

块根植物、棕榈、柑桔 和观赏植物的微繁殖

——粮农组织/挪威植物组织培养
技术与利用会议文集



粮 农 组 织

植物生产和保护
文 集

59



联合国
粮食及农业组织

块根植物、棕榈、柑桔 和观赏植物的微繁殖

作者:

粮农组织/挪威植物组织培养

技术与利用会议

挪威种子检测站

1984年7月3—4日于奥斯

粮农组织
植物生产和保护
文集

59



联合国
粮食及农业组织

本书原版为联合国粮农组织的植物生产和保护文集(59)《块根植物、棕榈、柑桔和观赏植物的微繁殖》, (FAO Plant production and protection paper No.59, Micropropagation of selected rootcrops, palms, citrus, and ornamental species, M-12 ISBN 92-5-102157-0, 1984, Rome)

本书中所用名称及材料的编写方式并不意味着联合国粮农组织对于任何国家、领地、城市或地区或其当局的法律地位或对于其边界的划分表示任何意见。使用“发达经济”和“发展中经济”这两个词是出于统计上的方便,并不是对某个国家或地区在发展过程中已达到的发展阶段作出的判断。

块根植物、棕榈、柑桔和观赏植物的微繁殖

粮农组织/挪威种子检测站

(书中提到有关厂商、产品、名称,粮农组织未作推荐)

CFP/90/10

版权所有。未经版权所有者事前许可,不得以电子、机械、照相复制等任何方法或其他程序全部或部分翻印本书,或将其存入检索体系,或发送他人。申请这种许可应写信给联合国粮农组织出版司司长(意大利罗马Via delle Terme di Caracalla, 00100)并说明希望翻印的目的和份数。

© 粮农组织 中文版 1990年 北京印刷

ISBN 92-5-102157-0/CH

前 言

在农业和园艺生产中，优质的栽培材料是基本投入之一。随着近几十年来微繁殖技术的发展，植物的快速繁殖已成为可能，而且在多数情况下可再生出无病植株，为了扩大优质栽培材料的生产和供应，联合国粮农组织种子改良和开发计划署正着手制定各项技术指南。

为了加快植物微繁殖技术的普及，有关部门组织了这次名为粮农组织/挪威植物组织培养技术和利用的专题讨论会，旨在从总体上评述组织培养技术的范围和可能性，特别是对某些块根作物、棕榈、柑桔和观赏植物的组织培养加以评述，以明确为获得和保存组织培养繁殖材料所必需的最低条件。

会议论文是由Raymond A. T. George先生编辑的。他是英国巴斯大学生物学院的高级讲师。编辑时既体现了粮农组织文献风格，又考虑到便于读者的需要。不过，编辑后的论文仍然保持了原作者的文体和观点。

联合国粮农组织采纳了会议上提出的关于为入选作物制定技术指南和复制录象带的建议。L. A. Withers博士的论文《获得和保存组织培养繁殖材料所必需的最低条件》已加以修改，不久将作为粮农组织的技术指南予以发表。在丹麦植物病理研究所、马铃薯研究所以及种用马铃薯健康检查委员会的协作下，粮农组织正在准备有关种用马铃薯微繁殖和生产的技术指南和录象带。

联合国粮农组织衷心感谢这次会议的组织者，特别要感谢挪威政府为这次会议提供了财政支持和挪威种子检测站在其一百周年纪念期间主持了这次会议。

联合国粮农组织植物生产及保护部种子处主任

Walter P. Feistritz

目 录

页 次

前 言

第一部分 会议正式开幕..... (1)

开幕词: Mr. Arne Wold..... (1)

开幕致词: A. Njos教授..... (1)

粮农组织致词: W. P. Feistritzer 博士..... (2)

第二部分 论文..... (8)

1. 组织培养技术的范围和可能性: W. W. Schwabe..... (8)

2. 马铃薯组织培养: H. Rønde Kristensen..... (12)

3. 木薯组织培养: K. K. Kartha..... (25)

4. 组织培养在改良薯蓣和甘薯栽培材料生产中的应用: F. L. Chandler
和S. Q. Haque..... (34)

5. 棕榈植物的组织培养: Woi Kheng Choo..... (44)

6. 柑桔组织培养: L. Navarro..... (56)

7. 观赏植物的组织培养技术: Victor M. Villalobos Arambula..... (71)

8. 观赏植物尤其是盆栽花卉的组织培养: M. Appelgren..... (82)

9. 进行组织培养和繁殖的基本材料与设备: L. A. Withers..... (91)

第三部分 会议闭幕..... (105)

总结: W. W. Schwabe..... (106)

闭幕致词: W. P. Feistritzer..... (106)

闭幕词: A. Wold..... (107)

与会者名单..... (107)

会议组织者..... (113)

附图..... (115)

第一部分 会议正式开幕

开幕词

Arne Wold(挪威种子检测站站长)

挪威农业大学校长Arnor Njøs教授、粮农组织种子处主任Walter P. Feistritz博士、Schwabe教授、参加组织培养技术讨论会的代表们、女士们、先生们：

我很高兴和荣幸地热烈欢迎你们来到挪威和挪威种子检测站。

挪威的种子试验至今(1984年)已有100年的历史。我们很高兴有这么多个组织培养专家作为我们的宾客，共同庆祝挪威种子检测站成立一百周年。

挪威正在多方面支持热带国家发展农业，已为这些国家提供了十年的经济援助。挪威种子检测站在有关种子质量检查的五次研讨会(菲律宾1975年，肯尼亚1977年，秘鲁1979年，泰国1981年和津巴布韦1983年)上提供了多篇管理论文和技术论文。第六次研讨会被安排与这次会议一起举行，它的参加者正以观察员身份出席这次会议。

挪威种子检测站现在既没有生产任何组培材料，也没有做这方面的任何工作。但是，我们怀着极大的兴趣关注着这项事业，因为我们将来可能参与组培材料的繁殖及其质量控制的工作。

几年来，挪威种子检测站一直在对种用马铃薯的组培小植株进行病毒病和环腐病(*Corynebacterium sepedonicum*)的监控。

在挪威和其他北欧国家，种子试验和鉴定是由种子检测站进行的。种子检测站要负责种子和种用马铃薯的田间小区试验、田间调查和实验室测定，实验室测定还包括病害测定。因此在将来很有可能由国家种子检测站负责组培材料的质量检查工作。

我期待着倾听会议的报告和讨论，尤其是对那些与组培材料病害防治有关问题的讨论。祝会议成功。

开幕致词

A. Njøs教授(挪威农业大学校长)

会议主席、粮农组织的代表们、Schwabe教授、杰出的同行们、女士们、先生们：

挪威农业大学欢迎您来本校参加粮农组织/挪威组织培养技术和利用专题讨论会。对你们中的一些人来说，这次会议是昨天开始的、内容广泛的第六次粮农组织/挪威种子试验研讨会的一部分。我们相信，在Arne Wold站长的主持下，在挪威种子检测站能开好这次研讨会和专题讨论会。几个星期以前，我们庆祝了这个检测站建立一百周年。挪威种子检测站是一个令人尊敬的部门，它充满生机和力量，能够在未来执行重要的工作。

我们非常欢迎粮农组织与挪威之间的合作，这对组培材料的开发工作是必要的和有益的。本次会议是粮农组织种子改良和开发计划署整体计划中的一部分。

在这次会议的暂定议程中，我注意到有很多探讨组织培养技术的论文，涉及到马铃薯到棕榈的很多栽培植物。这项技术对植物繁殖、遗传和环境卫生就象微型电子计算机对数据处理和管理工作一样重要。

现在，我想向大家介绍一些关于挪威农业大学以及奥斯农业研究、推广和试验联合体方面的情况。农业大学创办于1859年，至今已有125年的历史，在世界上比，它的规模不算大。大学农场的面积约600公顷，其中320公顷栽培作物，180公顷用作林场。职员约有600名，其中有240名科学家，在34个研究室工作。此外，研究委员会，尤其是农业研究委员会，以及其它机构雇佣了200人。奥斯农业研究、推广和试验联合体设有几个研究所，如国家种子检测站、土地资源研究所、挪威粮食研究所和挪威植物保护研究所。联合体中农业教学、研究和推广方面雇佣1400至1500人。

我校有900名大学生和约200名博士研究生。来自发展中国家的学生有40名。为发展中国家的博士生开设了为期一年的土壤学和畜牧学方面的研究生课程，其他博士生则研究别的课题。大学生要先在地区农业学校学习一年，然后在大学继续学习四年。每个学生必须提交一篇论文才能成为“农业工作候选者”。

大学有11个学习方向，包括普通农业、林业、园艺、土地规划、农学、经济、环境美化，农业工程、自然资源保护和畜牧。这些学习方向进一步分为27个独立的学习计划。

博士学位有两种，一是科学博士，大概相当于哲学博士（Ph. D）；另一种是农业博士，能否得到此学位仅取决于论文，它高于科学博士。

研究项目有：植物保护和生产，林业，动、植物营养和育种，栽培对环境的影响，土壤科学，乳品学和水产养殖。

一些研究人员被派往发展中国家，一些大学生在外国完成其论文。

我再稍微谈一下奥斯联合体。它的面积达100平方公里，人口11,000至12,000。耕种面积大约有40平方公里，在挪威，这个耕地百分比是相当高了。挪威的土地面积中，农业仅占3%，森林占20%左右，主要是桦树、云杉和松树林。

最后，我祝会议圆满成功，并希望这两天的辛苦工作硕果累累，这对作为与会者的各位和你们的国家都将是有益的。

粮农组织致词

W. P. Feistritzer

挪威农业大学校长、挪威种子检测站站长、女士们、先生们：

近几十年来，植物组织培养繁殖方法已在若干种作物上获得成功。利用这些方法可以快速繁殖这些作物，而且大多数情况下能够再生出无病植株。采用这些微繁殖技术，即在无菌条件下于培养基上离体诱导不定芽、鳞茎、块茎，或通过促进腋芽生长，再生植株，然后将形成的小植株转移到自然条件下生长。

如今，很多地方，主要是北美洲、欧洲和一些亚洲国家，都建立了商业性微繁殖设施。

为了加快微繁殖技术的推广，粮农组织种子改良和开发计划署一直在直接地帮助粮农组织成员国提高优质种子和栽培材料的生产和应用。

这次会议的主要目的是在总体上评述组织培养技术的范围和可能性，特别是对某些块根作物、棕榈、柑桔和观赏植物的组织培养加以评述，以确定获得和保存组织培养繁殖材料所必需的最低条件。特别有意义的是您对如下问题的看法：植物组织培养的类型、植物组织培养材料的处理、无菌操作、培养基的制备、在试管内消除病原的方法、病毒检测法、植物检疫程序、人力和设备需求、以及组织培养工作的总体安排和管理。

在这次会议商讨结果的基础上，联合国将制订了一套各种作物微繁殖的实践指南，包括小册子和录象带。这些指南将有助于在粮农组织成员国中开展全国性或地区性微繁殖技术的培训工作，以及建设或加强微繁殖设施。

挪威政府对优质种子和栽培材料生产技术的发展表示了极大的关注和支持，粮农组织在此深表感谢！

借此机会，我要向挪威种子检测站站长Wold先生表示深厚的谢意。在过去的十年中，他热情地与我们进行合作。

我还要感谢挪威农业大学校长Njøs教授。他十分友好地和我们一起参加这次会议，并郑重地为会议致开幕词。

现在请Schwabe教授宣读他的论文“组织培养技术的范围和可能性”。我想请他在宣读完论文后作为本次会议的主席，并请他明天为本次会议作一总结。

第二部分 论 文

1. 组织培养技术的范围和可能性

W. W. Schwabe

(Dept. of Horticulture (Teaching), Wye College, University of
London, Nr. Ashford, Kent TN25 5AH, U. K.)

摘 要

在这篇介绍性论文中，作者试图让人们注意影响外植体及其增殖、器官发生及再生成小植株的条件以及组织培养技术的某些重要的生理问题。强调了由微素梯度和隔离所引起的内源控制作用。简要地评述了用组织培养技术进行快速繁殖、保存遗传材料、育种、以及用常规方法和遗传工程方法创造新基因组的进展。最后，讨论了为生产化学物质等而进行的细胞培养的某些方面，以及感病植物材料汰除病毒的技术。

前 言

在这篇较为概述性的论文中，作者不打算论述组织培养程序、方法或实例的细节，而要指出一些现有技术的基本原则和潜在的新应用。由植株的离体器官再生完整的植株，这是一项实施了许多年的古老的园艺技术。组织培养这个概念在本世纪之前就已经被提出来了，就其历史说 Haberland (1902) 是这项技术的鼻祖，他第一个进行了在人工培养基上保持植物组织的试验，目的是研究特殊组织的代谢。这导致了他的不朽著作《生理植物解剖学》的产

生。他希望这种培养技术能够揭示细胞和组织各种功能的机理。尽管他没能达到这个目的，但他的预见是相当非凡的。例如，他建议进行花粉管培养，甚至预测到个体细胞就象人工胚胎一样能够再生完整植株。

在兰花的组织培养获得成功 (Morel和Wetmore, 1951; Gautheret, 1959) 以后, 最近二十年来, 很多种植物的组织培养都获得了成功, 近年来有许多文章和书籍记录了这些新的发展, 例如, Sharp等 (1979)、Thorpe (1981)、Bhojwani和Razdan (1983) 以及Evans等 (1983)。因此, 我们对有组织或无组织 (愈伤组织) 中的细胞增殖及其条件的了解多于对特定组织代谢的了解, 这是不足为奇的。这些技术过去曾显得好象没有什么真正的价值, 而现在正日臻完善, 人们非常诧异地发现, 这些技术在最近十年的应用很广, 而且组织培养实验室的数量和组织培养方面的文献急剧增加。许多应用正处于实际开发阶段, 其他应用不久也将如此。由于这次会议的大多数论文将详细地介绍试验情况, 本文只对组织培养技术作一概括性论述。

总 论

组织培养在高等植物上潜在的与实际的应用可概括为如下四个方面:

- (1) 快速或大规模繁殖现存的无性材料。
- (2) 用于遗传目的, 通过遗传工程方法以获得单倍体、新突变体 (体细胞无性系变异)、原生质体融合和外源DNA的转移
- (3) 通过细胞培养生产化学物质 (包括植物次生代谢产物)、固定化酶系统或仅仅大量生产细胞材料。
- (4) 其他用途, 包括生产无病毒植株。

一当原始外植体制备就绪, “植物体”或组织将发生很大变化, Meins (1983) 曾称此为“危机状态”。这时, 由于缺乏根压, 水分和矿物质得不到正常供应; 没有可向韧皮部系统供应糖分的叶片, 使碳水化合物也得不到正常供应; 此外, 植物组织中激素的流动也被完全破坏, 而激素对有机体保持整体性很重要。诱导愈伤组织增殖后, 便缺乏生长素的生产中心 (带有幼嫩叶原基的正常茎尖), 也缺乏细胞分裂素的供应中心 (如根等)。恢复这些物质的供应很可能是重新诱导组织生长的先决条件。因此, 培养基必须含有矿物质、糖、激素, 有时还应有维生素等物质。当然, 必须明白大多数代谢物现在仍是由培养的细胞合成的。较少论述的是物质的供应途径, 这也是很重要的, 在琼脂或滤纸桥培养基上进行组织培养时, 物质的供应单向地来自基部, 仅此就会导致很多问题。同样, 如果以浸浴培养基提供营养物质, 即培养基漫过整个组织表面, 不良效果与特定效应将同时存在, 特别是在考虑激素供应时。此外, 外界环境条件, 包括温度、光照与试管内的气体组成, 都将直接地影响组织的生长发育。

在前面提到的文献中, 都列有培养基所需的离子和其他成分, 最著名的培养基是Murashige和Skoog (1963) 提出的培养基。

如果目的是要形成愈伤组织, 那么理想的办法是抑制细胞增殖形成器官。在培养基中加入异常高浓度的生长素类激素 (IBA、 $2, 4-D$), 沿着非极性路线 (与有结构的芽反向) 供给组织, 或者排除其他限制因素, 例如, 剥去表皮层 (大豆子叶), 都可达到这个目的。

但是, 如果希望分化出芽, 根或完整的小植株, 那么每棵小植株就必须维持激素的自然

的、内源的流动规律。

为了诱导植物细胞的增殖或分化，在培养基中还必须加入其他许多物质，这通常是凭经验决定的。一般地讲，现在还没有证据证明这些物质是必需的或者具有普遍的用途，例如，Jones (1976) 发现根皮苷和间苯三酚（苹果的一种主要的酚类产物）对于苹果芽的繁殖很有用，但这种效果并不适用于所有的苹果品种（Zimmerman和Broome, 1981）。

在培养基中加入其他辅助物质如活性炭，有利于吸附芳香类物质，这对于生长素及其合成类似物尤其重要。辅助物质的作用方式就象“慢释放”机制一样，能够提高茎尖的活性。对有些植物来说，在促进根培养基中活性炭对光的吸收可能有利于根的生长。培养过组织的“适应培养基”，以及早期研究中采用过的滋养层细胞或组织，都可能提供了某种未知的化学成分，而所培养的组织在培养早期不能产生足够数量的这种物质。

培养基的硬度（琼脂与营养液的配比）、甚至于琼脂本身的强度或滤纸桥的利用，都有重要的作用。不同的方法可能适用于不同的情况。必须记住，应该保证有足够的养分扩散到外植体中，这决定于外植体接触培养基的面积、静止培养中养分的扩散距离或振荡培养中养分混合的速度。养分从培养组织向外扩散也可能是很重要的。

物理环境除温度之外并未得到重视，其实也是很重要的，尽管需要进一步证实。例如，缺氧条件似乎有利于芽的形成，其原因尚不清楚。包裹在芽中的组织（尤其是象棕榈芽尖那样的大芽所包裹的组织）能够很好地适应试管内非正常量的氧和二氧化碳。不存在这样的假设，即试管内的条件与自然界条件相似就一定最适当。例如，椰子树组织生长的最适温度为30~31℃，比28℃好，而野外的平均温度通常要低于这个温度（Apavatjirut 和 Blake, 1977）。

一、繁 殖

繁殖

形成新的小植株的方法主要有两种：器官化的组织增殖和非器官化的愈伤组织分化。

(1) 器官化组织的繁殖最常用的方法是利用芽外植体，这与无菌扦插基本相同。有时还可能要抑制组织的顶端优势，使每个叶腋甚至每个苞叶腋都长出芽，以产生大量的小芽，然后进行分离和再培养，目的是产生更多的繁殖用母芽，或者使之生根成为小植株。对于不同的植物，也可用花序、叶片、叶柄等其他组织作为外植体，但这类材料的芽分化通常都在非分化的愈伤组织形成之后。前面提到的教科书中都列表载明了已能成功地繁殖的许多植物种。

(2) 通过愈伤组织的繁殖，首先要使外植体组织丧失形成器官的能力，并以随机方式进行细胞增殖。实施办法通常是提高培养基中的生长素浓度，消除组织中的激素梯度、营养梯度和其他梯度（Lavee and Galston, 1968）。但是，组织细胞之间仍趋于存在协同关系（胞间连丝）和一定程度的控制作用。因此，通常这种组织中管胞的分化很少发生于愈伤组织的表面，而多发生于表面以下。很明显，外界的梯度仍然是必要的。在长期的愈伤组织培养中会出现多种不可逆的变化，这些变化与染色体的变化（体细胞突变、倍性变异等）可能有关，也可能无关，尽管细胞植株技术有时能够可逆地恢复细胞的正常全能性。现在对这些

不可逆变化有许多解释。一般认为在早期恢复细胞形成器官的能力是比较理想的，也就是通常所说的“分化”。

细胞全能性是指通常在脱分化过程以后，每个细胞都有能力恢复到其原始配子(单倍体)或合子所具有的各种活性，这暗示所有组织的特异化是由于不同基因的阻断，而这本身是可逆的。这个概念的普遍性还需要进一步证实，而且显然不适于体细胞倍性会增加的情形，例如 d'Amato (1952) 所列举的许多实例。Steward及其同事 (1967, 1972) 以及 Street (1979) 曾就保持细胞形态感受性 (morphogenic competence) 对上述概念作过详尽的讨论。

愈伤组织的分化

对分化的诱导日前在很大程度上的是凭经验，而且往往需要将诱导细胞增殖的培养基更换为生长素浓度大大降低而细胞分裂素浓度通常增加的培养基。因此，通常在培养基中简单地加入这些生长调节剂并不是理想的方法，它不能形成转运的极性，而这种极性是很重要的。诱导分化很可能还需要其他的植物发育调节因子，例如，最近有些研究者强调了多胺的重要性。腐胺、尸胺和亚精胺可作为稳定因子和抗衰老因子 (Galston, 1983, Galston等1978)。分化出现的方式通常是形成茎尖，其叶原基已开始分化，这通常只出现于有光照的时候。当茎尖器官分化受到某种干扰时 (由营养条件或环境条件引起)，这些茎尖极象自然界出现的扁化芽。如同扁化芽中一样，这种带状茎尖通常会分裂成径向对称的中心，然后表现出正常芽的形态。

器官重建的另一种常见的方式是胚状体的形成。对于胚状体是由单个细胞还是由细胞群演变而来，现在仍无定论。但此胚状体与真正的胚极其相似，例如，椰子胚胎发生时，能够形成大量的吸器组织，状如萌芽椰子的“apple”。有一些植物 (例如，蕨类植物) 的单个顶端细胞决定着芽的器官分化，研究这类植物的胚胎发生是很有意义的。

现在还不清楚胚状体发生是如何开始的，这整个领域仍处于凭经验的阶段。据推测，这很可能需要某些内部条件。与真正的胚胎及液体培养中自由漂浮的胚胎 (Steward等, 1964) 一样，细胞 (或者可能是细胞群) 必须由愈伤组织群所具有的某种随机协同控制作用中分隔出来。表皮组织中细胞全能性很容易表达 (Tran Thanh Van, 1973)，这也可能与细胞隔离程度较高有关。细胞隔离，即使是部分隔离，有利于细胞象受精卵细胞那样表达其全能性，细胞能够建立极性梯度以形成芽极和根极，然后完成胚胎发育的正常阶段。胚胎发生时这类发育都很相似，例如，几乎都能正常地形成胚柄或吸器 (图1.1)，有意义的是，在这类的细胞团外围形成的角质层可作为胚胎发生的早期标志之一 (McWilliam等, 1974)。

使细胞隔离的方法有组织离析或用果胶酶处理以产生悬浮细胞。另一种更激烈的方法是分离原生质体，这种方法还有其他的优点，如可产生细胞融合体。其他可能的方法是使愈伤组织质壁分离，再缓慢地复原，这样可使胞间连丝断裂，至少使某些细胞隔离开来，如同胚珠或颈卵器中的受精卵一样。

局部地使用激素可以导致梯度的形成，方法是在组织的上面或下面滴加激素或粘贴含特定激素的琼脂块。White所做的早期试验中，氧气梯度可能是导致芽形成的因素，因为愈伤组织在琼脂培养基上不能分化，而在相同成分的液体培养基中却能分化 (White, 1939)。形成梯度的另一种可能途径是施加电梯度，方法与在高等植物上采用的相同，要适于组织培养的条件。

件。其形式可用采用电势梯度，即通过植物组织缓慢放电。

利用组织培养技术进行无性繁殖，一般假定（或希望）产生的小植株保存其原有的遗传和生理特性，即是母株的忠实复制品。遗憾的是，实际上并非总是如此，在培养中，嵌合体组织几乎都会分裂成其构成组分。同样，遗传和生理将发生变化。例如，当以春化的和未春化的胡萝卜根韧皮部组织为材料，再生胡萝卜植株时，植株的生理状况会发生很有趣的变化，事实上，产生的两类小植株都必须经过再次春化处理才能开花（未发表的资料）。

二、组织培养遗传学中的应用

组织培养的遗传应用有四个方面：

- （1）保存现有的基因组；
- （2）辅助常规育种，进行现有基因组的重组；
- （3）创造和选择新基因组；
- （4）作为遗传工程的工具。

（1）快速繁殖是用组织培养保存现有基因组的一个主要应用。植物组织和器官（如，马铃薯小块茎、胚性培养物或整个小植株）的无菌培养是组建基因库的一个重要方法。在低温下这类培养物不会生长得太快，因而可减少继代培养，用器官化的组织也能减少发生遗传变异或其他持久性变化的危险。

组织培养技术的这类用途之一是冷冻保存，即将组织冰冻贮藏很长时间，在适当的时期还可使之恢复活性。已用于这种目的的组织包括：芽分生组织、植物细胞培养物、体细胞胚胎、原生质体、整个胚胎或完整种子、以及花粉、胚珠等等，所有这些组织在冷冻保存前都要进行无菌培养。通常是用液氮进行快速冷却（适于某些植物种），可防止细胞内形成冰晶（Thorpe, 1981）。如果需要再培养这些组织。在快速冷冻之后通常要快速升温解冻（37℃）。

另一种方法是缓慢冷却，使组织逐步地适应低温条件，冰晶则通常只在细胞间形成，从而可提高组织的成活率。冷却前在培养物中加入二甲亚砜（血红细胞和牛精子冷冻贮存的保护剂），已证明是有益的，它能使胡萝卜和香石竹在分步冷却直至-196℃（液氮）之后具有很高的成活力（例如，Nag和Street, 1973, Seibdr, 1976）。甘油渗入细胞很慢，是一种更好的冷冻保护剂。液氮温度对大多数组织，（但并非所有组织）都是适宜的，而且组织在37℃下快速解冻的成活力最高。

从实用角度看，以冷冻组织作基因库或试管苗保存植物材料是很安全的。这种技术的另一个极其重要的实用价值是它有利于无病材料在相距遥远的地区（或国家）之间转移。如果委任有关机构在国际规模上进行适当的监督和组织，利用这种技术就可为全世界提供健康而可靠的植物材料，以及恰当的疾病检测程序（Kahn, 1977）。

（2）组织培养在常规育种中的应用包括：花粉培养和雄核发育、离体授粉等。雄核发育是指在培养基（通常需要高浓度的糖分）上诱导不同发育阶段的花药中的花粉进行营养生长。花粉在培养前所处的发育阶段很重要，大多数植物都以第一次有丝分裂之后为最适。能促进雄核发育的其他处理是短期暴露于低温或高温（逆境）之下。远缘杂交是产生单倍体的另一种有趣的方法，这是因为有时一个杂交亲本的基因组在细胞分裂过程中会被排除（Ka-

sha和Kao, 1970)。虽然这种方法在禾谷类作物上很有用,但它是否有普遍性,目前尚未肯定。所产生的植株可能是单倍体。将秋水仙素(0.4%)直接加入花器或维管系统,可以很容易地使染色体数加倍。由此形成的双单倍体植株具有正常并纯合的配子,是进行育种或杂交试验、或生产 F_1 杂种的重要材料。

如果花粉管不能萌发或者不能到达胚珠,正常的授粉便不能实现,这时可利用无菌培养技术给离体花朵授粉。石竹科、茄科和其他植物(Bhojwani和Razdan, 1983)的种间杂交已成功地做了这种授粉并产生了活的杂种。另一种更特殊的具有实用价值的技术是两个无菌的离体培养物嫁接。对许多多年生果树来说,这种方法有时可使通过组织培养产生的自根植株在接穗和砧木的相互作用方面比得上嫁接的植株(Conger, 1981)。

(3) 组织培养技术在产生新基因组或重组中有许多重要的用途。其中之一是从细胞或愈伤组织培养所产生的小植株中选择体细胞突变体。这类突变体的出现对于保存无性系以大批量生产整齐一致的原有材料当然是不利的,但事实上,非器官化的细胞增殖有利于这类突变体的出现。虽然正常植株的不同组织在倍性等方面存在着差异(d'Amato, 1952)。但是如果不进行脱分化处理,在培养的组织中是很少能表达这些差异的。在由单个细胞或细胞群发育成的小植株中,基因组的这些变异被表达的机率就更大,此外还有体细胞的离体突变,因此相信其数量超过正常种子生产过程中出现的变异率。然后可以在常规的筛选试验中,筛选这些突变体的有利性状,如抗病性、产量、光照或温度反应等。例如,组织培养产生的水稻小植株就被广泛地用于这个目的的试验中。

组织培养同样适应于辐射诱变。如果对整个小植株或种子进行辐射,那么只是偶尔有细胞发生突变,然后产生新性状可完全表达的茎尖等,但在组织培养中,很多细胞都能形成新的小植株,因而有更多的遗传变异能得到表达,也可用组织培养技术作其他诱变处理,如用化学诱变剂甲基磺酸乙酯(EMS)。此外,可将放射性同位素(如 ^{32}P)等物质掺入培养基,使之在组织细胞内发生作用。

细胞和组织培养技术也适宜于培养杂种合子胚。在远缘杂交中,幼小胚胎在母体植株上常常会死亡。若将胚胎在早期移离母体植株,放在人工培养基上培养,胚胎就能继续发育,并产生正常的成活植株。

(4) 组织培养技术在遗传工程方面最惊人 and 最有意义的应用是植物原生质体的产生和培养。这种“裸露”的植物细胞很象动物细胞,因而可用类似的方法进行实验操作。如果讨论染色体DNA的切割并将之插入植物DNA的技术,就会超出本文的范围,但是可以指出要针对具有纤维素壁的正常植物细胞使用这种技术可能是困难的,尽管日臻完善的微注射方法有可能会克服这个障碍。此外,借助于根癌农杆菌的Ti质粒,可以向许多种对其敏感的植物转移DNA。

有许多报道说,多聚阳离子(多聚L-赖氨酸、多聚L-鸟氨酸或DEAE-葡萄糖)能够促进原生质体直接吸收DNA,但能否成功地参入仍是个疑问(Ohyama等, 1978)。

完整原生质体的融合是一种与此相似的方法,但选择性较低,因为它是两个细胞的整个遗传构件结合成的异核体。许多融合诱导剂如聚乙二醇和电技术能促进细胞的融合。迄今为止,只有在少数情形下,通常是亲缘关系较近的细胞,其融合产物能发育成小植株。融合后两种亲本细胞核的命运也存在问题,异核体可能保持双亲的全部或部分染色体,也可能一个

亲本的全部或部分染色体会丢失。因此大多数情况下尚未获得真正的体细胞杂种。一个亲本细胞的线粒体和质体与另一个亲本的细胞核相结合形成胞质杂种，这种方法也很有用。Cocking (193) 对此作了详细的探讨。

人们希望用这种途径获得常规杂交方法所不能获得的结果，例如，呼声很高的将根瘤系统向禾谷类等不结瘤作物转移现在还不太可能。

三、植物细胞培养

按照工业上酵母、真菌、细菌等的发酵技术来培养分离的植物细胞，尤其是当用这些细胞培养物生产难以化学合成的产品或化学合成经济效益低的产品时，这种方法是非常引人注目的。这类物质大多属于植物次生代谢产物。不幸的是，这些物质通常只能由植物的特殊组织如果实产生，因此要实现有些建议（譬如在发酵器中生产苹果组织的等价物）要比想象的困难得多。此外，尽管现在能够长期保存细胞培养物，但是常用的工业方法都取决于细胞的更新和增殖。因此，具有特定代谢能力的组织细胞还必须同时能增殖、分裂很可能还必须具有分生组织的活性。但这是相互矛盾的而且是不太可能的，因为所需的化学物质通常只能由老化的组织或特定的专化器官产生。

象固定化酶方法一样，也可以将整个细胞附着于固定的或流动的支持物上（即不同类型的表面，例如，浮于培养基中的小珠），以保证细胞在具有基本代谢物和条件的培养基中存活，并利用前体物质产生所需的化合物。

在Staba (1980) 编辑的讨论会文集中有关植物细胞培养的论述非常详尽。内容包括：技术、经济效益、所需的操作规模、细胞培养所产生的物质（包括生物碱、色素、有机酸、苯醌等）。

四、无病材料的生产

最后、至少应提及组织培养的一个最早的用途——生产无病材料，即无病毒、类病毒或枝原体的材料。基本方法是分离茎尖（分生组织培养）作为在适当培养基上的外植体。

茎尖，即使是染病植株的茎尖，通常是不带病毒等病原的。其原因尚不十分清楚，就象发病植株常常产生无病毒种子一样。分生组织细胞通常缺乏大液泡、或者维管束通道受到干扰，这也许是个重要原因。

分生组织培养产生新的小植株（有时还要进行高温处理以消除病毒），这就提供了健康的植株材料，它可以通过组织培养或常规方法进一步无性繁殖。

总之可以说，我们正处于组织培养技术在理论和实际应用方面的裨益日趋增加的年代。显而易见，上述方法将有助于我们加深对这个研究领域基本原则的了解。

参 考 文 献

- Apavatjirut, P. and Blake, J. Tissue Culture of Stem explants of Coconut
1977 (Cocos nucifera L.) Oléagineux 32, 267~270.

- Bhojwani, S. S. and Razdan, M. K. *Plant Tissue Culture, Theory and Practice*, Vol. 5 of Developments in Crop Science, Elsevier, Amsterdam, 502 pp.
1983
- Cocking, E. C. Hybrid and cybrid production via protoplast fusion. In *Genetic Engineering, Applications to Agriculture*, L. D. Owens (ed.), Beltsville Symposium 7. Granada, London, pp. 258-268.
1983
- Conger B. V. (ed.) *Cloning Agricultural Plants Via In vitro Techniques*. CRC Press, Florida, 273 pp.
1981
- D'Amato, F. Polyploidy in the differentiation and function of tissues and cells in plants. *Caryologia* 4, 311-358
1952
- Evans, D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P. V. & Yamada, Y. *Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1, Techniques for Propagation and Breeding*. Macmillan, New York, 970 pp.
1983
- Galston, A. W. Polyamines as modulators of plant development. *Bioscience* 33, 382-388
1983
- Galston, A. W., Altman, A. & Kaur-Sawhney, R. Polyamines, ribonuclease and the improvement of oat leaf protoplasts. *Plant Science Letters* 11, 69-79.
1978
- Gautheret, R. J. *La culture des tissus vegetaux*. Masson edit., Paris, 863 pp.
1959
- Haberland, G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber. d. Kais. Akad. D. Wiss, math.-naturw. Klasse* 111, 69-92.
1902
- Jones, O. P. Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots. *Nature* 136, 392-393.
1926
- Kahn, R. P. Plant quarantine: principles, methodology and suggested approaches. In *Plant Health and Quarantine in International Transfer of Genetic Resources* W. B. Hewitt and L. Chiarappa (eds.) Chemical Rubber Co. Press Inc., Cleveland, Ohio, pp. 289-307.
1977
- Kasha, K. J. and Kao, K. N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Nature, London* 225, 874-876.
1970
- Lavee, S. and Galston, A. W. [Structural, physiological, and biochemical gradients in tobacco pith tissue. *Plant Physiology* 43, 1760-1768.
1968
- McWilliam, A. A., Smith, S. M. & Street, H. E. The origin and development of embryoids in suspension cultures of carrot (*Daucus carota*). *Ann. Bot.* 38, 243-250.
1974

- Meins, F. quoted by Nina Federoff in *Plant Molecular Biology*, R. B. Goldberg (ed.), Proc. of ARCO Solar UCLA Symp., Keystone, Colorado.
- 1983
- Morel, G. and Wetmore, R. H. Tissue culture of monocotyledons. *American Journal of Botany* 38, 138-140
- 1951
- Murashige, T. and Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 115, 473-497.
- 1962
- Nag, K. K. and Street, H. E. Carrot embryogenesis from frozen cultured Cells. *Nature* 245, 270-272
- 1973
- Ohyama, K., Pelcher, L. E. & Schaefer, E. DNA uptake by plant protoplasts and isolated nuclei; biochemical aspects. In *Frontiers of Plant Tissue Culture*, T. Thorpe (ed.), University of Calgary Press, Canada, p. 75-84.
- 1978
- Seibert, M. Shoot initiation from shoot apices frozen to -196°C . *Science* 191, 1178-1179.
- 1976
- Sharp, W. R., Larsen, P. O., Paddock, E. F. & Raghavan, V. *Plant Cell and Tissue Culture, Principles and Applications* Ohio State University Press, Columbus, 892 pp.
- 1979
- Steward, F. C. Totipotency of angiosperm cells; its significance for morphology and embryology. *Phytomorphology* 17, 499-507.
- 1967
- Steward, F. C. and Krikorian, A. P. Problems of integration and organization. In *Plant Physiology, A Treatise* Vol. IIC, Academic Press, N. Y., 367-419.
- 1972
- Steward, F. C., Mapes, M. O., Kent, A. E. & Holsten, R. D. Growth and development of cultured plant cells. *Science, N. Y.* 143 20-27.
- 1964
- Staba, E. J. (ed.) . *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals* CRC Press, Florida, 285 pp.
- 1980
- Street, H. E. Embryogenesis and chemically-induced organogenesis. In *Plant Cell and Tissue Culture, Principles and Applications* W. R. Sharp et al. (eds.) Ohio State University Press, Columbus, pp. 123-153.
- 1979
- Thorpe, T. A. (ed.) . *Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press, 379 pp.
- 1981
- Tran Thanh Van, M. *In vitro* control of *de novo* flower, bud, root and callus differentiation from excised epidermal tissues. *Nature* London 246, 44-45.
- 1973

- White, P. R. Controlled differentiation in a plant tissue culture. *Bull. Torrey Bot. Club* 66, 507-513. 1939
- Zimmerman, R. H. and Broome, O. C. Phloroglucinol and *in vitro* rooting of apple cultivar cuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 106, 648-652. 1981

2. 马铃薯组织培养

H. Rønde Kristensen

(The National Institute of Plant Pathology, Lyngby, Denmark)

摘 要

大约在30年以前,法国人Morel和Martin获得了马铃薯和大丽花的无病毒分生组织培养物。从此以后全世界开展了这项研究,以期获得更多种植物的分生组织培养物。

在丹麦,这项研究工作始于1961年。首先研究的是马铃薯,后来才研究其他多种植物。

在已有成就的基础上,1977年在丹麦开始了一项生产健康马铃薯的新计划,估计从1986年起丹麦的所有种用马铃薯都将用分生组织培养技术生产。

入选的无性系块茎是马铃薯分生组织培养的基础。应该选用纯种的块茎,并检测其上有无马铃薯纺锤状块茎类病毒和马铃薯环腐病菌。

从块茎的芽上切取分生组织,放在试管内的特定培养基上培养。

在由分生组织发育成的植株上,切取茎段,同样地放在试管内的人工培养基上生长。

由茎段产生的植株可以库存起来备用,它是在温室保护条件下形成第一代块茎的基础。

第二代和第三代块茎的生产是在户外的隔离条件下进行的,然后由指定的马铃薯种植者进行三年的前原种栽培,此后再进行两年原种栽培。

分生组织培养第一个阶段的所有初期工作是在严格的无菌条件下进行的,对所有的原始“分生组织植株”都要用电镜法、血清学方法或指示植物法仔细检测病毒病。

一、前 言

近40年来,人们为不同目的进行了大量的植物分生组织培养工作,诸如与解剖学、生物化学有关的基础研究或者是为获得重要栽培植物的健康原原种而进行的应用研究。

White (1943)的早期工作证明,染病毒番茄的根尖比老龄组织含有较少的病毒。Lil-masset、Cornuet和Gendron (1949)发现,染病毒的烟草植株的顶端分生组织通常不含病毒。

大约30年以前,Morel和Martin (1952和1955)通过切取分生组织并在无菌的人工培养基上培养,获得了大丽花和马铃薯的某些染病毒品种的健康原种。

但是,Sheffield (1942)、Lackey (1946)和Norris (1954)的研究证明分生组织也会感染病毒,因此,当通过分生组织培养生产健康原原种时,仔细检测有关病原的有无是很重要的。