

· 专题论坛 ·

植物幼苗玻璃化发生机制研究进展

赵青平^{1,2}, 梁雨萍², 周方圆², 赵翔^{2*}

¹南阳师范学院生命科学与农业工程学院, 南阳 473061

²河南大学生命科学学院, 省部共建作物逆境适应与改良国家重点实验室, 开封 475004

摘要 玻璃化是指植物生长过程中出现的类似水浸状的半透明化生理病变现象, 常见于植物组织培养。玻璃化现象是限制组培技术发展和组培苗商业化生产的三大主要影响因素之一, 但是玻璃化的发生机制至今尚不清楚。以组培材料为对象研究玻璃化机制受多种人为因素的干扰, 而以非组织培养材料为研究对象, 避免了人为因素的干扰, 有助于从本质上揭示玻璃化发生的分子机制。该文综述了非组培苗因软木脂含量改变、表皮蜡质合成减少、细胞膜过氧化受损、离子或水分子跨膜运输受阻等导致植物玻璃化的机制, 以期最终揭示植物玻璃化机制提供参考。

关键词 水孔蛋白, 细胞膜, 表皮蜡质, 玻璃化, 软木脂

赵青平, 梁雨萍, 周方圆, 赵翔 (2022). 植物幼苗玻璃化发生机制研究进展. 植物学报 **57**, 90–97.

1 玻璃化现象概述

玻璃化(hyperhydricity)是指植物幼苗在生长过程中出现的类似水浸的半透明化现象, 与包埋玻璃化超低温保存以及玻璃化超低温脱毒中的“玻璃化”不同(李海兵等, 2010; 王玉英等, 2020)。玻璃化是一种植物生理失调的病变现象, 在组织培养过程中发生玻璃化后幼苗会出现发育不良、分化能力低下以及难以成活等症状(高弘扬等, 2019; 赵一鸣等, 2019)。玻璃化现象最早由Phillips和Matthews发现, 1964年他们在进行石竹(*Dianthus caryophyllus*)茎尖组织培养时首次描述了玻璃化现象(Phillips and Matthews, 1964)。直到1981年, Debergh等(1981)才提出“玻璃化”一词。近年的研究发现, 玻璃化不仅出现在植物组织培养过程中, 而且在一些非组织培养材料的幼苗期也有发生。本文主要综述非组织培养幼苗的玻璃化现象及其原因。

2 非组培苗的玻璃化特点

与组培玻璃化苗类似, 非组培玻璃化苗也表现出形态

结构异常和生理生化代谢紊乱的现象。形态观察显示, 玻璃化的非组培苗整体植株明显矮小, 呈半透明的水浸状, 子叶向内卷曲且脆弱易碎, 根尖分生区变小, 主根生长受抑制(Lee et al., 2002, 2021; Zhang et al., 2014; Zhu et al., 2014; Hsu et al., 2021)。微形态解剖结果显示, 玻璃化幼苗表皮角质层厚度增加, 但四氧化钼染色变浅, 角质层整体呈蓬松态, 表面蜡质纹饰呈不规则颗粒状(Lee et al., 2021); 表皮细胞形态异常, 叶肉细胞和栅栏组织细胞数目减少, 细胞间隙增大(Delarue et al., 1997); 叶绿体中类囊体数目减少, 基粒含量降低(Delarue et al., 1997); 顶端分生组织扁平, 由一些体积增大的含大量液泡的细胞无规则排列构成, 叶原基能够正常形成, 但不能发育形成真叶(Lee et al., 2021)。

生理生化检测结果显示, 玻璃化植株中的生理代谢过程明显紊乱。叶绿素是主要的光合作用色素, 负责将光能转化为电能, 玻璃化苗中叶绿素和类胡萝卜素总含量、叶绿素 a/b 的比值以及暗适应条件下的 F_v/F_m 值明显降低(Zhang et al., 2014), 表明玻璃化苗的光合作用能力降低。软木脂是由脂类物质聚合形成

收稿日期: 2021-07-30; 接受日期: 2021-10-12

基金项目: 河南省自然科学基金(No.212300410214)、国家自然科学基金(No.31871419, No.31870272)、南阳师范学院博士专项(No.2020ZX016)和河南省高等学校重点科研计划(No.20A18005)

* 通讯作者。E-mail: xzhao@henu.edu.cn

的渗透性屏障,可限制植物与外界环境之间进行气体、水分以及溶质交换,保护植物免受侵害并在植物生长发育中发挥重要作用(Hsu et al., 2021)。玻璃化苗中控制软木脂合成的甘油-3-磷酸酰基转移酶5(GPAT5)的基因突变导致软木脂合成受阻,软木脂含量降低(Beisson et al., 2007; Hsu et al., 2021)。与组培的玻璃化苗类似,非组培的玻璃化苗也面临严重的氧化胁迫,这些氧化胁迫可能由细胞膜完整性受损导致,也可能由缺氧胁迫引发(Lee et al., 2002, 2021)。氧化胁迫的爆发会进一步氧化细胞膜中的脂类物质,破坏细胞膜的弹性与完整性,干扰玻璃化苗的稳态平衡,影响玻璃化幼苗的生长与生存。

3 非组培苗玻璃化的发生机制

3.1 软木脂合成异常引发的玻璃化

软木脂是沉积在树皮、块茎、种皮以及根内皮层部位,由脂肪族和芳香族脂类物质形成的聚酯物质(Beisson et al., 2007; Alonso-Serra et al., 2019; Philippe et al., 2020)。软木脂在植物与外界环境之间的气体、水分与溶质交换以及保护植物免受生物与非生物胁迫中发挥重要作用(Andersen et al., 2015; Tylová et al., 2017)。软木脂成分的改变增强了马铃薯(*Solanum tuberosum*)块茎皮层对水分的渗透性;拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种皮软木脂沉积的减少干扰了种子的渗透性和休眠(Serra et al., 2010; Fedi et al., 2017)。拟南芥中软木脂合成相关的甘油-3-磷酸酰基转移酶5基因突变后,突变体*Atgpat5-1*在较高湿度环境下呈现玻璃化表型(Hsu et al., 2021)。紫瓶子草(*Sarracenia purpurea*)属于食虫猪笼草,叶子进化为特殊的瓶状并贮存大量雨水,形成水生生态系统以诱捕猎物(Ellison and Gotelli, 2002; Adlassnig et al., 2011)。陆生植物一般不能长期浸没在水中,紫瓶子草叶子可以长期储存水分而不影响植物的生长特性,引起了研究人员的兴趣。经研究发现,紫瓶子草叶片的防水性与软木脂有关(Hsu et al., 2021)。从紫瓶子草中克隆的基因*SpGPAT5*所编码的蛋白质与拟南芥*AtGPAT5*蛋白存在72%的一致性和80%的相似性,且*SpGPAT5*能够回补高湿度环境下*Atgpat5-1*突变体的玻璃化表型(Hsu et al., 2021)。上述结果表明,GPAT5通过影响软木脂的合成降低植物的渗透性,

以减少植物生长过程中玻璃化的发生。

3.2 植物表皮蜡质改变导致的玻璃化

蜡质是由表皮细胞合成分泌的覆盖于地上器官表面的保护性疏水屏障,不仅能够提高植物抵抗低温胁迫(Ladaniya, 2011)、紫外辐射(Barták et al., 2018)及病虫害侵袭的能力(牟香丽等, 2013),也通过限制非气孔性水分散失及降低自由水含量等方式保持植物自身的水分平衡状态(黄世安等, 2021)。植物表皮蜡质的化学组成复杂,主要由脂肪酸及其衍生而来的烷烃、醇、醛、酮和酯等100多种疏水有机物组分构成(Li et al., 2020; 黄世安等, 2021)。不同植物表皮蜡质的晶体结构、组成成分以及各组分含量(Li et al., 2020)有明显差异,其多样性差异通过影响蜡质渗透率变化调节植物对于干旱和水涝环境的适应性。拟南芥ABC转运蛋白(ATP-binding cassette transporters)家族中G亚家族成员ABCG5在幼苗子叶中大量表达,通过促进高密度表皮蜡质层的形成增强植物对水涝环境的适应性(Lee et al., 2021)。当*abcg5*突变体在不含蔗糖的1/2MS培养基上生长时,不能正常生长发育形成真叶,子叶甚至整个植株呈透明的水浸状(Lee et al., 2021),即缺糖培养时*abcg5*突变体表现典型的玻璃化表型。与其它所有玻璃化苗类似,*abcg5*突变体茎尖分生组织扁平,由含有大量液泡、体积增大的细胞以无规则排列方式构成;叶绿体结构异常,叶绿素和蔗糖含量降低;质外体含水量过多,植株经历严重的低氧胁迫(Lee et al., 2021)。对*abcg5*突变体玻璃化原因进行探究发现,ABCG5突变后表皮角质层的厚度减小,渗透率明显增大,角质层中蜡质含量明显降低。ATTED-II (*Arabidopsis thaliana* trans-factor and cis-element prediction database)数据库的共表达分析结果显示,ABCG5与角质合成相关基因、蜡质合成相关基因以及脂质转运基因共表达(Lee et al., 2021)。上述结果表明,ABCG5通过影响表皮蜡质形成调节植物的玻璃化,增强植物发育早期对水涝环境的适应性。

3.3 细胞膜过氧化受损导致的玻璃化

细胞质膜是细胞与外界环境之间的一道选择通透性屏障,在维持细胞内环境的稳定性方面具有重要作用。许多植物组织培养过程中玻璃化现象的出现就是

由于活性氧(reactive oxygen species, ROS)过度积累导致质膜过氧化, 进而使质膜完整性受损引发。外源添加抗氧化性物质多胺(polyamine, PA)或水杨酸(salicylic acid, SA)使玻璃化苗复壮即是通过降低 H_2O_2 含量实现的(Hassannejad et al., 2012; Sreelekshmi and Siril, 2020)。但非组培苗中因氧化胁迫导致细胞膜完整性受损引发的玻璃化报道很少。

拟南芥*fro1* (*frostbite1*)突变体叶片的玻璃化是一个由 H_2O_2 过度积累导致的例子(Lee et al., 2002)。基因*FRO1*编码的蛋白与线粒体电子传递链复合体I中18 kDa的Fe-S亚基(即NADH脱氢酶亚基)高度相似。正常生长条件下, *fro1*突变体叶片呈深绿色透明水浸状。电解质渗透率检测结果显示, *fro1*突变体叶片的电导率明显增加, 表明该突变体的电解质渗透率明显增加。电解质渗透率是细胞膜完整性的重要标志, 电解质的渗透率越高, 细胞膜越不完整(Zhu et al., 2014)。*fro1*突变体叶片较高的电解质渗透率暗示该突变体细胞膜的完整性受到破坏。由于*FRO1*基因编码线粒体中电子传递链复合体I的NADH脱氢酶亚基, *fro1*突变体中该亚基的突变导致ROS大量积累。大量积累的ROS通过诱导细胞膜中脂质的过氧化破坏细胞膜的完整性。*fro1*突变体呈现较深的DAB染色结果, 表明该突变体中积累了大量 H_2O_2 形式的ROS。因此, *fro1*突变体叶片的玻璃化表型最终由细胞膜过氧化受损导致(Lee et al., 2002; Zhu et al., 2014)。

3.4 离子或水分子跨膜运输受阻导致的玻璃化现象

ACA8 (autoinhibited Ca^{2+} -ATPases 8)是质膜定位的P型自抑制 Ca^{2+} -ATP酶, 主要参与调节胞内 Ca^{2+} 的输出, 维持细胞内的低 Ca^{2+} 水平(Bose et al., 2011; Costa et al., 2017)。研究发现, 拟南芥中ACA8基因突变后, 缺糖培养基上突变体*aca8*主根生长受抑制, 真叶形成受阻, 叶绿素含量明显降低, 呈典型的玻璃化现象(Zhang et al., 2014)。*aca8*突变体中液泡膜定位的钙转运蛋白ACA4、ACA11、CAX1、CAX3以及叶绿体定位的钙转运蛋白ACA1对应的基因表达量明显增高, 表明ACA8突变后, Ca^{2+} 从细胞质向质外体的转移受到抑制, 多余的 Ca^{2+} 主要进入液泡和叶绿体中(Zhang et al., 2014)。虽然 Ca^{2+} 是植物生长的必需元素, 但是细胞中 Ca^{2+} 浓度过高会对细胞产生毒害。用甘露醇代替蔗糖不能缓解*aca8*的玻璃化表型, 电

解质渗透率检测结果显示, *aca8*突变体的电解质渗透率明显高于野生型和互补植株。上述结果表明, *aca8*的玻璃化表型是由细胞内 Ca^{2+} 大量积累导致细胞膜完整性受损引发。外源添加蔗糖可有效促进玻璃化*aca8*的复壮(Zhang et al., 2014)。碳水化合物的可用性、代谢以及转运对植物水淹胁迫抗性至关重要。抗涝性强的水稻(*Oryza sativa*)品种(FR13A, Kalaputia)中非结构性碳水化合物的含量比敏感品种(Sarala和IR42)高(Rosa et al., 2009; Panda and Sarkar, 2014)。野薄荷(*Mentha arvensis*)中的MaRAP2-4 (ethylene response factor subfamily B-2 of ERF/AP2 transcription factor 4)是水涝胁迫的正调节因子, 该蛋白可以与拟南芥糖转运蛋白AtSWEET10 (Sugar Will Eventually be Exported Transporter10)基因启动子上的顺式作用元件DRE (dehydration response elements)和GCC (AGCCGCC-involved in biotic response box)盒2个部位特异结合, 促进糖的可用性, 增强植物的低氧胁迫抗性。研究发现, 外源添加蔗糖促进*aca8*突变体的复壮不仅与糖的碳源与能量性质有关, 也与糖诱导光合作用相关基因以及细胞周期调节因子的表达密切相关(Phukan et al., 2018)。

水孔蛋白是生物体内调节细胞水分跨膜运输的关键蛋白, 在植物水分平衡以及渗透压调节方面发挥重要作用(Sade et al., 2009; Zhu et al., 2014; 徐铭等, 2020)。利用高等植物水孔蛋白PIP2 (plasma membrane intrinsic protein 2)的类肽适配体PPA7 (与PIP2保守序列亲和力较高的7号类肽分子)检测玻璃化和正常石竹植株中水孔蛋白的表达, 发现玻璃化石竹中水孔蛋白的表达量显著高于正常植株(徐铭等, 2020)。在野生型拟南芥中超表达水孔蛋白(tonoplast intrinsic protein 1;1)基因*AtTIP1;1*得到的转基因植株35S:*AtTIP1;1*叶片呈透明玻璃化状态(Zhu et al., 2014)。与野生型体外水分注射导致的玻璃化表型类似, 转基因植株35S:*AtTIP1;1*的玻璃化表型在切断维管束水分供应后能快速得到恢复(Zhu et al., 2014)。上述结果证明, 超表达植株35S:*AtTIP1;1*的玻璃化表型是水孔蛋白功能异常引发的叶肉细胞间水分过度积累, 而非细胞膜完整性受损导致。

水孔蛋白的基因表达和活性状态在转录以及转录后水平上受到多种因素影响(Yang et al., 2009;

Rae et al., 2011)。拟南芥ERF (ethylene-responsive element binding factor)家族转录因子TG (TRANSLUCENT GREEN)直接结合并激活3种水孔蛋白基因*AtTIP1;1*、*AtTIP2;3*和*AtPIP2;2*的表达。TG超表达植株35S: TG呈现与转基因植株35S: *AtTIP1;1*相似的玻璃化表型, 此玻璃化表型在切断维管束水分供应后能快速得到恢复(Zhu et al., 2014)。但是*AtTIP2;3*和*AtPIP2;2*的超表达并未导致拟南芥出现类似35S: TG和35S: *AtTIP1;1*的玻璃化现象(Zhu et al., 2014)。以上实验表明, TG通过调节水孔蛋白基因35S: *AtTIP1;1*的表达影响拟南芥的玻璃化状态, TG超表达导致的玻璃化与水孔蛋白功能异常导致的细胞间水分的过度积累有关。

3.5 功能未知基因表达异常导致的玻璃化

cri (*cristal*)是拟南芥中最早被分离出来的具有稳定可遗传玻璃化表型的突变体。该突变体的出现为玻璃化机制的遗传分析提供了很好的材料。图位克隆结果证明, *CRI1*基因定位于4号染色体, 接近分子标记DHS1 (Delarue et al., 1997)。对*cri1*突变体玻璃化的机制进行研究, 发现*cri1*的玻璃化可能有3方面原因: (1) 突变体内部具有比野生型更高的渗透势, 突变体内部的高渗透势可能是由于含有渗透活性物质, 如低分子量的细胞壁多糖; (2) 突变体细胞分裂素水平增高, 定量测定*cri1*突变体中生长素、细胞分裂素和脱落酸的含量, 发现生长素和脱落酸的含量与野生型相比无明显差别, 但细胞分裂素含量几乎增加6倍; (3) 细胞表面角质层的改变, *cri1*突变体叶表面气孔功能正常, 但是蒸腾作用受阻, 暗示该突变体表面的角质层可能发生了改变(Delarue et al., 1997)。 *CRI1*基因的发现有助于揭示CRI1的功能以及植物玻璃化的分子机制。

4 总结与展望

玻璃化是一个复杂的生物学过程, 虽然导致植物玻璃化的机制多种多样, 但无论组培苗还是非组培苗, 玻璃化后最终都表现为水势显著升高、自由水含量增加、组织含水量高于正常植株。气体分子在水中的扩散速度是空气中的1/10 000 (Jackson, 1985), 水分大量积累严重阻碍了植物组织的气体交换, 导致植物生理功能紊乱(Gribble et al., 2003)。这些增加的水主

要在共质体和质外体空间积累, 共质体中水分的积累与玻璃化幼苗纤维素和木质素含量减少、壁压降低及细胞过度吸水有关(van den Dries et al., 2013)。植物质外体空间是细胞之间的空隙, 属于细胞壁的延续, 质外体水分积累的分子机制比较复杂(van den Dries et al., 2013)。

由于人工组织培养是人为模拟待培养植物的培养基和培养条件, 模拟条件并不能完全符合待培养植物的固有需求, 因此许多研究者认为玻璃化的原因是人工组织培养环境与自然环境差异形成的胁迫引发的(高弘扬等, 2019)。但环境差异导致的胁迫究竟是先引发外部器官形态异常进而引发植物内部生理功能失调, 还是先破坏植物内部稳态平衡而后引发外部结构畸变并无统一结论。此外, 环境差异导致的胁迫也不能很好地解释为什么同一培养瓶中同时存在正常植物和玻璃化植株的现象。以非组织培养材料为研究对象, 避免了人为因素的干扰, 有助于从本质上揭示玻璃化发生的分子机制。近年来, 随着植物生理学、生物化学、分子生物学、基因组学以及蛋白质组学技术的不断发展, 人们对玻璃化的发生机理有了一定的认识, 认为玻璃化的发生是分子层面基因或蛋白表达异常导致的植物防水系统受损, 如软木脂合成异常、表皮蜡质防水性降低、细胞膜完整性被破坏或水孔蛋白功能失调, 造成生理异常现象。本文总结了近年来发现的能够影响植物玻璃化的基因或蛋白(表1), 但在组培苗玻璃化中发挥重要作用的蛋白或基因是否参与调节非组培苗的玻璃化还有待进一步研究。

目前, 以非组培苗为材料进行玻璃化机制研究的报道较少, 组培材料玻璃化的研究成果为非组培苗玻璃化机制的研究提供了重要参考依据。对玻璃化幼苗进行转录组分析, 发现不同转录因子如MYB2、RNA结合蛋白PPR (pentatricopeptide repeat)、ABC转运蛋白和Laccase3的表达发生改变(Bakir et al., 2016)。对比正常叶片和玻璃化叶片的RNA-Seq (RNA测序)结果, 发现超过300个转录本的表达发生了变化, 排名前30位的DETs (差异表达转录本)主要参与细胞器基因表达、光合作用、细胞降解、植物角质层发育以及非生物应激反应等过程的转录后调控(Muneer et al., 2016; Soundararajan et al., 2017; 赵一鸣等, 2019)。DNA的表观遗传修饰(如甲基化)也是玻璃化形成的分子机理之一(Zilberman et al.,

表1 影响植物玻璃化的基因及蛋白质

Table 1 Genes or proteins with mutation or abnormal expression leading to plant vitrification

材料类型	基因或蛋白名称	作用	调节玻璃化机制	参考文献
非组培材料	ABCG5	ABC转运蛋白G亚家族成员	通过调节表皮蜡质形成,使表皮角质层的厚度降低,渗透率明显增加,外界水分大量渗入引发玻璃化	Lee et al., 2021
	ACA8	IIB亚家族中的P型自抑制Ca ²⁺ -ATP酶	主要参与调节胞内Ca ²⁺ 的输出,维持细胞内的低Ca ²⁺ 水平,突变后细胞膜完整性受损,细胞内离子大量泄漏引发玻璃化	Zhang et al., 2014
	CRI1	拟南芥 <i>cristal</i> 突变体,功能未知	突变后可能通过促进细胞渗透压升高、细胞分裂素水平增高以及表面的角质层改变导致植物玻璃化	Delarue et al., 1997
	FRO1	编码NADH脱氢酶	编码的NADH脱氢酶是线粒体电子传递链的一个亚基,突变后导致线粒体内电子传递异常,活性氧大量积累,细胞膜的完整性受损,细胞内离子大量泄漏引发玻璃化	Lee et al., 2002
	GPAT5	甘油-3-磷酸酰基转移酶5	通过影响软木脂及其相关蜡质的合成使植物的渗透率增加,导致高湿环境中水分大量渗入引发玻璃化	Hsu et al., 2021
	TIP1;1	编码水孔蛋白	超表达后导致叶肉细胞间水分过度积累引发玻璃化	Zhu et al., 2014
	TG	拟南芥ERF家族转录因子	超表达后通过影响水孔蛋白基因 <i>TIP1;1</i> 功能导致叶肉细胞间水分过度积累引发玻璃化	Zhu et al., 2014
组培材料	ACS1和ACO1	乙烯合成相关基因	基因表达被抑制后通过降低内源乙烯含量间接促进H ₂ O ₂ 含量降低和气孔开度增加,促进玻璃化植物的失水和复壮	Sreelekshmi and Siril, 2020
	BIP蛋白同源蛋白	受生理胁迫表达	在植物玻璃化中的作用机制目前还不清楚	Fontes et al., 1999
	PAL	苯丙氨酸解氨酶	突变后降低木质素的合成引发玻璃化	Phan and Hegedus, 1986
	NADPH氧化酶	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶	通过诱导活性氧的产生引发玻璃化	Tian et al., 2017

2007; 赵一鸣等, 2019)。蓝莓(*Vaccinium* spp.)基因组甲基化的模式和水平决定其是否出现玻璃化现象(吕敏等, 2014)。樱桃(*Cerasus pseudocerasus*)继代培养次数过多会引起基因组甲基化,这种甲基化修饰导致试管苗发生玻璃化现象(田田等, 2015)。以非组培苗为材料对上述问题进行深入研究将为揭示玻璃化机制提供重要的线索与依据。

参考文献

高弘扬, 许丹芸, 周良云, 罗碧, 杨全 (2019). 试管苗玻璃化现象的研究进展. 现代农业科技 (20), 52–56, 59.

黄世安, 董晓庆, 朱守亮 (2021). 园艺植物表皮蜡质研究进展. 安徽农业科学 49, 6–10.

李海兵, 周娜, 赵姣, 李翔, 冯秋妍, 赵喜亭, 李明军 (2010). 怀山药种质资源的包埋玻璃化超低温保存与植株再生. 植物学报 45, 379–383.

吕敏, 夏秀英, 徐品三, 李波, 郭照东 (2014). 蓝莓玻璃化试管苗的显微结构及生理生化特性变化. 植物生理学报 50, 453–460.

牟香丽, 王超, 王帅 (2013). 甘蓝无蜡粉突变体叶表皮蜡质超微结构观察. 中国蔬菜 (4), 32–37.

田田, 刘鹏飞, 乔光, 文晓鹏 (2015). 玛瑙红樱桃离体快繁及组培苗的变异检测. 西南大学学报(自然科学版) 37, 30–37.

王玉英, 王琴, 李枝林, 魏全涛, 商正蕊, 凌青 (2020). 虎雪兰玻璃化超低温法脱毒技术的研究. 北方园艺 (5), 61–66.

徐铭, 赵子健, 夏秀英 (2020). 植物水孔蛋白PIP2表达量快速无标记检测. 大连理工大学学报 60, 15–21.

赵一鸣, 隋宝凤, 张欣燕, 侯凯琳, 刘柏玲 (2019). 组织培养中玻璃化现象的研究进展. 国土与自然资源研究 (6), 68–74.

Adlassnig W, Peroutka M, Lendl T (2011). Traps of carnivorous pitcher plants as a habitat: composition of the fluid, biodiversity and mutualistic activities. *Ann Bot* 107, 181–194.

Alonso-Serra J, Safronov O, Lim KJ, Fraser-Miller SJ, Blokhina OB, Campilho A, Chong SL, Fagerstedt K, Haavikko R, Helariutta Y, Immanen J, Kangasjärvi J, Kauppila TJ, Lehtonen M, Ragni L, Rajaraman S, Räsänen RM, Safdari P, Tenkanen M, Yli-Kauhaluoma JT, Teeri TH, Strachan CJ, Nieminen K, Salojärvi J (2019). Tissue-specific study across the stem reveals the chemistry and transcriptome dynamics of birch bark. *New Phytol* 222, 1816–1831.

Andersen TG, Barberon M, Geldner N (2015). Suberization—the second life of an endodermal cell. *Curr Opin*

- Plant Biol* **28**, 9–15.
- Bakir Y, Eldem V, Zararsiz G, Unver T** (2016). Global transcriptome analysis reveals differences in gene expression patterns between nonhyperhydric and hyperhydric peach leaves. *Plant Genome* **9**, 2.
- Barták M, Pláteníková E, Carreras H, Hájek J, Morkusová J, Mateos AC, Marečková M** (2018). Effect of UV-B radiation on the content of UV-B absorbing compounds and photosynthetic parameters in *Parmotrema austrosinense* from two contrasting habitats. *Plant Biol* **20**, 808–816.
- Beisson F, Li Y, Bonaventure G, Pollard M, Ohlrogge JB** (2007). The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 351–368.
- Bose J, Pottosin II, Shabala SS, Palmgren MG, Shabala S** (2011). Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants. *Front Plant Sci* **2**, 85.
- Costa A, Luoni L, Marrano CA, Hashimoto K, Köster P, Giacometti S, De Michelis MI, Kudla J, Bonza MC** (2017). Ca^{2+} -dependent phosphoregulation of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase ACA8 modulates stimulus-induced calcium signatures. *J Exp Bot* **68**, 3215–3230.
- Debergh P, Harbaoui Y, Lemeur R** (1981). Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol Plant* **53**, 181–187.
- Delarue M, Santoni V, Caboche M, Bellini C** (1997). *crystal* mutations in *Arabidopsis* confer a genetically heritable, recessive, hyperhydric phenotype. *Planta* **202**, 51–61.
- Ellison AM, Gotelli NJ** (2002). Nitrogen availability alters the expression of carnivory in the northern pitcher plant, *Sarracenia purpurea*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 4409–4412.
- Fedi F, O'Neill CM, Menard G, Trick M, Dechirico S, Corbineau F, Bailly C, Eastmond PJ, Penfield S** (2017). Awake1, an ABC-type transporter, reveals an essential role for suberin in the control of seed dormancy. *Plant Physiol* **174**, 276–283.
- Fontes MA, Otoni WC, Carolino SMB, Brommonschenkel SH, Fontes EPB, Fári M, Louro RP** (1999). Hyperhydricity in pepper plants regenerated *in vitro*: involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. *Plant Cell Rep* **19**, 81–87.
- Gribble KD, Sarafis V, Conroy J** (2003). Vitrified plants: towards an understanding of their nature. *Phytomorphology* **53**, 1–10.
- Hassannejad S, Bernard F, Mirzajani F, Gholami M** (2012). SA improvement of hyperhydricity reversion in *thymus daenensis* shoots culture may be associated with polyamines changes. *Plant Physiol Biochem* **51**, 40–46.
- Hsu YF, Yan JW, Song Y, Zheng M** (2021). *Sarracenia purpurea* glycerol-3-phosphate acyltransferase 5 confers plant tolerance to high humidity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **173**, 1221–1229.
- Jackson MB** (1985). Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. *Annu Rev Plant Physiol* **36**, 145–174.
- Ladaniya MS** (2011). Physico-chemical, respiratory and fungicide residue changes in wax coated mandarin fruit stored at chilling temperature with intermittent warming. *J Food Sci Technol* **48**, 150–158.
- Lee BH, Lee H, Xiong LM, Zhu JK** (2002). A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression. *Plant Cell* **14**, 1235–1251.
- Lee EJ, Kim KY, Zhang J, Yamaoka Y, Gao P, Kim H, Hwang JU, Suh MC, Kang B, Lee Y** (2021). *Arabidopsis* seedling establishment under waterlogging requires ABCG5-mediated formation of a dense cuticle layer. *New Phytol* **229**, 156–172.
- Li Y, Hou XY, Li XT, Zhao X, Wu ZN, Xiao Y, Guo YJ** (2020). Will the climate of plant origins influence the chemical profiles of cuticular waxes on leaves of *Leymus chinensis* in a common garden experiment? *Ecol Evol* **10**, 543–556.
- Muneer S, Soundararajan P, Jeong BR** (2016). Proteomic and antioxidant analysis elucidates the underlying mechanism of tolerance to hyperhydricity stress in *in vitro* shoot cultures of *Dianthus caryophyllus*. *J Plant Growth Regul* **35**, 667–679.
- Panda D, Sarkar RK** (2014). Mechanism associated with nonstructural carbohydrate accumulation in submergence tolerant rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *J Plant Interact* **9**, 62–68.
- Phan CT, Hegedus P** (1986). Possible metabolic basis for the developmental anomaly observed in *in vitro* culture, called 'vitreous plants'. *Plant Cell Tiss Org* **6**, 83–94.
- Philippe G, Sørensen I, Jiao C, Sun XP, Fei ZJ, Domozych DS, Rose JK** (2020). Cutin and suberin: assembly and origins of specialized lipidic cell wall scaffolds. *Curr Opin Plant Biol* **55**, 11–20.
- Phillips DJ, Matthews GJ** (1964). Growth and development of carnation shoot tips *in vitro*. *Bot Gaz* **125**, 7–12.
- Phukan UJ, Jeena GS, Tripathi V, Shukla RK** (2018). MaRAP2-4, a waterlogging-responsive ERF from *Mentha*, regulates bidirectional sugar transporter *AtSWEET10* to

- modulate stress response in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J* **16**, 221–233.
- Rae L, Lao NT, Kavanagh TA** (2011). Regulation of multiple aquaporin genes in *Arabidopsis* by a pair of recently duplicated DREB transcription factors. *Planta* **234**, 429–444.
- Rosa M, Prado C, Podazza G, Interdonato R, González JA, Hilal M, Prado FE** (2009). Soluble sugars-metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. *Plant Signal Behav* **4**, 388–393.
- Sade N, Vinocur BJ, Diber A, Shatil A, Ronen G, Nissan H, Wallach R, Karchi H, Moshelion M** (2009). Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SITIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? *New Phytol* **181**, 651–661.
- Serra O, Hohn C, Franke R, Prat S, Molinas M, Figueras M** (2010). A feruloyl transferase involved in the biosynthesis of suberin and suberin-associated wax is required for maturation and sealing properties of potato periderm. *Plant J* **62**, 277–290.
- Soundararajan P, Manivannan A, Cho YS, Jeong BR** (2017). Exogenous supplementation of silicon improved the recovery of hyperhydric shoots in *Dianthus caryophyllus* L. by stabilizing the physiology and protein expression. *Front Plant Sci* **8**, 738.
- Sreelekshmi R, Siril EA** (2020). Influence of polyamines on hyperhydricity reversion and its associated mechanism during micropropagation of China pink (*Dianthus chinensis* L.). *Physiol Mol Biol Plants* **26**, 2035–2045.
- Tian J, Cheng YQ, Kong XY, Liu M, Jiang FL, Wu Z** (2017). Induction of reactive oxygen species and the potential role of NADPH oxidase in hyperhydricity of garlic plantlets *in vitro*. *Protoplasma* **254**, 379–388.
- Tylová E, Pecková E, Blascheová Z, Soukup A** (2017). Casparian bands and suberin lamellae in exodermis of lateral roots: an important trait of roots system response to abiotic stress factors. *Ann Bot* **120**, 71–85.
- van den Dries N, Gianni S, Czerednik A, Krens FA, de Klerk GJM** (2013). Flooding of the apoplast is a key factor in the development of hyperhydricity. *J Exp Bot* **64**, 5221–5230.
- Yang O, Popova OV, Süthoff U, Lüking I, Dietz KJ, Goll-dack D** (2009). The *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factor AtbZIP24 regulates complex transcriptional networks involved in abiotic stress resistance. *Gene* **436**, 45–55.
- Zhang J, Zhang XD, Wang RP, Li WQ** (2014). The plasma membrane-localised Ca^{2+} -ATPase ACA8 plays a role in sucrose signaling involved in early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* **33**, 755–766.
- Zhu DL, Wu Z, Cao GY, Li JG, Wei J, Tsuge T, Gu HY, Aoyama T, Qu LJ** (2014). TRANSLUCENT GREEN, an ERF family transcription factor, controls water balance in *Arabidopsis* by activating the expression of aquaporin genes. *Mol Plant* **7**, 601–615.
- Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S** (2007). Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet* **39**, 61–69.

Research Progress of Hyperhydricity Mechanism in Plant Seedling Growth

Qingping Zhao^{1, 2}, Yuping liang², Fangyuan Zhou², Xiang Zhao^{2*}

¹College of Life Science and Agricultural Engineering, Nanyang Normal University, Nanyang 473061; ²State Key Laboratory of Crop Stress Adaptation and Improvement, School of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475004

Abstract Hyperhydricity (HH) or vitrification is a physiological disorder during plant growth, which shows a typical translucent phenotype like water-soaked that often occurs in the plant tissue culture. Vitrification is one of the three main influencing factors that limit the tissue culture technology and the commercialized production of seedlings during the plant tissue culture, but its molecular mechanism is still unclear by far. Using plantlets from the tissue culture as a research object often lead to an interference of man-made factors, which can be avoided by non-tissue culture material to reveal the molecular mechanism of vitrification in nature. This review summarized the recent progress of mechanism for inducing HH in non-tissue culture plants, including the abnormal deposit of suberin, the reduction of cuticular wax, the lipid peroxidation in cellular membranes and the disrupted transmembrane transport of ion or water, to provide new clues and thinking for hyperhydricity in plant seedling growth.

Key words aquaporins, cell membrane, cuticular wax, hyperhydricity, suberin

Zhao QP, liang YP, Zhou FY, Zhao X (2022). Research progress of hyperhydricity mechanism in plant seedling growth. *Chin Bull Bot* **57**, 90–97.

* Author for correspondence. E-mail: xzhao@henu.edu.cn