

曾云英. 植物开放式组织培养的研究进展及发展前景[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 11-13.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.004

植物开放式组织培养的研究进展及发展前景

曾云英

(江苏开放大学、江苏城市职业学院, 江苏南京 210019)

摘要:从抑菌剂种类和浓度、蔗糖浓度、有机物质、培养容器、接种条件及培养方式几个方面综述了植物开放式组织培养的发展与应用,并展望了未来发展的前景。

关键词:开放式组织培养;植物;抑菌剂;培养容器;有机物质;接种条件;培养方式

中图分类号: Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0011-03

自 1902 年德国著名植物生理学家和植物学家 Haberlandt 提出了植物细胞具有全能性的理论之后,植物组织培养作为一种高效的植物快速繁殖技术显示出了巨大的应用价值。时至今日,植物组织培养技术以其特有的优势在理论研究和生产应用上不断被深入改进和创新,各种植物几乎都有进行组织培养的报道。植物组织培养技术要求严格的无菌环境,需要特定的仪器设备(超净工作台、高压灭菌锅和人工气候箱),因而生产成本很高,且繁杂的操作程序对工作人员的技术都有一定的要求,这大大地限制了该技术的应用和推广。为了降低成本,简化工作程序,学者们一直在努力探索一种能高品质和规模化生产试管苗的新技术。随着研究的不断深入,“开放式组织培养”理念被提出。植物开放式组织培养是

指在抑菌剂的作用下,使植物组织培养脱离严格无菌的操作环境,不需高压灭菌和超净工作台,用普通容器代替组培瓶,在自然、开放的有菌环境中进行植物的组织培养^[1]。开放式组织培养与传统的组织培养相比,有成本低、操作环节简单等优点,因而受到研究者的喜爱,更是规模化生产试管苗的必然趋势;但由于整个操作过程没有在有菌的条件下进行,防止污染也成了植物开放式组织培养研究中的主要任务。崔刚等采用中医理论,从多种植物中提取了具有杀菌、抗菌的活性物质,成功研制出了具有广谱性杀菌能力的抗菌剂,并利用这一技术成功地建立了葡萄外植体培养体系,同时还开展了多种植物开放式组织培养研究工作^[2]。随后研究者在多种植物上进行了开放式组织培养的尝试并取得了成功,主要有香蕉^[3-4]、魔芋^[5-6]、荸荠^[7]、马铃薯^[8]、梅花^[9]、红豆杉^[10]、白菜^[11]等植物,已建立开放式组织培养技术体系的植物种类见表 1。研究主要集中在抑菌剂种类的选择和浓度的确定、培养方式以及培养基中有机物质和无机碳这几方面。本文从抑菌剂、培养方式、培养基成分等方面综述了植物开放式组织培养的应用现状及发展前景,以期为该技术的生产应用及推广提供一定的理论支撑。

收稿日期:2014-05-17

基金项目:江苏省高校自然科学研究面上项目(编号:13KJB180004);江苏开放大学、江苏城市职业学院“十二五”规划项目(编号:12SEW-Y-026)。

作者简介:曾云英(1976—),女,重庆长寿人,硕士,副教授,主要从事园林植物与观赏园艺、生态规划方面的研究。E-mail:yuniny@sina.com。

再次,信托期满,信托公司通过收回贷款和回购股权等方式退出项目,向投资者返还利益,结束信托计划,最终形成信托公司、低碳农业和投资者的共赢局面。

该模式的核心就是现有信托机构搜寻合理的低碳农业项目。对于信托公司来说,充分开发和利用自身人才优势,结合国家农业政策,研究现有低碳农业项目的发展规划和前景。针对农业自身的特点创新具体的信托产品类型,如开发抵押性和项目信托。第一,抵押性信托就是信托公司以金融中介的角色给低碳农业项目发放抵押贷款或购买抵押贷款债权,获取手续费和利息收益。不足之处在于我国仍然没有构建利率的市场机制,使得相关项目难以获得较高的利息收入,同时也不能通过开展和创新票据业务分散项目信托带来的市场风险。第二,项目信托。信托公司与低碳农业项目分别以各自拥有的资金和土地、产品收益设立独立公司,信托公司作为股东,行使参与权参与公司经营、监督权监督低碳农业项目的运作,以保证信托项目的效益性和安全性。不足之处在于信托公司直接参与低碳农业项目,面临的市场风险较大。

科学合理的低碳农业模式的构建,一方面可以有效解决低碳农业发展面临的资金短缺问题,另一方面可以实现我国农业的可持续发展,优化我国农村地区乃至全国社会经济的发展环境。

参考文献:

- [1] 吴一平,刘向华. 积极应对气候变化 大力推进低碳农业建设[J]. 毛泽东邓小平理论研究, 2010(2): 58-65.
- [2] 胡晓宇,何平,杨璐嘉. 中国农业高新技术产业风险投资的 SWOT 分析及其对策[J]. 农村经济与科技, 2012, 23(6): 63-65.
- [3] 王青,郑红勇,聂桢祯. 低碳农业理论分析与我国低碳农业发展思路[J]. 西北农林科技大学学报:社会科学版, 2012, 12(3): 1-7.
- [4] 刘向华. 我国农业生态系统核心服务功能体系构建[J]. 当代经济管理, 2010, 32(12): 37-41.
- [5] 刘秀丽,张勃,张调风,等. 黄土高原土石山区土地利用变化对生态系统服务的影响——以宁武县为例[J]. 生态学杂志, 2013, 32(4): 1017-1022.

表 1 植物开放式组织培养的应用

试验材料	基本培养基	抑菌剂	作者	发表时间
香蕉	MS	次氯酸钠	莫廷辉等	2011、2012
荸荠	MS	次氯酸钠	吴桂容等	2013
魔芋	MS	H198	赵青华等	2011
梅花	MS	特制消毒液	陈瑞丹等	2007
红豆杉	MS	山梨酸钾	王丹等	2010
白菜	B ₅	大蒜素、代森锰锌	王赵玉等	2012
马铃薯	YEB、PDA	YI-1	张薪薪等	2005
葡萄	MS ₀	特制消毒液	崔刚等	2004
苹果	MS ₀	特制消毒液	崔刚等	2004
红栌	MS ₀	特制消毒液	崔刚等	2004
香花槐	MS ₀	特制消毒液	崔刚等	2004
蝴蝶兰	MS ₀	特制消毒液	崔刚等	2004
地被菊	MS ₀	特制消毒液	崔刚等	2004

1 抑菌剂

在植物开放式组织培养中,由于培养基不经过高温高压灭菌,外植体处于开放、自然的有菌环境中,所以能防止污染又不影响外植体生长的抑菌剂就成了研究者们研究重点。抗生素是植物组织培养中用来防止污染的传统试剂,是组织培养中常用的一种抑菌剂。但其在抑菌的同时有一定的抑菌谱且容易使微生物产生耐药性,对外植体的分化和生长有一定的影响。王春发现在马铃薯培养基中添加 20 mg/L 的硫酸链霉素能完全抑制细菌浸染且对组培苗的生长发育无不良影响^[12]。阎志红等通过实验发现 50 mg/L 的青霉素能够有效地抑制培养基的污染,但长期在含有此浓度青霉素的培养基上继代培养的西瓜的伸长生长与生根明显受到抑制^[13]。简

兴等在红掌的培养基中加入 300 mg/L 青霉素与 180 mg/L 链霉素混合液,比单一使用一种抗生素抑菌效果更好^[14]。随后研究者们尝试使用其他物质作为抑菌剂并获得了试管苗,报道有农药(代森锰锌)、食品添加剂(山梨酸钾)、家用消毒液(次氯酸钠)、植物提取物(大蒜素、特制消毒液)等作为抑菌剂。在香蕉的开放式组织培养试验中,解辉等通过向培养基中添加不同浓度的次氯酸钠溶液作为抑菌剂,发现 0.01% 以上浓度的次氯酸钠可有效抑制培养基的污染,浓度超过 0.02% 时外植体的存活率降低,试管苗的生根率低于传统组培苗^[4]。可能是由于次氯酸钠加入培养基后产生的次氯酸对外植体的生长有一定的影响且使培养基 pH 值降低影响了外植体对植物生长调节剂的吸收。吴桂容等在荸荠的开放式组织培养试验中发现当次氯酸钠浓度为 1.0% 时的污染率最低,诱导率最高,但都低于对照组^[7]。次氯酸钠稳定性差,易受热、光和 pH 值的影响,这可能是导致以上 2 个试验所用次氯酸钠浓度差别大的主要原因。王赵玉等自制生物农药大蒜素及化学农药代森锰锌对白菜种子进行开放式组培,试验结果表明,0.10~0.17 g/mL 的大蒜素抑菌效果较好且对植物生长影响较小,代森锰锌 0.1~0.7 g/L 抑菌效果较好且对植物的根和芽生长有明显的促进作用^[11]。赵青华等用 6 种不同的抑菌剂对魔芋进行开放组培,试验发现抑菌剂对愈伤组织的分化影响较大,容易引起愈伤组织褐变,浓度越低影响越小,且分化的试管苗长势也比传统组织培养试管苗弱^[6]。王丹等首次运用食品添加剂山梨酸钾作为开放组培的抑菌剂,发现 0.02 g/L 的山梨酸钾能有效抑制红豆杉开放组培中培养基的污染^[10]。

目前利用次氯酸钠、山梨酸钾、代森锰锌、大蒜素等作为开放式组织培养的抑菌剂均获得了组培苗(表 2)。

表 2 植物开放式组织培养中抑菌剂的应用情况

试验材料	抑菌剂种类	抑菌剂浓度	外植体生长状况
香蕉继代丛生芽	次氯酸钠	0.01%	
荸荠芽	次氯酸钠	1.0%	
魔芋	H198	400 倍液	比传统试管苗弱
梅花茎段	特制消毒液	0.7%	
红豆杉三年生叶片	山梨酸钾	0.02 g/L	污染率较高,存活率低
马铃薯试管苗	YI-1	62.5 g/mL	苗粗壮、叶片多、颜色绿、扩展
葡萄茎段	特制消毒液	0.2%	苗生长健壮,分化率较高
白菜种子	大蒜素	0.10~0.17 g/mL	种子萌发率 80% 以上,芽的生长与对照组无显著性差异
白菜种子	代森锰锌	0.1~0.7 g/L	种子萌发率 88% 以上,芽的生长与对照组无显著性差异

2 培养容器

传统的植物组织培养所用容器为锥形瓶,以塑料膜封口或用棉球塞封口,且容器要求能耐高温高压。而开放式组织培养采用培养基中添加抑菌剂代替高温高压灭菌,所以容器的选择范围大。为了降低成本,简化程序,报道的试验所用培养容器均为一次性塑料杯,以保鲜膜封口。但赵青华等在对魔芋进行开放式组织培养时进行了不同培养容器的对比试验,结果表明,一次性塑料杯由于质量过轻,操作起来不方便,且长期使用成本高,传统的培养容器如锥形培养瓶和方形培养盒虽然一次性投入高,但能反复使用,且外植体生长良好,是开放式组织培养的最佳选择^[6]。

3 无机碳和有机物质

蔗糖是外植体生长发育的碳源和能量来源,没有能量和碳源任何细胞都不能生长,植物不能进行正常的细胞分裂与组织分化。当生长素水平恒定时,2% 蔗糖有利于分化出木质部,4% 蔗糖则有利于分化出韧皮部,3% 的蔗糖则可以分化出二者,所以 3% 是植物组织培养常用的蔗糖浓度。植物组织培养中蔗糖是碳源和能量的供给物,同时也是微生物孳生的主要原因。为了降低污染率,研究者们采用降低蔗糖浓度、无糖培养等方式进行。有关蔗糖浓度与开放式组织培养中污染率之间的关系少有报道。吴桂容等在荸荠的开放式组织培养中发现,蔗糖浓度为 2% 时污染率最低而诱导率高,虽然随着

蔗糖浓度的提高,诱导率升高,但污染率也随之升高^[7]。在磨芋的开放式组织培养中,赵青华等通过 4 个蔗糖浓度对比试验,结果表明,3% 的蔗糖浓度有利于魔芋的诱导培养^[6]。

无糖培养是采用人工环境控制手段,用 CO₂ 代替蔗糖作为碳源,提供植株生长适宜的光、温、水、气、营养等条件,促进植株的光合作用,从而促进植物的生长发育。张伟在红掌的快繁中发现,如果不具备上述的无糖培养条件,仅在培养基中不添加蔗糖,虽然接种后由于无糖作为污染源,污染率大大降低,但外植体不会发生愈伤组织,增殖率很低,增殖系数只有 1.81,且生长缓慢;而继代培养的植株由于有了完整的茎、叶,具备一定的自养能力,不加蔗糖也能存活但植株基本无变化^[15]。

有机成分在生物生长发育过程中参与了生物体的新陈代谢,是所有生物体不可缺少的重要营养物质。曹善东等对影响草莓组织培养繁殖系数的有机物因素进行了对比试验,结果表明,甘氨酸是影响草莓繁殖系数的主要有机物因子,且浓度以 2.0 mg/L 为最适宜^[16]。张清霞等将 B5-10 培养基中的有机物加倍,发现有机物加倍对某些大白菜品种花药培养的出胚率无影响,而对一些难诱导出胚的品种则有促进作用;添加丝氨酸使花药培养的出胚率降低,而添加 0.4 g/L 谷酰胺对一些品种的胚诱导效果好^[17]。有机物质与污染率有一定的关系,荸荠的开放式组织培养中,去掉培养基中的有机成分能有效降低污染率,尤其是去掉甘氨酸后,污染率最低^[7]。

4 培养方式

培养方式对开放式组织培养的影响鲜见报道。吴桂容等在荸荠的开放式组织培养中进行了培养方式对其污染率和诱导率的影响试验,结果表明,培养室内污染率最低,玻璃温室和塑料温室的污染率都较高^[7]。固体培养与液体培养对开放式组织培养的影响还未见报道,仅王赵玉等在 B₅ 的固体培养基和液体培养基中加入了不同的抑菌剂对白菜种子进行开放式组培^[11],但未进行固体与液体培养基对开放式组培的影响的对比。张慎等认为循环流动的液体培养基不易受微生物的侵蚀,比固体培养基更适合于植物开放式组织培养^[1]。

5 接种条件

传统组织培养中,接种用的工具如镊子、刀片等均采用高温高压灭菌或乙醇灯灼烧灭菌或专用接种灭菌器灭菌。而开放式组织培养中,省掉了高温高压灭菌这一过程,崔刚等将接种工具用 75% 乙醇擦洗后放在抑菌剂中浸泡 1 h,接种过程中镊子和刀片一直浸泡在抑菌剂中,这样可有效防止接种工具引起的污染^[2]。赵青华等通过试验表明在魔芋的开放式组织培养中,培养瓶不需要进行特殊的杀菌处理,接种盘、镊子和刀片用抑菌剂浸泡处理即可达到灭菌效果^[6]。

6 发展前景

植物开放式组织培养技术对环境无严格的无菌要求,操

作程序简化,成本降低,是未来植物组织培养发展的主要方向。既能抑菌又不影响外植体生长的抑菌剂是植物开放式组织培养技术的核心,故寻找有效的抑菌剂是研究者们工作的重点。抗生素抗菌效果较好,但有一定的抗菌谱且对外植体生长有一定的影响。化学农药及家用消毒剂的加入对外植体的生长发育有一定的影响。利用生物提取物制成的中药混合物作为抑菌剂一直是研究者们比较认同的有效抑菌剂,但是中药的选择及提取过程比较繁琐。一些具有抗菌作用的蛋白质如乳铁蛋白和溶菌酶等,对外植体无任何副作用且不诱导微生物的抗性,可能是将来开放组培中抑菌剂的主要成分。

参考文献:

- [1] 张 慎,郭陶然,邓志瑞,等. 植物开放式组织培养的研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(26):14281-14283,14288.
- [2] 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.
- [3] 黄泰达,莫廷辉. 香蕉开放式组织培养中增殖培养基成分优化研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(18):9584-9586.
- [4] 解 辉,莫廷辉,曾丽星. 次氯酸钠在香蕉开放式组织培养中的应用研究[J]. 热带作物学报,2011,32(5):886-890.
- [5] 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.
- [6] 赵青华,陈永波,杨朝柱,等. 魔芋开放式组织培养技术初探[J]. 氨基酸和生物资源,2009,31(4):79-82.
- [7] 吴桂容,曲芬霞,余炳锋. 贺州荸荠开放式组织培养体系建立[J]. 北方园艺,2013(6):110-112.
- [8] 张薪薪,唐金花,王关林. 抑菌剂在开放组培中的使用及效果研究[J]. 辽宁师范大学学报:自然科学版,2005,28(4):466-469.
- [9] 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(增1):30-34.
- [10] 王 丹,刘 霞. 山梨酸钾在红豆杉开放式组织培养中的应用[J]. 安徽农业科学,2010,38(2):634-635.
- [11] 王赵玉,张健雄,户新宇,等. 抑菌剂在开放式植物组织培养中的应用研究[J]. 北方园艺,2012(18):125-127.
- [12] 王 春. 医用抗生素在马铃薯组织培养中的抑菌效应研究[J]. 甘肃农业科技,2004(10):15-16.
- [13] 阎志红,刘文革,赵胜杰,等. 青霉素和乳酸对西瓜组织培养中细菌污染的抑制作用[J]. 长江蔬菜,2009(18):21-23.
- [14] 简 兴,王米力,石大兴. 红掌组培苗继代过程中细菌污染的防治试验[J]. 亚热带植物科学,2003,32(2):52-54.
- [15] 张 伟. 盆栽红掌离体快繁简化培养基的研究[J]. 信阳农业高等专科学校学报,2012,22(2):102-106.
- [16] 曹善东,李桂新. MS 培养基中不同浓度有机物对草莓脱毒苗繁殖系数的影响[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2004,35(1):32-35.
- [17] 张清霞,杨晓云,张淑霞,等. 基因型和培养基中有机物变化对大白菜花药培养的影响[C]. 中国园艺学会十字花科蔬菜分会第六届学术研讨会暨新品种展示会论文集,2008:296-300.