

植物组织培养技术及应用进展

盛玉婷

(南京农业大学生命科学学院, 江苏南京 210095)

摘要:植物组织培养技术作为一种科研手段, 发展异常迅猛。本文回顾了植物组织培养的基本原理、培养基、以及各种激素的作用机理和培养方法, 简述了离体无性系快速繁殖与无毒化、植物育种、遗传物质的保存及植物次生代谢物的生产等组织培养技术在应用研究领域所获得的突破。

关键词:植物组织培养; 植物激素; 快繁; 脱毒; 转基因

中图分类号 Q944.6 **文献标识码** A **文章编号** 1007-7731(2008)09-45-03

Advance of Plant Tissue Culture and Its Application

Sheng Yuting (Nanjing agricultural University, Jiangsu Nanjing 210095)

Abstract: Tissue culture, as a way of science research, has developed rapidly. Plant tissue culture was widely used in the crop breeding, taking of virus, reproducing quickly, preserving genetic materials, producing secondary metabolites and in the transformation of plant gene. This article mainly introduces the principle and the application of tissue culture including its culture, method, and the mechanism.

Key words: Plant tissue culture; phytohormone; intermediate propagation; detoxication; transgenic

自哈布兰特(G. Haberlandt)提出细胞全能性理论以来, 在无数科学家的努力下, 离体培养经过 80 多年的历程后, 其培养技术日趋完善。20 世纪 50 年代以来, 植物组织培养发展十分迅速。利用组织培养, 不仅可以生产大量的优良无性系, 并可获得人类需要的多种代谢物质; 细胞融合可打破种属间的界限, 克服远缘杂交不亲和性障碍, 在植物新品种的培育和种性改良中有着巨大的潜力; 其植物细胞也成为在细胞水平上分析研究的理想材料。植物组织培养技术已渗透到植物生理学、病理学、遗传学、育种学以及生物化学等各个研究领域, 成为生物学科中的重要研究技术和手段之一, 并广泛应用于农业、林业、工业、医药业等多种行业, 产生了巨大的经济效益和社会效益, 已成为当代生物科学中最有生命力的一门学科^[1]。

1 组织培养的基本原理

1.1 植物组织培养的概念 植物组织培养技术是指在无菌条件下, 将离体的植物器官(如根尖、茎尖、叶、花、未成熟的果实、种子等)、组织(如形成层、花药组织、胚乳、皮层等)、细胞(如体细胞、生殖细胞等)、胚胎(如成熟和未成熟的胚)、原生质体培养在人工配制的培养基上, 给予适宜的培养条件, 诱发产生愈伤组织或潜伏芽等, 或长成完整的植株的技术^[1]。

1.2 植物组织培养的依据 植物组织培养的依据是植物细胞“全能性”及植物的“再生作用”。1902 年, 德国著名植物学家 G. Haberlandt 根据细胞学理论, 大胆地提出了高等植物的器官和组织可以不断分割, 直到单个细胞, 即植物体细胞在适当的条件下具有不断分裂和繁殖, 发育成完整植株的潜力的观点。1943 年, 美国人 White 在烟草愈

伤组织培养中, 偶然发现形成一个芽, 证实了 G. Haberlandt 的论点。在许多科学家的努力下, 植物组织培养技术得到了迅速发展, 其理论和方法趋于完善和成熟, 并广泛应用产生了巨大的经济效益和社会效益。

1.3 培养基的选择 组织培养的基础培养基有 MT、MS、SH、White 等。由于不同植物所需要的生长条件有所不同, 会对培养基做一些不同的处理, 一般采用较多的是 MS。组织培养采用固体培养基的较多, 但只有在植物周围的营养物和激素被吸收, 如果其他残留的培养基也能被利用, 对工厂化生产的成本减少方面有很大的帮助。董雁等^[2]利用回收转换后废弃的继代培养基, 加入原继代培养基 30% 浓度母液的培养基, 培养效果与原继代培养基的基本相同, 说明继代培养基再利用是可行的, 这为规模化组培育苗开辟了新的途径。杜勤^[3]等在外源激素条件下, 研究液体和固体培养基对黄瓜子叶培养器官分化的影响, 结果用液体培养基直接诱导花芽率更高, 分化高峰期出现的时间也更早, 说明液体培养基对外植体的生长更有利, 只是固体培养基更易操作而被较广泛应用。

1.4 各种激素的作用机理 IAA 能促进细胞壁的扩张和诱导纤维素酶的形成^[5]。Hail 从燕麦芽鞘分离出原生质体, 它可以保存在 11% 的蔗糖溶液中, 若添加少量 IAA, 只需 5 min 原生质体就会破裂。这是 IAA 首先作用于质膜的一个证据。当 IAA 直接同原生质膜结合时, 引起膜构象和透性的变化, 增加了离子流动, 产生生物电位变化或一系列代谢变化, 发生快速效应。

2, 4-D(2, 4-二氯苯氧乙酸)诱导体细胞胚胎发生的作用机制是诱导一些特异蛋白质形成, 2, 4-D 的浓度

与 DNA 甲基化有关,通过改变细胞内源 IAA 代谢而起作用等。

CTK 对硝酸还原酶的合成有明显的调节作用^[5]。Kende 以麦仙翁种子为材料,证明 BA 可以诱导硝酸还原酶蛋白的重新合成;陈微用蛋白合成抑制剂环己亚胺,阻抑了 6-BA(6-苄基腺嘌呤)的这种诱导作用;叶叙丰用紫外线诱变技术,在氯酸盐培养基上选得了缺少硝酸还原酶活力的突变细胞株;陆嘉陵等发现这些细胞中含 6-BA 受体位点比对照明显少,它们即使生长在加有 6-BA 的培养基上也不能变绿。

GA 诱导 α -淀粉酶的合成。杨文钰等用 GA3 处理发芽的大麦、小麦和黑麦种子能诱导出 α -淀粉酶、蛋白酶、核酸酶、磷酸酯酶和过氧化物酶。胚乳切片和糊粉层的离体培养证明 GA3 诱导 α -淀粉酶的形成,洗去 GA3, α -淀粉酶的合成停止。同时发现:经 GA3 处理后,大麦糊粉层中 RNA 增加。当用 14C-尿核苷处理时,糊粉层中有放射性的 RNA,表明 GA3 加速了转录。现已发现 GA3 可影响大麦糊粉层和玉米盾片的核酸甲基化,同时也调节 5'-末端的 7-甲基鸟嘌呤结构,从而影响翻译活性。

目前已证明许多激素如生长素、赤霉素和细胞分裂素均有专一性的受体,后者大多为蛋白质,一般认为受体蛋白存在于细胞核或质膜上,或共同存在于两者之中。

2 组织培养的方法

组织培养的材料称为外植体,主要形式有器官、胚胎、细胞、原生质体等^[6]。一般认为,诱导愈伤组织的成败关键不在于植物材料的来源,而在于培养条件。植物组织培养中,影响培养力的因素是多方面的,而植物激素是愈伤组织诱导和绿苗分化的关键因素。

诱导愈伤组织的最常用的生长素是 IAA、NAA 和 2,4-D,所需浓度为 0.10-10 mg/L。大多材料选用 2,4-D,它对愈伤组织的诱导作用优于其它生长素,缺乏 2,4-D 是导致直接出芽的原因。

在植物组织培养中,最常用的细胞分裂素是 KT 和 6-BA。KT 的主要作用是促进细胞分裂和愈伤组织分化。KT 对愈伤组织诱导率不大,但可以改善愈伤组织的质量,在一定程度上能延缓愈伤组织的衰老,延缓其器官分化能力的丧失,从而提高植株再生频率。

ABA 对植物体细胞胚的发生与发育具有重要作用。它对胚胎愈伤组织的发生有良好作用,可以增加愈伤组织的致密和分生细胞的数目,且有利于愈伤组织的诱导和再生能力的保持,降低分化过程中的发芽率^[7,8]。

各类植物激素的生理作用虽有相对专一性,但是植物的各种生理效应是不同种类激素之间相互作用的综合表现^[9]诱导脱分化和再分化过程更非某类激素单独作用的结果。王冬梅等^[10]研究表明,2,4-D 和 BA 是诱导分生愈伤组织、胚胎细胞和胚状体所必需的,但在诱导过程中,2,4-D 浓度应逐步降低,否则愈伤组织细胞不能成为胚胎细胞,而提前分化生根,则表明组织培养中生长素含量

过高不利于胚胎发生。

3 组织培养技术的应用

3.1 在植物脱毒和快速繁殖上的应用 植物脱毒和离体快速繁殖是目前植物组织培养应用最多、最有效的一个方面。很多农作物如马铃薯、甘薯、大蒜等都带有病毒,但感病植株并非每个部位都带病毒,White 早在 1943 年就发现植物生长点附近的病毒浓度很低甚至无病毒。如果利用组织培养方法,取一定大小的茎尖进行培养再生可获得脱病毒苗,再用脱病毒苗进行繁殖,则种植的作物就不会或极少发生病毒。此法已在马铃薯、草莓等多种作物上获得成功,并产生了明显的经济效益。由于运用组织培养法繁殖植物的明显特点是快速,每年可以数以百万倍的速度繁殖,因此,对一些繁殖系数低、不能用种子繁殖的名、优、特植物品种的繁殖,意义尤为重大。目前,观赏植物、园艺作物、经济林木、无性繁殖作物等部分或大部分都用离体快繁提供苗木,试管苗已出现在国际市场上并形成产业化。^[11]

3.2 在植物育种上的应用 植物组织培养技术对培育优良作物品种开辟了新途径。目前,国内外已把植物组织培养普遍应用于作物育种,并在以下几个方面取得了较大进展:

3.2.1 单倍体育种 单倍体植株往往不能结实,在培养中用秋水仙素处理,可使染色体加倍,成为纯合二倍体植株,这种培养技术在育种上的应用称为单倍体育种。单倍体育种具有高速、高效率、基因型一次纯合等优点,因此,通过花药或花粉培养的单倍体育种,已经作为一种崭新的育种手段问世,自 1964 年 Guha 等获得曼陀罗的花药单倍体植株以来,单倍体育种在国际上引起很大重视,各国纷纷开展这方面的研究工作,已先后在水稻、小麦、玉米、辣椒以及许多药用植物如枸杞、人参、平贝母中获得单倍体植株,共计 300 多种。其中许多已经应用于育种研究并得到了专利品种。我国在 20 世纪 70 年代掀起了单倍体育种的高潮,在农作物上取得了一批有实用价值的育种成果,特别是培育禾本科粮食作物,现在已经培育出水稻新品种 15 个、小麦新品种 6 个。

3.2.2 胚、子房、胚珠离体培养 植物胚培养是采用人工的方法在无菌条件下从种子中将成熟胚和未成熟胚分离出来,在人工合成的培养基上培养,使它发育成正常的植株,从而有效地克服远缘杂交不实的障碍,获得杂种植株。胚培养已在 50 多个科属中获得成功,如亚麻、棉花、黄麻等。从玉米的离体子房培养,经体外授粉也可获得种子。远缘杂交中,可把未受精的胚珠分离出来,在试管内用异种花粉在胚珠上萌发受精,产生的杂种胚在试管中发育成完整植株,称为“试管受精”。目前,在这一方面获得成功的自交或远缘杂交不亲和性植物有:怀地黄、矮牵牛、普通小麦、黑麦草等。

3.2.3 体细胞杂交育种 在转移胞质雄性不育特性,获得抗病及抗除草剂特性方面都已取得显著进展,并为克服远缘杂交时有性生殖上的障碍提供一种新的技术。美国

科学家采用细胞融合技术将番茄和马铃薯的细胞融合在一起,培育出称为“番茄薯”或“薯番茄”的新型植物。此外,获得成功的属间体细胞杂种植物还有:烟草+大豆、烟草+龙葵、芥菜+油菜等,这些属间杂种无法用有性杂交得到,这为远缘杂交育种开辟了新途径。

3.2.4 单细胞培养突变体的选择与应用 这是从细胞水平改造植物的一条途径。用单细胞培养的方法诱导单细胞突变,筛选需要的突变体培养成植株,经有性繁殖使遗传性状稳定下来。目前成功的例子有:已选育出抗花叶病毒的甘蔗无性系;抗1%~2% NaCl 的野生烟草细胞株;抗除草剂的白三叶草细胞株等。

3.3 在人工种子和种质低温保存方面的应用 组织培养物,如试管苗、愈伤组织等,在液氮(-196℃)条件下,加入冷冻保护剂,可有效降低代谢水平,利于长期保存。利用组织培养保存植物种质资源具有体积小、保存数量多、条件可控制、避免病虫害再度侵染、节省人力和土地等优点,是一种经济有效的种质保存方法。一些国家已建立了种质库,而我国在这方面还有待发展。在国际上一个新动向是“人工种子”的试验。所谓“人工种子”,是指以胚状体为材料,经过人工薄膜包装的种子在适宜条件下它萌发长成幼苗。我国成功地研制成水稻人工种子。目前有100多种植物可以经组织培养获得大量的胚状体,为制成人工种子用于生产提供了基础。可见,组织培养将在遗传育种、作物改良和改革作物栽培中获得更大的成效^[12]。

3.4 在提取植物次生产物生产上的应用 植物次生代谢物是许多医药、食品、色素、农药和化工产品的重要原料,其需求量逐年增加,组织培养技术对植物次生代谢产物的生产提供了有效的途径。由于任何植物的离体细胞在人工培养下仍具有合成药物成分的能力,并通过可通过调节培养条件有效地提高其含量和质量,为此,利用组织培养生产药物,已发展成为组织培养再生产应用的主流之一。利用组织培养技术,可以大量生产植物次生代谢物,以满足目前的需求量,同时有效地保护日益短缺的野生药用植物资源。仅从20世纪90年代以来的植物药用有效成分国际专利就达50多项,其中多为抗病毒、抗癌化合物^[11]。

4 植物组织培养的前景和存在的问题

组织培养技术已为人们广泛的应用在各个领域,它为

许多学科研究植物生长发育、抗性生理、激素及器官发生与胚胎发生等提供了许多良好试材和有效途径。由于组织培养在人工控制的条件下进行的,可在试管内人工受精,获得杂种或自交种;通过分离单倍体细胞,能培育纯合的二倍体优良品系,缩短育种时间;通过选择突变体,提高植物的品质,扩大植物的生长范围;将体细胞冷藏在低温下,建立基因库,达到保存物种的目的;获得药用价值高和工业生产所需的次生产品等,这些应用已引起广泛的关注。但是长期以来,组织培养多数还停留在试验研究上,在应用生产方面还有一定不足,因此今后需要有一套可行的措施,将研究成果转化为有经济价值的大规模生产实践。

参考文献

- [1] 王文静,袁道强,高松洁. 植物组织培养的应用现状. 河南师范大学学报,2000,(3):137-1391
- [2] 董雁,赵继梅,别婉丽. 继代培养基再利用研究[J]. 辽宁林业科技,1998,(4):131
- [3] 杜勤,竺莉红,梁海曼. 无外源激素条件下液体和固体培养基对黄瓜子叶培养器官分化不同影响[J]. 生物技术,1996,6(1):172191
- [4] 梁一池,杨华. 植物组织培养技术的研究进展. 福建林学院学报,2002,22(1):1-31
- [5] 杨文钰,袁继超,罗琼. 植物化控1. 四川科学技术出版社,1997,8:188-1891
- [6] Negussie A. Induce more buds of juniperus excelsa's tissue culture[J]. For. Eco. Manage,1997,98(2):115-1231
- [7] 陈荣敏,温书敏,朗明林. 脱落酸(ABA)对小麦花药培养的影响. 河北农业大学学报,1999,22(2):24-261
- [8] Narayanan, S. L et al. Effect of abscisic acid in enhancing plant regenerability in rice. Rice Biotechnology Quarterly,2000,(4):10-161
- [9] 李宗霞,周燮. 植物激素及其免疫检测技术. 江苏科学技术出版社,19961
- [10] 王冬梅,黄学林,黄志. 细胞分裂素类物质在组织培养中的作用机理. 植物生理学报,1996,32(5):373-3771
- [11] 胡彦,赵艳. 植物组织培养技术的应用以及在培养过程中存在的问题. 陕西师范大学学报(自然科学版),2004,(32):130-134
- [12] 王秀丽,杨煜,徐平丽,李爱琴,单雷. 植物组织培养的应用及进展. 山东农业科学,2005,(3):78-80

(责编:张琪琪)

(上接15页)提高污水利用率。以色列是世界上污水利用率最高的国家,废水回收利用率达30%以上,每年大约有2亿m³的净化污水用于农业。同时解决了工业废水对土壤的污染,保持了耕地的可持续利用。

3.5 重视教育和科技协作攻关 以色列把教育作为社会的一种基本财富,在农业上除正规教育外,大力发展中等专业学校,一些中学还设有中学后教育机构,开设职业培训课程。正是基于这一点,使科研与生产的配合非常密切。以色列农业部下属的农业推广人员随时把科技单位产品成果带到基布兹、莫沙夫农户,让其进行农田试验,进

行示范推广,同时又把试验中出现的新情况带回到科研单位进行研究设计,不断改进,从而大大提高了农业科技进步的贡献率。

世界各国在发展农业的具体做法上有一定差异,但在合理利用资源和积极推广农业科学技术方面是相同的,这也是世界农业发展的总趋势。在世界经济日趋一体化、全球化、联系越来越密切的今天,中国和各国的农业贸易潜力很大。如何依靠科学技术,实现农业的高产、优质、高效,是我国面临的大课题,而美国、法国、以色列有许多成功经验值得我们借鉴。

(责编:陶学军)