优点：**

- → 培养物产生体细胞胚的数目比不定芽要多，如1个离体烟草花药可产生 200多个胚状体。
- → 体细胞胚形成速度快。
- → 胚状体结构完整，一旦形成，便可直接萌发形成小植株，成苗率高。



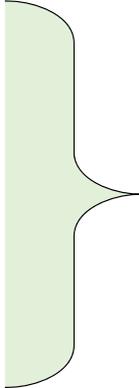
(3)再分化的三个水平：



- ◆ 细胞水平的再分化
- ◆ 组织水平的再分化
- ◆ 器官水平的再分化

- ①细胞水平的再分化

- 发生的变化
 - ◆ 细胞壁变厚
 - ◆ 假导管细胞的形成
 - ◆ 酶水平的变化
 - ◆ 明显的机能分化



从而形成各种类型的细胞

- 这些变化可归纳为三个方面：
 - ◆ 物质结构方面的变化
 - ◆ 生理生化方面的变化
 - ◆ 功能性质方面的变化

- ②组织水平的再分化

- 当愈伤组织在高水平生长素条件下，最常见的是维管组织的分化。
- 松散的愈伤组织内含有大量拟分生组织或瘤状结构。
- 致密的愈伤组织内组织分化很少，大多由高度液泡化的细胞组成。

维管组织(vascular tissue); 松散的愈伤组织(friable callus)
拟分生组织(meristemoid); 致密的愈伤组织(compact callus)

- ③器官水平的再分化

- 再分化的组织可形成各种器官，如根、茎或芽、叶、花以及多种变态的器官(如鳞茎、球茎、块茎等)。

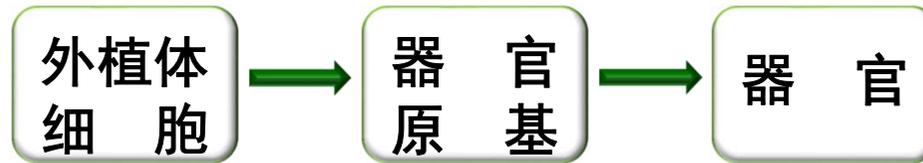
- 根据起源不同，器官发生可分为器官型和器官发生型。



器官水平的再分化(又称器官发生)

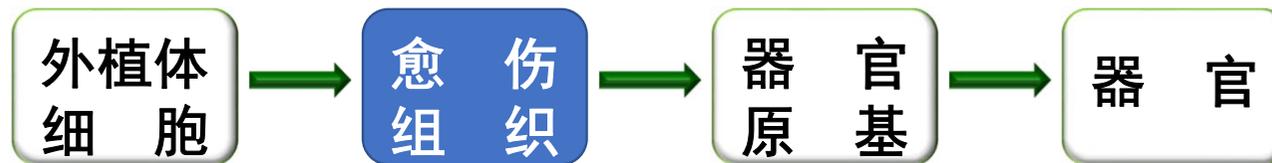
- ◆器官型

- 直接由外植体细胞形成器官原基，继而发育成器官。

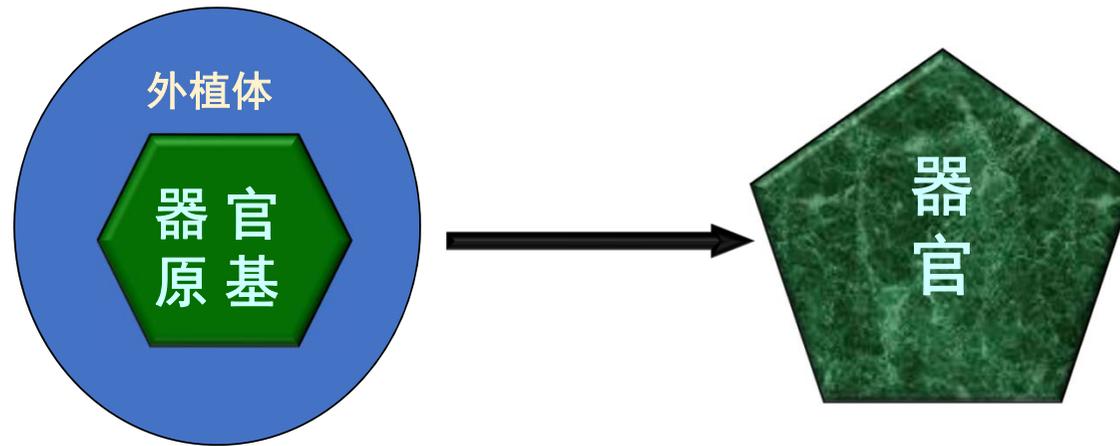


- ◆器官发生型

- 由外植体先形成愈伤组织，再由愈伤组织产生不同的器官原基。

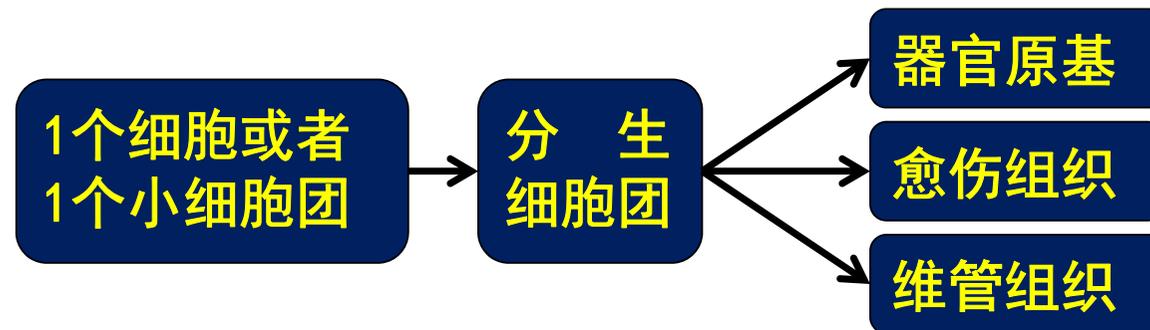


- 在有些情况下，器官是由外植体中已存在的器官原基发育成的。



- 多数是经过分化重新形成的，外植体脱分化后形成分生细胞团，随后分化成不同的器官原基。

- 这些分生细胞团通常由1个细胞或1个小细胞团分裂形成，细胞内原生质稠密，细胞核显著增大，形成一段时间后，在器官纵轴上出现单向性，进而形成器官原基。
- 分生细胞团并不一定导致器官发生，有时可能继续形成愈伤组织，或分化成维管组织。



- **3. 植株再生**

- 在离体培养中通过根、芽发生形成再生植株的方式**大致有三种**：

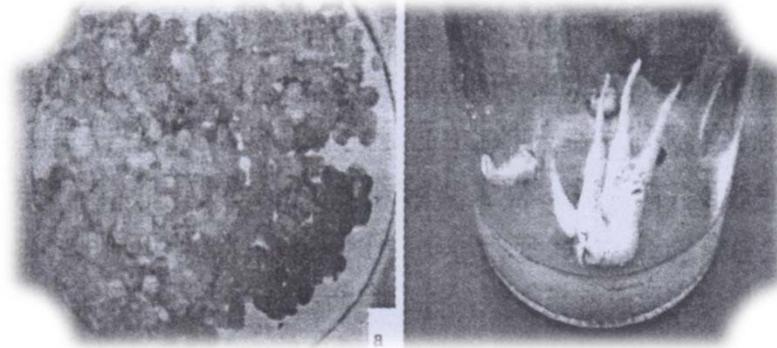
- ◆ 芽产生后，基部长根形成小植株。

- ◆ 先形成根，根上再出芽。

- ◆ 愈伤组织的不同部位，分别形成芽和根然后形成维管组织把两者结合起来形成一个植株。

- 一般而言，离体培养中先形成芽后，其基部很容易形成根，而培养物如先形成根，则往往抑制芽的形成；所产生的根. 芽一般为不定根. 不定芽。
- 一些具有变态茎、叶器官的植物，离体培养时易于形成相应的**变态器官**。
- **如：**百合和水仙鳞茎切块培养中可见由分化的芽形成的小鳞茎。

- 离体培养中再生植株的主要途径是器官发生和胚胎发生，而**原球茎发生、绿色球状体发生、球状茎原基发生、外植体已存在的器官原基萌发**等再生途径与器官发生有比较密切联系。



a. 龙眼高频率体细胞胚胎发生 b. 香蕉不定芽器官发生

植物体细胞胚胎与器官发生

原球茎 (protocorm) 绿色球状体 (green globular body, GGB)

①原球茎发生途径

- 兰科等植物离体培养中特有的植株再生途径。
- **原球茎** 兰花种子萌发初期并不出现胚根，而只是胚逐渐膨大，以后种皮的一端破裂，**肿胀的胚呈小圆锥状，称为原球茎。**
- 原球茎可理解为缩短的、呈珠粒状的、由胚生细胞组成的、类似嫩茎的器官，是兰花种子发芽过程中的一种形态学构造。

- 在兰科等植物离体培养中，常从茎尖、侧芽或叶片的培养中产生这样的原球茎。
- 一个芽周围能产生几个到几十个原球茎，培养一段时间后，原球茎逐渐转绿，长出毛状假根，叶原基发育成幼叶，转至生根培养，即可形成再生植株。
- 原球茎本身可不断增殖，在其转绿之前将之切成小块或给予针刺等损伤，再转到培养基上，可增殖出更多原球茎。



②茎原基增殖途径

- 茎原基增殖途径在菊科等一些植物中诱导成功可能与GGB类似。



茎原基增殖(mass of shoot Drimordial, MSP)

③腋生枝萌发途径

- 离体条件下促进腋芽或顶芽生长，并通过不断切割增殖而得到大量嫩茎，再诱导生根形成植株。
- 由于不经愈伤组织再生，极少发生变异，最能**使无性系后代保持原品种特性**。

也称“**无菌短枝扦插**”或“**微型扦插**”。

④绿色球状体发生途径

- 是蕨类植物离体培养中出现的。
- 绿色球状体的结构与兰花的原球茎相似，可以增殖，并可在一定条件下诱导成苗。
- 在蕨类植物工厂化生产中，该途径比不定芽发生途径生产效率高得多。

二、影响脱分化和再分化因素

- 1. 影响细胞脱分化的因素

- 植物离体培养中，细胞脱分化主要影响因素：

- ◆ 外植体本身
- ◆ 植物种类
- ◆ 生理状态
- ◆ 生长调节物质
- ◆ 环境条件
- ◆ 损伤
- ◆ 光照状况
- ◆ 细胞的位置

- **①损伤**

- 外植体由于切割损伤的刺激，导致细胞内一系列生理生化的变化，促使细胞增殖，这可能是生命的一种自我调节机制。

- **②生长调节剂**

- 主要是生长素类起作用，在诱导愈伤组织时常加入生长素类，但同时配合使用细胞分裂素则效果可能更好。

- **③光照**

- 弱光或黑暗条件，常有利于脱分化中的细胞分裂。

- **④细胞位置**

- 一般情况下，外植体本身是由多种细胞组成的，各类细胞可能对培养条件的刺激有不同的敏感性。

- **⑤外植体的生理状态**

- 不同生理年龄和不同季节会有不同的培养反应，而且差异较大。

- **⑥植物种类差异**

- 不同种类的材料脱分化难易有所区别，一般情况下，双子叶植物比单子叶植物及裸子植物容易。

- **2. 影响细胞再分化的因素**

- 从理论上讲，植物体的活细胞，都具有全能性，在离体培养条件下，均可经再分化形成各种类型的细胞、组织、器官及再生植株。但实际上，目前还不能让所有植物的所有活细胞都再生植株。

- **主要原因是：**

- ①不同种类植物再分化的能力差异很大。
- ②对某些植物而言，植株再生条件尚未完全掌握。
- 影响细胞再分化的因素，与脱分化基本上是一致的。

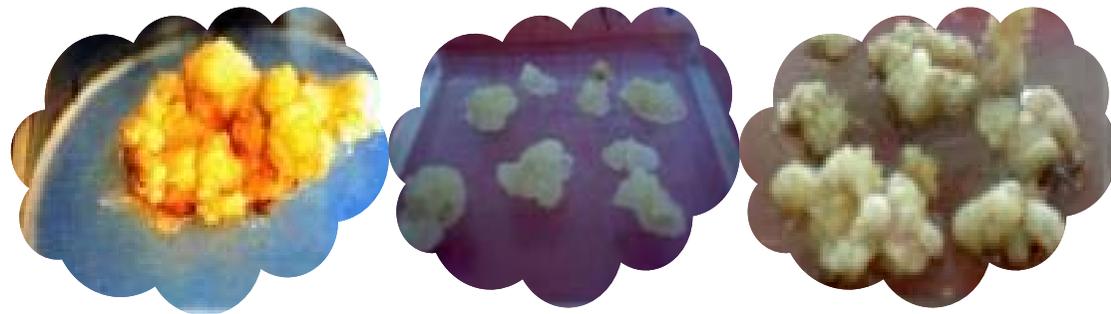
三、植物的愈伤组织培养

- 植物愈伤组织
- 植物在**伤口**表面（处）形成，或在组织培养条件下由**外植体**长出来的一团**无序的薄壁细胞**。



• **植物愈伤组织的应用：**

- ①用于制备原生质体和悬浮培养细胞。
- ②再生完整植株。
- ③用于提取各种不同类型细胞器，进而提取细胞器DNA。
- ④用于细胞生物学研究、基因操作等。



菠萝愈伤组织

烟草愈伤组织

魔芋愈伤组织

- **外植体**

- 在组织培养中，把由植物体上取下来用于组织培养的那部分器官、组织或细胞叫做**外植体**。

- **异质性**

- 外植体由各种类型细胞组成，不同细胞间在遗传学上存在差异。
- 由一个外植体形成的愈伤组织是异质的，不同细胞再生能力不同（即再分化能力不同）。

- **1. 愈伤组织的形成**

- 大多数情况下，体细胞在脱分化过程中，形成愈伤组织。愈伤组织往往是异质性的，无明显的极性，其形成过程可以分为三个阶段：

①诱导期 → ②分裂期 → ③分化期

愈伤组织形成及生长过程

- ①**诱导期** (即启动期)
- 愈伤组织形成的起点，细胞准备进行分裂。
- 外植体上已分化的活细胞在外源激素等因素的作用下，细胞大小虽变化不大，但其生理生化却发生了变化 (如蛋白质和核酸等合成代谢加强)。
- 诱导期长短因**植物种类**、**外植体的生理状况**、**培养因素**而异。
如：菊芋仅1d。
胡萝卜则要几天。



- ②分裂期

- 此时，外植体的外层细胞出现了分裂，中间细胞常不分裂，故形成一个**小芯**：

由于外层细胞迅速分裂使得这些细胞的体积缩小并逐渐恢复到分生组织状态，细胞进行脱分化。

- **分裂期愈伤组织共同特征：**

- 细胞分裂快，结构较疏松，缺少有组织性的结构，颜色浅而透明。
- 如果在原培养基上培养，细胞将不可避免地发生分化，产生新的结构，而将其及时转移到新鲜培养基上，愈伤组织可无限制地进行细胞分裂，维持其不分化的状态。

如果要继续扩增愈伤组织，就要在此时进行转接！

- **③分化期**

- 停止分裂的细胞，发生生理代谢变化，进而形成由不同形态和功能的细胞组成的愈伤组织，在细胞分裂末期，细胞内开始发生一系列形态结构和生理变化，导致细胞在形态和生理功能上发生分化，出现形态和功能各异的细胞。
- 必须指出，虽然根据形态变化把愈伤组织的形成分为三个时期，但实际上它们并不是严格区分的，特别是分裂期和分化期，往往可以在同一愈伤组织块上出现。

- **2. 愈伤组织的生长**

- 诱导期后，外植体外层细胞尤其是贴近培养基的伤口处的细胞首先开始出现分裂，在组织伤口表面形成一种薄壁细胞创伤形成层，愈伤组织的细胞数目迅速增多。
- 影响愈伤组织细胞大小的因素，有**培养基成分、培养温度**等。

- **①培养温度**

- 菊芋25℃培养7d，细胞数目可增加10×以上，但鲜重仅增加1×，说明**细胞分裂速率大于细胞伸长速率，单个细胞平均重量下降，细胞体积变小**，这是愈伤组织生长的普遍现象。降低温度，可使细胞生长速度减慢，细胞平均大小增加。

- **②培养基成分**

- 影响细胞大小，在含有 2,4-D的培养基中加入椰乳，则分裂细胞体积更小。

- **愈伤组织生长过程中生理生化变化：**

- **① RNA含量的变化**

在诱导期和分裂初始期，分裂细胞中的 RNA含量迅速增加，并达到高峰，但在继续分裂过程中RNA的含量将减少。

- **②同工酶谱的变化**

如菜豆的谷氨酸脱氢酶谱带在继代培养后，由原来的5条变为单带，到培养末期，才逐渐恢复到5条。

- **③次生物质的变化**

连续继代培养可能改变次生物质的积累水平或能力，如天仙子培养物中生物碱的成分和含量随着连续继代而发生变化。

培养物无法积累特殊物质，并不意味着生化合成能力的丧失，仅说明在培养条件下这种能力无法表现。这是由于在继代培养中有关酶的破坏所致。

- ④对生长素需求的变化

延长培养期可能使愈伤组织对生长素的需求发生变化，从而导致生长素的自给，出现驯化现象。

如菊芋继代培养对激素的要求不同于初代培养，初代培养IAA浓度 10^{-5} mol/L时，培养材料达最大生长量，第二代培养为 10^{-6} mol/L，第三代培养则降至 10^{-7} mol/L。

驯化 (h a b i t u a t i o n)

- 生长素要求的变化因植物种类和培养基而异，一般1年以上或继代培养10代以上时，即使没有生长素也能很好生长，如柑橘愈伤组织培养，逐渐降低激素用量，最终使之在无激素培养基上很好生长。
- 驯化状态的细胞与正常状态的细胞是可以相互转变的。



- 愈伤组织的质地明显不同，有松脆和致密两种类型，但它们之间是可以相互转变的。
- 一般，加入较高浓度生长素，可使致密的愈伤组织变得松脆。
- 降低或去除生长素或加入高浓度的细胞分裂素，往往使愈伤组织变得致密。

- **3. 愈伤组织的保持**

- 大多数情况下，随着培养代数的增加和培养时间的延长，愈伤组织表现出生长势下降、褐变等现象，薄壁细胞的分化和形态发生能力逐渐降低甚至完全丧失，或致至细胞死亡，这种现象称为**细胞全能性的丧失**。

- 这种情况的发生主要是由**遗传和生理**两个方面因素所致。



由核遗传物质的变化引起的，不可逆。
包括染色体畸变、
基因突变等。

生理因素导致形态
发生能力下降，可
通过改变培养条件
而得以恢复，可逆。

- 在一些情况下，愈伤组织可以长期得到保持。
- 如柑橘珠心和胚乳的愈伤组织、龙眼幼胚和花药的胚性愈伤组织，经过十多年继代培养仍保持强的体细胞胚胎发生能力。
- 胚性愈伤组织较易长期保持，而非胚性愈伤组织长期保持难度较大。
- 能够长期保持的愈伤组织，除了跟基因型有关以外，还与生理状态和继代培养方式相关。
- 柑橘经过驯化的胚性愈伤组织才能够长期继代保持。
- 龙眼胚性愈伤组织必须在两种不同性质的培养基中交替继代才能长期保持。

- **4. 愈伤组织形态发生**

- 愈伤组织生长过程中，开始细胞分裂局限在外层细胞，当表面细胞分裂逐渐减慢并停止时，内部较深处的细胞才开始分裂，且分裂的方向也发生改变，形成了维管化组织和瘤状结构。
- 这是愈伤组织生长的一个共同特征。
- 很多情况下，形成 **生长中心**，但不进一步分化，其周围产生薄壁细胞，形成一种泡沫球状增植物，这仍具备生长活跃愈伤组织的特点，随后这些小疣状物可以经历另一个发育过程，才能出现器官分化和体细胞胚状体的发生。

泡沫球 (frothy)

- 愈伤组织再分化的形态发生方式也有体细胞胚胎发生和器官发生两种。
- 器官发生具体包括：
 - ◆先形成芽，再从芽基部长出根。
 - ◆先形成根，再从根基部形成芽。
 - ◆在愈伤组织不同部位分别形成芽和根，然后根和芽的维管束接通形成完整植株。
 - ◆仅形成芽或根，如茶树花粉愈伤组织诱导器官分化时，往往只形成根，而芽的发生十分困难。

- **5. 愈伤组织中茎芽和根的发生**
- 细胞分裂是木质部分化的先决条件，维管组织的分化是器官分化的先决条件。
- **影响维管组织分化的因子：**
- **①生长素** 一般低浓度的生长素能刺激木质部的发生，生长素的浓度与木质部的分化程度之间存在反比关系。
- **②蔗糖** 生长素对维管束组织分化的作用取决于糖的存在。
- **③细胞分裂素和赤霉素**
- **④物理因子：温度、光照等。**

- 多数植物在适当条件下，都能由体细胞组织及生殖组织分化出芽和根，而不论其倍性水平如何。
- **生长中心**
- 愈伤组织由无序生长条件转到有序生长条件后，首先在若干部位成丛出现类似形成层的细胞群，其中出现管状细胞继而形成维管组织，是愈伤组织形成器官的部位。**即拟分生组织或生长中心。**

- 起初拟分生组织具有可塑性，可能形成根或茎芽，一般来说，根是内生的，茎是外部起源的，但茎也可通过内分化产生。
- 淀粉和糖是拟分生组织形成和茎芽分化的能源物质。
- 生长素与细胞分裂素的比例，影响器官分化的方向。
- 培养基硬度和状态等也影响器官的发生。

- 例1:
- 在胡萝卜悬浮培养物中形成若干生长中心，每个生长中心中央含有管胞，其周围是类似形成层的细胞。随后由这些中央细胞发育成根。
- 把这些长根的生长中心转到半固体培养基上在远离根的一点形成茎芽。
- 在根与茎芽之间渐渐地建立起维管组织系统形成完整植株。

- 例2:
- 烟草茎段培养物茎芽的形成出现在脱分化之后，茎芽主要起源于由形成层和外韧皮部形成的愈伤组织。
- 1970年，人们研究了正在分化和未分化的烟草愈伤组织中核酸、蛋白质及碳水化合物的组织化学动态。
- 两类组织细胞DNA含量无多大差异。茎芽分化区域RNA、蛋白质、淀粉含量高。
- 细胞内淀粉累积对茎芽分化有积极作用，只有能够形成茎芽的组织内才有大量的累积淀粉，在没有大量累积淀粉的区域内不能形成拟分生组织。

- 淀粉的累积发生在任何可见的有序发育之前，在11龄的培养物中达到最高值，这正是出现拟分生组织分化茎芽的3d之前。
- 赤霉素可使淀粉合成减少而降解增加，能防止淀粉累积，使之不能达到茎芽分化所需要的临界水平。
- 淀粉和培养基中游离态的糖在拟分生组织形成和茎芽、根分化高能耗过程中可做能源物质。
- 在生长迅速的茎尖中，淀粉含量比相临组织低得多。

第3节 植物体细胞胚胎发生

- **植物胚胎发生**

- 植物从合子 (受精卵) 到成熟胚的发生、发育的有规律变化。

- **合子胚**

- 由合子发育而来的胚。

- **胚状体**

- 植物离体培养细胞可产生的类似胚的结构，其形成经历类似胚胎发生和发育过程。

- 成熟的胚状体可以像合子胚一样长出根、芽，萌发再生植株。
- **体细胞胚胎发生**
- 植物离体培养细胞产生胚状体的过程。
- 植物体细胞胚胎发生**具有普遍性**，已从200多种植物上观察到胚状体的发生，包括被子植物几乎所有重要的科和一些裸子植物。

- **在被子植物上：**
- 从根、茎、叶、花、果实等器官的组织培养物中诱导产生**二倍性胚状体**。
- 从花粉、助细胞和反足细胞中诱导产生**单倍性胚状体**。
- 从胚乳细胞中诱导产生**三倍性胚状体**。
- 卵细胞受精形成合子进而发育成胚，即胚胎发生，但受精作用并非在一切情况下都是刺激卵细胞进入胚胎发生过程的必要因素。
- 在孤雌生殖的情况下，单是通过授粉或某些生长调节物质的刺激就能诱导卵细胞进行胚胎发育。

- 卵细胞也不是胚胎发育的唯一，雌配子体中的任何细胞及胚囊周围的孢子体组织中的细胞都有可能发育成胚。
- 自然界从未发现过胚囊外成胚的现象，活体上观察表明，胚的生长发育需要特殊的理化环境，而这种环境只存在于胚囊之中。

雌配子体（胚囊）

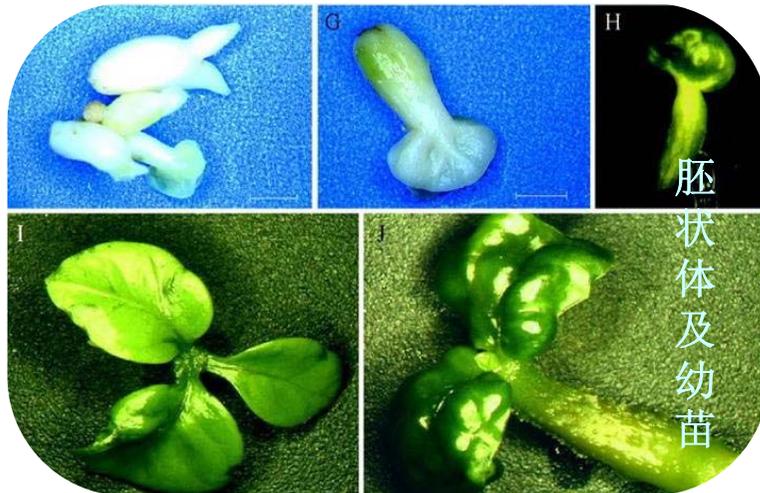
- 植物体细胞具有成胚的潜力，每种器官都能成胚。
- 胚胎发生并不一定局限于生殖周期中，高等植物二倍体细胞置于适当培养条件下，只要其不可逆的分化过程没有进展得太远，都能以和胚相似的方式进行发育，产生一个完整的植株。

合子胚的发生只是一个特例

• 胚 = 合子胚 + 非合子胚两类

由受精卵形成的胚

除受精卵以外的细胞形成的胚



可分为体细胞胚、孤雌胚、孤雄胚、胚状体

- **孤雄胚** 由雄配子体形成。
- **孤雌胚** 由未受精卵形成。
- **体细胞胚** 在离体或活体条件下由除合子之外的孢子体细胞形成的胚，不定胚是体细胞胚中的特例，如胡萝卜的茎生胚。

一、植物体细胞胚胎发生

- 1. 体细胞胚胎发生过程
- 不同种类的植物体细胞胚胎发生的主要发育阶段的划分是不一致的，但一般可分为五个阶段：
 - ◆ 胚性愈伤组织诱导
 - ◆ 体细胞胚胎诱导
 - ◆ 体细胞胚胎早期分化发育
 - ◆ 体细胞胚胎成熟
 - ◆ 体细胞胚胎萌发和成苗

- 在双子叶植物上，体细胞胚胎发生经过**原胚、球形胚、心形胚、鱼雷形胚和成熟胚**阶段。
- 在禾本科植物的成熟体细胞胚上，可以清楚地看到胚特有的结构，即**盾片、胚芽鞘和胚根**等。
- 体细胞胚与愈伤组织的维管系统没有连接最后会从培养物的表面脱落下来。

- **2. 胚性和非胚性细胞生理状态的差异**
差异明显。

- ◆ 胚性细胞与分生组织类似，通常较小，近圆形
- ◆ 具有较大的核和核仁并能高度染色，胞质浓厚
- ◆ DNA、RNA及蛋白质合成更活跃，含量和种类增加
- ◆ 淀粉和可溶性糖含量增加
- ◆ 内源多胺含量升高
- ◆ 活性氧水平提高
- ◆ 同工酶谱和内源激素合成有明显变化等

- ◆胡萝卜胚性愈伤组织的淀粉含量高出非胚性愈伤组织的15~40倍。
- ◆挪威云杉非胚性愈伤组织的乙烯生成速率比胚性愈伤组织高19~117倍。
- ◆龙眼胚性愈伤组织的内源多胺和激素水平都高于非胚性愈伤组织。
- 多数典型的胚性愈伤组织的外表，呈现松脆颗粒状。

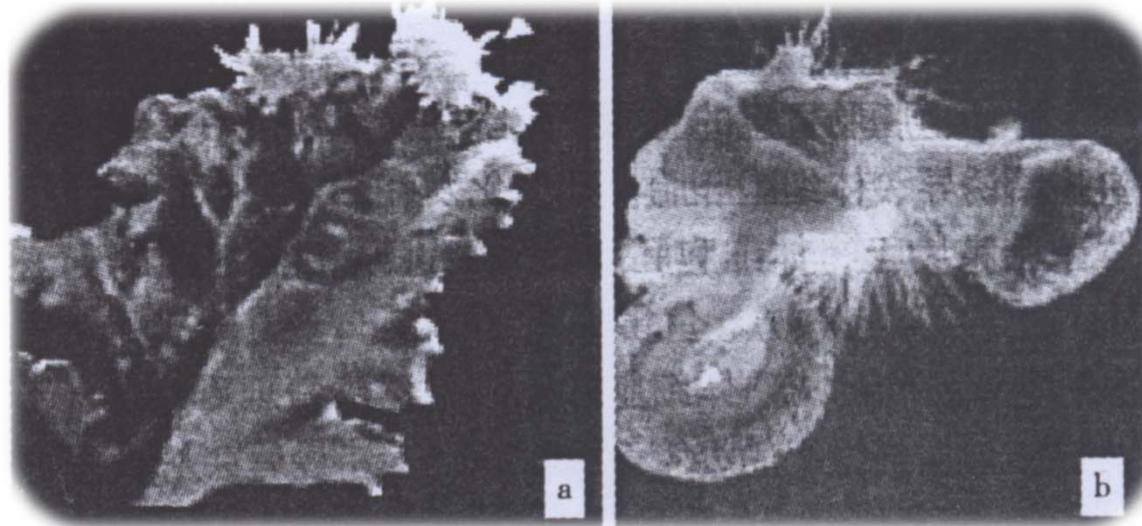
- **3. 体细胞胚胎发生的基因表达机理**

- 离体胚胎发生的基因表达机理，目前了解不多，主要是从胡萝卜、拟南芥、苜蓿、火炬松等体胚发生模式植物中得到一些信息。
- 在植物体胚发生过程中，会出现与基因表达有关的一系列生物大分子的有规律变化。

- 基因表达产物以某种活跃的形式表现出来，在胚性细胞分化过程中有蛋白质含量的变化和特异蛋白质的出现与消失。
- 胚性蛋白质可作为调控因子、结构蛋白、贮藏蛋白和酶蛋白而起作用。
- 植物体胚发生过程很复杂，涉及4000多个基因，体胚发育后期，表达的基因达10 000多个。

- 植物细胞胚性的获得是体胚发生研究的第一个环节。
- 目前已找到不少有关胚性与非胚性细胞之间基因表达的差异，如发现cdc2基因等细胞周期调节基因与胚性的获得有关。
- 在胡萝卜、拟南芥等的胚性愈伤组织中有特异蛋白表达或消失。
- 在梨的早期体胚发生培养物中检测到特异阿拉伯半乳聚糖蛋白 (AGPs) 的表达。
- AGPs是一种细胞表面的黏蛋白，与植物细胞生长发育密切相关，可能作为基因调控蛋白在体胚发生中起作用。

- 从拟南芥克隆到的LEC1、LEC2和BBM基因，能启动植物细胞从营养生长向胚性生长转换，激发体胚发生所必需基因的表达，可以使转基因植株产生体细胞胚或类似胚的结构。
- PKL基因调节LEC1的表达，在正常情况下，植物组织的LEC1被PKL所关闭，进行正常的生长发育
- 如果PKL基因失去作用，则LEC1会使植物组织出现胚性发育，无法正常生长。



a 油菜 b 拟南芥

BBM基因转化后植株叶片边缘产生的体细胞胚

- 早期胚胎发育状况对后续的胚胎发育有很大影响，即后期胚胎的发育在很大程度上在胚胎发育早期就已决定。在体胚发育后期，有大量晚期胚胎发生丰富蛋白表达。
- 用cDNA芯片技术研究表明，火炬松在胚胎发生早期，体胚与合子胚的基因表达模式基本相同，而在后期两者有一定差异。

- 植物体胚发生与DNA甲基化密切相关。非胚性细胞的DNA甲基化程度最好，胚性相关基因的表达受到抑制。
- 随着DNA甲基化程度降低，胚性相关基因表达，胚性细胞形成。
- 随着体胚形成与体胚的进一步发育，DNA甲基化程度逐渐升高，抑制胚性相关基因的表达，使体胚发育、成熟。

二、植物体细胞胚胎发生途径

- 1. 体细胞胚胎发生的方式
- 由外植体诱导体细胞胚胎发生的途径有两种，即**直接途径**和**间接途径**。
- **直接途径**
- 从外植体某些胚性细胞直接诱导出体细胞胚，如柑橘的珠心组织、茶树和龙眼的子叶、香雪兰花序等，可直接诱导出体细胞胚。

- **间接途径**

- 外植体先脱分化形成愈伤组织，再从愈伤组织的胚性细胞分化出体细胞胚。
- 多数体细胞胚胎的形成，是通过间接途径产生的
- 这种方式的胚状体形成通常分两个阶段。

- ①胚胎发生丛的形成
- 愈伤组织中常含有两类细胞：
 - ◆大液泡的细胞，通常失去胚胎发生潜能，在培养基中易散开。
 - ◆液泡小、细胞质浓的小细胞，常聚集为丛状(EC)，其表面可产生大量胚状体。
- 在胡萝卜属、毛茛属和柑橘属中已证明胚状体来自EC表面的单个细胞。

胚胎发生丛 (embryogenic clump, EC)

• ②胚状体的发育

- EC通常在原培养基上不能使其表面的胚状体发育，但EC可以增殖、崩溃而不衰。
- EC 中心的细胞增加膨胀使EC 崩溃，崩溃后的表面细胞结合成群，又形成新的EC。
- EC在转入降低或去除生长素、降低还原氮的培养基后，才能完成胚状体发育。

• 2. 体细胞胚胎的起源

- 体细胞胚究竟起源于单细胞还是多细胞，目前仍然有争论。
- 研究发现，大多数体细胞胚起源于单细胞。
- 从多种植物的愈伤组织中都可以观察到多个单个胚性细胞及不同发育时期的体细胞胚，如不均等或均等分裂的二细胞原胚、多细胞原胚、球形胚和成熟胚等。

- 脱分化状态的愈伤组织细胞中DNA的合成，为其分化分裂奠定了物质基础，促使其转变为胚性细胞。
- 直接或间接方式形成的体细胞胚，只有那些已启动脱分化并进行DNA合成的细胞才能形成体细胞胚。
- 体细胞胚发生的实质是细胞分化，即细胞在离体培养条件下，诱导部分基因开放，实现遗传信息的表达。

- **3. 体细胞胚胎发生的极性**

- 单个胚性细胞与合子胚一样，具有明显的极性，第一次分裂多为不均等分裂，顶细胞继续分裂形成多细胞原胚，基细胞进行少数几次分裂形成胚柄。

- 体细胞胚发生中极性获得的诱导因子是植物激素和外界刺激。
- 如白车轴草未成熟合子胚，在附加6-BA的培养基上，可从下胚轴表皮直接产生体细胞胚，细胞从有规律的垂周分裂变为无规律的平周分裂和斜向分裂。在没有6-BA时，垂周分裂还持续一段时间6-BA不一定是进入有丝分裂的关键因子，但它可以改变细胞极性和分裂平面。
- 在体细胞胚胎发生中沿着胚体的纵轴有一个稳定的电流，它可能与决定状态和极性的保持有关。
- 极性建立对细胞分化和体细胞胚发生具有重要作用。

三、体细胞胚发生极性和生理隔离

- 1. 体细胞胚具有两个明显特点：
 - ①双极性
 - ②与母体组织或外植体的维管束系统无直接的联系，处于较为孤立的生长状态，即存在生理隔离

生理隔离(physiological isolation) 双极性(double polarity)

- ◆小麦胚性细胞超微结构观察表明，不仅细胞核和质向一端偏移，而且细胞器、核糖体和质体等都有区域性集中分布现象，并和细胞核偏移的方向一致。
- ◆红豆草体细胞胚形成中DNA合成量也呈现极生化集中区域。
- ◆胡萝卜体细胞胚发生中，DNA和RNA的合成同样具有极生化集中区域，从单细胞第二次分裂后，poly(A)+RNA的合成就有区域性，即使胚胎继续发育受阻，早期的极生化比也仍然存在。

- **2. 体细胞胚胎发生的生理隔离**

- 被子植物的胚囊减数分裂后，形成的大孢子与周围细胞处于分开的状态。
- 在小孢子发生时，小孢子母细胞在减数分裂前期也与绒毡层的细胞间没有联系。
- 从胡萝卜体细胞胚中，观察到与周围细胞缺少联系，而处于孤立状态。

- 在多种植物中都观察到，早期的胚性细胞与周围细胞还存在胞间连丝，但随着胚性细胞的发育，细胞壁加厚，胞间连丝消失或被堵塞，胚性细胞开始分裂，从二细胞原胚到多细胞原胚始终被厚壁所包围，与周围细胞形成明显的界限。
- 从大量的体细胞胚发生观察结果看，生理隔离是普遍存在的，有利于胚胎发生潜力的表达。
- 由此认为生理隔离是体细胞胚发生的先决条件。但生理隔离是相对的，并不意味着与周围组织完全隔离开来。

- 对从外植体间接诱导的体胚发生，在胚性细胞出现过程中，即重新“决定”为胚性细胞的过程中，从周围那些细胞获取一定的物质、能量和信息可能是必需的。
- 因此，这种情况下的体胚产生一定的生理隔离以及与周围细胞保持一定的联系都是必需的。

四、植物体细胞胚胎发生的生理学和生物化学

- 1. 蛋白质
- 体细胞胚与合子胚在形态特征上、生化水平上都有相似性，特别是基因表达产物—蛋白质组分上的相似性。
- 体细胞胚发生过程蛋白质含量的有变化，有特异的胚性蛋白质的形成或消失。

- 胚性愈伤组织的可溶性蛋白质含量和合成速率远高于非胚性愈伤组织。
- 如石刁柏的球形胚蛋白质含量最高，其成熟胚最低；说明在胚胎发生早期已开始了与胚胎发生有关的代谢程序，到球形胚期，可溶性蛋白质积累较多，为胚胎发育提供物质基础。

• 2. 核酸

- 胚性细胞核大，核质比高，核仁明显而且具多核仁，有核仁液泡，变化十分活跃。
- 根据核仁结构与功能推测，胚性细胞中有大量核糖体 RNA合成，进一步形成核糖体，胚性愈伤组织RNA合成速率明显高于非胚性愈伤组织。
- RNA合成是胚性细胞发生的分子基础，是体细胞胚正常发育的重要条件。随着体细胞胚发育DNA合成量明显增加。

- 小麦体胚发生第8d，多细胞原胚期DNA合成量已为起始的2倍；第12~24d到达球形胚时，DNA合成量达峰值。
- 胡萝卜体细胞胚发生早期DNA活跃合成细胞中有三种是DNA不活跃合成细胞内所没有的蛋白质，认为这些蛋白质可作为DNA合成极化的分子标记物。
- 胚性细胞 DNA复制不仅为细胞增殖奠定了物质基础，也为细胞分化提供了条件。

• 3. 多胺代谢

- 多胺具有多聚阳离子的性质，与核酸相互作用，参与DNA、RNA和蛋白质合成的调节，在转录和翻译水平上对基因进行调控。
- 多胺与细胞的分裂有关，细胞分裂最旺盛的地方，多胺的生物合成也最活跃。
- 多胺可能是类似于“cAMP”的第二信使，作为植物激素媒介起作用。
- 多胺对植物生长分化起重要作用，参与体细胞胚发生、愈伤组织形成、不定根不定芽及花芽分化等植物离体培养形态建成。
- 胡萝卜的多胺生物合成变化与体胚发生关系的研究较深入。

- 多胺合成涉及鸟氨酸脱羧酶、精氨酸脱羧酶和S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶，细胞中多胺增加与这三个酶活性增加相关。
- 较高含量多胺及多胺合成酶活性与胡萝卜体细胞胚发生密切相关，胚性愈伤组织中腐胺、精胺含量比非胚性的高。三种酶的抑制剂能使胡萝卜细胞中的多胺水平下降，使其体胚发生能力降低。三种多胺中亚精胺与体细胞胚发生的关系最为重要。
- 在胡萝卜体胚发生系统中还发现，多胺促进体胚发生是由于抑制了乙烯合成，乙烯和多胺的生物合成都以S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为共同的前体，SAM在1-氨基环烷-1-羧酸(ACC)合成酶作用下形成ACC，参与乙烯生物合成。



- **4. 糖类**

- 糖类诱导植物体细胞胚胎发生不可缺少。在植物体胚发生过程中，糖类提供碳源、维持渗透压，起信号分子的作用。
- 高浓度蔗糖对龙眼培养体胚正常成熟是必需的。
- 高浓度蔗糖可以使胡萝卜体胚进入“静止”状态，并且不能为其他糖类所替代。

- 3%~6%蔗糖，枸杞体细胞胚的诱导频率可维持在较高的水平，蔗糖浓度达到9%时，则会抑制体细胞胚发生与发育。
- 淀粉的积累与胚性细胞分化能力和体细胞胚发育时期的转折密切相关。
- 如小麦的愈伤组织一旦分化为胚性细胞后就有淀粉粒的积累。
- 在胚性细胞分化与发育的过程中，淀粉的合成出现两次高峰，均在体胚发育的重要转折期。说明淀粉的合成成为体细胞胚的发育和分化提供必要的物质和能量基础。

- **5. 金属离子和微量元素**

- 金属离子可促进植物组织培养中形态发生，如 Ag^{2+} 、 Co^{2+} 和 Ni^{2+} 等金属离子是乙烯合成的抑制剂，通过控制乙烯的合成，提高体细胞胚发生的频率。
- 某些稀土元素能提高体细胞胚的发生频率，促进体细胞胚正常分化和发育。如在体细胞胚发生过程中，钙、铁、镁等元素的含量都发生规律性变化。

• 6. 内源激素

- 植物激素在植物体细胞胚胎的发生与发育中起诱导与调节作用。
- 内源激素代谢和动态平衡在细胞分化中也起着关键作用，内源激素对基因活动起调控作用，从而影响一系列代谢，最终影响植物细胞胚性潜力的诱导、维持和表达。

- **①生长素**

- 生长素用于启动细胞分裂和胚性潜力的诱导，促进体胚的早期发育。
- 多数植物细胞在离体培养条件下诱导胚性细胞发生必须在含2, 4-D的条件下进行，其机理可能是2, 4-D通过改变细胞内源IAA代谢而起作用。

- 在植物体胚发生过程中，早期体胚的生长素含量较高，发育后期含量下降。如龙眼体胚发生过程中，内源生长素含量的变化趋势呈“M”状。
- 另外，胚性愈伤组织的内源IAA含量明显高于非胚性愈伤组织，在球形胚时期形成一个高峰，以后呈明显下降趋势，尤其是到成熟子叶形胚则大幅度下降。

• ②细胞分裂素

- 高水平的细胞分裂素可能对细胞的分裂和生长是很重要的，但它并不直接参与胚的发生过程。
- 如龙眼体胚发育过程中，ZT的变化趋势大体上同IAA，但在胚胎发育后期却与IAA不同，呈上升趋势。
- 细胞分裂素对某些物种的胚状体发生起着相当重要的作用，但在另一些物种上，则需要生长素与细胞分裂素适当配合，才能有效诱导胚状体发生
- 细胞分裂素对体胚发生的作用机理还不清楚。

- **③赤霉素**

- 内源赤霉素对体胚发生的研究不多。
- 在龙眼体胚发生过程中，内源赤霉素水平呈下降趋势，并且非胚性愈伤组织中的内源赤霉素水平比胚性愈伤组织高。
- 向培养基中加入GA3合成抑制剂，在一定程度上提高了柑橘体胚形成的百分数。

• ④脱落酸

- ABA在种子生长、萌发控制、种子成熟和休眠等方面起重要作用。
- 内源ABA可调节植物体细胞胚胎发育，即内源ABA与胚性能力的启动或表达有关，可抑制体胚早期萌发和畸形胚的发生，防止裂生多胚的产生。
- 但在柚的体胚发生中，赤霉素却对胚胎发生有促进作用。
- 胚性细胞和非胚性细胞中内源赤霉素的含量和种类有很大差异。

- 胚性细胞中含低水平的GAI，但 GA4 / 7的含量较高，非胚性细胞相反。
- 胡萝卜胚状体的形成受内源 GAI的抑制，但对GA4/7的敏感性较小。
- ABA 对某些植物体胚发生的特异基因表达起调控作用，可激活相关基因的表达，大量合成储藏蛋白、晚期胚胎丰富蛋白和少量胚胎发生特异性蛋白。
- 在离体胚培养时，内源 ABA作为提前萌发的抑制剂和蛋白质合成的调节剂随着胚的发育阶段而改变。

- **5. 活性氧**

- 活性氧在生理代谢过程中，起重要的调控作用。研究发现氧化胁迫与细胞分化有关，因此，体细胞胚发生过程必然有氧化胁迫的影响，有其活性代谢的规律：如枸杞体细胞胚发生过程中，超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶（POD）活性有明显变化。

- 将继代的愈伤组织转入分化培养基后，随着胚性细胞的形成，SOD活性逐渐升高，胚性细胞形成原胚时，SOD活性达到最高峰，说明SOD活性升高对胚性细胞的分化以及早期胚胎发育有促进作用。
- 在继代愈伤组织中，POD和CAT的活性相对很高。但随着胚性细胞的形成，POD和CAT的活性迅速降低，而SOD活性却逐渐升高。
- 可见，胚性细胞形成时愈伤组织的H₂O₂含量明显高于非胚性愈伤组织，H₂O₂对胚性细胞的形成及体细胞胚早期发育具有诱导和促进作用。

第4节 影响离体形态发生因素

- 主要因素：
 - ◆外植体基因型和生理状态
 - ◆培养基
 - ◆培养条件等。
- 离体形态发生的不同阶段，要求培养基和培养条件不同，应采取相应培养程序。

一、植物种类和基因型

- 不同物种和同一物种不同基因型，其形态发生能力往往有很大差异。
- 如柑橘类中，甜橙的离体胚胎发生能力较强，宽皮橘(或橘)次之，柚类则比较困难。
- 植物离体培养的基因型依赖性是一个非常突出的问题，对于再生能力差的基因型，应根据其具体代谢上的特点来确定相应的培养条件。
- 但有一点值得注意，遗传上或亲缘上越相近的培养材料，其形态发生的条件要求也常类似。

二、培养材料的生理状态

- 1. 植株的发育年龄
- 植物个体发育经历幼态期、成熟期和衰老期。
- 一般情况下，幼态组织比老态组织具有较高的形态发生能力，特别是生根能力。
- 如欧洲云杉只有用小于 2年生实生苗上的芽为外植体时，才能在适宜的培养基上生长并再生植株(生根)。
- 杜鹃茎切段生根能力随茎的年龄增加而削弱。

- 某些植物成花器官越往植株下部，越易形成营养芽。
- 茶树和龙眼嫩叶可诱导出体胚，老叶则不行。
- 许多热带、亚热带木本果树植物，幼年外植体再生能力很强，成年接穗品种再生能力极差。
- 在有些情况下，取休眠芽作为外植体可能比嫩叶更好。
- 无菌苗的年龄也明显影响外植体的再生能力。如野油菜、小白菜和芥蓝萌发 3~4d 的无菌苗子叶或下胚轴形成的不定芽和苗再生能力远大于苗龄较长的无菌苗。

- **2. 培养器官或组织类型**

- ◆同一植物的不同器官、组织或细胞，其形态发生的能力和方向常有所不同。
- 如种子、幼胚和下胚轴较容易形成胚状体，而茎段、叶片则比较困难。
- ◆一般来说，双子叶植物形态发生常用的外植体依次为叶、茎、胚轴、子叶等。

- ◆单子叶植物特别是禾本科植物，细胞分裂旺盛的分生组织或器官，如叶基部、茎尖、幼胚、胚珠、幼花序轴等是极好的外植体材料。
- ◆裸子植物则大部分以子叶为外植体。
- ◆莎草科植物由根、茎、叶诱导形成的愈伤组织虽然都能分化形成根、芽、叶和长成小植株，但分化过程明显地表现出一定的倾向性，即由根获得的愈伤组织分化出根组织的比例明显比形成其他器官的比例要高，而由芽形成的愈伤组织则形成较多的芽。

- ◆同一器官不同部位的组织，其再生器官能力也不同。
- 如百合鳞茎片基部再生能力强，中部较弱，顶部则不行。
- ◆外植体的大小对器官再生有影响。
- 如木薯的分生组织，被剥离的外植体超过0.2mm时，才能再生植株，小于0.2mm时只能形成愈伤组织或根。
- 百合科的*Heloniopsis orientalis*叶组织培养中，能形成芽的外植体临界大小不一，幼叶大小为1mmx1mm，成熟叶为3mmx3mm。

- ◆植物的极性现象有着广泛的作用和影响
- 芽形成的位置，有时取决于外植体接触培养基的位置。
- 当外植体以它形态学的基本部放在培养基上，从远离基部的表面诱导出芽数目较多，如唐菖蒲外植体的基部向着培养基上方放置时，虽然能诱导出芽，但数量较少，诱导时间较长。
- ◆不同季节来源的外植体，其形态发生能力也有差异，大多数植物在生长旺盛季节采样较好，易培养成功。
- ◆供体植株的生长环境也影响着外植体的生理状态，如胶皮枫香树组培苗叶片比温室生长苗叶片不定芽再生能力强4倍。

• 3. 培养时间和细胞倍性

- 愈伤组织培养时间过长或继代次数太多，往往会推迟或降低形态发生的能力，所以一般均取处于旺盛生长期的愈伤组织材料来诱导器官的形成。
- 但是，某些植物胚状体发生，往往需要愈伤组织培养较长时间或多次继代培养，如咖啡叶的愈伤组织要培养70d才能出现胚状体，檀香经过5次继代培养才能诱导出胚状体，香蕉的胚状体诱导也存在类似现象。

- 细胞倍性也影响形态发生能力。在花药培养中，单倍体花粉细胞和二倍体花药壁细胞对渗透压要求不同。
- 在高渗透压条件下，容易启动花粉粒单倍性细胞生长和分化，较易得到单倍体花粉胚状体，而花药壁来源的二倍体细胞的生长和分化都受到明显抑制。

三、植物组织培养的培养基

• 1. 植物营养

- 培养基中的铵态氮和 K^+ 有利于胚状体形成提高无机磷含量可促进器官发生，不加还原氮有利于根的形成等。
- 用于茎尖培养和芽诱导的培养基主要是MS和B5培养基。
- MS培养基对植物茎尖培养效果好，但木本植物茎尖培养时如果在诱导芽之后反复使用MS培养基，可引起芽生长的退化。
- 茎尖培养的起始培养基和芽增殖的培养基往往是不同的，特别是无机盐成分常需进行调整。

- 体细胞胚胎发生常用的培养基有MS、B5、SH等，含盐量均较高，MS含盐量比White高10倍。
- MS中较高水平的 NH_4NO_3 和螯合铁对体细胞胚胎发生有一定的作用，如胡萝卜球形胚，如果缺螯合铁将不能发育到心形胚阶段。
- 碳水化合物种类及浓度，对体细胞胚胎发育有重要作用，缺糖或低糖常无法形成胚状体。
- 如提高蔗糖浓度，可增加可可生物碱、花青素、脂肪酸和日本泡桐花青素等贮藏物质的合成，有利于胚的成熟。

- 葡萄糖对可可体细胞胚的生长发育作用大于蔗糖，但对体胚的总脂类、花青素和生物碱类的合成作用小于蔗糖。
- 柑橘珠心愈伤组织在甘油 (180 mmol/L) 中比在蔗糖 (70mmol / L) 中较易进行体胚发生。
- 半乳糖和乳糖比蔗糖能更有效地刺激柑橘珠心愈伤组织体胚发生 (体胚增加6~12倍)。
- 其他物质如氨基酸、天然复合物常不同程度地促进器官和胚状体发生。

- **2. 植物生长调节剂**

- 植物生长调节剂是影响植物离体形态发生的最关键因素。

- **①生长素**

- 植物离体形态发生过程中，生长素促进外植体生长、生根，并与细胞分裂素共同作用诱导不定芽分化及侧芽的萌发与生长。

- 外植体含内源激素种类和浓度不同，需添加的外源激素种类及浓度亦不相同：有些外植体诱导芽形成时，需补加一定量的生长素，或与分裂素一起补加才显出作用。

- 生长素中2, 4-D被广泛用于诱导体细胞胚胎发生，较高浓度的2, 4-D可诱导体细胞胚胎发生，但抑制体胚的继续发育。
- 因为由2, 4-D 诱导的细胞分裂活性可引起细胞极性生长而形成体胚，如苜蓿叶肉原生质体的发育可由2, 4-D的浓度来决定。
- 另外，2, 4-D可能抑制了体胚储藏成分(如储藏蛋白质等)的形成，不利于体胚成熟。
- 所以，体胚诱导后需转入含较低浓度生长素的培养基中，使之进一步发育。
- 诱导体胚发生的 2, 4-D浓度因植物种及基因型而异；有效浓度为 $0.5-27.6 \mu\text{mol} / \text{L}$ 。

- **②细胞分裂素**

- 植物离体形态发生过程中，细胞分裂素促进分化和芽形成，抑制根发育及衰老。
- 如统计了250种植物器官发生的再生植株，24%双子叶植物、17%单子叶植物和50%裸子植物单独使用6-BA可诱导无根苗的形成。
- 6-BA在不定芽诱导过程中起重要作用。
- 但也有相当一部分植物，特别是单子叶和双子叶植物，其无根苗的形成需要分裂素和生长素的相互配合，甚至有一部分只需生长素。

- 分裂素可促进也可抑制体胚发生，这主要取决于植物的种类及基因型。
- 单子叶植物玉米、水稻、小麦、雀麦等的体胚发生可以不要求外加分裂素，而黑麦草、甘蔗等的体胚发生则要求生长素和分裂素共同作用。
- 另一类具细胞分裂素活性的物质是苯基脲衍生物和噻重氮苯基脲（TDZ），它们对一些植物外植体的芽分化、发育有极强的促进作用。

- 另外，腺嘌呤及其硫酸盐也具有促进芽分化的良好效应，这可能是它与分裂素在结构上有一定联系。
- 椰子汁中含有若干促进细胞分裂的因子，如二苯脒、9-β-D-呋喃核糖基玉米素等，对茎尖分生组织分化有促进作用。

- **③赤霉素**

- 植物离体形态发生过程中，赤霉素(主要使用GA3)能促进茎的伸长，打破休眠，对芽的诱导和形成有促进作用。

- **④乙烯**

- 乙烯对组织培养物芽的诱导和形成有促进或抑制作用，这与植物种类及处理时间有关。

- 如乙烯和二氧化碳的相互作用对针叶树芽的诱导有较大影响。
- 针叶树子叶培养中，从发育成熟的组织转向芽的分化，分裂素起着“扳机”作用，此时乙烯和二氧化碳可能对该“扳机”有协同和增效的作用，或为分裂素发挥作用所必需。
- 培养早期二氧化碳可能促进乙烯的合成，在后期(即子叶培养前10-15d)，二氧化碳可能与乙烯的作用相互拮抗。
- 另外，通过乙烯形成酶抑制剂 CO^{2+} 、 Ni^{2+} 以及乙烯作用部位竞争剂 AgNO_3 等调节乙烯的生物合成或作用，可以改善体胚发生能力。

- **⑤脱落酸**

- ABA对体胚的发生及成熟很重要。
- 培养基中加入一定浓度的ABA，可增强胚性愈伤组织的形成和体胚发生，防止畸形胚的产生，抑制体胚过早萌发，促进胚中贮藏成分(如贮藏蛋白质、后期胚胎丰富蛋白(LEA蛋白)、脂肪等)的合成。

• 3. 物理性质

- 培养基的物理性质如硬度、渗透压及pH等，影响器官或胚状体的形成及发育。

硬度对培养材料的影响

- 胡萝卜和石刁柏新分离的组织要在固体培养基上诱导形成愈伤组织，而细胞和胚状体的增殖则需液体培养基；
- 建兰原球茎的增殖及植株建成，也有类似情况；

培养基的pH对培养材料的影响

- 桑寄生科五蕊寄生属的*Dendrophthoe falcata*胚乳愈伤组织培养中，发现pH明显影响芽的形成；pH5.0和pH6.5时，培养物形成芽的概率小于15%，而pH5.8时则高达70%以上。

渗透压对培养材料的影响

- 诱导胚状体发生或早期胚胎培养，往往需要维持一定的渗透压；
- 如低浓度蔗糖（1%）有利于诱导龙眼胚性愈伤组织的体胚形成，诱导频率可以达到每克鲜重10 000个以上，并且体胚发育正常，蔗糖浓度提高到 5% 时，诱导频率下降且出现许多畸形胚；
- 进行体胚成熟培养时，低浓度蔗糖基本无法形成正常的成熟胚，成苗率极低，蔗糖浓度提高到5%时，体胚能够正常成熟，且成苗率高；可见，渗透压对体胚的诱导和正常发育有重要影响。

四、培养条件

- 光照和温度对离体材料的形态建成有重要的调控作用温两因素往往互相作用。
- 1. 光
- 光照强度、光照时间和光质对培养物生长和分化有很大影响。
- ①光照强度
- 不同植物及同一植物的不同材料对光照强度的要求不同。一般情况下，植物所需的光照强度为1 000~5000lx；
- 光照强度对培养物的增殖、器官分化、胚状体形成都有重大影响。

- 如卡里佐枳橙的茎尖生长，随光照强度的增加，分化产生的新梢数也增加；
- 烟草和可可的体胚发生需高强度的光照；
- 龙眼的体胚发生需黑暗条件，光照则严重抑制其发生；
- 胡萝卜和咖啡的体胚发生也需全黑暗的条件。

• ②光照长度

- 光照时间的长短常表现出光周期的反应。
- 如对短日照敏感的葡萄品种茎切段，仅在短日照培养条件下形成根；
- 而对日照不敏感的品种，则在不同光周期下皆可形成根；
- 对长日照植物菊芋根切段培养(已春化过的)时，在长日照条件下可成功地诱导形成花芽对短日照植物紫雪的花茎节间培养时，仅在短日照下才能形成花芽。
- 一般情况下，植物每日所需的光照时间为10~16h。

• ③光质

- 不同波长的光，对细胞分裂和器官分化有不同的影响。
- 对苗再生最有利的光谱是蓝光区，根的发生则是红光区较有利。
- 如在烟草髓部组织分化苗的培养中，起作用的主要是蓝光区，连续黑暗下，培养物停留在芽的分化，不能成苗；
- 红光(660nm)能促进菊芋块茎组织形成根。
- 烟草花粉培养中，红光和低光强的白光效果最好；
- 但曼陀罗花药培养中，红光则抑制胚状体形成。
- 离体培养中的一些形态发生过程可能为光敏色素所调节，如胡萝卜细胞培养中，观察形成胚状体的培养材料时，发现有高含量的光敏色素存在。

- **2. 温度**

- 不同植物要求的最适温度不同，一些园艺植物的生长适温为：

文竹	17°C	百合	20°C
杜鹃	25°C	石刁柏	26°C
月季	25~27°C	葡萄	28°C,
番茄	28°C	菊芋	30°C。

- 当然，它们都有一定的适应范围，大多数培养室采用25°C±2°C。

- 温度对器官分化和胚状体的形成有密切关系。
- 如四季橘花药培养中，26~30℃时无胚状体发生，20~25℃时出现胚状体。
- 有些植物的培养还要求变温。
- 有季节温差要求的植物，特别是鳞茎或球茎类植物，在移出试管前需一定的低温处理，如唐菖蒲的离体培养中，将小球茎或小植株直接移至土壤后不能正常生长，应在移至土壤前先在 2℃下维持4~6周。

五、植物细胞全能性的丧失

- 有些植物的愈伤组织或悬浮培养物，起初具有器官或胚胎发生的潜能，但经反复继代保存之后，其形态发生的能力常逐渐下降，直到完全丧失。
- 对此，目前有三种假说：
 - ①遗传学说
 - ②生理学说
 - ③竞争学说

- **1. 遗传学说**

- 由在培养细胞中常见的核染色体的变化（包括多倍性、非整倍性、染色体突变等）引起的，这种由遗传原因造成的形态发生潜力的丧失是不可逆的。

- **2. 生理学说**

- **某些情况下，形态发生能力的逐渐下降可能是由于细胞或组织内激素平衡关系或细胞对外源生长物质的敏感性的改变造成的细胞虽然停止了器官和胚胎的分化，但不一定丧失了分化能力，此时若改变外部处理条件，可使细胞的内在潜力得到恢复。**

- 具有全能性的胡萝卜培养物，在含2,4-D的培养基中培养8周之后，完全停止了胚胎发生，若加入1~4%的活性炭，其全能性又可得到恢复。
- 胡萝卜胚性细胞团在诱导培养基上可不断增殖，而在成胚培养基上才可发育成胚。
- 内源生长素水平的提高与胚性潜力的丧失是密切相关的。

• 3. 竞争学说

- 在胡萝卜细胞长期连续继代培养期间，有两个过程与胚胎发生潜力下降有关：
- 细胞对生长素 (2,4-D) 抑制全能性表达的作用变得比较敏感；
- 培养时间延长，培养细胞在细胞学上的不稳定，出现了缺乏胚性潜力的新细胞系，这种细胞学上的变化不一定是染色体数目地变化可能只是遗传信息的改变。

- 在复杂的多细胞外植体中，每个细胞能够产生胚性细胞团的潜在能力不同，由此形成的培养物细胞群体在成胚能力上表现出不稳定性。
- 如果非胚性细胞类群在培养基上具有生长优势，经反复继代培养其群体大增，而胚性成分则锐减，直到不复存在。
- 若培养物中尚存在少量胚性细胞，只是由于非胚性细胞的抑制作用而使其全能性无法表达，可通过改变培养基成分等，促进胚性细胞的增殖，以恢复培养物的形态发生能力。

六、植物细胞全能性的应用

- 植物细胞全能性是植物细胞的一种重要属性。
- 由小孢子可产生大量单倍体植株。
- 由胚乳细胞可获得三倍体植株。
- 细胞全能性在遗传学研究和育种上有重要意义。
- 体细胞可以产生完整植株，通过细胞水平上的遗传操作可进行农作物的改良。

- 通过人工种皮包被体细胞胚制造人工合成种子，用以繁殖遗传工程植物、减数分裂不稳定的基因型材料、自交不亲和植物、稀有珍贵物种、远缘杂交种、人工授粉得到的杂种等，人工种子所用的体细胞胚必须能经过储存、运输、机播后不致丧失发芽能力。
- 通常主要采用如藻酸钠一类的水凝胶作为体细胞胚的包被物质。
- 藻酸钠（2~3%，W/V）在室温下为液体，适于制造人工种子。
- 将体细胞胚与藻酸钠混合后在加入到硝酸钙或氯化钙溶液（100 mM）中，30min内表面即可完全络合，形成一层持久的种皮。

- 在种皮基质中还可加入一些对体细胞胚有益的物质，如能促进生长的微生物、营养物质、生长调节物质、杀虫剂、杀菌剂、用语旱地播种的亲水化合物等。
- 人工种子的工业化生产，必须建立高效的组织培养技术体系，生产出高质量的大小一致、发育同步、功能与合子胚一样的体细胞胚
- 研制和改进种皮生产方法与技术、生产设备与工艺、人工种皮所用基质的改进与开发、添加物质的开发与利用等；
- 形成完整的制种、储存、运输、播种、质量检测评价体系，降低成本，注重实用性，易于在生产中推广。

第5节 体细胞遗传学研究

- 植物成熟的分化组织 (如皮层和髓) 在细胞的染色体组成上有较大差异。
- 顶端分生组织 (茎尖和根茎) DNA合成之后立即进行核与细胞质的分裂 (正常细胞周期)，细胞均保持在二倍体水平上。
- 但这些分生细胞的衍生细胞的后续分化并非进行正常的有丝分裂，核内有丝分裂及核内复制在活体组织分化期间就会出现体细胞多倍性。
- 中柱鞘、原形成层和形成层细胞则保持二倍体状态，通过茎尖培养产生的植株和中柱鞘起源的侧根均为二倍体。

- 核内有丝分裂指染色体复制发生于完整的核膜之内，核内复制指每条染色体的 2 个染色单体在分裂间期复制，但染色体数不变。
- 通过核内复制可形成双分染色体（具有4个染色单体的染色体，其细胞DNA水平为4C）、四分染色体（具有 8 个染色单体的染色体，细胞的DNA水平为8C）以及多线染色体。
- 核内复制是体细胞多倍性常见的原因。体细胞核内多倍性并非组织分化的前提。有些物种（如菊芋、向日葵等）在完全不存在核内多倍性的情况下即可发生正常的组织分化。多倍体细胞的分裂必需有生长调节物质的刺激。

一、植物培养细胞的核变异

• 1. 植物培养细胞的特征

- 植物培养细胞的生理行为和形态发生会产生自发变异。某些新的变异特性可能是通过遗传或后生遗传的变异而产生的。
- 使表现体细胞多倍性物种的细胞脱离完整有机体的稳定环境，将其置于人工环境中就会增加核的不规则性。
- 向日葵等某些在活体组织分化不导致体细胞多倍性的物种，在人工培养条件下可发生一定程度的多倍化现象。

- **2. 核变异**

- 导致组织培养物细胞学上异质性的原因可能是：

- ①外植体中倍数性和遗传组成不同的细胞，经诱导后均能发生分裂；

- ②或培养条件引起的新的不规则性。

- 二者常同时发挥作用。

- ①初生愈伤组织

- 向日葵等不表现体细胞多倍性的植物培养早期的愈伤组织常保持一致的二倍体状态，只有相当晚的时候(约1年以后)才发生染色体数目异常现象。
- 豌豆根的组织培养中最早见到的四倍体细胞是既存于外植体中的核内复制的产物。组培中二倍体细胞第1次有丝分裂是在2个染色体(每条染色体有两条染色单体)的基础上进行的，而原来已发生过核复制的细胞分裂是在 $2n$ 个双分染色体(每条染色体上有4条染色单体)、 $2n$ 个四分染色体(每条染色体有8条染色单体)的基础上进行的

- 某些植物的培养物进行规则有丝分裂之前核在离体环境诱导下即能产生不正常现象。这些植物的外植体中具有不同倍数水平 (2C-128C) 的整倍体细胞常出现核碎裂现象，结果在细胞内造成多核状态。
- 核碎块大小不同，其DNA水平不一致。
- 在有些情况下，多核细胞内形成隔膜，使一个多核细胞变为多个细胞。
- 随后当完整的和已破裂的核进行正常有丝分裂时，初生愈伤组织就成为倍数性水平各异的各种整倍体和非整倍体 (亚单倍体、单倍体、亚二倍体、二倍体等) 细胞的混合群体。整倍体细胞竞争力强，通过有丝分裂选择，非整倍体细胞被淘汰。

- **②建成愈伤组织**

- 在培养的愈伤组织细胞中染色体数目异常主要有两种类型：

- **整倍性** 增加的染色体数是基本染色体数的整倍数 ($2n$, $3n$, $4n$ 等)；

- **非整倍性** 细胞所具有的染色体数不是基本染色体的整倍数。

- 多倍化作用导致离体培养中会出现四倍体、八倍体等整倍细胞，多倍化作用可能是纺锤体的形成受阻或染色体在后期落后，以及多核细胞的出现和其中各个核在同步分裂期间纺锤体的融合。

- 核融合可发生在间期。

- 组培中出现奇数系列 ($3n$, $5n$, $7n$ 等) 的整倍体细胞可能是核融合的结果, 也可能是在多倍体细胞有丝分裂期间染色体组发生分离的结果。
- 一个四倍体细胞在分裂时不是形成一个双极性纺锤体, 而是形成一个三极性纺锤体, 染色体的分配就可能出现数种形式 ($1: 3: 4$, $3: 2: 3$, $2: 4: 2$ 等), 也可能形成一个四极性纺锤体, 染色体的分配形式为 $2: 2: 2$ 。
- 在离体培养的二倍体组织中偶而会出现单倍体细胞。

- 除了杂种起源的植物及新合成的多倍体外，自然界中一般不出现非整倍性。
- 在组培中可出现非整倍性。
- 组培中由于选择作用使一种核型（即染色体数）的细胞在最终形成的细胞群体中占优势，主要受到培养基成分、培养类型、异质群体中细胞间的竞争和互作的影响。

- 把取自胡萝卜二倍体细胞系和四倍体细胞系的细胞等数混合，其单独培养时生长速度相同，混合后反复继代，四倍体细胞的频率不断增加，最后整个培养物都成了四倍体的。
- 将由纤维单冠菊中分离出具有4条、6条、16染色体的3个细胞系，培养在外加2, 4-D的B5培养基上，具4条和6条染色体的细胞系表现稳定，具16条染色体的细胞系逐渐失掉一些染色体，最后变成了一个具有13条染色体的稳定核型。



- 培养细胞染色体数目的稳定性并不能排除它在遗传学上的不稳定性。某些变异可由染色体结构变异引起而染色体数目未变。
- 进行培养细胞核型研究，常用醋酸洋红和孚尔根压片法，只可对染色体数目或大的形态进行观察，难以发现染色体结构变异。
- 可采用吉姆沙和奎吖因染色体分带法对培养细胞染色体结构变异进行更细致的研究。

• 3. 影响培养细胞核变异的因子

- 除组织的自然性质外，影响培养细胞核变异的因子很多，最重要的是培养基成分。
- 通过改变培养基成分，可有选择地诱导和保持倍数性细胞的分裂。
- 在只补加2, 4-D的培养基上，豌豆根培养物中二倍体细胞发生分裂，当还含有激动素和酵母浸出液时，能有选择地诱导四倍体细胞发生分裂
- 激动素和酵母浸出物能提高多倍体细胞有丝分裂的频率。
- 较高浓度的NAA能有选择地促进二倍体细胞的有丝分裂。

- 高浓度的生长调节物质能抑制多倍体细胞的有丝分裂，低浓度可选择地刺激多倍体细胞的有丝分裂。
- 培养基的物理状态也能影响培养细胞的细胞学行为。
- 悬浮培养条件下，选择压有利于二倍体细胞，在固体培养下，四倍体细胞出现的频率较高。
- 延长培养周期可扩大异常核型的变异范围。供体植株原有的倍数性在培养细胞多倍化的过程中起着重要作用。
- 还阳参单倍体细胞的二倍化现象比二倍体细胞的四倍化更为常见。

• 4. 核型变化和形态发生

- 某些植物培养物起初器官发生能力强，后来逐渐减弱直到完全丧失。由老龄培养物分化出来的器官形态异常者较多。
- 在长期培养的豌豆根愈伤组织中，根形成能力的下降与细胞染色体组成异常现象增加有关，包括染色体数增多和非整倍体频率提高等。
- 细胞学异常程度不同的烟草细胞系都能够生长和分化，但畸变程度较低的细胞系茎芽分化开始早，频率高。畸变程度较高的组织产生的植株生长极慢，难生根，呈叶丝状。在某些情况下，核型变异与形态发生存在着一定联系。

- 虽然组织培养中细胞间的倍数性不同，但由这些细胞再生的植株可能都是二倍体的。
- 保存一年的豌豆根愈伤组织中，有二倍体和四倍体细胞，但其分化出来的根全部是二倍体的。
- 随着愈伤组织年龄的增加，也会出现一些四倍体的根，当大部分愈伤组织细胞都变为 $4n$ 或倍数性更高时，其生根能力就完全丧失。
- 在菜豆愈伤组织中，虽然二倍体细胞的数目很少，但其形成的根都是二倍体的。



- 在一个倍数性不同的细胞混合群体中，倍数性高的细胞不利于细胞分裂，在继代培养中，高度多倍化细胞的出现是由于倍数性较低的细胞不断进行核内复制的结果，而不是这些多倍体细胞自我繁殖的结果，因而不能由它分化出器官来。
- 非整倍性可导致器官分化能力的丧失，但少数例证表明非整倍细胞也能再生完整植株。

二、再生植株中的染色体

- 1. 花粉植株的倍数性变异
- 花药培养是某些物种产生单倍体的有效方法，烟草属植物由花药培养产生的植株多数是单倍体，其它植物由花药培养产生的植株多数具有较高的倍性水平，或是非整倍体。

- 花药培养中1个植株可能是通过胚胎形成过程由花粉粒直接起源的，也可能是花粉粒先形成愈伤组织，然后再由愈伤组织分化产生。
- 如果发育方式是后者，则这些单倍体植株的起源或是由于愈伤组织是由花药的二倍体组织产生的，或是由于花粉起源的单倍体组织具有核内多倍性。

- 单倍体组织在培养中易发生多倍化。
- 如果花粉植株没有经历形成愈伤组织阶段而由花粉粒直接产生，核融合可能是多倍性的起因。
- 南洋金花花粉胚的发育有3种不同方式：
 - ①小孢子核进行正常分裂，形成1个营养细胞和1个生殖细胞，花粉胚是由营养细胞单独形成的；

- ②营养细胞和生殖细胞是通过正常方式形成的，2个核都参与胚胎发育；
- ③小孢子进行均等分裂，产生的2个子细胞进一步分裂，并参与胚的形成。
- 由途径①起源的胚都应当是单倍体，其它两个途径，由不同水平上进行的核融合，会形成 $2n$ ， $3n$ ， $4n$ 的胚。在途径②中，营养核和生殖核在同步分裂中彼此融合，形成2个二倍体核。

- 这2个二倍体核再进行正常的有丝分裂，最终形成1个二倍体的胚。
- 若在营养核和生殖核融合之前，生殖核已进行核内复制 (DNA含量变为4C)，将形成3n的胚。
- 若一个已进行过核内复制的生殖核 (DNA含量为4C) 和营养核的2个子核 (每个DNA含量为2C) 融合，就形成四倍体的胚。

- 途径③中只能通过2个子核在同步分裂期间彼此融合形成二倍体。
- 染色体自发加倍(核内多倍性或核融合)可免去秋水仙素处理，对获得纯合二倍体具有重要意义。
- 较高的倍数性或非整倍性的出现是通过花药培养生产单倍体的一个严重问题。

- 核型不稳定性的普遍存在是利用单倍体细胞培养进行遗传和生化研究的主要障碍。
- 荧光苯丙氨酸 (PFP) 能显著抑制烟草二倍体细胞的分裂，但不影响单倍体细胞系的生长，但林生烟草细胞对PFP的敏感性因其组织来源的不同而异，与倍数性无关。
- PFP浓度对获得和保持细胞单倍体形式很重要。

- **2. 再生植株的染色体**

- 植物细胞与组织培养中，再生植株染色体的倍性取决于所用外植体及是否进行过人工加倍处理。
- 离体培养中，应关注植物外植体到再生植株各个层次培养物染色体的倍性关系。

- **3. 嵌合性**
- 嵌合性指在一个有机体中同时存在遗传组成不同的细胞。
- 自然界染色体数的嵌合性常是由杂种或新合成的多倍体遗传不稳定性造成的。
- 硬粒小麦中胚轴节段培养10-15d能分化茎芽，由此长成的植株中根尖和茎尖都表现染色体数的嵌合性。

- 组成嵌合体的细胞除二倍体外，还有亚单倍体、单倍体、亚二倍体。
- 这种非整倍体细胞和整倍体细胞可长期共存，直到穗的发育后期。
- 二倍体细胞具有选择上的优势，非整倍体细胞逐渐被淘汰。
- 在小孢子母细胞和大孢子母细胞中，直到减数分裂前非整倍体细胞才完全被淘汰。
- 秘鲁番茄花药培养可产生平周嵌合体和边缘嵌合体植株。
- 由蚕豆子叶愈伤组织分化出了混倍体的根。
- 混倍体再生植株可能是由愈伤组织中一个以上细胞起源的。

三、植株再生遗传变异

- 1. 植株再生的遗传控制
- 愈伤组织再生植株是一个基因型特征，离体培养条件下，一个物种内并非所有品种都能表现同样的生长和分化能力，离体培养技术有很大局限性，很难用于某些农艺性状优良的品种。

- 为克服这种局限性，应搞清控制离体条件下生长分化的基因，然后把它转入农艺性状好但不易于离体培养的品种植株中，以改良其基因型，适于离体培养。
- 1978年，把在离体条件下反应能力很差的2个马铃薯品系杂交，选育出1个具有较高花粉胚形成能力的新马铃薯品系。

• 2. 组织培养诱发变异的应用

- 组织培养中自发变异频率很高，是遗传变异的丰富来源。
- 组织培养使嵌合体中的既存突变获得表现机会，外植体中的变异细胞，在人工诱导下形成新的个体，变异性状就能够表现出来。
- 长期培养物中的变异，可能来自亲本植株变异的积累，或是培养条件诱导。

- 1) 由培养细胞获得变异植株有两个途径：
 - ① 植株水平选择
 - 由已经过不同时间离体培养的组织或细胞诱导得到再生植株，然后在再生植株群体中筛选所需要的性状。
 - ② 细胞水平选择
 - 对于某些特性，如对某些除草剂、真菌毒素、污染因素、极端温度、高浓度盐分等的抗性，可在细胞水平上进行选择。

- 2) 几点说明

- ①途径 II 只需投入较少人力物力，在很少的空间即可对大量的变异细胞进行筛选。该法并非对所有性状都适用，如成熟期、果实味道、籽粒产量等。
- ②在细胞水平上入选的性状并不一定在植株水平上表现出来，而某些基因在单细胞水平上可能并不活跃，只有在完整的植株上，其特定功能才能表现出来。

- ③在细胞水平上入选的性状还必须在整体植株水平上重新检验。
- ④进行变异体离体选择尽可能使用单细胞或小细胞团。大的外植体或愈伤组织中并非所有细胞均匀一致地受到选择压的作用，某些野生型细胞可能逃脱压力而存活下来。

- **3) 两个概念**
- **体细胞无性系** 指组织培养再生的植株。
- **体细胞无性系变异** 再生植株中出现的变异。
- 多年来在甘蔗、马铃薯、水稻、小麦等作物中对其体细胞无性系变异进行了研究和选择。
- 体细胞无性系变异广泛，单一性状变异幅度大，有些变异可遗传，有的不可遗传。
- 可遗传的变异多数发生分离，难以稳定。
- 无性系变异频率高低与亲本材料基因型有密切关系。

- 4) 在细胞水平上对变异选择的类型
- ①对氨基酸和氨基酸类似物抗性的选择
- 某些主要农作物种子贮藏蛋白中都缺少必需氨基酸，如大豆缺甲硫氨酸，小麦缺赖氨酸和苏氨酸，玉米缺赖氨酸和色氨酸，水稻缺赖氨酸。通过对氨基酸及其类似物抗性细胞学的选择可改良作物营养品质；

- **②抗病性选择**

- 植物抗病性不是由单基因控制的，组织培养时不易察觉。某些情况下毒素对离体组培物和整体植株的毒害作用一样，若毒素又是致病的唯一因素，就有可能用植物毒素在离体条件下对抗病性进行直接选择；

- **③对除草剂抗性的选择**

- 田间条件下施加均匀一致的高强度选择压进行抗除草剂表现型的选择不易做到。
- 在细胞、组织和植株三个水平上对除草剂作用的研究表明，可在组织培养中进行抗除草剂的选择
- 1978年组培选出了抗“毒莠定”烟草突变体；

- ④抗逆性选择

- 土壤含盐量、低温等环境因子常是某些作物分布区域的主要限制因素，人们期望从组培中分离出抗逆表现型，并能在再生植株中稳定表达
- 1975年，分离出耐高浓度NaCl (0.88%)的烟草细胞系，再生植株经连续两个有性世代后仍保持着耐盐性。

- **3. 变异性状在再生植株中的表达和遗传**

- **①细胞水平要求**

- 有些情况下，一个在细胞水平上入选的突变性状能否在再生植株中表达无关紧要。
- 如若选择目的只为获得一个标记性状用于细胞杂交实验，或某一个性状只是用于发酵生产，那么这个性状能在培养细胞中表达就足够了。

- **②植株水平稳定**

- 有些情况下，要求突变性状能在再生植株中稳定表达，但能否通过有性过程传递则无关紧要，如植物的营养繁殖。

- **③稳定表达且遗传**

- 多数情况下要求入选的性状能在再生植株中表达并可通过有性过程传递给后代。

- **④变异体**

- 指只具有表现型变异的细胞或个体。变异体可能是后生遗传事件造成的。

- **⑤突变体**

- 由遗传事件造成的变异体，包括核苷酸的取代、插入、缺失、染色体节段重复、倒位、易位及染色体数目的增加或减少等。

• ⑥后生遗传变异

- 指在细胞的发育和分化过程中，在基因表达的调控上所发生的变化，而不涉及基因结构的变化。
- → 这些变化在诱发条件不复存在以后，还能通过细胞分裂在一定时间内继续存在。
- → 后生遗传变异具有这种特殊的稳定性不同于生理上的变化，生理变化是对刺激的反应，刺激一停，变化也就消失。
- → 后生遗传变异一般情况下不能通过再生过程传给再生植株。
- → 在表达方式上发生了改变的基因具有比较一般的细胞学功能，在分化组织中也很活跃，此时后生遗传变异有可能通过分化和脱分化过程而继续保持在二次培养物中。

- **⑦鉴别遗传变异和后生遗传变异的唯一标准**

- 就是看一个变异了的性状能否通过有性过程而传递给后代。
- 凡是能够通过配子而传递的性状，必须是一个能够通过减数分裂和有丝分裂而稳定延续的性状，是一个由DNA结构变异造成的遗传变异性状。

- **⑧遗传变异的表达**

- 有的遗传变异，不能在再生植株中表达可在二次培养物中表达，这是由于相关的基因可能只在未分化的培养细胞中表达，在成株中不活跃。

一个人做自己喜欢的事

和喜欢的人在一起做自己喜欢的事

和喜欢的人在一起做都喜欢做的事

