

植物组织培养及其应用研究概况

王家麟

(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 简述了组织培养的概念、原理及方法,概述了植物组织培养在植物快速繁殖、无病毒种苗生产、花药培养、单倍体育种、胚胎培养、细胞培养、植物次生代谢产物生产、植物细胞突变体筛选、原生质体培养、体细胞胚胎和人工种子、组织细胞培养物超低温保存及种质库建立等方面取得的成就。

关键词: 植物;组织培养;研究进展

中图分类号: Q 943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2006)03-0086-04

Research Summary of Plant Tissue Culture and Its Application

WANG Jia-lin

(Agricultural College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: The notion, principle and method of tissue culture were described briefly in this paper. the research achievement of plant tissue culture technology in micro-propagation plant, production of no-virus seedlings, anther culture, breeding of monoploid plant, embryo culture, cell culture, production of secondary metabolites, selection of plant cell mutant, protoplast culture, somatic embryogenesis and artificial seed, cryopreservation of plant cells and the foundation of germ plasm store were also summarized.

Key words: plant; tissue culture; research advance

在世界各国科学家的不断努力下,近几十年来,植物组织培养技术迅速发展。利用组织培养,不仅可以大量生产优良无性系,获得人类需要的多种代

谢物质,还可获得单倍体、三倍体、多倍体及非整倍体。通过细胞融合可以打破种属间的界限,克服远缘杂交不亲和性,在植物新品种的培育和种性的改

* 收稿日期: 2006-02-05

第一作者简介: 王家麟(1984-),男,哈尔滨人,就读于东北农业大学农学院生物技术系,本科大三学生。

多能的复合型知识结构,特别是随着社会的进步和科学技术的飞速发展,咨询专业人员更需要掌握经济、法律、技术、金融等多方面的知识,以适应工作的需要^[1]。为培养和造就一支高素质的农业工程咨询队伍,就必须采取相应的措施。一是要下大力气,努力汇聚一批熟悉农业科技、工程、经济、融资、法律、项目管理等知识的优秀人才;二是要根据拓展咨询业务的需要,培养一批一专多能的青年人才;三是要建立和不断完善人才激励机制和重用创新人才的机制,增强对优秀人才的凝聚力。

4.3 不断扩大信息知识资源

农业工程咨询单位必须把广泛采集、整理、加工、储存、传递、利用信息资源作为重要工作来抓。

要建立本单位的咨询专家库;要建立实用的软件;要善于把咨询人员的智慧和经验及时总结,形成咨询单位的专利技术和品牌,提高竞争实力;要与其它行业工程咨询单位广泛联系、增进信息交流,及时学习、掌握新知识、新信息。

参考文献:

- [1] 注册咨询工程师(投资). 考试教材编写委员会,工程咨询概论[M]. 北京,中国计划出版社,2003.
- [2] 贺雨青. 浅谈农业工程咨询[J]. 黑龙江农业科学,2005,(5), 62-63.
- [3] 薛亮. 发挥工程咨询作用提高农业项目决策水平[N]. 农民日报,2002-12-10(003).
- [4] 王保福,李红霞,陈文杰,等. 做好农业工程咨询工作,提高项目科学决策水平[J]. 甘肃农业科技,2005,(2),3-6.

良中发挥了巨大作用。组织培养的植物细胞是在细胞水平上分析研究的理想材料,从植物快繁、花药培养发展到细胞器培养、原生质融合以及 DNA 重组技术等,植物组织培养技术广泛应用于植物科学的各个领域及农业、林业、工业、医药等多种行业,已经成为当代生物科学中最有生命力的一门学科^[1~3]。

1 植物组织培养的基本概念、原理和试验步骤

1.1 概念

植物组织培养是在无菌条件下,将离体的植物器官(根尖、茎尖等)、组织(形成层、花药组织等)、细胞(体细胞、生殖细胞等)、胚胎(成熟或未成熟的胚)、原生质体等在人工配制的培养基上培养,给予适宜的培养条件,诱发其产生愈伤组织或潜伏芽或长成完整的植株的技术^[1]。

1.2 原理

植物组织培养的依据是植物细胞的“全能性”及植物的“再生作用”。1902 年,德国著名植物学家 G. Haberlandt 根据细胞学理论提出了一个观点,“高等植物的器官和组织可以不断分割,直至单个细胞,即植物体细胞,体细胞在适当的条件下具有不断分裂、繁殖并发育成完整植株的潜力”。1943 年,美国人 White 在烟草愈伤组织中偶然发现形成一个芽,证实了 G. Haberlandt 的论点^[2]。

不同植物所需要的生长条件不同,所用的培养基也有所不同。较常用的基础培养基有 MT、MS、SH、N6、White 等。在组织培养中,愈伤组织和胚状体能否形成是培育出新植株的关键。通过在基础培养基里添加一定浓度的外源激素,可以诱导出愈伤组织、胚状体、不定芽、根等器官,最终获得再生植株或次生物质^[2]。

用于植物组织培养的材料称为外植体,其主要形式有器官、胚胎、单细胞、原生质体等。根据外植体的不同,所需要的培养基种类、培养条件、外源激素的种类及比例等均不同。植物组织培养中,影响培养力的因素是多方面的,诱导愈伤组织成败的关键在于培养条件,植物激素是诱导愈伤组织和绿苗分化的关键因素^[2]。

最常用的诱导愈伤组织的生长素是 IAA、NAA 和 2,4-D,所需浓度为 0.01~10 mg/L。最常用的细胞分裂素是 KT 和 ABA,使用浓度为 0.1~10 mg/L。KT 的主要作用是促进细胞分裂和愈伤组织分化。ABA 对植物体细胞胚的发生与发育具有

重要作用^[4~6]。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^[7]。

1.3 试验步骤

1.3.1 选择和配制培养基 培养基是植物组织培养中的“血液”,血液的成分及其供应状况直接关系到培养物的生长与分化,因此了解培养基的成分、特点及其配制至关重要。

1.3.2 灭菌 灭菌是组织培养中的重要工作之一,通常采用物理的或化学的灭菌方法。培养基用常压或高压蒸煮等湿热灭菌、器械采用灼烧灭菌、玻璃器皿及耐热用具采用干热灭菌、不耐热的物质采用过滤灭菌、植物材料表面用消毒剂灭菌、物体表面用药剂喷雾灭菌、接种室等空间采用紫外线或熏蒸灭菌。

1.3.3 接种 将已消毒好的根、茎、叶等离体器官,经切割或剪裁成小段或小块放入培养基,整个接种过程要在无菌条件下进行。

1.3.4 培养 把培养材料放在有一定光照和温度等条件的培养室里,使之生长、分裂和分化,形成愈伤组织或进一步分化成再生植株。

1.3.5 试管苗驯化移栽 试管苗是在特殊环境条件下生长的幼苗,与自然生长的幼苗有很大差异,只有通过驯化,使之适应自然环境后才能移栽。

2 植物组织培养的应用

2.1 植物快速繁殖和无病毒种苗生产

植物快速繁殖技术始于 20 世纪 60 年代,法国的 Morel 用茎尖培养的方法大量繁殖兰花获得成功,从此揭开了植物快速繁殖技术研究和应用的序幕。目前,通过离体培养获得小植株并且具有快速繁殖潜力的植物已有 100 多科 1 000 种以上,有的已经发展成为工业化生产的商品^[3,8]。世界上 80%~85% 的兰花是通过组织培养进行脱毒和快速繁殖的^[9,10]。培养的植物种类也由观赏植物逐渐发展到园艺植物、大田作物、经济植物和药用植物等。在我国,同类的研究始于 20 世纪 70 年代。马铃薯无毒种薯和甘蔗种苗已在生产上大面积种植,30 余种植物已进行规模化生产或中间试验。利用组织培养进行植物快速繁殖及无病毒种苗生产,不仅能够挽救珍稀濒危物种,而且能够解决植物野生资源缺乏的问题^[11,12]。

2.2 植物花药培养和单倍体育种

将植物花药培养成单倍体植株,再经过染色体加倍,能很快得到纯合的二倍体,这样将大大缩短育种年限。到目前为止,世界上通过花粉和花药培养

已获得了几百种植物的单倍体植株。印度科学家应用这种方法培育的水稻品系,比对照产量提高15%~49%。韩国先后育成了5个优质、抗病、抗倒伏的水稻品种。我国自20世纪70年代开始该领域的研究,已经培育了40余种由花粉或花药发育成的单倍体植株,其中有10余种为我国首创。玉米获得了100多个纯合的自交系;橡胶获得了二倍体和三倍体植株。仅“九五”期间就育成高产、优质、抗逆、抗病的农作物新品种44个,种植面积超过660万 hm^2 ^[13]。

2.3 植物胚胎培养

杂交育种中,杂种胚常常败育,因此将早期生长的胚取出,应用组织培养方法,就有可能培育出杂交植物。已经有100篇以上幼胚培养成为植株的报道。国内外科学家应用植物胚胎培养技术获得了多种远缘杂交的重组体、栽培种和杂交品种^[14]。

2.4 植物愈伤组织或细胞悬浮培养

利用植物愈伤组织或细胞悬浮培养可以生产用于预防和治疗疾病的植物次生代谢产物。近年来,这一领域的发展极为迅速,已经研究了400多种植物,从培养细胞中分离到600多种次级代谢产物,其中60多种在含量上超过或等于原植物,20种以上干重超过原植物的1%。例如,从薯蓣愈伤组织和悬浮细胞生产的diosgenin用于合成甾体药物。最近抗癌药物紫杉醇—红豆杉细胞培养物,可用75t发酵罐培养,已达到商业化生产水平^[15~19]。另外,达到商品化水平的还有紫草、人参、黄连、老鹳草等;长春花、毛地黄、烟草等已实现工业化生产;牙签草、红花等20多种植物正在向商品化过渡^[14]。

2.5 细胞融合与原生质体培养

自1960年英国学者Cocking首次利用纤维素酶从番茄幼苗的根分离原生质体获得成功以来,到1990年已有100种以上植物的原生质体能再生植株。我国获得了30余个品种的原生质体再生植株,其中包括难度较大的重要粮食作物和经济作物,如大豆、水稻、玉米、小麦、谷子、高粱、棉花等^[20,21]。在木本植物、药用植物、蔬菜和真菌原生质体培养方面的进展也十分迅速。国外已先后获得了种内及种间的体细胞杂种植株。植物原生质体培养还可应用于外源基因转移、无性系变异及突变体筛选等研究,因而越来越受到人们的重视。

2.6 植物细胞突变体筛选

植物细胞突变体的筛选最早始于1959年,G. Melchers在金鱼草悬浮细胞培养中获得了温度突

变体。1970年,P. S. Carlson, H. Binding和Y. M. Heimer等分别分离出烟草营养缺陷型细胞、矮牵牛抗链霉素细胞系及烟草抗苏氨酸细胞系^[14]。迄今为止,已经在不少于15个科45个种的植物细胞培养中筛选出100个以上的植物细胞突变体或变异体。其中包括抗病细胞突变体,如玉米抗小斑病突变体^[22]和小麦抗赤霉病、根腐病突变体^[23~25];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^[26];抗逆境胁迫细胞突变体,如水稻耐盐突变体和小麦抗盐突变体^[27,28];抗除草剂细胞突变体及营养缺陷型细胞突变体,如玉米抗除草剂变异体^[29];株高突变体的筛选,如水稻矮秆变异体^[30,31]。

2.7 植物体细胞胚胎和人工种子

1958年,Reinert在胡萝卜的组织培养中最先发现了体细胞胚胎(胚状体)。据不完全统计,能大量产生胚状体的植物有43科92属100多种。一些重要作物如水稻、小麦、玉米、珍珠谷等,也能通过离体培养产生胚状体。这些胚状体用褐藻酸钠等包埋,再加上人工种皮,就形成了人工种子。人工种子的优点是:繁殖快速,成苗率极高;不受气候影响,四季皆可工厂化生产。上世纪80年代初,美、日、法等国家相继开展了人工种子的研究,我国也于“七五”期间开展了此项研究,并于1987年列入了国家“863”高技术研究发展计划^[14]。

2.8 植物组织细胞培养物的超低温保存与种质库建立

植物细胞全能性的发现和证实,为植物种质资源的长期保存开辟了一条新途径。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。如建立茎尖分生组织培养物的超低温保存种质库,不仅可以防止种质的遗传变异和退化,而且可以长期保存无病毒的原种^[32]。

2.9 植物组织培养与转基因技术的应用

我国第一个T-DNA插入突变体库的构建和研究为我国水稻功能基因组学研究奠定了良好的技术和材料基础,为确保我国拥有一批有自主知识产权的基因资源做出了积极贡献。由中国水稻研究所农业部水稻生物学重点开放实验室和中科院上海植物生理研究所合作,通过建立大规模、高效的农杆菌介导的转基因技术体系,将玉米转座子Ac-Ds等外源基因导入水稻未成熟胚和种子诱导的愈伤组织,获得了1.2万个独立的T-DNA插入株系,并构建了水稻突变体的数据库^[33]。

3 展望

植物组织培养研究与应用是 20 世纪科技进步的重大成果之一,为研究植物生长发育、抗性生理、激素及器官发生与胚胎发生等提供了许多良好的实验材料和有效途径。植物组织培养方法不断提高的同时,也相应拓宽了其应用范围。由于组织培养在人工控制的条件下进行,容易掌握花芽分化和开花成因;通过胚胎培养,能够得到杂种或自交种;通过分离单倍体细胞,能培育纯合的二倍体优良品系;提高育种多样性的同时缩短了育种时间;通过突变体筛选,提高植物的品质,增强抗逆境胁迫能力,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要的次生产物,加快药物生产的时间并且减少了单纯依靠天然植物的被动性。植物组织培养技术已经渗透到科研、生产和生活各个领域,必将日臻完善。

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[J].河南师范大学学报,2000,(3):137-139.
- [2] 梁一池,杨华.植物组织培养技术的研究进展[J].福建林学院,2002,22(1):1-3.
- [3] Negussic A Induce more buds of junipers excelsa's tissue culture[J]. For. Ecol. manage, 1997,98(2):115-123.
- [4] 崔凯荣,刑更生,周功克.植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节[J].遗传,2000,22(5):349-354.
- [5] 梁辉,周海鹰,李良材.脱落酸在小麦幼胚培养中的作用[J].农业生物技术学报,1996,4(1):51-55.
- [6] 彭艳华,刘成运,柯善强.脱落酸对黄连体细胞胚胎发生的影响[J].植物学报,1993,35(增刊):71-76.
- [7] 李宗霖,周璧.植物激素及其免疫检测技术[M].南京:江苏科学技术出版社,1996.
- [8] 李思经.国际农业生物技术进展[M].北京:中国农业科技出版社,1997.
- [9] 陈维伦.植物生物技术改良[M].北京:中国科技出版社,1991. 213.
- [10] 罗士书.植物组织培养和细胞培养工作的进展[A].全国细胞培养与体细胞杂交线粒体呼吸代谢与杂种优势会议论文集[C].北京:科学出版社,1978.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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(增刊):74-77.
- [14] 许凤芹,刘桂茹,杨学举.植物组织培养研究进展[J].河北农业科学,2005,9(1):99-103.
- [15] 刘泳,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.
- [16] 郑光植.植物细胞培养及其次级代谢[M].昆明:云南大学出版社,1992.
- [17] 蔡新声.台湾组织培养研究现状[J].植物生理学通讯,1994,30(6):427-476.
- [18] 孙彬贤,章国瑛,刘泳,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.
- [19] 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.
- [20] 孙敬三,桂耀林.植物细胞工程实验技术[M].北京:科学出版社,1995.
- [21] 孙勇如,安锡培.植物原生质体培养[M].北京:科学出版社,1991.
- [22] Gengenbach B. G., Green C. E. Selection of tT⁻ cytoplasm Maize Callus Cultures Resistant to Helminthosporium maydis Race T Pathotoxin[J]. Crop Science, 1975,15:645-647.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 李社荣,李安生,张敬,等.小麦抗赤霉病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.
- [26] 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.
- [27] Thepe TA. Plant Tissue Method and Application in Agriculture[M]. America: Academic Press. 1981. 273.
- [28] 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.
- [29] 王延峰,李国圣.玉米抗除草剂体细胞变异体的筛选及植株再生[J].河南农业科学,2001,(12):16-19.
- [30] 黄道强,黄慧君,陈文丰,等.水稻幼穗继代培养体细胞无性系变异及其在育种上的应用[J].广东农业科学,2001,(1):2-4.
- [31] 郭秀平,陈旭.花培创造的水稻新种质[J].中国种业,2002,(10):60.
- [32] 夏镇澳.植物组织培养与农业[J].植物生理学通讯,1995,31(1):62-64.
- [33] 韩磊,汪旭东,吴先军,张红宇.植物组织培养技术及其应用研究进展[J].种子,2005,24(1):38-43.