

[引著格式] 陶阿丽, 曹殿洁, 华芳, 等. 植物组织培养技术研究进展 [J]. 长江大学学报(自科版), 2018, 15 (18): 31~35.

植物组织培养技术研究进展

陶阿丽, 曹殿洁, 华芳, 李胜男, 杨梅兰 (安徽新华学院药学院, 安徽 合肥 230088)

[摘要] 主要就植物组培技术在基因工程、种质资源保存、原生质体培养、单倍体育种、体细胞杂交、选择离体突变体、脱毒等方面的研究进展及对现有难题的解决方案进行了综述, 同时简明地介绍组培技术在工厂化生产、繁殖人工种子(苗木)等方面的运用, 并对植物组织培养技术在植物各应用领域的发展情况进行了展望。

[关键词] 植物; 组织培养; 研究进展

[中图分类号] Q813.1⁺²

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-1409 (2018) 18-0031-05

DOI:10.16772/j.cnki.1673-1409.2018.18.008

植物组织培养 (plant tissue culture) 作为一种新兴技术, 是指在离体条件下, 将植物的离体器官(如植物根尖、茎尖、叶、花、种子等)、组织(如花药组织、皮层等)、细胞(体细胞、生殖细胞等)、胚胎及原生质体在无菌前提下作为外植体在人工创造的合适条件下, 诱发产生愈伤组织或潜伏芽等, 使其长成完整个体的技术, 统称为植物组织培养技术^[1,2]。目前, 植物组织培养技术在植物离体快速繁殖、苗木脱毒、细胞突变体筛选、基因(转基因)育种、遗传资源保存等方面得到了普遍的应用。

1 植物组织培养新技术的应用

国内外学者通过结合环境控制技术与植物组织培养技术的方法, 在提高组培苗生长速度、提高组培苗质量、降低生产成本这几个方面建立了一些新技术和方法。

1.1 开放式组培技术

崔刚等^[3]进行开放式组培的抑菌剂研究, 建立了一套比较完整的植物开放式组培模式, 在地被菊、矮牵牛、金叶连翘、绣球、红掌、蝴蝶兰等多种观赏植物上应用开放式组培技术, 均获得成功。赵青华等^[4]进行魔芋开放式组培研究, 成功解决了有菌环境下魔芋组培的污染问题, 简化了组培环节, 减少了生产成本。何松林等^[5]在有菌环境下进行文心兰组培接种操作, 在培养基中加入了杀菌剂 NaClO, 试管苗在培养过程中未发生污染现象, 可正常生长。陈瑞丹等^[6]对梅花茎段开放式组培进行了初步研究, 并取得一定效果。陈泽斌等^[7]利用蓝莓开放组培探究了抑菌剂在开放式组培中的作用及其应用前景。

1.2 光自养组培技术

采用 CO₂ 气体代替传统培养基中的糖作为碳源给不同种类的组培苗提供适宜的生长条件, 从而使植株能快速繁殖出优质种苗^[8,9]。光自养组培技术目前已经成功应用于半夏、草莓、花椰菜等植物的培养中, 并且获得了很好的成效。李传业等^[10]设计开发了无糖组培微环境控制系统。屈云慧等^[11]研究了虎眼万年青的再生芽无糖培养生根, 结果表明, 在无糖培养的基质上, 常规组培技术中发生污染的几率明显减少, 在一定程度上提高了成苗率。其后无糖组培技术在满天星^[12]、圆叶海棠^[13]、灯盏花^[14]等植物中均取得了较好的效果。

[收稿日期] 2018-03-08

[基金项目] 安徽省教育厅高校优秀青年人才支持计划重点项目 (gxyqZD2016395, gxyqZD2016394); 安徽新华学院校级科研团队项目 (2016td016)。

[作者简介] 陶阿丽 (1983-), 女, 硕士, 副教授, 主要从事基础化学与天然产物开发研究, taoali84@163.com。

1.3 新型光源的应用

侯甲男等^[15]以铁皮石斛原球茎及试管苗为材料, 研究发现采用适当比例的 CCFL 光源的光质配比, 有利于组培苗的光合作用和干物质积累。此外, 新型光源还具有高效、节能、空间高效利用等优点, 在农业和生物领域显示巨大的应用潜力。戴艳娇等^[16]通过研究新型光源辐射的不同光谱对蝴蝶兰组培苗生根和形态、色素含量、叶片碳氮代谢以及叶片酶系活性的影响, 发现单色红光处理的蝴蝶兰组培苗徒长, RBG (红光/蓝光/绿光) 处理组全部生根, 单色蓝光处理的组培苗根系活力最高。除了已进入组培应用期的新型光源 LED 外, 冷阴极荧光灯 (CCLF) 在此方面的应用也正在开发。

2 植物育种方面

2.1 单倍体育种

单倍体育种能够缩短育种年限、节约成本、提高育种效率以及扩展种质资源, 因而成为作物遗传育种的重要手段。将单倍体育种应用于生长周期长的林业生产中效果尤为显著。在杨柳科的杨属中, 花粉诱导愈伤组织的诱导率、绿苗分化率等都可达到较高水平。

目前我国通过花药培养已率先培育出重要农作物、经济作物 40 余种, 其中含水稻新品种近 20 种, 烟草、小麦新品种近 10 种^[17]。刘勇等^[18]利用单倍体技术获得双抗 TMV (烟草花叶病毒) 和 PVY (烟草马铃薯 Y 病毒) 的烟草株系。杨怀卫^[19]从单倍体获取途径、单倍体的加倍方式以及单倍体的诱导因素等方面进一步完善了玉米单倍体育种的研究。通过花药培养选育出了水稻单丰 1 号、花育 1 号、花育 2 号、中花系列粳稻品种、合江 21 号、龙粳系列粳稻品种。国内利用花药培养技术培育出小麦京花系列、甘春 16 号、豫麦系列、花培系列、冀麦 42、杨麦 9 号、陕农 28 号等品种, 并在生产上大面积推广应用。

2.2 胚胎育种

胚培养是指在人工干预的方式下, 在无菌环境中将植物成熟和未成熟胚从种子中剥离, 然后在人工创造的培养基上对植株进行培养, 使其成长为正常植株形态的一种培养方式。目前胚胎发育的机制、消除胚心珠的干扰、克服植物自交与杂交不亲和、突破种子休眠、减短育种周期、建立植物高效再生系统等都是该项技术的主要应用范畴^[20,21]。

目前我国已获得的由植物胚乳培养而来的植物再生植株有 10 余种。贾思齐等^[22]从胚胎离体培养及其在育种中的应用、真假杂种的鉴定与再生植株的加倍 3 个方面综述了目前改良现有芸薹属植物品种的重要手段是通过利用子房离体培养克服远缘杂交受精后胚胎发生障碍, 借此来获得芸薹属较远亲缘关系属、种间杂交的再生植株, 奠定了进一步选育出新的品种的基础。曾瑞香等^[23]以采自牡丹芍药育种基地的杂交牡丹种子为试验材料, 通过不同类型的外植体接种的比较、不同发育时期胚的启动效果比较以及胚培养的培养基和培养条件的选择试验, 为保存和扩繁牡丹杂种种质资源而提供牡丹组培苗的菌根化供试体系, 为牡丹菌根化组培苗培养研究提供有利的理论基础。孙丽娜等^[24]以连农 923 种子为试验材料, 在前人研究的基础上, 通过对比不同外植体对培养效果的影响以及探究不同激素配比对愈伤组织诱导的影响, 获得了最佳接种方式与最佳培养基。

2.3 细胞融合育种

细胞融合育种是通过植物脱细胞壁后仍有活力原生质体的融合, 而能消除植物种属间的远缘杂交不亲和性障碍的一种育种方式^[25]。曹雪等^[26]简述了目前主流的原生质体融合方法, 分别为 PEG-高 Ca^{2+} 高 pH 融合法、电融合法。郑锦荣^[27]通过利用原生质体融合技术尝试培育能在中高温环境下生长出菇的金针菇新菌株和生长周期短的巨大口蘑新菌株。李鸿梅等^[28]以罗尔阿太菌株 AY6657741 为试验材料, 用玉米淀粉和玉米黄浆作为试验培养基, 并采用原生质体融合技术选育出罗尔阿太菌, 其菌株 AY-3 多糖的产量有了明显提高。公维亮等^[29]通过对原生质体制备中甘氨酸浓度、溶菌酶浓度以及溶菌酶酶解时间的考察, 再利用 ARTP 诱变和原生质体融合技术选育出了那西肽高产菌株。

3 植物基因工程方面

3.1 基因转化方面

通过在植物细胞中导入外源基因，待其在植物体内表达并遗传，就能使植物性状发生定向改变，从而增强作物抵抗恶劣环境的能力，改良作物性状^[30]。

在杨树的基因工程育种中，通过导入抗虫基因 Bt 基因、抗病基因（抗病毒基因和抗菌基因）、抗除草剂基因、抗逆基因、降解木质素基因和雄性不育基因等来进行物种的遗传改良^[31,32]。

目前，农杆菌介导和基因枪这 2 种方式是应用于转基因操作的主要途径^[33]，在方法应用过程中，常通过向培养基中添加对植物细胞无毒害作用的抑菌性抗生素这一手段来抑制农杆菌的生长，从而避免细菌过度滋长造成的污染。研究认为，用于基因转化的受体系统应具有 80% 以上的再生频率^[34]。王燕等^[35]通过 pCAMBIA1301-SAL 质粒的构建，并通过根癌农杆菌介导转化为烟草，再利用 RT-PCR 的检测成功获得了 SAL 的转基因烟草，同时为进一步研究苦豆子凝集素基因的功能奠定了基础。曹必好等^[36]将表面消毒的“油青四九”菜心种子播种于 1/2 MS 培养基，取培养了 4d 的无菌苗带柄子叶作为外植体，采用 CTAB 法提取菜心植株 DNA 和 RNA，并利用根癌农杆菌导入法等对菜心进行研究，再通过分子生物学鉴定后发现利用未转化植株与雄性的转基因不育植株杂交获得的后代能分离出 50% 的不育植株，为未来开展菜心优势育种提供了更好的实验数据。吴晓庆等^[37]利用农杆菌介导的遗传转化体系转 ACO 基因，获得了花期延长的石竹材料。

3.2 选育细胞突变体

大量研究资料显示，由于愈伤组织和细胞在培养过程中不断进行分生，受培养条件和外界环境的影响，经常有突变体出现。例如在梁山慈竹的丛生芽诱导方面，NO. 66-2 与 NO. 29 诱导率明显高于梁山慈竹实生植株；较高浓度的 6-BA 和 KT 对 NO. 29 植株丛生芽诱导具有一定促进作用，当 6-BA 浓度为 3.0mg/L，KT 为 0.1mg/L 时 NO. 29 的增殖系数较高^[38,39]。邵秀红等^[40]对三倍体香蕉优良品种 Grand Nain 进行了全基因组重测序及变异分析，并解析了乙烯合成代谢途径基因的变异，以期香蕉贮藏保鲜等相关性状的遗传改良提供理论依据。通过物理、生物或化学方法处理得到的变异基因型为新品种的筛选和培育提供了更多的可选择性。从细胞水平上选择突变体具有选择效率高、节省时间、节约土地、不受自然环境限制等诸多优点。戴林建等^[41]通过对 Li³⁺ 离子束辐照和花药培养结合的方法所筛选出来的黑胫病突变体抗性明显提高并可以稳定遗传。王艳芳等^[42]通过航天搭载番茄种子选育出的突变体有可遗传的无限生长习性。

4 保存种质资源方面

目前仅有约 200 种植物诱导出体细胞胚，模式植物的体胚培养技术比较成熟，如马铃薯的人工培育的种子在各个方面都优于普通种子^[43,44]。

目前，白芨的产量无法满足日益增加的需求，致使白芨的价格越来越高。李伟平等^[45]以萌发后的白芨种子为材料，经过筛选得到了最佳的人工胚乳，利用人工种子技术快速繁殖白芨及幼苗，贮藏时间很长，为长途运输也提供了不少便利。张桂芳等^[46]将铁皮石斛作为原材料进行种子无菌萌发，形成原球茎接种到增殖培养基上，经过筛选得到的原球茎即为包埋体，通过探究人工胚乳中的不同成分产生的影响，最终建立了能有较高萌发率和成苗率的铁皮石斛人工种子的制作方法。汪福源等^[47]研究了繁殖白芨的最佳配方，建立了白芨人工种子繁殖体系。

5 植物体的快繁及脱毒

在植物体快繁方面，Morel 和 Martin 在 20 世纪 50 年代初最先用被病毒感染的大丽花植株的茎尖

分生组织培养出了无病毒植株^[48]。快繁技术在我国得到了一定的开发及应用,已经涉及到观赏植物、蔬菜、果树、药材等三百多种植物。在植物脱毒方面,脱毒后的马铃薯、甘蔗、大蒜、草莓、香蕉等作物的平均产量增加了30%以上。观赏植物经过脱毒后,植株变得生长势强、花色艳丽、花朵增大、产量提高。王新等^[49]通过大量研究与试验表明凤丹牡丹离体快繁技术是建立在基因型选择的基础上,而体系化是凤丹牡丹离体快繁技术的关键。田增胜等^[50]通过探讨油桃茎尖增殖的影响因素,为早熟油桃茎尖快繁体系的建立奠定基础。赵习武等^[51]综述了热处理脱毒、化学疗法、茎尖脱毒、花药培养脱毒等脱毒方法的研究进展,认为其中茎尖脱毒是目前最成熟的一种脱毒方法,而花药培养脱毒的脱毒率是100%,是未来研究的一个新方向。

6 结语

通过组织培养技术可缩短育种时间、减短培育周期,并大大提高作物品质和增强抗病虫害的能力,可由此建立基因库保存种质资源,还可提取用于食品、药品及工业的植物次生代谢产物和用于外来引入物种的安全性检疫等,这些应用前景已引起各界的广泛关注。随着科研工作的不断深入,组织培养技术会日益成熟和完善,在生产中的应用也正朝着工厂化、规模化方向迈进。

[参考文献]

- [1] 张国强, 翟秋喜. 我国植物组培技术的发展及展望 [J]. 安徽农业科学, 2006, (16): 3893~3895.
- [2] 周维燕. 植物细胞工程原理与技术 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 23~38.
- [3] 崔刚, 单文修, 秦旭, 等. 葡萄开放式组织培养外植体系的建立 [J]. 中国农学通报, 2004, (6): 36~38.
- [4] 赵青华, 陈永波, 滕建勋, 等. 开放式组织培养下魔芋快繁技术研究 [J]. 现代农业科技, 2011, (13): 114~115.
- [5] 何松林, 孔德政, 杨秋生, 等. 碳源和有机添加剂对文心兰原球茎增殖的影响 [J]. 河南农业大学学报, 2003, 37 (2): 154~157.
- [6] 陈瑞丹, 孙文薇. 梅花品种淡丰后茎段开放式启动培养的初步研究 [J]. 北京林业大学学报, 2007, 29 (1): 30~34.
- [7] 陈泽斌, 李冰, 高熹, 等. 抑菌剂在蓝莓开放组培中的应用试验研究 [J]. 中国南方果树, 2017, 46 (3): 139~142.
- [8] Gopalakrishnan S, Pakrasi H B, Maranas C D. Elucidation of photoautotrophic carbon flux topology in *Synechocystis* PCC 6803 using genome-scale carbon mapping models [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 15~17.
- [9] Nhut D T, Takamura T, Watanabe H. Efficiency of a novel culture system by using light-emitting diode (LED) on *in vitro* and subsequent growth of micro-propagated banana plantlets [J]. *ISHS Acta Horticulture*, 2003, 616: 121~127.
- [10] 李传业, 滕光辉, 曲英华. 基于 PLC 的无糖组培微环境控制系统 [J]. 中国农业大学学报, 2004, (4): 30~34.
- [11] 屈云慧, 熊丽, 张素芳, 等. 虎眼万年青离体快繁体系及无糖生根培养 [J]. 中南林学院学报, 2003, 23 (5): 56~58.
- [12] 李宗菊, 周应揆, 桂明英, 王玲. 满天星无糖组培快繁技术研究 [J]. 云南大学学报 (自然科学版), 1999, (2): 56~60.
- [13] 管道平, 杨其长, 刘文科, 等. 圆叶海棠无糖培养生根研究 [J]. 果树学报, 2006, (6): 899~902.
- [14] 杨凯, 王荔, 杨艳琼, 等. 灯盏花不定芽无糖生根培养的微环境调控技术研究 [J]. 云南农业大学学报, 2007, (3): 319~322.
- [15] 侯甲男, 王政尚, 文倩, 等. CCFL 光源不同光质比对铁皮石斛原球茎增殖及试管苗生长的影响 [J]. 河南农业科学, 2013, 42 (1): 86~89.
- [16] 戴艳娇, 王琼丽, 张欢, 等. 不同光谱的 LEDs 对蝴蝶兰组培苗生长的影响 [J]. 江苏农业科学, 2010, (5): 227~231.
- [17] 王万奇, 李文龙, 王媛媛, 等. 植物花药组织培养技术的研究 [J]. 黑龙江农业科学, 2015, (10): 177~179.
- [18] 刘勇, 陈学军, 肖炳光, 等. 利用母本来源的单倍体技术获得双抗 TMV 和 PVY 烟草株系 [J]. 中国烟草学报, 2014, 20 (3): 84~88.
- [19] 杨怀卫. 玉米单倍体育种研究 [J]. 种子科技, 2018, 36 (2): 53~54.
- [20] 路平. 浅议植物的组织培养 [J]. 农技服务, 2017, 34 (5): 30.
- [21] 刘岭. 中草药植物细胞工程研究进展 [J]. 中草药, 2002, 33 (12): 1132~1134.
- [22] 贾思齐, 王超. 芸薹属作物远缘杂交子房离体培养的研究进展 [J]. 北方农业学报, 2016, 44 (3): 110~114.
- [23] 曾端香, 袁涛, 王莲英, 等. 两个牡丹杂交系种子胚培养技术研究 [J]. 热带农业科学, 2011, 31 (3): 8~12.
- [24] 孙丽娜, 王淼, 吴春华. 连农 923 菜豆胚培养技术及愈伤组织诱导研究 [J]. 长江蔬菜, 2016, (4): 56~57.
- [25] 张怡田. 浅谈生物细胞工程 [J]. 农家参谋, 2017, (16): 200.
- [26] 曹雪, 戴忠良, 秦文斌, 等. 植物原生质体融合技术的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2016, 32 (25): 84~90.
- [27] 郑锦荣. 金针菇与巨大口蘑原生质体融合育种研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [28] 李鸿梅, 赵慧, 魏明, 等. 原生质体融合选育高产多糖的罗尔阿太菌株 [J]. 华南农业大学学报, 2015, 36 (4): 91~97.

- [29] 公维亮, 薛正莲, 周扬, 等. 原生质体诱变及融合选育那西肽高产菌株 [J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41 (5): 335~339, 381.
- [30] 张洁, 张东旭, 商蕾. 转基因技术在大豆育种上的应用与研究 [J]. 华北农学报, 2008, 23 (增刊): 133~138.
- [31] 朱伟康. 转 Bt 基因欧洲黑杨组织培养再生体系优化及其 TA29-Barnase 基因遗传转化 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [32] 汪文忠. 基因工程在果树上的应用 [J]. 烟台果树, 2014, (3): 5~6.
- [33] 王子逸. 浅谈植物组织培养技术 [J]. 农家参谋, 2017, (16): 203.
- [34] 吴多. 植物组织培养技术在林业生产中的应用 [J]. 民营科技, 2015, (3): 229~229.
- [35] 王燕, 李婷婷, 李阳, 等. 苦豆子凝集素基因植物表达载体的构建及其对烟草的转化 [J]. 新疆农业科学, 2013, 50 (2): 300~306.
- [36] 曹必好, 孟成民, 雷建军, 等. TA29-barnase 基因转化菜心 [J]. 生物工程学报, 2008, (5): 881~886.
- [37] 吴晓庆, 谭华山, 张静静, 等. 根瘤农杆菌介导 ACO 基因转化延长石竹花期的研究 [J]. 华中农业大学学报, 2015, 34 (6): 21~26.
- [38] 臧忠婧, 杨凤军, 蒲子钢. 体细胞突变体的筛选在作物育种中的应用 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2005, (4): 17~21.
- [39] 黄艳, 廖倩. 梁山慈竹及其体细胞突变体组织快繁技术研究 [J]. 林业科技通讯, 2016, (8): 3~5.
- [40] 邵秀红, 胡春华, 盛鸥, 等. 三倍体香蕉优良品种 'Grand Nain' 全基因组变异挖掘 [J]. 植物生理学报, 2018, 54 (4): 581~593.
- [41] 戴林建, 陈武, 周田, 等. 利用花药培养选育烤烟抗黑胥病突变体 [J]. 作物杂志, 2018, (1): 66~70, 175.
- [42] 王艳芳, 郑积荣, 王世恒, 等. 航天诱变番茄无限生长突变体的选育及生物学特性研究 [J]. 航天医学与医学工程, 2006, (2): 111~115.
- [43] 祝剑峰. 植物组织培养在育种中的应用 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42 (35): 12415~12417.
- [44] 李永军. 马铃薯种子培育技术的研究 [J]. 农业与技术, 2018, 38 (4): 59.
- [46] 沈海龙. 植物组织培养 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2005.
- [45] 李伟平, 田莎莎, 鲁光耀, 等. 利用人工种子技术快速繁殖白及 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (22): 3386~3390.
- [46] 张桂芳, 黄松, 刘宏源, 等. 铁皮石斛人工种子制作及影响因素研究 [J]. 中草药, 2011, 42 (9): 1812~1816.
- [47] 汪福源, 唐宁, 贲爱玲. 白术人工种子制作技术研究 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40 (2): 731~732, 735.
- [48] 王昱淇. 植物组织培养中存在的问题及其预防措施 [J]. 南方农业, 2014, 8 (12): 134~142.
- [49] 王新, 成仿云, 钟原, 等. 凤丹牡丹鳞芽离体培养与快繁技术 [J]. 林业科学, 2016, 52 (5): 101~110.
- [50] 田增胜, 韩明玉, 张满让, 等. 影响早熟油桃茎尖培养增殖效率的因素 [J]. 果树学报, 2005, (3): 279~282.
- [51] 赵习武, 王晨静, 杨丹丹, 等. 园艺植物脱毒技术方法研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41 (16): 7074~7076.

[编辑] 余文斌