

药用植物 生物技术

YAOYONG ZHIWU
SHENGWU JISHU

薛建平 柳俊 蒋细旺 主编
司怀军 田振东 张爱民 副主编
谢从华 主审

中国科学技术大学出版社

S567.01

1

淮北煤炭师范学院学术专著基金资助项目

药用植物生物技术

主 编 薛建平 柳 俊 蒋细旺
副主编 司怀军 田振东 张爱民
主 审 谢从华

中国科学技术大学出版社

2006·合肥

内 容 简 介

国内外许多学者利用生物技术,先后在小麦、水稻、玉米、甘薯、马铃薯等主要粮食作物及水果、蔬菜等经济植物方面取得了巨大成就,解决了人民的温饱问题。但长期以来,由于科技投入的不足,药用植物这一宝贵的资源并未得到充分的开发和利用。随着中国加入 WTO,中国的医药界及经济面临着要承付美国等国家高额的知识产权专利费用,在国内两院院士及许多有志之士上书倡议下,国家科技部、国家卫生部、国家发展和改革委员会相继启动了“中药现代化”等重中之重项目,各省相继也把中药现代化作为“十五”重大专项予以启动。但中药现代化的关键是药用植物种质资源及品种选育的现代化,纵观国内外这方面的专著还非常少见。作者结合自己十多年来的科研经验,组织一些专家编著“药用植物生物技术”一书,本书是国内第一部系统论述药用植物生物技术的专著。

全书由 12 章组成。第一章至第三章介绍了药用植物组织培养的基本知识、药用植物离体无性繁殖及离体培养获得无病毒苗方法;第四章至第五章介绍了药用植物原生质体培养、体细胞杂交及花药培养的基本技术和方法;第六章介绍了药用植物多倍体育种技术;第七章系统阐述了药用植物体细胞胚的发生及人工种子技术;第八章介绍了药用植物诱变育种技术;第九章重点阐述了药用植物细胞培养及次生代谢物生产现状及方法;第十章和第十一章分别对药用植物基因工程技术及药用植物种质资源的分子生物学等前沿技术进行了介绍;第十二章阐述了药用植物种质资源的保存的现状与方法。

该书适用于农、林、中医、师范等院校的本科生、研究生及其他相关科研单位从事药用植物生物技术专业的人员阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

药用植物生物技术/薛建平等主编. 合肥:中国科学技术大学出版社,2005.3
ISBN 7-312-01769-X

I. 药… II. 薛… III. 药用植物-生物技术 IV. Q943

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 010357 号

中国科学技术大学出版社 出版发行

(安徽省合肥市金寨路 96 号,邮政编码:230026)

合肥现代印务有限公司

全国新华书店经销

开本:787mm×1092mm/16 印张:23.75 字数:600 千

2005 年 3 月第 1 版 2006 年 9 月第 2 次印刷

印数:1 501—3 000 册

ISBN 7-312-01769-X/Q·44 定价:35.00 元

前言

我国中药材资源丰富,其中约 80% 为野生资源。由于长期过度采伐,资源日渐萎缩。人工栽培又面临品质退化、种子带病与农药残留超标等问题,而且在不同环境中生长的中药材,其活性物质的组成和含量也有差异。所谓道地药材又缺乏科学的检测方法和质量标准。目前常用传统药材约 400 种,其中短缺量占 20% 左右。当今中药现代化和国际化的呼声日益高涨,已列为国家“十五”重中之重的项目“中药现代化科技产业行动计划”已经启动,国家于 2002 年底颁发了“中药现代化纲要”,建立一批优质药材种植基地和实行中药材生产质量管理规范是其中的重要内容之一。中药现代化已引起世人广泛的关注,但这是一项非常复杂、庞大而艰巨的任务,需经几代人的不懈努力才能逐步实现。作为中药现代化的基础和源头的药用植物种质资源和种苗培养现代化是中药现代化必须首先解决的重大课题之一。众所周知,生物技术代表着现代生命科学最新的发展前沿。近年来,生物技术得到了迅速发展,已渗透到生物学科的各个领域,成为生命科学中的重要研究技术和手段之一,并广泛应用于农业、林业、工业和医药业,产生了巨大的经济效益和社会效益,成为当代生命科学中最有生命力的一门学科。

植物生物技术是一门以植物组织和细胞的离体操作为基础的实验性学科。它是以植物组织细胞为基本单位,在离体条件下进行培养、繁殖或人为的精细操作,使细胞的某些生物学特性按人们的意愿发生改变,从而改良品种或创造新物种,或加速繁殖植物个体,或获得有用物质的过程统称为植物生物技术。植物生物技术作为一个由多学科渗透融合而形成的综合技术体系,其发展既依赖于分子生物学、细胞生物学、遗传学和生理学等相关学科理论和技术的进步,同时也能作为这些学科发展的桥梁和载体,促进整个生命科学的发展与进步。目前,利用植物生物技术使得人们可以从细胞组织水平、染色体水平和基因水平对药用植物的遗传基础进行改造和改良,为植物品种改良提供新的强有力的手段。在众多的基础理论研究中,尤其重要的是传统药材中活性成分的化学结构、生物合成途径与参与反应的酶系统、离体植物组织与细胞的生物学特性、药用模式基因组与功能基因组学等内容,借助植物生物技术不仅可以保存和增殖濒危珍稀的传统药材,大量生产高品质的“道地药材”,扩增临床上急需的数量稀少又极有价值的新结构化合物,而且还可以在遗传上改变现存药材的有效成分和附加新的遗传特征,创造新的药用植物种质资源。

重视和加强药用植物生物技术研究,是我国中药现代化的需求,国内外这方面的专著还非常少见。作者结合自己十多年来的科研经验,组织一些专家编著“药用植物生物技术”一书。全书由 12 章组成。第一章至第三章介绍了药用植物组织培养的基本知识、药用植物离体无性繁殖及离体培养获得无病毒苗方法;第四章至第五章介绍了药用植物原生质体培养、体细胞杂交及花药培养的基本技术和方法;第六章介绍了药用植物多倍体育种技术;第七章系统阐述了药用植物体细胞胚的发生及人工种子技术;第八章介绍了药用植物诱变育种技术;第九章重点阐述了药用植物细胞培养及次生代谢物生产现状及方法;第十章和第十一章分别对药用植物基因工程技术及药用植物种质资源的分子生物学等前沿技术进行了介绍;第十二章阐述了药用植物种质资源的保存的现状与方法。

在该专著写作的自始至终,华中农业大学博士生导师谢从华教授给予了大量建设性意见,定稿后在百忙中对全书进行了审校。他严谨的治学态度、渊博的学识、敏捷的思维、奋发向上的攀登精神,将永远激励着我们在今后的教学和科研工作中积极进取。值此专著出版之际,谨向他致以崇高的敬意!

该专著完成的过程中,得到了淮北煤炭师范学院领导和同事们的支持,生物系盛玮和高翔老师在文字编辑方面给予了大量的指导;该专著的出版得到了中国科学技术大学出版社于文良主任的亲切关怀和淮北煤炭师范学院学术专著出版基金的专项资助,在此一并表示衷心的感谢。另外,该专著的完成参考了大量学者的研究成果,尽最大可能一一做了标注,如有遗漏和错误敬请谅解。

另外需要指出的是,一方面药用植物生物技术领域的研究成果日新月异,另一方面编者的水平有限,所以内容上可能尚不尽如人意。此外,尽管我们在文字、图表等方面已十分仔细认真,但难免会有一些错误,敬请读者谅解。同时,也希望读者能将对本书的意见和建议反馈给我们,以便在本书再版时予以相应的修改。

薛建平

2004年10月于淮北

目 录

第一章 药用植物组织培养的基本知识与操作·····	柳 俊 华中农业大学教授,博士 蒋细旺 江汉大学副教授,博士(1)
第二章 药用植物离体无性繁殖方法 ·····	蒋细旺 张爱民 淮北煤炭师范学院实验师(42)
第三章 药用植物离体培养获得无病毒苗·····	蒋细旺(126)
第四章 药用植物原生质体培养和体细胞杂交·····	司怀军 甘肃农业大学副教授,博士 田振东 华中农业大学副教授,博士(142)
第五章 药用植物花药培养和花粉培养·····	司怀军 田振东(176)
第六章 药用植物多倍体育种技术·····	薛建平 淮北煤炭师范学院教授,博士 蒋细旺(191)
第七章 药用植物体细胞胚胎发生和人工种子·····	薛建平 张爱民(201)
第八章 药用植物诱变育种技术·····	薛建平(222)
第九章 药用植物细胞培养及次生代谢物生产·····	薛建平 柳 俊(244)
第十章 药用植物基因工程技术·····	田振东 司怀军(281)
第十一章 分子标记在药用植物种质资源研究中的应用·····	田振东 司怀军(313)
第十二章 药用植物种质资源的保存·····	薛建平(332)
附录一 常用洗液的配制与适用范围·····	柳 俊 薛建平(350)
附录二 常用的培养基配方(浓度单位 mg/L) ·····	柳 俊 薛建平(351)
附录三 药用植物组织培养设施·····	柳 俊 薛建平(361)
附录四 缩写词表·····	柳 俊 薛建平(365)
附录五 植物学名称对照·····	柳 俊 薛建平(366)
附录六 中英文名词对照·····	柳 俊 薛建平(369)

第一章 药用植物组织培养 的基本知识与操作

第一节 药用植物组织培养的定义和相关概念及优越性

一、药用植物组织培养的定义

1903年,美国农业部的 Webber 提出“克隆”(来自希腊语,意指适用于植物繁殖的插条或枝条)术语,源于“Clone”的音译,用以称呼通过无性繁殖得到的植株,是一种重要的生物技术。它既可作名词也可做动词用。当作为名词用时,克隆是指一个无性繁殖系;当作动词用时,克隆则是指利用不同方法产生无性繁殖系所进行的工作。简而言之,克隆作动词用时是指研究或操作过程,作名词用时是指产生的结果。

克隆可根据其研究或操作的对象分为基因克隆、细胞克隆和个体克隆三大类。在植物克隆中,应用最多的是个体克隆,即以原有的细胞或组织或生物个体作为模板,复制出多个与原来模板完全相同的基因或细胞或生物个体来。这就有点像利用复印机复印资料一样,将母本植物放在“复印机”中进行了“复印”。

在长期的生产实践和科学研究中,人们已经掌握了许多克隆技术。“有心栽花花不成,无心插柳柳成荫”诗句中的“插柳”实际上就是一个“克隆”过程,即很早以前人们就知道把柳枝切成小段,插入土中,一段时间后,它就可以长出根来,并逐渐长成一棵与原来柳树一样的小柳树。农民种红薯时,先将一根红薯藤剪成若干小段,然后将每一小段栽插在土里,几天以后,红薯藤就会长出根来,然后逐渐长成一株完整的红薯植株,正常的生长,开花,结实。目前人类利用组织培养技术也能使许多植物的不同组织、细胞器官等再生成一棵完整的植株,其遗传性状与母株一样,这种组织培养技术实际上就是一种克隆技术。

药用植物组织培养(plant tissue culture)即药用植物的无菌培养技术或药用植物的克隆技术,是根据植物细胞具有全能性(totipotency)的理论,利用药用植物体的离体器官、组织或细胞,如根、茎、叶、花、果实、种子、胚、胚珠、子房、花药、花粉以及贮藏器官的薄壁组织、维管束组织等,在无菌和适宜的人工培养基及光照、温度等条件下,能诱导出愈伤组织、不定芽、不定根,最后分化、生长形成完整植株的过程。简言之,即将植物体的一部分,从母体分离出来,在无菌的适宜条件下培养而使之发育成与母体植株相同的新的植物体的技术。由于培养的是脱离植物母体的培养物,在试管内培养,也叫离体培养(in vitro culture)或试管培养。根据培养过程,先是初代培养,再是继代培养。根据培养基的状态,分为固体培养、液体培养,液体培养又有振荡培养、旋转培养和静止培养等。Gamborg 根据培养对象(外植体)的不同,分为器官培养(胚、花药、子房、根和茎的培养等)、分生组织培养、愈伤组织培养、悬浮细胞培养、原生质体培养等。其中愈伤组织培养是最常见的一种培养方式,除茎尖分生组织培养的一部分器官培养以外,其他几种培养形式最终都要经历愈伤组织才能产生再生植株,此外,愈伤组织还常

常是悬浮培养的细胞和原生质体的来源。

中国野生药用植物种质资源非常丰富,目前已知我国药用植物种类涉及 383 科,2309 属,11146 种(含亚种、变种)。已成为中药材的植物有 1000 余种,如人参、天麻、黄连、黄芪、杜仲、厚朴、巴戟天、平贝母、肉苁蓉等。各种药材的数量资源丰富,仅对我国 320 种常用植物类药材的统计,总蕴藏量就达 850 万吨左右。目前全国药材种植面积超过 580 万亩,药材生产基地 600 多个,常年栽培的药材达 200 余种,药用植物资源的开发利用获得了高额利润。如从猪苓中提取的猪苓多糖制成注射剂,用于抗癌辅助治疗,已有一个药厂年产值超过 1 亿元;丹参注射液、复方丹参滴丸、得乐冲剂等也都是高产值、好疗效的产品(胡之璧和刘涤,1999)。

有些从中药中研制出来的药物,其化学结构比较简单,可以用化学合成方法大量生产,如麻黄素、阿托品、天麻素等药物。同科属的植物往往含有化学结构相似的化学成分,因此往往可以按植物的亲缘关系寻找代用品。如紫杉醇(taxol)是 20 世纪 70 年代从短叶红豆杉的树皮中发现的,含量为 0.01%~0.06%。通过研究,在东北红豆杉、浆果红豆杉、云南红豆杉等几种红豆杉属植物中也寻找到紫杉醇,可作为生产紫杉醇的原料。但生产 1kg 紫杉醇要 1000~2000 棵树的树皮为原料,对生态环境破坏严重。为了解决这一问题,目前除了进行大量人工繁殖栽培外,正在探讨用化学合成法、真菌法、组织培养和细胞培养法等生产紫杉醇的可能性,其中植物细胞培养法已取得了明显的进展(梁光义和贺祝英,1999)。

有“活化石”之称的杜仲,其树皮要生长 15 年以上才能剥取,一直是紧缺统管的药材。研究发现,杜仲各部位的化学成分类别基本相同,其中松脂醇二葡萄糖甙为治疗高血压等疾病有效成分;杜仲胶为反式异戊二烯的聚合物,是制造海底电缆和航空航天器轮带的优良材料。1986 年以来,中日两国已发表有关杜仲的专利至少 10 项,如提高杜仲叶得胶率 3%的涡流压碎机,制造天然杜仲流化橡胶工艺,生产低胆固醇和高密度脂蛋白的鹅饲料添加剂,组织培养产生松脂醇二葡萄糖甙和丁香脂醇二葡萄糖甙技术等,现实的和潜在的经济效益显而易见。

但药用植物的蕴藏量是有限的。盲目挖掘,不仅使野生资源日益减少,造成全国经常使用的 400 余种药材每年有 20%的短缺,而且严重破坏了生态环境,使人类遭受到巨大的生命财产损失。迄今,为了解决药用植物的供需矛盾,人们多采用人工栽培的方法扩大药源。但在人工栽培的药用植物中,有不少名贵药材如人参、黄连等生产周期很长,如果以常规方法育种或育苗,需要花费很长时间。另有一些药用植物如贝母(*Fritillaria* spp.)、番红花(*Crocus sativus*)等,因繁殖系数小、耗种量大,导致发展速度很慢且生产成本增加。还有一些药用植物,如地黄(*Rehmannia glutinosa*)、太子参(*Pseudostellaria heterophylla*)等,则因病毒危害导致退化,严重影响了产量和品质。因此人工栽培品种面临的品质退化、农药污染和种子、种苗带病毒等问题,严重影响了对药材品质的保证和控制(于文明和陈明,1998)。

中药的“古老性”和“复杂性”使得我国中药生产加工总体上仍处于与现代科学技术严重脱节状态。因此除了制定有关政策法律,保护占我国药材市场 80%供应量的野生资源以外,还必须找到切实可行的新技术途径彻底改变我国中药生产的落后面貌。通过生物技术中的植物组织培养技术进行药用植物的快速繁殖和生产,具有不受地区、季节与气候限制,便于工厂化生产等优势,同时组织培养中的细胞生长速度要比植物正常生长速度快,接近于分生组织的生长速度,因此利用组织培养手段快速繁殖药用植物种苗,或者利用组织培养或细胞培养手段直接生产药物,对发展我国中医药事业具有十分重要的现实意义。

我国的药用植物组织培养研究,可以追溯到 20 世纪 50 年代。1964 年,罗士韦教授等首先报道了人参组织培养获得成功的研究成果。1983 年,全国第一届药用植物组织培养讨论会

召开,那时全国已有 30 多个单位、100 余人从事药用植物的组织培养研究。1986 年,由我国科学工作者编写的有关专著《药用植物组织培养》问世……到目前为止,我国的科技工作者在药用植物组织培养方面已取得了巨大的成绩,组织培养技术水平也不断提高:如培养方法已从固体、液体、悬浮培养,深层大罐发酵发展到液体连续培养;培养材料日益丰富,从药用植物的根、茎、叶、花、胚、果实、种子等组织或器官,诱导出愈伤组织或冠瘿组织或细胞。

目前药用植物组织培养在中草药中的应用主要有两个方面:一是利用试管微繁生产大量无病毒种苗以满足药用植物人工栽培的需要。二是通过愈伤组织或悬浮细胞的大量培养,从细胞或培养基中直接提取药物,或通过生物转化、酶促反应生产药物。从 20 世纪 90 年代以来的植物药用有效成分国际专利就达 50 多项,其中多为抗病毒、抗癌化合物。近 40 年来我国经离体培养获得试管植株的药用植物至少有 200 种(徐忠东,2001)。从常见的到珍稀濒危植物、民族植物,如云南黑节草、延龄草、高山红景天,藏药——川西漳芽菜、莪术、水母雪莲、星花绣线菊、溪黄草、玉叶金花、辽东葱木、金线莲(*Anoectochilus formosanus*)、白芨(*Bletilla striata*)、番红花(*Crocus sativus*)、铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)等。从生产常用药的植物到具有抗癌、抗病毒等有效成分的植物,如红豆杉、艾、黄杨、狼毒、大戟属、长春花、米仔兰、狗牙花、香榧、绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum*)、苦丁茶(*Bex kudingcha*)、南洋金花(*Daturn metel*)、海巴戟(*Morinda citrifolia*)等。

我国在利用植物组织或细胞的大量培养直接生产药物的研究方面也取得了很大进展。目前从各种培养物中产生的药用成分已有约 200 余种。其中药用成分含量超过或等于原植物的有 30 余种,包括人参皂苷、人参皂苷元、三七皂苷、甘草甜苷、甜叶菊甙、柴胡皂苷、薯蓣皂苷、川芎嗪、地奥配质、地高辛、 β -甲基地高辛、熊果苷、莨菪碱、东莨菪碱、烟碱、小檗碱、阿吗碱、蛇根碱、萝芙木总碱、总异黄酮化合物、呋喃色酮、哈尔明、蒽醌、柴草宁、迷迭香酸、胰岛素、左旋四氢巴马亭、辅酶 Q-10、L-谷氨酰胺、L-色氨酸、蛋白酶抑制剂(蛋白质)等等。这些药物中有的包括了许多种,例如甾醇就有油菜甾醇、谷甾醇、豆甾醇等三种;有的从几种植物组织培养物中可得到同一种高含量的化合物,例如蒽醌就可从狭叶番泻(*Cassia angustifolia*)、尖叶番泻(*C. senna*)、决明(*C. tora*)、海巴戟(*Morinda citrifolia*)、掌叶大黄(*Rheum palmatum*)和猪殃殃(*Galium spp.*)等多种(类)药用植物中得到。研究表明,以干重为基础的粗人参皂苷,在愈伤组织中的含量(21.1%)显著高于天然根(4.1%)。在用作泻剂的药用植物决明的愈伤组织中所含的蒽醌类,如大黄素、大黄酸、大黄甲醚的产量,比整个植株要高 10 倍以上。紫草中的有效成分萘醌类化合物——紫草宁及其衍生物在我国被用来治疗烧伤、皮肤病和痔疮,并具抗肿瘤活性,对获得的高产细胞系进行悬浮培养和发酵培养后发现:其细胞生长的最高月产率达 $22\text{g} \cdot \text{干重}/\text{L}$,色素含量为培养物干重的 17.5%;应用 10L 搅拌式反应器发酵培养,月产率达 $9.47\text{g} \cdot \text{干重}/\text{L}$,色素含量达干重的 14.26%,而通常在完整植株中仅含 1.5% 左右。

我国以组织培养技术为基础的毛状根的培养和增殖技术也在迅速发展,目前已在甘草、丹参、黄芪等多种植物建立了农杆菌转化器官培养系统。在 3、5、10L 容器中培养黄芪毛状根,经 21 天培养产量就可达 $10\text{g} \cdot \text{干重}/\text{L}$ 。黄芪毛状根中皂甙、黄酮、多糖、氨基酸等含量类似于药用黄芪,而且粗皂甙和可溶性多糖的含量还稍高于药用黄芪。另外,以组织培养技术为基础的基因工程的研究,如黄芪毛状根基因工程的研究,也取得了很大进展。

二、药用植物组织培养的相关概念

1. 外植体(explant):从植物体上分离下来的用于离体培养活的材料。

2. 植物细胞全能性(totipotency):指细胞携带着一套完整的基因组并具有产生完整植株的潜在能力。植物细胞全能性为药用植物组织培养的理论基础。

3. 植株再生(plant regeneration):指通过组织培养技术将植物的细胞、组织、器官等培养成完整植株的过程。

4. 无性克隆植株:从愈伤组织、细胞或原生质体再生的植株及其继代繁殖新产生的植株。

5. 初代培养(primary culture):从植物体上分离外植体进行的第一次培养。

6. 继代培养(subculture):将初代培养的培养物(愈伤组织、芽等)重新切割转移到新的培养基中继续扩大培养的过程。

7. 固体培养(solid culture):加入琼脂使培养基呈固体状态的培养。

8. 液体培养(liquid culture):不加入琼脂而培养基呈液体状态的培养。

9. 悬浮培养(suspension culture of plant cell):亦称植物细胞悬浮培养。使植物细胞或细胞团悬浮在液体培养基中进行培养的一种方法。通常可以分为成批培养和连续培养两种类型。

10. 薄层培养(tiny cell layer culture):缩写为 TCLC。亦称薄细胞层培养、薄细胞层组织培养。它是用植物表皮与皮层的几层细胞作为外植体进行培养的一种组织培养方法。通过薄层培养能够比较理想地将离体细胞培养成花芽,故该种培养方式一直为离体成花的研究者所重视。

11. 茎尖培养(shoot-tip culture):将植物的茎尖接种在培养基上进行快速繁殖的组织培养过程。

12. 原生质体培养(protoplast culture):指采用去掉细胞壁,仅由质膜所包被的裸露细胞进行组织培养获得再生植株的方法。

13. 决定(determination):该概念的提出始于 20 世纪初,最早用于动物发育领域,后来借代于植物发育领域。它是指胚胎细胞所具有的多种发育潜能,随着发育的过程逐渐受到限制,从而使胚胎细胞表现出不可逆的特化现象。例如,当将某些发育到一定程度的细胞从某个地方移到另一地方时,则这些细胞继续形成其在原来位置上所应该产生的器官。这些细胞此时的发育取向被认为是“决定了的”,其特征不为环境所改变。在整体植物中,细胞的发育途径已被决定,通常不容易改变,而在离体植物中,细胞的发育状态却是相对不稳定,因此能够表现出植物细胞的全能性。

14. 极性(polarity):高等植物均具一主轴,各个器官沿此主轴有顺序地进行生长、分化。其主轴的首尾两端在生理、形态上都有着明显的差异,通常是首端生芽而尾端长根,此种现象叫极性。

15. 分化(differentiation):细胞在分裂过程中发生结构和功能上的改变,从而在发育中形成各类组织和器官完成整个生活周期。

16. 器官分化(organ differentiation):是从外植体直接产生不定芽或不定根。

17. 脱分化(dedifferentiation):已分化好的细胞在人工诱导条件下,恢复分生能力,回复到分生组织状态的过程。

18. 再分化(redifferentiation):脱分化后具有分生能力的细胞再经过与原来相同的分化过程,重新形成各类组织和器官的过程。

19. 愈伤组织(callus):原指植物在受伤后,于伤口表面形成的一团薄壁细胞。现指在离体培养过程中形成的具有分生能力的一团无序生长的薄壁细胞,多在外植体切面上产生。常

见的愈伤组织类型有:(1)结构致密型:表面光滑有光泽,结构致密,多为淡黄色或白色,易于再生芽;(2)结构松散型:多为白色,可以用于悬浮系建立。(3)胚性愈伤组织:具有产生胚状体能力。

20. 胚状体(embroid):亦称体细胞胚。离体培养下没有经过受精过程,但经过了胚胎发育过程所形成的胚的类似物(不管培养的细胞是体细胞还是生殖细胞),统称为体细胞胚或胚状体。

21. 花药培养(anther culture):属器官培养的范畴,一定发育时期的花药在适当条件下,采用离体花药培养通过胚发生途径和器官发生途径形成单倍体植株。

22. 花粉培养(pollen culture)及游离小孢子培养(isolated microspore culture):属细胞培养的范畴,通过人工培养离体花粉或小孢子,改变其形成花粉管和精子的发育途径,诱导形成单倍体植株。

23. 合子胚:高等植物的卵细胞在受精后发育而成的胚。

24. 原球茎(green globlar body):原球茎最初是兰花种子发芽过程中的一种形态学结构。种子萌发初期不出现胚根,只是胚逐渐膨大,以后种皮的一端破裂,膨胀的胚呈小圆锥状,即原球茎。因此原球茎可理解为缩短的、呈珠粒状的、由胚性细胞组成的、类似嫩茎的器官。

25. 体细胞胚胎发生(体胚发生)(somatic embryogenesis):指双或单倍体的体细胞在特定条件下,未经性细胞融合而通过与合子胚胎发生类型的途径发育出新个体的形态发生过程。

26. 玻璃化(vitrification):当植物材料不断进行离体培养时,有些嫩茎、叶片呈现的半透明的水渍状态。

27. 玻璃苗(vitreous shoots):指外表呈玻璃状,茎叶透明的畸形试管植物。

28. 大量元素(macroelement):指浓度大于 0.5mmol/L 的元素,如 N、P、K、Ca、Mg、S 等。

29. 微量元素(microelement):指浓度小于 0.5mmol/L 的元素,如 Fe、B、Mn、Cu、Mo、Co 等。

30. 琼脂(agar):指培养基中的固化剂。它是从海藻中提取的高分子碳水化合物,本身不提供任何营养。

31. 植物激素(phytohormone):是植物新陈代谢产生的天然化合物,能以极微小的量影响到植物的细胞分化、分裂、发育等生理生化活动。

32. 植物生长调节剂(plant growth regulator):指由人工合成的,能够调控植物生长发育的化学物质。它们在植物生产中可以起到促进扦插生根、调控开花时间、塑造理想株型的作用。

33. 植物生长物质(plant growth substance):指在较低浓度的情况下能对植物产生明显生理作用的化学物质,主要包括内源的植物激素与人工合成的植物生长调节剂。

34. 细胞分裂素(cytokinin):缩写为 CTK。是一类腺嘌呤衍生物的激素,包括 6-BA(6-苄基腺嘌呤)、KT(激动素)、ZT(玉米素)等,其主要的生理作用是促进细胞分裂、抑制器官衰老、诱导芽分化、延缓叶片衰老等。

35. 生长素(auxin):在组织培养中,用于诱导愈伤组织的形成,诱导根的分化和促进细胞分裂、伸长生长的物质,包括 NAA、IAA、IBA 等。

36. 抗氧化物(antioxide):植物组织在切割时会分泌出一些酚类物质,接触空气中的氧气后,自动氧化或由酶类催化氧化为相应的醌类,产生可见的茶色、褐色以致黑色,这就是酚污染。减少或去掉酚污染的物质叫抗氧化物。

37. 活性炭(active carbon):为木炭粉碎经加工形成的粉末结构,具有很强的吸水力和吸附作用。

38. 培养基(medium):用于满足植物正常生长发育需要的各种营养物质的总和。

39. 繁殖系数(breeding coefficient):也叫增殖率。指每块外植体在一个培养周期内增殖的倍数。

40. 试管苗(test-tube plantlet):指在无菌离体条件下的人工培养基上,对植物细胞、组织或器官进行培养所获得的再生植株。

41. 锻炼(dardening):通过人为改善植物的抗性,使其提高对不利环境适应性的过程叫锻炼。植物的抗性是通过其体内的生理生化变化逐渐形成的,最终表现为对不利环境的适应性。

42. 后生(外)遗传变化(epigenetic variation):是指那些不是由于细胞基因组的固定变化所引起,但又可遗传的细胞水平的变化。这个概念源于动物学实验。果蝇的器官芽(drosophila imaginal disc)、哺乳动物细胞培养及原生动物的发育学实验表明,细胞的某些决定状态可以在单个细胞水平遗传。外遗传变化与传统的遗传变异的差异是:(1)外遗传变化常常是对专一性诱导物的一种直接反应;(2)外遗传变化可直接被逆转;(3)外遗传变化的表现型的范围是受细胞遗传潜力所限制;(4)外遗传变化是不能通过细胞减数分裂而传递的。后生遗传变异在取消诱发条件后,还能通过细胞分裂在一定时间内继续存在。

43. 嵌合体(chimera):亦称异源嵌镶体。植物体的突变往往只影响分生组织的一部分,使突变的组织呈扇状或层状。用这种分生组织所繁殖的植物,因同时具有两个或多个遗传性状不同的组织,而表现出不同的性状和特点,这种植物就叫嵌合体。

44. 接种(inoculability):是将已消毒好的根、茎、叶等离体器官,经切割或剪裁成小段或小块,放入培养基的过程。

45. 人工种子(artificial seed):亦称人造种子或体细胞种子。它是指任何一种经涂膜囊包裹的、裸露的、经过干燥的人工繁殖体。

46. 兰花工业(orchid industry):1960年,法国人 Morel 发明了一个用组织培养技术繁殖兰花的新方法。由于其繁殖系数极高,因此有着巨大的实用价值,从而很快为兰花生产者所接受。由于利用这一技术,使兰花的生产可以像其他工业产品那样进行工厂化生产,故将这种生产兰花的方式称为兰花试管苗“工业”,简称“兰花工业”。

47. 试管受精(cuvette impregnation):利用胚珠和子房培养,克服柱头或花柱对受精的障碍,使花粉管直接进入胚珠而受精。用于解决远缘杂交的不亲和性和克服自交不亲和问题。

48. 工厂化育苗(industrializing propagation):按一定工艺流程和规范化程序生产的,不但具有繁殖速度快、整齐、一致、无虫少病、生长周期短、遗传性稳定的特点,而且还可以加快产品的发展,获得繁殖无性系。特别对一些繁殖系数低、杂合的材料有性繁殖优良性状易分离、或从杂合的遗传群体中筛选出表现型优异的植株,需要保持其优良遗传性,有更重要的作用。(朱建华和彭士勇,2002)

49. 体细胞无性系(somaclone):来自细胞培养物产生的植株。

50. 体细胞无性系变异(somaclonal variation):由体细胞无性系所发生的遗传变异。

51. 原生质体无性系(protoclone):来自原生质体的植株。

52. 愈伤组织无性系(calliclone):来自愈伤组织的植株。

53. 胚培养(embryo culture):在植物种间杂交或远缘杂交中,有时虽然能正常受精,但胚往往发育不完全或胚与胚乳间不亲和,不能得到种子,将胚早期离体培养促使胚正常发育,从

而培养出杂交后代。如百合采用幼胚培养,成功地收到了杂交种子。同时,在杂交中如受精困难,也可把未受精的胚珠分离出来,在试管内用花粉受精来解决。

54. 单倍体育种(haploid breeding):利用花药培养诱导花粉形成单倍体,在试管培养中通过秋水仙素处理,使染色体加倍,成为纯合二倍体,从而缩短新品种育种的时间。还有利于突变体中隐性突变的分离。

55. 基因型(genotype):亦称遗传型。指生物体的遗传组成,是生物体所有遗传基础的总和。它不会因表现型的改变而发生变化。

56. 表现型(phenotype):亦称现象型。为生物个体所有性状的总和,是可以观察到的。它是基因型与环境相互作用的结果,因此遗传型相同的个体,在不同的环境中可以表现出不同的表现型。

三、药用植物组织培养的优越性

药用植物组织培养作为一种重要的生物技术,同常规的无性繁殖方法相比以及和其他繁殖方法相比,其优越性有以下几个方面。

(1)繁殖速度快,繁殖系数高

采用常规的无性繁殖方法如分株法,一棵药用植物植株一年一般只能繁殖几株或几十株,但用组织培养的方法在人工控制的环境里,可以周年不断地缩短植物形态建成和个体发育的周期,每年繁殖出几万甚至数百万的小植株。故组织培养技术对于按照植物在自然状态下的生命周期和繁殖系数进行的常规的生产来说是一种革命性的突破。工厂化试管苗快繁技术将成为 21 世纪农业和中草药产业的重要的技术之一。

组织培养快速繁殖的商业性应用始于 20 世纪 70 年代美国的“兰花工业”。兰花是世界名花,以其高雅、美丽,带有神秘色彩而深受世界人民的喜爱。兰花的常规繁殖方法有分株法和播种法。在兰花的常规繁殖中,有三个难以解决的问题:第一,用分株繁殖方法增殖缓慢,不利于新品种的推广;第二,种子繁殖困难,因兰花种子十分微小,胚很细弱,种子中几乎没有贮藏营养物,在自然条件下,绝大多数种子会在发芽过程中夭折,只有少数种子遇到菌根才能萌芽;第三,病毒感染严重,降低种性,目前至少在兰花上鉴定出七种病毒。采用组织培养的方法进行兰花的无性系繁殖,可以在一定程度上解决上述三个问题。1960 年法国的 Morel 观察到虎头兰的茎尖在无菌的培养基上能够形成扁圆形的小球体,这些小球体与幼胚发育成的原球体非常相似,故称为原球茎,在一定条件下,这些原球茎通过切割能够快速增殖,并能够再生成完整植株。Morel 的这一发现很快被从事兰花的研究者和生产经营者应用到兰花新品种的快速繁殖中去,使优良品种在短短数年内可由一株繁殖到几十万株甚至更多,从根本上改变了兰花生产的面貌。由于利用这一技术,使兰花的生产可以像其他工业产品那样进行工厂化生产,故将这种生产兰花的方式称为兰花试管苗“工业”,简称“兰花工业”。目前应用兰花试管苗生产技术已能够对近 70 属数百种兰科植物进行工厂化试管苗生产,这些兰花包括具有重要商业价值的各种兰花,如卡特兰、蝴蝶兰、石斛兰、大花蕙兰等,通过茎顶培养还可以对感染病毒的品种生产“脱毒苗”,“兰花工业”已成为许多国家花卉生产的重要行业。据统计在世界范围内,兰花组培苗的数量占植物组培苗总量的比例几乎达到 40%(熊丽和吴丽芳,2002)。

(2)不受季节限制,可周年大规模工厂化生产

药用植物组织培养快速繁殖是在实验室中进行,在严格控制下完成繁殖,条件可控,所以不受季节限制,可以全年进行连续生产。而常规的无性繁殖则受季节限制,只能在药用植物生

长季节进行繁殖。植物细胞的全能性证明,在营养成分适当的培养基中,来自植物分生组织的细胞几乎可以无限制地分裂、生长下去;同时,它们都具有分化形成和母体植物一样的植株的潜力。利用这一特点,我们可以把植物分生组织切碎、分散成许多单个细胞,待这些细胞通过组织培养大量克隆之后,再诱导其分别分化为单个植株。或者,我们也可以使植物的成熟组织,例如根、茎和叶等脱分化,变成具有和分生细胞一样发育潜力的细胞。这些过程就是典型的植物快速繁殖。通过制备培养基、切割和分散细胞、接种细胞以及诱导细胞分化等基本操作,可以在空间有限的实验室中进行大规模的工厂化生产。

(3)经济效益高

药用植物组织培养快速繁殖所需要的空间小,在一个 200m² 的培养室内一年可生产试管苗上百万株,如按每株 1 元计算,每年产值上百万元。且降低了劳动强度和劳动力成本。

(4)所用繁殖材料少,特别是繁殖材料较少的情况下。

(5)种苗去除病毒、真菌、细菌等病害

针对病毒对药用植物造成的严重危害,通过组织培养可以有效地培育出大量的无病毒种苗。已经取得成功的有(药用)菊花、百合、地黄等。

(6)能够获得具有高度一致而同时具有优良表型的组培苗无性系

由于组培材料均来自单一的个体,遗传性非常一致,将它们用于快繁,可避免许多误差,从而保证组培苗无性系性状的均一性。

(7)生长快,周期短,重复性强

由于组织培养条件优越,且建立在植物正常生长发育的基础上,故分化、成苗快,节约了时间。对有的野生药用植物变种,在应用组织培养繁殖时其驯化过程也可大为缩短。同时组织培养过程是按标准化程序进行,因此提高了结果的可信度,重复性强。

(8)药用植物生理活性物质的生产和次生代谢产物的生产

许多常见药物如生物碱、强心甙、薄荷油等是从药用植物中获得的,但产量、质量等难免要受到植物的遗传性、生长状况、生态环境、收获季节、储藏运输等因素的制约,而运用组织培养方法生产这些药物,则可克服上述缺点。对那些生态条件要求严格、生长缓慢、产量有限、价值贵重的中草药植物来讲,组织培养方法的优越性就更显得突出。

利用组织和细胞培养生产重要的次生代谢产物具有巨大的潜在经济价值。目前主要是针对一些经济价值高的药用植物进行研究,如人参、三七、红豆杉、薯蓣、烟草等。在红豆杉中含抗癌首选药物——紫杉醇等,就可以用大规模培养植物细胞来直接生产,近年国内在红豆杉组织培养中每升细胞培养液中紫杉醇的产量可达 0.25mg;在薯蓣愈伤组织的细胞悬浮培养中可产生 1%~1.6%(干重)的薯蓣皂苷素;利用烟草根尖进行细胞悬浮培养,可生产 2.9%(干重)的尼古丁;另外在烟草细胞培养中,每克(干重)快速生长的烟草细胞可产生 360μg 的辅酶 Q,这是所有活细胞中发现的最高含量水平,辅酶 Q 被用作治疗某些心脏病的药物。除提取药物外,还从葡萄细胞培养中提出一种带有水果香味的萜类化合物,而这种萜类化合物的化学合成往往很困难或很不经济。表 1-1(Albert Sasson, 1986;王蜀秀等, 1995;徐忠东, 2001)列举了药用植物组织培养中可能获得的次生代谢物。但在应用上存在的问题是如何提高培养物中的有效成分的含量和降低生产成本。

表 1-1 药用植物组织培养产生的次生代谢物

次生代谢物名称		
生物碱	酶抑制剂	挥发油
氨基酸	乙烯	麻醉剂
蒽酮	类黄酮	有机酸
抗白血病剂	调味料	香料
抗菌剂	呋喃色酮	酚类
抗肿瘤剂	呋喃香豆素	色素
苯甲酸衍生物	植物生长调节剂	多糖
苯基吡喃酮	激素	蛋白质
苯醌	免疫化学因子	类固醇、固醇
生物转化素	杀虫药剂	皂角素、皂角
碳水化合物	类胰岛素成分	甜味素
强心苷	胶乳	单宁
苯基苯乙烯酮	类脂化合物	萜烯、类萜
二蒽酮	萘醌	植物病毒抑制剂
食品乳化物	核酸及其衍生物	维生素

第二节 植物组织培养的历史

植物组织培养是 20 世纪以植物生理学为基础发展起来的,并且在生产中广泛应用后获得了巨大经济效益的一种生物技术。

一、理论准备和早期实验时期(1902 年~1929 年)

1838~1839 年,德国科学家 Schleiden 和 Schwann 发表了细胞学说,奠定了组织培养的理论基础。

1902 年,德国植物学家 Haberlandt 根据细胞学说,提出单个细胞的植物细胞全能性理论。

1904 年,Hanning 最先成功地培养了萝卜和辣根菜属的近成熟胚。

1908 年,Simon 研究了白杨嫩茎在培养中的发育,观察了愈伤组织的发生和根、茎的形成。

1922 年,Knudson 采用胚培养法获得大量兰花幼苗。克服了其种子发芽困难的问题。

1922 年,Kott 用稀释的 Knop 溶液加入复杂的有机物质,培养豌豆和玉米的根尖获得成功。

1925 年,Laibach 通过亚麻种间杂交幼胚培养得到杂种。

总结:未发现细胞有形态发生的能力;未使用激素。

二、技术和方法的建立时期(1930 年~1939 年)

1933 年,中国的李继侗和沈同将银杏胚乳的提取物加入培养基,研究银杏的胚培养获得成功,这是利用天然提取物研究植物组织培养获得成功的首次报道。

1934 年,荷兰植物学家 Went 发现生长素,即吲哚乙酸。

1934 年,美国的 White 用番茄根尖建立起第一个活跃生长的无性繁殖系,从而使非胚器

官的培养首先获得成功。

1934年,法国的 Gautherete 培养山毛杨、黑杨形成层组织产生了愈伤组织。

1937年,美国的 White 首先建立了人工合成的综合培养基,发现3种B族维生素和IAA对植物生长有作用。

1939年,法国的 Gautherete 培养胡萝卜根毛外植体成功。

1939年,美国的 White 培养烟草种间杂种幼茎切段原形成层成功。

1939年,Nobecourt 培养胡萝卜根薄壁组织成功。

总结:(1)生长素在组织培养中的应用;(2)认识B族维生素对植物细胞生长的重要性,并在组织培养中广泛采用;(3)White 和 Gautherete 建立了植物组织培养的基本方法;(4)中国学者在银杏胚培养和玉米根尖培养方面获得成功。

三、技术和方法的发展时期(1940年~1959年)

1940年,J. van Overbeek 将椰子的液体胚乳加入培养基中,使心形期曼佗罗杂种幼胚培养成功。

1943年,White 出版了第一部植物组织培养专著——《A Handbook of Plant Tissue Culture》,标志组织培养成为一门新兴学科。

1946年,罗士韦首次报道利用菟丝子茎尖培养物在试管内成花,开创了用组织培养方法研究植物成花生理学的先例。

1948年,Skoog 和崔澈培养烟草茎髓愈伤组织形成芽时,发现腺嘌呤可解除生长素对芽生长的抑制作用,促进细胞分裂。

1952年,法国的 Morel 和 Martin 首次报道茎尖分生组织的离体培养,获得去病毒大丽花植株。

1953年,Muir 等首次用摇床振荡的液体培养,使烟草愈伤组织分散为单细胞或小的细胞聚集体,即通过振荡培养,单细胞培养成功,这就是细胞悬浮培养技术;以后发展成为用于植物次生代谢产物大规模发酵生产的方法,如药物中的人参皂苷,毛地黄、甜菊甘等。

1956年,Miller 等从鲑鱼精子DNA热压水解产物中,分离出激动素(Kinetin),能促进细胞分裂和芽形成。随后又发现一系列类似化合物,叫细胞分裂素。

1958年,美国科学家 Steward 等和德国 Reinert 等分别用胡萝卜根的愈伤组织细胞进行悬浮培养,成功诱导出胚状体并分化为完整的小植株,不但使细胞全能性理论得到证实,而且为组织培养的技术程序奠定了基础。

1958年,Wickson 和 Thimann 利用外源的细胞分裂素,促使休眠的侧芽启动生长,创造了“无菌短枝扦插”或“微型扦插”繁殖方法。

总结:(1)出现了植物组织培养专著;(2)细胞分裂素在组织培养中的应用;(3)茎尖培养获得脱毒苗;(4)产生了细胞悬浮培养技术这种新型培养方式;(5)利用胚状体途径再生植株,证实了植物细胞的全能性;(6)对培养基的组成进行了改进,如在培养基中添加椰子乳。

四、技术和方法的深化和广泛应用时期(1960年~现在)

1960年,法国的 Morel 采用兰属(*Cymbidium*)的茎尖培养,经过茎尖—原球茎—再生植株的方式,实现了去病毒和快速繁殖的目的。

1960年,Cocking 采用纤维素酶、果胶酶等分离番茄幼根,获得原生质体。

1962 年, Kanta 完善了试管内传粉受精技术, 克服了花粉和柱头间的两性不亲和现象。

1962 年, Murashige 和 Skoog 在烟草培养中筛选出至今仍被广泛使用的 MS 培养基。

1964 年, 印度科学家 Guha 和 Maheswari 在毛叶曼陀罗 (*Datura innoxia*) 花药培养中获得许多胚状体, 并从胚状体进一步发育得到了单倍体植株。

1971 年, Takebe 等首次由烟草叶肉原生质体再生出完整植株, 证实了原生质体的全能性。

1972 年, Carlson 等通过两个种的烟草原生质体融合培养, 获得了第一个体细胞杂交的杂种植株。

总结: (1) 组织培养理论、实践、技术和方法不断完善和发展, 形成独具特色的专业技术和产业, 并于 20 世纪 70 年代在美国实现了组织培养的商业性应用——兰花工业, 于 80 年代被认为是能够带来全球经济利益的产业, 全世界组培苗的年产量从 1985 年的 1.3 亿株猛增到 1991 年的 5.13 亿株, 现在已超过 10 亿株, 植物组培苗的贸易额为约 150 亿美元, 并以每年 15% 的速度递增(熊丽和吴丽芳, 2002); (2) 在实验技术上建立了较完整的实验程序, 已成为一种重要的生物技术; (3) 组织培养已广泛应用于生物学的许多分支学科, 并取得丰硕的成果。

第三节 药用植物组织培养的原理

一、植物细胞全能性

1. 植物细胞全能性的概念

药用植物组织培养的理论依据是植物细胞具有全能性。所谓全能性, 是指任何具有完整的细胞核的植物细胞, 都拥有形成一个完整植株所必需的全部遗传信息。高等植物的器官和组织可以不断分割直至单个细胞, 每个细胞都具有进一步分裂和发育的能力, 并设想从一个体细胞可以得到人工培养的胚。20 世纪 50 年代末由 Steward 等人从胡萝卜的韧皮部取下的组织经过液体培养成功获得了完整的植株, 证实了植物细胞具有“全能性”的观点。

具有全能性的细胞有: (1) 受精卵(即合子); (2) 发育中的分生组织细胞(包括幼嫩器官的细胞); (3) 雌雄配子及单倍体细胞。

细胞全能性的实现可以用图 1-1 简单表示。在图中有 3 个循环, 其中 A 循环表示生命期, 它包括了孢子体和配子体的世代交替。B 循环表示细胞所决定的核质周期, 由于核质的互作、DNA 进行复制、转录 RNA 并翻译为蛋白质, 使全能性形成和保持。C 循环是组织培养周期, 组织或细胞与供体失去联系, 处于无菌的条件下, 靠人工的营养及激素条件进行代谢, 使细胞处于异养状态, 在这种条件下一个分生组织可通过三个途径实现细胞的全能性, 一是由分生组织直接分生芽而达到快速繁殖的目的, 此时极少发生体细胞无性系变异; 二是由分生组织形成愈伤组织, 经过分化实现细胞的全能性; 三是游离细胞或原生质体形成胚状体, 由胚状体直接重建完整植株, 或制成人工种子后再重建植株, 此阶段自养性明显加强。B 循环也可与 C 循环相结合, 繁殖具有特殊有益遗传性状的个体, 然后进入生命周期(A)。还可以设想, 用重组 DNA 技术可直接将异种 DNA 引入培养中的细胞或原生质体, 并在整体植株中表达。