

植物组织培养技术的现状及发展趋势

马慧, 张立军*, 阮燕辉, 崔振海 (沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁沈阳 110161)

摘要 概述了植物组织培养技术的发展现状、存在问题及发展趋势。

关键词 植物组织培养技术; 现状; 发展趋势

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)06-01602-03

植物组织培养(Plant tissue culture)是以植物生理学为基础发展起来的一门新生的生物技术学科。植物组织培养包括了所有类型的无菌培养技术, 主要有: ①成熟及未成熟植物胚胎的离体培养; ②离体器官包括根尖、茎尖、叶原基、花器官原基或未成熟花器官各部分以及未成熟果实的培养; ③从植物各种器官的外植体增殖而形成的愈伤组织培养; ④能保持良好分散性的离体细胞或很小细胞团的液体培养; ⑤除去细胞壁的植物原生质体培养。这一学科的建立和发展, 对植物科学的各个领域如细胞学、胚胎学、遗传学、生理学、生物化学、植物病理学、发育生物学等学科的发展均有很大的促进作用, 并在科学研究和生产应用上开辟了令人振奋的多个新领域。近年来发展很快, 广泛应用于植物的快速繁殖、植物品种改良、基因工程育种、种质资源保存、次生代谢产物生产等方面, 对现代农业和医药等领域产生了深刻影响。笔者就该技术的现状及发展趋势作一讨论。

1 植物快繁技术

植物快繁是利用体外培养方式快速繁殖植物的技术, 主要应用于用其他方式不能繁殖, 或繁殖效率低的植物的繁殖。为了保持某一品种的基因型稳定, 避免在有性繁殖过程中发生变异, 也采用植物快繁技术。快繁中利用的植物材料主要是茎尖、茎切段、叶片、胚等。快繁技术容易掌握, 繁殖率高。但是植物组培快繁无论在技术上, 还是在产业化方面都存在一定的困难。首先, 快繁技术的推广应用还存在着技术障碍。不同种类植物通过组培再生植株难易程度差异很大, 尽管许多植物都有组培成功的报道, 但由于繁殖率低等问题, 真正应用于大规模生产的并不多。总的来讲, 木本植物的组织培养难于草本植物, 单子叶植物难于双子叶植物。对于一些木本植物而言, 突出的问题是被培养材料的生根问题。而且植物组织培养技术的系统性不强, 这方面鲜有研究, 阻碍了组培快繁技术的推广和应用。因此, 需要针对不同类型的植物展开大规模的基础理论和应用基础研究, 从植物细胞学、发育学、生理学角度探索外植体发育的调控机制, 建立适合不同类型植物组织培养快繁技术体系, 并开发出专用于组织培养的、效率更高的植物生长激素或调节剂。第二, 植物组织培养快繁技术成本较高, 是阻碍其产业化的原因之一。能源消耗较大, 成本较高。出售价格如果过高, 将影响快繁苗的使用, 出售价格若过低, 快繁公司的利润空间变小。所以设法降低生产成本, 是植物组织培养技术产业化必须跨越的障碍。降低成本的途径主要有 3 个: 一是完善

现有的培养技术, 减少污染和死株, 提高繁殖率; 二是优化培养基配方和环境控制, 减少消耗; 三是创立全新的成本低的快繁模式。突破固有组培快繁模式, 应该是未来组培技术发展的一个重要途径。一些小型的公司应注意向专业化方向发展, 集中力量搞好一类或几类植物的快繁。因为不同植物的快繁需要的技术和管理是不同的, 有的差异很大。此外, 在组织培养快繁中发生变异, 再生苗不整齐也是一个严重的问题。

2 植物脱毒技术

植物脱毒技术往往与植物组培快繁技术结合在一起应用。植物在发育过程中不可避免地会感染病毒, 解决此问题的一个重要途径就是脱毒培养。在植物体内, 病毒主要通过维管束组织进行运输和扩散, 茎尖新生的分生组织, 没有维管束分化, 病毒难以到达, 因此病毒含量很低, 甚至没有。所以采取茎尖培养可减少再生植株的病毒含量, 连续进行几代培养, 甚至可获得无病毒植株, 使植物得以复壮。脱毒植株增加产量、提高品质的效应非常明显, 有广阔的应用前景。然而, 植物脱毒培养也存在一些技术上的问题。通常, 取茎尖 0.2~0.5 mm 的分生组织进行脱毒培养, 尽管有高低倍显微镜帮助, 操作也很不易; 其次, 把这样小的材料培养成再生植株也不是一件容易的事。此外, 有些病毒能够侵入顶端分生组织, 对此材料需要用高温处理等方法来杀死病毒, 更增加了组织脱毒培养的难度。在脱毒培养过程中, 病毒检测是一道不可缺少的程序, 常用的方法有敏感植物法、抗血清法、PCR 法。每种方法都有其局限性, 如敏感植物法需时间较长; PCR 法花费较多。随着植物组培脱毒产业化的兴起, 需要大量的病毒检测, 所以开发出应用简便, 用时少, 价格低, 适用于多种病毒检测的技术, 具有重要意义。

3 植物器官和细胞生物反应器

植物的许多次生代谢产物是重要的制药原料和化工原料, 有很高的经济价值, 直接从植物中提取这些物质, 需要破坏大量的植物, 而且生产受季节限制。利用生物反应器培养植物器官或细胞来生产次生代谢物, 是提高生产效率、增加产量的重要途径。许多植物次生代谢物的生物反应器生产技术正在向商品化发展。用于生物反应器的植物材料可以是细胞、组织、器官。在生物的器官中, 不定根是许多次生物质合成的重要场所, 但在生物反应器中利用不定根生产次生物质有很大难度。在生物反应器中影响不定根生长和生产效率的是搅拌速度和供氧数量, 不定根在反应器中往往形成密度很大的团块, 阻碍氧的进入。不定根生长需要大量的氧, 但又对剪切力非常敏感, 所以搅拌不能过快。因此如何给不定根提供充足的氧, 是生物反应器生产中的难题之一。

作者简介 马慧(1972-), 女, 辽宁鞍山人, 博士, 讲师, 从事生物技术方面的教研。

收稿日期 2006-11-22

Pauline 的实验室利用 DNA 重组技术,使与发酵过程有关的酶在体内超表达,增强不定根的耐低氧能力,减少对高氧的需求。同时,筛选不定根的形态突变体,以改变其在反应器中的行为,不形成致密的团块,有利于氧的吸收。

4 植物微繁殖技术与品种改良

4.1 原生质体培养与基因工程育种 基因工程育种是将一种生物中决定某一性状的基因,转移到另一生物中,并使其表达的技术。在农业上,利用基因工程技术已创造出一些具有重大应用价值的品种,如延熟番茄、抗虫棉、抗除草剂大豆、玉米等。基因工程育种的最大优势是可跨越物种转移基因,从而赋予植物原来没有的遗传性状,并可大大缩短育种年限。在基因工程操作过程中,外源基因通过农杆菌介导,或通过基因枪、电刺激等方法导入受体植物细胞。当外源基因导入受体植物细胞后,基因工程育种能否成功就取决于能否把含有外源基因的细胞培养成再生植株。目前外源基因的导入技术有了很大的进展,但是将植物微型材料,特别是将细胞或原生质体培养成再生植株的技术发展相对较慢,对于某些物种而言还不可能,因此阻碍了基因工程育种技术的应用。原生质体没有细胞壁,非常容易导入外源 DNA。所以,各种植物的原生质体培养技术将是未来植物培养界重点发展的领域之一。这个方面的重大突破或技术成熟,将会大大提高基因工程育种的成功率。

4.2 体细胞克隆变异 前面所述的植物组培快繁、脱毒和原生质体培养都属于体细胞克隆。体细胞克隆的另外一种方式是先将外植体培养成称为愈伤组织的细胞团,再在适当条件下分化成植株。通过愈伤组织培养再生植株很容易发生变异,如果在培养过程中人为增大选择压力,将有可能获得具有新性状的基因型。如用高温、低温、高盐或病菌毒素处理愈伤组织,从中筛选抗高温、低温、高盐或抗病的细胞系。体细胞克隆变异可为分子生物学研究和植物育种提供丰富的原始材料。

4.3 单倍体育种 取未成熟的花药或花粉粒培养,很容易获得单倍的胚状体,然后用秋水仙碱等加倍剂处理胚状体,使染色体加倍,形成正常的二倍体。与一般二倍体不同的是,这样获得的二倍体基因型是纯合的。在自然界,自花授粉植物是纯系,而异花授粉植物基因型是杂合的。要获得异花授粉植物的纯系,至少需要自交 10 代以上。对于自粉授粉植物,通过杂交方式导入新的基因后,利用花药或花粉单倍体培养,然后加倍,获得纯系,将大大缩短育种年限。同样,对于异花授粉植物,利用花药和花粉培养可缩短杂交后代的纯合时间,加快杂交育种的进度。然而,花药和花粉单倍体培养主要在自花授粉植物中获得成功,对于异花授粉植物还比较困难。花药和花粉单倍体培养的技术完善和突破,将会推动杂交育种的发展。

4.4 原生质体融合 将植物细胞去壁,就形成原生质体。在一定条件下原生质体间可发生融合。原生质体融合是不同基因型植物或不同物种间大量交流基因的一种重要方式,在育种上有重要的应用价值。利用原生质体融合可形成多倍体,进行多倍体育种;原生质体融合结合染色体操作技术,可对融合细胞内染色体进行重组,创造出具有新遗传性状的

品种;原生质融合也是克服杂交育种的远缘不亲和性的重要途径;利用原生质体融合技术,甚至可以创造出兼有 2 个物种特性的“超级植物”。因此,有理由相信,原生质体融合技术会受到越来越大的重视。

5 种质资源保存

种质是指亲代通过生殖细胞或体细胞传递给子代的遗传物质。种质资源指具有种质并能繁殖的生物体统称为种质资源或遗传资源。植物种质资源保存是利用天然或人工创造的适宜环境,使个体中所含的遗传物质保持其遗传完整性,有高的活力,能通过繁殖将其遗传特性传递下去。生命物质的保存,引起许多科研工作者的兴趣,其中包括原核生物、植物、动物材料的保存。目前,保存植物种质资源的主要手段是建立田间种质基因库和种子库。但这种方法需大量的土地和人力资源,成本高,且易遭受各种自然灾害的侵袭,每年都有许多具有或可能具有育种价值的、能作为基因库的品系在消失,同时许多植物种质是不产生种子的,如脐橙、香蕉,则不能用种子进行贮藏。而且种子库仅能保存基因,不能保存特定的基因型材料。随着植物组织与细胞培养技术的发展,为人们寻求种质保存提供了新途径。组织培养技术保存种质有许多优点:①高的增殖率;②无菌和无病虫害环境,不受自然灾害的影响;③保存的材料体积小,占用空间不大;④相对较少的人力花费;⑤不存在田间活体保存存在的异花授粉、嫁接繁殖而导致的遗传蚀变现象;⑥有利于国际间的种质交流与濒危物种的抢救和快繁。1975 年, Henshaw & Morel 首次提出离体保存植物种质 (conservation in vitro) 的策略,受到植物界的极度重视。1980 年,国际植物遗传资源委员会增加了对营养繁殖材料收集保存研究的支持,1982 年还专门成立了离体保存咨询委员会。随后,有关国际组织和许多国家相继建立了植物种质离体基因库,许多不能用常规种质保存的植物已采用这种方法得以保存。常用的离体保存方法有超低温保存、缓慢生长保存及愈伤组织的干燥保存。目前,运用组织培养技术保存种质已在 1 000 多种植物种和品种上得到应用,并取得很好的效果,但组织培养体的维持还有困难,在植物组织和细胞的培养过程中,不断的继代培养会引起染色体和基因型的变异,从而一方面可能导致培养细胞的全能性丧失,即分化形成新植株能力的丧失;另一方面,具有一些特殊性状的细胞株系,如具有某种特殊产物的细胞系及具有某种抗逆性的细胞系,也可能在继代培养中发生性状丢失。随着组织和细胞培养工作的迅速发展,具有特殊性状的细胞系日益增多,特别是细胞工程和基因工程的发展,需要收集和储存各种植物的基因型,使之不发生改变,所有这些都需要建立一种妥善的种质保存方法。

综上所述,从 1902 年 Haberlandt 提出植物细胞全能性观点以来,经过 100 多年,其道路是漫长而艰难的。我国的植物组培技术虽已处于相当高的水平,但仍存在很多问题。植物培养技术要从现有水平再提高一个台阶,还需从基础理论、应用基础理论和应用开发等方面展开全方位的深入研究。

参考文献

- [1] 曹汝义. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学出版社, 2002.

- [2] 程玉琴, 韩振海, 徐雪峰. 苹果病毒及其脱毒检测技术研究进展[J]. 中国农学通报, 2003, 19(1): 72-74.
- [3] 胡合. 植物体细胞遗传与作物改良[M]. 北京: 北京大学出版社, 1988.
- [4] 罗明典. 现代生物技术及其产业化[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2001.
- [5] 罗士伟, 何卓培. 高等植物突变细胞系的研究[J]. 细胞生物学, 1982, 14(2): 1-9.
- [6] 王际轩. 苹果脱毒技术的研究与应用[J]. 北方果树, 1994(2): 2-4.

- [7] 夏镇澳. 植物组织培养与农业[J]. 植物生理学通讯, 1995(1): 62-64.
- [8] 许智宏. 植物生物技术[M]. 上海: 上海科学出版社, 1997.
- [9] 杨建荣. 生物技术在花卉种苗生产中的应用[J]. 世界农业, 1996(4): 32.
- [10] 张春义, 杨汉民. 植物体细胞无性系变异的分子基础[J]. 遗传, 16(2): 1994.
- [11] 元英进. 植物细胞培养工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.

(上接第 1581 页)

功能,因而将来我们有可能按要求人工设计出特定功能的蛋白质结构。自适应对应于对环境的适应性,既可是被动的也可是主动的,体系是智能的、可训练的,具有响应外界刺激的自修改能力和适应性。在外界环境压力下,可以发生变异,选择不同的 λ , 从而产生适应外界环境的模板 ξ 。在模板的作用下,体系可进行自复制和自组装。

上面分析的网络结构的选择,可看作是一种分子进化机制,一旦选择了某种结构,就会形成一种特定的连接结构。这种特定的连接方式种类在网络中反复出现,而在不同的网络中这些连接方式种类的出现频率是不一样的。也就是说不同类型的网络具有不同的典型连接方式。这些特定的连接方式种类称为网络基序(Network Motif)^[7]。在模型中,它们是以占优势的模 ξ_i 来表示的。它们被认为是构造网络的基本砖块。这些网络基序一旦出现,就会遗传下去,若干个网络基序形成具有明显空间结构和功能特征的模块(Modules)。这样,网络常常体现出另外一个构造特点:网络的模块化。模块有 2 个显著特征:模块内的分子与分子间有直接的相互作用;模块与模块或模块与非模块之间有清晰的边界。如动物、植物、微生物虽然代谢方面有较大的差异,但它们的代谢网络都有着类似的构成方式。即依照一种等级的(Hierarchical)方式构建。首先形成许多紧密联接的小型模块,然后再形成相对松散的网络。也许可以这样认为,网络的构成遵循着:从底到顶(bottom-up)的原则。首先形成网络基序,作为网络的基本元素,在此基础上形成较高级的结构-模块,最后形成完整的网络。这也是蛋白质分子网络经过长期进化而得到的最佳结构-层次或分形结构。

4 蛋白质分子网络的分形维数计算

层次间广义流耦合的平衡式为^[4]:

$$\xi_s \frac{d}{dl} \int \delta \xi u dy - a \left(\frac{\partial \xi}{\partial y} \right) \Big|_w = \frac{d}{dl} \int \delta \xi u dy \quad (11)$$

式中, ξ_s 和 a 为常数, ξ 和 u 为层次耦合出的广义流的浓度和速度分布,可由相应的试验测得。对一般的 ξ 和 u 的分布,根据上式我们可求得广义流传递速率为 $h_n: l^{-p}$, p 值介于 0 和 1 之间。与前面的分层结构相结合,可得到如下关系式:

$$\frac{\bar{J}_n(\alpha_1) - \bar{J}_n(\alpha_2)}{\bar{J}_{(n-1)}(\alpha_1) - \bar{J}_{(n-1)}(\alpha_2)} \approx \frac{\bar{J}_{nm}(\alpha_1) - \bar{J}_{nm}(\alpha_2)}{\bar{J}_{u(n-1)}(\alpha_1) - \bar{J}_{u(n-1)}(\alpha_2)} \\ = \frac{\Omega_n}{\Omega_{n-1}} : \left[\frac{l_n}{l_{(n-1)}} \right]^{(d-p)} \quad (12)$$

式中: $d=1, 2, 3$; $d-p$ 为分形维数。从式(11)可看出,一旦

得到了 ξ 和 u 的分布,就可确定蛋白质分子网络的分形维数。

5 蛋白质分子网络复杂性的增加

随着蛋白质分子进入系统内部后的分子自组装,复杂性从大分子网络系统的外部进入了内部。系统外部的复杂性减少,而内部的复杂性增加。在系统外部,各种分子处于杂乱无章的状态,其复杂性非常小;进入系统内部,自组织自组装成为特定的大分子网络,其复杂性大大增加。

随着生物细胞的进化,细胞从外界抓取广义流的能力也在增强,因此广义流的形式,也在不断演化,从随机运动一层流—湍流—极度湍流。伴随着流形的演化,其分形维数也在增加。

6 小结

蛋白质大分子网络结构本质上就是生物大分子经过复杂的相互作用、竞争与合作的淘汰机制,在时空上形成的一种有序结构,即是一种时空斑图。笔者在最大流原理的基础上,重点分析了蛋白质大分子网络结构的选择和进化,以及遗传、复制和变异等特征。

对蛋白质分子网络的研究将帮助我们理解单个蛋白质的功能并为对细胞功能的分子基础提供新认识。如人们已知道所发现的 NMDA 受体复合物的 77 个蛋白质中有大约 1/3 是与长时程增强或抑制的诱导相关。这提示该复合物的主要功能是参与了突触可塑性的诱导。同时,因为相互作用的蛋白质在功能上可能是协同的,所以某些蛋白质的功能可根据其相关蛋白的功能来推测。因此,在一个蛋白质分子网络中将可更加全面、系统和方便地了解单个蛋白质的功能。

参考文献

- [1] 吴家睿. 生物系统的分子构建[J]. 科学, 2003, 55(3): 27-28.
- [2] CHAI L H, SHOJI M. Self-organization and self-similarity in boiling systems[J]. ASME Journal of Heat Transfer, 2002, 124: 505-517.
- [3] CHAI L H, WEN D S. Hierarchical self-organization of complex systems[J]. Chemical Research of Chinese University, 2004, 20(4): 440-445.
- [4] CHAI L H. A theoretical analysis of bubble interaction in boiling systems[J]. International Journal of Thermal Science, 2004, 43: 1067-1073.
- [5] 柴立和, 马德刚. 分形生长的新模型[J]. 天津大学学报: 自然科学版, 2004, 37(4): 326-330.
- [6] 刘曾荣. 同步、自适应性、网络和复杂系统中的涌现—神经和经济系统中的复杂性方法[C]//方锦清. 第二届全国复杂动态网络学术论坛论文集. 北京: 中国高等科学技术中心, 2005.
- [7] MILO R, SHEN-ORR S, ITZKOVITZ S, et al. Network motifs: simple building blocks of complex networks[J]. Science, 2002, 298: 824-827.
- [8] 阎隆飞, 孙之荣. 蛋白质分子结构[M]. 北京: 清华大学出版社, 1999.
- [9] 章文, 伍龙军, 徐天乐. 蛋白质组学与神经科学: 从蛋白质到网络[J]. 医学与哲学, 2002, 23(3): 1-4.
- [10] TUCKER C L, GERA J F, UETZ P. Toward an understanding of ecalaplex protein networks[J]. Trends Cell Biol, 2001, 11: 102-106.