

细胞培养技术在植物营养研究领域中的应用

王火焰¹, 王运华¹, 周建民²

(1 华中农业大学微量元素研究室,湖北武汉 430070;2 中国科学院南京土壤研究所,江苏南京 210008)

摘要:本文综述了植物细胞培养技术中的矿质营养效应以及有关利用细胞培养技术研究植物营养领域等问题,以期细胞水平植物营养研究工作提供依据。

关键词:细胞培养;植物营养

中图分类号:Q813.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-505X(2001)03-0344-09

从 20 世纪初到现在,细胞培养技术在多种作物上日趋成熟,并已作为生物技术的重要组成部分,广泛应用于遗传学、细胞学、病理学、植物生理生化等研究领域,在工农业生产中开始展示其巨大的经济效益和广阔的应用前景,如应用于作物遗传育种、作物种质保存、生产药物、色素、香精和食品添加剂等有用的次生代谢产物等。

植物细胞培养技术的发展与植物营养学有着密切的联系。为了有效地促进细胞培养技术的发展,人们需要了解各种矿质养分对培养细胞产生影响的作用机理,这决定植物矿质营养在细胞培养中有着非常重要的地位。作为一种研究技术和手段,细胞培养为研究植株矿质营养生理提供了一种新的方法和思路。细胞培养是植物营养研究领域中的特定层次,它与研究完整植株及植株特定器官有着不同的意义和特点。细胞培养体系的矿质营养研究范畴不涉及器官的分工及联系(如植株的根冠比,库源关系等),其养分的吸收利用主要决定于跨膜的被动扩散和主动运输过程,不存在植株中矿质养分的长距离运输、分配、再利用以及受蒸腾作用及光合碳水化合物供应的影响。因此,愈伤细胞的矿质营养生理与植株水平有所不同。但针对特定的营养元素及具体的植物代谢过程,细胞水平的研究将有利于人们对整株水平矿质营养功能机理的了解,尤其是细胞培养条件的简单、稳定、易控,为深入研究植株体内复杂营养生理过程提供了突破的可能。

1 细胞培养体系中的矿质养分效应

早期的植物组织培养基起源于植物栽培的营养液,如 White(1943)培养基和 Gautheret(1939)培养基分别由一种藻类培养基和 Knop 营养液演化而来,以后的各种培养基多是建立在这两种培养基基础上。不同种类、品种植物其细胞培养最佳培养基配方炯然不同,而同种植物细胞的最佳培养基配方也因细胞培养目的而异。为促进愈伤细胞及原生质体生长、调节愈伤细胞分化和增加有用次生代谢物质产量,通常需要在基本培养基(如 MS、B5 等)和其它条件适宜的基础上,采用一定的方法(如广谱实验法、正交试验法、含量分析法等),找出各种无机盐最合适的用量和比例。

细胞的生长需要适宜的矿质营养供应。在常用培养基的基础上进行适当的调整和修改有时会有很好

收稿日期:2000-01-17

作者简介:王火焰(1971—),男,安徽怀宁人,博士,现在中国科学院南京土壤研究所农业资源利用博士后流动站工作,主要从事植物营养机理及土壤肥料反应方面的研究。

的效果。例如对经典的 MS 培养基碳源、磷源、铵态氮与硝态氮比例以及生长调节物质进行改进,可大大促进马铃薯愈伤细胞的生长^[1]。Ketchum 等(1995)在多种培养基的基础上选用 B5 培养基的无机盐,同时调整多种有机物的供应,由此而得出的 TMS 培养基使短叶红豆杉愈伤细胞的生长速率比改良前的培养基增长了 5 倍多。Kao 等(1975)发现在 B5 培养基中增加氯化钙可以促进一种巢菜属植物和无芒雀麦原生质体的细胞分裂,而加入硝酸铵则降低了分裂细胞的频率。适用于多种植物的原生质体培养 D2a 培养基,其硝酸盐含量明显低于 MS 培养基,而钙镁盐含量远高于 MS 培养基^[2]。除了在常用培养基的基础上进行改进,还可根据植物的矿质成分选择无机盐的供应水平,如 Teasdale 等根据未成熟的火炬松种子中矿质养分含量,成功选择出一种非常适宜于火炬松细胞培养的培养基,该培养基中含较高的微量元素(如硼、锌等)和镁,而钙含量非常低,这为裸子植物细胞培养培养基矿质养分的选择开辟了新的途径^[3]。

在各种无机盐中,通常氮源的形态及浓度选择非常重要。适当的铵态氮和硝态氮比例能使大豆光能自养型细胞正常生长;而只供应一种形态的氮时,大豆细胞不能正常生长^[4]。Ogawa 等(1996)发现不同水稻品种其悬浮细胞最佳生长需要不同的还原态氮。高浓度铵离子能抑制水稻、大麦花粉愈伤组织的形成;朱至清等(1975)研制的 N6 培养基降低了铵离子的浓度,调节了铵态氮与硝态氮的比例,使得 N6 培养基非常适合禾谷类花药的培养。除了适宜的氮源形态及供应水平外,调节其它矿质养分的供应也不容忽视。在 Miller 培养基的基础上改变了铵离子浓度,提高磷酸二氢钾和铁盐浓度;黄鸿枢等(1977)得到了适宜于籼稻花药培养的合 5 培养基。同样除了改变铵态氮与硝态氮的比例,在 Miller 培养基基础上提高铁、镁、钾盐浓度,陈英等(1977)研制出了 SK3 培养基;而通用培养基则是通过在 N6 培养基的基础上加进铜、钴、钼 3 种元素,并用磷酸二氢铵代替 N6 中的硫酸铵和磷酸二氢钾而得出的。在原生质体培养体系中,增加钙镁供应可明显提高烟草原生质体分裂频率^[2]。

细胞培养后期可能涉及到器官的分化,在此过程中无机盐的选择也很重要。一般生根培养基无机盐浓度较低。许智宏等(1994)用 MS、1/2MS 和 1/2MS 无机盐加铁盐进行无籽西瓜生根实验,发现降低无机盐浓度有利于生根,根多而壮,加铁盐则更好。钙、硼、铁都有利于根的形成^[6]。水稻花粉愈伤组织分化为绿苗或白苗与铁的供应有一定联系,增加培养基中铁盐浓度,不仅愈伤组织诱导率随着提高,绿苗分化率也随着有规律地提高^[2]。

利用细胞培养生产有用的次生代谢产物具有广阔的应用前景。通过调节矿质营养供应可提高不同植物细胞特殊次生代谢产物的产量。如改善养分供应促进了罂粟培养细胞血根碱的生成^[6]。不同的细胞培养体系中,特定次生代谢产物的产量通常受少数几种矿质养分的影响较大。草莓悬浮细胞生长过程中磷在 4 天内即被全部吸收,氮则需要 9 天,而钙的吸收持续到细胞培养的全过程;其花青素合成也受到相应的影响^[7]。在多萼淫羊藿属悬浮细胞培养体系中,Yamamoto 等(1993)发现氮和磷酸盐供应对黄酮醇配糖合成的影响较大,增加磷供应可以提高特种黄酮醇配糖的含量。氮和磷也显著影响三角叶薯蓣细胞生长及其薯蓣皂苷配基的合成,只供应硝酸铵比外加硝酸钾有利于细胞的生长,氮源的消耗增加了薯蓣皂苷配基的合成,减少磷供应尽管不利于细胞生长但促进了薯蓣皂苷配基的合成^[8]。Panda 等(1992)也发现适宜的铵态氮硝态氮比例以及磷水平可以增加止泻木悬浮细胞生物碱产量。降低 LS 培养基中铵态氮至 1/4 标准水平,显著促进了一种熏衣草属植物悬浮细胞生长及其迷迭香酸的合成,而适当增加硝态氮供应也可使细胞迷迭香酸含量增长一倍^[9]。在紫草培养细胞中,Srinivasan 等(1993)通过调节培养基中高碳高氮水平及其比例,提高了紫草宁的产率。Morard 和 Henry(1998)则根据植株内矿质养分含量,降低盐浓度,采用硝态氮,降低钾而提高钙用量,由此得到的 MH1 培养基可以促进一种茄属植物愈伤细胞的生长,并使苦茄碱的产量提高了 3 倍。Esaka 等(1990)发现二价阳离子可以促进西葫芦细胞培养过程中抗坏血酸氧化酶的分泌,而水杨酸钾和黄色曙红则可以促进南瓜细胞抗坏血酸氧化酶的合成^[10]。二价阳离子中,钙作为第二信使参与洋葱悬浮细胞植物抗毒素合成的调节^[11];调节铜的供应可以促进一种唐松草属植物悬浮细胞黄连素及人参悬浮细胞人参皂角苷和多聚糖的合成^[12-13];缺铁可以诱导禾本科作物愈伤细胞麦根酸的合成^[14]。矿质养分不适宜也会间接影响次生代谢产物的产率。用来生产有用次生代谢产物的动植物及微生物细胞通常固定在褐藻酸钙中,其中过多的钙对细胞的生长会有抑制作用,钙还会通过作用于磷而影

响次生代谢产物合成,如阿拉伯咖啡碱的合成等^[15]。

2 利用细胞培养研究植物营养元素的吸收、代谢及营养机理

细胞是生物体的基本构成单位,是植物生命活动中各种代谢过程和生理生化反应进行的场所,因而细胞培养也是研究植物矿质养分代谢的一个有效手段。近年来,这方面的研究正在兴起,并取得了一些可喜的成果。

2.1 氮

不同形态氮源对植物生长代谢的影响及其作用机理是植物氮营养研究的重要内容之一。植物整株水平硝态氮的吸收同化研究往往因采用的根细胞功能结构的差异,以及植物缺氮引起的其它问题而受到干扰。

Campbell等(1984)研究了光能自养条件下,一种藜属植物细胞对铵态氮和硝态氮的吸收。Padgett等(1994)利用氨基酸态氮代替无机态氮培养玉米胚胎悬浮细胞系,提出利用细胞培养方式将有利于硝态氮吸收同化机理的研究,其研究结果表明:与硝态氮相比,玉米悬浮细胞更易于利用氨基酸,氨基酸对硝态氮吸收利用的抑制作用取决于氨基酸的总量而与氨基酸种类无多大关系^[16]。利用同样的细胞,人们还进行了与氮代谢有关酶的定位工作以及研究了继代周期不同阶段细胞对铵态氮和硝态氮的吸收同化^[17]。

利用细胞培养技术研究植物氮代谢机理也有少量报道。Schripsema等(1990)利用¹⁵N标记的硝态氮和铵态氮对山辣椒培养细胞的氮代谢进行了研究。另外,还有无机氮源影响烟草悬浮细胞辅酶Q的形成^[18]以及槭树悬浮细胞中激素影响氮代谢等方面的报道^[19]。培养基中有机和无机态氮均可促进依赖于NADH的谷氨酸合成酶(GOGAT)的合成以及提高相应的mRNA水平,而对依赖于铁氧还蛋白的GOGAT及其mRNA却没有影响^[20]。盐胁迫条件下,大豆细胞中的多胺代谢会发生变化^[21]。

大豆光能自养型细胞中只含有诱导型的硝酸还原酶,而大豆幼叶中硝酸还原酶既有诱导型又有结构型。当这种大豆细胞生长在以谷氨酸为唯一氮源的培养基上时,没有硝酸还原酶活性产生;而存在硝酸盐时,谷氨酸不能抑制硝酸还原酶的产生^[22]。Horn等利用大豆光能自养型、光能混养型以及异养型悬浮细胞研究了氮对各种氨基酸及叶绿素合成的影响。不同类型的细胞中主要氨基酸的种类及高峰出现的时间各不相同,其含量也受总氮供应水平的影响。但叶绿素含量与培养介质中最初的氮供应量有很好的相关性,试验证实光能自养型细胞是研究氮与光合作用的极好材料^[23]。

2.2 磷

植物缺磷会导致一系列生理变化,包括缺磷诱导的适应系统的产生。在植株水平如根际,这方面的研究很多。细胞培养体系虽然与植物根际环境不同,但缺磷愈伤细胞与植物根一样也会产生类似的变化和适应系统。

低磷条件下,水稻悬浮细胞生长速率与磷的消耗密切相关,细胞内磷含量与氮源的消耗速率及硝态氮的利用率也有密切联系^[24]。除影响细胞的生长外,Ninomiya等(1977)发现缺磷还会导致烟草培养细胞酸性磷酸酶的分泌。Goldstein等(1988)在番茄愈伤细胞培养介质中,也发现了缺磷诱导产生的酸性磷酸酶,并对其特性进行了鉴定。进一步研究表明,缺磷条件下,番茄愈伤细胞呼吸速率比正常细胞增加近1倍;向培养介质中分泌的蛋白质增加了3倍多。这些蛋白质至少有6种,分别在两个阶段产生,其分泌受高尔基体调控,而不是严重缺磷导致的无规则分泌或细胞壁蛋白质的流失。磷缺乏还诱导细胞吸磷能力的加强^[25]。谷氨酰胺作为酪蛋白水解产物的活性成分对缺磷介质中的细胞生长具有一定的平衡作用^[26]。磷缺乏诱导植物细胞吸收磷能力加强的结果在后来的研究中进一步得到证实。Shimogawara等研究烟草悬浮细胞无机磷吸收动力学及磷缺乏对其产生的影响发现,缺磷细胞最大吸收速度比正常细胞高5倍,但磷亲和力无差异。磷的缺乏促进了磷载体复合物的形成^[27]。

2.3 钾

低钾细胞及其原生质体是研究细胞水平钾运输的有效手段。萝卜悬浮细胞由缺钾介质转移到供钾培养基上,细胞钾的跨膜运输表现为平稳的非饱和的动力学特性,并能持续一定的时间。该运输过程在碱性条件下适宜,较少伴随阴离子而靠苹果酸来中和电荷,且受细胞质壁分离的影响较小。由同样悬浮细胞制得的原生质体其钾的跨膜运输能力下降了一半,但与细胞呈现类似的钾运输动力学及其它特性^[28]。Murphy等(1988)用多种 RNA 及蛋白质合成抑制剂处理玫瑰悬浮培养细胞,发现这均会导致细胞中钾离子的外流,进一步研究其机制,推测钾外流依赖于胞内蛋白质的合成或与新的质膜合成有关。

钾的跨膜运输更多是与离子通道有关。利用膜片钳(PC)技术、细胞培养和原生质体制备纯化技术研究植物生长发育过程中离子通道的作用是植物生理及营养研究领域中的热点之一。离子通道参与细胞大量净输出的渗透调节、膜信号传递以及调节膜电位,它直接影响一些养分离子的跨膜运输。而钾离子通道是目前人们研究最多的一种离子通道。Schauf和Wilson研究了一种萝藦属植物悬浮细胞原生质体中钾和氯2种离子通道的特性认为,钾离子流在去极化的过程中呈指数性增长;而依赖于电压的氯离子通道在超极化的过程中被激发^[29]。大麦悬浮培养细胞中有几种离子通道,这些通道具有很好的 K^+/Na^+ 选择性,但耐盐和不耐盐细胞的各通道特性以及整个细胞离子流没有显著差异。对于悬浮烟草细胞来说,其耐盐细胞和不耐盐细胞 K^+ 通道对 K^+ 、 Na^+ 的通透性均降低,而 K^+/Na^+ 选择性并未改变^[30]。

2.4 钙

利用植物细胞或组织进行养分吸收的研究,通常要进行洗涤或预培养,而这一措施会促进植物细胞对溶质的吸收。Schneegurt等(1986)研究了烟草悬浮培养细胞预培养液、钙及pH缓冲液对L-亮氨酸吸收的影响发现,1%蔗糖预培养促进L-亮氨酸吸收是因为促进了它的主动运输,预培养液中Tris缓冲液会抑制促进作用的发生,而加入钙可以解除这种抑制作用。

钙作为第二信使,通过其胞内外浓度的变化参与细胞信息传递和调节许多生理生化过程。利用离体细胞开展这方面的研究已有不少报道。一种落叶松属植物的悬浮细胞在一种诱导物的作用下很快产生防卫反应,这种诱导信号的传递必须有 Ca^{2+} 的参与,磷酸化过程在其中也起着重要的作用^[31]。Takahashi等的研究表明,低渗透压刺激会引起烟草悬浮细胞质中 Ca^{2+} 浓度上升,其机制是原生质膜上 Ca^{2+} 通道或质膜上一种低渗透压敏感组分的活动,这种组分的活性需要依赖于 Ca^{2+} 的磷酸化和持续的刺激。钙调素还参与调节红叶藜悬浮细胞液泡膜上依赖于钙的慢速离子通道^[33]。当钙离子载体将钙离子导入烟草培养细胞时细胞质流停止,但高钙使细胞质流停止的效应可能与与培养细胞中的CaM无关^[33]。Kurosaki等(1995)在胡萝卜悬浮细胞中发现了一种磷酸二酯酶的同功酶—基本磷酸二酯酶,这种酶的活性不依赖于 Ca^{2+} 和CaM,它与底物的亲和力高于CaM-PDE,对维持胡萝卜细胞cAMP、 Ca^{2+} 低水平时的休闲状态有重要作用。

利用细胞培养也有利于研究钙和钙调素在一些基因表达调控中的作用。一种阿布属植物的培养细胞中钙离子及热刺激可促进CaM相关基因表达的机理。其机制为胞质钙离子直接参与基因的调控而生成钙结合蛋白,这进一步证实钙在植物体内发挥第二信使功能^[34]。在大豆光能混养型细胞中,光敏色素控制的查耳酮合酶的基因表达受cGMP的正调控和钙及钙调素的负调控;但在紫外光的照射下,钙和钙调素转为正调控。红光和紫外光的混合照射研究结果表明,光敏色素的激活先于紫外光感受器的反应,因而钙和钙调素2种相反的调节功能是存在于时间左右顺序不同的2个反应中^[35]。

2.5 硼

与钙一样,植物体内硼对茎尖、根尖等分生组织有着直接影响。离体细胞在性质上非常接近植物的分生组织,因而细胞培养是研究植物硼生理功能的有力手段。

硼主要以被动吸收方式被植物吸收,这一结论在细胞水平也得以证实。Seresinhe等(1991)发现番茄细胞中的硼与悬浮培养基中硼存在一种被动的扩散平衡。在向日葵、南瓜植株及烟草细胞中也已证实硼的吸收是被动的非代谢过程。细胞质和细胞壁中非交换性硼复合物的形成是决定植物吸收硼的关键因子^[36]。

硼影响胡萝卜悬浮细胞质子的分泌和质子梯度的形成^[37]。缺硼可能引起膜硬化,导致向日葵悬浮细胞微粒体膜上 H^+ -ATP酶活性降低以及增加质子被动跨膜运输,最终抑制了微粒体膜上 H^+ 梯度的形成^[38]。缺硼抑制了胡萝卜悬浮细胞质膜NADH氧化酶的活性,铁氰化物激发的电子传递也只是在硼存在的条件下才与质子的释放相偶联。硼通过影响细胞质膜NADH氧化酶活性以及质子分泌而影响悬浮细胞的生长^[39];硼还影响胡萝卜悬浮细胞和向日葵根中 ^{32}P 和 ^{14}C -葡萄糖净吸收和流出速率,细胞培养与根中的研究结果非常一致^[40]。这些研究结果均表明硼与细胞膜功能有着密切的关系。

缺硼降低了胡萝卜悬浮细胞中葡萄糖向纤维多糖的转化率及纤维类物质总含量,除一种未知组分中甘露糖与葡萄糖的比例发生变化外,其它单糖的比例没有改变。由于胡萝卜细胞中因缺硼引起的细胞壁多糖组分的改变相对较小,因而硼影响细胞壁中多糖代谢不是缺硼的原初反应^[41]。Teasdale等比较了火炬松和辐射松细胞培养的培养基,前者需要高浓度的硼和镁,需钙少;后者几乎不需要硼,但钙镁量趋于正常。因而推测硼钙镁三者之间有一定的关系,并进一步研究提出了硼钙镁相互作用的一种模式。其模式认为存在一个原初分子,需要硼钙与其各自独立的位点结合之后才能激活该分子;镁是钙与该分子结合的竞争抑制剂,硼与该分子的亲和力是很低的,而钙的亲和力很强,且比镁高出2个数量级^[42]。该模式与后来Matoh和Kobayashi发现的硼钙共存于RG-II中的结果非常相似^[43]。

笔者利用细胞培养技术研究了不同硼效率甘蓝型油菜品种细胞水平硼基因型差异的表达情况发现,不同油菜品种悬浮愈伤细胞表现出与植株类似的硼效率差异及钙适应性。由此推测不同甘蓝型油菜品种硼效率基因型差异在细胞水平即已存在,且导致硼基因型差异的主要原因可能是不同油菜品种代谢本身需硼量不同。另外还发现提高培养基中硼水平显著降低悬浮细胞的钙含量,这部分钙又主要是可被NaCl提取的果胶酸钙。这些结果表明硼与钙在细胞水平存在密切的相互作用^[44]。

2.6 其它微量元素

除硼外,植物必需的其它其它微量元素如锌、铁等在细胞培养中起着同等重要的作用。但在植物细胞培养的有关研究工作中,人们通常只是在培养基中添加这些元素以满足细胞生长的需要,并没有对细胞生长过程中这些元素的作用机理进行广泛的研究。

水稻是需锌较多的植物,其悬浮细胞生长和细胞内锌含量均随介质中锌浓度上升而显著增长。缺锌导致悬浮细胞内游离氨基酸增多。培养基中生长素含量高时,水稻细胞需要更多的锌,因而锌的作用可能不是影响生长素水平而是直接调节生长素的活动^[45]。系统研究水稻悬浮细胞的微量元素营养后,Ohira等发现水稻悬浮细胞需要的硼、钼量较低。缺铁导致悬浮细胞及培养基中 γ -氨基丁酸、丙氨酸和酰胺类的积累;缺锌使细胞中蛋白质含量下降,而丙氨酸和酰胺类增多。缺锌和铁均导致悬浮细胞呼吸速率下降。另外与铁铜锌相比,水稻悬浮细胞对锰需求量也较低;而植株中锰需求量仍较高。这种自养与异养型细胞锰需求量的差异可能是由于自养型细胞中的光合作用需要更多的锰^[46]。

Teasdale利用生长分析的方法来研究微量元素营养。对火炬松悬浮细胞的铜营养进行了研究发现,悬浮细胞的生长与培养基中铜浓度成双曲线关系。铜的吸收不受膜上载体的调节,铜自由扩散进入细胞与其中的高亲和力受体相结合^[47]。硝酸还原酶缺乏的烟草突变体细胞中钼和钼辅因子对该酶有一定的修复作用^[48];同样一种葫芦藓属植物悬浮细胞中硝酸还原酶的活性受钼水平的调节^[49]。

烟草悬浮细胞培养液中铝和铁的共同存在抑制细胞生长,甚至可导致细胞死亡,而单一铝或铁却不会产生毒害。进一步调查发现,受抑制的细胞中含大量铝和铁,钾含量下降。在铁存在条件下,铝引起脂类的过氧化,导致细胞质膜透性改变而使细胞死亡^[50]。与缺磷相似,缺铁也导致番茄愈伤细胞中特定蛋白质的分泌^[25]。缺铁对小无花果树悬浮细胞呼吸作用有显著的作用。通过核磁共振检测出线粒体内膜上所有细胞色素和电子传递物中的Fe-S簇在缺铁细胞中急剧减少;但含铁组分的减少对其它复合物以及ATP合成系统没有明显的抑制作用,只是抑制了电子传递链中复合物II的功能,并导致线粒体内膜电子传递链能力的全面下降,最终使细胞死亡^[51]。Caris等(1995)用放射性 ^{59}Fe 研究植物悬浮细胞中一种铁络合剂O-Trensox的生物有效性,发现这种络合剂的有效性高于EDTA-Fe,且无EDTA-Fe和柠檬酸铁对DNA的毒害作用。

3 细胞培养与植物营养性状改良

组织培养技术的发展使人们对生物科学的各个层次:整体、器官、细胞、基因等有了更完整的认识。尽管细胞水平的性状与完整植株会有一定的差异,且对植物体内特定性状表达的生理生化过程还不太明确,但细胞培养技术已开始用于植物养分胁迫抗性生理研究与遗传育种过程中。

应用细胞培养筛选养分利用高效或抗养分毒害的基因型,在植物铁效率、磷效率、锌效率、锰效率、硼效率及抗铝、抗锌、抗镉、抗铜、抗硼、抗铷等方面有零星报道^[52~59],而研究最多的是植物抗盐细胞筛选以及再生植株的抗盐性^[60,61]。

到目前为止,人们尚未用细胞培养的方法筛选出真正可利用的养分利用高效或抗养分毒害品种。这一方面原于细胞培养及植株再生技术不很成熟;另一方面,细胞水平的胁迫抗性不一定能在植株水平上得以表达。植物体细胞表现型的改变并不都是能稳定遗传的变异,能遗传的变异在单细胞再生植株的过程中也有可能受其它因素影响而不能表达^[62]。因此人们对细胞培养筛选有用基因型的方法还不十分乐观。如 Dracup(1993)认为耐盐性状由多基因决定,是与整个植株结构和生理特征有关,细胞水平的筛选工作可能收效甚微。但事实上,植物对大多数环境胁迫可能存在多种适应机制。有的能在细胞水平上表达,有的则只能在植株或器官水平上表现出来,并且不同种类的植物也会大不相同。如已证实存在植株水平存在锌敏感性差异的2个大豆品种,其相应的愈伤细胞中并不存在这种差异,因为这种植株水平的差异可能与光合作用或茎中的特殊同功酶有关^[59]。细胞培养筛选营养高效基因型的效果很大程度上依赖于人们对植物适应特定营养胁迫机理的了解。如果植物的胁迫抗性只与高度复杂的植物系统相关,就不能用细胞培养的方法进行耐胁迫抗性的筛选;反之,细胞水平与植株水平耐胁迫机理一致,细胞培养筛选营养高效基因型就有可能成功^[62]。

目前,多种植物整株水平的耐营养胁迫机理已有较深入广泛的研究^[62],但同一植物愈伤细胞耐营养胁迫机理研究极少。细胞培养方法在植物营养性状改良上的应用一方面需要一定的技术和条件,另一方面需要人们对细胞水平耐营养胁迫机理的研究有更深一层的认识。活的细胞是植物生命的特定层次,其研究将有利于人们对完整植物生命的了解。因而,无论用细胞培养的方法能否最终筛选出农业生产中可以利用的优良品种,人们仍需要进行这方面的研究和探索。

参 考 文 献:

- [1] Gerard J, Antoine P, Lepoivre P, and Thonart P. Uptake kinetics of medium constituents during batch growth of potato cell cultures[J]. *Biotechnol Lett.*, 1991, 13(5):381-384.
- [2] 胡 含,陈 英. 植物体细胞遗传与作物改良[M]. 北京:北京大学出版社,1988. 55.
- [3] Teasdale R D, Dawsen P A, Woolhouse H W. Mineral nutrient requirements of a loblolly pine (*Pinus taeda*) cell suspension culture[J]. *Plant Physiol.*, 1986, 82: 942-945.
- [4] Horn M E, Martin B A. & Widholm J M. Photoautotrophic growth of soybean cells in suspension culture. II. Optimization of culture medium and conditions[J]. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1992, 30:85-91.
- [5] 曹改义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,1996.
- [6] Williams R D, Bedard C, Chavarie C *et al* . Production of sanyginarine by elicited plant cell culture. II. Further nutritional aspects[J]. *J. Biotechnol.*, 1996, 46(2): 107-120.
- [7] Zhang W, Seki M, Furusaki S and Middelberg A P J. Anthocyanin synthesis, growth and nutrient uptake in suspension cultures of strawberry cells[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, 86(1): 72-78.
- [8] Ravishankar G A and Grewal S. Development of media for growth of *Dioscorea deltoidea* cells and in vitro diosgenin production: influence of media constituents and nutrient stress[J]. *Biotechnology letters*, 1991, 13(2): 125-130.
- [9] Ilieva M and Pavlov A. Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension culture: Nitrogen effect[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1999, 15(6): 711-714.

- [10] Esaka M, Suzuki K and Kubota K. Stimulation of ascorbate oxidase secretion from cultured pumpkin cells by eosine yellowish and potassium salicylate[J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(4): 1547-1549.
- [11] Dmitriev A, djatsok J, Grodzinsky D. The role of Ca^{2+} in elicitation of phytoalexin synthesis in cell culture of onion (*Allium cepa* L.)[J]. *Plant Cell Rep.*, 1996, 15(12): 945-948.
- [12] Kim D I, Pedersen H and Chin C K. Development of process strategies for berberine production in plant cell suspension cultures [J]. *Journal of Biotechnology*, 1991, 21(3): 201-208.
- [13] Zhong J J and Wang D J. Improvement of cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharide in suspension cultures of *Panax notoginseng*: Cu^{2+} effect[J]. *Journal of biotechnology*, 1996, 46(1): 69-72.
- [14] Kawai S, Takagi S and Ojima K. Application of phytosiderophore to plant cell cultures and production of phytosiderophore by iron-deficiency stressed plant cell culture[J]. *Journal of plant nutrition*, 1992, 15(10): 1613-1624.
- [15] Bramble J L, Graves D J, Brodelius P. Calcium and phosphate effects on growth and alkaloid production in *Coffea arabica*: experimental results and mathematical model[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1991, 37(9): 859-868.
- [16] Padgett P E, Leonard R T. Free amino acid levels and the regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures [J]. *J. Exp. Bot.*, 1996, 47(300): 811-833.
- [17] Beck E and Renner U. Net fluxes and pools of nitrogenous compounds during suspension culture of photoautotrophic chenopodium rubrum cells[J]. *Plant Cell Environ.*, 1990, 13: 111-122.
- [18] Ikeda T, Matsumoto T, Noguchi M. Effects of inorganic nitrogen sources and physical factors on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture[J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1977, 41(7): 1197-1201.
- [19] Simpkins I. Studies on the growth in culture of plant cells. VII. Effects of kinetin on the carbohydrate and nitrogen metabolism of *Acer pseudoplatanus* L. cells grown in suspension culture[J]. *J. Exp. Bot.*, 1970, 21(66): 170-185.
- [20] Watanabe S, Sakai T, Goto S *et al* . Expression of NADH-dependent glutamate synthase in response to the supply of nitrogen in rice cells in suspension culture[J]. *Plant and Cell Physiol.*, 1996, 37(7): 1034-1037.
- [21] Broetto F, Malavolta E and Brasil O G. Effect of salt stress on polyamine metabolism in bean cell culture[J]. *J. Plant Nutrition*, 1999, 22(6): 889-990.
- [22] Nelson R S, Horn M E, Harper J E and Widholm J M. Nitrate reductase activity and nitrogenous gas evolution from heterotrophic, homomixotrophic and photoautotrophic soybean suspension cultures[J]. *Plant Sci. Lett.*, 1984, 34: 145-152.
- [23] Horn M E, Widholm H M. Photoautotrophic growth of soybean cells in suspension culture. IV. Free amino acid pools and the effect of nitrogen on chlorophyll levels[J]. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1994, 39(4): 245-250.
- [24] Wen Z Y and Zhong J J. Effects of initial phosphate concentration on physiological aspects of suspension cultures of rice cells: A kinetic study[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, 83(4): 381-385.
- [25] Goldstein A H, Mayfield S P, Danon A and Tibbot B K. Phosphate starvation inducible metabolism in lycopersicon esculentum. III. Changes in protein secretion under nutrient stress[J]. *Plant physiol.*, 1989, 91(1): 175-182.
- [26] Bister-Miel F, Guignard J L, Bury M and Agier C. Glutamine as an active component of casein hydrolysate: Its balancing effect on plant cells cultured in phosphorus deficient medium[J]. *Plant cell reports*, 1985, 4(3): 161-163.
- [27] Shimogawara K, Usuda H. Uptake of inorganic phosphate by suspension-cultured tobacco cells: Kinetics and regulation by Pi starvation[J]. *Plant and Cell Physiol.*, 1995, 36(2): 341-351.
- [28] Bush D R, Jacobson L. Potassium transport in suspension culture cells and protoplasts of carrot[J]. *Plant Physiol.*, 1986, 81(4): 1022-1026.
- [29] Schauf C L and Wilson K J. Properties of single K^+ and Cl^- channels in *Asclepias tuberosa* protoplasts[J]. *Plant Physiol.*, 1987, 85: 413-418.
- [30] Murata Y, Obi I, Yoshihashi M *et al* . Reduced permeability to K^+ and Na^+ ions of K^+ channels in the plasma membrane of tobacco cells in suspension after adaptation to 50 mM NaCl[J]. *Plant and Cell Physiol.*, 1994, 35(1): 87-92.
- [31] Bach M and Seitz H U. Elicitor-induced defence responses of a suspension-cultured woody plant (*Larix decidua*) and possible mechanisms of signal transduction[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1997, 75(8): 1243-1251.
- [32] Weiser T, Blum W and Bentrup F W. Calmodulin regulates the Ca^{2+} dependent slow vacuolar ion channel in the tonoplast in *Chenopodium rubrum* suspension cells[J]. *Planta*, 1991, 185(3): 440-442.

- [33] 孙大业,左德远,曹宝山,等.烟草培养细胞中钙离子、钙调素与细胞质流的关系[J].植物生理学报,1989,15(1): 24-29.
- [34] Braam J. Regulated expression of the calmodulin-related TCH genes in cultured Arabidopsis cells: induction by calcium and heat shock[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89(8): 3213-3216.
- [35] Frohnmeyer H, Bowler C, Zhu J K, Yamagata H, Schafer E and Chua N H. Different roles for calcium and calmodulin in phytochrome- and UV-regulated expression of chalcone synthase[J]. Plant Journal, 1998, 13(6): 763-772.
- [36] Brown P H. and Hu H. Boron uptake by sunflower, squash and cultured tobacco cells[J]. Physiologia Plantarum, 1994, 91: 435-441.
- [37] Blaser-Grill J, Knoppik D, Amberger A *et al*. Influence of boron on the membrane potential on *Elodea densa* and *Helianthus annuus* roots and H⁺ extrusion of suspension cultured *Daucus carota* cells[J]. Plant Physiol., 1989, 90(1): 280-284.
- [38] Ferrol N, Belver A, Roldan M, Rodriguez-Rosales M P and Donaire J P. Effects of boron on proton transport and membrane properties of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cell microsomes[J]. Plant Physiol., 1993, 103: 763-769.
- [39] Barr R, Bottger M and Crane F L. The effect of boron on plasma membrane electron transport and associated proton secretion by cultured carrot cells[J]. Biochemistry and molecular biology international, 1993, 31(1): 31-39.
- [40] Goldbach H. Influence of boron nutrition on net uptake and efflux of ³²P and ¹⁴C-glucose in *Helianthus annuus* roots and cell cultures of *Daucus carota* [J]. J. Plant Physiol., 1985, 118: 431.
- [41] Goldbach H. and Amberger A. Influence of boron nutrition on cell wall polysaccharides in cell cultures of *Daucus carota* L [J]. J. Plant Physiol., 1986, 123: 263-269.
- [42] Teasdale R D and Richards D K. Boron deficiency in cultured pine cells[J]. Plant Physiol., 1990, 93: 1070-1077.
- [43] Matoh T, Kobayashi M. Boron and calcium, essential inorganic constituents of pectic polysaccharides in higher plant cell walls[J]. J. Plant Res., 1998, 111 (1101): 179-190.
- [44] 王火焰,王运华.不同硼效率甘蓝型油菜悬浮细胞的硼钙营养效应[J].植物营养与肥料学报,(待出版).
- [45] Hossain B, Hirata N, Nagatomo Y *et al*. Inter zinc accumulation is correlated with increased growth in rice suspension culture[J]. J. Plant Growth Reg., 1997, 16(4): 239-243.
- [46] Ohira K, Ojima K, Saigusa M and Fujiwara A. Studies on the nutrition of rice cell culture. II Microelement requirement and the effects of deficiency[J]. Plant cell Physiol., 1975, 16: 73-81.
- [47] Teasdale R D. Application of growth analysis to trace element nutrition: study of copper-uptake with a loblolly pine (*Pinus taeda*) cell suspension culture[J]. J. Exp. Bot., 1984, 35: 1496-1506.
- [48] Endel R R and Muller A J. Repair in vitro of nitrate reductase-deficient tobacco mutants (cnxA) by molybdate and by molybdenum cofactor[J]. Planta, 1985, 163(3): 370-375.
- [49] Johri M M, Henriques B M A and Padidam M. Regulation of nitrate reductase in chloronema cell suspension cultures of *Funaria hygrometrica*[J]. Cryptogamic Botany, 1992, 3(1): 60-66.
- [50] Ono K, Yamamoto Y, Hachiya A *et al*. Synergistic inhibition of growth by aluminum and iron of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells in suspension culture[J]. Plant and Cell Physiol., 1995, 36(1): 115-125.
- [51] Pascal N and Douce R. Effect of iron deficiency on the respiration of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) cells[J]. Plant physiology, 1993, 103(4): 1329-1338.
- [52] Graham M J, Heavner D L, Nickell C D. Soybean genotype evaluation for iron deficiency chlorosis using sodium bicarbonate and tissue culture[J]. J. Plant Nutr., 1992, 15: 1215-1227.
- [53] Graham M J, Heavner D L, Nickell C D and Widholm J M. Response of soybean genotypes to boron, zinc and manganese deficiency in tissue culture[J]. Plant and Soil, 1993, 150: 307-310.
- [54] Matoh T, Ishigaki K, Mizutani M, Matsunaga W and Takabe K. Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. I. Requirement for and intracellular localization of boron and selection of cells that tolerate low levels of boron[J]. Plant Cell Physiol., 1992, 33(8): 1135-1141.
- [55] Wu L and Antonovics J. Zinc and copper tolerance of *agrostis stolonifera* L. in tissue culture[J]. Am. J. Bot., 1978, 65: 268-271.

- [56] Vitorello V A and Haug A. Capacity for aluminium uptake depends on brefeldin A-sensitive membrane traffic in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2) cells[J]. *Plant Cell Reports*, 1999, 18(9): 733-736.
- [57] Shirazi M A, Robideaux M L, Kapustka L A, Wagner J J and Reporter M C. Cell growth in plant cultures: an interpretation of the influence of initial weight in cadmium and copper toxicity tests[J]. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 1994, 27(3): 331-337.
- [58] Wagner G J and Krotz R M. Perspectives on Cd and Zn accumulation, accommodation and tolerance in plant cells: The role of Cd-binding peptide versus other mechanisms[J]. *UCLA symposia on molecular and cellular biology*, 1989, 98: 325-336.
- [59] Christianson M L. Zinc sensitivity in *Phaseolus vulgaris*, beans: Expression in cell culture[J]. *Environmental and experimental botany*, 1979, 19(3): 217-221.
- [60] 王仑山,王鸣刚,王亚馥. 利用组织和细胞培养筛选作物耐盐突变体的研究[J]. *植物学通报*, 1996, 13 (2): 7-12.
- [61] 吴平,罗安程,蔡其华,等. 抗土壤逆境细胞突变体的筛选与利用[J]. *土壤学进展*, 1995, 23, (6): 30-34.
- [62] 张福锁. 环境胁迫与植物育种[M]. 北京: 农业出版社, 1993.

Application of cell-culture technique in plant nutrition science

WANG Huo-yan¹, WANG Yun-hua¹, ZHOU Jian-min²

(1 *Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*; 2 *Inst. of Soil Sci., CAS, Nanjing 210008, China*)

Abstract: A review on the effects of mineral elements on cell growth as well as application of cell-culture technique in plant nutrition science was conducted in this paper, with a purpose to forward cellular researches in plant nutrition science.

Key words: cell culture; plant nutrition