

组织培养在林业中的应用

李怀仓

(陕西省林业厅,陕西西安 710082)

摘要:本文综述了组织培养在林木种质资源保存、杂交育种、单倍体育种、诱变育种与抗性育种、良种繁育等方面的应用现状,展望了组织培养在林业中的广阔应用前景,并分析讨论了组织培养过程中存在的主要问题。

关键词:组织培养;林业;现状与问题

中图分类号:S722.3+7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-2117(2006)03-0033-05

The Application of Tissue Culture in Forestry

LI Huai-cang

(Forestry Department of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710082, China)

Abstract: This paper summarized the application of tissue culture in the conservation of germplasm resources, hybridization, haploid breeding, inducement breeding, resistant breeding as well as the fine strains reproduction of forest tree. The prospect of the application of the tissue culture in forestry was described.

Key word: Tissue culture; forestry; status and problems

将植物的器官、组织或细胞从植株上取下,在无菌条件下进行培养称为植物离体培养(in vitro culture),也称为组织培养(tissue culture)。植物组织培养的历史可以追溯到上个世纪末和本世纪初,近30年,组织培养得到了蓬勃发展。

组织培养技术在科学研究和生产上开辟了令人振奋的多个领域,成为生物技术的一个奇葩,并逐步走向成熟,推动了植物的快繁、无病毒苗的培育,加速了育种进程以及次生代谢产物生产,在种质资源的保存和创新等方面也取得了非凡的成绩。组织培养广泛的用于林业实践中,必将给林业带来无限生机。

1 林木种质资源保存

由于大多数种质资源并不处于直接利用的状态,因此保存这些资源,需耗费许多财力和土地。植物微小茎尖、组织以及单个细胞再生植株可能

性,促使研究者们进行离体储存种质资源的研究^[6]。目前国内外用组织培养技术作为保存种质资源的一种有效手段,对植物种质资源的收集、扩增、保存起到了很大的作用。使组织培养室成为基因资源(再生材料、胚性细胞)保存(低温、超低温)的场所。保存的基因资源有花粉、种子、胚、胚轴、体胚、芽和茎尖等,这些基因资源可在0~15℃低温及液氮超低温中进行储存。据统计已有10多个属的10多个种林木花粉,30个属共40多个种的木本植物的种子、胚、胚轴或体胚,10多个属20多个种的木本植物芽或茎尖悬浮细胞和愈伤组织进行了超低温保存的研究^[2]。如Ahuja对山杨无性系休眠芽枝超低温(0~80℃)保存后仍能进行组织培养^[3];Tisserat将椰枣树胚性愈伤组织置于-196℃的液氮中低温处理,保存3个月后仍具有再生植株能力^[4];Jorgensen.j.采用逐渐降温途径,将山毛榉,栎类和欧洲七叶树球形胚在液氮中

收稿日期:2006-04-25

作者简介:李怀仓(1962-),男,陕西渭南人,高级工程师,主要从事林业职业高等教育教学与管理工作。

储藏 4~6 周,解冻后,接种在培养基上,胚状体恢复了正常生长,并再生形成了植株^[5]。

离体材料保存为优良和珍稀植物种质资源的保存提供了极为有效的手段,可以在很小的空间内保存大量的基因型,使材料免受病原菌危害和自然灾害,保持遗传特性,防止变异;又具有形态发生潜力,是种质资源保存的新趋势,给抢救和保存有用基因创造条件,是国际间种质交换的有意义的工具。以离体培养为中心的保存技术在林木种质资源保存和交换方面将发挥越来越大的作用。

2 原生质体培养及细胞融合

自 1960 年 Cocking^[5]用酶法进行高等植物原生质体分离后,开创了林木原生质分离、培养和细胞杂交新时期。1972 年 Rona 首次报道对假挪威槭(*acer pseudoplatanus*)原生质体分离获得成功,继而陆续对针叶树原生质体进行分离,均未获得再生植株。Rao (1985)进行了檀香(*santalum album*)原生质体培养获得了再生植株^[7]。Russell 等(1986)用银白杨和大齿杨杂种叶肉原生质体培养获得了再生^[8]。随着培养方法的改进,从 1987 年开始,相继对北美鹅掌楸^[9],欧洲黑杨鼬毛果杨,欧洲山杨^[10],毛白杨^[11],悬铃木^[12],白桦泡桐^[1],桑树^[16],小叶杨^[17],中华猕猴桃^[18]等树种进行原生质体培养并获得了再生植株。

原生质体培养为细胞杂交以及各种遗传操作创造了良好条件,无壁的原生质体之间在诱导条件下发生融合形成杂种,克服了有性杂交配子间的不亲和性、子代不育等常规育种中,远缘杂交难以克服的障碍或转移母性遗传特性,通过原生质体融合可以获得二倍体、非整倍体以及多倍体杂种和一些有性生殖障碍的植物种类体细胞杂种。日本最先成功地进行了木本植物原生质体融合,日本的 Saita(1980)已将台湾桐和欧美杨的原生质体融合在一起。1984 年西德的 Shuga 将欧洲山杨和美洲山杨、欧洲山杨和欧洲山毛榉原生质体融合在一起,但未见融合后诱导成植株的报道^[8],1985 年日本农林水产省果树实验场和 Kikkoman 酿造工业公司合作采用柑桔的珠心愈伤组织和枸桔的叶肉细胞进行原生质体融合进而培养分化出杂种植株,随后在柑桔属其他种间的体细胞杂交上也取得成功^[3]。此后日、美、德等对杨树种间、杨树与泡桐、杨树与山毛榉等树种的原生质体融合

实验,部分获得了杂种植株。美国利用榆树花粉与中国野生榆树的子叶细胞进行融合,培育出具有 56 条染色体的新个体,具有抗病、速生、材质优良等特性^[19]。最近,南京林业大学报道,成功进行了美洲黑杨与胡杨、美洲黑杨与青杨的原生质体融合和细胞杂交^[19]。

原生质体培养和体细胞杂交的不断发展,扩大了亲本杂交的组合范围,丰富了现有种质资源。此外无壁的原生质体可以容易的接受外来信息,如外源的细胞核、染色体、细胞器及外源 DNA 片段,作为外源基因导入的受体系统,因此在原生质体培养基础上进行的各种遗传操作作为现有种质资源创新提供了新的途径,对加速林木育种进程有十分重要的意义。

3 胚培养

胚胎培养工作起步较早,最早进行胚培养的树种是欧洲赤松(1924),随后有松树成熟胚培养^[20],李继桐(1934)就成功的培养了银杏的离体胚,发现银杏胚乳提取物对胚的生长具有促进作用。罗士苇等(1943)成功地进行了云南油杉和铁杉的幼胚培养研究^[21],Stone duffield(1950)为了培育抗锈病杂种,采用五针松的糖松和华山松,糖松和红松的组合,胚培养获得了杂种^[22],庄恩等(1974)利用桃胚培养技术克服了杂种胚不育的问题,培育出特早熟的白桃新品种^[23],Hu wang(1986)用番木瓜的组合胚培养获得了杂种^[22]。黄钦才利用泡桐杂合体未成熟胚进行离体培养诱导出再生植株,这一成果对克服泡桐远缘杂种不育提供了一种手段^[24]。与此同时创造了多种胚胎培养技术如子房培养及其试管受精、胚珠培养等。李文钿(1985)用亲缘关系很远的小叶杨与胡杨杂交,将含有未成熟胚珠进行离体培养并获得了完整植株,并成功地移入土壤^[25],Ling 等利用成熟果实中未受精败育的胚珠,诱导出温州蜜柑 14 个基因型的愈伤组织,此后在葡萄、猕猴桃、山楂、柑桔、栗、可可、马铃薯、杨树、杂种杨、核桃、栎属、山毛榉等植物种中,广泛开展了胚胎培养研究,获得了多种远缘杂种植株,培育出了一批新品种。国内外已广泛应用单个胚培养,进行珍贵杂交树种如果树(酸樱、欧洲甜樱桃、桃、柿、橘)和用材林(栎、松、欧洲山杨、云杉)的工业化繁殖,如加拿大(安大略)每年以 0.6 亿株在无菌条件下从单胚培育的黑云杉苗用于造林^[26]。

离体胚是组织培养中最早获得成功的器官,它在远缘杂交育种中的地位举足轻重,是大量繁殖杂种后代,扩大杂种群体的有效途径。胚培养在果树育种中具有重要意义,桃、李的胚在其完全发育之前停止生长,通过胚培养可以使胚完全发育萌发长成植株;在柑橘类树种中,通过珠心胚培养,可以排除它对合子胚发育的干扰,迅速获得无病毒苗木及纯合突变性状的系统。胚早期停止发育,分离幼胚困难,利用胚珠培养可以获得完全成熟的种子。胚培养已被广泛的用于林木育种中。

4 单倍体育种

单倍体诱导研究从1953年开始,Tulecke以银杏的花药为材料获得愈伤组织后^[27],世界各国对不同树种进行了研究。在单倍体培养方面我国处于世界先进水平,20世纪70年代中期,我国进入单倍体培养的高潮时期,在树木方面,最先获得成功的是黑杨,此后诱导出杨属10多个种和变种以及枸杞、三叶橡胶、楸、欧洲七叶树、桑树、荔枝、苹果、葡萄等20多种花粉植株^[3],并已初选出一些优良的杨树、橡胶等花粉植株品系^[28],并且有葡萄、苹果属的两个种的花粉植株已移栽成活。可以预期今后木本植物花粉植株诱导将会取得更显著进展^[29~31]。

单倍体育种作为一种崭新的育种手段,大大缩短了林木育种周期。用花药培养可以快速从杂合树体获得纯系,使一些多年生木本植物也能利用杂种优势,这将对某些树种现有繁殖方法进行改革;单倍体植株没有显性遮盖隐性问题,隐性性状当代即可表现,大大缩短育种年限,提高选择效率;利用获得的单倍体或纯合二倍体材料,可以研究染色体间部分同源性和各种性状的基因控制,为林木育种提供坚实的理论依据,从而更有效地进行育种工作;单倍体只有一套基因组,在遗传性状表现上不存在显隐性关系,因此单倍体培养与诱变育种结合可以提高育种效率;也可利用单倍体产生的原生质体进行融合,产生可育的二倍体细胞杂种,克服远缘杂交障碍;同一来源的花粉植株变异范围远远大于无性系和家系材料,可以从中选择有用的遗传变异加以利用。随着单倍体培养技术进一步完善,单倍体育种在林木育种中将发挥越来越大的作用。

5 林木种质资源创新

组织培养应用于种质资源创新是其在林木育

种中的另一重要方面。以细胞培养物为操作对象进行突变体筛选,在育种工作中具有重要价值,可以进行林木抗病、抗除草剂、抗盐碱、抗旱、抗寒、抗线虫、抗毒性离子、抗辐射、提高氨基酸含量等抗性育种及诱变育种的研究。用细胞代替植株进行筛选,可利用时间和空间优势,提供有效的选择技术和大量的筛选方法,获得的新的遗传变异是常规育种无法实现的。1986年美国东北部林业实验站的M. E. ostry教授利用体细胞无性系变异,成功地筛选出了杨树抗病害的新无性系^[32],1987年加拿大国家林业研究所W. M. cheliak利用体细胞变异体成功地进行了杨树抗除草剂的筛选^[33],张绮纹(1993,1995)以群众杨39为材料首次在林木中建立悬浮细胞系,利用逐步加大培养基中NaCl浓度的方法获得耐盐细胞系,定向培养耐盐变异体,至1997年经有盐、无盐的四代培养已形成群众杨、加拿大杨两个种12个无性系800多植株,为杨树耐盐育种开辟了一条途径^[34]。借助细胞和组织培养产生体细胞无性系变异,进行诱变育种可以增大变异率,加大选择压后人们可以控制选择具有新的遗传性状的个体,这是有发展前途的育种方向,为林木遗传改良提供了重要的选择来源。组织培养出现的各种变异体是林木抗性育种的宝贵材料来源。

6 林木良种繁育

6.1 脱毒复壮

林木经多代无性繁殖后,体内会逐渐累积病原体,严重时会导致病害发生,即使一些隐性病原体也会影响林木生长和发育。由于茎尖分生组织在其分化维管束之前,还未被母体病毒传染,因此是不带毒的。通常采用0.1~0.2mm茎尖分生组织进行培养脱去病毒^[23],这一技术在杨树、泡桐、苹果、柑桔茎尖培养脱毒中取得成功,有效地改善了林木品系的生长和品质。Berbee曾报道脱毒的杂种杨生长量是对照的两倍^[28],Jonard(1986)报道了西方一些科学家在柠檬、桃树、橡胶等方面做了无菌苗繁殖^[35,36]。在果树中通常采用微型嫁接脱毒,如将甜橙茎尖嫁接到橙砧木上,获得了无病毒植株^[37],在树木中获得的加拿大杨无病毒植株与未去除病毒的植株相比,其生长率大一倍^[38]。良种壮苗是造林获得成功的基础,随着无性系林业的发展以及种质资源交换的进行,脱毒苗越来越受到人们的重视。

6.2 快速繁殖

组培快繁以其繁殖系数大、成苗速度快和不易受外界环境影响而广泛用于植物的良种繁育中。我国稀有珍贵树种大别山五针松现存采种母树仅有 30 多株,其子叶和下胚轴离体培养试管苗的成功,为这一珍惜树种的保护和扩大繁殖提供了新途径;繁殖杂交育种中 F_1 代数数量少的品种,如银白杨和新疆杨杂种萌动条和茎尖的诱导成苗,迅速扩大了杂种群体,加速了这些优良无性系的繁育;组培对扩繁常规方法,繁殖周期长和繁殖困难的树种,具有很大的优越性,如钻天柳无性繁殖困难,扦插不易成活,采种育苗难度大,用芽和茎段诱导植株解决了树种繁殖问题。此外银杏、板栗、火力楠等树种试管苗诱导的成功也加速了这些树种的繁育^[39~40]。

据不完全统计,迄今为止,全世界已有 200 多种木本植物通过组织培养,获得了器官分化或完整植株。德国、法国、加拿大和巴西等国的三倍体山杨、云杉、杨树、桉树等树种的组培苗木,已进入工厂化和实用阶段,美国用组织培养法繁殖苹果矮化砧木、梨及樱桃试管苗,1 年可繁殖 50 万株^[35]。我国的杨树、桉树等树种组培快繁也进入商品化阶段,建立了年产桉树组培苗 250 万株、杨树组培苗 150 万株的工厂化生产线^[11]。繁殖效率超过了传统繁殖方法,对林木良种推广,加速林木良种化进程具有极其重要的作用。

6.3 体细胞胚和人工种子

体细胞胚胎发生是指在离体培养下,体细胞产生与正常受精卵发育方式类似的胚胎结构,自从 Reinert(1958)和 Steward(1958)等从胡萝卜的组织培养物诱导出胚状体以来,在许多植物中进行了广泛的研究^[38],体细胞胚在 100 多种植物中诱导成功,全世界已有 40 多种木本植物获得了体细胞胚,针叶树体胚已取得令人瞩目的进展^[41],其中已有侧柏、落叶松、云杉、核桃、桉树、泡桐、杨树等几十种树种,成功地诱导了体细胞胚胎的发生^[28~39]。如应用组织培养法诱导优树体细胞产生胚状体成功,则无性系的来源用之不尽,通过进一步改良培养条件,建立高效的液体连续培养系统并实现同步化,就可将这一技术直接进行苗木的高效超大规模工厂化生产^[28]。

最早提出研制人工种子创意的是 Murashige,在 1977 年的国际园艺植物学术会议上^[40],人工种子就是利用体细胞胚进行适当包裹,并加营养

物杀菌剂,萌发促进剂而研制出的。目前,人工种子技术引起了国内外高度重视,美国、日本、加拿大、法国、中国、韩国、瑞士、德国等国家和地区都在进行研究,在林木树种中有火炬松、花旗松、糖松、挪威云杉、巨桉等进行过种胚包裹实验,而且经储存后尚有一定的发芽率^[28]。组织培养领域发展起来的人工种子技术具有诱人的前景^[10],目前,用该技术对于乔木和灌木(杨树、胡桃、白云杉)的繁殖正在研究,此法在欧洲、美国和日本广泛推广,我国还处于研究阶段^[26],南京林业大学等单位正在进行枫香、鹅掌楸、杉木和马尾松等树种体细胞胚胎发生和植株再生技术的研究^[11]。

人工种子在本质上属于无性繁殖,繁殖速度快(用 1 个体积为 12 L 的发酵罐在 20 多 d 内生产的胡萝卜体细胞胚可制作 1000 万粒人工种子)^[10];与普通试管苗相比,人工种子体积小便于储藏,运输方便,使自然条件下不结实及无性繁殖困难的珍稀濒危和引进的植物得以快速繁殖;固定杂种优势,使 F_1 代杂种可多代利用,使优良单株能快速繁殖成无性系品种而得以利用,从而大大缩短育种周期,简化育种进程。

7 存在的主要问题及对策

(1)适用的材料范围比较窄,成本较高,限制了许多林木的组培繁殖,目前国内外正在对部分植物的离体培养降低成本途径进行研究解决。

(2)原生质体具有不确定性,一方面,进行优良种质快繁时,对不希望的无性系变异常常无法避免,在组培过程中如何控制培养物变异,保持植株的优良性状,维持品种特性,是一项关键技术;另一方面,用组织培养进行无性系变异研究时,通过组织培养定向获得变异体亦成为育种家关注的问题。因此组织培养进行良种快繁与诱导变异时要考虑怎样抑制变异和获得所要变异。

(3)离体培养中的污染、褐变以及玻璃化等问题。组培过程中外植体褐变是影响组培成功的重要因素,目前已在许多植物的组培中发现褐变现象,从各个角度对克服外植体褐变进行了研究,包括:外植体及培养条件,抑制剂作用,吸附剂及其他防止褐变措施,同时对褐变机理也进行了深入的研究,但至今没有一种有效手段防止褐变。因此不仅要从理论上认识褐变,更要从实践上防止褐变发生。

组培中出现的玻璃化现象是一种生理性病

变,已引起人们重视,并作了初步研究,但对其发生的根本原因及生理生化机制还不清楚,对关于防止玻璃化苗发生的措施进行了广泛研究,如加PVA酶系消除玻璃化,弄清其发生机制,对防止玻璃化有重要指导意义,此外,外植体消毒不彻底,在培养过程中重复感染很难消除,因此应重视病菌污染问题。

综上所述,组织培养自诞生以来在生产和基础研究领域显示了无可比拟的优越性,因此重视和发展组织培养,促使其在林业生产和研究中发挥巨大作用,是林业科学工作者面临的挑战。在组织培养的研究工作中,应充分注意其存在的问题,不断提高科研手段和方法趋利避害,加快其在林业生产中应用的步伐。

参 考 文 献:

- [1] 林顺权. 植物离体培养技术在果树育种研究上的应用[J]. 福建农学院学报, 1987, 16(1): 73-82.
- [2] 王君晖, 黄纯农. 木本植物超低温保存的研究进展[J]. 世界林业研究, 1998, (5): 6-10.
- [3] 林静芳. 林木组织培养的现状与展望[J]. 林业科技通讯, 1988, (4): 1-4.
- [4] Tisserat, B. Date plant tissue culture, USDA. ARS. Oakland, Calif. 1981.
- [5] Jorgensen J. conservation of valuable gene resources by Cryopreser - varion in some forest tree species [J]. plant physiol, 1990, (136): 373-376.
- [6] 林顺权. 植物离体培养技术在果树育种研究上的应用[J]. 福建农学院学报, 1987, 16(1): 73-82.
- [7] 王影, 黄敏仁. 林木原生质体培养研究进展[J]. 南京林业大学学报, 1993, 17(2): 91-96.
- [8] Julie A. Russell et al. culture and regeneration of Populus leaf protoplast isolation from non - seedling tissue [J]. plant science, 1986, 46: 133-142.
- [9] S. Amerkle, Regeneration of liriodendron tulipifera (Family magnolaceae) from protoplast culture [J]. Amer. J. Bot., 1987, 74(8): 1317-1321.
- [10] Julie A. Russell et al. Recovery of plants from liaf protoplasts of hybridpoplar and shpen clones [J]. plant cell reports, 1988, 7, 59-62.
- [11] 王善平. 毛白杨的叶肉原生质体培养再生植株[J]. 中国科学(B), 1990, (12): 1260-1263.
- [12] 卫志明. 悬铃木叶肉原生质体培养再生植株[J]. 植物学报, 1991, 33(11): 813-818.
- [13] 卫志明. 白桦泡桐叶肉原生质体培养再生植株[J]. 植物学报, 1991, 33(11): 735-739.
- [14] 卫志明. 桑树叶肉原生质体培养再生植株[J]. 植物生理通讯, 1992, 28(4): 248-249.
- [15] 王影等. 杨树细胞悬浮培养及体细胞胚胎发生的研究[J]. 南京林业大学学报, 1991, 15(3): 31-36.
- [16] 肖尊安, 沈德绪. 中华猕猴桃原生质体再生植株[J]. 植物学报, 1992, 34(10): 736-742.
- [17] 蒋丽娟, 李昌珠. 生物技术在林木育种上的应用[J]. 湖南林业科技, 1995, 22(3): 26-29.
- [18] 黄农. 木本植物组织培养繁殖的研究进展[J]. 湖南林业科技, 1989, (4): 44-47.
- [19] 句太和, 杨剑波, 吴家道. 我国农作物生物技术育种现状和展望[J]. 安徽农业科学, 1994, (6): 104-107.
- [20] 石井克明. 树木的组织培养[J]. 生物工程进展, 1993, (3): 10-11.
- [21] 颜昌敬. 植物组织培养手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990.
- [22] 陈少裕, 刘杰. 生物技术与林木遗传改良[J]. 生物工程进展, 1993, 14(2): 35-38.
- [23] 阿. 尔. 罗金[俄国], 张道兰, 左家文译. 组培法利用前景[J]. 江西林业科技, 1997, (3): 46-48.
- [24] 程东升. 日本的林业生物技术研究现状[J]. 林业科技通讯, 1992, (3): 70-75.
- [25] 袁巧平. 生物技术与林木试管微型选育[J]. 世界林业研究, 1990, (3): 51-55.
- [26] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986.
- [27] Larkin. p. J and scowcroft. w. r, Theor [J]. Appl. Genet., 1981, 60: 197-214.
- [28] 宋再华, 彭守华, 荷爱兰. 体细胞无性系变异及变异频率[J]. 莱阳农学院学报, 1997, 14(2): 126-129.
- [29] Ostry. M. E. Application of biotechnology for the development of Disease - Resstant poplars, proceedings IEA/BA Task2 workshop Biotechnology development, 1987, sep.
- [30] Cheliak W. M. selection for glyphosatetolerant cell culture in poplar IEA Task2 meeting and workshops on cell culture and coppicing, 1988, 17-23.
- [31] 张绮纹, 张望东. 群众杨 39 无性系耐盐悬浮细胞系的建立和体细胞变异体完整植株的诱导[J]. 林业科学研究, 1995, 8(4): 395-401.
- [32] 傅润民. 果树瓜类组织培养[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1988.
- [33] Naverro, l. et al. J. Am. Hort sci., 1975, 100(5): 471-479.
- [34] Berbee, F. M. et al. In duction of callus and trees from stem tip culture of a hybrid poplar, In vitro, 1972, 7: 269. (Abstr.).
- [35] 罗士伟, 许智宏. 经济植物组织培养[M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [36] 唐巍, 欧阳藩, 郭种琛. 针叶树体细胞无性系研究和应用进展[J]. 生物工程进展, 1997, 17(4): 2-9.
- [37] 李修庆. 植物人工种子研究[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990.
- [38] 施季森. 迎接 21 世纪现代林木生物技术育种的挑战[J]. 南京林业大学学报, 2000, 24(1): 1-6.