

全国普通高等院校
生命科学类“十二五”规划教材



植物组织培养教程

于丽杰 韦鹏霄 曾小龙 主编

Zhiwu Zuzhi Peiyang Jiaocheng



华中科技大学出版社
<http://www.hustp.com>

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材

植物组织培养教程

主 编 于丽杰 韦鹏霄 曾小龙
副主编 岳中辉 汤行春 马三梅 王有武
陆 胤 肖辉海 张君毅
编 委 (按姓氏笔画排序)

马三梅 (暨南大学)
于亚军 (湖南城市学院)
于丽杰 (哈尔滨师范大学)
王有武 (塔里木大学)
韦鹏霄 (广西大学)
汤行春 (湖北大学)
张君毅 (华侨大学)
肖辉海 (湖南文理学院)
岳中辉 (哈尔滨师范大学)
金晓霞 (哈尔滨师范大学)
陆 胤 (浙江树人大学)
秦公伟 (陕西理工学院)
曾小龙 (广东第二师范学院)
蒋景龙 (陕西理工学院)
熊仁次 (塔里木大学)



华中科技大学出版社
中国·武汉

内 容 提 要

本书系统、全面地介绍了植物组织培养的基本概念、基本原理、基本操作技术以及研究方法等,内容包括植物组织培养的基本原理和基本操作,植物组织培养实验室与仪器设备,植物营养培养基的组成、种类及配制,植物器官培养与离体快繁,植物脱毒与茎尖培养,植物胚胎培养和离体授粉受精,植物花药(粉)培养与单倍体育种,植物原生质体培养与体细胞杂交,体细胞无性系变异与突变体筛选,植物的人工种子,植物种质资源的离体保存,植物细胞遗传转化与转基因,植物细胞培养与次生代谢产物生产等。在大部分章基础理论之后都列举了应用实例,方便学生进行基本的技能训练。书中吸收了近年来植物组织培养技术中所取得的新成果和先进经验,有一定的新颖性、科学性和实用性。在每章前设置了知识目标和技能目标,每章后有小结和复习思考题,方便学生学习。

本书适合于农林、师范和综合性院校的生物科学类、生物技术类、园林类、农学类、草业科学类、森林资源类、环境科学和生态学等各专业不同层次学生作为教材使用,也可供生物类研究生、教师和相关行业科研人员以及从事植物组织培养工作的技术人员、经营管理人员作为参考书使用。

图书在版编目(CIP)数据

植物组织培养教程/于丽杰,韦鹏霄,曾小龙主编. —武汉:华中科技大学出版社,2015.4
全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材
ISBN 978-7-5609-9711-7

I. ①植… II. ①于… ②韦… ③曾… III. ①植物学-组织培养-高等学校-教材 IV. ①Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 079563 号

植物组织培养教程

于丽杰 韦鹏霄 曾小龙 主编

策划编辑:王新华

责任编辑:王新华

封面设计:刘 卉

责任校对:刘 竣

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321913

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:武汉市籍缘印刷厂

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:15

字 数:390千字

版 次:2015年8月第1版第1次印刷

定 价:36.00元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材

编委会



主任委员

余龙江 华中科技大学教授,生命科学与技术学院副院长,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物工程与生物技术专业教学指导分委员会委员,2013—2017 教育部高等学校生物技术、生物工程类专业教学指导委员会委员

副主任委员(排名不分先后)

胡永红 南京工业大学教授,南京工业大学研究生院副院长

李 钰 哈尔滨工业大学教授,生命科学与技术学院院长

任国栋 河北大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物学基础课程教学指导分委员会委员,河北大学学术委员会副主任

王宜磊 菏泽学院教授,2013—2017 教育部高等学校大学生物学课程教学指导委员会委员

杨艳燕 湖北大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物科学专业教学指导分委员会委员

曾小龙 广东第二师范学院教授,副校长,学校教学指导委员会主任

张士瑾 中国海洋大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物科学专业教学指导分委员会委员

委员(排名不分先后)

陈爱葵	胡仁火	李学如	刘宗柱	施文正	王元秀	张 峰
程水明	胡位荣	李云玲	陆 胤	石海英	王 云	张 恒
仇雪梅	贾建波	李忠芳	罗 充	舒坤贤	韦鹏霄	张建新
崔韶晖	金松恒	梁士楚	马 宏	宋运贤	卫亚红	张丽霞
段永红	李 峰	刘长海	马金友	孙志宏	吴春红	张 龙
范永山	李朝霞	刘德立	马三梅	涂俊铭	肖厚荣	张美玲
方 俊	李充璧	刘凤珠	马 尧	王端好	徐敬明	张彦文
方尚玲	李 华	刘 虹	马正海	王金亨	薛胜平	郑永良
耿丽晶	李景蕻	刘建福	毛露甜	王伟东	闫春财	周 浓
郭晓农	李 梅	刘 杰	聂呈荣	王秀丽	杨广笑	朱宝长
韩曜平	李 宁	刘静雯	彭明春	王永飞	于丽杰	朱长俊
侯典云	李先文	刘仁荣	屈长青	王有武	余晓丽	朱德艳
侯义龙	李晓莉	刘忠虎	邵 晨	王玉江	曾丽霞	宗宪春

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材

组编院校

(排名不分先后)

北京理工大学
广西大学
广州大学
哈尔滨工业大学
华东师范大学
重庆邮电大学
滨州学院
河南师范大学
嘉兴学院
武汉轻工大学
长春工业大学
长治学院
常熟理工学院
大连大学
大连工业大学
大连海洋大学
大连民族学院
大庆师范学院
佛山科学技术学院
阜阳师范学院
广东第二师范学院
广东石油化工学院
广西师范大学
贵州师范大学
哈尔滨师范大学
合肥学院
河北大学
河北经贸大学
河北科技大学
河南科技大学
河南科技学院
河南农业大学
菏泽学院
贺州学院
黑龙江八一农垦大学

华中科技大学
华中师范大学
暨南大学
首都师范大学
南京工业大学
湖北大学
湖北第二师范学院
湖北工程学院
湖北工业大学
湖北科技学院
湖北师范学院
湖南农业大学
湖南文理学院
华侨大学
武昌首义学院
淮北师范大学
淮阴工学院
黄冈师范学院
惠州学院
吉林农业科技学院
集美大学
济南大学
佳木斯大学
江汉大学文理学院
江苏大学
江西科技师范大学
荆楚理工学院
军事经济学院
辽东学院
辽宁医学院
聊城大学
聊城大学东昌学院
牡丹江师范学院
内蒙古民族大学
仲恺农业工程学院

云南大学
西北农林科技大学
中央民族大学
郑州大学
新疆大学
青岛科技大学
青岛农业大学
青岛农业大学海都学院
山西农业大学
陕西科技大学
陕西理工学院
上海海洋大学
塔里木大学
唐山师范学院
天津师范大学
天津医科大学
西北民族大学
西南交通大学
新乡医学院
信阳师范学院
延安大学
盐城工学院
云南农业大学
肇庆学院
浙江农林大学
浙江师范大学
浙江树人大学
浙江中医药大学
郑州轻工业学院
中国海洋大学
中南民族大学
重庆工商大学
重庆三峡学院
重庆文理学院

前 言

植物组织培养是当代生物科学中最有生命力的重要学科之一,它既是植物遗传工程、生理生态研究的重要工具,又是遗传育种、植物种子学、植物生产学的一种实用性极强的高新技术。为适应社会对植物组织培养人才的需要,目前许多高等院校已将其作为生物学相关专业的一门重要的应用基础课。该课程与植物学、植物生理学、微生物学、遗传学等学科有着密切的联系。通过该课程的学习,可以为许多生物基础理论的深入研究提供必要的方法和手段。学生掌握该技术后可以独立从事相关产业的研究工作,在经济植物的产业化发展中发挥自己所学专业知识的作

用。本书参编人员均是多年从事植物组织培养领域教学、科研工作的同仁,具有丰富的理论与实践经验。我们查阅了国内外大量的研究论文、专著和相关教材,归纳和总结了本学科最新技术、研究成果及发展动态,结合教学科研工作中的体验,进行本书的编写。

本书的特点是理论与实践相结合,既有较全面的植物组织培养基础知识和基本理论介绍,又有典型的离体培养的实用示范,理论性和实用性都很强。本书适合于综合性院校、师范院校以及农林院校的生物及相关专业的学生作为教材使用,也可供从事生命科学领域研究工作的相关人员阅读参考。

本书由于丽杰、韦鹏霄、曾小龙主编。编写分工如下:第一章由韦鹏霄编写;第二章由岳中辉编写;第三章由陆胤编写;第四章由曾小龙编写;第五章由金晓霞编写;第六章由张君毅编写;第七章由汤行春编写;第八章由王有武、熊仁次编写;第九章由于丽杰编写;第十章由肖辉海编写;第十一章由于亚军编写;第十二章由秦公伟编写;第十三章由马三梅编写;第十四章由蒋景龙编写。全书由于丽杰和岳中辉统稿、审稿和定稿。

植物组织培养研究涉及面广,内容和要求变化快,尽管我们倾注大量的心血,但因知识水平有限,书中难免会有不足之处,衷心希望各位专家、读者批评指正。

编 者

2015 年 4 月

目 录

第一章 绪论 /1

- 第一节 植物组织培养的基本概念和常用术语 /1
- 第二节 植物组织培养的分类和特点 /3
- 第三节 植物组织培养的发展简史 /6
- 第四节 植物组织培养的技术领域及应用 /11
- 第五节 植物组织培养的新技术及应用 /15

第二章 植物组织培养的基本原理和基本操作 /18

- 第一节 植物组织培养的基本原理 /18
- 第二节 植物组织培养的基本操作方法 /22
- 第三节 植物组织培养的常见问题与对策 /28

第三章 植物组织培养实验室与仪器设备 /33

- 第一节 植物组织培养实验室的组成与设置 /33
- 第二节 植物组织培养的仪器设备及其使用 /37

第四章 植物营养培养基的组成、种类及配制 /47

- 第一节 植物营养培养基的组成 /47
- 第二节 植物营养培养基的种类 /50
- 第三节 植物营养培养基的配制 /54

第五章 植物器官培养与离体快繁 /58

- 第一节 植物的器官培养 /58
- 第二节 植物的离体快繁 /62
- 第三节 植物器官培养和离体快繁的应用实例 /69

第六章 植物脱毒与茎尖培养 /72

- 第一节 培育脱毒苗的意义 /72
- 第二节 防治植物病毒的方法 /73
- 第三节 茎尖培养脱除植物病毒 /77
- 第四节 植物脱毒与茎尖培养的应用实例 /83

第七章 植物胚胎培养与离体授粉受精 /87

- 第一节 植物的胚胎培养 /87
- 第二节 植物胚胎培养的基本技术 /90
- 第三节 植物离体授粉与受精 /96
- 第四节 植物胚培养和离体受精的应用实例 /101

第八章 植物花药(粉)培养与单倍体育种 /104

- 第一节 植物花药(粉)培养与单倍体育种的含义及意义 /104
- 第二节 花药和小孢子的发育 /106
- 第三节 花药(粉)培养的基本方法 /108
- 第四节 影响花药(粉)培养的因素 /115
- 第五节 花药(粉)培养白化苗发生的机理及影响因素 /119
- 第六节 植物花药(粉)培养及单倍体育种的应用实例 /120

第九章 植物原生质体培养与体细胞杂交 /125

- 第一节 植物原生质体培养的定义及特点 /125
- 第二节 植物原生质体培养的程序和方法 /126
- 第三节 植物原生质体的分离 /127
- 第四节 植物原生质体的纯化及活力鉴定 /129
- 第五节 植物原生质体的培养 /130
- 第六节 植物原生质体的再生 /133
- 第七节 植物体细胞杂交 /134
- 第八节 杂种细胞的选择与鉴定 /137
- 第九节 植物原生质体培养与体细胞杂交的应用实例 /140

第十章 体细胞无性系变异与突变体筛选 /144

- 第一节 体细胞无性系变异 /144
- 第二节 植物体细胞突变体筛选 /150
- 第三节 体细胞突变体筛选的应用实例 /154

第十一章 植物人工种子 /156

- 第一节 人工种子的基本概念和应用价值 /156
- 第二节 人工种子的制作 /158
- 第三节 植物人工种子的应用实例 /164

第十二章 植物种质资源的离体保存 /167

- 第一节 植物种质保存的概念及意义 /167
- 第二节 限制生长保存 /168
- 第三节 超低温保存 /171

第四节	影响离体保存种质遗传完整性的因素	/176
第五节	植物种质资源离体保存的应用实例	/177
第十三章	植物细胞遗传转化与转基因	/181
第一节	植物细胞遗传转化与转基因的有关术语	/181
第二节	植物转基因的用途和研究进展	/183
第三节	植物细胞遗传转化的离体培养方法	/185
第四节	植物转基因的技术和方法	/186
第五节	转基因植物的鉴定和选择	/189
第六节	植物转基因的应用实例	/194
第十四章	植物细胞培养与次生代谢产物生产	/200
第一节	植物次生代谢产物的类型与合成	/200
第二节	离体培养细胞系的筛选	/204
第三节	植物次生代谢产物的提取与分离纯化	/208
第四节	植物生物反应器及其生产技术	/210
第五节	植物细胞培养与次生代谢产物生产的应用实例	/214
附录		/217
附录 A	植物组织培养常用缩略语	/217
附录 B	植物组织培养基常用化合物相对分子质量	/221
附录 C	常用植物生长调节物质浓度单位换算表	/223
附录 D	相对原子质量表	/223
附录 E	培养基成分	/224
参考文献		/229

第一章

绪论

【知识目标】

1. 掌握植物组织培养的基本概念和常用术语。
2. 掌握植物组织培养的类别和特点。
3. 了解植物组织培养的发展简史。
4. 了解植物组织培养的技术领域和应用前景。

【技能目标】

1. 运用所学的相关概念和术语,解释相关的植物组织培养现象。
2. 了解植物组织培养在实践中的具体应用。

第一节 植物组织培养的基本概念和常用术语

一、植物组织培养的基本概念

植物组织培养(plant tissue culture)是指在无菌(asepsis)和人工控制的环境条件下,利用人工配制的适宜培养基,对植物的胚胎(成熟和未成熟的胚)、器官(根、茎、叶、花、果实、种子等)、组织(分生组织、形成层、木质部、韧皮部、表皮、皮层、胚乳组织、薄壁组织、髓部组织、花药组织等)、细胞(体细胞、生殖细胞等)、原生质体等进行离体培养(culture in vitro),使其细胞分裂和生长增殖、细胞分化和再生发育成完整植株的过程。在这个过程中,用于培养的植物胚胎、器官、组织、细胞和原生质体等已脱离了母体植株,因此,植物组织培养又称为植物的离体培养。

植物组织培养的概念有广义和狭义之分。广义的植物组织培养是指对植物的器官、组织、细胞及原生质体等进行离体培养的技术。狭义的植物组织培养是指对植物的组织(如分生组织、表皮组织、薄壁组织等)及培养产生的愈伤组织进行离体培养的技术。

二、植物组织培养的常用术语

在植物组织培养的研究与发展过程中,形成了许多的专门术语。常用的植物组织培养术语如下:

(一) 植物细胞的全能性

植物细胞的全能性(totipotent of plant cell)是指植物细胞携带与母体植株相同的全部遗

传信息,因而在离体培养时,能被诱导发生器官分化并再生成与母体植株基本相同的新植株的能力。植物细胞的全能性是植物组织培养的基本原理和理论依据。

(二) 外植体

外植体(explant)是指离体培养用的器官、组织或其切段、细胞以及原生质体等,在体外培养中能增殖以及再生植株。

(三) 培养基

培养基(medium)是指在植物离体培养时,由人工配制的含有各种营养成分供培养物生长的基质。

(四) 接种

接种(inoculation)是指在无菌条件下,将培养物接入培养基中的过程。

(五) 细胞脱分化

细胞脱分化(cell dedifferentiation)是指已分化的细胞在一定因素的作用下,改变原来的发展方向而恢复分裂能力的过程。

(六) 细胞再分化

细胞再分化(cell redifferentiation)是指已脱分化的细胞经不断的细胞分裂而形成的愈伤组织或胚性细胞团,在合适条件(主要是激素和光照等)下重新分化出具有专一功能的组织、器官(根、芽等)或胚状体等的过程。

(七) 愈伤组织

愈伤组织(callus)是指外植体因受伤或在离体培养时,其未分化的细胞和已分化的细胞经脱分化,形成一团没有分化的、无特定结构的多细胞团。

(八) 胚性细胞团

胚性细胞团是指在植物组织培养中,具有强烈增殖和分化能力,并具有胚性发生且结构松散的细胞团块结构。

(九) 胚状体

胚状体(embryoid)是指在植物细胞和组织培养中,起源于一个非合子细胞,经过多次分裂而产生的一种与合子胚相似的结构。

(十) 初代培养

初代培养(primary culture)是指将植物体上分离得到的外植体进行最初培养的过程,又称启动培养或诱导培养(induced culture)。

(十一) 继代培养

继代培养(subculture)是指将初代培养诱导产生的培养物重新分割或分离,并转移至新鲜培养基继续培养,以保持培养物的连续生产和增殖的过程,又称增殖培养。

（十二）生根培养

生根培养(rooting culture)是指诱导组培苗生根,进而形成完整植株的过程,又称生根壮苗培养。

（十三）悬浮培养

悬浮培养(suspension culture)是指在液体培养基中对细胞及小细胞团进行培养,在此种条件下,细胞和小细胞团能保持良好的分散性,而且培养物组织化的水平通常较低。

（十四）器官发生或器官形成

器官发生或器官形成(organogenesis)是指组织培养物或悬浮培养物中芽、根或花等器官的分化与形成。

（十五）无性系

无性系(clone)是指一群经离体培养后,在遗传上基本一致的细胞、组织或植株(物种)。无性系又可分为单细胞无性系(single cell clone)、愈伤组织无性系(callus clone)和原生质体无性系(protoclone)。

（十六）细胞系

细胞系(cell line)是指对来自原初培养物的细胞(单细胞)连续进行一次、两次乃至多次继代培养的细胞群体。

第二节 植物组织培养的分类和特点

一、植物组织培养的分类

（一）根据培养材料分类

1. 植物培养

植物培养(plantlet culture)是指对幼苗及较大的植物体的培养。

2. 胚胎培养

胚胎培养(embryo culture)是指对成熟及未成熟胚胎的离体培养,包括合子胚、珠心胚、子房、胚乳培养及试管受精等。

3. 器官培养

器官培养(organ culture)是指把植物体某一器官如芽、花药、根、茎、胚、叶或切段在合成培养基上进行离体培养的过程。按所用于培养的器官的类型不同,又分为芽培养、茎端(茎尖)培养、根(尖)培养、茎(段)培养、叶(片)培养、胚(乳)培养、子房培养、花药(粉)培养等。

4. 愈伤组织培养

愈伤组织培养(callus culture)是指对植物离体部分通过培养增殖而形成的愈伤组织的培养。

5. 组织培养

组织培养(tissue culture)是指对构成植物体的各种组织的离体培养,如分生组织、表皮组织、输导组织、薄壁组织等离体组织的培养。

6. 细胞培养

细胞培养(cell culture)是指用单个细胞进行的液体培养或固体培养,其目的是诱导细胞增殖及分化以获得单细胞的无性系。

7. 原生质体培养

原生质体培养(protoplast culture)是指对去掉细胞壁后所获得的细胞原生质体的培养。

(二) 根据培养方式分类

1. 固体培养

固体培养(solid culture)是指利用固体培养基进行的培养。

2. 液体培养

液体培养(liquid culture)是指用不加任何凝固剂的液体培养基进行的培养。

液体培养方式又可分为以下几种:

(1) 静止培养 静止培养(stationary culture)是把培养物接入液体培养基,置于静止状态下进行培养。

(2) 纸桥培养 纸桥培养(paper bridge culture)是在液体培养基中放入滤纸形成纸桥,再将培养物置于滤纸上进行培养。

(3) 振荡培养 振荡培养(shake culture)是将盛有液体培养基和培养物的培养容器,置于往复摇床上,使培养液振荡的培养。

(4) 旋转培养 旋转培养(roller culture)是将盛有液体培养基和培养物的培养容器,置于转床上进行旋转的培养。

(三) 根据培养技术分类

1. 一般培养

一般培养(general culture)是对植物的各种组织、器官及愈伤组织的常规固体培养。

2. 悬浮培养

悬浮培养是在液体培养基中对细胞及小细胞团进行培养。

3. 看护培养

看护培养(nurse culture)是用离体组织和培养物(如花药、愈伤组织等)来看护单细胞(如花粉粒、原生质体等),使之生长和增殖的培养。

4. 微室培养

微室培养(micro-chamber culture)是将游离单细胞置于很少量的培养基和微室环境中的培养。

5. 平板培养

平板培养(plat culture)是将悬浮培养的细胞接种到一薄层固体培养基上的培养。

6. 发酵培养

发酵培养(fermentation culture)是指在发酵罐或生物反应器内对单细胞或小细胞团进行大规模的连续培养。

二、植物组织培养的特点

(一) 培养材料来源广泛

由于植物细胞具有全能性,所以在一定的培养条件下,单个或小块组织的细胞都可以生长增殖和分化再生出完整植株。植物组织培养的外植体可来自植物组织、器官、细胞及原生质体,因此培养材料来源广泛、取材丰富。在实际研究和应用中,以茎尖、根、茎、叶、子叶、下胚轴、花芽、花瓣等作材料进行培养时,只需几毫米甚至不到 1 mm 大小的材料;在细胞及原生质体培养时,所需材料更少。由于取材少,培养效果好,对于植物“名、特、优”新品种的快速繁殖(快繁)和良种复壮、珍稀濒危植物种质资源的保存和利用,都具有重要的现实意义和很大的应用价值。如非洲紫罗兰(*Saintpaulia ionantha*),取 1 枚叶片培养,经 3 个月培养就可得到 5 000 株苗;甘蔗(*Saccharum officinarum*),取良种的 1 个腋芽培养,经 1 年就可以得到 50 万株以上的试管苗。

(二) 培养条件可控

在植物组织培养中,培养材料所需的培养基质营养丰富且由人工进行配制,所需的温度、光照、湿度等均可以调控。因此,培养条件完善,不受大自然中四季、昼夜气候变化及灾害性气候影响,有利于植物生长和周年培养生产。

(三) 生长周期短、繁殖效率高

由于植物组织培养可以人为地控制培养条件,并能满足植物生长所需的环境条件,因此,植物生长速度快,生长周期短,往往 1~2 个月即可完成一个生长周期。如马铃薯(*Solanum tuberosum*)茎尖培养的无菌苗,不到 2 个月即可结成试管微型薯;铁皮石斛无菌苗培养 2 个月,也可使其花芽分化和开花。在适宜的培养条件下,植物材料能以几何级数大量繁殖,繁殖效率高,比常规无性繁殖(如嫁接、扦插、分株等)的繁殖效率要高数百倍甚至上千倍。

(四) 管理方便、利于自动化控制

植物组织培养是在一定的场所内,人为提供一定的温度、光照、湿度、气体、营养和激素等条件,进行高度集约化、微型化、精密化的科学培养和生产,比常规的盆栽、田间栽培等省去了中耕除草、浇水施肥、病虫害防治等繁杂劳动,极大地节省了人力、物力及土地。同时,可通过有关仪器仪表进行自动化控制(如定时调温和照光等),有利于植物组织培养的程序操作和工厂化生产。

(五) 条件可控、实验重复性好

植物组织培养是人工控制培养基中的各种成分,同时可以对培养环境进行调控,因此培养条件的误差小,实验处理易于安排调配,实验的重复性好。

(六) 实验体系完善

植物组织培养的实验技术和方法系统完善,适用性强,是研究植物学、细胞学、生理学、遗传学、育种学、发育学、药物学和生物化学等学科的新的重要实验体系,有利于开展相关学科的基础研究和应用研究。通过开展植物组织培养的有关实验,可研究非合子细胞形成胚胎的机理、原生质体再生细胞壁的机制、激素控制器官分化的作用模式、小孢子离体发育再生植株的

途径、细胞次生代谢产物形成的条件、细胞遗传转化的分子机制等,极大地丰富和促进相关学科的研究。

第三节 植物组织培养的发展简史

与其他新学科和新技术一样,植物组织培养也经历了一个发展的过程。虽然它的蓬勃发展只是近四十年来的事,但它的整个历史可以追溯到 20 世纪初。从那时起到现在,植物组织培养的发展过程大致可分为三个阶段,即探索阶段、奠基阶段、迅速发展和逐步实用化阶段。

一、探索阶段(20 世纪初至 30 年代中)

1902 年,在德国植物学家 M. J. Schleiden 和动物学家 T. Schwann 首创(1838—1839)的“细胞学说”的推动下,德国植物学家 G. Haberlandt(1854—1945)用 Knop 培养基培养紫花野芝麻(*Lamium purpureum*)和凤眼蓝(*Eichhornia arassipes*)的叶肉栅栏细胞,虎眼万年青属(*Ornithogalum*)的表皮细胞及紫露草(*Tradescantia*)的栅栏细胞、髓细胞、腺毛和雄蕊毛等单个离体细胞。结果他明显看到了培养细胞的生长、细胞壁的加厚和淀粉的形成等,并发现有的细胞能维持活力达 1 个月之久,但没有一个细胞在培养中能够分裂。就培养细胞未能分裂及分化而言,此实验没有成功。这是因为他所选用的实验材料都是已经高度分化了的细胞,同时所用的培养基过于简单,尤其是培养基中没有包含诱导成熟细胞分裂所必需的生长激素,而生长激素在当时还没有被发现和认识。然而,作为植物组织培养的先驱者,Haberlandt 的贡献不仅在于首次进行了离体细胞培养的实验,而且在于发表了第一篇有关植物细胞培养的经典性论文《植物离体细胞培养实验》。他在文中阐述了细胞培养的重要意义,并大胆提出“高等植物的器官和组织可以不断分割,直至单个细胞”的观点,提出了植物细胞“全能性”的设想。他还提出了一些重要的预言和设想,例如:用某种刺激因素作用,能使游离细胞恢复不断的生长;利用看护培养和胚囊液进行组织培养;从营养细胞培育出人造胚;等等。这些预言和设想,大多被后人的实验所证实。因此,Haberlandt 被誉为“植物组织培养之父”。

自 Haberlandt 的实验和经典性论文发表后,在植物组织培养领域还有一些探索性的工作,主要集中在胚培养和根培养两个方面。具体的研究如下:

1904 年,德国植物胚胎学家 E. Hanning 首次对一些十字花科植物进行“胚培养”,他在无机盐和蔗糖溶液中培养了萝卜(*Raphanus sativus*)和辣根菜(*Cochlearia officinalis*)的胚,使这些胚在离体条件下长到成熟。

1908 年,S. Simon 培养白杨(*Populus bonatii*)幼茎的切段,产生了愈伤组织并发育出根和芽。

1922 年,德国的 W. Kotte 成功地培养了豌豆(*Pisum sativum*)和玉米(*Zea mays*)的离体根尖,美国的 W. J. Robbins 也报道了培养离体根尖获得成功,这是有关根培养的最早实验。

1924 年,R. Blumenthal 和 P. Meyer 观察到培养中的胡萝卜(*Daucus carota*)切片形成愈伤组织。

1925 年,F. Laibach 用“胚培养法”使亚麻属(*Linum*)的种间杂种胚培养成熟和成苗,克服了杂交不育障碍,从而证明了胚培养在植物远缘杂交中利用的可能性。

1927 年,L. Rehwald 也观察到胡萝卜、辣根菜等切片能产生愈伤组织。

二、奠基阶段(20 世纪 30 年代中至 50 年代末)

植物组织培养技术的真正建立是在 20 世纪 30 年代。当时世界上主要有两个中心从事植物组织培养研究:一是在法国,以 R. J. Gautheret 为首;二是在美国,以 P. R. White 为首。植物组织培养工作主要是在这两个国家发展起来的。在此期间,科学家们进行了一些重要的有意义的工作。

1934 年,K. V. Thimann 及其合作者对吲哚乙酸(IAA)的生理作用进行了广泛研究。

1935 年,R. Snow 报道了 IAA 能刺激形成层的活力。

1937 年,P. R. White 最先建立了人工合成的综合营养培养基(White 培养基)。

1937—1938 年,R. J. Gautheret 和 P. Nobecourt 把 IAA 和 B 族维生素用于植物组织培养,发现其能显著促进黄花柳(*Salix caprea*)形成层的生长。

1939 年,Gautheret、Nobecourt 和 White 等成功地对愈伤组织进行继代培养。Gautheret 连续培养胡萝卜根形成层首次获得成功。Nobecourt 由胡萝卜、White 由烟草(*Nicotiana tabacum*)-1212 种间杂种的瘤组织,也建立了类似的连续生长的组织培养物。因此,Gautheret、White 和 Nobecourt 一起被誉为“植物组织培养的奠基人”。我们现在所用的若干培养方法和培养基,原则上都是这 3 位科学家在 1939 年所建立的方法和培养基演变的结果。

20 世纪 40 年代和 50 年代初,活跃在植物组织培养领域里的研究者以 Skoog 为代表,他研究的主要内容是利用嘌呤类物质处理烟草髓愈伤组织以控制组织的生长和芽的形成。Skoog(1944 年)以及 Skoog 和崔激(我国著名的植物学家)等(1951 年)发现,腺嘌呤或腺苷不但可以促进愈伤组织的生长,而且能解除培养基中 IAA 对芽形成的抑制作用,诱导芽的形成,从而确定了腺嘌呤与生长素的比例是控制芽和根形成的主要条件之一。

在 20 世纪 40 年代,植物组织培养技术的另一有价值的成果是 Overbeek 等首次把椰子汁作为补加物引入培养基中,使曼陀罗(*Datura stramonium*)的心形期幼胚离体培养至成熟。到 20 世纪 50 年代初,美国科学家 F. C. Steward 等在胡萝卜组织培养中也使用了椰子汁,从而使椰子汁在植物组织培养的各个领域中都得到了广泛应用。

20 世纪 50 年代,植物组织培养的研究日趋繁荣,10 年中引人注目的进展有以下 6 项:

(1) 1952 年,Morel 和 Martin 首次证实,通过茎尖分生组织的离体培养,可以由已受病毒侵染的大丽花(*Dahlia pinnata*)中获得无毒植株。

(2) 1953—1954 年,W. H. Muir 进行单细胞培养获得初步成功,创立了液体悬浮培养单细胞和细胞团的技术,并设计了看护培养技术,成功地使单细胞培养成愈伤组织,实现了 Haberlandt 培养单细胞这一设想。

(3) 1955 年,美国科学家 Miller 等由鲱鱼精子 DNA 中分离出一种首次为人所知的细胞分裂素,把它定名为激动素(kinetin,缩写为 KT)。现在,具有和激动素类似活性的合成或天然的化合物已有多种(如 6-BA、玉米素等),它们总称为细胞分裂素(cytokinin)。应用这类物质,就有可能诱导已经成熟或高度分化的组织(如叶肉和干种子胚乳)的细胞进行分裂。

(4) 1957 年,Skoog 和 Miller 提出了有关植物激素控制器官形成的概念,把控制器官分化的激素模式由“腺嘌呤/生长素”转为“细胞分裂素/生长素”。通过这一激素模式来调控芽和根的分化和形成。现已在植物组织培养中广泛地应用。

(5) 1958—1959 年,J. Reinert 和 F. C. Steward 分别报道,在胡萝卜愈伤组织培养中形成了体细胞胚,并且分化成完整植株,从体细胞证实细胞全能性,在人类历史上第一次实现了细

胞全能性。

(6) 1959 年, Gautheret 发表了第一本有关植物组织培养的内容广泛的手册, 对于开展植物组织培养工作有着重要的指导作用。

在这一阶段, 通过对培养条件和培养基成分的广泛研究, 特别是对 B 族维生素、生长素和细胞分裂素在植物组织培养中作用的研究, 已经实现了对离体细胞生长和分化的控制, 从而初步确立了植物组织培养的技术体系, 为以后的发展奠定了基础。

三、迅速发展和逐步实用化阶段(20 世纪 60 年代至今)

植物组织培养经探索阶段和奠基阶段后, 到了 20 世纪 60 年代开始进入迅速发展和逐步实用化阶段。据统计, 在 20 世纪 60 年代初期, 全世界还只有十几个国家(如美、英、法、加、澳、德、意、日、印、新西兰、苏联和中国等)的少数实验室从事植物组织培养研究, 但到了 20 世纪 70 年代, 仍未涉足植物组织培养领域的国家已为数不多。

20 世纪 60 年代以来, 植物组织培养迅速发展的典型工作有以下 15 项:

(1) 1960 年, G. Morel 创立一个离体无性繁殖兰花(*Cymbidium*)的方法, “兰花工业”迅速兴起, 此为植物组织培养微繁(快繁)工厂化生产的先例。

(2) 1960 年, K. Kanta 对虞美人(*Papaver rhoeas*)进行试管受精首获成功, 建立了试管受精技术。

(3) 1960 年, E. C. Cocking 首次成功地用纤维素酶(cellulase)分离出植物原生质体, 创立了原生质体分离培养技术。

(4) 1962 年, T. Murashige 和 F. Skoog 建立和公布了一个由大量元素和微量元素、一些生理活性有机物质、蔗糖、生长素和细胞分裂素等组成的综合营养培养基, 即 MS 培养基。

(5) 1964 年, 印度德里大学教授 S. Guha 和 S. C. Maheshwari 成功地培养曼陀罗属(*Datura*)的南洋金花(*Datura innoxia*)的花药, 获得胚状体及单倍体植株, 首次从性细胞证实了细胞全能性。

(6) 1967 年, J. P. Bourgin 和 J. P. Nitsch 成功从烟草花粉培养出单倍体植株。

(7) 1971 年, I. Takebe 等首次由烟草叶肉原生质体培养成完整植物。

(8) 1972 年, P. S. Carlson 等以 NaNO_3 为诱导剂, 首次使两种烟草的原生质体融合并培养成第一个种间体细胞杂种烟草。

(9) 1973 年, W. A. Keller 和 G. Melchers 创立了原生质体融合的高 pH(9.5~10.5)和高钙($0.05 \text{ mol/L CaCl}_2$)法。

(10) 1974 年, K. N. Kao 和 M. R. Michayluk 创立了原生质体融合的 PEG 法, 使原生质体融合率大大提高。

(11) 1979 年, Mitsugi Sendal 等发明了原生质体融合的电刺激法。

(12) 1981 年, U. Zimmirmaa 和 P. Scheurich 对电刺激法作了改进, 形成今天普遍采用的电诱融法。

(13) 1977 年, M. D. Chilton 等将来自根癌农杆菌的 Ti 质粒 DNA 成功地整合到植物体内。

(14) 1979 年, L. Marton 等为进行遗传转化建立了植物原生质体和根癌农杆菌共同培养的方法。

(15) 1981 年, V. A. Sidorov 等从经过诱变剂处理的烟草单倍体原生质体再生的细胞无