

植物组织培养快速繁殖类型综述

邓年方,王义强

(中南林学院生命科学与技术学院,湖南 长沙 410004)

摘要:应用植物组织培养方法进行快速繁殖,具有繁殖速度快、能保持植株的优良性状等优点。其繁殖类型有无菌扦插、器官发生、器官直接转变型、胚状体发生和原球茎等类型。指出了组织培养快速繁殖技术目前存在的主要问题。

关键词:植物组织培养;快繁;愈伤组织

中图分类号:Q943.1 **文献标识码:**A

Types of plant rapid micro-propagation in terms of tissue culture

DENG Nian-fang, WANG Yi-qiang

(College of Life Science and Technology, Central South Forestry University, Changsha 410004, China)

Abstract: Elite characters of plants can be kept by plant rapid micro-propagation technology in terms of the success of tissue culture. Propagation types including aseptic cuttage, organogenesis, organotypic, somatic embryo, protocorm-like body, etc. have been summarized and some problems to be solved have also been presented in this paper.

Key words: Plant tissue culture; Rapid propagation; Callus

1 应用组织培养法快速繁殖的目的与意义

生产上繁殖苗木一般采用分蘖繁殖、种子繁殖、扦插繁殖、嫁接或者埋条、埋根等方法进行,但这些方法各有弊端。比如苧麻^[1]是多年生植物,目前生产上多用分蘖繁殖法或种子繁殖法。分蘖繁殖,繁殖系数低,速度慢,种子繁殖则容易发生变异。*Musa balbisiana* 是商品香蕉的1个野生亲缘物种,其种子在自然条件下不能萌发^[2]。我国特有的毛白杨(*populus tomentosa* Carr)^[3],插枝生根比较困难,扦插繁殖成活率不稳定,常采用嫁接或埋条、埋根等方法进行无性繁殖,用材多,成活率亦低。菊花(*Chrysanthemum morifolium*)^[4],传统生产上是采用大芽扦插繁殖,但一些名贵品种不宜生根,致使生长弱,开花晚,无法大量繁殖生产以满足多方面的需要。菠萝[*Ananas comosus*(L.) Merr]^[5]的自然繁殖系数仅有2~3倍,用老茎切片繁殖法的繁殖系数也只能提

高15倍,因此影响了良种的繁殖与推广。

1958年,Steward和Reinert在胡萝卜愈伤组织和细胞培养实验中获得了植株,科学地证实“植物细胞的全能性”^[6],为植物组织培养技术奠定了理论基础。经过30多年的实验研究,目前已有600多种植物能用组织培养方法形成芽、胚状体及完整的植株^[7]。在离体培养下植物细胞所具有的这种能重新形成新个体的“全能性”,使组织培养技术在保持优良种质,加速植物的无性繁殖等应用中,取得了越来越多的成功,是快速繁殖优良植株的捷径。自20世纪60年代法国Morel开始用组织培养进行兰花的无性繁殖以来,用组织培养进行无性繁殖已在国内外得到了广泛的应用。我国广西钦州地区由雷林1号桉(*Eucalyptus leizhou* No. 1)优树获得的试管植物已开始用于造林^[8];马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)^[9]的无毒苗已大面积栽种;已用组织培养方法迅速繁殖北美红杉^[10](*Sequoia sempervirens*(Lamb.)Endl.)。

植物无性系的无菌快速繁殖发展如此迅速缘于

以下优点:

(1) 可以保持植物的优良特性和性状。由于大多数果树和观赏植物都是高度杂合的,因此它们的种子后代不可能与原种完全相同。只有无性系产生的植株,在遗传上才能与亲本植物完全相同,从而使品种的特性代代相传。一个品种通过无性繁殖可产生在遗传上等同的多个拷贝,其中由一个个体通过无性繁殖产生的一个群体称为一个无性系。在自然界中,无性繁殖的途径有二,一是无融合生殖,即不经过减数分裂和受精而形成种子;二是营养繁殖,即由母株的营养部分再生出新的植株。无融合生殖只发生在少数几个物种,因此园艺家一直采用营养繁殖的方法对入选品种进行无性繁殖,从而保持植物的优良性状。对于很少产生或不产生有生活力的种子,营养繁殖是唯一的繁殖方法。而组织培养技术,作为植物营养繁殖的一个新手段已被广泛应用。

(2) 用组织培养法进行繁殖周期短,繁殖快,节省空间。当前微繁最主要的用途是替代传统的营养繁殖方法以增加繁殖系数。而在离体条件下繁殖系数的提高,必然会显著缩短一个新品种由选育到推广所需的时间。如通过组织培养,由一块很小的,甚至是极微的植物组织,在 12 个月之内可以产生 100 万以上植株,如此高的繁殖速度是任何传统的无性繁殖方法所不能达到的^[2]。枝条的增殖周期很短(14~42 d),而每个周期都能导致枝条数的几何级数增长。澳洲青苹(*Malus pumila*)离体培养时,由 1 个茎尖可以在 8 个月内繁殖 60 000 个以上苹果枝条^[11]。对于兰科植物来说,微繁是惟一有效的进行大规模无性繁殖的方法^[12]。此外,在组织培养中,植物的繁殖可以不受季节的影响,周年连续进行。

(3) 可以通过组织培养的手段获得无病原菌的或无病毒的植株。消除病害的问题在经济树种、花卉生产上很受重视,因为大多数苗木连续采用扦插或嫁接等方法进行无性繁殖,体内病毒有所积累,严重地影响了果树的生长发育,甚至导致毁灭性的灾害而影响苗木生产的发展。一般都应用热处理法获得无病毒植物,但此法的主要限制在于并非所有供试植物都对热处理敏感,而且在热处理之后只有一小部分植株能够存活。茎尖培养方法具有更广泛的应用,在应用组织培养方法以获得无病毒植物时,所用的外植体是茎尖或顶端分生组织,这是因为病毒在植物体内的分布是不均匀的,在受浸染的植株中茎尖或顶端分生组织一般无毒或者只携带浓度很低

的病毒。在无菌条件下仔细地剥出茎尖,然后在合适的培养基上进行培养,一般可由茎尖再生出无病毒的植株。通过这种方法已得到的无病毒植株有草莓(*Fragaria ananassa* Duch)^[13],马铃薯^[14],香石竹(*Dianthus caryophyllas* L.)^[15]等。

2 植物进行无菌快速繁殖的类型

利用组织培养进行无性繁殖大约可以经下列 5 种途径达到大量繁殖的目的。

2.1 无菌短枝扦插

这是用组织培养方法进行无性繁殖方面应用最广的方法。腋芽存在于每个叶片的叶腋中,每个腋芽都有发育成 1 个枝条的潜力。采用一个有活力的潜伏芽在无菌条件下扦插,使其长出腋芽或丛生芽,这些腋芽又可以直接发育成枝条,这个过程可以重复若干次,结果原来的外植体就变成了一丛新枝。例如芋麻^[1],将无菌苗剪取带 1~2 个的节段在含激素的 MS 培养基上,几天后腋芽萌动,这些腋芽的基部又很快长出新的腋芽,大约 45 d 左右,每瓶就可产生 10~20 株新苗,如再用作接种材料,反复切取带腋芽的茎段再培养繁殖,就可以得到大量的无性系无根苗。这样一年的繁殖倍数可以高达 10^8 之多。

2.2 器官发生型

指从愈伤组织表面或内部形成芽和根。

(1) 用茎切法进行扩大繁殖。一般的方法是将茎切成约 0.3~0.5 cm 长的茎段,接种到合适的培养基上。例如鸡蛋枣^[16],10 d 左右就可产生愈伤组织,20 d 后就能分化出芽,芽的数目 1~3 个不等,多的可达 10 个。分化率最高可达 40%~50%。

(2) 通过叶外植体上芽的分化进行繁殖。利用叶外植体愈伤组织产生不定芽的方法比切段繁殖法有更高的繁殖速度。例如,将毛白杨^[17]的叶切成 1 cm×1 cm 的切块,在合适的培养基上,使叶背面和培养基相接触,约 15 d 后,从叶的切口处先形成愈伤组织,经 30 d 左右分化出不定芽,之后逐渐形成一簇。每个叶外植体可以得到 20 个以上嫩枝。粗略计算,1 株毛白杨,如果切取 5 个外植体,至少可得到 50 株以上由不定芽长成的小苗。用这个方法比茎切段繁殖法提高繁殖速度 10 倍以上。

2.3 胚状体发生

胚状体是指培养过程中由外植体或愈伤组织产生的与正常受精卵发育方式类似的胚胎结构。胚状体途径产生再生植株的主要特点是:分化率高,繁殖

系数大,根系发达。例如东方旱麦草 [*Eremopyrum orientale* (Linn.) Jaub. et Spach]^[18],可通过诱导产生胚状体进行繁殖,操作上需进行多次转移培养,将不同颜色、不同结构的愈伤组织分别进行培养,并挑出肉眼可见的胚状体团继代培养,一般继代培养20~30 d,胚状体团大小为1~3 cm³,可以切成10~30块进行下一代继代培养,由于胚状体按10~30倍的几何级数增殖,1 a内就可获得胚状团10¹²~30¹²块,每块成苗10~20株,就可获得胚状体苗10¹³~20×30¹³株。因为这些苗在发育上是不同步的,成活率仅为5%,1 a也可以培养出10¹³株以上的胚状体苗。

2.4 原球茎

原球茎的形成过程是:当对植物离体茎尖进行培养时,它们不是长成带叶的枝条,而是形成一个扁球体,基部着生假根,这些结构就叫原球茎。它们在形态上与种子萌发时由胚形成的原球茎相似。在茎尖培养中,这种原球茎起源于叶片的表皮或下表皮细胞。某些原球茎还能进行增殖,形成原球茎丛,其中最多可包含十几个原球茎。周丽等在大花蕙兰 (*Cymbidium hybridum*)^[19]进行无性繁殖试验时,把每个原球茎切成3~6块,接种在合适的培养基上,由于其表面细胞的活动,每一块又形成若干新的原球茎。在40~50 d的时间内,由1个切块最多能产生12个原球茎。这种增殖原球茎的过程可以无限反复进行。总起来算,若由1个茎芽在大约2个月的时间内形成3~5个原球茎,把每个原球茎切成4~6块,其中每一块在1个月内又产生3~5个原球茎,以这样一种繁殖速度,在1 a中可以产生几百万个植株。

2.5 器官直接转变型

指由离体的茎尖、花芽、叶片、花丝、花托、鳞片等组织上直接产生小植株。这种方式往往在形成小芽苗的同时或之前也形成少量的愈伤组织。

(1)由茎尖进行繁殖。如林如青等建立了甜叶悬钩子 (*Rubus suavissimus* S. Lee)^[20]的茎尖培养方法:把剪下的1 mm长的茎尖(带有2~3个叶原基)切成约20段,置于培养基上以后,每段都能形成很多新茎芽,有些新茎芽60 d后长到大约3 cm高。把这些茎丛从基部分割开来再培养,又可以产生更多的新茎。这个过程每10~14 d重复1次,这样在3~4个月内,由1个茎尖开始即可产生8 000个植株。

(2)从鳞片分化芽或小鳞茎。将兰州百合 (*Lilium davidii* var *unicolor*)^[21]鳞片切段培养在含有

1/2MS + IBA 0.5 mg/L的培养基上时,1株百合最多可以产生20个以上的小鳞茎。

还有用侧芽分化和增殖,如桑树 (*Morus alba* L.)^[22]、甘蔗^[23]等。叶外植体的周围再分化出芽的有银河1号杨 (*Populus alba* × *P. hopeiensis*)^[24]、菊花 (*Dendranthema grandiflorum*)^[25]等,与上述器官发生型繁殖方式不同的是:不定芽由植物叶片切口直接长出来,其间不间入愈伤组织阶段。也有由萌发种子的顶芽及腋芽产生丛生芽,如黄山药 (*Dioscorea panthaica* Prainet Burkill)^[26]、香石竹 (*Dianthus caryophyllus*)^[27]等,以上这些方式都能产生大量的试管苗。

3 存在的问题

应用组织培养技术进行植物离体快繁现已被世界上很多苗圃用于各种各样的草本和木本植物,将兰花、菊花等观赏植物用组织培养方法进行工厂化生产,将桉树、杨树等林木树种用组织培养方法进行扩繁用于植树造林。随着基因工程技术的发展,越来越多的外源基因被转到植物中,将被转基因的植物用组织培养方法进行扩繁是进行转基因的第一个关键步骤,因此用组织培养法进行快速繁殖技术很重要,得到了更加广泛的应用。但是,目前这种离体无性繁殖方法也还存在一些问题,有一定的局限性。

3.1 个体差异性

虽然很多物种都已建立了进行离体快繁的有效、实用方法,但很多难于用传统方法繁殖的重要树木,包括若干裸子植物,离体繁殖技术还没有过关^[1]。在不定芽形成和愈伤组织方法中,茎芽必须重新形成,而很多重要栽培植物并不能形成茎芽,那么是这些组织具有某种特殊的要求至今还没得到满足呢?还是它们缺少茎芽分化的遗传能力?

3.2 遗传上的不稳定性

通过愈伤组织诱导芽是进行植物繁殖的最快方法,但用这种方法遇到了严重问题,例如,当通过愈伤组织培养繁殖石刁柏时,所得的植株表现多倍性和非整倍性,用胚状体方式进行无性繁殖时也存在遗传上变异的问题^[2]。用愈伤组织培养进行植物繁殖的另一个缺点是,随着继代时间的增加,愈伤组织最初的植株再生能力可能逐渐下降,最后甚至完全丧失。而通过一个植物器官或一个节段直接长出芽用在具有遗传嵌合性的品种上时,会产生一个严重的问题:不定芽的形成会招致嵌合体裂解从而出

现纯型植株的风险^[2]。

3.3 “玻璃化”现象

根据研究者们的经验,当不断进行重复离体繁殖的时候,一部分培养物常常变成水渍状、其植株茎部趋于透明状,这类试管苗的生长和繁殖速度都会下降,最后甚至死亡,称之为“玻璃化”现象^[28],这个问题还没有得到满意的解决。

参考文献:

- [1] 罗士伟,许智宏. 经济植物组织培养[M]. 北京:科学出版社,1988.
- [2] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京:中国农业大学出版社,1992.
- [3] 穆香明,郭俊华,王美健,等. 优良绿化树种—三倍体毛白杨苗木繁育技术[J]. 农业科技通讯,2004(1):27.
- [4] 李 莉,李 茜. 菊花的繁殖方法[J]. 安徽农业,2000(4):15.
- [5] 刘 岩,钟 云,杨 护,等. 菠萝良种苗木快繁技术研究[J]. 中国南方果树,2004,33(6):55-57.
- [6] 罗士伟. 我国植物组织培养工作的进展. 自然杂志年鉴,1979c.
- [7] 王怀智. 经济植物组织培养[M]. 北京:科学出版社,1988.
- [8] 谢绮文. 雷林1号桉组织培养诱导完整植株[J]. 桉树科技协作动态,1981(7):46-49.
- [9] 曹 坚,倪宏正,周 峰. 早春大棚马铃薯脱毒薯快繁技术[J]. 中国种业,2005(01):44.
- [10] 陈 芳,马显达,陈 娟,等. 北美红杉优良无性系组培快繁技术研究[J]. 林业科学研究,2005,18(1):102-105.
- [11] 张志勤,张 铮,王喆. 澳洲青苹茎尖培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2004(2):197.
- [12] 陈发兴,林顺权,王家福,等. 兰花繁育技术的研究进展[J]. 福建农林大学学报,2002,31(4):476-479.
- [13] 郭彩霞,秦 娜,迟 晓. 茎尖培养草莓无毒苗及其繁殖[J]. 烟台果树,2001(2):28-29.
- [14] 刘志云. 利用茎尖培养马铃薯无毒苗技术的研究[J]. 高师理科学刊,2003,23(3):46-47.
- [15] 彭 扬,李景申,刘焕新,等. 应用组培技术繁育香石竹无毒苗的试验[J]. 天津农林科技,1998(2):4-6.
- [16] 伍成厚,何业华,谢碧霞,等. 枣茎段组织培养的研究[J]. 果树学报,2004,21(6):609-611.
- [17] 陈甘牛,安雪琴,王福宾. 三倍体毛白杨叶片培养和快速繁殖[J]. 山东林业科技,2002(5):12-13.
- [18] 周小云,计巧灵,刘亚萍. 东方早麦草胚状体诱导和无性繁殖体系的建立[J]. 新疆大学学报,2005,22(1):68-70.
- [19] 周 丽,胡春根. 大花蕙兰原球茎增殖研究[J]. 黔东南民族师范高等专科学校学报,2002(4):89-91.
- [20] 林如青,孙 端,李月英. 甜叶悬钩子茎尖微繁技术研究[J]. 福建林业科技,2003,30(4):25-27.
- [21] 王丽艳,梁国鲁,郭启高. 兰州百合组培苗试管结鳞茎研究[J]. 北方园艺,2004(3):73.
- [22] 刘辉芬,罗天学,宋 建,等. 桑树侧芽组织快速繁殖试验研究[J]. 四川林业科技,2002,23(03):43-46.
- [23] 邹宗兰,秦延豪,吴才文. 甘蔗侧芽的离体快速繁殖[J]. 甘蔗,1999,6(02):25-26.
- [24] 宋玉霞,马洪爱,郭生虎,等. 银河I号杨叶外植体再生体系建立[J]. 西北植物学报,2002,22(03):661-666.
- [25] 高亦珂,赵 勃,丁国勋,等. 菊花茎叶外植体再生体系的研究[J]. 北京林业大学学报,2001,23(01):32-33.
- [26] 马 林,张 玲,李卫锋. 黄山药丛生芽诱导与植株快速繁殖[J]. 生物技术,2004,14(02):53.
- [27] 杨 进,钟利华. 香石竹组织培养丛生芽分化的初步研究[J]. 湖北农学院学报,2004,24(01):45-47.
- [28] 卜学贤,陈维伦. 试管植物的玻璃化现象[J]. 植物生理学报,1987(5):13.

(上接第26页)

木,立即剥皮处理,清除害虫的发源地。

(2) 饵木诱杀:在伐除虫害木的基础上,当林分卫生大体良好,有虫株率低于2%时,为了扫除残余个体,可以设置饵木诱杀。方法是,在优势种或先锋种入侵前,采伐少量衰弱树作饵木,在每年6月放置于林下的饵木数量以800 m²放1~2根为宜。待新的子坑道大量出现而幼虫尚未化蛹时,大致在7~8月即应将饵木予以剥皮,歼灭幼虫。在饵木上喷施1%α-萘烯可提高诱杀效果1~2.5倍。

(3) 原木的熏蒸处理:选用0.12 mm厚的农用薄膜,用粘合剂根据原木垛堆大小粘合成相应大小的帐幕,覆盖在木垛堆上,边缘用土压紧。在木垛上方薄膜上开孔,投入磷化铝3 g/m³,密闭熏蒸2~3昼

夜。本法除可歼灭小蠹外,还兼治蛀入木质部的天牛幼虫。

参考文献:

- [1] 蔡邦华. 中国肤小蠹属(*Phloeosinus* Chap.)研究及新种记述(小蠹研究之三)[J]. 动物分类学报,1964,1(1):84-89.
- [2] 范 迪. 柏肤小蠹的初步研究[J]. 森林病虫通讯,1985(2):23-24.
- [3] 苏世友. 杉肤小蠹的危害对杉树年材积生长量影响的研究初报[J]. 森林病虫通讯,1986(2):25-26.
- [4] 祁庆兰. 柏肤小蠹生活史的研究及其防治[J]. 昆虫知识,1987(240):34-190.
- [5] 赵锦年. 杉肤小蠹的初步研究[J]. 林业科学研究,1988,1(2):186-190.
- [6] 苏世友. 杉肤小蠹生物学特征及防治技术的研究[J]. 林业科学,1988,24(2):239-241.