

非生物胁迫处理对植物离体组织培养再生效果影响研究进展

余茂云¹, 殷桂香¹, 杜丽璞², 张平治¹, 叶兴国²

1. 安徽省农业科学院作物研究所, 合肥 230031

2. 中国农业科学院作物科学研究所; 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081

摘要 植物离体组织培养再生性能受多种因素影响。早期关于提高植物组织培养和植株再生效率的策略往往侧重于基因型筛选、培养基改良和植物生长调节剂搭配等方面, 忽略了环境胁迫条件对植物离体培养再生效果的影响。据此, 综述了不同胁迫诱导对植物离体组织培养再生的影响, 主要包括氧化、渗透、水分、伤害和温度等胁迫。氧化胁迫对植物细胞的再生过程具有双重作用, 即氧化胁迫引发植物体内相关抗氧化胁迫酶类合成, 从而促进再生, 但是发生氧化胁迫的细胞因其细胞膜通透性发生改变, 易导致细胞死亡; 短期渗透胁迫对植物胚性愈伤组织再生能力具有明显的促进作用; 伤害通过影响相关基因表达而对体细胞胚胎产生积极作用; 温度对植物体细胞胚胎发生的影响具有发育阶段的特异性以及处理强度的依赖性, 适度的温度处理可诱导出较多的胚性愈伤组织。因此, 对于组织培养的外植体进行适当的逆境胁迫前处理, 有助于植物组织培养过程胚性愈伤组织的产生, 并最终促进植物离体组织培养再生性能的提升。

关键词 植物; 胁迫; 诱导; 组织培养; 植株再生

中图分类号 Q785

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.28/29.014

Research Progress on the Impact of Abiotic Stresses on Plant Regeneration During Tissue Culture *in vitro*

SHE Maoyun¹, YIN Guixiang¹, DU Lipu², ZHANG Pingzhi¹, YE Xingguo²

1. Crop Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031

2. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences; National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081, China

Abstract Plant regeneration performance during tissue culture *in vitro* is affected by many factors. To improve plant regeneration efficiency, the previous strategies focused on genotype screening, optimization on media components, and combination of plant growth regulators, while paying little attention to the significant impact of environmental stress on plant regeneration. This paper summarizes the recent research progress on different stress-induced effects on plant regeneration during tissue culture *in vitro*, including oxidative stress, osmotic stress, wounding, and cold stress. The oxidative stress plays a dual role in the plant regeneration process, i.e., induction of relevant stress antioxidant enzymes synthesis contributing to plant regeneration positively and changes on cell membrane permeability caused by oxidative stress leading to cell death negatively. The short-term osmotic stress significantly promotes the plant regeneration potential. Wounding has a positive effect on somatic embryogenesis by activating the relevant gene expression. The effect of temperature on the development of plant embryonic cells depends on the plant developmental stage and treatment intensity, and moderate temperature pretreatment can induce more embryonic calli. Therefore, appropriate stress pretreatment on explants used for

收稿日期: 2014-06-27; 修回日期: 2014-07-15

基金项目: 安徽省农业科学院科技创新团队项目(13C0202); 安徽省种子工程项目(14D0202)

作者简介: 余茂云, 助理研究员, 研究方向为作物营养代谢与逆境胁迫分子机理, 电子信箱: ahxiaoshe@126.com; 殷桂香(共同第一作者), 硕士, 研究方向为植物组织培养和遗传转化, 电子信箱: guixiangyin@126.com; 张平治(通信作者), 研究员, 研究方向为小麦抗病遗传育种, 电子信箱: pzzha@163.com; 叶兴国(共同通信作者), 研究员, 研究方向为小麦生物技术育种, 电子信箱: yexingguo@caas.cn

引用格式: 余茂云, 殷桂香, 杜丽璞, 等. 非生物胁迫处理对植物离体组织培养再生效果影响研究进展[J]. 科技导报, 2014, 32(28/29): 97-103.

tissue culture may contribute to the formation of embryogenic calli greatly, and may ultimately help to improve plant regeneration capacity during tissue culture *in vitro*.

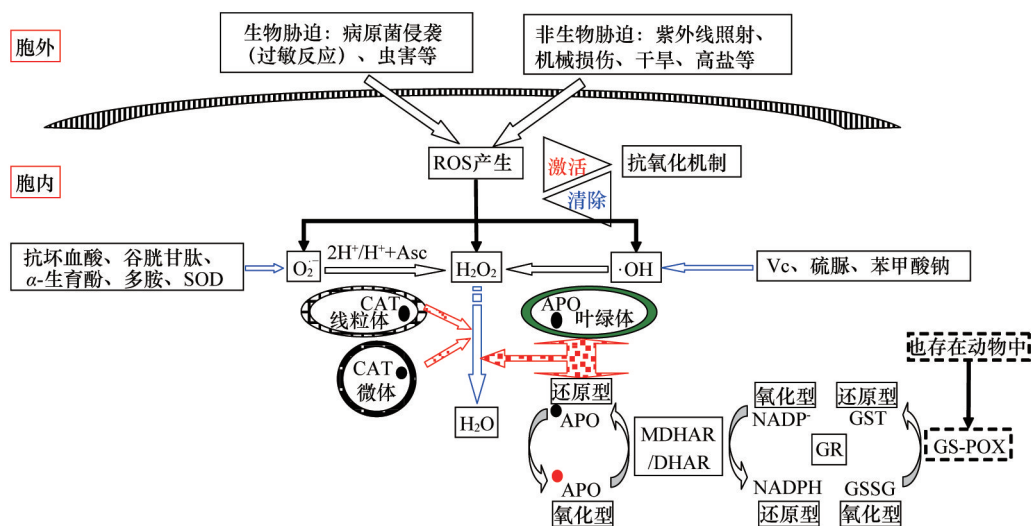
Keywords plant; abiotic stress; induction; tissue culture; plant regeneration

植物离体组织培养再生过程(亦即植物体细胞胚胎发生, somatic embryogenesis)包括从单个体细胞经脱分化到再分化进而产生一个完整植株的一系列过程。长期以来,人们已认识到逆境胁迫可引起植物细胞内染色质重构,在植物离体组织培养再生诱导方面具有重要作用。研究发现,植物离体组织培养再生的早期阶段有大量胁迫相关基因表达,因此认为植株离体组织培养再生是离体培养的植物细胞对外界极端环境胁迫响应的结果^[1-8]。通过对胁迫过程的转录组学及蛋白质组学研究,已发现许多与植物离体组织培养再生过程有关的基因表达和蛋白质合成。在对拟南芥离体组织培养的研究中发现,含 0.7 mol/L 甘露醇的 B5 培养基能有效诱导体细胞胚胎的发生^[9],鉴定出胚中特异性表达基因 *ABI 3* 及 *FUS3*;胡萝卜体外诱导中发现,0.7 mol/L 蔗糖、0.3 mol/L NaCl 或 37℃ 的培养条件就足以诱导胡萝卜再生^[10]; Kiyosue 等^[11]研究发现,当 MS 培养基^[12]中含重金属离子,如 CoCl_2 、 NiCl_2 、 ZnCl_2 及 CdCl_2 时即能诱导胡萝卜的体细胞胚胎发生。这些研究集中表明,干旱、高盐、渗透、温度胁迫及重金属离子等能显著诱导离体培养组织的再生。此外,有报道表明,外植体伤害预处理也对体外培养的细胞再生具有刺激作用^[13]。

1 氧化胁迫与植株再生

许多自然及物理因素能诱发氧化胁迫,包括紫外线照射、除草剂使用及氧气缺乏等。其中,因氧气缺乏导致的氧化胁迫有 3 种类型:低氧、缺氧及再氧化。活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)的产生标志着低氧特别是再氧

化的发生。过氧化氢(H_2O_2)、超氧自由基(O_2^-)及羟自由基($\cdot\text{OH}$)是植物细胞内许多反应过程的副产物,如离子催化的 Fenton 反应、各种氧化酶介导的生化过程,这些物质可能对植物细胞正常代谢、植物的生长及发育造成不利影响,导致细胞功能紊乱和植物死亡。在植物细胞内,氧化胁迫可发生在所有的生物大分子上,包括脂类、蛋白质、碳水化合物及核酸。细胞抵御低氧引发的氧化胁迫能力与物种、品种、组织、细胞膜特性、内源抗氧化剂含量及细胞抗氧化能力有关^[2,14-16],有效的能量利用、厌氧代谢实施及氧化还原机制维持是确保细胞在遭受氧化胁迫条件下幸存的关键。细胞内的抗氧化系统能抑制 ROS 的产生,包括低分子的抗氧化剂(抗坏血酸、谷胱甘肽及生育酚等)、产生抗氧化剂的酶类以及 ROS 互作的酶,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POX)及过氧化氢酶(CAT)等。在植物组织中,存在一些抗氧化的酚类物质,包括黄酮类、丹宁酸及木质素前体物质,它们扮演植物体内清除 ROS 系统组份的角色,抗氧化过程伴随一系列氧化还原过程的发生。目前,有关抗坏血酸与谷胱甘肽、抗坏血酸与酚类物质间的互作机制已研究比较清楚。当植物体内发生氧化胁迫时,一系列的抗氧化机制被活化,但一些研究表明,抗氧化物基因的过表达并不总是引起抗氧化防御机制的加强^[2]。在植物组织培养过程中,已发现许多氧化胁迫存在^[3,5,7,14,17,20]。由于 ROS 的产生与体内清除 ROS 能力的差异引起的氧化胁迫,是导致谷类作物原生质体培养再生能力的重要原因之一^[21]。植物体内 ROS 产生途径及参与 ROS 清除系统如图 1 所示。



SOD:超氧化物歧化酶;APO:抗坏血酸过氧化物酶;MDHAR:单脱氢抗坏血酸还原酶;DHAR:脱氢抗坏血酸还原酶;GR:谷胱甘肽还原酶;GS-POX:谷胱甘肽过氧化物酶;Asc:抗坏血酸盐

图1 植物体内活性氧物质的清除路径

Fig. 1 ROS scavenging in plants

Papadakis 等^[4]对烟草及葡萄原生质体培养过程细胞全能性与体内活性氧物质含量相关性研究发现,原生质体全能性的发挥与细胞抗氧化物质的活力呈正相关,而与体内及培养基中 ROS 负相关。烟草具有全能性的原生质体相对于无全能性的原生质体,前者胞内及培养基中 O_2^- 和 H_2O_2 含量分别低至后者的 2 倍和 7 倍。添加能产生 O_2^- 的碱性二甲亚砜 (DMSO),将导致烟草原生质体再生性能及细胞分裂能力降低。对原生质体内氧自由基清除剂的研究表明,在再生能力强的烟草体内,这些氧自由基清除剂主要以还原型的形式存在,在再生能力弱的烟草及葡萄品种中则以氧化型的形式存在,且具有高活性的抗氧化酶类,其中高活性的 SOD 可在体内持续达 8 d。然而,liyama 等^[22]发现活性氧类物质(AOS)对植物的生长和发育具有促进作用,如 H_2O_2 参与过氧化物酶介导的分子内同型酪氨酸互作以及与 O_2^- 一道充当信号分子,诱发细胞防御反应^[23]。在原生质体再生性能方面, H_2O_2 功能表现为双重性^[24],一方面作为代谢产物调控植物细胞的代谢过程,另一方面作为信号分子参与细胞内复杂生命活动的调节。研究还表明,在烟草原生质体培养中,氨肽酶(APO)的调控发生在转录水平上,且是再生必须的,当过氧化物酶活性受到抑制时,原生质体的分裂能力及再生力不受影响,但当过氧化物酶活性受到影响时,首先影响的是原生质体的分裂能力。胞外的 H_2O_2 是维持细胞分裂必须的,对植物生长、发育、适应性及防御反应具有重要作用,同时也是 POX 介导的细胞壁重构的底物分子,减少培养基中 H_2O_2 的过度累积有利于植株再生。

近年来,关于氧化胁迫与植株再生的相关性已进行了深入研究,氧化还原状态的改变可影响体细胞胚胎发生^[24-26]。研究发现,谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、CAT 及 MT1 在菊苣(*Cichorium intybus* L.)非胚性愈伤组织中异常表达引起低的

氧化胁迫,而在胚性愈伤组织中则具有高的氧化胁迫^[27]。Szechyńska-Hebda 等^[5]在研究小麦幼胚和花药再生中发现,高再生能力的愈伤组织中含较高的抗氧化酶活性,花药诱导的愈伤组织比幼胚诱导的愈伤组织具有更高的 SOD、CAT 和 POD 活性,其中,幼胚诱导的愈伤组织中 3 种酶活性的高低依赖于不同植物生长调节剂(plant growth regulators, PGRs)的应用,在非再生的愈伤组织中,仅生长素处理后酶活性最高,而在具有再生能力的愈伤组织中,最高活性出现在细胞分裂素处理后,认为小麦愈伤组织的再生性能与特定 PGRs 诱导的 ROS 有关,在胚性愈伤组织发育和分化过程中,ROS 充当体外 PGRs 效应与体内形态发生的“信使”。高浓度 H_2O_2 能促进离体培养组织的快速分裂,诱导体细胞胚胎发生过程中 CAT 及 APX 的转录^[20]。剑兰(*Gladiolus hybridus* Hort)再生研究表明, H_2O_2 的使用可提高体细胞胚胎发生率^[28]。随着 CAT 活性下降, H_2O_2 浓度上升,表明氧化平衡的破坏可能促进了与形态发生相关基因的表达^[29]。同样, Cui 等^[30]在枸杞(*Lycium barbarum*)再生研究中也发现,高再生性状总是与 CAT 活性下降、 H_2O_2 含量上升相伴发生的,合适浓度 H_2O_2 可以提高内源 H_2O_2 含量,进而诱导 SE 相关基因表达。然而, Rajeswari 等^[31]报道再生芽分化能力与 CAT 活性呈正相关。Tian 等^[32]在樱桃中研究发现,高 O_2^- 及低 H_2O_2 含量与低器官形成能力有关,外源添加 H_2O_2 能促进芽再生。研究还发现,氧化胁迫过程降解的小分子多肽可充当细胞内的第二信使,参与细胞生命活动的调控(图 2)^[33]。

由此可见,氧化胁迫对植物细胞的再生过程具有双重作用,即氧化胁迫引发植物体内相关抗氧化胁迫酶类合成,从而促进再生;另一方面,发生氧化胁迫的细胞其细胞膜通透性发生改变,进而导致细胞死亡^[33]。

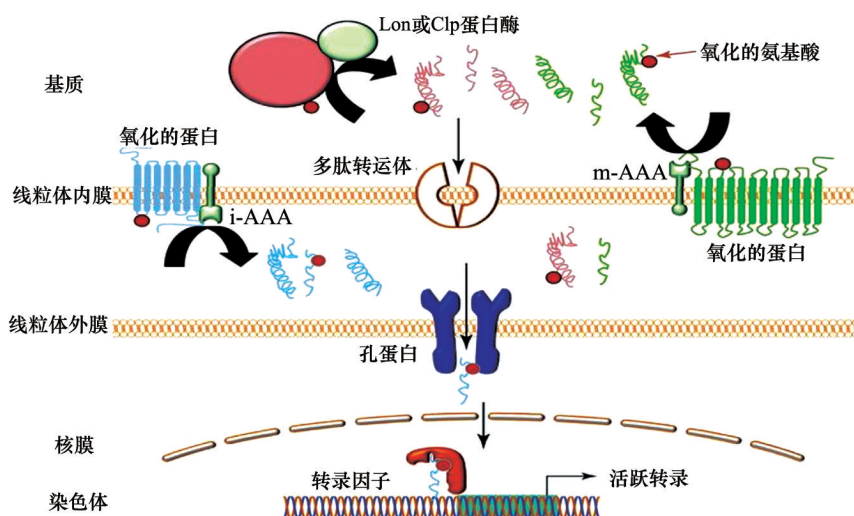


图2 氧化胁迫降解的小分子肽段的信号调控路径(引自 Møller 等^[33])

Fig. 2 Signal pathways regulated by low-molecular-weight peptides proteolysed under oxidative stresses (refer to Møller, et al^[33])

注:i-AAA和m-AAA分别表示活性位点位于膜间隙(intermembrane space)和基质(matrix)的ATP依赖型蛋白酶

2 渗透胁迫与植株再生

温和的渗透胁迫对组织培养植株再生是有利的,其中碳水化合物,如蔗糖、果糖、甘露糖等的添加在一定程度上构成了渗透胁迫^[9,16,34-38]。在玉米中发现,高浓度蔗糖能显著提高植株再生率^[39]。结合45 min的质壁分离处理,促进胡萝卜胚性愈伤组织形成达3倍之多^[40],认为渗透胁迫阻断了前胚胎期细胞间的黏连,使得细胞在生理上彼此分离,从而容易分化。Marty等^[41]也发现,培养基中添加蔗糖对于烟草叶肉细胞原生质体不同培养阶段表达基因的作用不同,对烟草叶肉细胞原生质体原初表达基因,即早期基因(early genes),如*Thioh*具有明显的诱导作用,而对培养4 d后的烟草叶肉细胞原生质体中的基因,即晚期基因(late genes),如*EF-1 α* 则无影响,表明外源添加的蔗糖通过影响胚性愈伤组织形成相关的早期基因表达,促进烟草胚性愈伤组织形成。Jain等^[35]研究发现,培养基中添加0.4 mol/L甘露糖能显著减缓籼稻愈伤组织生长,促进胚性愈伤组织形成,同时抑制了芽再生(即实生苗的发生),但更低浓度(0.1~0.2 mol/L)对籼稻愈伤组织再生能力的提升更为明显,表明甘露糖对籼稻愈伤组织再生性能具有低浓度效应。同时,还发现对愈伤组织进行24 h的高渗胁迫处理能明显提高梗稻及籼稻品种绿芽再生率,其中,IR43、Pusa Basmati 1、Basmati 385和Taipei 309分别提高3倍、2.3倍、1.6倍和1.6倍。渗透胁迫提高植物组织培养再生率的现象在大豆^[42]、籼稻^[43]和梗稻^[44]中均有报道。研究发现,受到渗透胁迫的植物体内脱落酸(ABA)生物合成能力显著加强^[45],但尚不确定ABA是如何影响培养物的形态发生过程。此外,山梨醇也被用来与蔗糖一起构成水稻体外诱导的渗透胁迫,该胁迫对水稻胚性愈伤组织形成具有积极作用^[46]。同样,在小麦、大麦幼胚培养形成胚性愈伤组织过程中也发现类似的现象^[47]。

Kumria等^[48]通过研究代谢过程胁迫处理对棉花体细胞胚胎发生及分化的影响,发现来自下胚轴或子叶的胚性愈伤组织在含有3%麦芽糖和高浓度硝酸盐的无激素培养基上能很好产生球形期体细胞胚,继续培养可低频率(每皿2~4个)进入鱼雷期及子叶期生长。但在1/5MS培养基上,胚胎发生频率提高2~3倍。在MS培养基上进行早胁迫诱导,能发育成完整植株的球形胚频率上升到每皿20~24个。然而,Grosset等^[49]研究发现,渗透胁迫并不能诱导烟草叶肉细胞原生质体培养渗透相关基因的转录,只是降低叶中mRNA的消失速度,促进新生愈伤组织的形成。

Bommineni等^[50]在硬粒小麦组织培养中发现,不同硬粒小麦品种在不同固体支持物的培养基上诱导出球形期愈伤组织的时间不同,在琼脂粉中培养仅需2 d,在含琼脂糖或植物凝胶的培养基上培养则需4 d。对此现象的解释是:1)基因型决定;2)培养基成分引起;3)植物激素的作用;4)蔗糖及培养基固体支持物的协同作用。因此,认为含3%蔗糖及0.8%琼脂粉的诱导培养基对于硬粒小麦胚性愈伤组织的诱导最合适,1/2 MS培养基或与含1 mg/L BA(6-

benzylaminopurine)及1 mg/L IAA的MS培养基配合使用有利于再生过程。蔗糖作为维持细胞渗透压的重要物质,已被广泛用作植物组织培养培养基的一个重要组分。研究表明,MS培养基添加5.6 μ mol/L 2,4-D及58 mmol/L蔗糖(无脯氨酸)有利于小麦品种Bobwhite悬浮培养细胞胚性愈伤组织的形成,添加9 μ mol/L 2,4-D及87 mmol/L蔗糖(无脯氨酸)有利于再生^[51],其原因是高浓度蔗糖引起的渗透胁迫促进了再生。另外发现,在含有58 mmol/L蔗糖培养基上再生的小麦幼苗中白化苗占95%,而在含有87 mmol/L蔗糖培养基上白化苗下降至45%,其机理尚不清楚。

尽管渗透胁迫对小麦胚性愈伤组织再生能力具有明显的促进作用,但Rodriguez-Sotres等^[52]对发育小麦籽粒中三酰甘油(triacylglycerol, TAG)合成的研究发现,在基本培养基上培养4 d的胚内TAG合成降低,在添加30 mmol/L蔗糖的培养基上则保持不变,而在添加400 mmol/L甘露糖或1 μ mol/L ABA的培养基上的胚内TAG合成上调,且发现此处的渗透胁迫强度及ABA浓度与正常小麦植株内的完全一致,TAG的脂肪酸组成也与正常体内一致,但在缺少ABA或渗透胁迫时,发现 $C_{18}:C_{16}$ 比例下降。进一步的同位素标记结果表明,仅在渗透胁迫或添加ABA的情况下,¹⁴C标记的醋酸盐才能掺入到离体胚内TAG的合成中,但对TAG的降解没有影响,这种渗透胁迫对TAG合成的影响是暂时的,并且受ABA的干扰,认为小麦离体培养胚仅对短期渗透胁迫或ABA处理非常敏感,长时间的胁迫处理反而不利。

3 伤害与植株再生

植物受到伤害是一种常见的非生物及生物胁迫的结果,不仅对植物体造成损伤,同时也为病原菌侵入提供便利。植物伤害相关基因包括抗病响应基因、编码细胞壁修饰酶类基因、参与植物次生代谢途径基因及渗透胁迫和热响应基因,其中许多基因参与乙烯、茉莉酸甲酯及ABA信号转导途径,但伤害抑制生长素信号通路相关基因表达^[53]。伤害对组织培养再生可能的影响途径如图3所示。

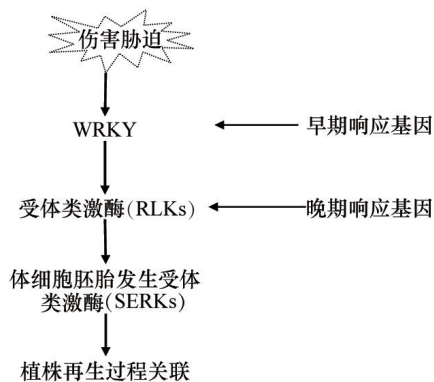


图3 伤害引发的植物再生调控路径

Fig. 3 Putative regulatory pathway of regulation initiated by wounding in higher plants

Santarem 等^[13]报道,大豆外植体的人为伤口促进体细胞胚的快速诱导,其中,Jack 品种经过 14 d 的诱导即可产生体细胞胚,21 d 后胚性诱导率平均为每片子叶 44 个,但在供试的 2 个大豆品种 Jack 和 Resnik 中并未发现胚性愈伤组织诱导率有显著差异。Nadolska-Orczyk 等^[54]也报道伤害对大豆胚性培养物形成的促进作用,然而其胚性愈伤组织诱导率仅为每片子叶 6 个以下。伤害与再生的相关性可能由于伤害促进了乙烯的产生^[55]。Grosset 等^[49]认为,伤害处理对于烟草叶肉细胞原生质体脱分化的诱导是必要的,提出伤害促进植物胚性愈伤组织形成的机制,即借助伤口愈合替换损伤的组织,从而诱导细胞分裂。伤害诱导植物再生最直接的证据就是仅在外植体的伤口处最早出现愈伤组织,而在外植体内部或未发生创伤处没有愈伤组织的形成,而对于成熟器官很少存在损伤的谷类作物,这些器官在离体培养时很少产生胚性愈伤组织^[13,49]。Marty 等^[41]比较烟草原生质体快速生长阶段与成熟叶片中基因表达差异的研究发现,质壁分离处理不影响差异基因表达,但伤害能诱导差异基因表达,特别是伤口附近的细胞。此外,发现泛素^[56]、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidases, GPX)^[57]等也受伤害诱导。通过对烟草细胞内 3 种编码泛素基因(转录本大小分别为 1.6、1.3 和 1.9 kb)的表达分析发现,烟草原生质体脱分化、再分化过程与泛素基因上调表达密切相关,其中伤害处理首先诱导 1.6 kb 的泛素转录本上调表达,而另外 2 个片段(1.3 kb 和 1.9 kb)虽不具有伤害诱导性,但具有发育阶段依赖性,表现为在幼叶及分裂旺盛组织表达较高,表明泛素基因参与植物再生性状调控的早期阶段,即部分泛素基因(如 1.6 kb)在伤害处理条件下,通过促进细胞脱分化进而对再生产生积极作用。Iwase 等^[58]对拟南芥 AP2/ERF 类转录因子 WIND1 (wounding induced dedifferentiation 1) 研究发现,伤害处理诱导了 WIND1 基因转录本在植物损伤部位累积,促进细胞脱分化,且发现在无外源生长素和细胞分裂素的条件下,过表达的 WIND1 就足以维持拟南芥体细胞脱分化状态,加速细胞分裂,直至形成具有细胞全能性的愈伤组织。体内研究表明, WIND1 是通过非典型应答调控子, (Arabidopsis response regulator, ARR) 依赖的信号通路,促进和维持细胞脱分化状态,进而促进拟南芥植株再生。由此可见,伤害处理对植株再生的影响,主要是通过上调早期与细胞脱分化相关基因表达,促进植物离体组织再生过程。

4 温度胁迫与植株再生

作为一种胁迫因子,温度与植物离体组织培养再生相关性研究也受到关注。Kamada 等^[59]通过研究温度对胡萝卜体细胞胚胎发生发现,在室温(25℃)培养前 37℃胁迫处理离体组织 2、3、4 周,胚性愈伤组织诱导率分别为 3%、17% 和 8%,其中 37℃胁迫处理 1 周不能有效诱导胚性愈伤组织发生。进行不同温度的前处理(包括 35℃处理 1~4 周,40℃及 42℃处理 2、4、6、8、10、15、20、30、40 及 72 h)后转到 37℃或 25℃进行诱

导培养,没有胚性愈伤组织形成,仍然存活下来的茎尖组织直接生长成幼苗。在芸薹属植物的组织培养中也发现,高温可诱导小孢子直接发育成胚,仅 32.5℃前处理 3 d 就能刺激花药胚胎的形成^[60]。Györgyey 等^[61]在苜蓿组织培养再生研究中分离到 2 个热激蛋白编码基因(heat shock protein, hsp): Mshspl8-1 和 Mshspl8-2。这 2 个基因室温下在苜蓿的根及叶组织中不表达,而在微愈伤组织悬液(microcallus suspension, MCS)中有微量表达,且受高温、CdCl₂及高渗胁迫诱导。在正常培养条件下,胚胎发生早期由 MCS 发育而来的体细胞胚中检测到这 2 个基因大量表达。在胚胎发育过程中, hsp 基因的差异表达揭示 HSPs 蛋白在离体培养植物细胞发育过程中具有特定的功能。Howarth^[62]在高粱种子正常发育过程中也检测到了 HSP72 及 HSP83 的表达。而在胡萝卜悬浮细胞的体细胞胚胎发生过程中却发现一个截然不同的热激蛋白效应^[63]。这些结果表明,不论是正常表达的 HSPs,还是在特定发育阶段在不同温度下 HSPs 差异的热激响应,都暗指其可能在植物正常发育过程中发挥重要作用,是植物胚性细胞分化过程中一个重要的功能组成^[64]。在离体培养的云杉属(*Picea abies* L.)植物体细胞胚胎发育过程中也发现了温度影响体细胞胚胎发生的现象^[65]。温度越低,植株芽成熟的时间越晚,这种分化差异与云杉属的纬度分布一致。上述现象表明,在云杉属植物胚发育过程中存在一个根据温度变化调控芽发生的机制,这种机制影响不同经度和纬度间同种植物的基因流。Asaka 等^[66]研究发现,适当提高处理温度能诱导高丽参(*Panax ginseng* L.)形成更多胚状体,相比未处理的培养物,胚性诱导率提高达 10 倍,经这种处理后再生出的高丽参与天然高丽参在人参皂苷 Rb1、Rg1 及其他皂苷成分上无异。然而,罂粟(*Papaver bracteatum* Lindl)组织培养研究表明,接种在 MS 培养基上辅以 1.0 mg/L NAA 和 0.5 mg/L BA 可诱导产生愈伤组织,但不进行器官发生。在 25℃条件下进行诱导,愈伤组织生长缓慢,而在 15℃条件下愈伤组织快速生长^[67],并在此温度下再生芽大量出现,揭示低温对罂粟愈伤组织生长有利,促进了罂粟离体组织培养再生。由此可见,温度对植物离体组织培养再生的影响具有发育阶段的特异性及处理强度的依赖性,适度的温度处理可诱导出更多的胚性愈伤组织,反之,则有可能引发胚死亡。

5 结论

目前关于提高植物组织培养和植株再生效率的策略往往侧重于基因型筛选、培养基改良和植物生长调节剂搭配等方面,忽略了环境胁迫条件对植物离体培养再生效果的影响。根据多年开展小麦幼胚培养、花药培养和成熟胚培养的结果发现,相同小麦基因型在不同年份取样,以及同一小麦基因型在不同生态地区取样,其组织培养再生效果差异显著,说明温度、光照等气候条件通过影响供体植株的生理状态或再生相关基因的表达影响了外植体的组织培养效果。同时,我们将 5 个小麦品种种植在相邻的水、旱两种条件下,

统一于开花授粉后 13~14 d 进行幼胚培养,同时测定幼胚中内源激素的含量,与来源于干旱条件下的幼胚相比,来源于干旱条件下幼胚样品中的 ABA 含量提高,生长素(IAA)含量降低,植株再生率显著提高(文章待发表)。认为干旱缺水影响幼胚中内源激素的平衡,进而调节了细胞分裂和体细胞胚胎发生相关基因的表达。另外,在培养基改进的基础上,对小麦成熟胚进行破碎处理,显著提高小麦成熟胚的再生效果,并适用于众多小麦基因型^[68]。认为破碎处理同样刺激再生相关基因的表达,促进胚性愈伤组织的形成和植株再生,环境和机械等伤害胁迫对小麦组织培养效果有至关重要的影响。本文主要从氧化、渗透、伤害及温度胁迫等几个方面,综述不同胁迫前处理对后续植物组织培养再生的影响,轻微或短时间的胁迫对植物再生均有促进作用,为改进植物组织培养再生率提供了一种新思路。但植物再生过程中受多种因素的综合作用,实际操作时尽量控制其他因素的负面影响或综合考虑多种因素的正向作用,对培养的植物材料进行合理地前胁迫处理,以期获得最佳的组织培养效果。

参考文献(References)

- [1] Karami O, Saidi A. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis[J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(5): 2493-2507.
- [2] Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review[J]. *Annals of Botany*, 2003, 91(2): 179-194.
- [3] Obert B, Benson E E, Millam S, et al. Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax *in vitro* cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162(5): 537-547.
- [4] 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.
- [5] Szechyńska-Hebda M, Skrzypek E, Dąbrowska G, et al. The role of oxidative stress induced by growth regulators in the regeneration process of wheat[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2007, 29(4): 327-337.
- [6] Gallie D R. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(2): 433-443.
- [7] Zavattieri M A, Frederico A M, Lima M, et al. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2010, 13(1): 12-13.
- [8] Tuteja N, Gill S, Tuteja R. Plant responses to abiotic stresses: Shedding light on salt, drought, cold, and heavy metal stress[J]. *Omics and Plant Stress Tolerance*, Benjam Science Publisher, USA, 2011: 39-64.
- [9] Ikeda-Iwai M, Umehara M, Satoh S, et al. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 2003, 34(1): 107-114.
- [10] Kikuchi A, Sanuki N, Higashi K, et al. Absciscic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells[J]. *Planta*, 2006, 223(4): 637-645.
- [11] Kiyosue T, Takano K, Kamada H, et al. Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1990, 68(10): 2301-2303.
- [12] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15(3): 473-497.
- [13] Santarem E R, Pelissier B, Finer J J. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1997, 33(1): 13-19.
- [14] Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R O N, et al. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35(2): 259-270.
- [15] Brotman Y, Landau U, Cuadros-Inostroza Á, et al. Trichoderma-plant root colonization: Escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(3): e1003221.
- [16] Rai M K, Shekhawat N S, Gupta A K, et al. The role of abscisic acid in plant tissue culture: A review of recent progress[J]. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 2011, 106(2): 179-190.
- [17] Abdel Latef A A. Changes of antioxidative enzymes in salinity tolerance among different wheat cultivars[J]. *Cereal Research Communications*, 2010, 38(1): 43-55.
- [18] Melchiorre M, Robert G, Trippi V, et al. Superoxide dismutase and glutathione reductase overexpression in wheat protoplast: Photooxidative stress tolerance and changes in cellular redox state[J]. *Plant Growth and Regulation*, 2009, 57(1): 57-68.
- [19] Selote D S, Khanna-Chopra R. Antioxidant response of wheat roots to drought acclimation[J]. *Protoplasma*, 2010, 245(1-4): 153-163.
- [20] Zhang S G, Han S Y, Yang W H, et al. Changes in H₂O₂ content and antioxidant enzyme gene expression during the somatic embryogenesis of *Larix leptolepis*[J]. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 2010, 100(1): 21-29.
- [21] Cutler A J, Saleem M, Wang H. Cereal protoplast recalcitrance[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1991, 27(3): 104-111.
- [22] Iiyama K, Lam T B T, Stone B A. Covalent cross-links in the cell wall [J]. *Plant Physiol*, 1994, 104(2): 315-320.
- [23] Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1997, 48(1): 251-275.
- [24] Belmonte M F, Stasolla C. Applications of DL-buthionine-[S, R]-sulfoximine deplete cellular glutathione and improves white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development[J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(4): 517-523.
- [25] Smagghe B J, Blervacq A S, Blassiau C, et al. Immunolocalization of non-symbiotic hemoglobins during somatic embryogenesis in chicory [J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2007, 2(1): 43-49.
- [26] Stasolla C, Belmonte M F, Tahir M, et al. Buthionine sulfoximine (BSO)-mediated improvement in cultured embryo quality *in vitro* entails changes in ascorbate metabolism, meristem development and embryo maturation[J]. *Planta*, 2008, 228(2): 255-272.
- [27] Legrand S, Hendriks T, Hilbert J L, et al. Characterization of expressed sequence tags obtained by SSH during somatic embryogenesis in *Cichorium intybus* L[J]. *BMC Plant Biology* 2007, 7(1): 27-38
- [28] Gupta S D, Datta S. Antioxidant enzyme activities during *in vitro* morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidant on plant regeneration[J]. *Biologia Plantarum*, 2003, 47(2): 179-183.
- [29] Libik M, Konieczny R, Pater B, et al. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant[J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 23(12): 834-841.
- [30] 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.
- [31] Rajeswari V, Paliwal K. Peroxidase and catalase changes during *in*

- in vitro* adventitious shoot organogenesis from hypocotyls of *Albizia odoratissima* L.f. (Benth) [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2008, 30 (6): 825-832.
- [32] 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 Science*, 2003, 165(4): 701-707.
- [33] Möller I M, Sweetlove L J. ROS signaling: Specificity is required[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(7): 370-374.
- [34] Huang W L, Lee C H, Chen Y R. Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress[J]. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 2012, 108(2): 257-263.
- [35] Jain R K, Jain S, Wu R. Stimulatory effect of water stress on plant regeneration in aromatic Indica rice varieties[J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15(6): 449-454.
- [36] Karami O, Deljou A, Esna-Ashari M, et al. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)[J]. *Scientia Horticulturae*, 2006, 110(4): 340-344.
- [37] Karami O, Deljou A, Kordestani G K. Secondary somatic embryogenesis of carnation (*Dianthus caryophyllus*) [J]. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 2008, 92(3): 273-280.
- [38] You X L, Yi J S, Choi Y E. Cellular change and callose accumulation in zygotic embryos of *Eleutherococcus senticosus* caused by plasmolyzing pretreatment result in high frequency of single-cell-derived somatic embryogenesis[J]. *Protoplasma*, 2006, 227(2-4): 105-112.
- [39] Lu C Y, Vasil V, Vasil I K. Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1983, 66(3-4): 285-289.
- [40] Wetherell D F. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells[J]. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 1984, 3(3): 221-227.
- [41] Marty I, Brugidou C, Chartier Y, et al. Growth-related gene expression in *Nicotiana tabacum* mesophyll protoplasts[J]. *The Plant Journal*, 1993, 4(2): 265-278.
- [42] Hammatt N, Davey M R. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Cultured Zygotic Embryos of Soybean[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1987, 128(3): 219-226.
- [43] Rancé I, Tian W, Mathews H, et al. Partial desiccation of mature embryo-derived calli, a simple treatment that dramatically enhances the regeneration ability of Indica rice[J]. *Plant Cell Reports*, 1994, 13 (11): 647-651.
- [44] Tsukahara M, Hirokawa T. Simple dehydration treatment promotes plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus[J]. *Plant Cell Reports*, 1992, 11(11): 550-553.
- [45] Brown C, Brooks F J, Pearson D, et al. Control of embryogenesis and organogenesis in immature wheat embryo callus using increased medium osmolarity and abscisic acid[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1989, 133(6): 727-733.
- [46] Kavi Kishor P B, Reddy G M. Retention and revival of regenerating ability by osmotic adjustment in long-term cultures of four varieties of rice[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1986, 126(1): 49-54.
- [47] Ryschka S, Ryschka U, Schulze J. Anatomical studies on the development of somatic embryoids in wheat and barley explants[J]. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 1991, 187(1): 31-41.
- [48] Kumria R, Sunnichen V G, Das D K, et al. High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress[J]. *Plant Cell Reports*, 2003, 21(7): 635-639.
- [49] Grosset J, Marty I, Chartier Y, et al. mRNAs newly synthesized by tobacco mesophyll protoplasts are wound-inducible[J]. *Plant Molecular Biology*, 1990, 15(3): 485-496.
- [50] Bommineni V R, Jauhar P P. Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat[J]. *Plant Science*, 1996, 116(2): 197-203.
- [51] Fellers J P, Guenzi A C, Taliaferro C M. Factors affecting the establishment and maintenance of embryogenic callus and suspension cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Plant Cell Reports*, 1995, 15(3/4): 232-237.
- [52] Rodriguez-Sotres R, Black M. Osmotic potential and abscisic acid regulate triacylglycerol synthesis in developing wheat embryos[J]. *Planta*, 1993, 192(1): 9-15.
- [53] Cheong Y H, Chang H S, Gupta R, et al. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129 (2): 661-677.
- [54] Nadolska-Orczyk A, Orczyk W. New aspects of soybean somatic embryogenesis[J]. *Euphytica*, 1994, 80(1/2): 137-143.
- [55] Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants[J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1984, 35(1): 155-189.
- [56] Jamet E, Durr A, Parmentier Y, et al. Is ubiquitin involved in the dedifferentiation of higher plant cells?[J]. *Cell Differentiation and Development*, 1990, 29(1): 37-46.
- [57] Criqui M C, Jamet E, Parmentier Y, et al. Isolation and characterization of a plant cDNA showing homologies to animal glutathione peroxidases [J]. *Plant Molecular Biology*, 1992, 18(3): 623-627.
- [58] Iwase A, Mitsuda N, Koyama T, et al. The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*[J]. *Current Biology*, 2011, 21(6): 508-514.
- [59] Kamada H, Tachikawa Y, Saitou T, et al. Heat stress induction of carrot somatic embryogenesis[J]. *Plant Tissue Culture Letters*, 1994, 11 (3): 229-232.
- [60] Pechan P M, Keller W A. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*[J]. *Physiologia Plantarum*, 1988, 74(2): 377-384.
- [61] Györgyey J, Gartner A, Németh K, et al. Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis[J]. *Plant Molecular Biology*, 1991, 16(6): 999-1007.
- [62] Howarth C. Heat shock proteins in *Sorghum bicolor* and *Pennisetum americanum* II. Stored RNA in sorghum seed and its relationship to HSP synthesis during germination[J]. *Plant, Cell & Environment*, 1990, 13(1): 57-64.
- [63] Zimmermann J L, Apuya N, Darwish K, et al. Novel regulation of heat shock genes during carrot somatic embryo development[J]. *The Plant Cell*, 1989, 1(12): 1137-1146.
- [64] Ellis R J. Molecular chaperones: The plant connection[J]. *Science*, 1990, 250(4983): 954-959.
- [65] Kvaalen H, Johnsen Ø. Timing of bud set in *Picea abies* is regulated by a memory of temperature during zygotic and somatic embryogenesis [J]. *New Phytologist*, 2008, 177(1): 49-59.
- [66] Asaka I, Li I, Yoshikawa T, et al. Embryoid formation by high temperature treatment from multiple shoots of *Panax ginseng*[J]. *Planta Medica*, 1993, 59(4): 345-346.
- [67] Ilahi I, Ghauri E G. Regeneration in cultures of *Papaver bracteatum* as influenced by growth hormones and temperature[J]. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 1994, 38(1): 81-83.
- [68] Yin G X, Wang Y L, She M Y, et al. Establishment of a highly efficient regeneration system for the mature embryo culture of wheat[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2011, 10(1): 9-17.

(责任编辑 吴晓丽)