

## 专论与综述 Reviews

## 影响禾谷类作物胚性细胞悬浮系建立的一些因素

芦笛, 杨清, 陆巍\*

南京农业大学生命科学学院, 南京 210095

## Several Influencing Factors on Establishment of Embryogenic Suspension Cell Lines of Cereal Crops

LU Di, YANG Qing, LU Wei\*

College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

摘要: 介绍了禾谷类作物通过愈伤组织继代培养建立胚性细胞悬浮系及其影响因素的研究进展, 并对这一问题的研究前景作了展望。

关键词: 悬浮细胞系; 愈伤组织; 诱导; 培养条件

以植物悬浮细胞直接进行原生质体分离、培养与杂交和基因转移具有愈伤组织或其他外植体无可比拟的优越性(路铁刚和叶和春 1995)。在次生代谢产物等生产中, 悬浮细胞培养正得到越来越多的应用。已有报道, 用转基因水稻悬浮细胞系可表达出具有生物活性的人  $\gamma$ -干扰素(Chen 等 2004)。

Vasil和Vasil (1980)用珍珠粟幼胚建立了胚性悬浮细胞系, 并通过胚胎发育途径再生出首例禾谷类植物原生质体植株。目前, 禾谷类作物包括水稻、小麦、玉米、高粱、燕麦、黑麦等, 均已建立了各自的悬浮细胞系。与其他植物相比, 禾谷类作物建立悬浮细胞系比较困难。以同种作物的不同基因型所建立的悬浮细胞系, 其愈伤组织的质量和生长量差异很大, 悬浮细胞再生能力不高, 且对培养基和生长调节剂的需求不同。直接将愈伤组织用于植株再生的再生率很低; 若用悬浮细胞进行植株再生, 不仅再生率高, 而且植株质量好(张宏等 1996)。

胚性愈伤组织最适宜于建立禾谷类作物悬浮细胞和原生质体培养体系。禾本科(包括禾谷类)愈伤组织内的胚性细胞为近等径圆形, 胞质浓密(向太和等 1993)。胚性悬浮细胞不仅是禾谷类作物原生质体的主要来源, 也是体细胞胚大量同步发生的良好材料, 而且可以采用部分酶解的悬浮细胞作为外源基因导入的直接受体。在植物中采

用细胞大规模培养技术可以在可控的和可重复的条件下生产天然产物, 并且产物分离和提取操作相对简单。作为育种途径之一的悬浮细胞体系, 也越来越受到国内外育种专家的重视(Liu 等 1999; Kisaka 等 1997; Jelodar 等 1999; Dalton 等 1999; Guo 等 2000)。

## 1 胚性愈伤组织的诱导与保持

胚性愈伤组织诱导受多种因素影响。其中生长调节物质、外植体来源及其发育时期是最为关键性的因素。

1.1 可诱导的外植体种类 在用于诱导胚性愈伤组织的各种外植体中, 应用最为广泛的是幼胚, 包括水稻、小麦、玉米、高粱、燕麦、黑麦等各种禾谷类作物; 幼穗也是高粱、小麦和大麦的适宜外植体来源。在水稻的愈伤组织诱导中, 也有用幼穗作为外植体的(褚启人等 1995)。在小麦、高粱和黑麦中, 以幼叶为外植体也成功地诱导产生了胚性愈伤组织。此外, 也有以幼根、茎尖和花药为外植体的(程肖蕊等 1997; Toriyama 和 Hinata 1985; 赵海岩等 2005)。但由于受季节限制材料不易获得, 所以往往用成熟种子诱导愈伤组织(白志良等 1995; 李根英等 2006; 王良群等

收稿 2006-12-29 修定 2007-04-16

资助 南京农业大学 SRT 项目(0506A08)。

\* 通讯作者(E-mail: luw@njau.edu.cn; Tel: 025-84395423)。

2004; 崔林和范银燕 1995)。在胚性愈伤组织的诱导中, 不同外植体或同一外植体的不同部位的诱导效率不同。谭光轩和吴诗光(1999)指出, 野生稻不同外植体离体培养时, 幼穗愈伤组织诱导率差异在 8.7%~94.7% 之间; 成熟种胚愈伤组织诱导率普遍高于幼穗, 但很少能再生绿苗。王昌涛等(2005)根据玉米不同外植体愈伤组织的诱导及植株再生研究的结果认为, 仅能从幼胚和茎尖诱导出的胚性愈伤组织, 转入分化培养基后可以获得再生植株; 而成熟胚和下胚轴则不能获得再生植株。

**1.2 基因型的差异** 基因型的差异是决定建立良好悬浮细胞系的关键因素之一。在小麦幼胚离体培养过程中, 基因型对愈伤组织的诱导和幼胚愈伤组织的再生均有影响(何花榕和杨惠杰 1994; 梁静静等 2003)。袁立勇等(2003)在建立水稻悬浮细胞系的研究中指出, 在同一培养基上, 30 个水稻基因型中有 11 个能诱导出质量较好的愈伤组织, 出愈率较高。不适合悬浮培养的基因型在连续继代培养过程中, 细胞团大而致密, 呈黄褐色, 细胞团块不分散, 生长速度慢, 有严重的褐变现象。一般认为褐化过程是不可逆的, 但在种胚诱导过程中, 采用一些抗氧化剂对种胚进行预处理可以降低愈伤组织的褐化率。不同抗氧化剂和不同基因型的防褐效应不同(韦鹏霄等 2005)。迄今已查明, 不是所有基因型的作物都能够建立高效的胚性悬浮细胞系。这可能是由于不同基因型外植体细胞激素代谢的不同而产生的。

**1.3 培养基的选择和氮源等有机物的作用** 目前用于禾本科植物悬浮培养的有 MS、N<sub>6</sub>、AA、LS、KM、B<sub>5</sub> 和 White 等培养基。其中较常用的为前 3 种。N<sub>6</sub> 和 MS 是高盐培养基, 各种无机盐含量都很高, 适合水稻细胞生长, 而 LS 和 White 培养基是低盐培养基, 各种无机盐含量都很低, 不适合水稻细胞生长(贝丽霞 1998a)。N<sub>6</sub> 培养基应用于水稻和小麦的花药培养, 可显著提高其培养成功率(朱至清等 1975)。培养基中的渗透压对愈伤组织的诱导和植株再生有影响。高渗透压培养基可改变分化前的细胞团状态, 如结构疏松、生长快、难以分化的愈伤组织可形成结构致密、生长缓慢易分化的愈伤组织(李良材等 1988)。但也有报道

低无机盐有利于愈伤组织的生长。例如, 马莲菊等(2003)在影响玉米细胞悬浮系建立和单细胞培养因素的研究中, 通过比较 1/2B<sub>5</sub> 和 B<sub>5</sub> 培养基的培养效果分析大量元素对玉米悬浮细胞生长的影响时, 观察到大量元素减半明显提高圆形细胞率和活细胞率。采用以氨基酸为唯一氮源的 AA 培养基, 可以降低水稻悬浮细胞变褐的程度(邢登辉等 1994)。缺点是 AA 培养基中几种氨基酸组分不宜高压灭菌, 而要用过滤灭菌, 方法繁杂, 且易污染(王俊丽等 1999)。虽然 AA 培养基对水稻悬浮细胞的分散和保持有良好作用, 但增殖速度较慢(袁立勇等 2003)。不同的培养基对同种作物的愈伤组织诱导率、愈伤组织的质量、悬浮细胞的生长速率和绿苗分化率有不同效果(郝云凤等 1998; 林毅等 2003; 张慧英等 2004)。

培养基中的不同种类和不同浓度的氮源显著影响愈伤组织的诱导和生长。成雄鹰等(1987)研究天冬氨酸族氨基酸及其组合、赖氨酸类似物 S- 氨基乙基半胱氨酸以及羟脯氨酸对水稻愈伤组织生长的影响的结果表明, 添加上述氨基酸及其组合对愈伤组织生长有抑制作用。赖氨酸 + 苏氨酸的协同抑制可为甲硫氨酸部分解除。0.25 mmol·L<sup>-1</sup> 的 S- 氨基乙基半胱氨酸即具强烈抑制作用。这种抑制作用可部分地为赖氨酸解除。羟脯氨酸也抑制愈伤组织生长, 其抑制作用可为脯氨酸完全解除。同时添加适当浓度的羟脯氨酸和脯氨酸可大大提高愈伤组织的生长速度。

培养基中添加丰富的氮源一般有利于胚状体发生和植株再生。此外, 其他有机物质如: 硫酸素、肌醇、维生素 C 和亚精胺等也可提高愈伤组织的诱导率。肌醇是水溶性 B 族维生素中的一种。肌醇在植物组织培养中作为营养附加物, 参与碳水化合物代谢、磷脂代谢及离子平衡作用, 对组织快速生长有促进作用。尹庆良和刘世强(1994)也报道, 肌醇对水稻悬浮培养有作用, 液体培养基中附加肌醇可大大提高愈伤组织的分化程度, 因此从中分离出的单细胞经初步培养可再生出愈伤组织。

**1.4 植物激素和人工合成的生长调节物质的作用** 关于激素在植物愈伤组织诱导和生长过程中的机制尚需深入研究。但可以肯定的是, 植物激素(IAA、

ZT、ABA)和人工合成的生长调节物质(2,4-D、NAA、KT)的调节对愈伤组织的诱导以及生长很重要。

2,4-D是诱导禾谷类作物愈伤组织中唯一不可缺少的生长调节物质(王睿辉等 2001),其作用的适宜浓度范围为  $0.5\sim 5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,但也有例外。不同品种和不同外植体需要不同浓度的 2,4-D (Bregitzer 等 1998)。其他激素或生长调节物质如: IAA、NAA、KT、ZT 和 ABA 也已成功地应用于玉米、水稻和黑麦胚性愈伤组织的诱导。

不同种类激素对水稻细胞生长的影响差异很大,而生长素类(2,4-D、NAA、IAA)对细胞生长的促进作用大于细胞分裂素类(贝丽霞 1998b)。在一定范围内,随着培养基中 2,4-D 浓度的增加,愈伤组织的诱导率有不同程度的增加(邹高治等 1986;向太和 1991;向太和等 1996)。2,4-D 浓度过低,则愈伤组织常常容易产生褐化;而过高的 2,4-D 会对愈伤组织产生毒害作用。悬浮细胞在一定范围内对培养环境有着适应性和依赖性。夏启中等(2005)也报道,突然去掉培养基中的生长素可引发诱导棉花悬浮细胞系的程序性死亡。

适当浓度的ABA对细胞内含物的充实起一定的作用(王凌健等 1995)。ABA 有助于非胚性愈伤组织转化为胚性愈伤组织以及愈伤组织的生长(张静兰等 1992;张栋和陈季楚 1995)。在小麦幼胚愈伤组织的诱导与分化过程中,不同浓度 ABA 处理的小麦愈伤组织诱导率和分化率有较大差异。在试验的浓度范围内( $0\sim 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),随着培养基中 ABA 浓度的提高,愈伤组织诱导率和分化率均随之增加,当浓度达到  $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  之后,诱导率和分化率又随 ABA 浓度的提高而下降(陈军营等 2006)。

KT 和 6-BA 均可促使水稻达到一定的再生率。在愈伤组织再生过程中 6-BA 的效果优于 KT,而二者对悬浮细胞的作用无明显差异(王俊丽等 1999)。在粳稻愈伤组织的分化过程中,细胞分裂素 ZT 的效果好于 6-BA (陈兴春等 2006)。Carimi 等(2003)报道,提高培养基中的细胞分裂素浓度会诱导拟南芥悬浮细胞的程序性死亡。

培养基中添加多种适量的激素对愈伤组织诱导以及植株再生的效果比仅添加 2,4-D 的好。但

2,4-D 浓度下降而其他激素浓度升高时,愈伤组织诱导率虽显著下降,但愈伤组织的质量有所改善,绿苗分化率成倍提高(李欣等 2001)。

**1.5 矿质元素的作用** 在培养基中添加  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$  和  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  等氮素营养,有利于形成生长迅速、松脆型的愈伤组织。此外在培养基中加入一定浓度的 NaCl 可筛选出生活力强和分裂旺盛的愈伤组织(张亚兰等 1998;韩福光等 1997;王仑山等 1993)。

朱至清等(1975)在通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基中观察到,以  $\text{KNO}_3$  作唯一氮源的培养基上的花粉愈伤组织诱导频率高于以  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  作唯一氮源的培养基。 $\text{KNO}_3$  和  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  结合使用时的效果最好,培养基上花药愈伤组织的鲜重也明显超过前 2 种培养基。特别值得注意的是以硫酸铵作唯一氮源时,愈伤组织生长极其缓慢。花粉愈伤组织的良好发育既需要硝态氮也需要铵态氮,但高浓度的铵盐又会抑制愈伤组织的形成和生长。董云洲(1998)在‘丰抗 8 号’小麦悬浮细胞系的建立及遗传转化的初步研究中,将 MS 培养基中  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  和  $\text{KNO}_3$  的浓度均调到  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,这样,氮素营养和盐离子浓度提高后,有很好的筛选作用,可快速获得适合悬浮培养的细胞。

$\text{Cu}^{2+}$  浓度对愈伤组织的诱导无明显影响,但对胚性愈伤组织的形成有明显的促进作用(李会勇 2003)。 $\text{Cu}^{2+}$  对小麦幼胚愈伤组织的再分化作用也很明显。 $\text{Cu}^{2+}$  对幼胚愈伤组织的再分化表现为低浓度促进和高浓度抑制的作用(陈耀锋等 2004;余舜武等 2001)。有研究表明,在培养基中添加各常用微量元素(B、Mo、Mn、Co、Zn、Cu),只有铜元素有明显的促进水稻愈伤组织植株再生的作用。铜元素对愈伤组织的增殖量影响极小,它不仅能提高再生植株的频率和数量,还能提高再生植株的重量,其作用浓度范围相当宽广(杜建芳等 2004;袁玲 2003;杨跃生等 1999)。

乙烯抑制剂  $\text{AgNO}_3$  对许多单子叶和双子叶植物形态发生有促进作用,至于  $\text{Ag}^+$  的作用机制尚需进一步研究。培养基中  $\text{Ag}^+$  的存在可能是通过促进多胺的合成而提高体细胞胚和芽发生的频率(杜建芳等 2001;廖祥儒等 2000)。在一定浓度范围内, $\text{AgNO}_3$  能提高愈伤组织的诱导率与分化率

(袁玲 2003)。但如果  $\text{AgNO}_3$  浓度过高, 则又会产生毒害作用。

陈军营等(2006)在研究 ABA 和  $\text{AgNO}_3$  对小麦幼胚愈伤组织诱导和分化影响的结果表明: 诱导培养基中添加  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA 的基础上, 添加  $2.5\sim 10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{AgNO}_3$  可显著提高小麦幼胚愈伤诱导率和分化率, 其中以  $\text{AgNO}_3$  浓度为  $2.5$  和  $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时效果较好。但  $\text{AgNO}_3$  浓度达到  $15.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 胚性愈伤诱导率和绿点率下降, 且愈伤组织有变褐死亡的趋势, 这说明高浓度的  $\text{Ag}^+$  对愈伤组织的诱导和分化有毒害作用。

**1.6 愈伤组织在固体培养基上的继代周期** 多长的继代周期最适宜愈伤组织的生长, 取决于愈伤组织的生长状况。不同植物的继代周期差别很大。禾本科植物适宜的继代周期为  $20\sim 40 \text{ d}$ 。水稻愈伤组织生长速度较快, 通常在  $20\sim 30 \text{ d}$  需继代转移; 玉米愈伤组织生长速度相对缓慢, 其适宜的继代周期是  $30\sim 40 \text{ d}$  (向太和等 1996)。时间过久, 愈伤组织容易分化或褐化, 其诱导率和分化率均会降低。一般条件下, 缩短继代周期或继代时尽量将愈伤组织摊平, 则有利于松脆型愈伤组织的形成。

固体继代次数是一个关键的因素, 随着继代次数的增加, 愈伤组织转入液体培养后形成的悬浮系, 其质量会越来越高。固体继代 7 次后形成的悬浮系其鲜重增长率、分散程度和圆细胞率都明显好于固体继代 2 次后形成的悬浮系(尹庆良和刘世强 1994)。

## 2 胚性悬浮细胞系的建立

固体培养基上的胚性愈伤组织转入液体培养基中进行震荡培养。经过继代培养建立胚性悬浮细胞系。

**2.1 悬浮细胞培养过程中培养基设计、转速、光照、温度、pH 等因素的影响** 不同植物需要不同的最适培养条件。为促进愈伤组织细胞和原生质体的生长、调节愈伤细胞分化和增加有用次生代谢物质的产量, 通常需要在基本培养基和其他条件适宜的基础上, 采用一定的方法, 找出各种组分最合适的用量和比例(王火焰等 2001; 王新国等 2005; 任江萍等 2005)。同时, 还需考虑除了培养基以外的多种因素, 包括光照、培养温度

和摇床的振荡速度等。附加入培养基中的激素、糖类、氨基酸等物质的最适浓度, 常用正交试验法确定(张君等 2003; 严健汉等 1978; 张恒 2006; 王爱国等 2006; 陈成斌和李道远 1993)。

徐林林等(2006)以水稻品种‘中花 11’种子为材料, 建立了胚性悬浮细胞系, 并寻找培养基中氮源、肌醇和 2,4-D 的最佳浓度, 当 AA 培养基中氮源浓度为 150%, 同时附加  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D 和  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  肌醇时的悬浮细胞系生物产量最高。

植物细胞含有大的液泡且细胞壁僵硬, 对剪切力十分敏感。适当的剪切力可改善通气, 从而可保证植物细胞有良好的混合状态和分散性, 甚至还可以提高细胞密度和增加代谢产物产量。但过高的剪切力会导致细胞的机械损伤, 细胞体积变小, 细胞形态和聚集状态改变, 或影响细胞代谢, 降低产率或引起细胞自溶, 胞内化合物释放; 甚至还可导致细胞的活性丧失(王素芳等 2002)。一般情况下, 摇床震荡速率以控制在  $90\sim 120 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  范围内为宜(黄纯农等 1995; 向太和等 1997; 马莲菊等 2002)。

通常, 愈伤组织诱导在黑暗条件下进行(贾永炯等 1994; 刘选明等 1994; 夏光敏等 1995; 崔林和范银燕 1997)。有研究表明, 25℃ 下暗培养与光-暗交替培养对大麦花粉愈伤组织诱导率的影响差异不大(朱睦元等 1990)。

小麦花药或种胚经过低温预处理的愈伤组织诱导效果明显比低温处理或不处理的好。但低温预处理时间不宜长, 以尽量不超过  $4 \text{ d}$  为宜。单独进行低温预处理和高温处理的效果均比不作处理的好。低温预处理和高温处理配合作用不一定能获得更好的效果, 仅是比较接近两者各自分别处理中的较高值(刘建平 1991; 刘萍等 1996; 陈军营等 2005)。梁辉和欧阳俊闻(1997)将经过 33℃ 和 36℃ 高温培养不同时间后的小麦转到 28℃ 培养 24 h 后, 绿苗分化率可较大幅度地提高, 而愈伤组织诱导率则有明显下降的趋势。小麦花药培养对培养温度的反应很敏感。温度相差  $2\sim 3$ ℃ 即可导致花粉愈伤组织和绿苗的诱导率呈现大幅度的变化, 特别是在低于 26℃ 时更是如此。绝大多数作物的花药适宜培养温度为  $28\sim 30$ ℃ 的范围(欧阳俊闻等 1984; 隋新霞等 2005)。水稻和小麦

等作物的愈伤组织诱导和培养温度一般为25~28 (向太和等 1995; 邢登辉等 1995; 林毅等 2003)。

有报道指出, 水稻悬浮细胞系培养基中的铵盐浓度在 20~50 mmol·L<sup>-1</sup> 时, 随着培养时间的增加, pH 由初始的 5.8 开始下降, 细胞生长明显受到抑制。培养液中加入适量 MES (2- 吗啉乙磺酸) 缓冲液(pH 为 6.1)后, 铵盐对悬浮细胞的抑制作用得到了减轻, 悬浮细胞的鲜重和干重都比不加 MES 缓冲液时高。培养液 pH 低于 5 时, 悬浮细胞的鲜重和干重增长率都呈现不同程度的下降 (Chen 和 Kao 1997)。

**2.2 愈伤组织在液体培养基中的继代周期** 在摇床上震荡培养的液体培养基中的愈伤组织, 通常 3~7 d 换液继代一次(刘选明等 1994; 夏光敏等 1995; 崔林和范银燕 1997)。继代周期过短不容易得到足够的悬浮细胞; 而继代周期过长, 愈伤组织又容易发生不同程度的褐化, 且悬浮细胞的死亡率也逐渐上升。徐林林等(2006)在水稻品种‘中花 11’的悬浮细胞系继代培养过程中, 以细胞密实体积、干重增长率和悬浮细胞存活率为指标, 分析得出较好的继代周期为 4 d。

通常刚刚转移到液体培养基中的愈伤组织形成的悬浮细胞系还不够稳定, 需要一个适应的过程。因此, 要得到稳定的胚性悬浮细胞系, 必需进行多次继代。

**2.3 细胞培养的起始浓度** 起始培养的细胞浓度也是影响细胞生长的关键因素之一。有报道指出, 水稻成熟胚愈伤组织生长速率与初始培养愈伤组织的数量呈负相关, 即初始培养的愈伤组织越少其愈伤组织增长率越高(吕孟雨等 2005)。但接种量过少则不利于愈伤组织生长。这可能是由于在高密度细胞群和培养基营养丰富情况下, 愈伤组织细胞中内源激素浓度较高, 细胞易于分裂和生长; 但如果愈伤组织总接种量过少, 愈伤组织细胞中内源激素浓度不足, 从而导致细胞分裂和生长缓慢(方文娟等 2005)。

### 3 结束语

综上所述, 可以看出:(1)随着继代培养时间的延长, 胚性愈伤组织和胚性悬浮细胞的再生能力会逐渐丧失。这是目前禾谷类作物悬浮细胞培养中的主要问题之一(邢登辉等 1994)。在小麦花

药培养中, 花粉植株的白化现象极为普遍, 白苗率一般约为 40%, 高的达 80%~90%, 甚至全部为白苗(李景琦等 2002)。但是 Brisibe 等(1997)用小麦花药建立的悬浮细胞系中胚性悬浮细胞占 70%; 用此种悬浮细胞进行植株再生, 有 90%~100% 的悬浮细胞可以再生为绿色植株。报道中有些说白苗率较高, 而有些不以为然。说明此问题尚不能下结论。(2)在禾谷类作物悬浮细胞培养过程中, 有时会出现质体基因组缺失现象。例如 Cahoon 等(2003)报道, 在墨西哥黑色甜玉米悬浮细胞中, 质体 DNA 发生缺失; 有的悬浮细胞系中的质体 DNA 缺失达到质体基因组的 70%。这可能与悬浮细胞再生为植株时出现白苗有关。(3)长期继代培养物胚性潜力难以充分发挥这一问题, 似乎还没有十分有效的解决办法。频繁继代并在继代时挑选可再生的愈伤组织进行培养似乎有助于胚性的保持。

培养条件和禾谷类作物自身遗传因素是建立禾谷类作物胚性细胞悬浮系的 2 个重要方面。那些即使在相对最理想的培养条件下建立起来的悬浮细胞系, 并不表现得高效。可能除了培养条件之外, 作物自身的遗传因素也很关键。目前, 禾谷类作物胚性细胞悬浮系几乎是通过探索其悬浮细胞的最佳培养条件的方式建立, 而针对悬浮细胞的胚性所做的分子水平上的研究甚少。悬浮细胞的胚性可能受到细胞内基因的调控作用。如果可以找出调控悬浮细胞胚性的相关基因, 那么通过基因工程将其加以适当改造, 就能迅速、高效地建立起禾谷类作物胚性细胞悬浮系。

在建立禾谷类作物悬浮细胞系的过程中, 培养液的渗透压也是一个值得考虑的方面, 尽管由于细胞壁和液泡的存在, 植物细胞对渗透压没有动物细胞敏感。有些悬浮细胞系中的愈伤组织致密、质硬, 长期震荡也不易分散, 从而产生的悬浮细胞密度也很低, 其部分原因可能与培养液渗透压较高有关。在较高渗透压培养液中, 愈伤组织细胞体积小, 聚集成致密的细胞团, 对剪切力的敏感性下降, 不易产生足够的悬浮细胞。渗透压也参与悬浮细胞内的基因表达调控(Hollung 等 1997), 但其调控机制还不清楚。

作为研究禾谷类作物细胞生物化学和分子生

物学的理想材料(Nandadeva等1999; Takase等2003), 胚性悬浮细胞内的基因和植物激素或人工合成的生长调节物质之间的相互作用还了解甚少。例如, Bostock等(1999)报道, 在 $N_6$ 液体培养基中加入 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA可以强烈诱导水稻悬浮细胞 *Em* 基因的表达。Hollung等(1997)的研究表明, 在大麦胚性悬浮细胞中, ABA参与诱导和调控 *Lea* 基因的表达。这虽然说明ABA参与了悬浮细胞的基因表达调控, 但ABA参与基因表达调控的具体方式仍不清楚, 尚需进一步探讨。

### 参考文献

- 白志良, 王良群, 郑丽萍, 李爱军, 王丰林(1995). 高粱不同外植体离体培养. 华北农学报, 10 (1): 60~63
- 贝丽霞(1998a). 不同培养基对水稻悬浮细胞生长速率的影响. 黑龙江农业科学, (2): 21~22
- 贝丽霞(1998b). 激素对水稻悬浮细胞生长速率的影响. 中国农学通报, (2): 24~25
- 陈成斌, 李道远(1993). 普通野生稻花药培养基研究. 西南农业学报, 6 (4): 16~20
- 陈军营, 文付喜, 何盛莲, 陈新建, 许海霞, 程西永(2006). ABA和 $\text{AgNO}_3$ 对小麦幼胚愈伤组织诱导和分化的影响. 麦类作物学报, 26 (2): 46~48
- 陈军营, 尹海燕, 梁静静, 许海霞, 程西永, 詹克慧, 陈新建, 崔党群, 吕德彬(2005). 不同预处理对小麦成熟胚愈伤组织形成的影响. 河南农业科学, (1): 19~21
- 陈兴春, 牛蓓, 王克秀, 廖毅, 崔维科, 陈放(2006). 水稻愈伤组织分化与不同激素配比关系的研究. 四川大学学报, 43 (1): 222~227
- 陈耀锋, 王丽敏, 丁云姣, 李春莲, 郭月霞, 韩德俊, 任慧莉, 郭东伟, 奚亚军(2004).  $\text{Cu}^{2+}$ 对小麦幼胚脱分化和高频再生特性的影响. 西北农林科技大学学报, (10): 1~4
- 成雄鹰, 梁竹青, 高明尉(1987). 氨基酸及其类似物对水稻愈伤组织生长的影响. 浙江农业大学学报, 13 (4): 355~360
- 程肖蕊, 张亚兰, 杨松涛, 李彦航(1997). 野大麦幼根和幼叶悬浮细胞系的原生质体培养. 吉林农业科学, (2): 22~26
- 褚启人, 曹华新, 王亦菲, 邓晓梅, 王新华(1995). 水稻重要商业栽培种的原生质体高频率再生. 上海农业学报, (2): 6~11
- 崔林, 范银燕(1995). 裸燕麦不同外植体愈伤组织诱导及再生植株变异研究. 内蒙古农业科学, (6): 9~12
- 崔林, 范银燕(1997). 裸燕麦悬浮细胞系的建立及植株再生. 生物工程学报, (1): 107~111
- 董云洲(1998). 丰抗8号小麦悬浮细胞系的建立及遗传转化的初步研究. 应用基础与工程科学学报, 6 (2): 140~143
- 杜建芳, 廖祥儒, 侯小康, 王俊丽, 陈丕铃, 周艳芬, 芦春斌, 王建平(2001).  $\text{AgNO}_3$ 和低温处理对小麦细胞GST及GR酶活性的影响. 河北大学学报, 21 (4): 402~405
- 杜建芳, 廖祥儒, 陈彤, 王春红, 谢德娟(2004). Trp和 $\text{Cu}^{2+}$ 对水稻细胞再生及一些酶活性的影响. 河北农业大学学报, 27 (4): 22~25
- 方文娟, 韩烈保, 曾会明(2005). 植物细胞悬浮培养影响因子研究. 生物技术通报, (5): 11~15
- 韩福光, 赵海岩, 林凤, 杨立国(1997). 高粱幼叶离体培养的衍生系的耐盐筛选与性状分析. 作物学报, 23 (4): 491~495
- 郝云凤, 史有国, 韩金梅, 樊俊峰, 李彦标, 刘晓东(1998). 不同培养基对春小麦花药培养愈组率及绿苗率的影响. 内蒙古农业科技, 增刊: 40~43
- 何花榕, 杨惠杰(1994). 小麦幼胚离体培养研究概况. 福建稻麦科技, (3): 46~49
- 黄纯农, 王军晖, 颜秋生, 张雪琴, 严庆丰(1995). 大麦胚性悬浮细胞系的快速建立及其超低温保存. 中国农业科学, (3): 21~27
- 贾永炯, 陈放, 李瑛, 何小莉(1994). 从水稻悬浮细胞获得原生质体再生植株. 四川大学学报, (3): 382~385
- 李根英, 黄承言, 隋新霞, 何中虎, 孙其信, 夏先春(2006). 小麦不同外植体的组织培养效果研究. 麦类作物学报, 26 (1): 21~25
- 李会勇(2003).  $\text{Cu}^{2+}$ 浓度对啤酒大麦幼胚组织培养与植株再生的影响. 麦类作物学报, 23 (2): 27~29
- 李景琦, 王成社, 邹淑芳(2002). 小麦花药培养中白苗的发生和调控措施. 西安联合大学学报, 5 (2): 19~21
- 李良材, 陈一明, 陈英(1988). 水稻原生质体培养及植株再生的研究. 遗传学报, (5): 321~328
- 李欣, 于恒秀, 杨成根, 程祝宽, 顾铭洪(2001). 生根粉及植物激素在粳稻杂交花药培养中的应用研究. 江苏农业研究, 22 (2): 1~6
- 梁辉, 欧阳俊闻(1997). 小麦花药培养初期高温处理对培养反应的影响. 科学通报, 42 (13): 1436~1439
- 梁静静, 吕德彬, 陈军营, 陈新建(2003). 不同基因型对小麦成熟胚愈伤组织诱导及植株再生的影响. 河南农业大学学报, 37 (2): 107~114
- 廖祥儒, 张会图, 杜建芳, 宋陆铎, 王俊丽, 陈丕铃, 朱宝成(2000). 甘露醇和 $\text{AgNO}_3$ 对小麦细胞再分化的影响. 河北大学学报, 20 (3): 263~265
- 林毅, 高俊山, 李艳(2003). 不同培养基对小麦幼胚再生能力的影响. 安徽农业大学学报, (1): 6~9
- 刘建平, 李春红, 胡道芬(1991). 培养温度对冬小麦花药培养的影响. 农业新技术, (4): 6~10
- 刘萍, 宋晓华, 马惠萍, 马琨(1996). 温度处理对春小麦花药愈伤组织诱导率影响初报. 宁夏农学院学报, 17 (1): 52~56
- 刘选明, 周朴华, 余平(1994). 杂交水稻体细胞胚诱导与同步化的研究. 作物学报, (4): 465~471
- 路铁刚, 叶和春(1995). 细胞悬浮培养. 见: 孙敬三, 桂耀林主编. 植物细胞工程实验技术. 北京: 科学出版社, 36~48
- 吕孟雨, 赵和, 王海波(2005). 水稻愈伤组织生长速率研究. 中国农学通报, 21 (12): 53~55
- 马莲菊, 高峰, 于翠梅, 刘世强(2002). 玉米细胞悬浮系的建立与单细胞培养效果. 沈阳农业大学学报, (6): 449~451
- 马莲菊, 高峰, 王艳, 刘世强(2003). 玉米细胞悬浮系建立和单细胞培养影响因素的研究. 沈阳师范大学学报, (3): 215~218
- 欧阳俊闻, 周淑明, 贾双娥(1984). 小麦花药培养对培养温度的反应. 不同基因型小麦花药的适宜培养温度. 遗传, 6 (3): 11~14
- 任江萍, 李磊, 王新国, 尹钧(2005). 大麦幼胚离体培养条件的建立. 麦类作物学报, 25 (6): 25~28
- 隋新霞, 樊庆琦, 李根英, 黄承彦(2005). 小麦花药培养研究进展. 麦类作物学报, 25 (4): 127~131

- 谭光轩, 吴诗光(1999). 野生稻不同外植体的离体培养. 植物生理学通讯, 35 (2): 96~100
- 王爱国, 张以忠, 任翠娟, 陈庆富(2006). 普通荞麦愈伤组织诱导及其分化的正交设计试验研究. 种子, 25 (1): 7~10
- 王昌涛, 杨爱国, 高树人, 赵琦, 赵玉锦, 张世煌(2005). 玉米不同外植体愈伤组织的诱导及植株再生的研究. 沈阳农业大学学报, 36 (5): 515~518
- 王火焰, 王运华, 周建民(2001). 细胞培养技术在植物营养研究领域中的应用. 植物营养与肥料学报, 7 (3): 344~352
- 王俊丽, 宋陆铨, 薛静, 廖祥儒, 杜建芳, 陈丕铃(1999). 水稻悬浮系细胞的建立及植株再生. 河北大学学报, (4): 363~365
- 王良群, 白志良, 王呈祥, 杨伟, 刘勇, 武秀兰, 侯丽萍(2004). 高粱不同外植体再生苗分化培养的研究. 杂粮作物, 24 (5): 262~263
- 王凌健, 倪迪安, 宛新杉, 夏镇澳(1995). 水稻原生质体培养再生植株程序化的初步研究. 实验生物学报, 28 (4): 361~369
- 王仑山, 高清祥, 王亚馥, 张国柱(1993). 小麦耐盐变异体的筛选. 兰州大学学报, 29 (4): 208~211
- 王睿辉, 陈耀风, 高秀武, 秦震霓, 任惠莉, 韩德俊, 梁虹(2001). 激素对小麦幼胚胚性无性系高频率诱导的影响. 西北农林科技大学学报, (1): 33~36
- 王素芳, 王志林, 蒋琳兰, 赵树进(2002). 植物细胞悬浮培养. 中国生物制品学杂志, (6): 381~383
- 王新国, 任江萍, 李磊, 尹钧(2005). 不同培养基及激素配比对小麦幼胚离体培养的影响. 麦类作物学报, 25 (2): 5~8
- 韦鹏霄, 覃伟, 岑秀芬, 陈远孟(2005). 不同抗氧化剂预处理防止优质籼稻种胚愈伤组织褐化的研究. 广西农业生物科学, 24 (2): 109~112
- 夏光敏, 李忠谊, 周爱芬, 郭光沁, 陈惠民(1995). 小麦胚性悬浮系与原生质体植株再生. 生物工程学报, (1): 63~66
- 夏启中, 张献龙, 聂以春, 郭小平(2005). 撤除外源生长素诱导棉花胚性悬浮细胞程序性死亡. 植物生理与分子生物学学报, 31 (1): 78~84
- 向太和, 杨剑波, 吴李君, 吴家道, 钟华鑫, 梁海曼, 颜秋生, 张雪琴(1993). 水稻胚性悬浮细胞系建立的细胞学研究. 安徽农业科学, (1): 1~6
- 向太和(1991). 不同类型水稻成熟胚培养和悬浮细胞系建立的初步研究. 中国农学通报, (5): 22~25
- 向太和, 钟华鑫, 梁海曼, 颜秋生, 张雪琴(1995). 水稻胚性悬浮细胞系建立过程中的生理生化变化. 作物学报, (2): 223~229
- 向太和, 杨剑波, 吴家道(1996). 水稻、玉米胚性悬浮细胞系的有效建立. 安徽农业科学, (1): 1~8
- 向太和, 梁海曼, 钟华鑫, 颜秋生, 张雪琴(1997). 水稻胚性悬浮细胞系建立过程中生理生化变化. 作物学报, (3): 353~358
- 邢登辉, 吴琴生, 刘大钧(1994). 禾谷类作物细胞培养. 生物学通报, (7): 1~3
- 邢登辉, 吴琴生, 刘大钧(1995). 黑麦胚性悬浮细胞系的建立和植株再生. 作物学报, (6): 759~762
- 徐林林, 芦笛, 陆巍, 张荣铎, 杨清(2006). 水稻悬浮细胞系的建立及培养条件对生物产量的影响. 植物生理学通讯, 42 (4): 612~616
- 严健汉, 赵仁智, 曹家林, 任巧凤, 王秋桃, 郭跃进(1978). 用正交试验法筛选粳稻花药培养基的研究. 山西大学学报, (1): 128~134
- 杨跃生, 郑贵朝, 简玉瑜(1999). 铜在水稻愈伤组织培养中的作用进一步研究. 中国水稻科学, 13 (4): 245~247
- 尹庆良, 刘世强(1994). 水稻细胞悬浮系及其单细胞培养的研究. 沈阳农业大学学报, (4): 366~372
- 余舜武, 朱永生, 余毓君, 章荣德, 张端品(2001). 快速建立胚性细胞悬浮系的培养程序初探. 华中农业大学学报, 20 (4): 325~328
- 袁立勇, 李绍清, 李阳生, 冯双华, 戴长柏, 李达模(2003). 水稻悬浮细胞系的建立. 云南大学学报, (4): 373~376
- 袁玲(2003). 铜、银元素对水稻愈伤组织绿苗分化率的作用. 湖北农业科学, (1): 17~19
- 张栋, 陈季楚(1995). ABA, NAA 诱导水稻胚性愈伤组织的研究. 实验生物学报, 28 (3): 329~334
- 张恒(2006). 小麦胚芽愈伤组织培养条件对维生素 E 积累的影响. 江苏农业科学, (1): 33~35
- 张宏, 薛爱群, 谢友菊, 戴景瑞, 李俊明(1996). 主要禾谷类作物原生质体培养研究进展. 华南理工大学学报, 24(增刊): 88~92
- 张慧英, 王小敏, 庾韦花, 吴汉兵, 韦家川, 郝小琴(2004). 玉米幼胚离体培养和植株再生. 广西农业生物科学, 23 (3): 190~192
- 张静兰, 金坚敏, 唐定台(1992). 采用低 pH 值和适量的玉米素、ABA 配合恢复褐化的水稻愈伤组织. 植物学通报, (1): 39~40
- 张君, 王丕武, 武丽敏, 吕长宝, 王雷(2003). 正交试验法在玉米组织培养中的应用. 玉米科学, 11 (1): 101~103
- 张亚兰, 李彦舫, 杨柏明, 张成武, 吴晓明(1998). 短芒大麦耐盐变异体的筛选与鉴定. 草业科学, (1): 30~32
- 赵海岩, 郑文静, 王昌华, 张燕之, 滕国峰(2005). 水稻花药培养及后代选育. 辽宁农业科学, (1): 5~7
- 朱睦元, 徐阿炳, 袁妙葆, 黄纯农, 黄培忠(1990). 基因型和培养条件对大麦花药培养的影响. 植物学通报, 7 (1): 18~21
- 朱至清, 王敬驹, 孙敬三, 徐振, 朱之垠, 尹先初, 毕凤云(1975). 通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基. 中国科学, (5): 484~490
- 邹高治, 叶鸣明, 葛扣麟, 杨金水, 王韞珠(1986). 水稻单细胞培养及植株再生. 复旦学报, 25 (3): 335~340
- Bostock RM, Gerttula S, Quatrano RS (1999). Superinduction of the *Em* gene in rice suspension cells in the presence of ABA and cycloheximide. *Plant Cell Rep*, 18 (10): 848~852
- Bregitzer P, Dahleen LS, Campbell RD (1998). Enhancement of plant regeneration from embryogenic callus of commercial barley cultivars. *Plant Cell Rep*, 17 (12): 941~945
- Brisibe EA, Olesen A, Andersen SB (1997). Characterization of anther culture-derived cell suspensions exclusively regenerating green plantlets in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 93 (3): 321~329
- Cahoon AB, Cunningham KA, Bollenbach TJ, Stern DB (2003). Maize BMS cultured cell lines survive with massive plastid gene loss. *Curr Genet*, 44 (2): 104~113
- Carimi F, Zottini M, Formentin E, Terzi M, Schiavo FL (2003). Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta*, 216 (3): 413~421
- Chen SJ, Kao CH (1997). Ammonium-inhibited growth of suspension-cultured rice cells as affected by medium pH. *Plant Growth Regul*, 21 (1): 1~6
- Chen TL, Lin YL, Lee YL, Yang NS, Chan MT (2004). Expression

- of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures. *Transgenic Res*, 13 (5): 499~510
- Dalton SJ, Bettany AJE, Timms E, Morris P (1999). Co-transformed, diploid *Lolium perenne* (perennial ryegrass), *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) and *Lolium temulentum* (darnel) plants produced by microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep*, 18 (9): 721~726
- Guo WW, Deng XX, Yi HL (2000). Somatic hybrids between navel orange (*Citrus sinensis*) and grapefruit (*C. paradisi*) for seedless triploid breeding. *Euphytica*, 116 (3): 281~285
- Hollung K, Espelund M, Schou K, Jakobsen KS (1997). Developmental, stress and ABA modulation of mRNA levels for bZip transcription factors and Vp1 in barley embryos and embryo-derived suspension cultures. *Plant Mol Biol*, 35 (5): 561~571
- Jelodar NB, Blackhall NW, Hartman TPV, Brar DS, Khush G, Davey MR, Cocking EC, Power JB (1999). Intergeneric somatic hybrids of rice [*Oryza sativa* L. (+) *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka]. *Theor Appl Genet*, 99 (3): 570~577
- Kisaka H, Kisaka M, Kanno A, Kameya T (1997). Production and analysis of plants that are somatic hybrids of barley (*Hordeum vulgare* L.) and carrot (*Daucus carota* L.). *Theor Appl Genet*, 94 (2): 221~226
- Liu B, Liu ZL, Li XW (1999). Production of a highly asymmetric somatic hybrid between rice and *Zizania latifolia* (Griseb): evidence for inter-genomic exchange. *Theor Appl Genet*, 98 (6): 1099~1103
- Nandadeva YL, Lupi CG, Meyer CS, Devi PS, Potrykus I, Bilanz R (1999). Microprojectile-mediated transient and integrative transformation of rice embryogenic suspension cells: effects of osmotic cell conditioning and of the physical configuration of plasmid DNA. *Plant Cell Rep*, 18: 500~504
- Takase T, Yanagawa Y, Komatsu S, Nakagawa H, Hashimoto J (2003). Cell-cycle-related variation in proteins in suspension-cultured rice cells. *J Plant Res*, 116: 469~475
- Toriyama K, Hinata K (1985). Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci*, 41 (3): 179~183
- Vasil V, Vasil IK (1980). Isolation and culture of cereal protoplasts. *Theor Appl Genet*, 56 (3): 97~99