

我国植物组培技术的发展及展望

张国强¹, 翟秋喜² (1. 信阳农业高等专科学校园艺林学系, 河南信阳 464000; 2. 辽宁农业职业技术学院农学园艺系, 辽宁熊岳 115009)

摘要 介绍了我国植物组织培养技术的发展历史及现状, 分析了目前存在的主要问题和应采取的措施, 并对植物组织培养技术的发展作了展望。

关键词 组织培养; 发展现状; 存在问题; 措施

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)16-3893-03

Development and Forecast of Plant Tissue Culture Technique in China

ZHANG Guo-qiang et al (Department of Horticulture, Xinyang Higher Agricultural School, Xinyang, Henan 464000)

Abstract The history and present situation of the plant tissue culture technique in China were introduced. We analyzed the main problems and put forward the proper countermeasure. A development forecast of the plant tissue culture technique was also made.

Key words Tissue culture; Development situation; Existing problem; Countermeasure

组织培养技术是农业高新技术中最重要、最活跃的领域之一, 它不仅是农业持续发展的基础, 而且是生物技术中应用最广、最具现实意义的领域, 被誉为农业发展史上的第4次绿色革命。其对解决经济和社会发展所面临的人口增长、农业资源匮乏、环境污染等重大问题, 具有战略意义。

1 我国植物组培技术的发展历史及现状

19世纪30年代, 德国植物学家 Schleiden 和德国动物学家 Schwann 创立了细胞学说。1902年, 德国植物学家 Haberlandt 在细胞学说的基础上, 大胆提出要在试管中人工培育植物。他预言离体的植物细胞具有发育上的全能性, 能够发育成为完整的植物体。这种细胞全能性的理论是植物组织培养的理论基础。1948年, 我国植物生理学家崔微和美国科学家合作, 用不同种类和比例的植物激素处理离体培养的烟草茎段和髓, 发现腺嘌呤和生长素的比例是控制芽和根形成的主要条件之一。1958年, 美国植物学家 Steward 等用胡萝卜韧皮部细胞进行培养, 终于获得了完整植株, 并且该植株能够开花结实。这证实了哈伯兰特在50多年前关于细胞全能性的预言。

我国植物快速繁殖和无病毒种苗生产的研究始于20世纪70年代。目前, 马铃薯无毒种薯和甘蔗无毒种苗已在生产上大面积种植, 兰花、香石竹、月季、菊花、唐菖蒲、百合、重瓣玉簪、橡皮树、草莓、茶花、桉树、杨树、苹果、柑桔、枣树、醋栗、葡萄、木薯、香蕉、巴戟天、大蒜、金线莲、枸杞、半夏、红花、银杏等已进行规模化生产或中间试验。试管苗的年产量, 已由20世纪90年代初期的2000万株左右发展到现在的上亿株。利用组织培养技术进行植物快速繁殖及无病毒种苗生产, 不仅能够获得显著的经济效益, 同时能够挽救珍稀濒危物种和帮助解决药用植物野生资源短缺问题^[1-2]。

花药培养方面, 我国从1970年开始, 至今已利用花粉或花药培育出40多种植物的单倍体植株, 其中小麦、黑麦、小冰麦、玉米、橡胶树、杨树、辣椒、甜菜、白菜、油菜、柑桔、甘蔗、大豆和苹果等单倍体植株为我国首创。玉米利用花药培养获得了100多个纯合自交系, 橡胶获得了二倍体和三倍体植株。仅“九五”期间, 就利用花药培养育成高产、优质、抗逆、抗病新品种44个, 种植面积超过667万hm²^[3]。目前,

花药培养作为一种崭新的育种手段正在植物育种研究工作中发挥巨大优势。

胚胎培养, 是应用组织培养方法将早期生长的胚取出培养。胚胎培养有可能培育出杂种植物, 解决杂交育种中杂种胚败育的问题, 因而得到了广泛重视和应用。目前胚胎培养主要应用于一些亚洲国家^[4]。中国农业科学院蔬菜研究所培养结球甘蓝和大白菜的杂种胚, 获得了种间杂种。西北植物研究所得到了节节草和普通小麦的属间杂种。大麦+小麦、大麦+提莫菲维小麦、小麦+冰草等也都通过胚培养获得了杂种。同时, 烟草属间杂种、水稻品种间杂种也都已经得到。中国科学院植物研究所和北京市农林科学院合作, 通过胚胎培养育成的早熟桃新品种“京早3号”, 成熟期比一般早熟桃提前15~20d。此外, 龙眼、荔枝的焦核胚胎培养研究, 为果树选育优良焦核品种开辟了新途径。

原生质体培养方面, 到20世纪90年代初期, 我国获得了30个以上品种的原生质体再生植株, 其中包括难度较大的大豆、水稻、玉米、小麦、谷子、高粱、棉花等^[5]。原生质体培养的成功促进了体细胞融合技术的发展。

另外, 组织培养技术在药用植物培养、突变体选育及种质资源保存等方面也有了新的进展。有研究表明, 全世界有75%的人口以植物作为治疗、预防疾病的药物来源^[6]。仅20世纪90年代以来, 植物药用有效成分的国际专利就达50多项, 其中大多为抗病毒、抗癌化合物。由于有些植物生长周期长, 繁殖慢, 导致市场价格昂贵。如从长春花中提取的抗癌生物碱——长春新碱, 用于治疗白血病时, 售价高达6000美元/g。如果利用组织培养技术, 则能较快地获得提取药物的大量试材, 这样既能缩短生产周期, 又能降低生产成本。在美国, 来源于植物的药物市场约为90亿美元^[7]。例如, 白芷悬浮培养中生成的次生代谢物 imperatorin 是治疗头痛的主要药效成分; 从薯蓣愈伤组织和悬浮细胞产生的 diosgenin 用于合成甾体药物^[8]; 紫杉醇——红豆杉细胞培养物为最新抗癌药物, 目前, 已达到商业化生产水平^[9]。通过离体培养筛选植物突变体是生物技术研究中的一个较新的领域。筛选植物的有益突变体对提高作物抗逆性和改良作物品质有重要作用; 并能为植物遗传工程研究提供各种带有遗传标记的受体突变体细胞; 同时对于研究植物体内一些生理生化机理亦有重要意义。如小麦抗赤霉病和根腐病突

作者简介 张国强(1978-), 男, 山西运城人, 助教, 从事设施园艺栽培技术方面的研究。

收稿日期 2006-05-19

变体^[10-12];抗氨基酸及其类似物细胞突变体,如甘蓝型油菜抗 HYP 突变体^[13];逆境胁迫抗性突变体,如小麦抗盐突变体^[14];抗除草剂细胞突变体及营养缺陷型细胞突变体等。

人工种子研究方面,我国人工种子的研究始于“七五”期间,并于 1987 年被列入了“863 高新技术研究发展计划”。采用液氮超低温保存技术能保持很高的存活率,并且能再生出新植株和保持原来的遗传特性。如用其建立茎尖分生组织培养物的超低温保存种质库时,不仅可防止种质的遗传变异和退化,而且可长期保存无病毒的原种。我国对水稻、小麦、玉米、甘蔗、马铃薯、红豆、草莓、唐菖蒲、三分三、长春花等植物的茎尖分生组织、愈伤组织、胚状体、幼胚和花粉等材料,展开材料特性、预处理、光照、冰冻保护剂和降温冰冻方法对恢复生长的影响以及种质保存后遗传性状分析等研究。近 20 年来有关这方面的研究取得了很大进展^[15]。

2 我国在发展植物组培方面存在的问题及对策

2.1 发展植物组培育苗中存在的技术问题及对策 由于组培育苗操作程序复杂,在生产中常遇见污染、外植体接种困难、瓶苗生长分化不良、生根难、炼苗移栽成活率低、瓶苗玻璃化等诸多技术难题,虽然通过试验组培成功的植物已有很多,但利用组培进行规模化生产的植物种类却不多。有许多植物是因为某一环节的技术问题难以解决,而不能进行规模化生产。

2.1.1 污染问题及对策。污染是植物组培过程中的技术难题之一。根据污染发生的对象和出现的不同阶段,可分为 3 种^[17]:外植体污染、初代培养污染、继代培养污染。外植体材料、培养基、接种工具、接种室消毒不严格或无菌操作不规范等因素均会导致污染的发生。培养物受到污染在组织培养中经常遇到,并且难以控制,若不能把污染率降低到可接受的范围,将会造成重大的经济损失^[16]。因此,分析污染的产生和来源,控制污染的发生,成了植物组织培养中的重要工作。

对策:对从大田或温室采集的带菌植物外植体,应进行一系列的杀菌处理,使污染率降低到可接受的范围;对于初代培养污染和继代培养污染,要求组培室所有工作人员都必须严格按照规程操作,并且定期进行培养室消毒与操作台检查。

2.1.2 试管苗玻璃化现象及对策。玻璃化现象是由于人工在试管内小环境条件下提供的培养基和培养条件不完全符合培养物固有的需要造成的。由于玻璃化苗的组织结构和生理功能异常,其分化能力低下,难以增殖成芽、生根成苗,成活率低,成为组培过程中的技术难题之一。

随着对玻璃化现象研究的深入,在控制其发生时,大多数研究者均采用如下措施:

(1)选不易玻璃化的植物品种及部位作外植体材料。不同植物种类适宜的外植体部位可能不同。吴若箐等研究表明,香石竹的基部茎段发生玻璃化的可能性最大,这可能与不同植物的生理特性有关^[18]。

(2)利用固体培养基,增加琼脂浓度^[19];选择适当的碳源,提高培养基中蔗糖含量^[20];从根本上降低培养基的渗透势,造成细胞吸水阻遏,减少培养基中植物材料可获得的水

分,可减轻植物试管苗玻璃化现象。李瑶采用通风的方法,有效降低了玻璃化现象的发生频率。

(3)采用通气性好的封口材料如纱布、脱脂棉等代替聚乙烯塑料膜,可有效降低培养容器内部环境的相对湿度,减少有害气体的积累,使植物光合作用顺畅^[21-22]。

(4)选择适宜的糖源及外源激素的种类和浓度,并注意生长素与细胞分裂素的配合,尽量兼顾繁殖系数。研究表明,培养基中的 BA 是导致试管苗玻璃化的一个重要原因^[23-26]。选择合适的激素组合和适当降低培养基中 BA 的浓度均可减少玻璃苗的出现。

(5)通过改善培养条件(温度和光照)减少玻璃苗的发生。控制温度,避免过高的培养温度,进行变温处理。研究表明适当低温处理可消除玻璃化^[27]。同时,提高光照强度,适当延长光照时间。充分利用自然光照也可以降低玻璃苗的发生频率^[28]。

2.1.3 外植体褐变及对策。褐变是植物组培育苗中常见的现象,以木本植物较为严重。酶促褐变是主要因素^[29]。一般认为培养材料变褐是由于伤口处分泌的多酚氧化酶(PPO)被氧化成醌类物质,呈红褐色,并抑制许多酶的活性,影响培养物的正常生长,严重时导致其死亡^[30]。抑制外植体褐变的措施如下:

(1)根据不同时期、不同年龄的外植体在培养中褐变的程度不同,选取褐变程度较轻的材料。如选用早春和秋季的材料作为外植体。

(2)用抗氧化剂溶液对外植体进行预处理;或在接种之前用无菌水反复清洗,洗净外植体切口处渗出的酚类物质;均可起到减轻褐变危害的作用。

(3)选择适宜的培养条件,如低浓度的无机盐、适当的 pH 值和适宜的培养环境。如温度控制在 15~20℃,可有效防止褐变的发生。

(4)应用抗褐变剂和吸附剂(活性炭等)^[31]抑制褐变的发生。

(5)在组培过程中,经常筛选并剔除易褐变的细胞。

2.1.4 试管苗移栽问题及对策。移栽前,要根据当地的气候环境、植物种类、设备条件、移栽季节等特点,重点缩小试管苗移栽前后的环境差距和由异养向自养的转化,使植株能尽快适应自养发育和外界的温度、湿度、光照强度的变化。同时使其具备一定程度的抗微生物感染能力。

2.2 组培育苗成本较高问题对策 由于组培育苗生产中所需设备、技术的投入较大,组培育苗程序复杂,使得组培育苗的风险大,生产出的苗木成本相对较高,以致该项成果难以迅速推广应用。针对这些实际问题,首先应该让操作人员从操作规程上减小污染,提高成品率,其次还应从培养基的成分和培养条件方面展开研究,以降低成本。

宋锋惠等研究了简化培养室条件,如采用大玻璃窗的自然光代替日光灯进行组培育苗^[32]。结果表明,自然光代替日光灯,不仅有利于植株生长,减少了诱导的培养时间,还可减少设备投入和节约电能;此外,自然光培养苗叶片形状极小,可减少在接种时因叶片相互缠绕而引起的污染。

在培养基成分方面,减少其中的有机成分,不影响试管

苗的增殖,还可抑制细菌的生长,减少细菌污染。如采用液体浅层培养代替固体培养,可省去煮琼脂的电能消耗,而且等量培养基分装的瓶数比固体培养更多,在进行大量生产时对降低成本有实用价值。祁彦丰等通过用雨水、自来水、蒸馏水配制培养基进行马铃薯的培养试验,发现雨水培养基利于发根,根多而长、叶片数多、植株深绿、生长健壮,有利于移栽^[3]。李孟超发现,在不加蔗糖的情况下,在相同的基本生根培养基上,火鹤的继代苗生长良好,根、茎、叶、株高等的生长情况与加蔗糖处理的基本一致,且移栽后成活率和新生叶片数都高于加蔗糖处理^[34]。

3 展望

虽然组培育苗存在成本高、技术复杂等问题,但随着科学技术的不断发展,组培育苗将在未来植物繁殖中占有重要地位。其发展趋势如下:

(1)组培技术育苗植物种类不断增加。如组培技术育苗种类有果树、蔬菜、草坪草、花卉、香料植物、药用植物、茶叶、农作物等,既有草本又有木本。

(2)组培技术程序简化,组培成本降低。例如:用全自然光代替人工光照的组培育苗技术,使组培育苗的成本大幅度降低;新药品、新方法的运用将使传统的组培技术得以改进,使组培育苗技术更经济、更实用。

(3)组培技术不断提高。由最初的茎尖快繁到花药培养、胚胎培养、原生质体培养、体细胞杂交等。

(4)组培技术的应用范围不断扩大。由植物的简单繁育到突变体选育、种植资源保存等。

(5)组培技术逐渐向自动化方向发展。随着现代化温室在我国的应用及环境控制水平的提高,组培育苗将与现代化温室、电脑自控调节等手段相结合,使其效率更高。

参考文献

- [1] 徐忠东.植物组织培养生产药物研究进展[J].生物学杂志,2001,18(6):13-14.
- [2] 彭爱红,何永睿,邹修平,等.观赏植物组织培养与基因工程研究进展[J].亚热带植物科学,2002,31(2):58-63.
- [3] 郑企成,白新盛,刘录祥.浅议我国农作物细胞工程育种[J].农业生物技术学报,2000,8(S):74-77.
- [4] 李思经.国际农业生物技术进展[M].北京:中国农业出版社,1997:5.
- [5] 孙勇如,安锡培.植物原生质体培养[M].北京:科学出版社,1991.
- [6] 邢建民,赵修德,李茂寅,等.植物细胞培养生产黄酮类化合物研究进展[J].生物工程进展,2001,21(1):47-50.
- [7] 刘涂,胡之璧.生物技术在传统药材生产中的应用前景[J].生物工程进展,1997,17(2):13-16.
- [8] 蔡新声.台湾组织培养研究现状[J].植物生理学通讯,1994,30(6):427-436.
- [9] 孙彬贤,章国瑛,刘涂,等.红豆杉细胞培养与紫杉醇的生产[J].植物生理学通讯,1999,35(2):135-140.
- [10] 欧阳俊闻,周嘉平,贾双娥,等.植物细胞工程与育种[M].北京:北京工业大学出版社,1990:254-260.
- [11] 阎博,薛秀庄,陈建莉,等.利用幼穗愈伤组织筛选小麦抗赤霉病菌毒素体细胞突变体的研究[J].西北农业学报,1995,4(3):8-12.
- [12] 李社荣,李安生,张敬,等.小麦抗赤霉病菌突变体的离体筛选及生化变化的研究[J].核农学报,1995,16(3):158-161.
- [13] 吴沿友,罗鹏.甘蓝性油菜抗 HYP 突变体的筛选及鉴定[J].中国油料作物学报,1998,20(2):10-15.
- [14] 郭房庆,李群,顾瑞琦.抗盐小麦突变体的诱变筛选及其抗盐性的比较[J].核农学报,1997,11(1):1-8.
- [15] 夏镇澳.植物组织培养与农业.植物生理学通讯[J].1995,31(1):62-64.
- [16] 李骏明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业大学出版社,1996.
- [17] 毛秀红,荀守华,毛加发,等.植物组培快繁技术常见问题及解决对策[J].山东林业科技,2004,153(4):45.
- [18] 吴若箐,尤华明,彭东辉.香石竹组培苗玻璃化控制的研究[J].福建林学院学报,1995,15(4):360-363.
- [19] 韩美丽,唐玉贵,黄华艳.种灯白掌组培再生体系的建立与玻璃化现象的控制[J].广西林业科学,2000,29(3):111-114.
- [20] 张敏,张曙光,孙红绪,等.对影响草莓组培苗玻璃化若干因素的探讨[J].湖北农业科学,2002,(6):82-83.
- [21] JO M H, HAM I K. Eff of sealing materials and photosynthetic photon flux of culture vessel on growth and vitrification in carnation plantlets in vitro[J]. Journal of the Korean Society for Horticulture Science, 2002, 43: 133-136.
- [22] 高疆生,张卫芳,段黄金,等.克服香石竹试管苗玻璃化研究[J].北方园艺,2001(3):34-36.
- [23] 王爱勤,何龙飞,裴润梅,等.组培条件对不同品种芦荟试管苗玻璃化的影响[J].中国农学通报,2002,18(5):46-52.
- [24] 王春彦,高年春,张效平,等.非洲菊组织培养工厂化育苗关键技术研究[J].南京农专学报,2003,19(2):32-42.
- [25] 丰锋,李洪波,谢建英.芦荟组织培养中试管苗玻璃化的发生与防止[J].西南农业大学学报,2001,23(5):449-451.
- [26] 李任珠,杨跃标.美国芦荟离体培养中玻璃苗的复壮及快速繁殖的研究[J].海南大学学报:自然科学版,2001,19(3):240-245.
- [27] 李娅莉,张健,潘远智.观赏植物组织培养过程中玻璃化现象与解决措施进展[J].四川农业大学学报,2004,22(3):278-282.
- [28] 韩建军.叶子花组织培养中培养条件与玻璃化的相关性[J].中国林副特产,2002(1):48.
- [29] 于守超,赵兰勇,王芬,等.植物组织培养过程中外植体褐变机理研究进展[J].山东林业科技,2004,154(5):61-63.
- [30] 陈凯.植物组织培养中褐变的产生机理及抑制措施[J].安徽农业科学,2004,32(5):1034-1036.
- [31] 盛长忠.红豆杉愈伤组织培养中褐变现象的初探[J].南开大学学报:自然科学版,2001,34(4):120-122.
- [32] 宋锋惠,史彦江,卡德尔.改进培养方法提高组培快繁技术的初探[J].经济林研究,2003,21(4):57-59.
- [33] 祁彦丰,王萃莲,魏固宁,等.用三种不同水质配制培养基对马铃薯脱毒试管苗的影响[J].中国马铃薯,2000,14(3):173.
- [34] 李孟超.火鹤组培苗无糖生根培养试验[J].北京农业科学,2000,18(5):30-32.

科技论文写作规范——数字

公历世纪、年代、年、月、日、时刻和各种计数和计量,均用阿拉伯数字。年份不能简写,如 1990 年不能写成 90 年,文中避免出现“去年”、“今年”等写法。小于 1 的小数点前的零不能省略,如 0.245 6 不能写成 .245 6。小数点前或后超过 4 位数(含 4 位数),从小数点向左右每 3 位空半格,不用“,”隔开。如 18 072.235 71。尾数多的(5 位以上)的数字和小数点后位数多的小数,宜采用 $\times 10^n$ (n 为正负整数)的写法。数字应正确地写出有效数字,任何一个数字,只允许最后一位存在误差。