

植物组织培养的应用及存在问题

吴桂容

(贺州学院生化系, 广西 贺州 542800)

摘 要:本文介绍了植物组织培养技术在快速繁殖、植物育种、人工种子、种质保存及次生代谢物生产等方面的应用及取得的进展, 指出植物组织培养中存在的问题并提出了相应的解决方法。

关键词:组织培养; 原生质体融合; 次生代谢物; 玻璃化

中图分类号: Q813.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-9719(2007)03-0119-03

植物组织培养技术又称植物克隆, 是根据植物细胞具有全能性(Totipotency)的原理, 即植物体任何一个细胞都携带着一套发育成完整植株的全部遗传信息, 在离体培养的条件下, 这些信息可以表达并发育成一个与母体同样的植株^[1]。自 1902 年, 德国植物学家 Haberlandt 预言离体的植物细胞具有发育上的全能性, 到 1934 年美国 White 等用番茄根进行离体培养, 首次建立了活跃生长的无性繁殖系, 再到 1958 年, 美国植物学家斯图尔德(F. C. Steward)等人, 用胡萝卜韧皮部的细胞进行培养, 终于得到了完整植株以来, 植物离体培养技术发展很快。特别是 70 年代以后, 植物组织培养已渗透到与之相关的农业、林业、园艺、医药等领域的多个学科, 为这些学科的发展提供了理论基础与研究手段, 同时与其他技术结合创造了巨大的经济效益和社会效益, 在种质保存、挽救珍稀植物、开发利用野生植物资源、创造新物种、生物制药、人工种子研究等方面做出了巨大贡献。

1 植物组织培养技术特点

1.1 繁殖数量多且快速

采用常规的方法, 一棵花卉一年一般只能生产几株或几十株, 但利用组织培养技术则每年可以繁殖出几十万至几百万棵小植株, 这种短时间、高效

率、大规模工厂化生产苗木的产业称为“植物工业”。

1.2 实验条件易控制

组织培养在室内进行, 室内的温度、光照等试验条件容易控制, 且易于重复试验结果, 提高工作效率。

1.3 可连续生产, 生产效率高

常规的无性繁殖受季节限制, 而植物组织培养因条件可控制, 可以全年进行连续生产, 对一些难繁殖的名贵品种花卉及一些短期内大量急需生产的花卉, 应用很广。

2 植物组织培养技术的应用

2.1 植物繁殖

2.1.1 快速无性繁殖

利用组织培养技术对优良品种的花卉、林木、果树、蔬菜进行大量的快速无性繁殖, 实现工业化生产。一个 10m² 的恒温室内, 可繁殖 1 万~50 万株小苗, 可使有价值的、自然繁育慢的植物在短时间和有限的空间内得到大量的繁殖。据统计, 每年全世界的无性繁殖的花卉种苗中, 80% 以上来自于组织培养, 花卉组培苗生产量从 1985 年的 1.3 亿株到 2002 年已超过 10 亿株^[2]。

2.1.2 植物脱毒, 获得无病毒苗

病毒是植物的严重病害, 病毒病的种类不下 500 种, 病毒逐代传递积累, 危害日趋严重, 可导致品种的退化甚至灭绝。目前国内外已通过茎尖培养方法得到了大量马铃薯、苹果、柑橘、葡萄等数百种经济植物的脱病毒苗, 减少或者消除由病毒引起的植物病害。

收稿日期: 2006-12-13

基金项目: 广西教育厅科研面上项目资助。

作者简介: 吴桂容(1970-), 女, 广东陆丰人, 讲师, 主要从事植物组织培养及植物生态方面研究。

2.2 次生代谢物生产

植物中含有数量极为可观的次生代谢物质。次生代谢物种类繁多,一般分为萜类化合物、酚类化合物和含氮化合物三大类。次生代谢物的药用价值很高,目前,世界 75% 人口大量依赖植物次生代谢物作为药物。如三七、人参中的皂甙,红豆杉中的紫杉醇和萝芙木中的生物碱等都是疗效极佳的植物次生代谢物,这些化合物的化学结构复杂,人工不易合成,大多数要从植物中提取获得,然而野生资源和人工栽培难以满足日益增长的需求。利用植物组织(细胞)培养可以生产很多药物。迄今为止,全世界已有大约 500 多种植物建立细胞培养体系,从中分离得到 600 多种次生代谢产物,其中 60 多种化合物在含量上等于或超过原植株^[3]。通过组织(细胞)培养还可以获得新的生物活性物质,如在云香细胞培养中,合成并积累了云香素(rutacultin),这是一种至今尚未能从原植物或其他植物中检测到的呋喃香豆精类化合物^[4]。

2.3 育种

植物组织培养技术为育种提供了许多手段和方法。

2.3.1 单倍体育种 自 1964 年印度 Guha 等首次在诱导毛叶曼陀罗单倍体株成功以来,单倍体育种成为一条新的育种途径。采用花药培养、小孢子培养或未传粉子房培养均可获得单倍体植株。据不完全统计,至 2002 年 5 月,用单倍体作介导已育成的新品种和杂交种达 34 科 88 属 256 种^[5]。其中小麦、玉米、杨树、橡胶、辣椒等 28 种植物的花粉植株在我国首先获得成功。小孢子培养在花药培养基础上发展并具更大的潜力,已在油菜、大麦、玉米和小麦上获得成功。

2.3.2 胚培养和胚乳培养 为了克服远缘杂交的不亲和性、打破种子的休眠和后熟作用,缩短育种周期以及早熟品种育种等困难,可采用胚培养手段进行育种获得三倍体,进而生产无籽果实,如无籽柑橘、苹果、西瓜等;三倍体植株较之于二倍体植物高大、生长速度快、生物产量高,在杨树、桑树、甜菜等以营养体作为收获物的生产上,培育三倍体植株有重要的意义。

2.3.3 原生质体融合 通过原生质体融合不仅能使近缘不亲和种内或种间植物,而且可使远缘不亲和的属间甚至科间植物产生体细胞杂种,使植物能够利用远缘的有用基因,从而培育成人工合成的新物种。孔秀英^[6]等运用合成的硬粒小麦尾状山羊草双二倍体与普通小麦杂交,新合成的双二倍体中成功整合了两者的遗传物质。原生质体融合技术在木本植物育种上有着较好的应用前景,如通过原生质体融合获得的多抗的速生杨树品系,在生产上大

量推广并已产生巨大的经济效益。邓秀新等^[7]通过柑桔体细胞杂交得到抗寒、抗高温和抗病的杂种植株。

2.4 人工种子

体细胞在适宜的条件下可形成胚状体,将之包裹在营养物质并具有保护功能的凝胶胶囊中,就可形成人工种子,人工种子在无菌条件下的萌发率达到 90%。我国已在胡萝卜、黄连、芹菜、苜蓿等数十种植物中获得大量体细胞胚。

2.5 植物种质的保存

以植物细胞、愈伤组织、幼胚、茎尖分生组织、试管苗、花药、花粉、原生质体等的形式保存的种质具有很强的再生能力,将之保存在天然环境或人工创造的适宜环境中,只需要很小的空间即可保存大量的种质,并且植物的遗传特性得以长期稳定保存。

3 植物组织培养中存在问题及解决方法

在这几十年间,植物组织培养技术发展迅速,但是仍然存在一些问题,限制了其大规模应用,主要有以下方面的问题:

3.1 污染现象及对策

在组织培养过程中,如果环境、培养基或外植体灭菌不彻底、操作过程不规范等,微生物则会在培养基中滋生,并使培养物的生长受到影响甚至死亡^[8]。吴林森^[9]在对月季快繁出现的污染物分析,发现主要是由肠杆菌属、棒杆菌、地霉菌、曲霉属、毛霉属、根霉属等细菌和真菌引起感染。

在组织培养过程中严格的无菌操作是降低污染率的关键,选择在植物生长旺盛期采用外植体并进行消毒,并在培养基中加入适量抗生素、杀菌剂^[10]。研究表明^[11],在培养基中添加广谱性杀菌剂,实行开放式组织培养,简化了组织培养环节,并将污染率控制在 10% 以下,能有效的解决杂菌感染的问题。

3.2 褐变现象及对策

外植体在培养过程中切口产生的多酚类物质被氧化成褐色的醌类物质,这就是褐变现象。目前已在许多植物组织培养中发现有褐变现象,尤以木本植物组织培养中褐变严重。褐变现象主要发生在外植体,外植体的部位不同,取材时期不同,褐变程度亦不同,如油棕用幼嫩器官或组织,胚等作外植体进行培养,褐变较轻,而用高度分化的叶片作外植体,接种后很容易褐变^[12]。

选择适当的外植体进行预处理之后,选择适宜的培养基,在黑暗或弱光下进行培养,并在培养基中加入活性碳可以防止细胞褐变的发生和发展^[13];在外植体接种后 1~2 天既转移到新鲜培养基上,使细胞在褐化之前及时转移可以大大减轻或避免褐化。

3.3 玻璃化现象及对策

玻璃化指在组织培养过程中,有些植物的嫩茎、叶片往往会呈现半透明状,水浸状的现象,又称过度水化。玻璃苗的分化能力低下,难以增殖生根成苗,这是一种生理失调症。目前已报道出现玻璃化苗的植物已达 70 多种^[14]。

随着玻璃化产生机理研究的深入,某些植物的玻璃化已得到了有效的控制。主要措施有:(1)选择不宜玻璃化的基因型及部位做外植体;(2)采取改善氧气供应状况和通气条件,控制温度,适当低温处理,降低容器内相对湿度^[15];(3)适当提高蔗糖含量,降低培养基中的水势;减少细胞分裂素及生长素等方法均可减少玻璃苗的发生。

虽然对组织培养中出现的问题的发生、机理及控制进行了一定的研究,但是尚未能找到普遍适用的行之有效的解决办法,成为提高组织培养繁殖率和增加培养过程稳定性的主要障碍。因此对这些问题研究仍需继续深入,以期找到更好的解决办法,使控制措施从治标走向治本,从而使植物组织技术发挥更大的作用。

参 考 文 献:

- [1]潘瑞炽. 植物组织培养[M]. 广州:广东高等教育出版社, 2001.
- [2]阎金玲, 杨春梅. 花卉组织培养研究进展[J]. 西南农业学报, 2004, 17: 351-353.
- [3]刘 涤, 胡之壁. 生物技术在传统药材生产中的应用前景[J]. 生物工程学报, 1997, 17(2): 60-62.
- [4]张以恒, 钟建军, 俞俊棠. 三七悬浮细胞高密度培养生产人参皂甙和多糖[J]. 华东理工大学学报, 1997, (3): 71-74.
- [5]许智宏. 植物生物技术[M]. 上海:上海科学技术出版社: 1998, 37-40.
- [6]孔秀英, 周荣华, 董玉琛. 尾状山羊草与硬粒小麦、普通小麦的杂交及外源染色质检测[J]. 植物学报, 1999, 41(11): 1164-1168.
- [7]邓秀新, 章文才. 柑桔原生质体培养与融合研究[J]. 自然科学进展, 1995, 5(1): 35-41.
- [8]Merel Langens-Gerrits, Marion Albers, Geert-Jan De Klerk. Hot-water treatment before tissue culture reduces initial contamination in *Lilium* and *Acer*[J]. Plant Cell Tissue Org Cult, 1998, 52: 75-77.
- [9]吴林森. 植物组织培养污染问题的研究及其控制措施[J]. 江苏林业科技, 2005, 32(1): 130-134.
- [10]王志成, 刘明稀, 易自力. 杀菌剂防治植物组织培养污染的初步研究[J]. 长沙电力学院学报(自然科学版), 2004, 19(1): 82-84.
- [11]崔 刚, 单文修, 秦旭, 等. 植物开放式组织培养研究初探[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2004, 35(4): 529-533.
- [12]陈正华主编. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京:高等教育出版社, 1986: 466-480.
- [13]李 梅. Medium pH Change and Browning during Chinese Water Chestnut In Vitro Culture[J]. 湖北农学院学报, 1999, 12(2): 55-57.
- [14]陶 铭. 组织培养中畸形胚状体及超度含水态苗的研究[J]. 西北植物学报, 2001, 21(5): 1048-1058.
- [15]A. Piqueras, B. H. Han, J. M. Van Huylenbroeck, P. C. Debergh. Effect of different environmental conditions in vitro on sucrose metabolism and antioxidant enzymatic activities in cultured shoots of *Nicotiana tabacum* L. [J]. Plant Growth Regulation, 1998, 25(1): 5-10.

(责任编辑:莫书荣)

Application and Problem in Experiments on the Culture of Plant Tissue

WU Gui-rong

(Hezhou College, Hezhou, Guangxi, 542800)

Abstract: This article mainly introduces the application of plant tissue culture in the reproducing quickly, crop breeding, preserving genetic materials, producing secondary metabolites. It points out the problems during plant tissue culture and gives some methods to solve these problems.

Keywords: tissue culture; protoplast fusion; secondary metabolite; vitrification;