

供中草药栽培与鉴定专业用



新世纪全国高等中医药院校创新教材

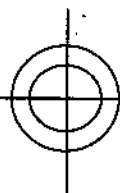
XIN SHI JI QUAN GUO GAO DENG ZHONG YI YAO YUAN XIAO
CHUANG XIN JIAO CAI

药用植物组织培养

主 编 钱子刚



中国中医药出版社



新世纪全国高等中医药院校创新教材

药用植物组织培养

(供中草药栽培与鉴定专业用)

主 编 钱子刚 (云南中医学院)

副主编 李 明 (甘肃中医学院)

罗光明 (江西中医学院)

主 审 刘飞虎 (云南大学)

中国中医药出版社

·北 京·

图书在版编目 (CIP) 数据

药用植物组织培养/钱子刚主编. —北京: 中国中医药出版社, 2007.1. (新世纪全国高等中医药院校创新教材)
ISBN 978-7-80156-903-5

I. 药… II. 钱… III. 药用植物-组织培养-医学院-教材 IV. S567.035.3

中国版本图书馆CIP数据核字 (2006) 第 026202 号

中国中医药出版社出版

北京市朝阳区北三环东路 28 号易亨大厦 16 层

邮政编码: 100013

传真: 64405750

中国中医药出版社出版

北京市朝阳区北三环东路 28 号易亨大厦 16 层

邮政编码: 100013

传真: 64405750

河北省欣航测绘院印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 850×1168 1/16 印张 18.25 字数 422 千字

2007 年 1 月第 1 版 2007 年 1 月第 1 次印刷

书号 ISBN 978-7-80156-903-5 册数 3000

*

定价: 22.00 元

网址 www.cptcm.com

如有质量问题请与本社出版部调换

版权专有 侵权必究

社长热线: 010 64405720

读者服务部电话: 010 64065415 010 84042153

书店网址: csln.net/qksd/

中草药栽培与鉴定专业系列教材

编审委员会

主任委员	李振吉				
副主任委员	贺兴东	胡国臣	刘延楨	沈连生	
总主编	刘延楨	李金田			
副总主编	邓沂	张西玲			
总主审	沈连生				
委员	(按姓氏笔画排序)				
	王德群	石俊英	龙全江	叶定江	任远
	任跃英	庄文庆	刘雄	李成义	李荣科
	姚振生	晋玲	顾志建	徐良	钱子刚
	郭玫	阎玉凝	董小萍	詹亚华	
学术秘书	李荣科	晋玲			
策 划	李金田	邓沂	王淑珍		

前言

目前,我国大多数中医药院校均已开设有中药学专业,其培养方向主要立足于能进行中药单味药及复方的化学、药理、炮制和鉴定的生产、教学、科学研究等工作,就业方向主要是中医院、中药研究机构、药检所和制药企业。随着中药现代化及产业化的飞速发展,特别是国家颁布了中药规范化种植的条例(GAP)以后,该专业的课程设计和所培养学生的知识结构已不能完全适应社会需求,具体表现在有关中草药栽培的知识基本空缺,中药材鉴定方面的知识也缺乏深度和广度。截止2000年,国内所有高等院校无任何一家设置有培养中草药栽培与鉴定方面专门人才的专业。经努力,甘肃中医学院于2000年获国家教育部批准,设立中草药栽培与鉴定本科专业,填补了我国高等教育专业设置的空白。

该专业是中药学-农学-生物学结合的一门交叉边缘性技术学科,旨在培养从事中草药的科学栽培与解决中药商品流通过程中中草药原材料的质量问题、实施GAP和实现中药材规范化生产和管理等高级专门人才,因而课程设置以中药学、农学和生物技术为基础,使学生系统掌握中草药栽培和鉴定的基础理论、基本知识和技能,并养成创新意识和能力,以培养适应21世纪社会主义现代化建设和中药现代化发展需要,德、智、体全面发展,系统掌握中草药资源分布、栽培、科学采收加工及鉴定领域的基本理论、基本知识和基本技能,能胜任中草药栽培和鉴定方面的生产、科研、开发、研究和经营等方面的高级实用型人才。

由于中草药栽培与鉴定专业属国家教育部颁布的高等学校专业目录外专业,是中药学-农学-生物学交叉的一门新兴边缘学科,系国内首创,因而,国内外没有现成的适用教科书。而教学计划中含有较多的新型特色课程,其教学内容大多需通过将现有不同学科的专业知识和技能合理撷取、有机整合,从而自成体系。鉴于这一现实,根据教育部《关于“十五”期间普通高等教育教材建设与改革的意见》精神,由全国中医药高等教育学会、全国高等中医药教材建设研究会负责组织,甘肃中医学院牵头,20多所高等中医药院校和农业大学等100余名专家、教师联合编写了这一套“新世纪全国高等中医药院校创新教材——中草药栽培与鉴定专业系列教材”,计有《中药材鉴定学》《中药材加工学》《中药养护学》《中药成分分析》《药用植物生态学》《药用植物栽培学》《中草药

遗传育种学》《药用植物组织培养学》等 8 部教材。

中草药栽培与鉴定专业的新世纪创新教材编写的指导思想与目标是：以邓小平理论为指导，全面贯彻国家教育方针和科教兴国战略，面向现代化、面向世界、面向未来；认真贯彻全国第三次教育工作会议精神，深化教材改革，全面推进素质教育；实施精品战略，强化质量意识，抓好创新，注重配套，力争编写出具有世界先进水平，适应 21 世纪中药现代化人才培养需要的高质量教材。编写原则和基本要求是：①更新观念，立足改革。要反映教学改革的成果，适应多样化教学需要，正确把握新世纪教学内容和课程体系的改革方向。教材内容和编写体例要体现素质教育和创新能力与实践能力的培养，为学生在知识、能力、素质等方面协调发展创造条件。②树立质量意识、特色意识。从教材内容结构、知识点、规范化、标准化、编写技巧、语言文字等方面加以改革，从整体上提高教材质量，编写出“特色教材”。③注意继承和发扬、传统与现代、理论与实践，中医药学与农学的有机结合，使系列教材具有继承性、科学性、权威性、时代性、简明性、实用性；同时注意反映中医药科研成果和学术发展的主要成就。

本系列教材的出版，得到了全国高等中医药教材建设研究会、中国中医药出版社领导的诚心关爱，全国高等中医药院校和吉林农业大学在人力、物力上的大力支持，为教材的编写出版创造了有利条件。各高等院校，既是教材的使用单位，又是教材编写任务的承担单位，在本套教材建设中起到了主体作用。在此一并致谢。

由于本教材属首次编写，加之时间仓促和水平有限，教材中难免存在一些缺点和不足，敬请读者和兄弟院校在使用过程中提出批评和建议，以便修订完善。

中草药栽培与鉴定专业系列教材编审委员会

2005 年 12 月 9 日

新世纪全国高等中医药院校创新教材
《药用植物组织培养》编委会

主 编 钱子刚 (云南中医学院)
副主编 李 明 (甘肃中医学院)
罗光明 (江西中医学院)
编 委 (以姓氏笔画为序)
王 兵 (云南师范大学)
任跃英 (吉林农业大学)
杜 勤 (广州中医药大学)
杨生超 (云南农业大学)
杨耀文 (云南中医学院)
胡 珂 (安徽中医学院)
巢建国 (南京中医药大学)
主 审 刘飞虎 (云南大学)

编写说明

中草药栽培与鉴定专业是中药学及农学交叉的一门新兴学科,国内首次创办。根据教育部《关于“十五”期间普通高等教育教材建设与改革的意见》的精神,为适应我国高等中医药教育改革发展的需要,全面推进素质教育,贯彻国家教育方针和科教兴国战略,面向现代化、面向世界、面向未来,认真贯彻全国第三次教育工作会议精神,深化教材改革,实施精品战略,强化质量意识,抓好创新,注重配套,力争编写出具有世界先进水平,适应 21 世纪中药现代化人才培养需要的高质量教材。

《药用植物组织培养》是中草药栽培与鉴定专业的专业课,与《药用植物学》、《中草药栽培学》等相关课程的关系十分密切,其主要对象为全国高等中医药院校中药类专业本科、专科及成人教育或自学学生。

本教材内容分为上下两篇:上篇为药用植物组织培养的原理和方法,下篇为药用植物组织培养的应用。作为第一本药用植物组织培养教材,本书注重介绍国内外药用植物组织培养研究的新进展和新成果,特别是随着现代植物生物工程技术突飞猛进地发展,着重介绍植物细胞工程内容和植物种质资源离体保存、有关有效成分植物次生代谢产物以及可用于实践的组培苗工厂化生产内容。虽然作为一个学科,其系统性和完整性仍有不足,但本教材已将涉及的相关方法和内容尽可能全面详细地介绍。通过教学要求学生掌握专业需要的本学科的基础理论、基本知识和基本技能,为学习相关课程,开发、利用和保护中药资源以及培养继承发扬我国中医药事业的应用型人才奠定良好基础。

教学过程包括课堂讲授和实验两部分。本课程是实践性很强的学科,课堂讲授要求理论联系实际,贯彻少而精的原则,注重启发式,发挥学生的主观能动性和创造性,充分运用音像教材以提高教学效果。并充分利用实验课培养学生严谨的科学态度、理论联系实际的工作作风和分析问题的能力。

本书的编写分工是:上篇第一章实验室的设备和技術、第三章细胞全能性与器官的发生以及下篇的甘草、黄连、红花和罗布麻由甘肃中医学院李明副教授编写;第二章培养基、第十章药用植物种质离体保存以及下篇的半夏、黄柏、杜仲和枳壳由江西中医学院罗光明教授编写;第四章体细胞胚胎的发生以及下篇的牡丹皮、菊花和薄荷由安徽中医学院胡珂副教授编写;绪言、第五章胚胎

培养和胚乳培养以及下篇的枸杞、附录由云南中医学院钱子刚教授编写；第六章子房、胚珠培养与离体授粉以及下篇的银杏由南京中医药大学巢建国副教授编写；第七章花粉和花药培养以及下篇的人参、厚朴、刺五加和长春花由吉林农业大学任跃英教授编写；第八章原生质体培养和细胞融合、第十一章药用植物脱毒技术以及下篇的巴戟天、何首乌、莲、广藿香、穿心莲和芦荟由广州中医药大学杜勤副教授编写；第九章药用植物细胞培养和转化以及下篇的黄芪、当归、桔梗、川乌、贝母、百合、金铁锁、枇杷、金银花、月季、山楂、龙眼和荔枝由云南中医学院杨耀文副教授编写；第十二章药用植物组培苗工厂化生产以及下篇的石斛和灯盏花由云南农业大学杨生超副教授编写；第十三章药用植物次生代谢产物的产生由云南师范大学王兵讲师编写。实验指导部分：胡珂副教授编写实验一植物组织培养基制备，罗光明教授编写实验二百合愈伤组织的诱导，杨耀文副教授编写实验三桔梗体细胞胚胎发生的诱导、实验四百合花药培养实验、实验六黄芪遗传转化实验、实验七百合组织培养及快速繁殖实验、实验八月季组织培养及快速繁殖实验，杜勤副教授编写实验五细胞融合实验。书中插图主要由云南中医学院张洁实验师绘制。教材内容先由钱子刚教授、罗光明教授和李明副教授分别审阅修改，经过定稿会最后由钱子刚教授统一审定稿。

在本书的编写过程中，始终得到了各参编单位领导的热情鼓励和支持，同时得到了主审刘飞虎教授的支持和指导。在编写过程中还得到了中国科学院昆明植物研究所孙航教授、杨崇仁教授等支持并提出宝贵的意见，在此深表谢意。

由于编者水平有限，加之时间仓促，疏漏之处在所难免，敬请读者和兄弟院校在使用过程中提出批评和建议，以便修订完善。

《药用植物组织培养》编写委员会

2006年10月

目 录

绪论	(1)
----	-----

上篇 药用植物组织培养的原理和方法

第一章 组织培养实验室的设备和培养技术	(11)
第一节 植物组织培养的基本设备	(11)
第二节 植物组织培养的一般技术	(17)
第二章 培养基	(24)
第一节 植物组织培养基的种类和组成成分	(24)
第二节 植物组织培养基的选择	(35)
第三节 植物组织培养基的制备	(38)
第三章 细胞全能性与器官的发生	(42)
第一节 愈伤组织形成的条件和过程	(42)
第二节 愈伤组织增殖方式和状态的调控	(44)
第三节 细胞分化	(46)
第四节 器官分化	(49)
第四章 体细胞胚胎的发生	(56)
第一节 体细胞胚胎发生的方式	(56)
第二节 影响体细胞胚胎发生的因子	(59)
第三节 体细胞胚胎的成熟过程	(66)
第四节 体细胞胚胎与合子胚胎的比较	(66)
第五节 人工种子	(68)
第五章 胚胎培养和胚乳培养	(75)
第一节 胚胎培养	(75)
第二节 胚乳培养和三倍体的产生	(81)
第六章 子房、胚珠培养与离体授粉	(85)
第一节 子房、胚珠培养	(85)
第二节 离体授粉	(88)
第七章 花粉和花药培养	(94)
第一节 花粉的形成	(94)
第二节 花粉母细胞和花粉培养	(95)
第三节 花药培养	(98)
第八章 原生质体培养和细胞融合	(103)

2 ·药用植物组织培养·	
第一节 原生质体的分离	(104)
第二节 原生质体的培养	(108)
第三节 原生质体的融合与体细胞杂交	(112)
第九章 药用植物细胞培养和转化	(120)
第一节 单细胞的分离	(120)
第二节 细胞悬浮培养	(121)
第三节 单细胞的培养与应用	(125)
第四节 细胞遗传转化	(129)
第十章 药用植物种质离体保存	(132)
第一节 低温保存	(132)
第二节 超低温保存	(134)
第三节 离体保存技术的应用	(141)
第十一章 药用植物脱毒技术	(144)
第一节 常用的脱毒方法	(145)
第二节 脱毒效果检验和无毒原种保存	(149)
第三节 其他病原菌的离体消除方法	(151)
第十二章 药用植物组培苗工厂化生产	(152)
第一节 工厂化生产的设施设备与技术	(152)
第二节 工厂化生产的成本管理	(160)
第三节 组培苗的壮苗培养与移栽	(166)
第十三章 药用植物次生代谢产物生产	(174)
第一节 萜类	(174)
第二节 酚类	(179)
第三节 含氮次级化合物	(185)
第四节 植物组织细胞培养生产次生代谢产物	(188)
下篇 药用植物组织培养的应用	
第十四章 根和根茎类药材的组织培养	(195)
第一节 人参	(195)
第二节 甘草	(198)
第三节 黄芪	(199)
第四节 当归	(200)
第五节 桔梗	(201)
第六节 川乌	(202)
第七节 贝母	(203)
第八节 半夏	(204)
第九节 百合	(208)

第十节 黄连	(209)
第十一节 巴戟天	(211)
第十二节 何首乌	(211)
第十三节 金铁锁	(213)
第十五章 茎类和皮类药材的组织培养	(216)
第一节 黄柏	(216)
第二节 杜仲	(217)
第三节 牡丹	(221)
第四节 厚朴	(222)
第五节 刺五加	(223)
第十六章 叶类药材的组织培养	(226)
第一节 枇杷	(226)
第二节 罗布麻	(227)
第三节 银杏	(238)
第十七章 花类药材的组织培养	(232)
第一节 红花	(232)
第二节 菊花	(233)
第三节 金银花	(234)
第四节 月季	(235)
第十八章 果实和种子类药材的组织培养	(237)
第一节 枸杞	(237)
第二节 山楂	(239)
第三节 枳壳	(240)
第四节 龙眼	(241)
第五节 荔枝	(242)
第六节 莲	(242)
第十九章 全草类药材的组织培养	(244)
第一节 石斛	(244)
第二节 灯盏花	(245)
第三节 广藿香	(247)
第四节 长春花	(247)
第五节 薄荷	(249)
第六节 穿心莲	(250)
第七节 芦荟	(251)

实验指导

实验一 植物组织培养基的制备	(253)
----------------	-------

4 药用植物组织培养·····

实验二	百合愈伤组织的诱导·····	(255)
实验三	桔梗体细胞胚胎发生的诱导·····	(257)
实验四	百合花药培养实验·····	(258)
实验五	细胞融合实验·····	(259)
实验六	黄芪遗传转化实验·····	(261)
实验七	百合组织培养及快速繁殖实验·····	(262)
实验八	月季组织培养及快速繁殖实验·····	(264)

附录

附录一	常用培养基配方·····	(267)
附录二	常用微量单位及换算·····	(272)
附录三	常用植物生长激素浓度单位换算表·····	(273)
附录四	常用缩略词·····	(274)
主要参考文献·····		(276)

绪 论

一、药用植物组织培养的定义和任务

药用植物组织培养 (tissue culture of medicinal plant) 是以现代生命科学理论为基础, 结合化学学科的科学原理, 采用先进的生物工程技术手段, 以药用植物为研究对象, 进行其组织器官的发生、培养和细胞融合、转化以及次生代谢产物和药材组培苗工厂化生产研究的一门新兴的综合性应用学科。药用植物组织培养的形成和发展, 与资源的合理开发、可持续利用和保护的社会发展趋势相吻合, 是中药产业发展的支撑学科, 关系到中药现代化和国际化进程, 具有广阔的应用前景; 其应用技术和研究成果, 在保障中药和其他医药产品的生产原料, 新资源的开发和培植方面都具有重要的应用价值, 在培养具有综合素质的高级专门技术人才方面具有重要作用。

药用植物组织培养是中药材栽培与鉴定专业和中药专业的一门专业课, 主要讲述药用植物的人工培养条件、愈伤组织培养、悬浮细胞培养和转化、器官培养、分生组织培养和原生质体培养以及脱毒技术和工厂化育苗、种质的离体保存和次生代谢产物的产生等。所以药用植物组织培养和中药的优良品种筛选繁育、种质资源保存、有效成分生产等密切相关, 在专业课程中具有重要的地位。

(一) 植物组织培养的一般概念

广义的组织培养, 不仅包括在无菌条件下利用人工培养基对植物组织的培养, 而且包括对原生质体、悬浮细胞和植物器官的培养。根据所培养的植物材料的不同, 组织培养分为器官培养和组织细胞培养两类。其中愈伤组织培养是一种最常见的培养形式。所谓愈伤组织, 原是指植物在受伤之后于伤口表面形成的一团薄壁细胞; 在组织培养中, 则指在人工培养基上由外植体长出来的一团无序生长的薄壁细胞。愈伤组织培养之所以成为一种最常见的培养形式, 是因为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。

在组织培养中, 当把分化组织中的不分裂的静止细胞, 放置在一种能促进细胞增殖的培养基上以后, 细胞内就会发生某些变化, 从而使细胞进入分裂状态。一个成熟细胞转变为分生状态的过程叫做脱分化。在组织培养中, 把由活植物体上切取下来进行培养的那部分组织或器官称为外植体。外植体通常是多细胞的, 这些细胞常常包括各种不同的类型, 因此由一个外植体所形成的愈伤组织中不同的组分细胞具有不同的形成完整植株的能力, 即不同的再分化能力。一个成熟的植物细胞经历了脱分化之后, 之所以还能再分化形成完整的植株, 是因为这些细胞具有全能性。所谓全能性, 即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。

全能性只是一种可能性,要把它变为现实必须满足两个条件:一是要把这些细胞从植物体其余部分的抑制性影响下解脱出来,也就是说必须使这部分细胞处于离体的条件下;二是要给予它们适当的刺激,即给予它们一定的营养物质,并使它们受到一定的激素的作用。一个已分化的细胞要表现它的全能性,必须经历上面所说的两个过程,即首先要经历脱分化过程,然后再经历再分化过程。在大多数情况下,再分化过程是在愈伤组织细胞中发生的,但在有些情况下,再分化可以直接发生在脱分化的细胞当中,其间不需要插入一个愈伤组织阶段。

脱分化后的细胞进行再分化的过程有两种不同的方式,一种是器官发生方式,其中茎芽和根是在愈伤组织的不同部位分别独立形成的,形成的时间可以不一致,它们为单极性结构,里面各有维管束与愈伤组织相连,但在不定芽和不定根之间并没有共同的维管束把二者连在一起;另一种是胚胎发生方式,即在愈伤组织表面或内部形成很多胚状体,或称体细胞胚,它们经历的发育阶段与合子胚相似,成熟胚状体的结构也与合子胚相同。胚状体是双极性的,有共同的维管束贯穿两极,可脱离愈伤组织在无激素培养基上独立萌发。一般认为,愈伤组织中的不定芽起源于一个以上的细胞,而体细胞胚只起源于一个细胞,因此由体细胞胚长成的植株各部分的遗传组成应当是一致的,不存在嵌合现象。

(二) 组织与器官培养的分类

1. 器官培养

植物的器官培养,主要是指植物的根、茎尖、叶、花器(包括花药、子房等)和幼小果实的无菌培养。目的是研究器官的功能及器官间的相关性,器官的分化及形态建成等问题,以更好地认识植物生命活动的规律,控制植物的生长发育,加快珍稀植物材料的繁殖,为人类生产实践服务。

(1) 离体根培养 培养的离体根,常用作根系生理和代谢的研究材料,其优点为生长迅速、代谢活跃、无性繁殖系变异性小。同时,因其能在无菌条件下生长,所以既可排除微生物的干扰,又可根据研究的需要,增减培养基中某些成分,以研究其生长和代谢的变化。应用离体根的培养技术,已研究了碳素和氮素代谢、无机营养的需要、维生素的合成与作用、生长素和生物碱的合成与分泌、形成层中细胞的分裂、分化与伸长以及芽和根的相关性等。

(2) 茎尖培养 茎尖培养包括小到十至几十微米的茎尖分生组织和大到几十毫米的茎尖或更大的芽的培养。由于在培养中它会长出茎叶,并分化出根而形成小植物,从而在培养过程中失去器官培养的含义。但这并不妨碍它成为研究植物形态建成,尤其是由营养生长转入生殖发育过程的有用工具。由于它能长成小植物,并可进一步培养成正常植株,可进行开花生理研究、无病毒植株的培养,因此茎尖培养具有一定的实用价值。

(3) 叶培养 叶是植物进行光合作用的自养器官,又是某些植物(例如蕨类植物)的繁殖器官,因此,叶培养不仅可用于研究叶的形态建成、光合作用、叶绿素形成等理论问题,而且在园艺上也是繁殖稀有名贵品种的有效手段。

(4) 花与果实的离体培养 花与果实培养始于1942年,花与果实的培养较多地用于花

的“性别决定”及果实发育和花器官的再分化研究。

(5) 胚胎培养 20 世纪 20 年代, 用胚胎培养技术培养了亚麻的种间杂种胚, 得到了杂种植物, 克服了杂交不亲和的障碍, 从而开创了植物胚胎培养应用于实际的时期。因为在通常情况下, 高等植物在种间或属间远缘杂交时, 由于不亲和性常常发生花粉不能在异种植物柱头上萌发, 或花粉管生长受到抑制不能伸入子房, 或即使受精, 但胚乳发育不良或因胚与胚乳间不亲和而使胚在早期败育。目前, 胚胎培养除了用于育种的实践之外, 也广泛地被用来研究胚胎发育过程中与胚发育有关的内外因素, 以及与其发育有关的代谢和生理生化变化。

2. 组织细胞培养

植物的组织细胞培养, 主要是指植物各个部分组织、单个细胞或很小的细胞团和原生质体等的离体无菌培养。目的是研究植物组织、细胞在离体培养条件下, 各种环境因子对植物形态发生的影响及其遗传稳定性和变异性、次生代谢产物的生成等科学问题。

(1) 组织培养 组织培养系指植物各个部分组织的离体培养, 使之形成愈伤组织称为组织培养。植物组织包括茎组织、叶肉组织、根组织、中柱鞘、形成层、髓组织、贮藏薄壁组织、珠心组织等。

(2) 细胞培养 细胞培养系指用能保持较好分散性的植物细胞或很小的细胞团为材料进行离体培养, 如生殖细胞、叶肉细胞、根尖细胞和髓组织细胞培养等。

(3) 原生质体培养 原生质体培养系指除去植物细胞的细胞壁, 培养裸露的原生质体, 使其重新形成细胞壁并继续分裂、分化, 形成植株的方法。

从以上方面延伸的内容有: 药用植物脱毒培养技术、突变体筛选、细胞融合、种质离体保存和人工种子、次生代谢产物的生产等。

二、药用植物组织培养的发展

要明了植物组织和细胞培养的目的、方法及其在生物学研究中的重要性, 必须理解细胞学说的两个基本观点。即植物细胞是生物有机体的基本结构单位, 并且植物细胞又是在生理上、发育上具有潜在的全能性的功能单位。

(一) 建立基本方法阶段

这一阶段为 20 世纪初至 20 世纪 30 年代中期。在 20 世纪初, 德国著名植物学家 Harberlandt 根据细胞理论, 提出了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。为了证实这一观点, 他试图培养高等植物的离体细胞, 但是没能观察到细胞分裂。其他人在以后多年继续进行类似的实验尝试, 均由于技术原因而进展很小。

在胚胎培养和其他器官培养的范围则取得了一些成功。1904 年 Hännbning 最先在无机盐溶液及有机成分的培养基上成功地培养了萝卜和辣根菜的胚, 结果发现离体胚均可发育, 并有提早萌发形成幼苗的现象。Laibach 在 1925 年通过培养亚麻种间杂交时形成的幼胚, 成功地得到了杂种。我国李继侗等在 20 世纪 30 年代就曾进行银杏离体胚的培养, 发现 3mm 以上大小的胚即可正常生长, 以及银杏胚乳提取物能够促进银杏离体胚的生长, 后一发现对于后

人使用植物胚乳液汁或幼小种子及果实的提取液促进培养组织的生长具有启迪意义。离体根尖培养获得成功虽由 Kotté 和 Robbins 于 1922 年分别报道,但直到 1934 年 White 由番茄根建立了第一个活跃生长的无性繁殖系时,有关离体根的培养试验才获得真正成功。由于 White 1937 年发现了 B 族维生素对培养离体根的生长具有重要意义,以及对生长素 (IAA) 在控制植物生长中的作用的不断认识,使 Gautheret 在 1937 年、1938 年所使用培养基中加入这些生长因子,结果使得培养的柳树形成层的生长大为增加。与此同时, Nobécourt 培养了胡萝卜根的外植体并使细胞增殖获得了成功。不久, White 报道用烟草种间幼茎切段的原形成层组织建立了类似的组织培养,成功地进行了继代培养。在 Gautheret 和 White 工作中建立起来的植物组织培养的基本方法,成为以后各种植物进行组织培养的基础技术。

(二) 奠基阶段

这一阶段为 20 世纪 30 年代中期至 50 年代末期。30 年代末以后的近 10 年时间内,很多植物组织培养的研究与探讨培养器官、组织的营养需要有关。40 年代末至 50 年代初,由于在植物生理及实验形态研究方面产生了许多问题,使植物组织培养研究又进入了一个新的活跃时期。Carnus 在 1949 年将芽嫁接在培养的组织上,结果诱导分化出微管组织。Skoog 和崔激在烟草茎段和髓培养以及器官形成的研究中,发现腺嘌呤或腺苷可以解除培养基中生长素 (IAA) 对芽形成的抑制作用并诱导形成芽,从而确定了腺嘌呤/生长素的比例是控制芽和根形成的主要条件之一。为了寻找促进细胞分裂的物质,Miller 等于 1956 年发现了激动素。不久即发现激动素可以代替腺嘌呤促进成芽,并且效果增加约 3 万倍。于是控制器官分化的激素模式即改为激动素/生长素。1958 年 Steward 等在悬浮培养中成功地诱导形成了胚状体,此工作与 Skoog 等的研究为以后研究组织培养中的器官形成及胚胎发生奠定了基础。

此外, Muir 由无菌的冠瘿肿瘤组织的悬浮培养液和易碎的愈伤组织分离得到单细胞,并使其开始分裂生长,并建立了单细胞无性系。而 Bergman 所采用的琼脂平板培养法技术经过改进,已在实验室广泛应用。Nitsch 关于离体果实的培养工作,促进了对植物幼小果实、子房、胚珠、种子、胚胎及花各部器官的培养研究。

(三) 迅速发展阶段

这一阶段为 20 世纪 60 年代至今。由于培养技术的日趋成熟与完善,对培养细胞的生长、分化规律已有所认识,此时期研究目的明确,与相关学科的研究结合较为紧密。而具有意义的研究主要集中于花药培养和原生质体培养方面。用纤维素酶分离植物的原生质体获得成功,并且可以诱导分化、培养成再生植株,以及证明原生质体可以从外界摄取病毒、细菌和蛋白质、核酸等大分子,由此原生质体培养已成为遗传工程研究的适宜方法。在原生质体融合研究中;通过聚乙二醇 (PEG)、高钙、高 pH 等方法,已在多种植物原生质体之间得到融合。应用选择性筛选的方法,分别从品种间、种间的杂种细胞培养成新的杂种植株。以上这些工作无疑给高等植物的遗传育种研究带来了深远的影响。

从以上对历史的简要回顾可以看出,植物的组织和细胞培养的发展,与所处时代的生产力和科学技术的水平有密切关系。目前,以细胞大规模培养技术生产次生代谢产物为依托的