

甘薯细胞工程及应用

陈明灿^{1,2} 覃德华¹ 李友军¹ 孔祥生¹

(1 河南科技大学 河南洛阳 471003 2 浙江大学农业与生物技术学院 浙江杭州 310029)

摘要 甘薯细胞工程主要有体细胞胚发生、原生质培养、细胞悬浮培养、茎尖分生组织培养等。甘薯细胞工程与组织培养在人工种子生产、种质资源创新、新品种选育和脱毒苗工厂化生产等方面具有广阔的应用前景。

关键词 甘薯 细胞工程 组织培养 种质创新 脱毒苗

中国图书分类号:Q343 文献标识码:B

甘薯(*Ipomoea batatas*)系旋花科、甘薯属的1年生植物,原产于以墨西哥为中心的美洲地区,16世纪中、后期传入我国,至今已有400多年的栽培历史。我国每年种植甘薯约660万hm²,占世界甘薯种植面积的80%以上,是世界上最大的甘薯生产国。近年来,随着生物技术的迅速发展,国内外学者在甘薯细胞工程和组织培养方面进行了系统的研究,尤其在甘薯种质创新和病毒病的有效防治方面显现出广阔的应用前景。

1 甘薯体细胞胚发生与人工种子

植物组织培养从不同组织、器官以及悬浮培养的细胞和原生质体都可以形成类似合子胚的结构,但它们与合子胚起源不同,因此称为不定胚或胚状体(embryoid),由体细胞发生的胚状体称为体细胞胚(somatic embryo, SE)。胚状体的诱导为优良种质的无性繁殖、人工种子研制、单倍体育种、品种改良、植物转基因和突变体筛选等提供了材料,具有重要的实践意义。胚状体的发生主要受植物基因型、外植体来源、培养物生理状况以及培养基中外源激素的影响。研究表明,甘薯的体胚发生比较困难,而且不同品种间差异较大。Jarret等(1984)用9个甘薯品种进行体胚发生研究,结果只有6个品种能产生胚性愈伤组织;刘庆昌等(1993)利用港17、栗子香等8个品种对甘薯体细胞胚胎发生进行了研究,结果有7个品种的体细胞胚发育成植株;辛淑英等(1994)研究了10个甘薯品种的体细胞胚胎发生,结果有8个品种有体细胞胚出现,其中徐薯18和广薯70-9的发生频率较高。甘薯体细胞胚胎发生通常分2步进行,先将消毒过的甘薯茎尖分生组织在含有一定浓度生长素的MS培养基中培养,产生胚性细胞团,然后将胚性细胞团转移到生长素含量较低或不含生长素的培养基中培养,使其发育为成熟的体细胞胚。从甘薯体胚发生结果看,甘薯进行活跃细胞分裂的部位,如茎生长点的分生组织则更容易实现体细胞胚胎发生。外源激素是影响体细胞胚发生的关键因素,最常用的外源激素是添加不同浓度的2,4-D,不同品种有各自不同的最适浓度,大致范围在0.5~3.0 mg/L,也有报道细胞分裂素对甘薯体胚发生有促进

作用(Chee 1989;Desamero 1994等)。

Murashige等于1978年提出了人工种子的概念,人工种子是指将细胞培养中形成的体细胞胚包裹在能提供养分的胶囊里形成球状结构,然后在胶囊的外面包裹上一层具有保护功能的外膜,形成一种类似天然种子的结构。甘薯体细胞胚发生系统的建立和完善为甘薯人工种子的生产提供了可能。汤绍虎(1994)、王钰(2002)、郭小丁(2006)等进行了甘薯人工种子的研制,其制作方法是用体细胞胚胎或2~3 mm带腋芽的甘薯组培苗茎段,将其放入4%的海藻酸钠(溶液为MS培养基加3%的蔗糖)基质中,然后将包裹基质的体细胞胚胎或组培苗茎段逐滴(逐段)放入2%的CaCl₂溶液中,经10~15 min的离子交换形成白色、半透明且具有一定硬度的球形人工种子。甘薯人工种子在灭菌培养基中萌发率可达60%,但在营养土上的萌发率很低。因此,甘薯人工种子要应用于大田生产,仍需解决其萌发率低的问题。

2 甘薯原生质体培养与体细胞杂交

1960年Cocking采用酶法分离原生质体获得成功,开创了植物原生质体培养和细胞杂交的新领域。植物原生质体及其衍生系统不仅是探索生命活动理论研究的良好体系,而且还可以对其进行细胞操作和遗传操作,从而改良作物的性状,在甘薯种质资源创新方面有巨大的应用潜力。甘薯原生质体培养的基本程序是在无菌条件下将甘薯茎、叶等供试材料放入混合酶液中,保温6~8 h,在倒置显微镜下观察大多数细胞已经脱去细胞壁成为游离原生质体时停止酶解,然后收集包含原生质体的酶液用不锈钢筛滤去细胞残渣,将原生质体悬浮液低速离心至管底,除去上清液后用高浓度蔗糖或甘露醇溶液重新悬浮原生质体,用吸管吸出原生质体稀释于培养液中,取少量悬浮液测定原生质密度,然后调整原生质体到合适密度即可在培养基中培养。

甘薯属同源6倍体自交和杂交不亲和性植物,这严重限制了甘薯杂交育种中遗传资源的利用和亲本的选配,通过原生质体融合实现体细胞杂交,是克服甘薯杂交不亲和的有效途径。刘庆昌等(1998)用甘薯

胚性细胞悬浮培养系进行原生质体分离,然后进行体细胞杂交,从徐薯 18+*I. triloba*、高系 14+*I. triloba*、栗子香+*I. cairica* 等近 20 个杂交不亲和组合获得了种间、种内的体细胞杂交植株,这些植株育性正常,能同甘薯进一步杂交成功,并且从这些杂种中筛选出了具有良好结薯性的中间体杂种 KK14-121 和 XK18-61 等,创新了甘薯种质资源,为甘薯新品种选育提供了新的途径。

3 甘薯细胞悬浮培养与突变体筛选

细胞悬浮培养是指细胞或细胞聚集体在液体培养基中进行悬浮培养,培养物可以接种在培养瓶中在摇床上培养,也可以在生物反应器中进行大规模培养。甘薯细胞悬浮培养系的建立可先由茎尖或叶片等组织诱导得到胚性愈伤组织,然后将胚性愈伤组织在添加 1~2 mg/L 2,4-D 的液体培养基中进行振荡培养。刘庆昌等(1997)用甘薯品种栗子香、高系 14 号等诱导得到胚性愈伤组织,振荡培养建立了增殖迅速、分散程度良好的胚性细胞悬浮培养系,并认为悬浮培养 24~28 周的细胞团是甘薯生物工程的最适供体。陈克贵等(1999)研究了悬浮培养中甘薯细胞的生长特性及其影响因素,结果表明悬浮培养中的细胞生长曲线均呈“S”型,悬浮培养的最佳 2,4-D 浓度不同品种间有差异,南薯 88 为 1.0 mg/L,8 129-4 为 2.5 mg/L,最佳蔗糖浓度南薯 88 为 30 g/L,8 129-4 为 15 g/L,椰乳和酵母汁能明显促进南薯 88 的生长,但椰乳对 8 129-4 无效,谷氨酰胺、色氨酸和脯氨酸对甘薯悬浮细胞的生长无促进作用,葡萄糖则抑制其生长。

诱变育种是甘薯育种的重要途径之一,但传统的诱变育种局限于个体或器官水平,突变率低,选择群体大,育种年限长。用单个细胞做诱变材料,通过适量的 γ 射线或离子束照射甘薯的胚性细胞,能显著提高突变率,且可得到单细胞的同质突变体,经细胞培养和植株再生使变异在短时间内得到稳定,大大缩短育种年限。此外,在细胞悬浮培养过程中,常常会出现自发变异,通过对这些突变体进行筛选,也可用于甘薯新品种选育。王玉萍等(2005)以甘薯品种栗子香为材料,用 0~100 Gy $^{12}\text{C}^{5+}$ 和 0~200 Gy $^4\text{He}^{2+}$ 离子束分别照射其胚性悬浮细胞团,经细胞胚胎发生途径获得大量再生植株。将获得的再生植株移栽到大田,对其生物学性状进行分析,发现离子束辐照后代发生了广泛的性状变异,已获得了一批叶形、薯皮色等的突变体。李爱贤等(2002)以甘薯品种栗子香的胚性悬浮细胞为材料,用 PEG6 000 和 NaCl 分别作离体筛选抗旱、耐盐突变体的选择剂,经细胞培养和植株再生已得到了一批抗旱、耐盐新材料。

4 甘薯茎尖分生组织培养与脱毒快繁

据报道,在美洲和非洲地区,病毒病造成的甘薯减产达 20%~57%。中国农科院植保所曾报道,因病毒

危害,春薯减产 14%、夏薯减产 19.2%,病重的可减产 40%以上。能够侵染甘薯的病毒和类病毒有近 20 种。由于甘薯属无性繁殖作物,病毒能够在植株体内不断增殖积累并代代相传,使甘薯病毒病的危害逐年加重,但目前还没有培育出高抗病毒病的实用甘薯品种,也没有防治甘薯病毒病的有效药剂。根据病毒在植物体内不均匀分布的特性,利用甘薯茎尖病毒含量低或不带病毒的特点,通过茎尖分生组织培养可以生产甘薯无毒苗。甘薯茎尖分生组织培养脱毒苗的方法是取甘薯茎顶端 3~5 cm 长的芽段,剪去较大的叶片,采用 2% 次氯酸钠溶液消毒 5~10 min,表面消毒后用无菌水冲洗 3~4 次,在解剖镜下切取 0.3~0.5 mm 长的茎尖分生组织(带 1~2 个叶原基),在附加 6-BA 2.22 $\mu\text{mol/L}$ 、IAA 0.57 $\mu\text{mol/L}$ 和 GA 30.29 $\mu\text{mol/L}$ 的 MS 培养基中,于 25~28℃,光照时间 14 h/d,光照强度 35 $\mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$ 的条件下培养,当茎尖分生组织长至 3 mm 左右,将其转至 MS 培养基上培养成苗。多数研究表明,添加激素的种类和浓度为:6-BA 0.5~4.0 mg/L,IAA 0.2~2.0 mg/L, NAA 0.01~2.0 mg/L,GA₃ 1.0 mg/L,KT 0.1~2.0 mg/L。有些培养基可使甘薯茎尖分生组织直接成苗,但有些需转移至无激素的 MS 或 1/2MS 中才能培养成苗,成苗率的高低与品种基因型、操作熟练程度和剥取茎尖分生组织的大小有关。当培养苗长到 3~5 cm 时,去掉试管塞,炼苗 5~7 d,然后移栽至含蛭石的灭菌土中,置 28℃左右的防虫隔离室保湿培养,约 1 周后移到装有无菌土的小钵中,待苗长到具有 5~6 节时即可进行病毒检测。经检测确认为不带病毒的组培苗可取其茎段进行快繁或移植于有防虫网的大田进行甘薯原原种生产。目前已有徐薯 18、北京 553、豫薯 7 号、豫薯 8 号等多个甘薯品种的脱毒苗在生产上得到应用。

5 结语

甘薯属无性繁殖作物,同时又是同源 6 倍体自交和杂交不亲和性植物。这使甘薯生产和育种存在诸多常规方法难以解决的问题:1)繁苗用种量大,成本高;2)容易感染病毒,产量品质下降;3)杂交育种亲本自由组配难;4)诱变育种变异率低,育种年限长。随着生物技术的发展以及细胞工程在甘薯上的应用,甘薯生产中存在的诸多问题已找到有效的解决途径。当前,在甘薯人工种子研制、种质资源创新、新品种培育和病毒病的有效防治方面已呈现出美好的应用前景。

主要参考文献

- 1 刘庆昌,罗建钦,周海鹰等.甘薯高频率体细胞胚胎发生及植株再生.农业生物技术学报,1993,1(1):84—89.
- 2 孔祥生,张妙霞,郭秀璞等.甘薯茎尖分生组织培养快速繁殖技术研究.河南农业大学学报,1998,32(2):133—137.
- 3 辛淑英.甘薯体细胞胚胎发生.中国甘薯,1994(7):183—186.

我国的观赏蕨类资源及其开发利用

曾汉元 (怀化学院生物工程系 湖南怀化 418008)

摘要 我国约有蕨类植物 2 600 种,其中观赏价值较高的种类有数百种,按照观赏用途可分为园林绿化、室内盆栽、切花配叶、点缀盆景假山、吊篮栽培和制作干花或观赏标本等 6 类。观赏蕨类的绿化和美化效果好,耐荫性强,市场开发潜力大。综述了我国观赏蕨类的研究和应用现状、主要种类、园林用途和繁殖方法,并就我国观赏蕨类的开发利用提出了几点建议。

关键词 观赏蕨类 园林应用 中国

中国图书分类号:Q949-36 文献标识码:A

在欧美和日本等国家,观赏蕨类早已成为重要的观叶植物,在园林绿化和居室美化中得到了广泛的应用。蕨类之美在于:叶形的变幻、脉序的精致、孢子囊群的组合排列、独特的造型、高雅飘逸的姿态、碧绿青翠的叶色、根状茎上鳞片的多样化;蕨类植物保持了大自然的健康美。

我国是世界上蕨类植物最丰富的国家之一,约有 2 600 种,占全世界的 1/5 强,其中具有较高观赏价值的种类有数百种,但目前得到较好应用的不过几十种,这与蕨类资源大国的地位极不相称。因此,我国开发利用观赏蕨类资源不仅潜力巨大,而且也是极有意义的工作。

1 我国蕨类植物分布概况

我国的蕨类植物主要分布在西南和长江流域以南地区,云南省拥有蕨类约 1 400 种,四川、贵州、广西、湖南、福建、台湾、浙江、江西和广东等省各有蕨类植物 500~800 种。随着纬度的北移,蕨类植物种类逐渐减少,华北各省蕨类总数不逾 200 种,西北地区除了陕西和甘肃 2 省的南部由于邻接华中和西南,蕨类资源较为丰富外,其余地区的蕨类亦相当贫乏,东北地区由于气候寒冷,种类更为稀少,如吉林省仅有 23 种。(崔艳等,2006)从植被地理来看,我国的蕨类主要分布在森林植被地区,尤其是热带(季)雨林和常绿阔叶林地区,夏绿阔叶林地区产有一定数量的蕨类,但多数种类是与南方地区所共有的,干旱半干旱地区、高寒地区的种类多样性和资源贮量都很低,但有一些特有种,如吉林省的对开蕨(*Phyllitis scolopendrium*)、甘肃省的甘肃骨牌蕨(*Iepidogrammitis kanuensis*)、新疆的欧

亚多足蕨(*Polypodium vulgare*)。

2 我国观赏蕨类研究与开发利用现状

2.1 观赏蕨类资源调查、引种栽培和繁殖研究 在 20 世纪 90 年代以前,我国蕨类植物的研究工作主要侧重于系统分类和蕨类植物志的编写方面。90 年代初期,原中国花卉协会蕨类植物分会会长张朝芳教授以及其他几位蕨类植物学家率先从事观赏蕨类的开发利用研究,北京植物所、云南植物所、华南植物园、贵州植物园、北京植物园、杭州铁路林场等单位开展了观赏蕨类引种栽培和繁殖研究,至今,已经筛选出多种优美的观赏蕨类,出版了一系列观赏蕨类繁殖与栽培管理方面的专著,发表了数十篇相关论文,例如:《观赏蕨类》(石雷,2002,曾宋君等,2002)、《中国云南蕨类植物(图谱)》、《广西观赏蕨类植物资源与引种研究》和《观赏蕨类的栽培与用途》等专著,图文并茂,分别介绍了我国不同地域的观赏蕨类的引种栽培、繁殖和日常管理的基本方法及观赏价值,这些著作所涉及的种类涵盖了我国主要的观赏蕨类资源,所推介的观赏蕨类总数在 600 种以上。

2.2 目前已经在我国实现商品化的观赏蕨类 我国观赏蕨类的开发起步晚,目前较为广泛利用的仅 30 余种(含变种),如:肾蕨(*Nephrolepis auriculata*)、波士顿蕨(*N. exaltata* var. *bostoniensis*)、垂穗石松(*Palhinhaea cernua*)、翠云草(*Selaginella uncinata*)、里白(*Diplopterygium glaucum*)、荚果蕨(*Matteuccia struthiopteris*)、榭蕨(*Drynaria roosii*)、福建观音座莲(*Angiopteris fokiensis*)、乌毛蕨(*Blechnum orientale*)、巢蕨(*Neottopteris nidus*)、铁线蕨(*Adiantum capillusveneris*)、白羽凤尾蕨(*Pteris ensi-*

4 刘庆昌,米凯霞,鲁迪慧等.甘薯胚性细胞悬浮培养系的建立.作物学报,1997,23(1):22-26.

5 汤绍虎,孙敏,李坤培等.甘薯人工种子研究.作物学报,1994,20(6):746-750.

6 郭小丁,张允刚.甘薯人工种子初探.江苏农业学报,2006,22(1):93-94.

7 李爱贤,刘庆昌,翟红等.甘薯耐旱、耐盐突变体的离体筛选.农业生物技术学报,2002 10(1):15-19.

8 陈克贵,张义正.甘薯细胞悬浮培养的建立及其生长研究.应用与环境生物学报,1999,5(3):275-278.

9 王玉萍,刘庆昌,翟红.离子束对甘薯胚性悬浮细胞团的辐射诱变效应.作物学报,2005,31(4):519-522.

10 崔红,陈睦传.甘薯生物技术研究进展.植物学通报,1999,16(6):653-657.

(E-mail:cmcan@126.com)