

植物细胞工程的理论基础:细胞全能性学说

朱至清

中国科学院植物研究所,北京 100093

细胞全能性学说认为,植物的细胞具有发育为胚胎和植株的潜能。细胞和组织培养的实践表明,虽然不是植物所有细胞都具有全能性,但是的确许多类型的细胞可以在离体培养条件下发育为胚状体或者植株。正因为如此,在细胞水平上进行的任何遗传操作,通过细胞培养和植株再生,最终可以将细胞的遗传修饰变成植物的遗传修饰,从而改变了整个植物的遗传特性。此外,植物细胞的全能性使得它们能够在培养条件下无限的分裂和增殖,我们可以利用植物细胞的大量培养的方法,使它们像微生物一样,在生物反应器中生产有用的化合物。因此,我们把细胞全能性学说看作是细胞工程的理论基础。

细胞全能性学说是在细胞学说和组织培养实践的基础上建立起来的。细胞的发现可以追溯到17世纪。1665年英国学者胡克(Robert Hooke)被好奇心所驱使,想知道做瓶塞的软木为什么那么轻,于是就在显微镜下观察软木的切片。他发现,软木是由一个个极小的小室(cell)构成的,从此cell一词在生物学上便被称为细胞。实际上胡克当时看到的仅仅是植物细胞的外壳——细胞壁。后来的研究发现了细胞内部的各种结构,也认识到除病毒和噬菌体以外,种类繁多的生物都是由细胞组成的。1838年德国植物学家施莱登(Matthias Jacob Schleiden)总结了前人的研究结果,提出:“一切植物,如果它们不是单细胞的话,都完全是由细胞集合而成的,细胞是植物构造的基本单位。”与此同时,德国动物学家施旺(Theodor Schwann)在动物学领域提出了相似的观点。他们的观点形成了作为19世纪三大发现之一的细胞学说,这一学说的基本论点是:细胞是生物结构、功能和发育的基本单位。

19世纪末叶,显微技术的改进促使细胞学迅速发展。德国细胞学家Strassburger在1875年首次观察到存在于细胞核内的染色体,不久 Hertwig(1876)和 Strassburger(1884)在动物和植物中分别描述了受精过程和精卵融合现象。1882年, Flemming 观察了蝾螈体细胞分裂时的染色体行为,并第一次用有丝分裂(mitosis)来描述这一过程。Boveri(1892)和 Strassburger 各自描述了动物和植物的减数分裂过程。通过这一过程,染色体数目减半,从而证实了 Weismann(1883)的假设,即有性生殖之前性细胞的染色体的数目减半,而在精卵融合时染色体数目加倍,从而保持生物体细胞内的染色体数目的稳定。1900年孟德尔定律的重新发现使人们认识到染色体实际上是遗传因子的载体。当时的生物学家意识到,既然细胞内具有同样数目的染色体,每个细胞自然就携带了彼此相同的全部遗传因子,因此也应当像受精卵一样,具备分化和发育的潜能。第一次提出这种观点的是德国植物学家 Haberlandt,他在1902年发表了著名论文《植物细胞离体培养实验》,距今正好100年。文章指出,作为高等植物的器官和组织基本单位的细胞有可能在离体培养条件下实现分裂分化,乃至形成胚胎和植株。这种见解后来被称为细胞全能性学说(cell totipotency)。该文还报道

了几种植物的细胞和组织的培养试验,但是由于当时的条件所限,都没有成功。

从20世纪30年代起植物组织和细胞培养开始迅速发展,1951年Skoog和Tsui(崔)揭示,在加有IAA和腺嘌呤的培养基上,烟草茎段的髓组织的细胞可以分裂和生长,并且分化形成不定芽。这是人类第一次从离体培养的植物组织诱导出芽和植株。后来Miller等(1955)从DNA的降解产物中分离出6-咪喃氨基嘌呤(激动素),并发现它不仅可以代替腺嘌呤诱导烟草茎段分化芽,而且诱导芽分化的效力比腺嘌呤高三万倍。这一研究为诱导离体细胞的器官分化提供了有效的方法。此后Muir(1954)利用液体振荡培养烟草和万寿菊(*Tagetes erecta*)愈伤组织的方法建立了悬浮细胞培养物,然后用机械的方法从细胞悬浮液中取出单个细胞,将单个细胞放在滤纸上,在滤纸的下面放置愈伤组织和培养液,首次实现了离体条件下单个细胞的分裂和愈伤组织形成。这种方法后来被称为资助培养(nurse culture)。1958年Steward培养来自胡萝卜根的悬浮细胞,并成功地诱导单个的悬浮细胞发育为成熟的胚胎,完全证明了Haberlandt提出的细胞全能性学说。至今已经在1000多种植物上,从各种类型的组织和细胞,甚至原生质体,诱导出胚胎和完整植株,因此植物细胞的全能性的存在已是不争的事实。

1 胚性细胞——植物的干细胞

植物组织培养的大量实践证实了植物细胞全能性学说,但是也告诉我们,并不是植物体内的每一个细胞都具有全能性。一般说来,高度分化或特化的细胞,例如筛管细胞和根冠细胞,已经失去分裂和再分化的能力,即使在离体培养的条件下,也不可能发育成植株。只有那些胚性细胞或分化程度不高的细胞才可具备发育为胚胎或植株的全能性。胚性细胞(embryogenic cells或embryonic cells)一词最早见于在20世纪80年代植物组织培养文献中,其含义与近年来动物细胞学家提出的胚胎干细胞基本相同。

毫无疑问,被子植物的合子是胚性细胞,植物的早期胚胎细胞也属于胚性细胞。植物的分生组织细胞也是一种胚性细胞或胚胎干细胞。我们知道,植物的发育模式与动物有很大的区别。动物的器官分化是一个有限的过程,在胚胎成熟时器官的分化过程已经完成。而植物的器官分化在某种意义上是一个无限的过程,种子中的胚胎萌发成苗后,在整个生活史中不断地形成新的器官,如根、茎、叶、花和果实,直到生命的终结。多年生植物的器官发生可以年复一年地反复进行,延续数十年乃至数百年。植物连续的器官分化是由顶端分生组织来完成的,可见它们是一种具有全能性的细胞。有些植物的成熟器官和组织中也保留着一些胚性细胞,因为有些类型的植物细胞可以在机体上或培养条件下发育为植株。最典型的例子是落地生根(*Kalanchoe laxiflora*),其叶片周缘组织特定部位中遗留的胚性细胞能够沿着叶片的四周形成不定芽,然后发育为具有根系的小植株,脱落到地面。有趣的是在许多植物种类上,一些分化程度较高的细胞,例如叶肉细胞、表皮细胞,乃至花粉细胞,仍然可以在离体条件下经过脱分化和再分化过程,形成胚胎或植株。但是分化细胞如何才能恢复胚性,仍然是植物细胞生物学中尚未完全解决的重要问题。细胞全能性和细胞脱分化的分子机理和基因调控,将是21世纪细胞分子生物学的一个重要的生长点。

植物家早就发现,在自然条件下,植物体内的许多细胞可以不断地产生不定胚或芽,表明他们保留着胚性。在自然界表现出胚性的细胞可以分为三大类,即早期胚胎细胞、茎端分生细胞和成熟组织中遗留的胚性细胞。

1.1 合子和早期胚胎细胞

精卵结合产生的合子,合子发育为胚胎,因此合子是真正意义上的胚性细胞。

许多植物的早期胚胎细胞可以通过裂生多胚(cleavage polyembryony)方式产生两个以上的胚(胡适宜,1983),说明它们是一群胚性细胞或者胚胎干细胞。裂生多胚现象普遍存在于裸子植物中。例如松属(*Pinus*)植物的原胚细胞一般会发育出4~8个各自分离的胚胎。由一个原胚裂生的多胚之间存在着竞争,4个胚胎中的一个可以发育为成熟胚,其余的3个渐渐败育,到种子成熟时便看不到任何痕迹。被子植物中裂生多胚现象比较少见。在郁金香、椰子、美洲鹿百合(*Erythronium americanum*)、耳叶报春(*Primula auricula*)和美冠兰(*Eulophia epidendreaea*)等植物中曾观察到裂生多胚,它们是从原胚顶部的细胞增生形成的。有些植物可以从胚柄细胞增殖产生多胚,在猕猴桃(*Actinidia chinensis*)、悉辉半边莲(*Lobelia syphilitica*)和外果木(*Exocarpus sparteus*)都记载过这种情况(胡适宜,1983)。胚胎发育到一定阶段只有两端各有一团细胞保持着分生状态,后来发育成为茎端和根端分生组织。

1.2 顶端分生组织中的干细胞(胚性细胞)及其基因调控

植物连续的器官分化是由顶端分生组织来完成的。顶端分生组织是植物胚胎胚芽和胚根顶端的分生细胞团,分别称之为茎端分生组织和根端分生组织。茎端分生组织包含全能性细胞,它们相当于动物的胚胎干细胞(embryonic stem cells),可以不断分裂和分化,形成各种器官。根端分生组织只能分化出根组织,很像是动物的组织干细胞(tissue stem cells)。

植物的茎端分生组织(SAM)为一半球型结构。外面的两层细胞(T1、T2)组成的结构叫做原套(tunica),它们能进行垂周分裂,保证分生组织的表面增长,在生长点的基部T2层的细胞也有平周分裂。T1层成为以后器官的表皮组织,T2层衍生的细胞构成皮下组织以及花粉粒和胚珠的生殖细胞。原套的细胞层数随植物种类而异,可以是2层,也可以是1层或3层。原套下面的分生组织的中央部分叫做原体,它由多层细胞组成,分裂时按照多个方向进行。原体发育出茎的皮层、髓和维管系统,以及叶和花器官的最里层细胞(Jenik and Irish, 2000)。原套和原体的中央部分统称为分生组织的中央区(central zone),由一团有丝分裂活动不旺盛的胚性细胞(干细胞)组成。而分生组织周围区(peripheral zone)由分裂速度较快的细胞组成,器官原基就在这里产生。中央干细胞分裂后产生两部分,一部分仍然保留在分生组织的中央,叫做干细胞后裔(progeny of stem cells),保持全能性,另一部分叫做子代细胞(daughter cells),将离开中央带逐渐向分生组织周围区移动,它们在周边分化成新的器官原基(徐云远,2002)。综上所述,茎的顶端分生组织的中央带永远存在着全能性的胚性细胞,所以离体培养植物的生长点便可以不断地产生苗和植物体。

拟南芥菜(*Arabidopsis thaliana*)的与生长点的形态和发育模式有关的突变体为研究分生细胞的基因调控提供了试验材料。通过对*stm*突变体的研究发现了一个与维持顶端细胞的分生状态有关的基因。拟南芥菜的*stm*突变体(shoot meristemless)的特点是胚胎发生过程中不能形成茎端分生组织,这一特性的出现是*STM*基因突变的结果。由拟南芥菜克隆的*STM*基因及其推导的编码蛋白的氨基酸序列说明*STM*基因是编码Homeodomain类的*KN*基因家族的一员,很可能是通过转录调控而影响SAM的形成。*STM*基因功能是在整个发育过程中保茎端分生组织的结构建成。*STM*基因作用于*WUS*和*ZIL*基因的上游,后两基因在维持分生组织细胞的不分化特性上具有重要的作用(Endrizzi et al., 1996; Long et al.,

1996; 许智宏, 1997)。

对另一个突变体 *wus* 的研究揭示了一个维持顶端分生组织中央区的保持干细胞特性的基因 *WUS*。*wus* 突变体的主要特征是发育迟缓, 几片真叶形成后, 茎尖变得平坦, 主茎的生长也随之停止, 这是由于调控细胞全能性的 *WUS* 基因发生了突变。*wus* 突变体的遗传学分析证明, *WUS* 基因定位在拟南芥染色体 II 上。基因克隆和测序的结果表明, 它编码一个有 291 个氨基酸组成的同源异型蛋白(homeodomain protein)。*WUS* 基因是干细胞促进途径(stem cell-promoting pathway)中的重要调控成分(Brand et al., 2000; 许云远, 2002)。*WUS* 在拟南芥胚胎的分生组织中就开始表达, RNA 原位杂交表明, 在 16 细胞的胚胎中, 中央的 4 个细胞中有 *WUS* mRNA 存在, 而在外周的细胞检测不到。胚胎增大后, 仍然是中央的 4 个细胞中存在 *WUS* mRNA。鱼雷胚时期(torpedo stage), 分生组织中有 *WUS* 的表达, 但是在原套的 L1 和 L2 层细胞无表达。在胚胎晚期, *WUS* 仅在分生组织的 L3 层(原体的最上一层细胞)之下的几个细胞中表达, 这一分布模式一直延续到花分生组织出现。该基因在分生组织三层细胞之下表达, 以非细胞自主方式(non-cellautonomous manner)决定其上方细胞的干细胞性质, 因此将表达 *WUS* 的区域看作是一个新的功能单元, 叫做干细胞组织中心(Mayer et al., 1998)。*WUS* 的表达不仅能够维持细胞处于干细胞状态, 还能够激活邻近细胞中的 *CLV* 基因, 促使一部分干细胞分化为器官原基。反过来, *CLV* 基因的表达又可以限制 *WUS* 基因的表达量和表达区域, 使分生组织中的干细胞的数目保持恒定(Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000)。

WUS 的功能分析表明, 它不仅能够保持茎尖分生组织和花分生组织干细胞状态, 而且参与莲座叶形态的控制(Hamada et al., 2000)以及胚珠的发育(Gross-Hardt et al., 2002)。最近的研究表明, 在化学诱导下 *WUS* 的超量表达或者 35S 启动子驱动下的组成型表达可以使转基因拟南芥的根或其他部位的体细胞分化出胚状体(Zuo et al., 2002), 说明该基因在植物细胞全能性的表达上起重要的作用。

1.3 植物成熟物器官中遗留的胚性细胞

根、茎、叶、花和果实等植物的器官都是由不同的组织所构成, 每一种细胞又有若干类型的细胞组成。这些细胞大多数属于分化细胞, 甚至是高度特化的细胞。但是在植物的组织和器官中也保留少数未分化或分化程度不高的细胞, 它们可以在自然条件下形成不定胚(adventitious embryo)或不定芽(adventitious bud), 进行无性繁殖。我们把这些能够产生不定胚或不定芽的体细胞定义为遗留的胚性细胞。

1.3.1 被子植物胚囊中的细胞

卵细胞显然是具有全能性的, 不过它的全能性只有在与精子结合形成合子后才能实现。卵细胞以外的胚囊分子有时也保留着全能性。一些植物胚囊中的助细胞具有形成胚胎的能力, 例如在岩白菜(*Bergenia delavayi*)中, 助细胞不经受精可以发育为单倍体的胚胎, 因此在受精后的胚珠的切片上时常可以看到胚囊中有两个胚胎, 其中大的是合子胚, 小的是助细胞胚。在榆属(*Ulmus*)的一些种和韭菜上观察到反足细胞也具有产生胚胎的能力, 不过反足细胞胚很难发育为成熟胚。

1.3.2 珠被和珠心细胞

许多植物胚珠中的珠被和珠心细胞, 特别是靠近胚囊的珠心细胞具有全能性, 能够产生不定胚。在柑橘属、芒果属、仙人掌属、玉簪属、绶草属和金蝴蝶属的一些物种中观察到过珠

心胚。珠心多胚现象在园艺生产中具有重要意义,藉此可以得到与亲本植株完全一样的健壮实生苗。

柑橘属植物是珠心胚现象(每个种子有一个以上的胚)的一个典型例证。在该属的若干物种中,珠心组织在每个种子中能形成1~40个不定胚,其中很多都能发育成熟,在种子萌发之后形成植株。

在芒果的胚珠切片上可以发现,具有胚胎发生潜力的细胞的形态不同于其他的珠心细胞,其体积较大,具有浓厚的细胞质,细胞核的体积也比较大,每一个细胞经过分裂可以形成一个不定胚,在一个胚珠内不定胚的数目从几个到几十个不等。不定胚的发生并不需要传粉的刺激,但是不定胚的发育和成熟必须依靠传粉和受精,因为如果胚珠没有受精,就会败育和脱落,珠心胚自然也不能继续发育。

1.3.3 营养体中的薄壁细胞

一些木本植物具有从根部产生根蘖或从茎上产生不定芽的特性,它们往往起源于根或茎皮层组织中的分化程度较低的薄壁细胞。叶组织产生不定芽的情况也比较常见,前面提到的落地生根就是一个典型的例子。秋海棠属(*Begonia*)和非洲紫罗兰(*Sanpaulia ionantha*)的叶柄中也遗留有胚性细胞,不过它们在植物体中不会启动细胞分裂,只有在被人工切断并扦插后,才能产生不定芽。

表皮细胞也是一种薄壁细胞,虽然它与外界接触的一面细胞壁有不同程度的加厚。有些植物的表皮细胞,例如亚麻下胚轴的表皮细胞,在自然情况下能够形成不定芽,而且这些不定芽是由单个表皮细胞起源的。只要除去幼嫩的亚麻苗的顶芽,沿着下胚轴全长的所有表皮细胞都能形成不定芽,但其中只有一个能长成完整的枝条。在组织培养中能由茎的表皮层细胞形成芽或胚的物种除亚麻外还有石龙芮、胡萝卜、蓝猪耳、烟草和蔓青等。

2 从分化细胞到胚性细胞

近年来发现,动物像植物一样,在成熟组织中也保留着一些干细胞,它们具有重新发育为胚胎(胚胎干细胞)或组织器官(组织干细胞)潜能。但是在动物体中,已分化细胞一般不可能逆转为胚性细胞或干细胞。植物则不同,只要细胞处于生活状态,即使分化程度很高的细胞,也保持着恢复到分生状态的能力。据研究,只有极少数类型的细胞完全失去分裂的能力,例如细胞核已经开始解体的筛管和木质部成分,或者细胞壁厚于2微米的纤维细胞以及细胞壁厚达7微米的管胞细胞。据Gautheret(1966)研究,一个细胞通过脱分化向分生状态回复可能达到的程度,取决于它已有的分化程度。分化程度较低的细胞,如形成层细胞和薄壁细胞,可以脱分化形成营养生长点,然后重新分化,产生器官或植株。而分化程度很高的细胞,如厚壁细胞或纤维细胞最多不过回复到形成层细胞状态,能够分裂形成某些组织,但不可能再生植株。由此看来,被子植物的茎端分生细胞,形成层分生细胞和薄壁细胞属于胚胎干细胞,而其他分化程度高的细胞可以看作是组织干细胞。

在离体培养的条件下,一个分化的细胞转变为分生状态,形成胚性细胞团或愈伤组织的现象称作脱分化(dedifferentiation)。一个已分化细胞若要表现其全能性,形成完整植株,首先要经历脱分化过程,然后再经历再分化(redifferentiation)过程。在大多数情况下,再分化过程是在愈伤组织细胞中发生的,但在有些情况下,再分化可以直接发生于脱分化的细胞中,无须经历愈伤组织阶段。组织培养研究的结果已经揭示,分化细胞的脱分化需要两个条

件:创伤和外源激素。创伤引起的细胞脱分化现象在扦插试验中经常可以见到,例如将秋海棠或非洲紫罗兰的叶柄切断,扦插到苗床上,在适合的温度和湿度下,叶柄中的薄壁细胞就能启动细胞分裂,产生分生细胞团,并由它们分化出小植株。创伤之所以能够诱导细胞的脱分化,主要是由于它使组织中的生长素分布发生了变化,伤口处生长素浓度的提高是细胞开始脱分化的直接原因。在组织培养时,培养基中添加的外源激素对细胞脱分化起着决定性的作用。

2.1 细胞脱分化过程的形态学和生物化学变化

关于离体培养细胞脱分化的形态学变化,曾经有过零星的研究,但并未揭示细胞脱分化过程的全貌。我们曾经以烟草叶片外植体(用于组织培养的组织块)为材料,比较系统地研究了离体培养条件下叶肉细胞脱分化的形态过程(朱至清等,1982,1984)。烟草的叶肉细胞分为两类,即栅栏细胞和海绵细胞。两类细胞在切割刺激和培养基中的NAA和激动素的作用下,都会启动细胞分裂,形成分生细胞团,然后发展为愈伤组织。愈伤组织只出现在外植体切口的部位,说明除了外源激素和培养基因素外,创伤也是分化细胞激动脱分化过程不可缺少的前提。

烟草叶肉细胞脱分化过程可以概括为以下三个阶段:(1)静止的叶肉细胞进行第一次分裂;(2)经过连续几次细胞分裂,叶肉细胞转变为分生细胞;(3)分生细胞形成愈伤组织。

在培养32h左右,烟草叶片外植体的光学显微镜切片表明,靠近切口处的有些分栅栏细胞和海绵细胞就已经完成了第一次细胞分裂,形成包括在原有栅栏细胞壁之内的两个子细胞。但是外植体的表皮细胞并不发生分裂,以后也不会分裂。可见在烟草的叶片中叶肉细胞具有全能性,而表皮细胞不具备这种特性。

如果外植体细胞均为正常二倍体或单倍体,脱分化细胞的第一次分裂的方式通常是有丝分裂。如果外植体含有高倍化细胞,细胞脱分化的第一次分裂有可能是无丝分裂。在烟草叶片外植体中,绝大多数细胞均为二倍体细胞,栅栏细胞和海绵细胞均以有丝分裂的方式进行第一次分裂。我们在培养16~24h观察过2000多个分裂相,它们无一例外都是有丝分裂,从未发现过无丝分裂的现象。在这一实验系统中,无丝分裂只出现在培养20天以后的愈伤组织中,而且出现频率相当低。以往有人认为细胞只有通过无丝分裂才能完成细胞的脱分化,这样的观点显然是缺少根据的。

在叶片外植体离体培养24~32h,一部分叶肉细胞启动第一次分裂。此时采用酶解压片法制备叶肉细胞的整体压片,可以观察到栅栏组织细胞和海绵组织细胞脱分化第一次分裂的过程。棒状的栅栏细胞的第一次有丝分裂多数情况下细胞板与母细胞的长轴垂直,但也可以与之平行,还可以与之呈一定的角度。海绵组织细胞第一次细胞分裂细胞板的位置具有较大的随意性。细胞群体脱分化和进入分裂的过程是非同步的,一般说来靠近外植体切口处的细胞先开始脱分化,然后逐渐波及到较内部的细胞。

在自然条件下分化细胞通常停止细胞分裂,执行特定的代谢功能,直至死亡。在离体培养条件下,静止的分化细胞脱分化的第一个也是最重要的步骤就是启动第一次细胞分裂,分化细胞一旦开始分裂,就可以连续分裂形成分生状态的细胞群体。如果能够揭露启动脱分化第一次细胞分裂时基因表达的细节,找出细胞脱分化的相关基因,我们就能了解细胞脱分化过程的本质,从而达到精确控制细胞全能性表达的目的。遗憾的是在这一重要领域分子生物学尚未很好地介入。

对于连续分裂的细胞的细胞周期的分子调控机理,特别是如何从细胞周期的静止阶段G₀期转向分裂的第一阶段G₁期的调控机理近年来已经取得重要进展。20世纪后期,美国科学家L. H. Hartwell与英国科学家R. T. Hunt和P. M. Nurse发现,所有真核有机体,包括酵母、植物、动物和人类的细胞中存在着调节细胞周期的关键分子,并通过细胞周期钟模型解释了细胞周期的控制机理,从而获得了2001年度诺贝尔生理学及医学奖。这一发现将对细胞生物学的发展产生重大影响,不仅有助于解释**正常的静止细胞何以会转向无序的分裂而形成癌症**,也为解释分化的细胞如何启动分裂和脱分化过程奠定了基础。

1970~1971年Hartwell利用酵母的细胞周期行为异常的突变体,成功地分离了100多个与参与细胞周期调控的基因,即所谓CDC(*cell division cycle*)基因。这些基因中的一个被称为CDC28,它能够控制细胞周期的第一阶段G₁期进行。70年代中期,在裂褶酿酒酵母中发现了CDC2基因。他证明CDC2对基因G₂期和分裂期的进行起调控作用。1987年Nurse又在人类细胞中发现了一个编码细胞周期依赖性激酶CDK(*cyclin dependent kinase*)的基因CDK1。与此同时,Hunt发现了一类蛋白质叫做**细胞周期蛋白(cyclin)**,已经发现有10余种。Cyclin在每次细胞周期中周期性的形成和降解。Cyclin是一类识别蛋白,某种特定的cyclin与CDK分子结合时能够引导CDK使一种特定的与细胞分裂相关的靶蛋白磷酸化,保证细胞分裂正常运转。已经知道细胞中**CDK和cyclin含量的提高与癌细胞的分裂有关**,推测CDK基因和cyclin基因的活化与表达也与植物分化细胞脱分化第一次分裂的启动有关。

最近,Boucheron等(2002)将一种细胞分裂周期基因CDC2a的启动子与GUS连接,构建质粒转化烟草,利用GUS染色反应研究转基因烟草髓组织培养物中CDC2a的表达,发现它只在启动有丝分裂的细胞中表达,说明CDC基因家族参与调控成熟细胞的脱分化过程。然而总的说来,对于调控脱分化过程的基因现在了解得很少,有待开展系统的研究。揭示启动脱分化过程的相关基因及其表达将有助于了解克隆的机理和癌症的起因,是生命科学的前沿领域。

2.2 分化细胞脱分化过程中细胞结构的变化

植物体内大量的分化细胞是成熟的薄壁细胞,例如叶肉细胞、表皮细胞、内皮层和髓部的薄壁细胞等,它们在形态上与分生细胞有明显的区别。与分生细胞相比,成熟的薄壁细胞及其细胞核的体积较大,核位于细胞边缘,细胞中央有一个大的液泡,细胞质内核糖体密度较低,多聚核糖体数目很少,质体为分化程度较高的叶绿体、杂色体、白色体或淀粉体。在离体培养条件下成熟的薄壁细胞从第一次分裂开始即进入脱分化的过程。通过数次有丝分裂,新生的细胞逐步转变为分生状态的细胞。仍以烟草的叶肉栅栏细胞为例,在脱分化第一次分裂的前期细胞质的体积增加,细胞核的体积明显增大,并且在细胞质流的推动下,从周边位置移动到细胞的中央。大约在离体培养的32 h上兰细胞进入第一次分裂中期分裂时栅栏细胞的总体积并不增加,因此形成的子细胞的体积比栅栏细胞减少了一半。

在外植体离体培养60 h左右,从一个栅栏细胞分裂经过几次分裂形成多个子细胞,但仍然被原有的栅栏细胞壁包裹着。此时细胞的体积进一步减小,大液泡逐渐缩小,同时细胞质增多。在这一阶段细胞质和细胞器的结构也发生明显的变化,主要有以下两个方面。

2.2.1 在脱分化细胞中出现液泡蛋白体

从培养20 h起直到培养3~4天,脱分化细胞的液泡中陆续出现电子密度很高的圆球体。放射自显影研究表明,标记的亮氨酸可以渗透到这种电子密度很高的圆球体中去,证明

它们是一种蛋白体。单独用锇酸固定时,电子致密体可以被完整地保存下来。如只用戊二醛固定,它们虽然也可固定下来,但其内部呈现网状结构,表明具有一些不能被戊二醛固定的物质。电子致密体对固定剂的反应说明,它除了含有能被醛固定蛋白质外,还含有一些能被锇酸固定但不被醛类固定的物质,例如脂类等。同时还可以看到在液泡中有一些新形成的球形的细胞质团,其大小和外形与蛋白体十分相似,并经常和后者相连接。这些新形成的球形的细胞质团中多聚核糖体的数目很多,说明处于合成代谢活跃的状态。这种不寻常的电子显微图像给人的印象是,在蛋白体的基础上可以形成新的细胞质团,实现细胞质的改组。因此,朱至清等(1984)认为蛋白体的出现和细胞质的旺盛生长是烟草叶肉细胞开始脱分化的重要标志,因此有必要进一步研究蛋白体的生物化学性质和与蛋白体形成相关的基因表达。

2.2.2 脱分化细胞中叶绿体转变为原质体

脱分化过程中细胞质改组的另一个重要方面,就是细胞器的变化。变化最明显的是叶绿体。随着脱分化过程的进行,叶绿体内淀粉粒逐渐增大,有的几乎充满叶绿体的整个空间,淀粉粒的数目有时也多达7~8个。同时,叶绿体开始以缢裂方式分裂。随着分裂的次数增加,叶绿体的体积逐渐减小,片层退化和消失,变成只含有淀粉粒的淀粉体。淀粉体重的淀粉被消耗之后,最终成为原质体。叶绿体还以出芽方式产生质体芽,质体芽中可以见到对原质体的遗传和复制极为重要的DNA,质体芽脱落后即成为原质体。脱分化过程中线粒体、微体、高尔基体、粗面型内质网明显增多,胞质电子密度加大。这些胞质结构的变化显示细胞代谢非常活跃。

烟草外植体中的叶肉细胞经过多次的细胞分裂和细胞结构的改组,在培养96 h左右已经发育出分生细胞团。每一个分生细胞团来自于一个栅栏细胞或海绵细胞。分生细胞团中的细胞具有典型的分生细胞的特点:细胞体积较小,细胞核较大并占据细胞中央的位置,细胞质浓厚,叶绿体已经消失而代之以原质体和淀粉体,中央大液泡已经不复存在,在细胞质中有一些小液泡。随着分生细胞团细胞数目的增加,淀粉体和小液泡的体积还会缩小,整个细胞的形态变得与茎端分生细胞完全相同。

2.3 分生细胞的再分化与植株再生

从分化细胞经过脱分化过程形成的分生细胞或分生细胞团可以再分化形成胚胎或器官然后发育为完整的植株。

2.3.1 体细胞胚胎发生(embyogenesis)及其基因表达

离体培养的细胞在完成脱分化过程之后,在适当的诱导条件下,能够通过体细胞胚胎发生过程产生体细胞胚或胚状体。

在过去二十几年间已经累积了大量资料,证明植物体细胞具有发育为胚胎的潜力。据统计,在属于33个科的80个种上已经有过关于体细胞胚胎发生的报道。已经发现,植物的每种器官都能成胚。事实上被子植物的胚胎发生现象并不一定局限于有性生殖过程,植物单细胞培养研究表明,任何一种器官的体细胞,在适当的培养基中都能以一种和合子胚胎发生相似的方式进行发育,并产生一个完整的植株。

离体条件下的体细胞胚胎发生过程最早是在胡萝卜中发现的(Reinert, 1958; Steward等, 1958)。此后胡萝卜就一直被广泛地用于对离体条件下胚胎发生过程中各种问题的研究。对于这种现象做过比较详细研究的其他植物有石龙芮(*Ranunculus sceleratus*)、博落回(*Macleaya cordata*)以及柑橘属和咖啡属的一些物种。

Kohlenbach(1965)证明,在博落洞中,用机械方法分离得到的充分分化的叶肉细胞能产生**胚性愈伤组织**。在含有等克分子浓度($5\ \mu\text{mol/L}$) 2,4-D和激动素的培养基上,这些由叶肉细胞分裂形成的愈伤组织不断增殖,但若把激动素的浓度降低到 $1\ \mu\text{mol/L}$,并以 $2\ \mu\text{mol/L}$ IAA取代2,4-D,则可诱导愈伤组织分化芽和胚状体。当把选择的胚性愈伤组织转移到完全不含生长激素的基本培养基上时,它们将以很高的频率形成胚状体。如果增加培养基中还原态氮的含量,愈伤组织分化胚状体的频率还可进一步提高。

石龙芮花器各部分(包括花药)的体细胞组织在含有IAA和椰子汁(10%)的培养基上都能增殖形成分生状态的愈伤组织细胞,培养3周后,在愈伤组织上会出现大量的胚。这些胚是由愈伤组织外层细胞以及深部细胞起源的。胚的分化也能发生在由这些愈伤组织建立起来的悬浮培养物中。这些体细胞胚在原来的位置上即可萌发,若把它们剥离下来单个地栽植于新鲜的半固体培养基上也能萌发。一个特别有趣的现象是,由这些小植株的茎表面还能再长出成群的不定胚,在每个小植株上所形成的不定胚的数目由5个到50个不等。光学显微镜和超微结构的研究表明,这些茎生胚是由单个的表皮细胞起源的,它们所经历的各个发育阶段与该物种在活体条件下的合子胚相似。

近10年来胚胎发生过程中的基因表达受到人们的关注,发现一些调控胚胎发生的相关基因。玉米的*knotted1* (*kn1*)基因是在植物界发现的第一个同源异型基因(homeobox gene) (Vollbrecht et al. 1991),它在维持苗分生组织细胞的不分化状态上起着重要作用(Kerstetter et al. 1997)。在授粉后10天的玉米合子中曾检测到*kn1*基因的表达(Smith et al. 1995)。拟南芥的LEAFY COTYLEDON1 (*LEC1*)基因是一个转录因子,在胚胎和**胚乳**细胞中都检测到*LEC1*的mRNA,同时它的过量表达可以诱导拟南芥的叶片组织形成类似胚胎的结构,因此认为*LEC1*的表达产物可以激活细胞分化和胚胎发生所需要的基因(Lotan et al. 1998)。

Zhang等(2002)最近用原位杂交方法研究了*kn1*和*ZmLEC1*在玉米离体胚胎发生过程中的表达。他们分别固定了玉米的胚性愈伤组织,诱导培养后7天的球形胚状体、14天的盾片胚状体和成熟胚状体,制成切片,然后用地高辛标记的*kn1*和*ZmLEC1*反义mRNA探针进行原位杂交。在愈伤组织阶段检测不到*kn1*的转录,在球形胚状体中*kn1*的转录仅限于苗分生组织原(iSTM)部位的5~10个细胞中,在具盾片的胚状体中*kn1*的转录定位于早期的苗分生组织(eSTM)。在成熟胚状体中*kn1*的转录发生在苗分生组织中,但是在子叶中没有表达。*ZmLEC1*的表达出现得更早,在胚性愈伤组织的某些部位就可以观察到,在球形胚状体中它的表达十分强烈,然后随着胚状体长大而逐渐减弱。这种表达模式和进程与在拟南芥合子胚发育中观察到的*LEC1*的表达情况非常相似。综上所述,*kn1*和*ZmLEC1*基因,特别是*ZmLEC1*基因,与离体胚状体的发生有密切的关系。

2.3.2 器官发生(organogenesis)

离体培养的细胞脱分化后,形成再生植株的另一条途径是器官发生。在一定的诱导条件下,离体细胞或组织重建芽的分生组织,分化出芽后再产生根,成为完整的植株。有些离体细胞不能发育为完整植株,只能发育为某种特定的器官,例如根、花、雌蕊、雄蕊或子房等。**器官分化的模式和程度主要取决于供体细胞的生理状态和培养基中的外源激素组成。**

烟草的表皮层细胞的分化最能说明供体细胞生理状态和外源激素对器官分化模式的影响。烟草的表皮在培养中一般不能成活,或是对培养的反应很差。然而,在培养茎叶的包括

1~7层细胞的薄层表皮时,却有可能诱导表皮细胞进行分裂,并表现出全能性。有趣的是,在茎的薄层表皮培养物中,可任意诱导表皮细胞直接发育成根或茎,甚至发育成可育的花。这一实验体系的优点是,可以对在单细胞分化为不同类型器官的各种变化过程进行直接的观察,同时由于这类外植体没有维管组织和形成层,供体其他组织的数量也少到了最低限度,因而很少或没有内源激素的影响,可以较准确的判断外源激素对分化和器官发生的影响。

从正在开花的烟草植株的茎撕取薄层表皮进行培养时,它们所形成的芽的类型因取材区域而不同。在一定的培养条件下,由花枝取下的薄层表皮只能产生花芽,由植株基部取下来的薄层细胞只能产生营养芽,由中间部分取得的外植体能产生这两种类型的芽,但其间的比例会有不同,这取决于它们与植株基部距离的远近。在一个花序之中,由基部取下的表皮比由顶部取的表皮对培养的反应更为明显。花序基部表皮形成花芽的的数目还受供体植株生理状态的影响。例如由长着绿色果实的枝条上切取的薄层表皮100%都能分化出花。如果供体植株上的果实已经成熟,对培养的反应就较差,只有85%外植体形成花芽。

花芽的分化还受外源激素组成的影响,只有当培养基中所含的激动素和IAA的克分子浓度皆为 10^{-6} mol/L,且蔗糖为2%~3%时,烟草花枝的表皮才能形成花芽。若不改变IAA浓度,把激动素浓度提高到 10^{-5} mol/L,则会完全抑制花芽的形成,而只出现营养芽。如果进一步改变这两种激素在培养基中的浓度比例,还有可能使形态发生过程转变为有利于生根或形成愈伤组织。这是说明器官分化受激素控制的又一个例证。在理想的条件下,由一块大小为 1×0.4 cm的外植体能长出7~30个花芽。在薄层表皮培养中形成的花芽是正常的,其中产生的配子有生活力,能够结实。除烟草外,在薄层表皮培养中能发生可控制的器官发生过程的植物还有菊苣、蓝猪耳以及大叶落地生根等。

综上所述,100年来对于植物细胞全能性的研究经历了理论假设,组织培养试验证明,细胞生物学观测和分子生物学机理探讨等发展阶段。这方面的实验研究使得上千种的植物的细胞可以在人工培养条件下发育为器官、胚胎和植株,从而为细胞工程研究和应用奠定了坚实的基础。现在我们不仅可以通过培养离体细胞或组织实现种苗大量繁殖和生产有用的次生代谢产物,而且能够对细胞进行遗传操作,达到培育新品种的目的,使细胞工程成为改良植物的有力手段。近年来对于细胞全能性表达、细胞脱分化和器官发生的基因调控已经积累了丰富的资料,可以预料对于细胞全能性相关基因的功能与表达的研究,将会揭露克隆和植株再生的分子机理,在更多的植物种类上实现细胞全能性的表达,克服植株再生的基因型差异,进一步拓宽细胞工程和基因工程的研究范围,为植物改良提供更有效的手段。

参考文献

- 1 胡适宜. 1983. 被子植物胚胎学. 人民教育出版社.
- 2 徐云远. 2002. 拟南芥菜bre突变体分析及小麦ver203F基因表达模式研究. 中国科学院植物研究所博士后研究报告.
- 3 许智宏. 1997. 植物发育与生殖的研究. 植物学报, 41(9): 909~920.
- 4 朱至清等. 1982. 烟草离体细胞中的原质体发生. 植物学报, 24(3): 20~25.
- 5 朱至清等. 1984. 烟草外植体脱分化细胞中的蛋白体. 植物学报, 26(2): 126~129.
- 6 Boucheron et al., 2002, Planta, 215: 267~278.
- 7 Brand U et al., 2000, Science, 289: 617~619.

- 8 Endrizzi K et al. , Plant J,10:967~979.
- 9 Endrizzi K et al. ,1996, Plant J, 10:967~979.
- 10 Fletcher J, 2002, Annu. Rev. Plant Biol, 53:45~46.
- 11 Gautheret R J, 1966, In: W. Bergmann (Editor), Cell Differentiation and Morphogenesis. North-Holland Publishing Co., Amsterdam,55~95.
- 12 Gross-Hardt R et al. , 2002, Genes Dev, 16:1129~1138.
- 13 Haberlandt G,1902, Sber Akad Wiss Wien,1902, 111:69~92.
- 14 Hamada et al. , 2000, Plant J, 21:351~360.
- 15 Jenik P and Irish V, 2000, Development, 127:1267;1276.
- 16 Jenik P, Irish V, 2000, Development, 127:1267~1276.
- 17 Kohlenbach HW, 1965, Planta, 64:37~40.
- 18 Long J A et al. , Nature, 379:66~69.
- 19 Lotan T et al. , 1998, Cell, 93:1195~1205.
- 20 Mayer K et al. ,1998, Cell, 95:805~815.
- 21 Miller C O et al. , 1955, J Am Chem Soc, 77:1392.
- 22 Muir WH et al. , Science, N. Y. , 119:877~878.
- 23 Satina S et al. , 1940, Amer J Bot, 27:895~905.
- 24 Schoof H et al. ,2000, Cell, 100:635~644.
- 25 Skoog F,Tsui C,1948,Am J Bot,35:782~787.
- 26 Steward F C, 1958, Amer J Bot, 45:709~713.
- 27 Zhang S et al. , 2002, Planta, 215: 191~194.
- 28 Zuo J et al. . 2002, Plant J, 30:349~359.

On Cell Totipotency, the Basis of Plant Technology

Zhu Zhiqing

Institute of Botany, CAS, Beijing 100093

Abstract: This paper looks back the research progress on plant cell totipotency since 1902 when Haberlandt published first report on plant cell culture. Embryogenic cells, or plant stem cells, distributed in different organs of plant organisms which makes possible to induce plant regeneration from cultured cells. Plant cell engineering immersed in 1960s because in that period in vitro culture of genetically or biologically modified cells, such as virus-free meristem, pollen and somatic hybridized protoplasts, were succeeded. To this point, we could say cell totipotency is the basis of plant cell engineering even gene engineering. In recent 20 years great progress has been made on hormone regulation and related gene express of cell dedifferentiation and somatic embryogenesis that will eventually revealed the mechanism of cell totipotency. and plant regeneration.

Key words: cell totipotency; stem Cell; embryogenic cell; somatic embryogenesis; plant biotechnology