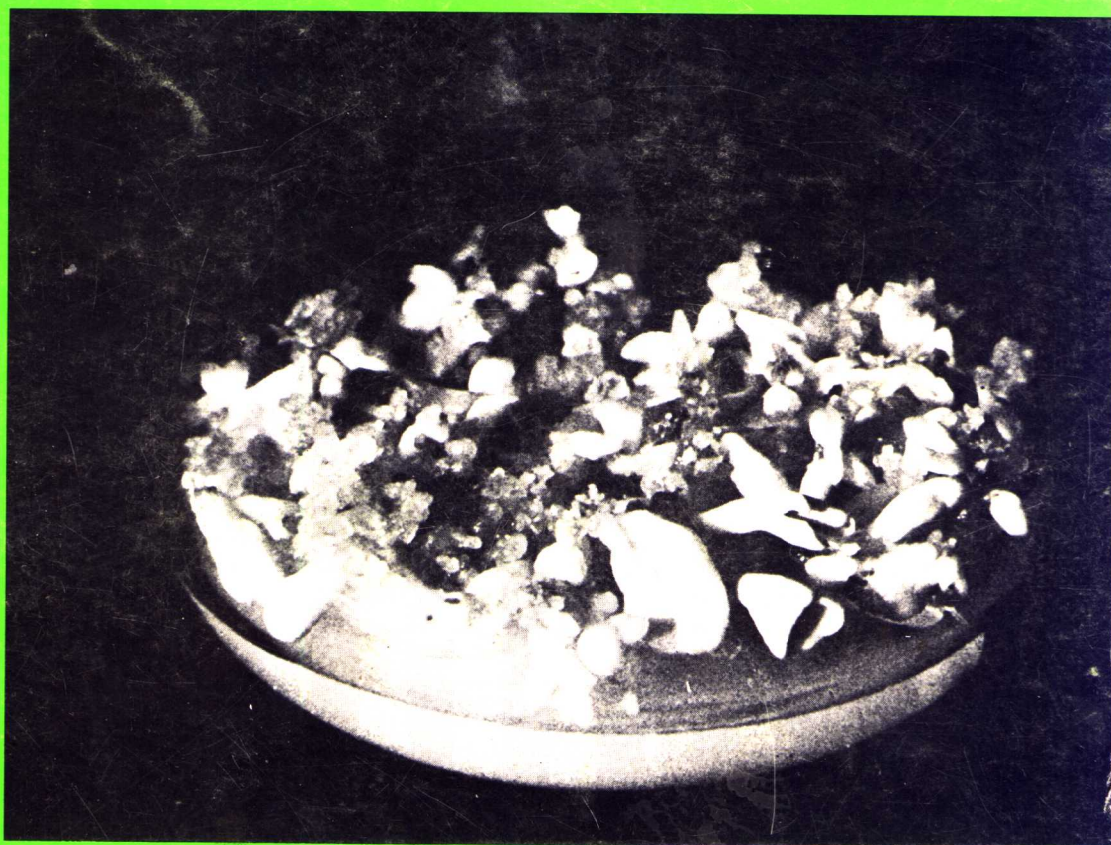


# 棕榈植物的组织培养



联合国粮食及农业组织 罗马

AGPC/MISC/77

## 棕榈植物的组织培养

组织培养技术及对椰子的应用状况

A·科乌尔 著

(巴黎大学第七分校)

[在粮农组织关于椰子生产、保护和加工的技术工作组第五届会议(1979年12月,马尼拉)上提交的论文]

联合国粮食及农业组织

1981年 罗马

本刊物中所使用的名称和引用的资料，并不意味着联合国粮农组织对于任何国家、领土、城市、地区或其当局的法律地位，或对其边界或国界的部分，表示任何意见。

M-10

ISBN 92-5-501133-2

本书版权属联合国粮食及农业组织所有。未经本版权所有者书面许可，不得以任何方式全部或部分翻印本书。申请这种许可，需说明再版的目的与范围，寄交联合国粮农组织出版处处长，意大利，罗马 Via delle Terme di Caracalla 00100。

© 粮农组织 1981年

# 目 录

	<u>页 次</u>
引 言	1 - 3
器官培养	3 - 1 2
愈伤组织培养	1 2 - 3 2
单倍体培养	3 2 - 4 4
原生质体培养	4 4 - 5 0
参考资料	5 1 - 5 8



## 图 例 目 录

	<u>页 次</u>
1 动物细胞分化示意图。	1
2 植物细胞分化示意图。 经过组织培养的愈伤组织期,解除分化和再分化途径。	2
3 枣椰的幼苗。 摄影: S.Ammar和A.Benbadis ( 2 , 3 )	6
4 枣椰苗胚轴的移植培养。 摄影: S.Ammar和A.Benbadis ( 2 , 3 )	7
5 在枣椰胚轴外植体上,用萘乙酸和激动素诱导的大量不定根。	8
6 枣椰胚外植体在培养中形成的雄花序。 摄影: S.Ammar和A.Benbadis ( 2 , 3 )	9
7 欧洲榛 ( <i>Corylus avellana</i> ) 胚外植体愈伤组织的再分化途径示意图。 选自 Lj.Radojević(73)	13
8 欧洲榛的愈伤组织。左图为使用生长素 ( 2,4-D ) 和细胞分裂素 ( 激动素 ) 后出现的解除分化生长,右图为培养基中不加植物激素时所诱导出来的许多芽。 摄影: Lj.Radojević和A.Kovoor	14
9 油棕幼叶的原外植体,显示愈伤组织沿叶脉形成。 摄影: H.Rabéchault,ORSTOM(71)	15
10 油棕组织培养中所形成的愈伤组织 ( 已解除分化 ) 。 摄影: H.Rabéchault,ORSTOM(71)	16
11 油棕的愈伤组织培养 ( 见图 10 ) , 在细胞分裂素的影响下产生胚状体。 摄影: H.Rabéchault,ORSTOM(71)	17
12 从图 1 1 中的培养物移植的胚状体正在形成根。 摄影: H.Rabéchault,ORSTOM(71)	18
13 图 1 2 中的胚状体的进一步发育。 摄影: H.Rabéchault,ORSTOM ( 71 )	19

- 14 从胚状体的组织培养中诱导出来的油棕离体小植株。  
摄影: H. Rabéchaull, ORSTOM (71) 2 0
- 15 培养中的油棕胚分段。  
摄影: H. Rabéchaull, ORSTOM (67) 2 2
- 16 油棕胚分段在培养中的发育情况。  
摄影: H. Rabéchaull, ORSTOM (67) 2 3
- 17 未成熟枣椰胚在试管中形成的愈伤组织。  
摄影: S. Ammar 和 A. Benbadis 2 4
- 18 未成熟枣椰胚的愈伤组织(见图 17)形成的芽。  
摄影: S. Ammar 和 A. Benbadis 2 5
- 19 从胚形成的愈伤组织中(见图 17)形成的枣椰小植株(芽和根)。  
摄影: S. Ammar 和 A. Benbadis 2 6
- 20 从枣椰的子叶鞘外植体上分离的并在试管中进行增殖的愈伤组织。  
摄影: S. Ammar (2) 2 7
- 21 形成根的枣椰愈伤组织(见图 20)。  
摄影: S. Ammar 和 A. Benbadis (2,3) 2 8
- 22 图 20 中的枣椰愈伤组织已长出了芽。  
摄影: S. Ammar 和 A. Benbadis (2,3) 2 9
- 23 从图 20 中的愈伤组织获得的枣椰小植株。芽和根在无植物激素的培养基上同时发生。如能在一个聚块中将一个芽和根移走且不带愈伤组织,则这个小植株可以隔离生长。  
摄影: S. Ammar 和 A. Benbadis (2,3) 3 0
- 24 把试管中获得的枣椰小植株移植在钵中。  
摄影: S. Ammar 和 A. Benbadis (2,3) 3 1
- 25 单倍体胚产生途径示意图。  
选自 J. Reinert 和 Y. P. S. Bajaj (80) 3 3
- 26 细胞核在雄核发育过程中可能发生的几种情况。  
选自 J. Reinert 和 Y. P. S. Bajaj (80) 3 5
- 27 在黑天仙子(*Hyoscyamus niger*)花药培养中,对用 RNA 先驱物尿嘧啶核苷( $^3\text{H}$ -uridine)小孢子进行的自动射线照相  
G: 生殖核, V: 营养核。

- 摄影: V.Raghavan (78) 3 6
- 28 从欧洲七叶树的 1 个花药内含物中获得的离体单倍体胚。  
摄影: Lj.Radojević (73,74) 3 7
- 29 椰子花药在培养中形成的愈伤组织。  
摄影: Lj.Radojević (未发表) 3 8
- 30 培养中的椰子花药所表现出来的紧胀的花粉, 经常是直接进行雄核发育的前兆。  
摄影: T.K.Haibou (37) 4 0
- 31 椰子花药外植时的一部分, 显示了在四分体中的单核花粉, 福尔根氏(Feulgen)染色。  
摄影: T.K.Haibou和J.Kovoor (37) 4 1
- 32 椰子外植花药的花粉, 用荧光素染色; 相同的花粉粒在亮光下(左)和紫外光下(右)的对比情况。  
摄影: T.K.Haibou和E.Duhoux (37) 4 2
- 33 椰子花药(如图30)在试管中培养一月后的花粉, 用荧光素染色。相同的花粉粒在亮光下(左)和紫外光下(右)的对比情况。  
摄影: T.K.Haibou和E.Duhoux (37) 4 3
- 34 椰子原生质体在不同时期的对比情况。  
摄影: T.K.Haibou (37,38) 4 6
- 35 分离后立即用钙萤石染色的椰子原生质体, 显示出无细胞壁的真正原生质体。  
摄影: T.K.Haibou和E.Duhoux (37,38) 4 7
- 36 培养24小时后的椰子原生质体, 用钙萤石染色, 显示细胞壁的再生以及在亮光下(左)和紫外光下(右)的对比情况。  
摄影: T.K.Haibou和E.Duhoux (37,38) 4 8
- 37 椰子原生质体培养中的细胞分裂情况。  
摄影: T.K.Haibou (37,38) 4 9
- 38 在椰子原生质体培养中产生的细胞集群(愈伤组织)。  
摄影: T.K.Haibou (37,38) 5 0

## 引言

现代生物学中最重要的问题之一就是真核有机体的分化。动物细胞的分化是最终的、不可逆转的，也就是说，接合子从单细胞开始，通过胚胎发育的几个特有的阶段进行增殖，最后形成成体(图1)。与这个过程相伴的是各细胞的分化，直到最后形成极不相同的类型，如上皮、结膜、神经和骨骼等组织。此时，已分化了的细胞再不会恢复原状。确实在有些情况下，它们可能象胚胎细胞那样强度增殖，尽管分裂速率上升，但却仍保持已经特化了的性状，而且也不会随解除分化的过程恢复到原状。相反植物细胞不仅能进行分化，而且还能解除分化，即可使特化了的植物细胞发生分裂并引起产生特化程度较小的类型；因此它们可以重新分化并形成新的特化过程(GAUTHERET)。这的确是能区别植物和动物的特征之一(34)，甚至可能比传统上使用光合作用或果胶-纤维素细胞壁来区别还更为重要。植物细胞这种奇特的可塑性使它能够在任意分化，解除分化，再分化，这一点只是在植物组织培养技术(图2)问世之后才得到说明。某一特化组织的细胞可在离体后解除分化，甚至一直倒退到最初的胚胎水平，即接合子。然后，由于它们的全能生长势(STEWARD)，在再分化时，通过正常的胚胎发育过程又再生一个完整的植物体(91,79)。这就是最明显而又众所周知的在农艺上所应用的植物组织培养，从中可以看出是如何从植物的基本细胞分化特性中产生出来的。

### 动物细胞分化

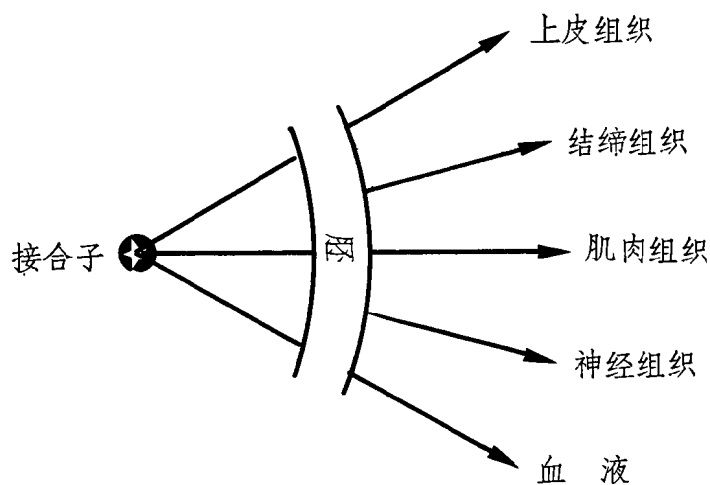


图1 动物细胞分化示意图



植物 细胞 分化

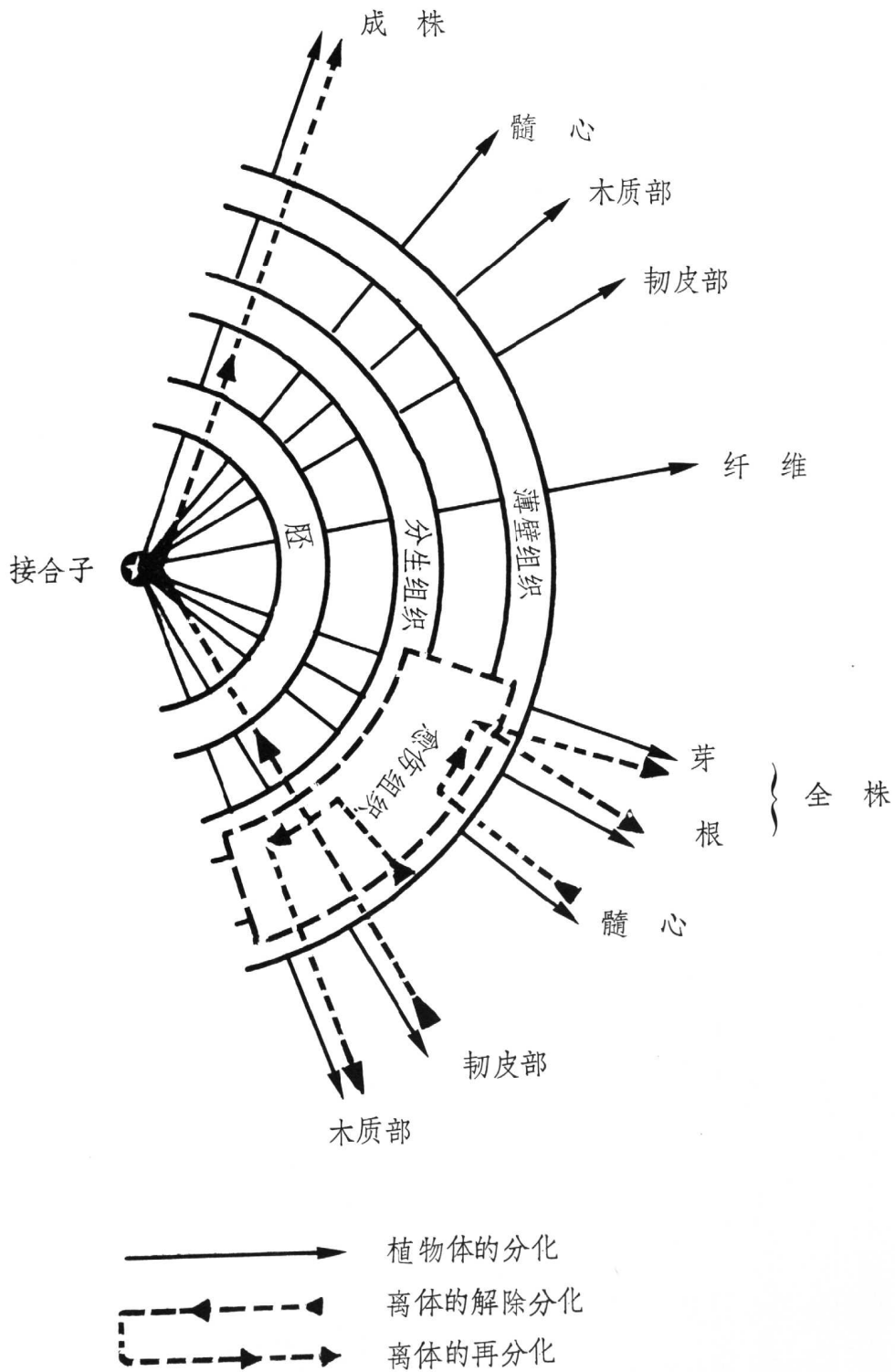


图2 植物细胞分化示意图。经过组织培养的愈伤组织期，解除分化和再分化途径。

在植物组织培养的早期，人们以为只有外植体的分生组织才能产生愈伤组织，使真正的组织或细胞培养物解除分化并无限制的生长。因此双子叶植物的形成层器官成为理想的初始试验材料，正如人们已看到这门学科的创始者 GAUTHERET, WHITE, NOBECOURT, RIKER 及其他人对胡萝卜、向日葵、爬山虎所做的首次培养。由于单子叶植物没有这种形成层，所以人们很长时间以来就认为要建立单子叶植物组织培养技术是不可能的或者至少是很困难的。然而自从 SKOOG (88) 发明了细胞分裂素（植物细胞分裂的高效能刺激素）以及利用椰子汁（一种未知的自然混合物并具有同细胞分裂素差不多的效果）后，可以从更加特化的组织（如韧皮部或髓心）中解除分化和进行培养。于是，少数单子叶植物的组织培养取得了成功，主要是谷类，但总的印象是，在实践中单子叶植物材料是难以成功的材料。然而可以指出，现有的单子叶植物组织培养的数量较少，仅仅是因为很少对单子叶植物进行尝试。在双子叶植物中，好几种木本植物能进行愈伤组织培养，但它们在形态发生上是很难对付的。直到现在，还很少有树木的组织培养能成功的诱导获得胚和全能性途径的再分化，这实际上也就是无性繁殖过程，从应用观点来看是非常有意义的。不幸的是，大多数棕榈科植物既是树木又是单子叶植物，所以它们的组织培养工作会遇到双重的困难，的确，我们尝试后很快就会察觉到这点。

回顾棕榈类的组织培养，从展望它们最终的实用性这样一个观点来看，分类工作应是对整个组织培养工作的特点和有关的培养技术进行的分类。这里将探讨 4 个主要的培养方法，并说明棕榈植物特别是椰子在多种情况下已做的和可能做到的工作，有些部分在没有棕榈植物的研究资料时，将用其它植物的例证予以说明。

4 种处理方法是：器官培养、愈伤组织培养、单倍体培养和原生质体培养。

## 器 官 培 养

用器官进行培养，意味着切割一块特定的器官，例如把一块顶端分生组织，芽，根，甚至一块接合子胚作为外植体。在培养中，它会象保留在植物体原位上那样发育。就是说，分化将继续而不会被解除。由于这种原因，既然它们不能显示上述的植物组织独一无二的可塑性，所以有些咬文嚼字者就拒绝承认器官培养是真正的组织培养；它们与真正的培养所共有的特征仅仅是：离体在有同样的培养基的容器中，是在无菌条件下生长起来的。

然而，忽视这种处理方法在词义上的理由也是错误的。ROBBINS 和 WHITE 早些时候进行的根培养和 STREET 稍后进行的工作（一个根的顶端分生组织在培养瓶中仅仅生长为更长些的根）在培养基和无机代谢方面取得了有价值的资料（85, 103, 104, 92）。MOREL 用病株的顶端分生组织在试管中刺激其加速生长，并得到无病毒的植株。现在我们已经可以设计出利

用根的培养物在原位对水污染进行非常敏感测试。

对有些种如兰花，它们正常的发芽在实验室的研究与操作中既慢又困难，对这些种，从种子的一个接合子胚上切下一块在试管中培养（正如用顶端分生组织一样），在实践中有很多优点（51, 52）。这种方法的应用，还是在棕榈植物中最早发现的。

## 油 棕

首次对棕榈植物成功应用离体技术的是RABECHAUT，他在1962年切下油棕的胚并在培养中研究它的发育（59）。从此以后一直到1976年，他的小组在巴黎的奥斯顿发表了一系列论文，其中除报导了切下的油棕胚的营养之外（69），还报导了内部因素（如休眠和水分含量）和外界因素（如植物激素和渗透压）与胚的相互作用。他们的研究结果概括如下：

(1) 种子的自然休眠似乎是由胚上的胚乳所产生的一种效果。赤霉素（可能是GA<sub>3</sub>）对这种休眠不起阻碍作用，但热处理可以起这种作用。然而赤霉素能刺激生长，尽管这种刺激对自然授粉的胚来说随基因型独特性不同而有差别。正如所预料的那样，赤霉素对根的发育不起作用，但能增加叶子的生长速率（8, 9）。应该指出，这些实验都是在1965年做的，当时只有很少的赤霉素为人们所知。而我们现在能够区别40多种在形态发生学特性上各有不同的植物激素。所以只有鉴定了油棕的天然赤霉素并在离体的胚上进行试验后，对赤霉素对油棕的作用才能真正的了解。

(2) 在果实大小及它的老化反应方面，可以反映出基因型的变异性（61）。这些标准可以在切割前作为选择离体实验胚的准则。老化反应似乎取决于果实中的临界含水量而定，这些水分是在采割后的贮存期间获得的，并有利于切下的离体胚的生长（60, 62, 63, 68）。

(3) 椰乳（因为组织培养工作者反复使用“椰乳”这个错误术语，所以现在人们使用的是“椰乳”而不是“椰水”）的效果似乎更取决于培养基中的其它成分（65）和胚中的含水量（70）。它不象通常遇到的大量组织培养那样显示出引人注目的影响，但在其它胚培养中却显示了这种影响，这种培养是由LI在1934年（44）和后来的BLAKESLEE小组（101）对其它胚培养增添了必不可少的椰乳而首先获得成功。自相矛盾的是，它对油棕胚的作用却减弱了。再者，不象大多数其它组织在高压消毒的牛奶中会增加效能，而棕榈植物胚的干重仅与过滤消毒的椰乳有关。RABECHAULT解释他的发现时认为，这是因为在椰乳中有一些感热的因素在起作用，这些因素只能在胚内部达到临界湿度时才能被利用。这与一般认为椰乳对组织培养起着类似细胞分裂素作用的看法有显著的差异。

(4) 油棕离体胚的发育有两个阶段。第一个阶段是异养的，这时它完全依赖培养基中的碳

水化合物并需要大量的糖。在第二阶段中，这时幼叶已开始转绿，开始进入自养，少量的糖即可满足。RABECHAULT 有个很重要的结论，即糖的作用不仅仅是营养性的也是可以调节渗透压的，因为它易被甘露醇代替(66)。

(5) 奥斯顿小组也作了油棕的根培养(45,46)。外植体是从成熟的接合子胚上切取的根。在试管中它们象典型的根培养那样增加长度，但最后也进行愈伤组织的生长，因此他们的发现将放在下节讨论。

STARITSKY 在瓦赫宁根〔荷〕也从油棕顶芽的初级外植体中培养出幼叶及幼根(90)。在这种情况下应把它视为器官培养，因为他未能建立一个解除了分化的愈伤组织培养。

## 枣 椰

枣椰的器官培养首先由以色列沃肯尼研究所的一个小组进行试验的，但是根据已发表的文献，从组织培养的观点来看，显然没有取得很大的成功(57,81,82)。首次富有成果的试验无疑是SCHROEDER 在加利福尼亚所作的(87)。他在10多年中用各种外植体在不同的培养基中进行的试验表明，在试管中事先会发生分化，因此枣椰分株的顶端分生组织会产生伸长的胚性叶。从实用的观点来看，子叶伸展到10毫米的枣椰萌发幼苗较好些(这时胚苗已脱离了胚乳的养分供应)，可以发育成为苗和根并生长成为独立的植株。从这种胚培养物切下的根块上只生长出次生小根而无苗的分化，从这一事实可以看出无解除分化成改变进程的现象发生。

AMMAR 和 BENBADIS 在突尼斯作过同样的处理，在刚发芽的种子胚乳上(图3)切一块带有胚芽和胚根的子叶鞘，把它当作器官的外植体(图4)，这样的处理使他们能够确定外界因素对遗传性发育过程的影响(2,3)。于是，萘乙酸能诱导大量的不定根(图5)。在一次偶然的机会中还观察到另一个惊人的现象，切下的胚在试管内生长出一、两片败育叶子后，直接在培养管中形成一个完整的雄性或雌性花序(图6)。这些结果需要加以评论。既然这个外植体在形态发生学上是一个完整的胚(虽然是引人注目的离体)，就应该认为它是处在一个正常发育过程之中。例如就上面谈到的花序的那种情况而言，它仅仅是因为自然发展的时间历程已经被极大地缩短了。BENBADIS 也指出，在两年多时间内所做的试验中，这样的作法占很大的比例，但也仅有个别的胚外植体产生这样的花序。尽管他们曾在培养基中添加过植物生长素和高效力的细胞分裂素(6-苯甲-氨基嘌呤)，但这些植物激素并不象是主要的和仅有的诱导者，因为他们在其它情况下没有如此作过。相反，似乎在这个外植体中有一种内在的状态对其发育过程中的这样一种表现是很关键的，而这种状态非常短暂。在极少发育过程中的这种短暂的能力的重要性，将放在单倍体培养中讨论。

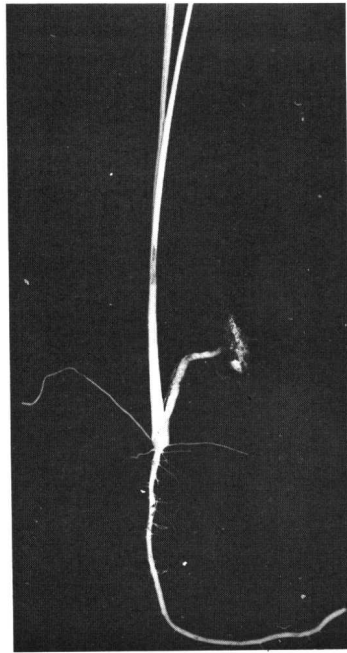


图3 枣椰的幼苗。

摄影: S.Ammar and

A.Benbadis(2,3)

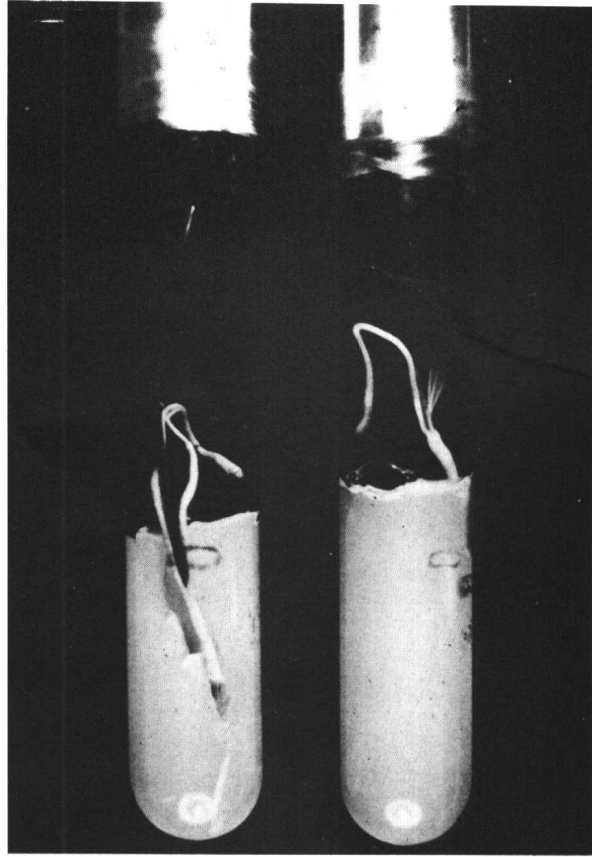


图4 枣椰苗胚轴的移植培养。

摄影: S.Ammar and

A.Benbadis(2,3)



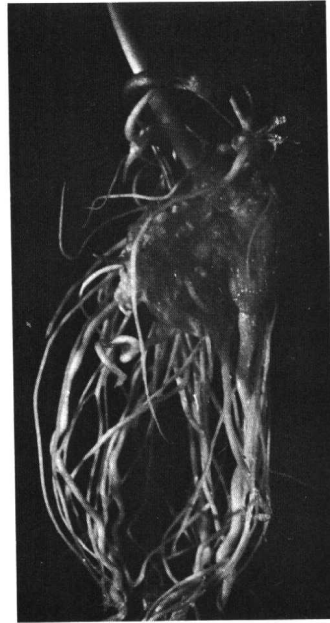


图 5 在枣椰胚轴外植体上，用  
萘乙酸和激动素诱导的大  
量不定根。

摄影：S·Ammar and  
A·Benbadis(2,3)



图6 枣椰胚外植体在培养中形成的雄花序。

摄影: S.Ammar and

A.Benbadis(2,3)

## 椰子

首先尝试用棕榈植物的胚进行培养的是CUTTER和WILSON (16),他们早在1954年就试验不同的生长因子(包括胚乳提取物)对切下的椰子胚的生长的影响。晚些时候,ABRAHAM同THOMAS (1)也试图进行椰子的胚培养,但是椰子器官培养的突出例子实际上是GUZMAN在菲律宾对makapuno胚所作的不可朽的研究工作(18,19,22,24)。NOEHADI在印度尼西亚(56,55), FISHER和 TSAI在佛罗里达(29,30)对正常的胚也作了同样的工作。今后如何,只能看比较这两种类型胚的表现情况后所作出的推断。

几年前他们所知道的最初事实是: makapuno胚在栽植植物体上不能生长,但却能使它在离体时(即从makapuno胚乳上切割下来)生长;从另一方面来说,正常胚在栽植植物体上能发育,而在离体时则不能发育。简单的解释是: makapuno胚乳对胚的生长起抑制作用,而正常的胚乳不仅没有抑制作用甚至是必不可少的,如缺少了它,正常的胚就不能在离体时生长。正如BRINK, COOPER及其他人表明的那样,在很多情况下,好几种植物的不亲合性杂种的失败都归因于胚乳的致死效应,因而胚乳的抑制作用是经常性的,尽管大多数这类种子的失败更多地是由于胚乳的衰退和失去营养的供应。但是把所有的失败都归在胚乳上也是不公正的。似乎这两种类型的胚除各自的胚乳以外,其它方面也各不相同,因为makapuno胚能成功地摆脱它的有抑制作用的胚乳并在培养中独立地生长,而正常的胚不能离开它的滋养组织而生存。换句话说,两种胚在离体生长中的需要是不同的。

而且更要记住的是:胚乳是一个三倍体组织,一个染色体补体是父本的,其它两个融合极核是母本的。因而,胚乳至少在基因量效果方面与胚有基因型上的区别。是TORRES(98)在1937年首先提出, makapuno性状隶属于1个单孟德尔隐性基因。随后, ZUNIGA在菲律宾的控制授粉条件下进行了详细的实验研究表明,确实获得了预期的孟氏遗传比率(105)。根据ZUNIGA的研究成果整理的表1表明了一个makapuno载体亲本的果实(或是自花授粉或是异花授粉)的遗传性分离的成分结构。隐性的makapuno等价基因用 $m$ 表示,显性的正常等价基因用 $M$ 表示。在这4种可能的胚乳中,显性的正常性状 $M$ 能产生出3:1(正常胚乳与makapuno胚乳之比)的比率。没有相应的胚,同型接合的隐性 $mm$ 就不能生存——至少在de GUZMAN成功地培养了makapuno胚以前是如此(18,19,22,24)。所以在正常生存的栽植子代中,正常的与makapuno载体的棕榈之比应是1:2。请注意,所有现存的makapuno载体棕榈必定是异型接合的。假如同型接合的隐性胚( $mm$ )能够生长成为成熟树并进行自花授粉,则100%的果实将带有makapuno胚乳( $mmm$ )。这是来自de GUZMAN实验室的最新报告。在表1中表明的另一个重要问题是, makapuno胚同正常的胚在遗传学上也是