

# 植物组织培养在农业生产中的应用研究进展

周权男, 张慧君, 戴雪梅, 孙爱花, 黄天带, 黄华孙

(中国热带农业科学院 橡胶研究所, 国家橡胶树育种中心, 海南 儋州 571737)

**摘要:**植物组织培养是指利用细胞全能性培养再生植株的技术, 具有快速繁殖、克服杂交不亲和及保存种质资源等优点。现对组织培养在基因工程、种质资源保存、原生体培养与体细胞杂交、单倍体育种、选择离体突变体、脱毒等方面的研究进展进行综述; 同时简要介绍了组织培养在工厂化育苗、人工种子繁殖等方面的应用; 并对组织培养在植物各领域的应用情况进行了展望。

**关键词:**植物组织培养; 基因工程; 植物育种

**中图分类号:**Q 943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)13-0196-04

近几十年来, 植物组织培养技术发展非常迅速, 是生物技术领域最为基础、应用最为广泛领域之一, 现已发展成为现代农业生产及科研的重要手段<sup>[1-2]</sup>。1902年, Haberlandt 提出在适宜环境条件下植物细胞具有独立发育成个体的潜能, 即细胞全能性(totipotency)。此观点为植物组织培养的开展奠定了基础; 随后又提出单一细胞能发育成多细胞的细胞群, 从而产生新的个体<sup>[3]</sup>。1937年, White 认为植物的全能性在特定环境下是不能发育的, 如果脱离这样特定的环境, 其细胞全能性将通过细胞的脱分化、再分化过程而重新表现出来<sup>[4]</sup>, 他开展研究植物细胞全能性条件的深入探索, 并提出细胞全能性的发现是决定植物再生能力的重要因子, 是组织培养成功的关键。直到1948年, 首例再生植株从烟草茎段离体培养中获得<sup>[5]</sup>。截至目前, 植物组织培养成功获得再生植株已经有1 000多种<sup>[6]</sup>, 在组织培养的外植体选择中, 是能否成功获得离体培养的关键。而常用的外植体包括原生质体、胚胎、细胞、器官等<sup>[7-8]</sup>, 但更为关键的则是培养条件和培养基质。植物组织培养常用的基础培养基有N6、SH、MT、White、WP、MS等, 但不同植物种类也需要不同的培养条件, 因此, 在具体

哪种植物离体培养过程中常需要对培养基进行适当的改良, 对于一些植物, 需选择专用培养基来进行离体培养。而植物激素是调节植物生长发育的重要物质, 在离体培养过程中, 往往通过添加不同浓度以及不同种类的植物激素来调节外植体的分化, 最终获得完整的再生植株<sup>[9]</sup>, 常用的激素有TDZ、KT、6-BA、2, 4-D、IBA、IAA、NAA、GA<sub>3</sub>、ABA<sup>[10-11]</sup>。细胞分裂素类激素不仅有利于植物不定芽的分化, 还能诱导植物组织产生愈伤组织, 生长素类激素则主要是诱导不定根的分化和愈伤组织的形成<sup>[11-14]</sup>。在植物组织培养过程中, 大部分都是采用在基础培养基上添加适当浓度的外源激素, 先是诱导愈伤组织, 而后是胚状体, 然后诱导芽, 最后获得完整植株。植物生物技术产业的蓬勃发展, 代表着21世纪的发展方向, 因此, 植物组织培养作为其重要途径, 也日益受到重视。植物离体培养技术成为现代化农业及多种生物产业发展的重要手段, 已在农业生产上得到广泛应用, 归纳起来主要有以下几方面。

## 1 在植物基因工程方面的应用

自从1983年转基因植物首次获得以来, 植物基因工程研究逐渐进入蓬勃发展的阶段。植物基因工程是指利用重组DNA技术, 有计划地在体外通过人工方法将外源基因导入到受体中, 从而获得目标性状。目前已育成了一大批耐抗病、除草剂、抗逆、抗虫的新品种, 并已开始在生产上大面积推广应用。据统计, 到目前为止, 有3 000多例转基因植物获得成功, 并进入田间试验, 打破了自然界物种难以交配的天然屏障, 并已产生了巨大的效益。

近年来, 人们利用植物基因工程方法将多种目的基因成功导入植物受体中。其中, 很多有重要价值的转基

**第一作者简介:**周权男(1981-), 男, 硕士, 助理研究员, 现主要从事植物组织培养等研究工作。E-mail:zhouquannan2004@163.com.

**责任作者:**黄华孙(1963-), 男, 研究员, 研究方向为植物遗传育种。E-mail:xjshhs@163.com.

**基金项目:**中央级公益性科研院所基本科研业务费中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费资助项目(1630022011005, 1630022013002); 国家现代农业产业技术体系建设专项资助项目(NYCYTX-34)。

**收稿日期:**2014-03-19

因植物已经应用于生产实践中。植物组织培养在用农杆菌介导法和基因枪法转化植物过程中起着非常重要的作用。在植物的遗传转化过程中,主要是目的基因对植物组织伤口的细胞进行转化,只有发生这些转化的植物细胞能够再生,长成完整的植株,才能获得转基因植株。

## 2 在植物育种上的应用

### 2.1 种质资源保存

植物种质资源是农业生产过程的基础。但由于多方面原因,如自然灾害、自然选择以及人为活动等原因,已经造成一定数量的植物消失,或处于濒危状态,尤其是一些具有特殊遗传性状的珍贵物种的灭绝,造成了无法挽回的损失。对于被子植物来说,如果以种子的形式长期保存,可能会因为时间的推移而使种子生活力逐渐下降,并极易受到病虫害的侵扰;而植物杂交种子获得后,性状又分离,导致遗传不稳定。还有些植物没有种子,只能进行栽培繁殖保存,这就需要耗费大量的物力、人力和财力。而采用组织培养的方式来保存,将植物的外植体放到无菌环境下进行离体培养,并置于低温或者超低温条件下保存,能达到长期保存种质资源的目的。离体种质资源的保存可以在常温下,也可以用常低温或者低温保存,例如草莓茎尖在4℃黑暗条件下,茎的培养物能保持生活力达6a左右,而这期间只需要每3个月加入一些新鲜培养基;另外,有些植物还可以用超低温保存,也叫冷冻保存,是指在超低温液氮(-196℃)条件下使生长细胞代谢处于基本停止的状态,完全抑制种质资源材料基因变异的可能性,稳定地、长期地保存植物种质资源。其技术简单,操作过程简化,成本较低等<sup>[4]</sup>。尤其是对无性繁殖的植物,对茎尖分生组织、体细胞等材料进行超低温离体保存,可以大大节省空间,还可以避免病虫害的侵袭。在恰当条件下能迅速繁殖,长出新的植株,还能保持遗传特性的稳定。

### 2.2 原生质体培养与体细胞杂交

自1972年Carlson等<sup>[7]</sup>首次成功获得烟草种间体细胞融合杂种再生植株以来,越来越多的物种在体细胞杂交上取得了新的突破性的进展。通过原生质体融合,克服了常规育种中的有性杂交不亲和,从而获得体细胞杂种,创制出新物种或新类型,这是组织培养应用很诱人的一个方面。目前通过原生质体融合成功获得体细胞杂种的作物有番茄<sup>[15]</sup>、小麦<sup>[16]</sup>、大麦<sup>[17]</sup>、马铃薯<sup>[18]</sup>、茄子<sup>[19]</sup>、水稻<sup>[20]</sup>、油菜<sup>[21]</sup>、芥菜等。迄今为止,我国是1972年开始体细胞杂交和原生质体培养的研究。我国的科学家已在50多种植物上取得了组织培养的成功,并获得了再生植株,而且得到多种植物的体细胞杂种,其中,

有一些经济植物没有性生殖能力或有性生殖能力很低,具有重要的科学研究意义。

### 2.3 单倍体育种

由于具备所有基因均能表现、基因型可快速纯合等优点,单倍体育种已成为一种新的育种手段,并已育成大规模推广种植的新品种作物,在人工控制条件下进行,在组培试管内人工进行授精,获得自交种或杂种;并通过分离单倍体细胞,进而培育出纯合的优良二倍体品系,不仅可以缩短育种时间;还可以通过选择突变体,提高植物的更多品质,增强抗逆能力,扩大植物的生长范围。

### 2.4 选择离体突变体

组织培养的细胞无论是悬浮细胞还是愈伤组织,都处在旺盛分裂的状态,由于这个状态下的细胞,容易受内部多种因素和培养条件等的影响而产生变异,因而可以从中筛选到对植物育种中有用的突变体,来加快育种的选择,加速育成新品种。尤其对原来诱发突变较为困难,突变率较低的一些性状,用细胞培养进行诱发、筛选和鉴定时,由于处理的细胞数量大大多于处理个体数量,因而一些突变率极低的性状可能选择出来,如植物抗盐、抗病、抗寒、抗旱、抗除草剂,生理生化变异等诱发,为进一步选育提供了较多的变异材料。目前,用离体筛选突变体技术已经筛选出部分抗性突变体,如抗病、抗盐、高赖氨酸、高蛋白等的有益突变体,部分已用于植物生产过程中。

### 2.5 脱毒

农作物都不同程度地遭受到植物病毒的危害,据不完全统计,全球每年农作物因病毒病引起的作物损失达200多亿美元。植物脱毒可使植物复壮,提高产量和品质。如:甘薯脱毒后增产17%~158%,使大中薯率提高。马铃薯脱毒后株高增加63%~86%,增产50%~90%。大蒜脱毒后叶面积增加58%~96%,蒜头增产32%~114%。目前,通过组织培养脱毒可以实现商业化的无菌苗,在园艺领域已经十分普遍,如草莓、甘薯、马铃薯、柑桔、大蒜、苹果、康乃馨、矮牵牛、菊花、月季、花叶芋、山牡丹等已在中国广泛应用。

## 3 工厂化育苗方面

目前,植物组织培养在生产上应用最为广泛、能产生较大经济效益的技术是植物离体快繁技术。离体快繁具有繁殖系数大,周年生产,繁殖速度快,苗木整齐一致等特点。所以利用这项技术可以使单株全年繁殖几万到几百万株。我国成功获得组培苗并已进行工厂化育苗的有月季、菊花、甘蔗、栎树、山楂、猕猴桃、樱桃、仙客来、杉木等。

#### 4 人工种子

人工种子的概念首先是 1978 年美国生物学家 Murashige 提出来的,它是指植物离体培养中产生的不定芽或胚状体,被包裹在含有养分和保护功能的人工胚乳和人工种皮中,从而形成能发芽出苗的颗粒体。人工种子的意义在于,人工种子结构完整,体积小,便于贮藏与运输,可直接播种和机械化操作,不受季节和环境限制,胚状体数量多,繁殖快,利于繁殖生育周期长、自交不亲和、珍贵稀有植物的工厂化生产,也可大量繁殖无病毒材料,可在人工种子中加入抗生素、菌肥、农药等成分,提高种子活力和品质,体细胞胚由无性繁殖体系产生,可以保持杂种优势。

虽然人工种子的研究已有 20 多年,但一些难题仍然未能很好解决,如人工种皮,防腐,制作成本高,主要靠手工操作等。这些难题的解决又涉及细胞工程学、植物胚胎学、植物生理学、生物化学、高分子化学、机械加工等技术领域,要求的技术水平较高,所以,目前人工种子的研究仍处于探索阶段。由于人工种子具有许多优点,如繁殖速度快,固定杂种优势,节约粮食等,人工种子的研究方兴未艾。特别是近年来,人工种子技术研究已逐渐由体细胞胚人工种子转向非体细胞胚人工种子。因为只有少数植物能建立起高质量的体细胞胚发生系统,而这些植物中有些并不需要人工种子作为繁殖手段,如胡萝卜、紫苜蓿和芹菜等,仅是作为模式植物进行研究。

#### 5 展望

植物组织培养技术已广泛应用于植物的各个领域,这项技术为许多学科研究工作者提供了良好试材和基体保障。通过植物组织培养,可以获得较稳定的体胚发生和不定芽体系,在组织培养基础上进行细胞悬浮培养及植物基因工程等工作,为植物通过基因工程改良植物打下了坚实基础,虽然还存在一些问题,如:组织培养周期长、受外植体类型限制、组培变异率高、再生诱导频率低,在培养过程中再生能力弱,再生苗生根困难等。因此,如何解决这些问题将是植物组织培养研究的重要课题。

(该文作者还有华玉伟,单位同第一作者。)

#### 参考文献

- [1] 盛玉婷. 植物组织培养技术及应用进展[J]. 安徽农学通报, 2008, 14(9): 45-47.
- [2] 梁一池, 杨华. 植物组织培养技术的研究进展[J]. 福建林学院学报, 2002, 22(1): 1-3.
- [3] Verdeil J L, Alemanno L, Niemenak N, et al. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy[J]. Trends Plant Sci, 2007, 12: 245-252.
- [4] Sathyanarayana B N, Varghese D B. Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols [M]. India: New Delhi, International Publishing House Pvt Ltd, 2007: 1-8.
- [5] Zhu Z Q. Theoretic basis of plant cell engineering: cell totipotency. In: Plant Cell Engineering[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003: 114.
- [6] Gupta P K, Durzan D J. Biotechnology of somatic poly-embryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine[J]. Biol Technology, 1987(5): 147-151.
- [7] Carlson P S, Smith H H, Dearing R D. Parasexual interspecific plant hybridization[J]. Proc Nat Acad Sci US, 1972, 69(11): 2292-2294.
- [8] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991.
- [9] Boszoradova E, Libantova J, Matusikova I, et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation of economically important oilseed rape cultivars[J]. Plant Cell Tiss Org, 2011, 107: 317-323.
- [10] George E F, Hall M A, De Klerk G J. Somatic embryogenesis. Plant propagation by tissue culture[M]. Springer Netherlands, 2008: 335-354.
- [11] Huang W L, Lee C H, Chen Y R. Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress[J]. Plant Cell Tiss Org, 2012, 108(2): 257-263.
- [12] Garcíar Martín G, Manzanera J A, González-benito M. Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos[J]. Plant Cell Tiss Org, 2005, 80: 171-177.
- [13] Barreto R, Nieto Sotelo J, Cassab G I. Influence of plant growth regulators and water stress on ramet induction, rosette engrossment, and fructan accumulation in *Agave tequilana* Weber var. Azul[J]. Plant Cell Tiss Org, 2010, 103: 93-101.
- [14] Ivanova M, Van Staden J. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. sc[J]. Plant Cell Tiss Org, 2011, 104: 13-21.
- [15] Kisaka H, Kameya T. Production of somatic hybrids between *Daucus carota* L. and *Nicotiana tabacum*[J]. Theor Appl Genet, 1994, 88(1): 75-80.
- [16] Xia G M, Chen H M. Plant regeneration from intergeneric somatic hybridization between *Triticum aestivum* L and *Leymus chinensis* (Trin) Tzel [J]. Plant Sci, 1996, 12(2): 197-203.
- [17] Kisaka H, Kisaka M, Kanno A, et al. Intergeneric somatic hybridization of rice (*Oryza sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) by protoplast fusion [J]. Plant Cell Rep, 1998, 17(2): 362-367.
- [18] Fock I, Collonnier C, Purwito A, et al. Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*[J]. Plant Sci, 2000, 160(1): 165-176.
- [19] Collonnier C, Fock I, Daunay M C, et al. Somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. sisymbriifolium* as a useful source of resistance against bacterial and fungal wilts[J]. Plant Sci, 2003, 164(4): 849-861.
- [20] Yan C Q, Qian K X, Yan Q S, et al. Use of asymmetric somatic hybridization for transfer of the bacterial blight resistance trait from *Oryza meyeriana* L. to *O. sativa* L. ssp. japonica[J]. Plant Cell Rep, 2004, 22(3): 569-575.
- [21] Sheng X G, Liu F, Zhu Y L, et al. Production and analysis of intergeneric somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *Matthiola incana* [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2008, 92(1): 55-62.

# 果实脱落过程中水解酶作用的研究现状及展望

杨子琴<sup>1</sup>, 许真<sup>2</sup>, 张蕾<sup>1</sup>, 洪继旺<sup>1</sup>, 李松刚<sup>1</sup>

(1. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 农业部华南作物基因资源与种质创制重点实验室 国家热带果树品种改良中心, 海南 儋州 571737; 2. 鹤壁职业技术学院, 河南 鹤壁 458030)

**摘要:** 果实的脱落是由于离区细胞间质的降解, 而细胞间质的降解有赖于水解酶的参与, 这使得水解酶成为近年来器官脱落研究的热点之一。该文主要综述了各种水解酶的生化特性、克隆表达以及降解细胞间质作用等方面的研究现状, 并展望了其未来的发展方向, 以期推进水解酶在果实脱落上的研究及其相关制品的开发利用。

**关键词:** 水解酶; 纤维素酶; 内切-1, 4- $\beta$ -D-葡萄糖酶;  $\beta$ -甘露聚糖酶; 多聚半乳糖醛酸酶; 果胶甲酯酶

**中图分类号:** Q 946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2014)13-0199-03

果实是一种大量消耗养分的异养生殖器官。在果实发育过程中, 落果是植物减少果实负载量, 集中树体资源保证留树果实个体发育的正常现象。这种现象被视为植物果实负载量的自我调节机制。过量的负载量会导致树体状况下降, 同时由于果量过大还会导致单果

重下降、品质低, 因此生产中往往需要大量的人力来进行疏果, 而外界环境不适宜或者营养供应不足情况下又会出现落果严重, 导致欠收<sup>[1]</sup>。在劳动力成本飞涨的今天, 用化控代替人工投入将是植物界最有潜力的发展方向。因此, 研究果实坐果/落果调节机制对开发新型的保果剂/疏果剂, 高效果园管理具有重要的指导作用。

## 1 果实脱落的机制与相关水解酶

脱落涉及离层细胞中间层的水解, 通过细胞壁修饰和水解酶的作用实现。因此, 脱落需要植物器官发育早期有离区的形成和随后的细胞分离反应激活<sup>[2-5]</sup>。离区的分化可能在器官脱落前的很长时间就已经完成了, 这暗示着分化程度是脱落发生的重要前提<sup>[6]</sup>。脱落过程本身也是一个程序性细胞死亡过程的经典模型, 因为脱落发生的区域-离区(AZ)是一个由特殊细胞组成的类激素靶细胞区域<sup>[7-8]</sup>。细胞凋亡过程中液泡膜破裂, 释放出许多水解酶, 引起细胞死亡<sup>[9]</sup>。因此, 水解酶的作用是脱落过程中较靠下游的信号, 在脱落的执行阶段起作

**第一作者简介:** 杨子琴(1981-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为果树栽培生理, 现主要从事果树逆境生理等研究工作。E-mail: yangzqin1@163.com.

**责任作者:** 李松刚(1976-), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向为果树栽培生理, 现主要从事南方果树反季节生产研究工作。E-mail: lsg1976@sina.com.

**基金项目:** 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所)资助项目(1630032014017); 国家现代农业产业技术体系专项资助项目(CARS-33); 国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(201003021)。

**收稿日期:** 2014-03-20

## Research Advances in Application of Plant Tissue Culture in Agricultural Production

ZHOU Quan-nan, ZHANG HUI-jun, DAI Xue-mei, SUN Ai-hua, HUANG Tian-dai, HUANG Hua-sun, HUA Yu-wei

(Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, State Center for Rubber Breeding, Danzhou, Hainan 571737)

**Abstract:** Plant tissue culture is the use of totipotent cells cultured plant regeneration technology, the genetic engineering of tissue culture, germplasm stored in the native culture and somatic hybridization, haploid breeding, select progress body detoxification and other aspects of *in vitro* mutation were discussed in this paper; brief introduction of tissue culture in factory application breeding, artificial seeds, etc.; and tissue culture plants in billing applications in various fields were discussed.

**Key words:** plant tissue culture; genetic engineering; plant breeding