

# 林木植物组织培养及存在问题的研究进展

黄烈健, 王 鸿

(中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520)

**摘要:** 从外植体选择及分化途径、影响增殖、生根的主要因素三方面, 概述了近年来林木植物组培的研究进展, 外植体3种分化途径(腋芽萌发途径、间接器官发生途径、体细胞发生途径)有其相应的最适外植体类型, 林木组培首选腋芽萌发途径。培养基和植物生长调节剂是影响增殖的两大因素, 对培养基的探索已从对林木植物组培常用培养基的筛选发展到无糖培养基的探索, 出现了光自养、开放组培等概念; 植物生长调节剂是生根的关键因素, 外源激素与内源激素的相互作用对增殖有较大影响。阐述了组培中褐化、玻璃化、污染三大难题的起因和解决措施, 对褐化和玻璃化的研究主要集中在外植体的生理状态和培养环境方面, 提出无糖组培通过对培养环境进行改善, 有望改善褐化、玻璃化问题; 传统组培希望从无菌技术层面解决污染难题, 这也造成了组培成本偏高的问题, 进而对开放组培和无糖组培的探索, 通过抑菌剂的添加及糖的剔除有望降低组培对无菌操作的要求。随着组培技术的发展, 在抑菌剂加入的条件下, 不进行高温高压灭菌, 进行开放式的组培; 利用植物自生的光合能力, 剔除培养基中的蔗糖, 同时改变光照条件、培养环境中的CO<sub>2</sub>浓度、湿度, 以促进外植体光自养微繁殖生长; 二者均着眼于降低组培成本, 简化组培程序, 有望使组培技术得到革新。本文对林木组织培养研究进展进行综述, 为今后开展林木植物组织培养技术的研究提供重要参考。

**关键词:** 林木植物; 组织培养; 开放组培; 研究进展

中图分类号: S722.3<sup>+</sup>7

文献标识码: A

## Advances in Tissue Culture Techniques of Trees and the Problems Existed

HUANG Lie-jian, WANG Hong

(Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

**Abstract:** The advances in forest plant tissue culture in recent years are reviewed from the aspects of explant selection, explant differentiation pathway, and the factors that have effects on proliferation and rooting in the process of tissue culture. There are three differentiation pathways (axillary bud germination, indirect organogenesis and somatic embryogenesis), in which the axillary bud germination is popularity. It is necessary to choose different kind of explant according to the differentiation pathway. The culture medium and plant growth regulator are the main factors influencing the proliferate. The study on culture medium has shifted from the selection of general medium to culture medium without sucrose, and the concepts of photoautotrophic culture and open tissue culture emerged. Plant growth regulator is the critical factor for rooting. The interaction of endogenous hormone and exogenous hormones has great influence on proliferation. The causes and solutions of vitrification, browning and pollution in tissue culture were explained. Studying on vitrification and browning focused on the physiological state and culture environment of explant. It is suggested that tissue culture without sucrose could less the vitrification and browning by improvement of culture environment. Traditional culture focuses on solving the pollution problem by aseptic technique, resulting in high cost. The new tissue culture could lower the requirement of aseptic technique by adding bacteriostats and taking

out sucrose. Open culture without high temperature and pressure sterilization under the adding of bacteriostats. Photoautotrophic culture which making use of the photosynthetic capacity of cultured explants, reducing the concentration of sucrose, and adjusting the light conditions, concentration of  $\text{CO}_2$ , and moisture is another method for tissue culture. Both focus on reducing cost and simplifying culture procedure.

**Keywords:** tree plant; tissue culture; opening tissue culture; advances

自1902年 Haberlandt 提出细胞全能性理论以来,以此为理论基础的植物组织培养技术相关研究,至今已开展有100多年,逐渐得到完善并趋于成熟,其应用范围也越来越广泛。长期以来,对植物组织培养的研究主要集中在:外植体的选择,培养基的完善,确定适宜的激素配比以提高增殖率,组培苗的生理学研究及不同的离体培养途径等研究<sup>[1-5]</sup>。我国植物组织培养研究起步较早,最早的林木组培是欧洲赤松(*Pinus sylvestris* Linn.)的胚胎培养,到20世纪70年代以后,在一些领域的研究已处于国际先进水平。与花卉、草本植物相比,林木植物由于其自身特点(生长周期长),在组培研究中仍存在一些难题(如:继代增殖培养中的褐化、玻璃化,生根困难树种的生根问题、移植存活率低,组培成本居高不下等)较难克服,并且至今仍有很多树种无法通过组培技术进行繁殖,这些都是木本植物组培产业化推广应用难度较大的重要原因。

20世纪70年代末至80年代初,有学者提出改善组培苗生长环境的观点,从这一角度思考解决组培难题的方法,至80年代末以后引起普遍重视,并开展了实质性研究<sup>[1]</sup>,进而促进在对组培苗生长环境研究之上的新型组培技术不断出现,如 Kozai 等<sup>[6-7]</sup>提出的光自养微繁殖理论(Photoautotrophic micropropagation)。无糖组培技术于1997年传入我国,中国农业科学院、中国农业大学、南京农业大学等单位开展了相关探索研究<sup>[8]</sup>。目前,开放组培和光自养微繁殖还处于探索阶段<sup>[9-15]</sup>,多见于农作物种苗生产。二者将是林木组培技术的重要发展方向,这需要林木研究者不断开展其相关基础和技术研究,使林木的组培技术得到新的改善和提高,从而促进其产业化的快速发展。

本文从组培过程中的外植体选择及分化途径、增殖、生根3个方面,详细概述了近年来木本植物传统组培的研究进展,阐述了组培中褐化、玻璃化、污染三大难题的起因和解决措施,对近几年新发展的组培新技术的研究现状也做了简单分析,为今后开展林木植物组织培养新技术的研究提供参考。

## 1 林木植株再生体系研究进展

### 1.1 外植体的选择及分化途径

外植体的选择要考虑不同树种的生理特点、遗传因素等方面,同时,选用哪一种外植体进行植株再生,与其发生途径有极大关系。从众多学者的研究结果看:进行组培时,所选外植体若为茎段,应为中度木质化的材料,不同树种的采条最佳时间不同。不同的发生途径对最佳外植体有一定的要求,这也会因树种的不同而有差异。因此,外植体选择与发生途径应同时考虑,将二者有机地结合起来,才能建立正确有效的组培技术体系。

1.1.1 腋芽萌发途径 多数能进行组培快繁的林木植物,都能以腋芽萌发途径进行组培,其再生植株的遗传变异程度较愈伤组织诱导的小,但茎段腋芽组培的增殖率通常低于愈伤组织诱导丛生芽的增殖率。枣树能以茎段再生植株,却一般不以愈伤组织获得不定芽或是直接诱导胚状体的途径进行快繁<sup>[16]</sup>。通过腋芽萌发途径建立的组培体系中,所选外植体部位及对外植体的处理均是影响培养成功与否的关键因素。对月季(*Rosa chinensis* Jacq.)的研究表明,从枝条中部截取的茎段萌发较快<sup>[17]</sup>;对卷荚相思(*Acacia cincinnata* F. Muell.)外植体诱导研究发现,树冠不同部位对芽诱导萌动率有显著影响,以中上部穗条最好<sup>[18]</sup>。离体芽尖冷藏处理后,其再生率显著提高<sup>[19]</sup>。厚荚相思(*A. crassicarpa* ex Benth.)选用半木质化的嫩茎,且带有饱满即将萌发的腋芽,并进行预培养,以防止大量的培养材料污染和褐化<sup>[20]</sup>。

1.1.2 间接器官发生途径 指通过诱导产生愈伤组织后,分化不定芽或不定根的途径。目前,多数阔叶树都能以此方式再生植株。外植体类型会影响愈伤的诱导,叶片与茎段均能诱导出愈伤组织,叶片诱导出的愈伤组织质量明显优于茎段诱导出的愈伤组织(茎段诱导的愈伤组织易褐化)。大叶相思(*A. auriculaeformis* A. Cunn. ex Benth.)腋芽可成功诱导出丛生芽,而下胚轴和叶等外植体只分化出愈伤组

织,不能诱导丛生芽。张玫瑰<sup>[21]</sup>指出,杉木不同无性系叶片愈伤组织的诱导,在同一 NAA 浓度处理下差异显著。

激素种类及浓度是影响胚性愈伤组织诱导的关键因子之一,低浓度 2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)对柑桔(*Citrus reticulata* Blanco)诱导愈伤组织有促进作用,浓度过高会抑制愈伤的产生和生长<sup>[22]</sup>。刘振林等<sup>[23]</sup>以白花怪柳(*Tamarix androssowii* Litw.)的茎段,在未添加 2,4-D 的培养基中没有产生愈伤组织,而添加 2,4-D 的培养基均可以诱导出愈伤组织。NAA(萘乙酸)和 IAA(吲哚乙酸)诱导产生的愈伤组织较容易分化,NAA 诱导效果更佳。用 NAA、IAA 诱导愈伤组织时,一般需要添加一定量的细胞分裂素<sup>[24-25]</sup>(常用的如:6-BA(6-苄基氨基嘌呤)、TDZ(噻苯隆)或 KT(激动素)),6-BA 最常用,TDZ 生物活性很高,诱导效果高于另二者。2,4-D、BA 和 KT 是影响华北落叶松(*Larix principis-rupprechtii* Mayr.)未成熟胚性愈伤组织发生的主要外源激素<sup>[26]</sup>。

1.1.3 体细胞胚胎发生途径 体细胞胚发生最初在针叶树种离体快繁研究中获得成功,在阔叶树中也取得一定进展。对木本植物体细胞胚发生的研究,主要集中在发生的条件、组织学和生理生化方面。目前,火炬松(*Pinus taeda* Linn.)、月季<sup>[17]</sup>、辐射松(*P. radiata* D. Don)、挪威云杉(*Picea abies* (Linn.) Karst.)、鹅掌楸(*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.)<sup>[27]</sup>、龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)<sup>[28]</sup>、茶(*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.)等木本植物,已建立了通过体细胞胚胎发生途径再生植株的技术。外植体的种类、处理方式均对体细胞胚胎的诱导有影响,体胚发生最好的诱导材料是未成熟胚,其中,胚轴诱导频率最高。应注重对外植体基因型的筛选,同时考虑相应材料所具有的生长和适应性等优良的综合性状。山核桃(*Carya cathayensis* Sarg.)体胚发生的最适宜碳源是蔗糖<sup>[29]</sup>,其体胚的发生与外植体种类及基因型均有关<sup>[30]</sup>。培养基中还原态氮、外源激素的含量对体细胞胚诱导的影响也很重要。

## 1.2 影响增殖的主要因素

1.2.1 培养基 目前,MS、WPM、SH、改良的 Nitsch、CM 等基本培养基,均用于林木组培,其中,MS 和改良 MS 最常用,WPM 也常作为针叶树种的基础培养基。马占相思(*Acacia mangium* Willd.)组培以 ER 或改良 MS 为基础培养基为宜。香樟(*Cin-*

*namomum camphora* (L.) Presl.)<sup>[31]</sup>、银荆(*Acacia dealbata* Link)<sup>[32]</sup>、灰木相思(*A. implexa* Benth.)<sup>[33]</sup>、橡皮树(*Ficus elastica* Roxb. ex. Hornem.)<sup>[34]</sup>通常采用 MS 基本培养基。张志敏等<sup>[35]</sup>发现,青钱柳(*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk.)以 WPM 和改良 MS 培养基效果最佳。

长期以来,培养基中糖的种类及浓度被认为是植物组织培养能否成功的重要因素之一,蔗糖作为碳源,影响到培养物的营养状况和细胞分化,并维持渗透压;然而,有学者认为,糖并不是植物组培中必不可少的物质,外植体上几平方厘米的叶片就能进行一定的光合作用,强光照加上高 CO<sub>2</sub> 浓度的条件下,植株完全可以实现光合自养。于是出现了培养基中不加糖的光自养培养技术,但此技术除了改变培养基的成分外,还改变了组培的气体环境和生物环境<sup>[36]</sup>。自此,对培养基的研究已不仅仅是选其适宜的种类,更发展为培养基的无糖、培养基状态及装培养基的容器多方面的探索,以寻求更加适合外植体增殖,工业化生产的培养基及培养环境。

1.2.2 植物生长调节剂 植物愈伤组织分化过程中,IAA 是愈伤组织生长的重要内部因子,其含量高则无性系的增殖速度较高。当加入不同的外源激素,内源激素含量表现出不同的变化。IAA 对内源激素含量的影响最大,IBA 和 NAA 协同作用时,效果远远大于其中任一种激素单独使用的效果。马凤桐等<sup>[37]</sup>对桑树(*Morus alba* L.)枝条的冬芽进行培养,在 MS 培养基中加入 IAA 和 6-BA 诱导产生了愈伤组织和芽的分化。细胞分裂素对月季的茎段芽增殖有影响,细胞分裂素能诱导芽的萌发与生长,CP-PU 利于芽增值系数的提高<sup>[38-39]</sup>。

## 1.3 影响生根的因素

生根起始期细胞分裂会受到 GA 的抑制,表现为根的分化和形成受到抑制(GA<sub>3</sub> 是生根过程中主要的抑制物,生根后,GA<sub>3</sub> 的浓度缓慢提高)。内源细胞分裂素的激活受到外源生长素的抑制,导致根系的生长发育受到影响。内源 IAA 含量在诱导生根的初始阶段,是影响生根率的主要因素,对生根起促进作用。IBA 是影响根粗生长的主要因子,ABT 含量对试管苗生根起抑制作用,影响着试管苗不定根的形成;而一些研究发现,ABT 对植物的不定根形成也有促进作用。牙祖韧等<sup>[40]</sup>指出:与 NAA 和 IAA 各个不同浓度处理间生根率差异比较,IBA 各不同浓度处理间的生根率差异最大;IBA 处理的侧根较

粗短;高浓度 ABT 抑制了根的发生。ZR 的含量在根原基形成分化期呈上升趋势,它能促进生根。ZT (玉米素)是天然细胞分裂素,高浓度 ZT 对生根起一定的抑制作用,低浓度的 ZT 有利于生根。西洋杜鹃 (*Rhododendron hybridum* Hort.) 组培苗在培养 60 d 后,生根过程基本完成时 ZT 的含量才有所上升<sup>[41]</sup>。

目前的研究普遍认为,植物的生长过程是植物内源激素水平及各激素间的平衡问题;在植物诱导生根中,内外源激素之间存在相互作用,外源激素与内源激素的种类和水平有密切关系<sup>[42-43]</sup>。目前,对添加的外源激素是否刺激或抑制了某些内源激素的变化及其作用机制、对各种激素间比例关系问题的探讨成为热点。

除外源激素种类及浓度外,蔗糖含量和基本培养基也对植物内源激素的调控产生影响,三者不同组合,共同作用,引起植物生理生化的变化。使用适宜的培养基,内源激素的含量会趋于平衡,此时表现出较好的生根效果。黄烈健等<sup>[44]</sup>发现,1/2 MS + IBA 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup>对马大杂种相思 (*A. mangium* × *A. auriculiformis* Cunn. ex Bench.) 生根的效果较好;但三者共同作用的机理尚不明确,尤其是关于蔗糖浓度、基本培养基二者对外源激素作用的影响研究甚少。

## 2 组培存在的主要问题

### 2.1 褐化

褐化又称酚污染,培养物的再分化和外植体的脱分化进程均会受到严重影响,是组培中存在的三大难题之一,也是木本植物组织培养能否取得成功的重要因素。褐化分为酶促褐化(更常见)和非酶促褐化。正常植物组织细胞内,多酚类物质与多酚氧化酶是互不接触的,故而不会发生褐化。切割后的植物伤口处,分泌的酚类化合物发生氧化反应后形成醌类化合物,在酪氨酸酶的作用下,它与培养材料中的蛋白质发生聚合,导致其他酶系统的失活,代谢紊乱,影响植物生长。非酶促褐化,则不会有酚类物质的产生,主要是不利环境条件(如:温度)引起细胞的程序性死亡或细胞坏死。

外植体材料、培养基、培养条件是影响褐化发生的重要因子。

2.1.1 外植体材料 外植体材料的基因型、年龄、取材时间、部位、大小等都与外植体褐化有密切关

系。不同物种、同物种的不同品种褐化程度差异很大<sup>[45]</sup>;高度分化的组织(茎尖、叶片)易褐化,年龄越老、木质化程度越高的外植体褐化越严重,而幼龄材料褐化程度则一般较轻<sup>[46-48]</sup>;温度影响着多酚氧化酶的活性,木本植物于温度较低的冬春季取材褐化率低;一般越小的外植体,其褐化也越严重,故而选取适宜大小的外植体可降低褐化率。红豆杉 (*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.) 愈伤组织的继代以 0.7 ~ 0.8 cm 较适宜,过大或过小都易发生褐化<sup>[49]</sup>。梨 (*Pyrus serrulata* Rehd.) 茎尖作为外植体时,以 7 ~ 15 mm 较适宜;而外植体消毒时间越长,褐化率越高<sup>[50]</sup>。

2.1.2 培养基 培养基的成分、状态、硬度、pH 值,糖的种类及含量,都对外植体褐化率有影响。低无机盐浓度有益于褐化率的降低,过高的无机盐浓度则会加剧褐化。茶树 (*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.)<sup>[51]</sup>、桑树<sup>[52]</sup>、白掌 (*Spathiphyllum kochii* Engl. et Krause)<sup>[53]</sup>、苹果梨<sup>[54]</sup>、番荔枝 (*Annona squamosa* Linn.)<sup>[55]</sup>等木本植物,在 1/2 MS 或 1/2 DKW 培养基上,褐化率较低;黑莓 (*Rubus fruticosus* L.)<sup>[56]</sup>、银杏 (*Ginkgo biloba* Linn.)<sup>[57]</sup>等在 MS 培养基上,褐化得到抑制。

防止褐化纸板培养基最好,固体培养基最差,液体培养基和半固体培养基居中<sup>[54]</sup>。当培养基为液体时,培养过程中分泌的有毒物质扩散,在纸板培养基中较快,并且纸板培养基的滤纸条有吸附作用可进一步减轻褐化<sup>[58]</sup>;同理,培养基硬度也会影响褐化率,培养基硬度变大,褐化率随之降低<sup>[52]</sup>。培养基的酸碱度与硬度有相关性,过高的 pH 值常引起严重的褐化,pH 值降低,多酚氧化酶活性和底物利用率随之降低,从而抑制褐化<sup>[59]</sup>;故可通过降低 pH 值,适当增加琼脂量来抑制褐化。糖的多少主要影响褐化的程度,糖的种类以葡萄糖或果糖为宜,蔗糖较差,麦芽糖居中<sup>[60]</sup>;糖的量以适宜为好,过多过少都可引起褐化加重<sup>[61]</sup>。

2.1.3 培养条件 培养条件中,温度是重要因子,它能直接影响植物体内的酶活性,组织褐化受其影响较大。低温导致酶(如 PPO)活性降低<sup>[62]</sup>,褐化减弱;高温时酶活性增强,氧化速度加快,褐化加剧,从低温转入常温时褐化率增加<sup>[63]</sup>。光照条件也影响褐化现象的发生,暗处理能明显降低发生几率并推迟褐化发生的时间<sup>[52]</sup>。

木本植物由于其本身富含木质素、单宁、色素等

物质,褐化较草本植物严重。目前的研究主要从培养基的选择、状态、pH 值、硬度,外植体的选择和处理以及吸附剂、抗褐化剂和激素的添加等方面抑制褐化的发生。对组培褐化机理进行深入研究,希望从根本上使其减轻,并得到有效控制。近年来备受关注的无糖组织培养,有望为解决褐化问题提供新的思路<sup>[64]</sup>。

## 2.2 玻璃化

玻璃化苗表现为生理状态失调,叶片纵向卷曲或肿胀,叶易碎,叶片表皮角质层蜡质缺少,苗含水量高,营养物质含量少、分化能力低,难增殖成芽,生根成苗、存活率极低。目前,已报道 80 多种植物组培时出现玻璃化苗,其中,草本多于木本<sup>[65-66]</sup>。

影响玻璃化苗发生的因素包括:外植体材料与培养环境(光照、温度、湿度、培养基成分)。外植体材料的种类和类型显著影响玻璃苗的发生;自然光照对玻璃化有抑制作用,因为自然光中的紫外线能加快木质化,促进苗成熟<sup>[67]</sup>,但光照时间过长,将引起试管苗玻璃化加剧<sup>[68]</sup>。光照条件对玻璃化的影响机理以及影响程度,还有待进一步研究。一般认为,对培养温度进行调控,加大昼夜温差可以消除玻璃化现象,低温状态能防止玻璃苗形成,并使部分已玻璃化的苗恢复到正常状态<sup>[65]</sup>;培养环境的湿度是影响玻璃化的关键因子之一,培养空间相对湿度升高容易出现玻璃化苗<sup>[69]</sup>。不适宜的封口材料会造成透气困难,导致培养瓶内湿度升高,棉花及透气膜透气效果均优于塑料膜,能有效减少玻璃苗<sup>[65]</sup>。光自养培养从改变组培环境的角度出发,采用大型容器,调节容器内湿度和 CO<sub>2</sub> 浓度,最终使植物生长的环境更接近于自然的生长环境,苗的玻璃化现象能得到改善,苗的质量得到提高。光自养培养方式,有可能为解决玻璃化提供一个极优的途径。MS 培养基能有效抑制苗的玻璃化, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 浓度则会加重苗的玻璃化现象,蔗糖浓度与玻璃化呈负相关<sup>[65]</sup>。外源细胞分裂素易导致玻璃化,细胞分裂素浓度与玻璃化率成正相关,其中,6-BA 的影响大于 ZT 和 KT。培养基酸碱度对玻璃化也有影响,酸性的培养条件能抑制褐变发生<sup>[70]</sup>。培养基的琼脂浓度与培养基硬度有关,故而能影响瓶内湿度,固体培养优于液体培养;也有一些实验表明,玻璃化与琼脂浓度关系不大,可能是不同植物对琼脂浓度敏感度不同,琼脂浓度对玻璃化的影响还待进一步从玻璃化机制角度研究<sup>[66]</sup>。

目前认为,组培苗玻璃化是苗适应性生理问题,自然界并未发现玻璃化的陆生植物,多数是茎尖或茎段的不定芽,极少玻璃苗来自于愈伤组织的再生芽,已长成的组织、器官不会出现玻璃化,目前未见玻璃化的发生与遗传有直接关系的报道<sup>[66]</sup>。关于玻璃化机制的研究,主要集中在培养过程中水势的影响、以细胞分裂素为主的激素平衡问题、矿质元素平衡供应问题等方面。关于玻璃化现象,不同植物有不同的起因,但最终都导致木质素合成受阻,细胞分化受到抑制。不同原因为何均导致木质素合成受阻,是研究植物玻璃化的核心问题<sup>[70]</sup>。

## 2.3 污染

污染是组培中常出现的,材料一旦污染,势必导致培养的失败。为防止污染发生,从选材和接种前准备、接种及培养阶段都投入了大量的人力、物力,一旦发生污染,损失会较大。污染分为接种前污染和接种后污染。接种前污染主要是接种人员自身带菌、接种工具带菌和接种环境含菌量高造成。接种后污染主要原因有:接种室或超净工作台不清洁,外植体消毒不彻底或外植体内生菌较多,培养中一系列转接操作不规范带入杂菌等。

克服接种前污染需接种员严格操作,定期对接种室进行消毒。用 70% 的酒精喷雾降尘消毒,消毒水擦拭接种室墙壁、地面、工作台等;紫外线照射消毒;甲醛加少量的高锰酸钾熏蒸灭菌均可<sup>[71]</sup>。

对于接种后污染,主要从外植体的选择和处理等方面进行预防。植物的胚是较好的选择;以茎尖为外植体时,以枝条室内培养后新长抽的条为外植体;以茎段为外植体时通常会探索不同的灭菌策略,选择合适的消毒方法和消毒剂,进行多次灭菌等。植物内生菌导致的污染,通常在培养基中加入适量的抗生素。

有学者在对光自养培养探索的过程中,提出开放式光自养培养技术,即在培养基无糖的情况下,在培养基中加入适宜的抑菌剂,以简化培养过程中的灭菌程序<sup>[13]</sup>。实验证明,尽管培养瓶内会产生少量菌体,但完全不能构成污染,外植体仍可生长<sup>[72]</sup>。这将是组培技术实质性发展的重大突破,使组培成本更低,产业化也将更加容易。

## 2.4 成本高

组培虽能在一些植物快繁上实现较好的效益,做到产业化,但总体上看,目前组培育苗还处在高成本的阶段。培养基、蔗糖、能耗、劳动力均包括在组

培成本预算内。同时,传统组培的增值系数低,出苗率不高,苗驯化困难,最终造成成本偏高。如何改进这些技术环节,降低成本,是组培技术研究的一个重要课题,如组培过程中使用的蔗糖完全可以用普通葡萄糖代替,蒸馏水可用自来水代替。

## 2.5 配套设施不健全

与国外相比,国内的组培自动化程度还很低,多数操作还是人工。研究者也很少关注对自动化技术、配套设施的研究。研发整套植物组培自动化生产设备,建立、健全培养室与温室相配套的生产体系,也将是组培技术研究的未来方向。

## 3 组培新技术

植物组织培养新技术主要包括:植物开放式组织培养、光自养培养技术(即无糖培养技术)和建立在前二者之上的开放式光自养微繁技术。

植物无糖组培技术是利用小植株的光自养能力进行无糖培养,该技术出现已近20年。由于培养基中不含蔗糖,能有效预防污染,还能显著促进试管苗生长,提高苗质量,增强试管苗的生根能力,提高驯化出苗成功率;同时降低组培成本,为更多植物实现组培产业化成为可能。

无糖培养主要利用外植体的光自养能力,与光合作用有直接关系的 $\text{CO}_2$ 浓度和光照条件是影响无糖组培的关键因子。陈本学<sup>[73]</sup>指出,珍珠相思(*Acacia podalyriifolia* A. Cunn.)光自养生根培养时,对培养微环境中的 $\text{CO}_2$ 浓度进行控制,生根率受其影响显著。当容器中 $\text{CO}_2$ 的浓度高于补偿点时,提高光强可改善试管苗的光合作用并促进苗的生长发育。光照条件包括光照强度和光质。丁昌国等<sup>[13]</sup>对黑木相思的无糖培养研究发现,培养初期光照强度应较低,之后大幅度提高光强,植株的生根率和干质量都会增加。草本植物在无糖培养过程中,红光可促进叶片生长,但阻碍叶绿素的合成,蓝光的作用则相反<sup>[74]</sup>。木本植物在无糖培养过程中,关于光质方面的研究未见报道。此外,培养容器也影响无糖组培,以大型培养容器为宜。容器容积大,空气流通性好(可促进苗生长),相对湿度小(可提高苗质量)。许多学者研究使用高分子膜材料能否改善培养容器效能,发现这类材料普遍透气性高,与玻璃容器相比,可极大地改善容器内外的气体交换情况<sup>[75]</sup>。

植物开放式组织培养是通过使用抗菌剂,使培

养不需要严格的无菌环境(而是在开放、自然的有菌环境中进行,不需使用灭菌锅和超净工作台,组培环节得到简化,从而降低成本<sup>[76]</sup>),使带菌组培、培养基工业化生产、自然光条件下培养成为可能。进行开放式组培的关键是找到适宜的抑菌剂,但寻找效果好的抑菌剂很困难,这是目前开放组培的关键难题。不同植物有其适宜的抑菌剂种类、组合方式及浓度。崔刚等<sup>[76]</sup>遵循中医学理论,从植物中提取广谱性抗菌活性物质,并做了大量试验确定其有效浓度和使用方法,取得了理想的结果。抑菌剂对组培苗的生长发育是否有影响,还有待于从组培苗的生理生化角度予以阐明;抑菌剂是否导致变异发生,使用抑菌剂时激素水平是否需要做相应调整,这都急需进行深入研究阐明<sup>[77]</sup>。

开放式光自养微繁技术,即为无糖与开放相结合的组培方法,在无糖组培的容器中、开放培养环境下,在培养基中加入广谱抗菌剂,省去严格的无菌操作,同时使培养环境得到改善,兼有无糖组培和开放组培的特点及优点。

对于光自养培养,光照条件(光照强度、波长、光质、光照时间、频率、周期)对植物生长、发育和形态影响的了解还不够详细,自动化程度还很低,尚未建立能满足商品化生产的自动化生产系统。前期投入较大,对设备的要求相对较高。未来的工作应深入开展光自养微繁殖生态环境系统的研究,利用新型材料,自动化设备,实现对培养环境中温、光、气、水的自动化调控,建立高自动化水平、生产规模庞大的组培快繁体系<sup>[78]</sup>。

## 4 展望

开展林木植物的组培快繁技术体系研究,对促进林木植物的良种选育,为生产推广种植提供大量的优质苗木,均具有非常重要的意义。许多林木植物现已成功建立了组培快繁体系,但受培养过程中褐化、玻璃化及污染等的影响,造成生产成本较高,严重影响技术的推广,甚至无法实现工业化生产。通过对影响增殖、生根的因素进行深入研究,使组培技术不断得到完善;同时,植物组培新方法的出现,为林木组培技术的研究及发展提供了很好的机遇。

虽然,目前植物组培新技术还未成熟,且多见于草本植物的研究;在木本植物方面,仅见杉木(*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.)<sup>[79]</sup>、桉树(*Eucalyptus robusta* Smith)<sup>[80]</sup>、马占相思<sup>[81]</sup>等少数树种

在生根培养阶段的光自养或开放式光自养研究报道。尽管目前还未建立完整的关于林木光自养或开放式光自养技术体系,但已有的研究实例,已为今后林木组培新技术的发展奠定了重要基础。

开放式组织培养、光自养培养技术(即无糖培养技术)和建立在前二者之上的开放式光自养微繁技术,其核心是通过使用抗菌剂使培养不需要严格的无菌环境,而是在开放、自然的有菌环境中进行,在提高组培效率的同时降低生产成本,为更多植物实现组培产业化成为可能;但这又带来新问题:由于抗菌剂的使用,在组培过程中,组培苗受抗菌剂的影响表现为生长较缓慢,增殖倍数也相对较低,这对组培新技术体系的建立不利。因此,筛选合适的抗菌剂,并研究其对组培苗生长影响的生理机理及分子机理,减轻对组培苗生长的影响,从而建立具有较高增殖倍数和生根率的高效组培技术体系,将是今后开展林木组培新技术研究的重要课题。

笔者相信,组培新技术所具有的高研究价值和广阔发展前景,随着其不断的建立和完善,林木组培产业化将会加速发展。

## 参考文献:

[1] 李盟,高亦珂. 植物组织培养新技术研究进展[J]. 广东农业科学, 2009(3):152-154.

[2] 施琼,胡峰,黄烈健,等. 马大杂种相思腋芽高效组培增殖体系[J]. 林业科学, 2014, 50(6): 55-60.

[3] 胡峰,施琼,黄烈健. 马占相思和大叶相思优树组培不定根诱导研究[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2015, 39(2):57-62.

[4] 胡峰,施琼,黄烈健. 厚荚相思(*Acacia crassicaarpa*)腋芽组培快繁技术体系研究[J]. 植物研究, 2015, 35(2):179-184.

[5] 施琼,胡峰,黄烈健,等. 马大杂种相思组培快繁技术[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(2):79-84.

[6] Kozai T, Iwanami Y. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of Carnation[J]. Japan Soc Hort Sci, 1988, 57(2):279-278.

[7] Kozai T, Koyoma Y, Watanabe I. Multiplication of potato plantlets in vitro with sugar-free medium under high photosynthetic photon flux[J]. Acta Horticulturae, 1988, 230:121-127.

[8] 周炜,曲英华. 无糖组培技术在我国的研究进展[J]. 农村实用工程技术(温室园艺), 2005(7):24-25.

[9] 卢加举, ArakTira-Umphon, 张正学, 等. “黔兴1号”抑菌剂在甘蔗开放组培中的影响[J]. 农业科学与技术(英文版), 2014, 15(9):1478-1481.

[10] 陈英,张西英,刘江娜. SDIC在马铃薯脱毒组培苗开放式快繁生产中的应用试验研究[J]. 新疆农垦科技, 2014, 37(11):38-40.

[11] 刘福平. 植物抗菌组培中抗菌剂应用的研究方法[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(4):910-915.

[12] 刘丽丽. 东北红豆杉开放式组培育苗关键技术研究[D]. 吉林:吉林大学, 2013:1-91.

[13] 丁国昌,高淑慧,林思祖,等. 黑木相思开放式光自养微繁殖的研究[J]. 福建林学院学报, 2010, 30(1):11-14.

[14] 管道平,刘文科,杨其长,等. 植物光自养培养箱 CO<sub>2</sub> 自动调控系统的设计与试验[J]. 林业科学, 2007, 43(5):116-119.

[15] 占爱瑶,詹亚光. 植物组织培养新技术:光自养微繁[J]. 生物技术通报, 2007(4):85-89.

[16] 王玫瑞,刘孟军,代丽. 枣树组织培养研究进展[J]. 果树学报, 2002, 19(5):336-339.

[17] 刘会超,郭丽娟,贾文庆,等. 月季组织培养研究进展[J]. 河南科技学院学报:自然科学版, 2007, 35(3)45-47.

[18] 汪长水. 卷荚相思组培快繁技术研究[J]. 福建林业科技, 2009, 36(3):92-97.

[19] Adela H, Ina P. Plant regeneration from Rosa shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method[J]. Plant Cell, Tissue and Organ culture, 2006, 84(2):100129-100137.

[20] 赖家业,周传明,叶春生,等. 厚荚相思组织培养与快速繁殖[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2003, 40(5):982-985.

[21] 张玫瑰. 杉木优良无性系组织培养及再生体系研究[D]. 福建:福建农林大学, 2013:1-63.

[22] 罗君琴,徐建国,王平. 不同培养条件对柑橘胚性愈伤组织离体诱导的影响[J]. 北方园艺, 2013, 37(13):125-127.

[23] 刘振林,潘玉霞,姬玉,等. 百花怪柳的组培与快繁技术[J]. 技术开发, 2013, 27(5):11-114.

[24] Amutha S, Ganapathi A, Muruganatham M. In vitro organogenesis and plant formation in *Vigna radiate* (L.) Wilczek [J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 2003, 72(2):203-207.

[25] 林娅,郑玉,刘青林. 影响月季愈伤组织诱导和分化的因素[J]. 分子植物育种, 2006, 4(2):223-227.

[26] 韩登媛,李旦,赵健,等. 华北落叶松胚性愈伤组织诱导影响因子的研究[J]. 林业科学研究, 2013, 26(4):454-458.

[27] 陈志,陈金慧,边黎明,等. 杂交鹅掌楸胚性细胞悬浮系的建立[J]. 分子植物育种, 2007, 5(1):137-140.

[28] 李惠华. 龙眼体胚发生过程中激素代谢和信号转导相关基因的克隆与表达[D]. 福建:福建农林大学, 2011:1-223.

[29] 胡恒康,江青梅,张启香,等. 碳源对山核桃体细胞胚发生和植株再生的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2011, 28(6):911-917.

[30] 汤浩茹,王永清,任正隆. 核桃体细胞胚发生与转基因研究进展[J]. 林业科学, 2000, 36(3):102-110.

[31] 邹晖,陈永快,王伟英. 香樟组培快繁技术研究进展[J]. 福建农业科技, 2009(1):71-72.

[32] 陈桂芳,娄利华. 银荆相思组织培养及快繁技术研究[J]. 西南农业大学学报:自然科学版, 2004, 26(2):195-197.

[33] 张祖荣,刘兴良. 灰木相思茎段腋芽的组织培养及植株再生[J]. 西南农业大学学报:自然科学版, 2004, 26(3):291-293.

[34] 徐刚,牟豪杰,汪一婷. 橡皮树组培及成品苗养护[J]. 中国花卉园艺, 2009(4):20-21.

[35] 盛丽莉,史文亚,张志敏. 青钱柳组织培养技术研究进展[J]. 西南林业大学学报, 2011, 31(2):84-89.

[36] 高淑慧. 厚荚相思和黑木相思光自养微繁殖技术的研究[D]. 福建:福建农林大学, 2007:1-46.

[37] 马凤桐,刘玉荣. 成龄桑树冬芽的组织培养[J]. 植物生理学



通讯, 1985, 9(1):34-35.

- [38] Veneta K T, Hendrik J V T, Elena Y. Role of phenylurea cytokine in CPPU in apical dominance release in In vitro cultured rosa hybrid[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2000, 19(2): 232-237.
- [39] Niels B, Kell K. Changes in concentrations of cytokinins (CKs) in root and axillary bud tissue of miniature rose suggest that local CK biosynthesis and zeatin-type CKs play important roles in axillary bud growth[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2005, 24(3): 238-250.
- [40] 牙祖初, 韦鹏霄, 岑秀芬, 等. 不同激素处理对厚荚相思组培苗生根及移栽效应[J]. 广西林业科学, 2007, 36(1):53-64.
- [41] 陈凌艳, 郑宇, 陈礼光, 等. 西洋杜鹃组培苗生根培养及其内源激素含量变化的研究[J]. 福建林学院学报, 2011, 31(2):131-135.
- [42] 高红宾, 王朋飞, 刁绍启, 等. 6-BA 对酸樱桃组培苗 4 种内源激素质量分数动态变化的影响[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(7): 46-48.
- [43] 李代丽, 康向阳. 植物愈伤组织培养中内外源激素效应的研究现状与展望[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(3):546-548.
- [44] 黄烈健, 陈祖旭, 张赛群. 马占相思优树组培快繁技术研究[J]. 林业科学研究, 2012, 25(2):227-230.
- [45] 谢志亮, 吴振旺. 木本植物组培褐化研究进展[J]. 中国南方果树, 2013, 42(5):42-46.
- [46] 马莉贞. 植物组织培养中褐变现象的研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(15):3583-3584.
- [47] Gannoun S, Lionakis S M, Gempopoulos D, et al. Aspects of in vitro culture of *Pistacia terebinthus* and *Pistacia vera*[J]. Acta Horticulturae, 1995, 419:201-206.
- [48] 邹英宁, 李国怀, 吴强盛. 中国李组织培养过程中褐变的抑制研究[J]. 山地农业生物学报, 2007, 26(6):508-512.
- [49] 李冬杰, 张进献, 魏景芳, 等. 培养基和培养条件与红豆杉细胞培养中褐化的关系[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(1):95-98.
- [50] 刘杰, 张玉星, 董祯. 梨组培褐化及抗褐措施研究进展[J]. 河北林果研究, 2008, 23(2):195-199.
- [51] 黄燕芬, 周国兰, 赵华富. 降低茶树组织培养中外植体褐化程度的研究[J]. 西南农业学报, 2009, 22(5):1492-1495.
- [52] 邱璐, 陈善娜, 夏跃明, 等. 桑树组织培养中褐化问题的研究[J]. 云南大学学报:自然科学版, 2000, 22(1):76-78.
- [53] 毛红俊, 孔祥生, 张妙霞. 香水白掌离体培养褐化反应的初步研究[J]. 北方园艺, 2010, 34(10):182-184.
- [54] 陈蕾, 曹后男, 宗成文, 等. 降低苹果梨组培过程中外植体褐化的研究[J]. 北方园艺, 2008, 32(10):139-142.
- [55] 张振霞, 郑玉忠. 番荔枝组培中的褐化及防止措施研究[J]. 中国南方果树, 2009, 38(3):41-42.
- [56] 王小敏, 吴文龙, 李海燕, 等. 黑莓外植体褐化影响因素分析及适宜培养条件筛选[J]. 植物资源与环境学报, 2009, 18(3):63-68.
- [57] 张明文, 陈力耕. 银杏组织培养中控制褐化的研究[J]. 中国南方果树, 2003, 32(3):51-52.
- [58] 陈斌, 杨娟. 红豆杉细胞继代培养防褐变措施的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(4):8-11.
- [59] 王东霞, 李长杰. 如何对抗植物组培中的组织褐变[J]. 中国花卉盆景, 2002, 29(2):17.
- [60] 盛长忠, 王淑芳, 王宁宁, 等. 红豆杉愈伤组织培养中褐变现象的初探[J]. 南开大学学报, 2001, 34(4):120-122.
- [61] 闫桂琴, 张伟, 张艳芳. 翅果油树脱毒试管苗的组织培养技术研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(7):1297-1303.
- [62] 熊丽, 吴丽芳. 观赏花卉的组织培养与大规模生产[M]. 北京:化学工业出版社, 2003.
- [63] 刘洋, 苏淑钗, 冷平生, 等. 阿月浑子外植体褐变抑制方法[J]. 果树学报, 2007, 24(3):393-396.
- [64] 张宏平, 姬爱国, 和林涛. 植物组培快繁褐化现象研究进展[J]. 农业工程, 2013, 3(5):128-130.
- [65] 陈兵先, 黄宝灵, 吕成群, 等. 植物组织培养试管苗玻璃化现象研究进展[J]. 林业科技开发, 2011, 25(1):1-5.
- [66] 蔡祖国, 徐小彪, 周会萍. 植物组织培养中的玻璃化现象及其预防[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(3):353-355.
- [67] Phan C T, Hegedus P. Possible metabolic basis for the development anomaly observed in vitro culture, called 'vitreous plants' [J]. Plant Cell Tissue Org Cult, 1986, 6(1):83-94.
- [68] 卢兴霞, 柴慈江, 张婷, 等. 枸杞试管苗玻璃化影响因素的研究[J]. 北方园艺, 2014, 38(18):103-106.
- [69] 邵龙珠, 赵淑君, 王淑荣, 等. 植物组织培养中的常见问题与解决技术措施[J]. 林业勘查设计, 2012(1):49-51.
- [70] 黄海波, 谈明. 植物组织培养中存在的主要问题与对策[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(12):2632-2633.
- [71] 巩健. 植物组织培养快繁中存在的主要问题及防止措施[J]. 科技信息, 2008(3):214-215.
- [72] 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.
- [73] 陈本学. 珍珠相思光自养微繁殖技术再生体系的建立[D]. 福建:福建农林大学, 2008:1-45.
- [74] Nhut D T, Takamura T, Watanabe H, et al. Artificial light source using light-emitting diodes (LEDs) in the efficient micropropagation of *Spathiphyllum* plantlets[J]. Acta Horticulturae (ISHS), 2005, 692:137-142.
- [75] 牟宁宁, 高亦珂. 植物无糖组培技术研究进展[J]. 林业科技开发, 2007, 21(1):10-12.
- [76] 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.
- [77] 王家庆, 李晓燕. 植物组培新方向—开放组培与无糖暴露组培研究概况[J]. 辽宁农业科学, 2007(1):44-45.
- [78] 陈本学, 林思祖, 曹光球. 观赏多花相思光自养生根培养研究[J]. 北方园艺, 2012, 36(23):71-75.
- [79] 仇金维. 杉木优良无性系光自养微繁殖技术[D]. 福建:福建农林大学, 2012:1-87.
- [80] 徐景云. 不同光自养条件下根际微环境对桉树 (*Eucalyptus* sp.) 组培不定芽生根的影响研究[D]. 福建:福建农林大学, 2010:1-50.
- [81] 丁昌国, 林思祖, 陈宇, 等. 基质径级和 NPK 水平对马占相思光自养幼苗的影响[J]. 福建农林大学学报:自然科学版, 2012, 41(3):238-242.

(责任编辑:徐玉秀)