

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2023.24103

综述

植物体细胞胚胎发生的分子机制

韩 贝 孙思敏 孙伟男 杨细燕* 张献龙

华中农业大学作物遗传改良全国重点实验室, 湖北武汉 430070

摘 要: 植物细胞的全能性是指每个细胞均具有该植物的全部遗传信息, 其离体组织或细胞在适当培养条件下具有发育成完整植株的潜能。植物体细胞胚胎发生是最能体现植物细胞全能性的一种方式, 其在人工种子、单倍体育种、无性繁殖和种质保存等领域具有广阔的应用前景, 其发生的机制也是基础研究领域的热点。近年来, 随着技术的进步及研究的深入, 植物体细胞胚胎发生的分子调控机制取得了重要进展。植物体细胞胚胎发生是一系列基因在时空顺序上表达调控的结果。本文系统综述了体细胞胚胎发生过程中激素及逆境胁迫信号转导、胚胎发育相关转录因子、胞外蛋白和表观遗传调控的作用, 并对本领域未来的研究重点及方向进行了展望。

关键词: 体细胞胚胎发生; 激素及逆境胁迫信号转导; 转录因子; 表观遗传修饰

Molecular mechanisms of somatic embryogenesis in plants

HAN Bei, SUN Si-Min, SUN Wei-Nan, YANG Xi-Yan*, and ZHANG Xian-Long

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: Plant cell totipotency refers to that each cell has all the genetic information of the plant, and *in vitro* tissues or cells has the potential to develop into a whole plant under appropriate culture conditions. Somatic embryogenesis is the most efficient way to reflect the totipotency of plant cells. It has broad application prospects in the fields of artificial seeds, haploid breeding, asexual reproduction, and germplasm preservation, and its mechanism is also a hotspot in basic research. In recent years, with the development of technology and in-depth research, the molecular regulation mechanism of plant somatic embryogenesis has made important progress. Plant somatic embryogenesis is the result of the expression and regulation of a series of genes in spatiotemporal order. In this review, we systematically reviewed the roles of hormones and stress signal transduction, embryonic development related transcription factors, extracellular proteins, and epigenetic regulation in somatic embryogenesis, and prospected future research priorities and directions in this field.

Keywords: somatic embryogenesis; hormone and stress signaling transduction pathways; transcription factor; epigenetic regulation

植物体细胞胚胎发生是指由体细胞经过离体培养产生胚状体的过程, 该过程可直接从外植体表皮、亚表皮、悬浮细胞、原生质体发生, 也可以从脱分化的外植体形成愈伤组织的外部或内部产生。从体细胞向胚性细胞转变是体细胞胚胎发生的前提, 该过程中离体的植物细胞经历脱分化形成愈伤组织, 然后脱分化状态的愈伤组织和细胞经历再分化过程, 再度分化成不同类型的细胞、组织和器官, 甚至最终再生成完整的植株。这一过程涉及细胞的重编程、激活

细胞周期、细胞分化及器官发育过程, 受到众多转录因子、激素信号传导途径及表观遗传修饰等构成的复杂网络调控。本研究就体细胞胚胎发生过程中关键基因的功能及调控机制、表观遗传机制及关键基因的应用等进行综述, 为深入解析体细胞胚胎发生的分子机制及细胞全能性的研究提供理论依据。

1 激素信号转导与植物体细胞胚胎发生

在体细胞胚胎发生过程中, 通过不同激素的配

本研究由国家重点研发计划项目(2018YFD1000907)资助。

This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD1000907).

* 通信作者(Corresponding author): 杨细燕, E-mail: yxy@mail.hzau.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: bhan_z@163.com

Received (收稿日期): 2022-04-08; Accepted (接受日期): 2022-08-01; Published online (网络出版日期): 2022-08-09.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20220808.1609.002.html>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

合使用可以有效调控体细胞胚胎发生的各个发育阶段。比如,通过调节生长素(auxin)与细胞分裂素(cytokinin, CTK)比率促进脱分化和愈伤增殖,通过添加低浓度的乙烯(ethylene)促进体细胞胚胎发生,通过赤霉素(gibberellins, GAs)调控胚性培养物到球形胚的转化,通过添加脱落酸(abscisic acid, ABA)来提高体细胞胚的质量等。外源激素对体细胞胚胎的作用主要是通过胞外或胞内的激素受体将外界刺激信号转到核内,从而调控基因的表达,启动发育程序。

1.1 生长素信号传导及体细胞胚胎发生

生长素是诱导植物体细胞胚胎发生过程的重要植物生长调节剂。其中 2,4-D 在植物体细胞胚胎发生中的应用较为广泛。一定浓度的生长素能够促进愈伤组织的诱导和增殖。在棉花体细胞到胚性细胞的转变中,伴随着内源生长素水平的升高,表现为生长素信号途径的激活^[1]。与生长素合成、极性运输和响应相关的基因被认为是植物体细胞胚胎发生的关键基因。目前已从不同植物中已解析出多个受生长素诱导表达的基因,这些基因包括 *GH3s*

(Gretchen Hagen 3)、*PINs* (Pin-formed)、生长素/吲哚乙酸蛋白基因(auxin/indole-3-acetic acid, *AUX/IAAs*)、生长素响应因子基因(auxin response factors, *ARFs*)和 *SAURs* (small auxin-up RNAs)。生长素信号通路依赖生长素响应因子,尤其是 *JMJ30* (jumonji C domain-containing protein 30)与 *ARF7* 和 *ARF19* 相互作用并直接与 *LBD* (lateral organ boundaries domain) 家族基因(*LBD16*, *LBD17* 等)的瞬时元件结合激活它们的表达, *LBD* 家族基因诱导 *E2Fa* 的表达,促进愈伤组织的增殖(图 1)^[2-4]。另外,在体细胞胚胎发生过程中,外源生长素能激活胚胎发育相关转录因子调控网络,转录因子 *BABY BOOM* (BBM)和 *LEC1-ABI3-FUS3-LEC2* (LAFL)复合物是体细胞胚胎发生的主要调节因子。BBM 编码 AIL (aintegumenta-like) 并直接调节所有 LAFL 基因^[5]。同时 LAFL 基因也可以激活生长素合成和运输进而调控体细胞胚胎发生。在体细胞胚胎发生过程中,在 SAM 区域的较高浓度的生长素会诱导 *WUS* (WUSCHEL)基因的表达,进而激活 *PIN1* 蛋白的极性定位,促进体细胞胚胎的生长和发育^[6]。

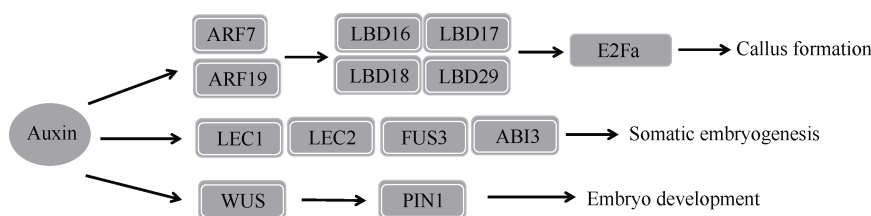


图 1 生长素信号传导及体细胞胚胎发生

Fig. 1 Auxin signaling and somatic embryogenesis

1.2 细胞分裂素信号与愈伤组织的增殖

在植物体细胞胚胎发生过程中,大部分情况下生长素不是独立发挥作用,只有当生长素和细胞分裂素维持在合适的比例时,才能促进愈伤组织的产生^[7]。细胞分裂素信号转导是一个“磷酸接力传递”的过程。细胞分裂素首先结合受体组氨酸激酶(histidine kinases, HK)并使其磷酸化,将磷酸基团转移给胞质中的磷酸转运蛋白(histidine-phosphotransfer protein, HP),磷酸化的 HP 进入细胞核并将磷酸基团转移到 A 型和 B 型反应调节因子(Arabidopsis response regulator, ARR)上,进而进行信号的传递和激活。拟南芥中超表达 *ARR1* 促使细胞周期相关基因的表达,从而促进愈伤组织的分裂与增殖^[8]。细胞分裂素信号的抑制基因 *ARR7* 和 *ARR15* 的超表达会抑制拟南芥根系顶端分生组织的起始和拟南芥的体

细胞胚胎发生,在拟南芥细胞分裂素受体基因 *ahk2ahk4* 和 *ahk3ahk4* 双突变体中,再生体细胞胚的根尖和茎尖发育畸形^[9]。

1.3 乙烯信号与体细胞胚胎发生

植株的再生能力与乙烯的敏感性有一定的关联,乙烯含量的升高及其信号途径的激活有利于体细胞胚胎发生^[10]。拟南芥中的研究表明,用乙烯合成抑制剂处理或超表达乙烯合成抑制基因 *ETO1* (ethylene-overproducer 1)会降低外植体的再生能力,乙烯不敏感突变体(*etr1-1*, *ein2-1* 等)的再生能力下降,而乙烯响应负相关因子突变体(*ctr1-1*, *ctr1-12*)的再生能力增强^[11]。在大豆体细胞胚胎发生过程中,添加一定浓度的乙烯合成前体 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)显著促进大豆的体细胞胚胎发生效率,而利用乙烯抑制剂

氨基乙氧基乙烯甘氨酸 (aminoethoxyvinylglycine, AVG) 等处理则显著抑制大豆的体细胞胚胎发生率^[12]; 在棉花中, 乙烯及其信号对愈伤组织的增殖起着正向调控作用。超表达 *SPL10* (squamosa-promoter binding protein-like 10) 促使乙烯合成酶相关基因 *ACO*s (1-aminocyclopropane carboxylic acid oxidases) 的表达, 从而提高愈伤组织的增殖率, 乙烯合成抑制剂 AVG 抑制处理降低乙烯的含量并显著抑制愈伤组织的增殖; 而乙烯合成前体 ACC 处理则显著促进外植体愈伤组织的增殖^[13]。

2 逆境胁迫信号与愈伤组织再生

理论上所有离体植物细胞在合适的外界环境下均可表现全能性。外界环境因素(特别是逆境因素)是体细胞胚胎发生的重要影响因素。逆境因子(包括机械损伤)在体细胞胚胎发生的几个主要阶段都起着重要的作用, 很多研究者都将逆境因子的调控作为优化体细胞胚胎发生体系的重要手段。在现有的诱导愈伤组织体系中, 培养基多采用MS培养基, 相对于维持植株正常生长或萌发胚生根成苗的含有逆境因子的低糖、低盐、低渗的SH培养基及1/2 MS培养基来说, MS培养基无机盐含量较高, 微量元素种类较全, 浓度也较高。另外, 很多物种, 包括胡萝卜、苜蓿、烟草等, 均有通过利用逆境处理来促进体细胞胚胎形成及发育的研究, 涉及到的逆境因素也多种多样, 主要有ABA处理、饥饿处理、渗透胁迫、高温处理等^[14-15]。

机械损伤是愈伤组织诱导原初诱导触发因子^[16]。再生的发生一般都是在创伤部位开始的。创伤可以诱导许多细胞反应, 包括激素的积累(茉莉酸)、 Ca^{2+} 快速流入、活性氧(reactive oxygen species, ROS)爆发、细胞间远程通讯中断等。拟南芥(WIND1 WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1)及其同源物WIND2~WIND4是这一过程的中心调节因子。WIND1~WIND4是AP2/ERF转录因子家族成员, 在愈伤组织诱导过程中会在受伤处诱导迅速表达, 并促进细胞的脱分化及愈伤组织增殖。异位表达 *WIND1* 可使成熟的体细胞摆脱正常的分化程序而启动诱导在组织和结构上无定形的细胞增殖, 以及保持其脱分化状态^[17]。转基因植株(35S:*WIND1*)细胞状态与2,4-D所诱导的愈伤组织细胞类似。WIND1蛋白是细胞分裂素应答的正调节因子, 主要通过B型 *ARR* 基因促进细胞分裂素信号传导并直接激活 *ESR1* (enhancer of shoot regeneration1) 从而促进愈伤组织的形成(图2)^[17]。在损伤时也会诱导 *IPT3* (sopentenyltransferase 3)、*LOG1* (lonely guy 1)、*LOG4* (lonely guy 4) 和 *LOG5* (lonely guy 5) 并提高细胞分裂素水平, 进而通过 *CYCD3;1* (D-type cyclin 3;1) 重新激活细胞周期^[18]。其他AP2/ERF (APETALA2/ethylene response factor) 基因, 如 *ERF115* 和 *PLT3* (PLETHORA3)、-5、-7也在伤口诱导的愈伤组织形成过程中上调表达, 并且还发现AP2/ERF和CTK介导的途径调控网络广泛串联^[19]。

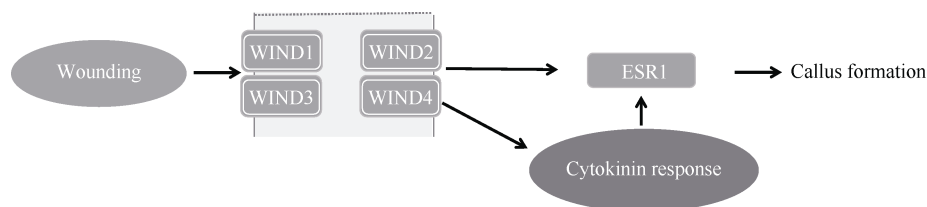


图2 机械损伤通过调节因子 WINDs 调控愈伤组织形成

Fig. 2 Mechanical damage regulates callus formation through the regulatory factor WINDs

3 转录因子与体细胞胚胎发生

虽然体细胞胚胎发生过程受诸多外界环境因素的影响, 但归根结底是在各种因素的作用下, 体细胞中某些特异的基因启动表达, 从而使体细胞脱分化并再分化转变为胚性细胞。许多研究人员致力于解析体细胞胚胎发生过程的相关基因, 目前已鉴定和克隆了大量与体细胞胚胎发生相关的转录因子, 其中许多参与调节合子胚发生、分生组织分化和维持的转录因子都在体细胞胚胎发生过程中起着重要作用。

3.1 核因子 Y (nuclear factor Y, NF-Y)

核因子 Y (nuclear factor Y, NF-Y), 又称 CCAAT 盒结合因子(CCAAT-binding factor, CBF)或亚铁血红素激活蛋白(heme activator protein, HAP), 是一类普遍存在于酵母、动物、植物等真核生物中的转录因子, 通常由 3 种不同亚基组成, 即 NF-YA (CBF-B 或 HAP2)、NF-YB (CBF-A 或 HAP3) 和 NF-YC (CBF-C 或 HAP5) 3 个家族^[20]。植物 NF-YB 对胚胎发生具有重要作用^[21]。拟南芥中 NF-YB 家族共有 13 个成员,

分为 LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1) 类和非 LEC1 2 类蛋白, 其中 LEC1 类包括 LEC1 和 LEC1-LIKE (L1L), 是植物胚胎形成的中枢调控因子^[22]。LEC1 在胚性细胞、体细胞胚和未成熟种子中高表达, 并可赋予体细胞向胚性细胞发育的能力, 在体细胞胚胎发育的早期能维持胚性细胞的命运, 目前在多个物种中将其作为体细胞胚胎发生的标记基因^[23-24]。L1L 与 LEC1 类似, 在胚性愈伤组织、体细胞胚和未成熟种子中高表达, 而在非胚性愈伤组织、营养组织中表达量较低, L1L 的异位表达可以代替 LEC1 发挥作用, 在柑橘营养组织中异位表达 L1L 会诱导出胚^[25]。

3.2 B3 结构域转录因子

B3 结构域转录因子家族属于植物特异性转录因子家族。其中 LEC2、FUS3 (FUSCA3) 和 ABI3 是含有 B3 结构域的与胚胎发育相关的调控因子, 是一类胚胎发育相关的标志基因, 与 LEC1 存在协同调控作用^[26-27]。过量表达 (或异位表达) LEC2 基因调控 LEC1、L1L、FUS3、ABI3 (abscisic acid-insensitive 3) 和 WR1 (wrinkled 1) 等转录因子基因的表达, 并促使体细胞向胚性细胞的转变, 从而使转基因植物具有了胚胎的特性^[27]。与 LEC1 促进胚性细胞的形成不同, LEC2 可直接诱导形成体细胞胚胎, 两者可能激活不同的调控路径^[28]。同样, FUS3 基因在顶端分生组织特异表达, 可以促使转基因植物在顶端分生组织产生体细胞胚^[27]。LEC2、FUS3 和 ABI3 的下调则显著抑制直接和间接体细胞胚胎发生^[5]。LEC2、FUS3 和 ABI3 同时受生长素的诱导表达, 而且 LEC2 也可以对生长素合成基因 YUC4 (YUCCA4) 直接调控, 同时激活生长素响应基因的表达, 进而激活生长素信号传导途径^[29]。

3.3 AP2/ERF 结构域蛋白

AP2/ERF 结构域蛋白是植物特异性转录因子家族, 它们参与许多发育过程的调节。有几个 AP2/ERF 家族成员参与调控体细胞胚胎发生, 其中研究得最多的是 BBM。BBM 最初是从甘蓝型油菜花粉体细胞胚中分离得到的, 并在花粉体细胞胚和合子胚中表达。在拟南芥、辣椒、毛白杨等物种中的研究表明 BBM 基因是植物细胞全能性的关键调控因子, 在体细胞胚胎发生过程中该基因能促进细胞分裂和形态发生, 异位表达 BBM 基因或者拟南芥 *AtBBM* 基因能在没有外源植物生长调节剂或胁迫的情况下诱导体细胞胚胎的发生^[30]。BBM 能结合 LAFL 基因的

启动子, 从而调控这些基因的表达, 进而调控 *WOX2* (WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 2) 和 *WOX3* 等早期胚胎发生基因; 反过来, *BBM* 的表达也受到 LAFL 蛋白质的调节, 它们形成交互网络共同促进体细胞胚胎发生^[31-32]。另一个成员是拟南芥 *EMK* (EMBRYO MAKER) 在胚发育的早期和成熟胚中表达, 异位表达 *EMK* 促进拟南芥子叶体细胞胚胎发生的启动^[33]。在机械损伤部分提到过的 *WIND1*~*WIND4* 也是 AP2/ERF 转录因子家族中调控体细胞胚胎发生的成员, *WIND1* 可以与 LEC 途径相互作用, 与单独激活 *WIND1* 或 *LEC2* 相比, 在外植体中按顺序依次激活 *WIND1* 和 *LEC2* 能诱导出更多的胚性愈伤^[19]。

3.4 同源异形域转录因子

同源异形域 (homeodomain, HD) 是指真核生物中一个由约 60 个氨基酸组成的高度保守的具有转录因子特征的 DNA 结合域, 其最早是在果蝇体节发育中发现并命名的, 之后在高等植物中发现包含该类结构域的基因有重要作用。其中 WOX 转录因子家族在胚的发育、顶端分生组织建成和器官形成中发挥重要作用。*WUS* 是 WOX 家族中最早发现的成员, 在分生组织阶段该基因的表达受生长素和细胞分裂素的诱导, 调控分生组织维持的特性; 反之, *WUS* 基因调控体细胞胚胎发生过程中生长素依赖的营养组织向胚性组织转变^[34-35]。超表达 *WUS* 会诱导体细胞胚胎发生及茎尖和根尖器官发生, 异位表达 *WUS* 基因可使那些难以诱导体细胞胚胎发生的顽拗型材料去分化产生不定芽和体细胞胚^[35-36]。*WUS* 基因是细胞分裂素应答的负调节因子, 通过抑制 A 型 *ARR* 基因的表达, 与细胞分裂素信号传导途径协同作用, 进而决定体细胞胚胎过程中某些细胞的命运^[37]。另外由于 *WUS* 可以穿过顶细胞层并激活其负调控因子 *CLV3* (CLAVATA3) 的转录, 这种 *WUS*-*CLV* 的反馈回路可以维持干细胞库的稳定和顶端分生组织的发育^[34,36]。WOX 家族其他成员也被发现具有调控体细胞胚胎发生的功能。在拟南芥中, *AtWOX2* 是胚胎发育中细胞命运决定和顶端分化的调控因子, 包括顶端分生组织干细胞的启动, 发育后期 *WOX2* 还参与侧生器官的形成和分离^[38]。在松树中 *WOX2* 被作为体细胞胚胎发生的标志基因^[39]。*STM* (SHOOT MERISTEMLESS) 是同源异形域转录因子 KNOXI (KNOTTED1-like homeobox 1) 家族的成员, 与 *WUS* 和 *CLV3* 共同作用保持顶端分生组织的干细胞微环

境, 并调节细胞增殖和分化的平衡^[40]。甘蓝型油菜中 *STM* 的异位表达可以调节对外源生长素的敏感性并促进拟南芥体细胞胚胎发生^[41]。

4 体细胞胚胎发生过程中的信号转导

4.1 类受体激酶与体细胞胚胎发生

SERK (somatic embryogenesis receptor-like kinase) 是体细胞胚胎发生过程中促进体细胞向胚性细胞转变的关键激酶。它首先是在研究胡萝卜体细胞向胚性细胞转变的过程中发现的, 其仅在胚性细胞的球形期表达, 而在非胚性细胞或其他时期的体细胞胚胎中均不表达^[42]。SERK 属于富含亮氨酸重复序列受体类似激酶(leucine-rich repeat receptor-like kinase, LRR-RLK)亚家族的成员, 通过识别分子信号进而介导其蛋白的 LRR 结构域与胞外蛋白结合, 诱导细胞内的信号级联放大。这些信号可识别不同的靶标, 并利用染色质重塑提高体细胞胚胎发生早期响应基因的表达(如 *LEC* 和 *BBM*), 从而诱导组织或体细胞向胚性细胞发生转变^[43]。异位表达拟南芥 *SERK1* 基因可促进其体细胞胚胎发生, 该基因可作为体细胞胚胎发生过程中标记基因^[44]。植物激素对 SERK 基因的表达和信号转导起重要作用。*SERK1* 的表达受到生长素和细胞分裂素的协同调控, *SERK2* 和 *SERK3* 则参与生长素特异性反应, 并且 *SERK1* 和 *SERK5* 与油菜素内酯信号传导有关^[45]。*CLV1* 也是属于 LRR-RLK 亚家族的成员, 虽与 SERK 同属一个家族, 但它们在体细胞胚胎发生中的功能却是相反的, 在芸薹属植物中, *CLV1* 抑制体细胞胚胎发生转录因子(如 *WUS*)的表达进而抑制体细胞胚胎发生^[38]。

4.2 钙信号与体细胞胚胎发生

Ca^{2+} 作为第二信使, 在植物生长发育及环境响应中起着重要的作用。有研究认为液泡 Ca^{2+} 浓度增加是识别胚胎发生细胞的原初信号, 胚性细胞启动胚胎发育时伴随着较大的 Ca^{2+} 浓度的波动, Ca^{2+} 的梯度调控胚胎发育阶段极性分化及器官建成^[46]。较高浓度的 Ca^{2+} 提高胚性愈伤组织的形成和胚胎发生的频率, 缺乏 Ca^{2+} 会阻止体细胞胚的形成。

细胞 Ca^{2+} 信号由 Ca^{2+} 感受器进行感受并传递。植物中存在 3 种主要的 Ca^{2+} 感受器。被熟知的是钙调素(calmodulin, CaM)和类钙调素蛋白(calmodulin-like proteins, CMLs)^[47]。CaM 受生长素诱导表达, 并在诱导体细胞胚胎发生后期(胚性愈伤到胚发育阶段)特异性表达, 一般定位于发育中胚胎的分生组织

区域。CaM 具有促进细胞增殖的作用; 采用钙调素抑制剂 W7 [*N*-(6-氨基己基)-5-氯-1-萘磺胺盐酸盐] 处理则会抑制体细胞胚胎发生。钙依赖蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase, CDPK)是第 2 类 Ca^{2+} 感受器, 它包含一个 C-末端 CaM 样结构域, 可以直接结合 Ca^{2+} 并进行下游信号的传递, 阻断 CDPK 介导的信号通路抑制胚胎发生^[48]。第 3 类 Ca^{2+} 感受器是钙调磷酸酶 B 亚基类似蛋白(calcineurin B-like protein, CBL)家族, 与 CaM 不同, CBLs 只在高等植物中存在, 并特异与蛋白质激酶 CIPKs (CBL-interacting protein kinases)家族相互作用进行钙信号转导^[49]。在棉花体细胞胚胎发生过程中发现 *CBL* 和 *CIPK* 家族基因差异表达, 超表达 *CIPK6* 基因影响棉花体细胞的脱分化过程, 并可能与生长素信号通路存在交叉互作^[1]。

5 胞外蛋白与体细胞胚胎发生

为了在植物中诱导体细胞胚胎发生, 已经开发了多种诱导系统。这些系统中的分子有助于激发植物细胞的胚性潜能, 促进体细胞胚胎的发生。在此过程中也筛选到一些胚胎特异性基因作为区分胚性和非胚性细胞培养物的标记, 并发现了许多胞外蛋白也可作为胚胎发生潜力的标记物或调控体细胞胚胎发生的信号分子^[47]。

5.1 阿拉伯半乳糖蛋白

阿拉伯半乳糖蛋白(arabinogalactan-proteins, AGPs)是一类富含羟脯氨酸或脯氨酸的糖蛋白, 广泛存在于植物的细胞壁、细胞膜和组织的细胞间隙, 并可以分泌到培养细胞的培养基中^[50]。AGPs 能促进多个物种的体细胞胚胎发生, 有些可作为细胞能否进行体细胞胚胎发生的早期标志。添加外源 AGPs 提高胡萝卜、仙客来、云杉、香蕉和小麦非胚性细胞系的胚性能力, 增加体细胞胚胎的数量^[51-52]。去除细胞壁上的 AGPs 会使原生质体形成体细胞胚胎的能力下降, 而加入胞外 AGPs 则会逆转去除细胞壁的部分效果。添加从胡萝卜种子 AGP 中分离的可使失去体细胞胚胎发育能力的细胞系重新启动胚形成, 添加与 AGP 特异结合的抑制剂 Yariv (1,3,5-三[4- β -D 葡吡喃糖基-氧化苯基-偶氮基]-2,4,6-三羟基苯)导致细胞增殖受阻, 抑制体细胞胚胎发生^[53-54]。AGPs 调节体细胞胚胎发生的作用机制可能体现在两方面: (1) AGPs 一般存在于胞外或膜的界面, 与细胞壁非共价结合, 能快速移动、降解, 可作为信号分子影响

细胞识别及信号传递,进而影响细胞增殖、分化,导致发育轨迹的改变;(2) AGP可作为多种酶的底物,裂解后产生不同种类的寡糖分子,寡糖分子作为信号分子参与发育调控。有研究表明同时添加几丁质酶和AGP能进一步加快体细胞胚胎发生的频率,几丁质酶能裂解AGP的寡糖基链,产生信号分子,促进体细胞胚胎的发生^[55]。

5.2 脂质转运蛋白

脂质转运蛋白(lipid transfer protein, LTP)是一类分子量小于 10 kD 的小分子可溶性碱性蛋白^[56]。在动物中,有些 LTP 蛋白参与癌细胞增殖的调控。植物中 LTP 含量高,占可溶性蛋白的 4%左右。有些非特异性 LTP 基因在幼嫩组织、营养生长时期的分生组织、幼胚中优势表达,并在体细胞胚胎发生过程进行富集,被认为是体细胞胚胎发生诱导的早期标记^[58]。EP2 (extracellular protein 2)是胡萝卜胚性培养中第一个被分离和鉴定的编码 LTP 的基因,其分泌到胞外,在原胚性细胞中高表达,而在非胚性细胞中不表达^[57-58]。棉花 LTP 基因在下胚轴、非胚性细胞组织和植株中不表达,但在胚性细胞、球形胚高量表达,而在球后期体细胞胚胎中表达量又下降^[59]。LTP1 是葡萄体细胞胚胎发育过程中表皮原形成的标志,异位表达 35S::VvLTP1 导致胚胎严重畸形,导致表皮层出现异常^[60]。

6 体细胞胚胎发生的表观遗传调控

一般认为,植物体细胞比动物体细胞具有更强的可塑性,已分化的离体植物细胞在一定培养条件下可脱分化并获得全能性或亚全能性,在这个过程中,植物细胞必须获得改变细胞发育命运的潜能,这一过程也伴随着染色质水平和基因表达水平的重编程,DNA 甲基化、组蛋白去乙酰化/甲基化、miRNA 等重要的表观调控因子也是影响体细胞胚胎发生的重要因素^[61]。

6.1 DNA 甲基化

植物体细胞胚胎发生过程受 DNA 甲基化的调控。一般来说,非胚性愈伤组织基因组甲基化水平高,而胚性愈伤组织的基因组甲基化水平较低,这一现象在刺五加、甜菜、棉花、黑松等中都能观察到^[62]。体细胞胚的发育过程也伴随着 DNA 甲基化水平的变化,体细胞胚胎发育早期阶段较低,随着体细胞胚胎的发育逐渐增加,到子叶胚阶段达到最高值^[63]。在拟南芥等中发现体细胞胚胎发生过程的

调节需要一定水平的 DNA 甲基化维持,甲基化抑制剂 5-氮杂胞苷(5-azacitidine, 5-AzaC)处理诱导 DNA 胞嘧啶甲基化水平降低,抑制非胚性愈伤组织的增殖或胚性愈伤组织的体细胞胚胎发生能力^[64]。DNA 甲基化可通过引起胚胎发生特定基因的启动进而影响体细胞胚胎发生。*LEC1* 基因启动子在体细胞中被甲基化,随着外源培养条件的施加,其甲基化状态被消除,促进体细胞向胚性细胞的转变及体细胞胚的产生,随后在胚胎发育成熟后再次被甲基化^[65]。同样,在拟南芥中,5-AzaC 处理显著抑制外植体的体细胞胚胎发生能力,处理后体细胞胚胎发生调节基因 *LEC2*、*LEC1* 和 *BBM* 等的表达也均显著降低,但在 DNA 甲基化酶基因(*drm1* *drm2* 和 *drm1* *drm2* *cmt3*)突变体中这些基因明显上调表达并提高体细胞胚胎发生频率^[64]。DNA 甲基化受 2,4-D 的调控,在诱导阶段,高浓度的 2,4-D 通过 DNA 甲基化关闭原有分化细胞内基因的表达;去除 2,4-D 后使 DNA 去甲基化。

6.2 组蛋白甲基化

在体细胞胚胎发生过程中,发现DNA甲基化作用的同时也发现组蛋白甲基化对体细胞胚胎形成的影响。两个研究得较多的组蛋白甲基化修饰是关于组蛋白H3的第27位赖氨酸的三甲基化(H3K27me3)和第4位赖氨酸的三甲基化(H3K4me3),H3K27me3是动、植物发育重要基因的沉默基因转录标记物,而H3K4me3是转录激活标记物。

组蛋白甲基化由组蛋白甲基转移酶完成。拟南芥中,组蛋白甲基转移酶PRC2通过H3K27me3来抑制相关基因的表达,从而促进细胞分化,反之则引起细胞脱分化,诱导体细胞胚胎发生^[66]。在拟南芥中 *PRC2* (Polycomb repressive complex 2) 基因 (*CURLY LEAF*, *CLF* 和 *SWINGER*, *SWN*) 或 (*VERNALIZATION 2*, *VRN2* 和 *EMBRYONIC FLOWER 2*, *EMF2*)双突变体在茎尖脱分化形成愈伤组织,间接导致体细胞胚胎发生并形成异位根^[67],与野生型相比,*PRC2*的突变体在营养组织中显示出更高的体细胞胚胎诱导能力^[68]。大部分胚性相关基因*LEC1*、*LEC2*、*AGL15*和*BBM*以及分生组织调节因子*STM*、*WUS*和*WOX5*等基因的染色质区域都含有H3K27me3等甲基化位点^[69]。而*PRC1*和*PRC2*与胚胎发生转录抑制因子*VAL1*和*VAL2*等互作,并通过表观修饰抑制胚胎发生相关靶标基因的表达从而抑制愈伤组织的形成和体细胞胚胎发生。除了H3K27me3

在体细胞胚胎发生发挥功能外,在拟南芥还发现赖氨酸特异性去甲基酶LDL3可以在愈伤组织形成过程中特异性消除H3K4me2,进一步使愈伤组织具有芽分化的能力^[70]。

6.3 组蛋白去乙酰化

组蛋白去乙酰化也是一种与植物体细胞胚胎发生密切关联的组蛋白修饰。在激素诱导下组蛋白乙酰化水平和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)的活性在体细胞胚胎发生过程中会发生明显变化。而且组蛋白 H3 和 H4 的乙酰化会促进体细胞胚胎发生。组蛋白乙酰化的水平和位置受到组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT)和组蛋白去乙酰化酶的严格控制,并影响植物的许多发育过程^[71]。HDAC 抑制剂古曲抑菌素 A (trichostatin A, TSA)处理小麦培养物可增加胚性愈伤诱导率和芽分化率^[72]。HDAC 双突变体 *hda6/hda19* 或 TSA 处理诱导胚性标记基因 *LEC1*、*FUS3* 和 *ABI3* 的上调表达,促进体细胞胚胎发生^[73]。在拟南芥利用成熟的合子胚进行体外培养时,经过 TSA 处理无需额外施加生长素便能够诱导体细胞胚形成,这可能是由于 TSA 处理后生长素合成通路基因(*YUC1*、*YUC10*)、胚胎发育相关转录因子(*LEC1*、*LEC2*、*BBM*)及胁迫响应因子 *PGA37/MYB118* 等显著上调表达引起的^[74-75]。HDA6 和 HDA19 分别特异性结合 VAL1 (VP1/abscisic acid insensitive 3-like1)和 VAL2 (VP1/abscisic acid insensitive 3-like2),并通过表观修饰抑制胚胎发生相关靶标基因的表达从而抑制愈伤组织形成和体细胞胚胎发生^[76]。*PKL* (PICKLE)是拟南芥中主要的染色质重塑因子,在抑制细胞过度增殖中起核心作用。其突变体 *pkl* 在种子萌发后形成愈伤组织,在 *pkl* 突变体中 *LEC1* 和 *LEC2* 的 H3K27me3 水平下降导致甲基化抑制解除;其另一突变体 *cytokinin hypersensitive 2* 易诱导形成愈伤组织,而该表型可被外施 TSA 模拟^[77]。

6.4 miRNA 的调控作用

植物的 miRNA 通过转录和转录后水平的基因沉默对植物细胞发育命运进行调控^[78]。水稻中发现 *miR156* 在分化的胚性愈伤比未分化的胚性愈伤中有更高的表达量;而 *miR397* 表达则相反^[79]。柑橘和棉花等物种中也发现类似结果,同时发现 *miR168*、*miR171*、*miR159*、*miR164*、*miR390* 等也在体细胞胚胎发生过程中差异表达^[78]。*miR156* 通过调控其靶基因 *SPLs* 的表达参与调控体细胞胚胎发生。在柑橘中

超表达 *miR156a* 或敲除其 2 个靶基因 *CsSPL3* 和 *CsSPL14* 株系的体细胞胚的数量显著高于对照^[80],而且在体细胞胚胎发生的标志基因 *CsFUS3* 的超表达材料中可以发现 *miR156a* 在整个体细胞胚胎过程均显著上调^[81]。*miR157a* 是 *miR156* 的另一个成员。棉花中对 *GhmiR157a* 及其靶标 *SPL10* 研究发现其通过调控乙烯信号和类黄酮生物合成调控逆境下棉花体细胞胚胎发育^[13]。miRNA 的调控体细胞胚胎发生可能通过 2 个方面: (1) miRNA 参与植物激素信号的转导。植物体细胞胚胎发生过程中多个激素信号途径相关基因被发现受 miRNA 调控; (2) 体细胞胚胎发生过程中一些重要转录因子可作为 miRNA 的直接靶标。miRNA 可通过降解互补的 mRNA 或影响 mRNA 翻译降低蛋白水平。

7 关键基因在体细胞胚胎发生和遗传转化中的应用

随着研究的不断深入和新技术的涌现,体细胞胚胎发生所涉及的激素信号转导,基因转录调控、表观遗传修饰与代谢物动态变化等复杂分子生物学过程都在逐步深入地阐释。然而,目前虽然通过对组织培养、农杆菌侵染等方法的优化,拟南芥、杨树、水稻、玉米、棉花等植物的遗传转化体系得以成功建立,但植物的高效遗传转化仍存在许多问题,如基因型依赖性严重、转化效率不高。随着对体细胞胚胎发生机制深入研究,一些调控体细胞胚胎发生的关键基因被发现并逐渐用于改进植物遗传转化体系和再生植株的效率,从而实现植物的高效遗传转化^[82]。

BBM 和 *WUS* 是 2 个提高植物遗传转化效率的关键基因。在玉米中用 *ZmBBM* 和 *ZmWUS2* 两个基因共转化未成熟胚时,愈伤组织的比例显著提升,且在多个不易转化的玉米自交系中取得较高的转化效率^[83]。此外,在水稻、高粱中利用 *ZmBBM* 和 *ZmWUS2* 的共转化也实现转化效率提高^[83]。在双子叶植物甜椒中,Heidmann 等^[84]发现瞬时表达 *BnBBM* 基因可高效诱导体细胞再生,并分化出大量可发育成完整植株的体细胞胚胎;将 *WUS2* 和 *IPT* 或 *WUS2* 和 *STM* 共转化烟草、番茄、葡萄等植物中可实现了芽的原位诱导^[85]。因此解析体细胞胚胎发生过程中关键基因的功能及调控机制,开发更高效的遗传转化方法,有望实现更多植物的遗传高效再生体系建立。

8 总结与展望

体细胞胚胎发生是体细胞在没有受精的情况下再生为胚状体的过程,是展现植物细胞具有全能性的一个重要途径。自 20 世纪 50 年代以来,体细胞胚胎发生的研究经历了从经验方法到系统性理论研究的发展,并在多个物种成功建立起再生体系^[86]。对于体细胞胚胎发生的研究,从最开始通过对外植体的选择、培养基类型、激素含量的配比及组合等进行优化开展研究;发展到对植物体细胞胚胎发生调控基因的研究,并利用调控体细胞胚胎发生的关键基因去提高植物的转化及再生效率;再到对植物体细胞胚胎发生过程基因的调控网络、代谢物质的变化、表观遗传调控机制的研究,说明对体细胞胚胎发生的分子机制不断深入及完善。

随着分子生物学的进步和测序技术的发展。多组学技术的应用加速了对植物体细胞胚胎发生分子机制的解析。利用 RNA-seq 揭示体细胞胚胎发生过程中基因的动态变化,借助代谢组技术解析体胚发育各个阶段的内源物质变化,并通过对表观组学的研究揭示体细胞胚胎发生过程中表观遗传机制(DNA 甲基化、组蛋白甲基化、组蛋白去乙酰化及 miRNA)对基因表达调节。并且随着将来单细胞测序技术、空间转录组等新技术在植物体细胞胚胎发生上的应用,体细胞胚胎发生起源单细胞还是多细胞的问题有可能得到解决。此外,随着转基因技术及基因编辑技术利用,对植物体细胞胚胎过程中基因型依赖严重、转化效率低等问题也在逐步得到改善。

尽管当前体细胞胚胎发生的研究进展迅速,但仍然存在许多谜团。2005 年, *Science* 创刊 125 周年之际公布了 125 个最具挑战性的科学问题,其中植物细胞全能性被列入最重要的 25 个科学问题。2021 年 9 月, *Plant Cell* 公布了植物细胞生物学 15 个最重要的问题,其中有多数问题都涉及到植物细胞全能性和多能性的表达。理论上,只要条件合适,所有的植物细胞都可以表现全能性,得到再生植株。然而,植物细胞再生实际上只能在有限的植物中实现;而且离体细胞胚胎发生和器官再生的细胞学和分子机理的研究都不够完善。体细胞胚胎发生的起源是单细胞还是多细胞?在不同的发生体系中究竟是哪一类或哪几类细胞如何被选中进行重编程,从而再生?虽然已有研究表明这些再生大都来源于植物的干细胞,但植物的干细胞究竟如何界定?表观遗传修饰如何参与并协调再生过程?这些问题都是未来

研究中的重点。

References

- [1] Yang X Y, Zhang X L, Yuan D J, Jin F Y, Zhang Y C, Xu J. Transcript profiling reveals complex auxin signalling pathway and transcription regulation involved in dedifferentiation and redifferentiation during somatic embryogenesis in cotton. *BMC Plant Biol*, 2012, 12: 110.
- [2] Lee H W, Kim N Y, Lee D J, Kim J. *LBD18/ASL20* regulates lateral root formation in combination with *LBD16/ASL18* downstream of *ARF7* and *ARF19* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2009, 151: 1377–1389.
- [3] Fan M Z, Xu C Y, Xu K, Hu Y X. LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration. *Cell Res*, 2012, 22: 1169–1180.
- [4] Lee K, Park O-S, Seo P J. JMJ30-mediated demethylation of H3K9me3 drives tissue identity changes to promote callus formation in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2018, 95: 961–975.
- [5] Horstman A, Li M, Heidmann I, Weemen M, Chen B, Muino J M, Angenent G C, Boutilier K. The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis. *Plant Physiol*, 2017, 175: 848–857.
- [6] Mendez-Hernandez H A, Ledezma-Rodriguez M, Avilez-Montalvo R N, Juarez-Gomez Y L, Skeete A, Avilez-Montalvo J, De-la-Pena C, Loyola-Vargas V M. Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 77.
- [7] Skoog F, Miller C O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol*, 1957, 11: 118–130.
- [8] Sakai H, Honma T, Aoyama T, Sato S, Kato T, Tabata S, Oka A. *ARR1*, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science*, 2001, 294: 1519–1521.
- [9] Su Y H, Liu Y B, Bai B, Zhang X S. Establishment of embryonic shoot-root axis is involved in auxin and cytokinin response during *Arabidopsis* somatic embryogenesis. *Front Plant Sci*, 2015, 5: 792.
- [10] Neves M, Correia S, Cavaleiro C, Canhoto J. Modulation of organogenesis and somatic embryogenesis by ethylene: an overview. *Plants* (Basel), 2021, 10: 1208.
- [11] Chatfield S P, Raizada M N. Ethylene and shoot regeneration: hookless1 modulates de novo shoot organogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep*, 2008, 27: 655–666.
- [12] Zheng Q L, Zheng Y M, Perry S E. AGAMOUS-like15 promotes somatic embryogenesis in *Arabidopsis* and soybean in part by the control of ethylene biosynthesis and response. *Plant Physiol*, 2013, 161: 2113–2127.
- [13] Wang L C, Liu N, Wang T Y, Li J Y, Wen T W, Yang X Y, Lindsey K, Zhang X L. The *GhmiR157a-GhSPL10* regulatory module controls initial cellular dedifferentiation and callus proliferation in cotton by modulating ethylene-mediated flavonoid biosynthesis. *J Exp Bot*, 2018, 69: 1081–1093.
- [14] Langhansova L, Konradova H, Vanek T. Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryos. *Plant Cell Rep*, 2004, 22: 725–730.

- [15] Stasolla C, Yeung E C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2003, 74: 15–35.
- [16] Marhava P, Hoermayer L, Yoshida S, Marhavy P, Benkova E, Friml J. Re-activation of stem cell pathways for pattern restoration in plant wound healing. *Cell*, 2019, 177: 957–969.
- [17] Iwase A, Harashima H, Ikeuchi M, Rymen B, Ohnuma M, Komaki S, Morohashi K, Kurata T, Nakata M, Ohme-Takagi M, Grotewold E, Sugimoto K. WIND1 promotes shoot regeneration through transcriptional activation of enhancer of SHOOT REGENERATION1 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2017, 29: 54–69.
- [18] Ikeuchi M, Favero D S, Sakamoto Y, Iwase A, Coleman D, Rymen B, Sugimoto K. Molecular mechanisms of plant regeneration. *Annu Rev Plant Biol*, 2019, 70: 377–406.
- [19] Ikeuchi M, Iwase A, Rymen B, Lambolz A, Kojima M, Takebayashi Y, Heyman J, Watanabe S, Seo M, de Veylder L, Sakakibara H, Sugimoto K. Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes. *Plant Physiol*, 2017, 175: 1158–1174.
- [20] Bucher P, Trifonov E N. CCAAT box revisited: bidirectionality, location and context. *J Biomol Struct Dyn*, 1988, 5: 1231–1236.
- [21] Pelletier J M, Kwong R W, Park S, Le B H, Baden R, Cagliari A, Hashimoto M, Munoz M D, Fischer R L, Goldberg R B, Harada J J. LEC1 sequentially regulates the transcription of genes involved in diverse developmental processes during seed development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: E6710–E6719.
- [22] Kwong R W, Bui A Q, Lee H, Kwong L W, Fischer R L, Goldberg R B, Harada J J. LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development. *Plant Cell*, 2003, 15: 5–18.
- [23] Lotan T, Ohto M, Yee K M, West M A L, Lo R, Kwong R W, Yamagishi K, Fischer R L, Goldberg R B, Harada J J. *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 1998, 93: 1195–1205.
- [24] Orłowska A, Igielski R, Lagowska K, Kepczynska E. Identification of *LEC1*, *LIL* and *Polycomb Repressive Complex 2* genes and their expression during the induction phase of *Medicago truncatula* Gaertn. somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2017, 129: 119–132.
- [25] Zhu S P, Wang J, Ye J L, Zhu A D, Guo W W, Deng X X. Isolation and characterization of *LEAFY COTYLEDON 1-LIKE* gene related to embryogenic competence in *Citrus sinensis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2014, 119: 1–13.
- [26] Le B H, Cheng C, Bui A Q, Wagmaister J A, Henry K F, Pelletier J, Kwong L, Belmonte M, Kirkbride R, Horvath S, Drews G N, Fischer R L, Okamoto J K, Harada J J, Goldberg R B. Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 8063–8070.
- [27] Gazzarrini S, Tsuchiya Y, Lumba S, Okamoto M, McCourt P. The transcription factor *FUSCA3* controls developmental timing in *Arabidopsis* through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Dev Cell*, 2004, 7: 373–385.
- [28] Brand A, Quimbaya M, Tohme J, Chavarriaga-Aguirre P. *Arabidopsis* *LEC1* and *LEC2* orthologous genes are key regulators of somatic embryogenesis in cassava. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 673.
- [29] Stone S L, Braybrook S A, Paula S L, Kwong L W, Meuser J, Pelletier J, Hsieh T F, Fischer R L, Goldberg R B, Harada J J. *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON2 induces maturation traits and auxin activity: implications for somatic embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 3151–3156.
- [30] Zhang Z Y, Zhao H, Li W, Wu J M, Zhou Z H, Zhou F, Chen H, Lin Y J. Genome-wide association study of callus induction variation to explore the callus formation mechanism of rice. *J Integr Plant Biol*, 2019, 61: 1134–1150.
- [31] Horstman A, Li M, Heidmann I, Weemen M, Chen B, Muino J M, Angenent G C, Boutilier K. The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis. *Plant Physiol*, 2017, 175: 848–857.
- [32] Mathew M M, Prasad K. Model systems for regeneration: *Arabidopsis*. *Development*, 2021, 148: dev195347.
- [33] Tsuwamoto R, Yokoi S, Takahata Y. *Arabidopsis* EMBRYOMAKER encoding an AP2 domain transcription factor plays a key role in developmental change from vegetative to embryonic phase. *Plant Mol Biol*, 2010, 73: 481–492.
- [34] Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer K F X, Jurgens G, Laux T. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell*, 2000, 100: 635–644.
- [35] Zuo J R, Niu Q W, Frugis G, Chua N H. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2002, 30: 349–359.
- [36] Zhang T Q, Lian H, Zhou C M, Xu L, Jiao Y, Wang J W. A two-step model for de novo activation of *WUSCHEL* during plant shoot regeneration. *Plant Cell*, 2017, 29: 1073–1087.
- [37] Gordon S P, Chickarmane V S, Ohno C, Meyerowitz E M. Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 16529–16534.
- [38] Zhang Z, Tucker E, Hermann M, Laux T. A molecular framework for the embryonic initiation of shoot meristem stem cells. *Dev Cell*, 2017, 40: 264–277.
- [39] Hassani S B, Trontin J F, Raschke J, Zoglauer K, Rupps A. Constitutive overexpression of a conifer *WOX2* homolog affects somatic embryo development in pinus pinaster and promotes somatic embryogenesis and organogenesis in *Arabidopsis* seedlings. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 838421.
- [40] Su Y H, Zhou C, Li Y J, Yu Y, Tang L P, Zhang W J, Yao W J, Huang R, Laux T, Zhang X S. Integration of pluripotency pathways regulates stem cell maintenance in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 22561–22571.
- [41] Elhiti M, Tahir M, Gulden R H, Khamiss K, Stasolla C. Modulation of embryo-forming capacity in culture through the expression of *Brassica* genes involved in the regulation of the shoot apical meristem. *J Exp Bot*, 2010, 61: 4069–4085.
- [42] Schmidt E D L, Guzzo F, Toonen M A J, de Vries S C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, 1997, 124: 2049–2062.
- [43] Li H Q, Cai Z P, Wang X J, Li M Z, Cui Y W, Cui N, Yang F, Zhu M S, Zhao J X, Du W B, He K, Yi J, Tax F E, Hou S W, Li J, Gou

- X P. SERK receptor-like kinases control division patterns of vascular precursors and ground tissue stem cells during embryo development in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2019, 12: 984–1002.
- [44] Hecht V, Vielle-Calzada J P, Hartog M V, Schmidt E D L, Boutilier K, Grossniklaus U, de Vries S C. The *Arabidopsis* *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol*, 2001, 127: 803–816.
- [45] Singh A, Khurana P. Ectopic expression of *Triticum aestivum* *SERK* genes (*TaSERKs*) control plant growth and development in *Arabidopsis*. *Sci Rep*, 2017, 7: 12368.
- [46] Borisjuk N, Sitailo L, Adler K, Malysheva L, Tewes A, Borisjuk L, Manteuffel R. Calreticulin expression in plant cells: developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution. *Planta*, 1998, 206: 504–514.
- [47] Yang X, Zhang X. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Crit Rev Plant Sci*, 2010, 29: 36–57.
- [48] Anil V S, Rao K S. Calcium-mediated signaling during sandalwood somatic embryogenesis. Role for exogenous calcium as second messenger. *Plant Physiol*, 2000, 123: 1301–1311.
- [49] Pandey G K, Grant J J, Cheong Y H, Kim B G, Li L G, Luan S. Calcineurin-B-like protein CBL9 interacts with target kinase CIPK3 in the regulation of ABA response in seed germination. *Mol Plant*, 2008, 1: 238–248.
- [50] Letarte J, Simion E, Miner M, Kasha K J. Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Plant Cell Rep*, 2006, 25: 877–877.
- [51] Perez-Perez Y, Carneros E, Berenguer E, Solis M T, Barany I, Pintos B, Gomez-Garay A, Risueno M C, Testillano P S. Pectin de-methylesterification and AGP increase promote cell wall remodeling and are required during somatic embryogenesis of *Quercus suber*. *Front Plant Sci*, 2019, 9: 1915.
- [52] Kreuger M, Vanholst G J. Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, 1995, 197: 135–141.
- [53] Makowska K, Kaluzniak M, Oleszczuk S, Zimny J, Czaplicki A, Konieczny R. Arabinogalactan proteins improve plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2017, 131: 247–257.
- [54] Serpe M D, Nothnagel E A. Effects of yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. *Planta*, 1994, 193: 542–550.
- [55] van Hengel A J, Tadesse Z, Immerzeel P, Schols H, van Kammen A, de Vries S C. N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol*, 2001, 125: 1880–1890.
- [56] Cheng C S, Chen M N, Lai Y T, Chen T, Lin K F, Liu Y J, Lyu P C. Mutagenesis study of rice nonspecific lipid transfer protein 2 reveals residues that contribute to structure and ligand binding. *Proteins*, 2008, 70: 695–706.
- [57] Sterk P, Booi H, Schellekens G A, Vankammen A, Devries S C. Cell-specific expression of the carrot *EP2* lipid transfer protein gene. *Plant Cell*, 1991, 3: 907–921.
- [58] Dodeman V L, Ducreux G, Kreis M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J Exp Bot*, 1997, 48: 1493–1509.
- [59] Zeng F C, Zhang X K, Zhu L F, Tu L L, Guo X P, Nie Y H. Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray. *Plant Mol Biol*, 2006, 60: 167–183.
- [60] Francois J, Lallemand M, Fleurat-Lessard P, Laquitaine L, Delrot S, Coutos-Thevenot P, Gomes E. Overexpression of the *VvLTP1* gene interferes with somatic embryo development in grapevine. *Funct Plant Biol*, 2008, 35: 394–402.
- [61] Wojcikowska B, Wojcik A M, Gaj M D. Epigenetic regulation of auxin-induced somatic embryogenesis in plants. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 7.
- [62] Bravo S, Bertin A, Turner A, Sepulveda F, Jopia P, Jose Parra M, Castillo R, Hasbun R. Differences in DNA methylation, DNA structure and embryogenesis-related gene expression between embryogenic and non embryogenic lines of *Pinus radiata* D. don. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2017, 130: 521–529.
- [63] Nic-Can G I, Lopez-Torres A, Barredo-Pool F, Wrobel K, Loyola-Vargas V M, Rojas-Herrera R, De-la-Pena C. New insights into somatic embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4* are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PLoS One*, 2013, 8: e72160.
- [64] Grzybkowska D, Moronezyk J, Wojcikowska B, Gaj M D. Azacitidine (5-AzaC)-treatment and mutations in DNA methylase genes affect embryogenic response and expression of the genes that are involved in somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regul*, 2018, 85: 243–256.
- [65] Shibukawa T, Yazawa K, Kikuchi A, Kamada H. Possible involvement of DNA methylation on expression regulation of carrot *LEC1* gene in its 5'-upstream region. *Gene*, 2009, 437: 22–31.
- [66] Nakamura M, Batista RA, Kohler C, Hennig L. Polycomb Repressive complex 2-mediated histone modification H3K27me3 is associated with embryogenic potential in Norway spruce. *J Exp Bot*, 2020, 71: 6366–6378.
- [67] Chanvivattana Y, Bishopp A, Schubert D, Stock C, Moon Y H, Sung Z R, Goodrich J. Interaction of polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development*, 2004, 131: 5263–5276.
- [68] Mozgova I, Munoz-Viana R, Hennig L. PRC2 represses hormone-induced somatic embryogenesis in vegetative tissue of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 2017, 13: e1006562.
- [69] Liu J, Deng S, Wang H, Ye J, Wu H W, Sun H X, Chua N H. *CURLY LEAF* regulates gene sets coordinating seed size and lipid biosynthesis. *Plant Physiol*, 2016, 171: 424–436.
- [70] Ishihara H, Sugimoto K, Tarr P T, Temman H, Kadokura S, Inui Y, Sakamoto T, Sasaki T, Aida M, Suzuki T. Primed histone demethylation regulates shoot regenerative competency. *Nat Commun*, 2019, 10: 1786.
- [71] Kumar V, Thakur J K, Prasad M. Histone acetylation dynamics regulating plant development and stress responses. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78: 4467–4486.
- [72] Bie X M, Dong L, Li X H, Wang H, Gao X Q, Li X G. Trichostatin a and sodium butyrate promotes plant regeneration in common wheat. *Plant Signal Behav*, 2020, 15: 12.
- [73] Tanaka M, Kikuchi A, Kamada H. The *Arabidopsis* histone deacetylases HDA6 and HDA19 contribute to the repression of

- embryonic properties after germination. *Plant Physiol*, 2008, 146: 149–161.
- [74] Wojcikowska B, Botor M, Moronczyk J, Wojcik A M, Nodzynski T, Karcz J, Gaj M D. Trichostatin a triggers an embryogenic transition in *Arabidopsis* explants via an auxin-related pathway. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1353.
- [75] Moronczyk J, Braszewska A, Wojcikowska B, Chwialkowska K, Nowak K, Wojcik A M, Kwasniewski M, Gaj M D. Insights into the histone acetylation-mediated regulation of the transcription factor genes that control the embryogenic transition in the somatic cells of *Arabidopsis*. *Cells*, 2022, 11: 863.
- [76] Zhou Y, Tan B, Luo M, Li Y, Liu C, Chen C, Yu C W, Yang S G, Dong S, Ruan J X, Yuan L B, Zhang Z, Zhao L M, Li C L, Chen H H, Cui Y H, Wu K Q, Huang S Z. *HISTONE DEACETYLASE19* interacts with *HSL1* and participates in the repression of seed maturation genes in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell*, 2013, 25: 134–148.
- [77] Furuta K, Kubo M, Sano K, Demura T, Fukuda H, Liu Y G, Shibata D, Kakimoto T. The CKH2/PKL chromatin remodeling factor negatively regulates cytokinin responses in *Arabidopsis* calli. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52: 618–628.
- [78] Yang X, Wang L, Yuan D, Lindsey K, Zhang X. Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *J Exp Bot*, 2013, 64: 1521–1536.
- [79] Luo Y C, Zhou H, Li Y, Chen J Y, Yang J H, Chen Y Q, Qu L H. Rice embryogenic calli express a unique set of microRNAs, suggesting regulatory roles of microRNAs in plant post-embryogenic development. *FEBS Lett*, 2006, 580: 5111–5116.
- [80] Long J, Liu C, Feng M, Liu Y, Wu X, Guo W. miR156-SPL modules regulate induction of somatic embryogenesis in citrus callus. *J Exp Bot*, 2018, 69: 2979–2993.
- [81] Liu Z, Ge X, Qiu W, Long J, Jia H, Yang W, Dutt M, Wu X, Guo W. Overexpression of the *CsFUS3* gene encoding a B3 transcription factor promotes somatic embryogenesis in Citrus. *Plant Sci*, 2018, 277: 121–131.
- [82] Gordon-Kamm B, Sardesai N, Arling M, Lowe K, Hoerster G, Betts S, Jones T. Using morphogenic genes to improve recovery and regeneration of transgenic plants. *Plants (Basel)*, 2019, 8: 38.
- [83] Lowe K, Wu E, Wang N, Hoerster G, Hastings C, Cho M J, Sceilong C, Lenderts B, Chamberlin M, Cushatt J, Wang L, Ryan L, Khan T, Chow-Yiu J, Hua W, Yu M, Banh J, Bao Z, Brink K, Igo E, Rudrappa B, Shamseer P M, Bruce W, Newman L, Shen B, Zheng P, Bidney D, Falco C, Register J, Zhao Z Y, Xu D, Jones T, Gordon-Kamm W. Morphogenic regulators baby boom and wuschel improve monocot transformation. *Plant Cell*, 2016, 28: 1998–2015.
- [84] Heidmann I, de Lange B, Lambalk J, Angenent G C, Boutilier K. Efficient sweet pepper transformation mediated by the BABY BOOM transcription factor. *Plant Cell Rep*, 2011, 30: 1107–1115.
- [85] Maher M F, Nasti R A, Vollbrecht M, Starker C G, Clark M D, Voytas D F. Plant gene editing through de novo induction of meristems. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 84–89.
- [86] Loyola-Vargas V M. The history of somatic embryogenesis. In: Loyola-Vargas V M, Ochoa-Alejo N, eds. *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Cham: Springer International Publishing, 2016. pp 11–22.