

植物体细胞胚胎发生的信号传导

刘福平

(福建省亚热带植物研究所, 中国福建 厦门 361006)

摘要: 概述植物体细胞胚诱导中生长素、细胞分裂素、钙、活性氧信号分子作用机制研究进展, 以及体细胞胚成熟培养与 ABA、蔗糖、水分胁迫信号的相互关系。

关键词: 植物体细胞胚; 诱导; 成熟培养; 信号分子

中图分类号: Q945.4; Q942.6

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2005)S1-0060-06

Plant Somatic Embryogenesis and Signal Transduction

LIU Fu-ping

(Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen 361006, Fujian, China)

Abstract: The advances in mechanism of signal molecular, such as auxin, CTK, Ca^{2+} and ROS, in the induction of plant somatic embryo, as well as the relationship between the maturation culture of somatic embryo and signals, such as ABA, sucrose and moisture stress are reviewed.

Key words: plant somatic embryo; induction; maturation culture; signal molecular

(*Life Science Research*, 2005, 9(4): 060 ~ 065)

植物体细胞胚发生受细胞内外多种因子影响, 各种因子通过转录与翻译水平复杂而精确的调控, 使基因在时间和空间上得以选择性激活或抑制。“细胞信号转导”主要是指胞间通讯的因子如激素、逆境胁迫、病原体的侵入、光、创伤等作用于细胞表面(或胞内)受体后, 跨膜传递给胞内第二信使, 即各种激素、 Ca^{2+} 、活性氧(ROS)、水杨酸(SA)、一氧化氮(NO)、寡糖分子等, 激活并引起某些特定反应, 如某些离子的吸收和释放, 特定蛋白质的磷酸化和去磷酸化, 最终引起特定基因的表达和导致生理反应。体细胞胚人工发生可在离体条件下有针对性地开展信号传导机理研究, 为研究植物胚胎尤其是早期发育的机制提供了良好系统, 而对细胞信号传导机制的进一步了解, 也为

体细胞胚发生技术的建立提供了依据。

1 体细胞胚诱导的信号转导研究进展

生长素是诱导体细胞胚发生的重要因素, 细胞分裂素则有协同作用, 体细胞胚诱导中钙、活性氧信号变化或作用也有相当研究。

1.1 生长素信号传导

2, 4-D 广泛应用于体细胞胚诱导, 尤其对禾谷类植物的体细胞胚发生具有决定性作用。2, 4-D 作用机理之一是, 在高浓度2, 4-D 培养使细胞核DNA(主要在胞嘧啶)甲基化水平提高, 基因沉默比例提高, 转入去除2, 4-D 的分化培养基, DNA 甲基化不足, 激活体细胞胚发生特异基因表达^[1], 对脐橙 (*Citrus sinensis*) 的研究^[2]发现胚性愈伤组织

收稿日期: 2005-10-09; 修回日期: 2005-11-11

基金项目: 福建省自然科学基金资助(C0410040)

作者简介: 刘福平(1963-), 男, 山东济南人, 福建省亚热带植物研究所副研究员, 主要从事植物生理学研究, E-mail: fliu5334@sina.com

的甲基化水平较失去胚性的愈伤组织低。生长素如何作用使得甲基化修饰(或甲基化酶)水平提高的机理尚不清楚。另一方面,有报道在水稻细胞培养中,2,4-D促进了细胞内源 IAA 含量的提高从而诱导胚性细胞的形成^[3],在胡萝卜悬浮培养体细胞胚中认为2,4-D是通过促进 IAA 结合蛋白的形成,从而提高细胞对 IAA 敏感性而达到同样的效果^[4]。关于生长素的信号转导,几乎都是来自 IAA 的研究,在信号的感知上存在生长素结合蛋白(ABP)介导的膜上感知等途径,G 蛋白(GTP 结合蛋白)参与信号的胞内传递,第二信使包括离子型第二信使、磷脂酶 A2(PLA2),脂活化蛋白激酶、促分裂原激活蛋白激酶(MAPK)等,生长素促进 AUX/IAA 蛋白与泛素(Ubiquitin)的相互作用,使 AUX/IAA 降解,释放生长素反应因子(ARFs),后者与生长素应答因子(AuxREs)结合,从而介导生长素调节的基因表达。2,4-D 的信号传导近年有文献^[5]综述:外加2,4-D、IAA、NAA 都可导致细胞质内 Ca^{2+} 水平上升和胞质内酸化(pH 下降 0.1~0.2);2,4-D 是通过刺激肌醇三磷酸(IP₃)的降解来完成细胞质内 Ca^{2+} 水平增加,同时外加 IP₃, cGTP 和 cATP 可以增加细胞质内 Ca^{2+} 浓度;2,4-D 还可以引起钙调素(CaM)含量的增加,并在一定浓度范围内表现出正相关;已分离的 CaM 基因 *arCaM*,对一般的胁迫没有反应,专门应答受生长素(2,4-D、IAA、NAA)诱发的反应;作为信号传导的主要成员 G 蛋白也参加了2,4-D 触发的体细胞胚发生的信号传导;利用免疫化学方法检测组织培养中 G-蛋白、arrestin 蛋白和核苷二磷酸激酶(NDPK)的表达,结果表明在离体培养条件下(有2,4-D 存在)三者都过量表达,而且由抗 G 蛋白抗体检测出一个附加的32 kD 蛋白,并认为这个蛋白可能是由生长素诱导表达的,而在非胚性组织里缺少该蛋白的信号。此外,Nilolai 等^[6]报道在胡萝卜体细胞胚发生早期克隆到一个 Ca^{2+} 结合蛋白(Calreticulin)的 cDNA, Northern 杂交显示它在发生早期表达水平最高,受2,4-D 的调节。

1.2 细胞分裂素信号转导

较多的研究证明植物体细胞胚发生中,CTK(细胞分裂素)与生长素有一定的协同作用,经分析认为启动细胞分化、脱分化不是外源激素与内源激素的简单相加,更可能是外源激素通过对内源激素的调节使内源激素达到新的平衡所致。对水稻等体细胞胚发生过程中内源生长素与 CTK

分析表明,IAA 的合成有利于胚性细胞的产生,CTK 的合成和胚性细胞的分化相联系^[7],也有单独使用外源 CTK 诱导产生体细胞胚^[8],近年新型高效细胞分裂素 TDZ(噻二唑苯基脲),在多种植物(葡萄、梨、草莓、棉花)体细胞胚诱导中发挥重要作用。在烟草组织培养中发现,外源 BA^[9]及玉米素、二氢玉米素及其他自由碱基形式玉米素^[10]进入细胞很快转化为核苷、尤其是糖苷核苷,通常认为自由碱基形式是活性形式,糖苷核苷是运输与贮藏形式。信号转导方面,虽然对拟南芥等模式植物的 CTK 受体成员以及所形成的特定信息可能激活 MAPK 级联途径有所研究,但 CTK 的信号转导途径还没有清晰的轮廓。

1.3 钙信号与体细胞胚发生

作为信号转导第二信使,钙有两方面重要功能,一是直接参与激活蛋白激酶 C(PKC),另一是与 CaM 结合,使多种蛋白激酶及其他依赖 Ca^{2+} -CaM 的酶活化,促进蛋白质磷酸化和细胞反应。在合子胚发育中, Ca^{2+} 的作用尤为明显, Ca^{2+} 的剧增激活一些基因表达,为合子的分裂和胚胎发育做准备。体细胞胚发生作为与合子胚发生类似的系统,其信号传导应有相似之处,檀香继代的原胚细胞团转入无激素的分化培养基时,出现了类似于受精时出现的 Ca^{2+} 浓度的波动(细胞质中 Ca^{2+} 的浓度上升了4倍),像受精一样触发了胚胎的发育,而且外源 Ca^{2+} 对体细胞胚发生有促进作用^[11]。在三叶胶(*Hevea brasiliensis*)的组织培养中,较高浓度的 Ca^{2+} 能有效地刺激富含胚性细胞的颗粒状愈伤组织的形成,同时保持很高的胚胎发生能力^[12],增加体细胞胚分化培养基中 Ca^{2+} ,可提高胚胎发生能力^[6,13],提高 N₆培养基 Ca^{2+} 对玉米幼胚胚性愈伤组织的诱导、继代和分化具有促进作用,在培养基中添加 CaM 抑制剂盐酸氯丙嗪(CPZ),可抑制 Ca^{2+} 的作用,说明玉米胚性愈伤组织诱导和继代受 Ca^{2+} /CaM 信息系统控制^[14]。加入 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 显著降低胚胎发生能力^[13]。用金霉素(CTC)和氟非那嗪(Fluphenazin)分别标记 Ca^{2+} 和 CaM,结果发现在胡萝卜体细胞胚发育的各个阶段 CTC 荧光要比原胚中高,CTC 均匀分布在胚胎中,而氟非那嗪在胚胎基部^[15]。枸杞(*Lycium barbarum*)的胚性愈伤组织中,CaM 在多细胞原胚、球形胚中最高,CaM 峰出现较 Ca^{2+} 峰出现稍晚些,加入外源 Ca^{2+} 后 CaM 几乎成倍增加,蛋白质组种类也增加^[13]。Yang 等^[16]分离了一

个 Ca^{2+} 结合蛋白 Zm SAUR1 与 SAURs (small auxin up RNAs) 具有序列同源性, 属于早期生长素反应基因家族, 这个结果提供了 Ca^{2+} -CaM 参与体细胞胚发生中基因表达调节作用的直接证据. 关于 Ca^{2+} 在体细胞胚发生中的时空动态分布, 李杉等^[17] 报道在枸杞胚性细胞分化早期的细胞间隙和细胞壁上均有 Ca^{2+} 沉淀, 随着多细胞原胚形成, 这时 Ca^{2+} 在细胞内的分布主要集中在细胞膜和液泡膜上, 球形胚期在细胞核中 Ca^{2+} 呈弥散性分布, 在此过程中, ATPase 活性时空分布与 Ca^{2+} 的定位变化具有高度一致性, 仅仅稍滞后于 Ca^{2+} 出现的时间, 而在非胚性愈伤组织中, 则未见两者活性呈时空动态分布, 由此推测, Ca^{2+} 和 ATPase 的时空分布对胚性细胞分化起着关键性作用.

1.4 活性氧与体细胞胚发生

植物细胞在离体培养过程中, 超氧化物歧化酶 [SOD]、 O_2^- 与 H_2O_2 的相互关系决定着细胞的分化. 近年来, 有关 ROS 信号传导的研究取得了长足进展, G 蛋白可能通过活化蛋白质磷酸化酶激活 NADH 氧化酶和增加 ROS 生成, ROS 作为第二信使, 通过氧化还原反应与靶分子非共价结合或对靶分子的磷酸化或去磷酸化修饰引起靶分子空间结构和活性的变化来传递信号, 如触发 MAPK 级联的信号传递. 在枸杞体细胞胚发生过程中, SOD 活性呈上升趋势直到多细胞原胚期, 只有 SOD 活性升高, 细胞分化才会发生, 相反过氧化物酶 [POD] 和过氧化氢酶 (CAT) 的活性呈下降趋势^[18], 用 SOD 抑制剂二乙基二硫代氨基甲酸钠 (DDC) 抑制了体细胞胚发生的频率, CAT 的抑制剂氨基三唑 (AT) 影响不明显^[19], 说明胞内 H_2O_2 的积累与体细胞胚发生有直接的关系. 胚性愈伤组织的内源 H_2O_2 的含量也远远高于相应的继代愈伤组织, 一定浓度的 H_2O_2 对枸杞胚性细胞的分化有促进作用, 将继代愈伤组织转入分化培养基 (含 H_2O_2 为 $200 \mu\text{mol/L}$) 时, 体细胞胚发生频率明显提高, 降低 H_2O_2 浓度则无此作用, 但高于此剂量对胚性细胞反而具有抑制作用^[18]. H_2O_2 促进胚性细胞分化的相关作用及机理有^[20]: H_2O_2 可能作为一种细胞信号物质, 诱导多种多肽的合成和引起细胞内 Ca^{2+} 的释放, 或改变细胞内 Ca^{2+} 的分布使其发挥下游信号分子作用, 从而调控基因的表达, 促进胚性细胞的分化. 目前, 植物细胞的氧化猝发及 H_2O_2 信号传导研究更多地与胁迫相关, 通过 ROS 在体胚发生中的积极作用, 以及体细胞

胚诱导必须加入各种激素或附加物, 而这些物质多为富含氧化原化合物 (peroxidant compound), 增加培养细胞的氧化胁迫这一事实, 使我们联想到“体细胞胚发生是细胞对环境胁迫的一种反应和适应”^[21] 的假说.

1.5 体细胞胚发生中的程序性细胞死亡

程序性细胞死亡 (PCD) 贯穿了生物个体发育过程, 在体细胞胚发生中, 胚性细胞分裂形成顶、基大小两个细胞, 基细胞只进行少数几次细胞分裂或不分裂, DNA 合成停止, 细胞质浓缩、凝聚或碎片化, 完成程序性死亡, 而顶细胞继续分裂形成胚^[22]. 胡萝卜、挪威云杉 (*Norway spruce*) 体细胞胚发生中也观察到程序性死亡的典型症状, 如核 DNA 断裂, 3'-OH 积累, 形成凋亡小体等^[23, 24], Ca^{2+} 、ROS (O_2^- 和 H_2O_2)、NO 诱发植物 PCD 的产生起重要作用已得到证实, 蛋白质磷酸化及 MAPK 途径在植物中可能通过参与对活性氧等含量的调节, 引起细胞过敏性死亡. 在植物胚性细胞发生与发育过程, 还有些细胞已完成或不再行使功能进入 PCD 过程, 如在多种植物胚性愈伤组织中, 胚性细胞发育到多细胞原胚期, 其周围细胞就开始发生规律性细胞死亡而造成“生理隔离”, 正在死亡的细胞还可能提供原胚细胞一些信号, 使后者发育成胚^[20].

2 体细胞胚成熟培养的信号转导

体细胞胚的成熟起始于体细胞胚的发育, 终止于萌发前的干化处理. 大部分木本植物体细胞胚经成熟培养提高体胚质量和同步发育数量. 目前成熟培养使用最多的是 ABA 预培养、乙烯合成的控制, 也常用高浓度蔗糖、甘露醇以及高分子量的聚乙二醇 (PEG) 和葡聚糖进行渗透胁迫. 其中研究较多的 ABA、蔗糖、水分胁迫信号间有十分错综复杂的关系.

2.1 脱落酸信号

合子胚发育后期, 内源 ABA 是诱发种子脱水成熟的关键因素, 关于植物体细胞胚发生、发育过程中 ABA 作用的信号转导研究还鲜见报道. 气孔关闭的信号受体实验发现感受 ABA 信号的受体位于质膜和胞内. 外源和内源 ABA 都对植物体细胞胚的发生、发育都有调节作用, 说明 ABA 受体在胞内和胞外都有存在, 加入外源 ABA 后内源 ABA 的含量明显升高, 由此推测胞内 ABA 受体在此起了关键作用^[20]. 相对其他激素来说,

ABA受体研究还比较落后,胞内游离 Ca^{2+} 对脱落酸反应很敏感,浓度或升或降,还有的“振荡”,这种差别在信号转导中的意义还不清楚.ABA处理后细胞磷酸肌醇系统的变化及其酸功能的关系研究还很少,ABA除了依赖钙离子的信号转导途径,还可以直接通过激活阴离子通道起作用.

已克隆了150多个受ABA调节的基因,其中大多数是与逆境胁迫和胚胎发生相关.植物胚胎发生后大量积累的一系列蛋白质称胚胎发生后期丰富蛋白(LEA蛋白),与种子成熟、脱水耐性密切相关,成为当前植物胚胎学与逆境生理学研究热点之一.*Lea*基因表达受发育阶段、ABA和脱水信号的调节,脱水信号的诱导作用有依赖或不依赖ABA参与的4条途径.在一般培养条件下,有些植物体细胞胚不积累或积累很少LEA及其他贮藏蛋白,必须加入一些外源因子如ABA才能诱导LEA蛋白合成,以促进体细胞胚成熟及提高耐脱水性.*RAB*(响应ABA基因)表达LEA蛋白的某些类型,在大麦糊粉层原生质体的研究^[25]表明,在ABA含量恒定的情况下,增加外源 Ca^{2+} 的浓度可检测到*RAB*mRNA表达的增加,*RAB*基因的表达被 Ca^{2+} 通道阻断剂、抑制剂和 Ca^{2+} 拮抗物所抑制,显然 Ca^{2+} 作为信号分子调控*RAB*基因的表达.

2.2 蔗糖信号

齐眉等^[26]克隆了1个与胡萝卜胚根发育相关的特异性cDNA片断,它属于*Lea*基因Dc3家族,该基因在高蔗糖水平培养下的调控胚中表达,在解调控后24h表达活性则基本消失,而且这种变化无法用PEG等渗透调控物质代替,因此推测蔗糖除了起调节渗透压作用之外,由于分子小可以透过细胞质膜被共质体吸收,发挥其他重要作用如信号因子的作用.其他事例如Klimaszewska等^[27]在研究北美落叶松(*Larix laricina*)时发现单独使用PEG不能促进体细胞胚的生长和发育,相反出现了早熟萌发,只有在单独使用蔗糖以及蔗糖和PEG同时使用时才能够观察到一些胚的正常发育.在黄连体胚转换试验中,15%果糖、葡萄糖、蔗糖经过过滤灭菌后催熟体胚,其中蔗糖、果糖得到80%以上的体胚转换率,经高压灭菌各糖的效应均下降,证明蔗糖的催熟功能依赖于分子结构完整^[28].最近Iraqi和Tremblay^[29]也阐述了蔗糖刺激云杉体胚发育的代谢机制.

植物体中的糖信号及其转导机制,蔗糖在植物叶肉细胞合成经韧皮部运输卸载到“库”,同时

作为信号分子激活或抑制不同组织中基因表达,如蔗糖专一性调控的基因包括拟南芥亮氨酸拉链(LZ)基因、农杆菌转录因子*TAB2*和*rolC*基因,还抑制一些光合基因的转录.另外,高浓度蔗糖能在转录水平上调节位于筛管质膜中蔗糖转运蛋白(SUT)的稳态mRNA水平.研究韧皮部同化物运输往往以发育的种子为材料,胚与母体组织之间没有胞间连丝,胚从质外体吸收蔗糖是以糖转运蛋白为载体的主动过程,该过程中蔗糖—质子同向运输起作用.值得注意的是转入胞内的蔗糖可降解为葡萄糖,参与己糖激酶依赖的转导途径,以至一些作者^[30,31]认为在大多数情况下,蔗糖的信号分子作用可被己糖(果糖和葡萄糖)替代,即葡萄糖和果糖可能是直接的信号分子.

植物糖信号传导途径并不是独立存在的,糖信号和激素信号间存在广泛而直接的相互作用.随着拟南芥胚胎发育,蔗糖磷酸合成酶(Sps)和蔗糖合酶(Sus)的活性增加,此时,种子中的ABA水平也增加,促进了贮藏物质(糖)的积累^[32].程玉兰等^[33]报道,经不同浓度蔗糖调控的胡萝卜体细胞胚结果表明,随着胚的生长发育,内源ABA含量呈上升趋势,一旦将调控胚解调控,体细胞胚内源ABA含量则明显下降,表明蔗糖浓度可导致体胚内源ABA水平的变化,而用外源ABA处理的效应与高浓度蔗糖处理有所差异,表明两者的调控相似又不尽相同,所以在蔗糖调控胡萝卜体细胞胚发育的信号传递网络中ABA可能是一个重要的中介信号因子.

2.3 水分胁迫信号

植物在水分胁迫下的信号传导链(网)有较多的研究,至少有4条依赖或不依赖ABA的信号转导途径.Skriver等^[34]发现植物遇水分亏缺时常常积累一些特异性的RNA和蛋白质,其中部分蛋白质类似于种子胚发育中后期所特有的,如禾谷类胚中的*Em*(胚胎成熟)基因编码的蛋白质和其他相对分子量在10~25kD的蛋白质,干旱胁迫期间受ABA诱导合成的蛋白质中许多也和种子胚发育期间合成的蛋白质相似.高述民^[35]报道ABA和PEG分别处理胡萝卜的调控(体)胚中S₁点(与渗透调节密切相关的特异蛋白质多肽)有相同的变化规律,认为PEG引起胚体内ABA的变化,由ABA完成对体胚的一系列调控作用,或者PEG和ABA二者先分别经历不同途径,最终调节同一基因的表达.也有PEG和外源ABA导致不

同的代谢变化的事例,如龙眼体胚成熟过程中,在黑暗低糖加 PEG6000 培养下,体胚淀粉含量变化呈单峰型,在黑暗低糖加 ABA 培养下,淀粉含量变化呈双峰型^[36]。大豆体细胞胚在脱水之前萌发率很低,仅用 ABA 处理不能提高萌发率,经过干燥处理的萌发率大为增加。

干旱胁迫普遍引起植物体内蔗糖积累,这时蔗糖合成酶基因和蔗糖磷酸合成酶基因的表达量也增加。在调节基因表达中,糖胁迫可能与其他胁迫信号相耦联,如细胞受糖胁迫, α -淀粉酶与其他胁迫相关基因蛋白一起被诱导,而用水分胁迫也可增强 α -淀粉酶基因表达。Ho 等^[37]认为糖胁迫信号与其他胁迫信号可能由同一或不同感受器感知,在信号转导途径的下游汇集。

关于植物干旱胁迫的信号转导,质膜上组氨酸激酶(HK)受体等可能起渗透感受器的作用,胞质中 G 蛋白在上游信号转导中起重要作用, Ca^{2+} 和 IP_3 可能充当脱水信号的第二信使,其下游传导主要有钙依赖型蛋白激酶(CDPK)途径和 MAPK 途径作用于基因表达,最终对水分胁迫作出反应。最近第二信使作用研究进展较快,表明水分胁迫下可以诱导 ROS 形成,而 ABA、NO 可通过各种方式与 ROS 对话发挥传递信号作用。

与合子胚相比,体细胞胚诱导、发育、成熟的信号传导研究才刚刚起步而相对滞后。相对体细胞胚诱导的生理学与分子生物学研究成果,成熟阶段的培养并没有引起足够重视(更多的就合子胚、体细胞胚成熟的物质基础进行比较研究),以致新的资料相对匮乏。激素是诱导体细胞胚发生的决定性因子,但它们如何通过细胞信号转导而影响胚胎特异基因表达还不完全清楚,水分、光、温、金属离子和活性氧对体细胞胚发生的作用机制研究较少。关于生长素和细胞分裂素、蔗糖和 ABA 等双因子影响体细胞胚发生的研究近几年才起步,应给予更多关注。相信随着人们对植物形态发生机制认识的深入,最终会揭示体细胞胚发生这一特定细胞分化过程的本质。

参考文献 (References):

- [1] LOSCHIAVO F, PITTO L, GIULIANA G, et al. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs[J]. Theor Appl Genet, 1989, 77: 325-331.
- [2] HAO Y J, DENG X X. Stress treatments and DNA methylation affected somatic embryogenic of Citrus callus[J]. Acta Bot Sin, 2002, 44(6): 673-677.
- [3] 陈以峰, 周 樊, 汤日圣, 等. 水稻体细胞培养中胚性细胞出现与 IAA 的关系[J]. 植物学报, 1998, 40(5): 474-477.
- [4] LOSCHIAVO F, FILIPPINI F, COZZANI F, et al. Modulation of auxin-binding protein in cell suspension. I Different responses of carrot embryo cultures[J]. Plant Physiol, 1991, 97: 60-64.
- [5] 施小龙, 邢更妹, 汪丽虹, 等. 植物钙信号系统与体细胞胚发生[J]. 生命科学, 2002, 14(5): 302-305.
- [6] NILOLAI B, LEONID S, KLAUS A, et al. Calreticulin expression in plant cell: developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution[J]. Planta, 1998, 206(4): 504-514.
- [7] 向太和, 梁海曼, 钟华鑫, 等. 水稻胚性悬浮细胞系建立过程中的生理生化变化 II. 氨基酸、多糖及内源激素的变化[J]. 作物学报, 1997, 23(3): 353-359.
- [8] 周俊彦, 郭扶兴. 细胞分裂素类物质在植物体细胞胚发生中的作用[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(4): 247-253.
- [9] BARENDSE G W M, CROSE A F, BOSVELD M, et al. Uptake and metabolism of NAA and BAP in explants of Tobacco in relation to *in vitro* flower bud formation[J]. J Plant Growth Regul, 1987, 6(4): 193-200.
- [10] CHRISTEN H, JAN C, HENRI V O. The accumulation and metabolism of plant growth regulators during organogenesis in cultures of thin cell layers of *Nicotiana tabacum*[J]. Physiol Plantarum, 1991, 83(4): 578-584.
- [11] ANIL V S, SANKALA R K. Calcium-mediated signaling during sandalwood somatic embryogenesis, role for exogenous calcium as second messenger[J]. Plant Physiol, 2000, 123: 1301-1311.
- [12] MONTORO P, ETIENNE H, MCCHAUX F, et al. Callus-friability and somatic embryogenesis in *Heava brasiliensis*[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1993, 33: 331-338.
- [13] 邢更妹, 井茹芳, 李 杉, 等. 枸杞体细胞胚发生中外源 Ca^{2+} 的作用[J]. 植物生理与分子生物学报, 2004, 30(3): 261-268.
- [14] 付凤玲, 李晚忱, 荣廷昭, 等. N6 培养基添加钙和烯效唑对玉米幼胚培养的作用[J]. 作物学报, 2005, 31(5): 634-639.
- [15] TIMMERS A C J, DEVRIS S C, SHEL J H N. Distribution of membrane-bound calcium and activated calcium during somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.) [J]. Protoplasma, 1989, 153: 24-29.
- [16] YANG T, POOVAIAH B W. Molecular and biochemical evidence for the involvement of calcium/calmodulin in auxin action[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 3137-3143.
- [17] 李杉, 邢更妹, 崔凯荣, 等. 枸杞体细胞胚发生中 Ca^{2+} 和 ATPase 的超微结构定位研究[J]. 实验生物学报, 2003, 36(6): 414-420.
- [18] 崔凯荣, 邢更生, 王亚馥, 等. 枸杞组织培养中抗氧化酶活性与体细胞胚发生相关性的研究[J]. 兰州大学学报, 1998, 34(3): 93-99.
- [19] CUI K R, XING G S, LIU X M, et al. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L.[J]. Plant Sci, 1999, 146(1): 9-16.
- [20] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [21] DUDITS D, BOGRE I A, GYORGYEY J. Molecular and cellu-

- lar approaches to the analysis of plant embryo development from somatic embryogenesis[J]. *J Cell Sci*, 1991, 9(4): 475-482.
- [22] MCCABLE R F, LEVINE P A, MEIJER J, *et al.* A carrot programmed cell death pathway suppressed by social signaling[J]. *Plant J*, 1997, 12: 267-280.
- [23] HAVEL L, DURZAN D J. Apoptosis in plants[J]. *Bot Acta*, 1996, 109: 268-277.
- [24] MCCABE P F, PENNELL R I. Apoptosis in plant cells *in vitro*[A]. KOTTER T G, MARTIN S J. *Techniques in Apoptosis*[C]. London: Portland Press, 1996. 301-326.
- [25] VANDEMEULEN R M, VISSER K, WANG M. Effects of modulation of calcium and calcium fluxes on ABA-induced gene expression in *Barley aleurone*[J]. *Plant Sci*, 1996, 117: 75-82.
- [26] 齐眉, 陈凡, 黄美娟, 等. 胡萝卜 *lea* 基因 cDNA 片段的克隆及其表达特性分析[J]. *科学通报*, 1999, 44 (18): 1959-1963.
- [27] KIIMASZEWSKA K, DEVANTIER Y, LACHANCE D, *et al.* *Larix laricina*(tamarack): somatic embryogenesis and genetic transformation[J]. *Can J For Res*, 1997, 27: 538-550.
- [28] 桂耀林, 徐廷玉, 顾淑荣, 等. 黄连体细胞胚胎发生的研究[J]. *植物学报*, 1989, 31(12): 923-927.
- [29] IRAQI D, TREMBLAY F M. Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development[J]. *J Exp Bot*, 2001, 52: 2301-2311.
- [30] JANG J C, SHEEN J. Sugar sensing in higher plants[J]. *Plant Cell*, 1994, 6: 1665-1679.
- [31] JANG J C, SHEEN J. Sugar sensing in higher plants[J]. *Trends Plant Sci*, 1997, 2: 208-214.
- [32] FINKELSTEIN R R, GIBSON S I. ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voice in a crowd? [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 5: 26-32.
- [33] 程玉兰, 黄美娟, 刁丰秋, 等. 蔗糖调控培养对胡萝卜体细胞胚内源 ABA 水平的效应[J]. *植物学报*, 1999, 41(7): 761-765.
- [34] SKRIVER K, MUNDY J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress[J]. *Plant Cell*, 1990, 2: 503-512.
- [35] 高述民. ABA 和 PEG 对胡萝卜体细胞胚诱导和调控的影响[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2001, 29(2): 13-16.
- [36] 李冬梅, 赖钟雄. 龙眼胚成熟过程中淀粉含量的变化[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2005, 34(2): 220-223.
- [37] HO S L, CHAO Y C, TONG W F, *et al.* Sugar coordinately and differentially regulates growth and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms[J]. *Plant Physiol*, 2001, 125: 877-890.

(上接第 45 页) 只有少数的科研院所开展这方面的工作. 因此植物大片段 DNA 的研究的力量还需加强.

参考文献 (References):

- [1] SHIZUYA H, KOUROS-MEHR H. The development and application of bacterial artificial chromosome cloning system[J]. *Keio Journal of Medicine*, 2001, 50 (1): 26-30.
- [2] SHIZUYA H, BIRREN B, KIM U, *et al.* Cloning and stable maintenance of 300 kilobase pair fragments in *Escherichia coli* using an F factor based vector[J]. *PNAS*, 1992, 89(18): 8794-8797.
- [3] KIM U J, BIRREN B W, SLEPAK T, *et al.* Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library[J]. *Genomics*, 1996, 34(2): 213-218.
- [4] MOZO T, FISCHER S, SHIZUYA H, *et al.* Construction and characterization of the IGF *Arabidopsis* BAC library[J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 99: 305-313.
- [5] HAMILTON C M, FRARY A, LEWIS C, *et al.* Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosome[J]. *PNAS*, 1996, 93(18): 9975-9979.
- [6] IOANNOU P A, AMERMIYA C T, GARNES J, *et al.* A new bacteriophage p1-derived vector for propagation of large human DNA fragments[J]. *Nature Genetics*, 1994, 6: 84-89.
- [7] LIU Y G, SHIRANO Y, FUKAKI H, *et al.* Complementation of plant mutant with large genomic DNA fragments by a transformation competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning[J]. *PNAS*, 1999, 96(11): 6535-6540.
- [8] 顾红雅. 植物分子生物学实验手册[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998. 4-6.
- [9] DANIEL G, PETERSO N. Construction of Plant Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Libraries: an Illustrated Guide [M]. University of Georgia Press, 2002.
- [10] THANKSLEY S D. Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes[J]. *Trends in Genetics*, 1995, 11(2): 63-68.
- [11] MADAM M. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants[J]. *Molecular Breeding*, 1997, 3: 87-103.
- [12] ALLIOUS S. Construction of a BAC library of pearl millet, *Pennisetum glaucum*[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 1200-1205.
- [13] MILLER J M. Cloning and characterization of a centromere-specific repetitive DNA element from *Sorghum bicolor* [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 832-839.