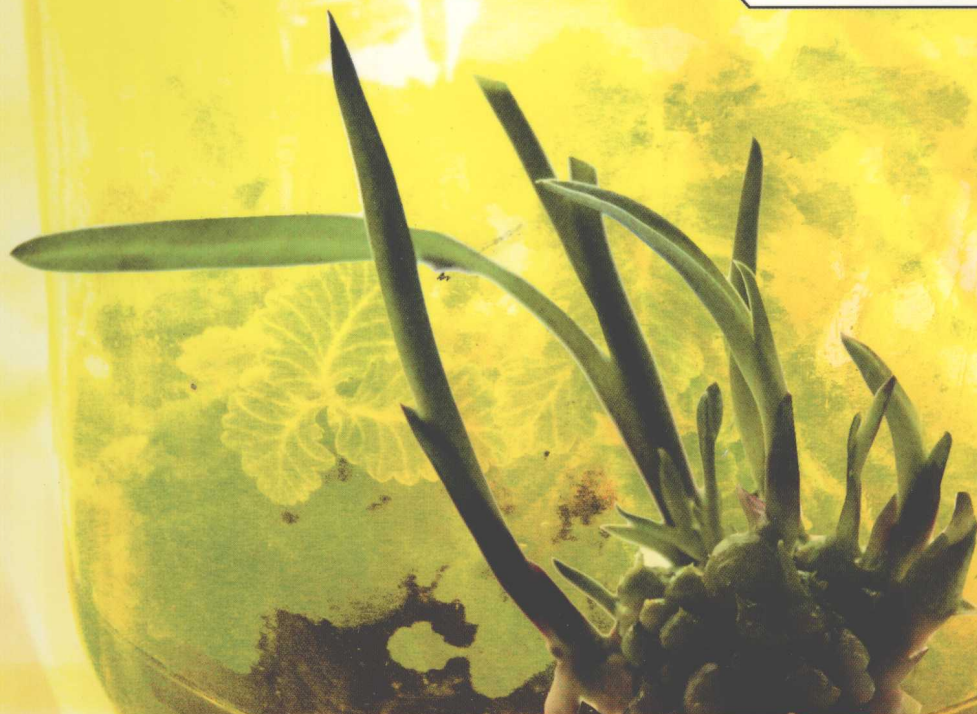




高职高专“十一五”规划教材

★ 生物技术系列



植物组织 培养技术

刘振祥 廖旭辉 主编

ZHIWU ZUZHI
PEIYANG JISHU



化学工业出版社



高职高专“十一五”规划教材

★ 生物技术系列



植物组织 培养技术

刘振祥 廖旭辉 主编

ZHIWU ZUZHI
PEIYANG JISHU



化学工业出版社

· 北京 ·

本书为高职高专“十一五”规划教材。本教材除对植物组织培养的基本理论和基础知识作简明必要的介绍以外,重点阐述了植物组织培养各方面的实用技术,内容包括组织培养实验室设备和使用方法、植物组织培养的基本技术、快速繁殖与脱毒技术、植物组织培养苗的工厂化生产技术,以及果树、蔬菜、药用植物、园林及观赏植物中30余种常见品种的组织培养实用技术,其中兼顾了我国南方一些主要的组培工厂化育苗的作物种类。为了培养学生的实践动手能力,本教材专门安排了13个单元的实践训练内容,使学生能得到系统的训练,掌握实际操作技术。同时,书中还吸收了近年来植物组培方面所取得的最新成果和先进经验。教材的每章末尾附有思考题,可供学生思考、复习和练习之用。

本书可供高等职业技术学院和普通本科院校生物、园林、园艺类专业作为教材使用,也可供中等专业学校、大专函授、成人高校相关专业作为教材和教学参考书,同时也可作为植物组培技术的培训教材以及植物组培爱好者、生产者的自学用书。

图书在版编目(CIP)数据

植物组织培养技术/刘振祥,廖旭辉主编. —北京:
化学工业出版社, 2007. 6
高职高专“十一五”规划教材★生物技术系列
ISBN 978-7-122-00376-8

I. 植… II. ①刘…②廖… III. 植物-组织培养-高等学校: 技术学校-教材 IV. Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 059246 号

责任编辑: 李植峰 梁静丽 郎红旗 装帧设计: 张 辉
责任校对: 凌亚男

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)
印 装: 北京市彩桥印刷有限责任公司
787mm×1092mm 1/16 印张 14¼ 字数 342 千字 2007 年 5 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899
网 址: <http://www.cip.com.cn>
凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 24.00 元

版权所有 违者必究

前 言

植物组织培养技术是植物生物技术的重要组成部分。自 20 世纪 70 年代以来,植物组织培养技术在世界各国得到了迅猛发展,并逐步走向大规模产业化生产的道路。目前,该技术在植物组培快繁、植物脱毒、植物育种、生物制药等各个领域已得到了广泛的应用,并取得了显著的经济效益。随着我国综合国力的不断增强和农业现代化进程的加快,决策层和学术界已经看到,加强现代化建设的重要措施之一就是要以现代生物技术来提升农业。因此,作为生物技术之一的植物组织培养技术已显得越来越重要。发展植物组培产业不仅能为农业提高效益,为农民增加收入,同时也能为生物基础研究、城市绿化、医药、食品等领域作出重要的贡献。因此可以这样认为,植物组织培养既是一种手段,也是一门技术,更是一门艺术;它不仅能满足人们的物质生活,也能美化人们的精神生活。

为了培养更多的高级应用型植物组织培养技术人才,满足农业发展、农民致富、新农村建设和社会经济发展的需要,我们几所高等院校共同组织编写了这本教材。在编写过程中,先由刘振祥教授拟订了编写提纲和编写体例,广泛征求意见后达成共识,然后着手编写。参加本书编写的有湖北咸宁职业技术学院、广西职业技术学院、河南濮阳职业技术学院、安阳工学院、漯河职业技术学院、河南工业大学、广州城市职业学院、江西景德镇高等专科学校、湖北生态工程职业技术学院、三峡职业技术学院、荆州职业技术学院等高校的十几位教师。由刘振祥、廖旭辉同志对部分章节进行了适当的补充和改写,并最后统稿。

本书在编写过程中,得到了化学工业出版社的大力支持和热情指导,得到了许多朋友和同行的鼓励、帮助,同时也参阅了有关研究人员的研究成果和文献资料,谨在此表示衷心的感谢。

虽然我们在编写之前结合我国国情和高职院校特点进行了广泛的调查研究,编写过程中也参阅了大量的文献资料,并付出了辛勤的劳动,但书稿中难免存在一些缺点和遗漏之处,恳请使用本教材的教师、学生和同行提出宝贵意见,以便再版时修正。

编 者

2007 年 3 月

目 录

绪论	1
一、植物组织培养的一般概念	1
二、植物组织培养的发展简史	2
三、植物组织培养在生产中的应用	6
思考题	8
第一章 植物组织培养的基本条件及 一般技术	9
第一节 实验室及主要设备	9
一、植物组织培养实验室的设计原则	9
二、植物组织培养实验室的组成及其 功能	9
三、无菌操作设备	11
四、常用工具	12
五、常用仪器设备	13
第二节 培养基	14
一、培养基的种类与成分	14
二、配制培养基的准备工作	16
三、培养基的制备方法	16
第三节 外植体的选择与处理	17
一、外植体的类型	17
二、外植体的消毒	18
三、外植体的接种与培养	19
第四节 无菌技术	20
一、试验材料和器具的消毒与灭菌技术 ..	20
二、无菌操作要求	21
三、无菌室空气污染情况的检验	21
四、无菌操作技术	21
第五节 植物组织培养环境条件的控制	22
一、温度	22
二、光照	22
三、湿度	23
四、气体	23
思考题	23
第二章 植物细胞全能性及其营养 代谢	24
第一节 植物细胞的全能性	24
一、植物细胞全能性的概念	24

二、植物细胞全能性的应用	24
第二节 植物离体分化成苗的类型	25
一、芽再生型	25
二、器官发生型	26
三、胚状体发生型	26
四、原球茎型	26
第三节 培养物的营养与代谢	27
一、碳源	27
二、无机营养	27
三、有机营养	29
四、植物生长调节物质	30
五、pH 值	31
六、其他成分	32
思考题	32
第三章 培养物的脱分化与再分化	33
第一节 外植体的脱分化	33
一、诱导期间的细胞脱分化过程	33
二、与脱分化有关的因子及其作用	33
第二节 愈伤组织的形成与调控	34
一、愈伤组织形成的过程	34
二、愈伤组织的生长和调控	35
第三节 培养物的再分化	36
一、细胞分化和组织分化	36
二、器官分化和植株形成	37
思考题	38
第四章 植物组织器官培养	39
第一节 茎尖培养	39
一、茎尖培养的意义	39
二、茎尖培养的方法	40
第二节 其他器官和组织培养	41
一、胚的培养	41
二、离体根的培养	41
三、离体叶的培养	42
四、花的培养	42
五、幼果的培养	42
六、愈伤组织的培养	43
思考题	44

第五章 细胞培养	45	二、植物脱毒的意义	71
第一节 单细胞培养	45	第二节 植物脱毒的方法	72
一、单细胞的分离	45	一、茎尖分生组织培养脱毒	72
二、单细胞的培养方法	46	二、热处理脱毒	72
三、影响单细胞培养的因子	48	三、热处理结合茎尖培养脱毒	73
第二节 细胞悬浮培养	48	四、其他方法脱毒	73
一、悬浮培养的启动	48	第三节 脱毒苗的鉴定	74
二、细胞悬浮培养的方法	49	一、指示植物鉴定法	74
三、细胞悬浮培养基	50	二、抗血清鉴定法	74
四、细胞悬浮培养的影响因素	51	三、电子显微镜鉴定法	75
五、悬浮细胞的同步化	51	四、酶联免疫测定法	75
六、悬浮培养细胞生长计量	52	五、分子生物学方法	75
七、细胞活力的测定	52	第四节 无病毒苗的保存与繁殖	76
八、细胞悬浮培养的应用	53	一、无病毒苗的保存	76
思考题	53	二、无病毒苗的繁殖	76
第六章 植物离体快繁技术	54	思考题	77
第一节 植物离体快繁的意义及应用	54	第八章 植物组织培养在育种中的	
第二节 植物离体快繁的培养过程及相关		应用	78
技术	54	第一节 胚培养与育种	78
一、无菌培养体系的建立	54	一、胚培养的意义	78
二、诱导外植体生长与分化	55	二、胚培养的发育方式	78
三、继代增殖与培养	57	三、离体胚的培养	79
四、壮苗与生根	58	四、胚乳培养	80
五、试管苗的炼苗及移栽	60	第二节 花药培养与单倍体育种	81
第三节 植物快繁生产中应注意的几个		一、花药培养的意义	81
问题	62	二、花药培养的方法	82
一、遗传稳定性问题	62	三、花药培养操作举例	83
二、玻璃化问题	63	第三节 培养细胞变异系的利用	84
三、污染及褐化问题	64	一、自发变异系的利用	84
第四节 植物无糖组培技术	64	二、培养细胞的人工诱变	84
一、植物无糖组培技术的概念、意义及		第四节 组织培养在其他育种工作中的	
发展前景	64	应用	85
二、植物无糖组培技术与常规组培技术		一、种质资源保存	85
在具体操作上的主要区别	65	二、植物试管受精	85
三、无糖培养微体繁殖工厂化生产成本		三、原生质体培养与细胞融合	85
分析	65	四、植物细胞的遗传转化技术	86
四、无糖培养与有糖培养相结合	66	思考题	87
五、无糖微体繁殖对外界环境条件的		第九章 离体培养生产次生物质	88
要求	67	第一节 细胞培养生产次生物质的意义及	
六、无糖培养技术应用实例	68	特点	88
思考题	70	一、细胞培养生产次生物质的意义	88
第七章 植物脱毒技术	71	二、细胞培养生产次生物质的特点	88
第一节 植物脱毒的意义	71	第二节 离体培养生产次生物质的方法	89
一、植物病毒病的危害	71	一、细胞悬浮培养和固定化培养	89

二、高产细胞株系的筛选	89
三、影响次生物质合成的因素	90
四、利用生物反应器进行细胞大量培养	93
第三节 次生物质生产中目前存在的主要问题	93
一、细胞的增殖与生物次生物质的合成速度不够理想	93
二、代谢产物的释放问题	93
三、生长激素是否安全问题	94
四、生产成本较高的问题	95
思考题	95
第十章 植物组织培养苗的工厂化生产技术	96
第一节 工厂化生产的主要设施和设备	96
一、组织培养、离体快速繁殖的主要设施和设备	96
二、保护地栽培的主要设施和设备	97
第二节 工厂化生产技术	100
一、品种选育和母株培养	100
二、离体快繁组培基本苗	100
三、组培苗的移栽驯化	101
四、苗木传递与运输	108
五、苗木质量检验	108
第三节 工厂化生产的工艺流程	109
第四节 工厂化生产的机构设置与各部门岗位职责	110
一、生产部	110
二、质量检验部	110
三、技术开发部	110
四、市场营销部	111
五、物资供应、后勤保障部	111
第五节 组培工厂设计中的主要技术参数	111
一、培养基的需要量	111
二、继代增殖系数与继代周期	112
三、生根诱导	112
第六节 生产规模与生产计划	112
一、试管苗增殖率的估算	112
二、生产计划的制定	114
第七节 组培苗的生产成本与经济效益概算	115
一、直接生产成本	116
二、固定资产折旧	116
三、市场营销和经营管理开支	116

四、组培苗的增值	117
思考题	117
第十一章 水果与经济作物的组织培养技术	119
第一节 葡萄组织培养	119
一、葡萄组织培养的意义	119
二、葡萄组织培养技术	119
第二节 草莓组织培养与脱毒技术	120
一、草莓组织培养的意义	120
二、草莓的脱毒技术	121
三、脱毒种苗病毒的检测	122
四、移栽	124
第三节 香蕉脱毒与快繁技术	124
一、概述	124
二、香蕉离体快速繁殖简史	124
三、香蕉离体快速繁殖技术	125
四、香蕉病毒病的简易检测方法	127
第四节 甘蔗的组培快繁	127
一、概况	127
二、甘蔗离体快速繁殖简史	128
三、甘蔗离体快速繁殖技术	128
思考题	130
第十二章 蔬菜组织培养技术	131
第一节 马铃薯组织培养与脱毒技术	131
一、培养意义	131
二、茎尖脱毒技术	131
三、微型薯生产技术	133
第二节 石刁柏的组织培养	134
一、培养意义	134
二、培养方法	135
第三节 结球甘蓝的组织培养	135
一、培养意义	135
二、培养方法	135
第四节 无籽西瓜的组织培养	137
一、培养意义	137
二、培养方法	137
第五节 大蒜的组织培养	138
一、培养意义	138
二、培养方法	138
第六节 大白菜腋芽培养技术	141
一、培养意义	141
二、培养方法	142
第七节 番茄的组织培养	142
一、培养意义	142

二、培养方法	142
第八节 甘薯脱毒技术	143
一、培养意义	143
二、培养方法	143
思考题	144
第十三章 观赏及园林植物的组织培养	
技术	145
第一节 月季的组织培养	145
一、培养意义	145
二、培养方法	145
三、质量标准及调控	146
四、移栽管理	147
第二节 杜鹃的组织培养	147
一、培养意义	147
二、培养方法	148
第三节 红掌的组织培养	149
一、概述	149
二、培养方法	150
第四节 仙客来的组织培养	151
一、培养意义	151
二、培养方法	151
第五节 百合的组织培养	152
一、培养意义	152
二、培养方法	153
三、当前存在的主要问题	154
第六节 花叶芋的组织培养	154
一、培养意义	154
二、培养方法	155
第七节 新几内亚凤仙的组织培养	156
一、培养意义	156
二、培养方法	156
第八节 郁金香的组织培养	157
一、培养意义	157
二、培养方法	158
三、影响郁金香愈伤组织诱导的因素	159
四、试管苗的移栽与管理	159
第九节 一品红的组织培养	159
一、培养意义	160
二、培养方法	160
第十节 山杜英的组织培养	161
一、培养意义	161
二、培养方法	161
三、试管苗的移栽与管理	162
第十一节 蒲包花的组织培养	162

一、培养意义	162
二、培养方法	163
第十二节 丽格海棠的组织培养	163
一、培养意义	163
二、培养方法	164
第十三节 蝴蝶兰的组织培养	164
一、培养意义	164
二、培养方法	165
第十四节 美国红叶石楠的组织培养	167
一、培养意义	167
二、培养方法	168
第十五节 高羊茅的组织培养	168
一、培养意义	168
二、培养方法	169
第十六节 桉树的组织培养	169
一、概况	169
二、桉树的组织培养简史	170
三、桉树的试管快繁方法	170
四、桉树试管苗的移栽	172
五、桉树组培苗的扦插繁殖	172
思考题	173
第十四章 药用植物的组织培养与工厂化生产技术	174
第一节 利用红豆杉愈伤组织与细胞培养生产紫杉醇	174
一、培养意义	174
二、材料的选择	174
三、愈伤组织的诱导与生长	174
四、紫杉醇含量的检测	176
第二节 利用紫草组织培养生产紫草宁及其衍生物	176
一、培养意义	176
二、材料的选择	176
三、愈伤组织的诱导与生长	176
四、高产细胞系的筛选	177
五、紫草宁及其衍生物的合成与采收	177
第三节 人参的组织培养与工厂化生产	177
一、外植体选择	178
二、培养基及培养条件	178
三、培养方法	178
第四节 银杏的组织培养与工厂化生产	178
一、培养意义	178
二、培养技术	179
第五节 浙贝母的组织培养	180

一、培养意义	180	实训六 胡萝卜离体根培养	194
二、培养方法	180	实训七 百合鳞茎培养	195
第六节 桔梗的组织培养	182	实训八 矮天牛叶片培养	196
一、培养意义	182	实训九 水稻花药培养	197
二、培养方法	182	实训十 甘蔗组织培养	199
第七节 半夏的组织培养	183	实训十一 细胞分离与细胞悬浮培养	200
一、培养意义	183	实训十二 马铃薯茎尖培养脱毒	202
二、培养方法	183	实训十三 组培苗工厂化生产的厂房和工艺 流程设计实践	204
第八节 罗汉果的组培脱毒与快繁技术	184	附录	206
一、培养意义	184	附录一、常用英文缩略语	206
二、罗汉果的组织培养简史	185	附录二、常用植物生长激素浓度单位换 算表	206
三、罗汉果的离体快繁技术	185	附录三、蒸汽压力与温度的关系表	207
思考题	187	附录四、常用培养基成分表	208
第十五章 实践技能训练	188	附录五、培养基常用化合物的相对分子 质量	209
实训一 培养基母液的配制	188	附录六、稀酸和稀碱的配制方法	210
实训二 培养基的配制与灭菌	190	附录七、培养物异常表现、可能原因及改进 措施	210
实训三 培养材料（外植体）的消毒与 接种	191	参考文献	212
实训四 参观植物组织培养与育苗工厂（公 司）或观看植物组织培养录像	192		
实训五 猕猴桃茎段培养	192		

绪 论

一、植物组织培养的一般概念

植物组织培养 (plant tissue culture) 是指在无菌条件下, 将植物体的任何一部分, 如植物器官、组织、细胞以及原生质体等, 培养在人工配制的培养基上, 并给予合适的培养条件, 使之发育形成完整植物体的过程。由于组织培养是在脱离植物母体的条件下进行的, 所以也称作离体培养 (culture *in vitro*)。

根据所培养的植物材料的不同, 可以将植物组织培养分为 5 种类型: 器官培养、茎尖分生组织培养、愈伤组织培养、细胞培养和原生质体培养, 其中愈伤组织培养是最常见的一种培养方式。所谓愈伤组织 (callus), 原指植物在受伤之后于伤口表面形成的一层薄壁细胞, 在组织培养中则指在人工培养基上由外植体诱导形成的一团无序生长的薄壁细胞。愈伤组织培养之所以最常见, 是因为除茎尖分生组织和部分器官培养以外, 其他几种培养形式一般都要经历愈伤组织阶段才能形成再生植株。另外, 在悬浮培养和原生质体培养中也常以愈伤组织作为细胞来源。

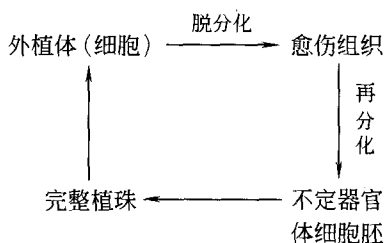
在植物组织培养中, 将已分化的植物器官或组织进行培养, 使之形成愈伤组织的过程, 即返回到没有分化的分生状态的过程, 叫做脱分化。众所周知, 植物细胞与动物细胞的主要区别不仅表现在形态结构上, 同时也表现在生理特性上。动物细胞的分化一般是不可逆的, 而植物细胞只要具有一个完整的膜系统和一个有生命力的核, 即使是已经高度成熟和分化的细胞, 也仍然保持着回复到分生状态的能力, 即具有脱分化的能力。

那么, 一个脱分化的植物细胞为什么能够再生成完整的植株呢? 这是因为植物细胞具有全能性。所谓细胞全能性 (totipotency), 是指植物的每个细胞都具有该植物所包含的全部遗传信息, 在适宜的条件下都具有形成完整植株的能力。早在 1902 年, 德国植物生理学家 Haberlandt 就预言, 植物的体细胞在适宜条件下具有发育成完整植株的潜在能力。但由于当时技术和设备条件的限制, 该预言未能通过实验证实。直到 1958 年, 美国康奈尔大学的英国学者 Steward 等人用胡萝卜根韧皮部细胞进行悬浮培养, 从中诱导形成胚状体, 并进一步萌发形成完整植株, 第一次证实了 Haberlandt 提出的细胞全能性学说。因此, 对于植物细胞来说, 不仅受精卵、而且体细胞也具有全能性; 对于动物细胞来说, 随着克隆羊、克隆牛等的相继出现, 也证实了动物体细胞的全能性。在生产实践中, 由已脱分化的植物活体细胞再分化形成完整植株一般有两种途径, 一种叫做不定器官形成 (或器官形成、器官发生) 途径, 即在愈伤组织的不同部位分别独立形成不定根和不定芽, 其中不定根和不定芽形成的时间并不完全一致, 而且它们都是单极结构, 即各自具有独立的维管束与愈伤组织联系; 另一种叫体细胞胚胎发生途径, 即在愈伤组织表面或内部形成类似于合子胚的结构, 因其从体细胞发育而来, 故一般称其为体细胞胚, 或不定胚, 或胚状体。体细胞胚发生所经历的发育阶段与合子胚相似, 一般也经历球形胚、心形胚、鱼雷形胚和子叶胚 4 个发育阶段, 成熟胚状体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发育成完整植株。一般认为, 愈伤组织中的不定芽起源于多细胞, 而

体细胞胚则起源于单细胞。因此由体细胞胚发育而成的植株的各部分在遗传组成上应当是一致的，不存在嵌合体现象。但也有少数研究者发现由体细胞胚胎发育途径再生的植株存在嵌合体现象，说明在个别情况下体细胞胚胎也起源于多细胞。

由胚状体途径产生再生植株具有三个显著的优点：一是发生数量多，即在一个培养物上产生的胚状体往往比不定芽的数目要多，如一个离体的烟草花药经过培养可产生 200 个以上的胚状体；二是培养周期短，加之胚状体发生数量多，因此在一定时间内能提高繁殖系数，可培养出大量的试管苗供生产需要；三是结构完整，成苗率高，胚状体一旦形成，一般均能直接萌发形成小植株。

综上所述，植物组织培养的全过程可简单表示如下：



二、植物组织培养的发展简史

植物组织培养的研究起始于 1902 年德国植物生理学家 Haberlandt，至今已有 100 余年历史。它的发展过程大致可以分为以下三个阶段。

1. 探索阶段（20 世纪初至 20 世纪 30 年代中）

在德国植物学家 Schleiden 和动物学家 Schwann 创立的“细胞学说”的推动下，1902 年，Haberlandt 提出了高等植物的器官和组织可以不断分割、直至分成单个细胞的观点，并预言离体单个细胞在适宜条件下具有发育成完整植株的能力，即植物细胞具有全能性的设想。为了证实这一观点，他将野芝麻和凤眼兰的叶肉栅栏组织和虎眼万年青属植物的表皮细胞放入加有蔗糖的克诺卜（Knop）溶液中培养，试图证明由一个细胞可以培养出一株完整的植株，并发表了论文《植物细胞离体培养实验》。他在论文中写道：“我愿意指出：在我的培养实验中虽然经常观察到细胞的明显生长，但从未观察到细胞的分裂。发现单离细胞分裂的条件，将是未来培养试验的难题”。他还预言：“在未来人们可以成功地从营养细胞培养出人工胚”。限于当时的技术条件和科学发展水平，他的实验只是观察到了细胞的生长和细胞壁的加厚，而没有看到细胞的分裂，因此实验未能取得成功。现在看来，实验失败的原因，一是所选用的实验材料均为已经高度分化的成熟细胞；二是所选用的培养基比较简单，尤其是没有加入在诱导成熟细胞分裂中起决定作用的生长激素，这是因为生长激素在当时还没有被发现。然而，作为植物组织培养的先驱者，他的实验对以后植物离体培养的发展起到了先导的作用，他所提出的细胞全能性设想也为植物组织培养的研究与发展奠定了基础。

自 Haberlandt 的实验之后，直到 1934 年 White 培养离体番茄根尖的成功，其间的 32 年里，许多研究者继续进行类似的细胞培养实验，同样未能获得成功，植物组织培养技术总体上处于探索之中，进展不大。然而，在以下两个方面却取得了具有深远意义的结果。一是以胚为材料进行研究获得一定进展。如 1904 年 Hanning 在进行萝卜和辣根菜的胚培养中，发现离体胚可以充分发育，并有提早萌发形成小苗的现象。后来 Laibach (1925) 在由亚麻种间杂交形成的不能成活的种子中的幼胚剖出进行培养，也能使其发育至成熟，从而证明了

胚培养在植物远缘杂交中应用的可能性。二是利用离体根尖培养获得某些成功。如 1922 年 Haberlandt 的学生 Kotte 和美国的 Rbbins 分别获得离体根类培养的某些成功, 还生长了很长的一段时间, 并能进行继代培养。这是有关根培养的最早的实验。但总的说来, 这段时期的研究失败要多于成功, 即使某些实验取得了一定的成功, 也只是阶段性的, 因为最终没有发育为完整的植株。故将这一阶段称为植物组织培养的探索阶段。

2. 奠基阶段 (20 世纪 30 年代中至 50 年代末)

这一阶段的主要特点是通过不断的探索和积累初步形成了植物离体培养的技术体系, 为以后的发展和应用奠定了基础。

1934 年, 美国的 White 等用番茄根尖的组织培养建立了第一个活跃生长的无性繁殖系, 使根的离体培养首次获得了成功; 1937 年, 他用 3 种 B 族维生素即吡哆醇、硫胺素和烟酸取代酵母提取液获得成功。在这个后来被称为 White 培养基的人工合成培养基上, 他将 1934 年建立起来的根培养物一直保持到 1968 年他逝世前不久。

与此同时, 法国的 Gautheret (1934) 在培养山毛榉和黑杨等植物的形成层组织时发现, 虽然在含有葡萄糖和盐酸半胱氨酸的 Knop 溶液中, 这些组织也可以不断地增殖几个月, 但只有在培养基中加入 B 族维生素和生长素吲哚乙酸 (IAA) 后, 山毛榉形成层组织的生长才能显著增加。

1939 年, Gautheret 连续培养胡萝卜根形成层获得首次成功。同年, White 用烟草种间杂种的瘤组织、Nobecourt 用胡萝卜根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。现在所用的若干培养方法和培养基, 原则上都是这三位学者于 1939 年建立起来的。诱导成熟细胞或已分化细胞发生分裂则是发现了细胞分裂素之后才成为可能。

20 世纪 30 年代, 植物组织培养领域出现了两个重要发现, 一是认识了 B 族维生素对植物生长的重要性, 二是发现了生长素是一种天然的生长调节物质。

20 世纪 40 年代和 50 年代初期, Skoog (1944), 以及 Skoog 和崔激等 (1951) 通过研究发现了腺嘌呤 (adcnine, AD) 或腺苷不但可以促进愈伤组织的生长, 而且还能解除 IAA 对芽形成的控制作用, 使植物茎段能诱导成芽, 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因素之一。

20 世纪 40 年代, 植物组织培养技术的另一项重要进展是 Overbeck 等 (1941) 首次将椰子汁加入到培养基中, 发现椰子汁可以刺激曼陀罗胚的发育, 使心形期幼胚能够离体培养至成熟。当时还不知道椰子汁中含有细胞分裂素, 但很快被许多研究者应用于器官发生的研究, 使椰子汁在组织培养各个领域得到了广泛的应用。

20 世纪 50 年代以后, 随着技术的不断深入, 植物组织培养的研究也日趋繁荣, 到 60 年代中期, 取得了很多引人注目的进展, 其中主要的有以下 9 项。

1952 年, Morel 和 Martin 首次证实通过茎尖分生组织的培养, 可以由已受病毒侵染的大丽花中获得无病毒植株。

1953~1954 年, Muir 进行单细胞培养获得初步成功。方法是将万寿菊和烟草的愈伤组织转移到液体培养基中, 置摇床上振荡, 使其组织破碎, 获得由单细胞和细胞团组成的细胞悬浮物, 而且可以继代繁殖。后来 Muir 等由分离得到的单细胞置愈伤组织上面的滤纸上培养 (即看护培养), 使细胞发生了分裂, 实现了 Haberlandt 培养单细胞这一设想的可能性。

1955 年, Miller 等从鲱鱼精子 DNA 中分离出一种首次为人所知的细胞分裂素, 并将其

定名为激动素 (kinetin, KT), 同时发现激动素的活性比腺嘌呤高 3 万倍。现在, 具有与激动素类似活性的合成的或天然的化合物已有多种, 它们总称为细胞分裂素 (cytokinin)。

1957 年, Skoog 和 Miller 提出了有关植物激素控制器官形成的概念, 即激动素/生长素的比例高形成芽, 比例低形成根, 如果二者比例相当, 组织则倾向于以一种无结构状态生长。这从根本上否定了 Went 的“器官形成特殊物质学说”, 并从此建立了离体培养中器官分化的激素配比模式。这一规律的发现, 不仅在植物离体培养中具有非常重要的意义, 而且揭示了植物生长发育生理学中的一个奥秘。后来进一步证实, 激素可调控器官发生的概念对于大多数植物种类都是适用的, 只不过在不同植物、不同组织或植物的不同发育阶段其内源激素水平不同, 它们所要求的外源激素水平也相应有所不同而已。

1958 年, Steward 等以胡萝卜根的韧皮部细胞作为材料进行培养, 形成了体细胞胚, 并使其真正发育成了完整植株, 第一次通过实验证实了 Haberlandt 关于细胞全能性的设想, 成为植物组织培养研究历史中的一个里程碑。1965 年, Vasil 和 Hildebrandt 用同一种化学成分确定的培养基培养烟草单细胞也获得了完整的再生植株, 进一步证实了植物细胞具有全能性。

同是 1958 年, Wickson 和 Thimann 发现, 应用外源细胞分裂素可促成在顶芽存在的情况下处于休眠状态的腋芽的生长。这意味着, 当把茎尖接种在含有细胞分裂素的培养基上以后, 将可解除侧芽的休眠状态而启动其生长。而且能够从顶端优势下解脱出来的不仅是那些存在于原来茎尖上的腋芽, 还包括原来的茎尖在培养中长成的侧枝上的腋芽, 结果就会形成一个微型的多枝、多芽、郁郁葱葱的小灌木丛状的结构, 里面包含了数目很多的小枝条, 其中每个枝条又可取出用同样方法培养重复上述过程。如此下去, 即可在相当短的时间内培育出成千上万的小枝条。当把这些小枝转移到另外一种培养基上诱导生根以后, 即可移植于土壤中。后来, Murashige 发展了这一方法, 制定了一系列标准程序, 并将该方法广泛应用于包括蕨类、花卉、果树等多种植物的快速繁殖中。

1958~1959 年, Reinert 和 Steward 分别报道其在胡萝卜愈伤组织培养中形成了体细胞胚。这是一种完全不同于由芽和根的分化而形成植株的再生方式。目前已知有 40 余科 100 多种植物通过培养可以形成体细胞胚。在有些植物如胡萝卜和毛茛中, 甚至可从植物体的任何部分得到体细胞胚。

1960 年, Cocking 等人用真菌纤维素酶分离植物原生质体获得成功, 使人们对原生质体的培养产生了极大兴趣。

1964 年, Guha 和 Maheshwari 报道了在毛曼陀罗中通过离体花药培养, 可由小孢子直接发育成胚。1967 年, Bourgin 和 Nitsch 通过花药培养获得了烟草的单倍体植株。

综上所述, 在这一发展阶段中, 人们对培养条件和培养基成分进行了广泛的研究, 特别是通过对 B 族维生素、生长素和细胞分裂素在组织培养中的研究, 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, 并首次用实验证明了细胞全能性的设想, 为以后的应用和发展奠定了基础。

3. 迅速发展和逐步实用化阶段 (20 世纪 70 年代至今)

20 世纪 60 年代, 全世界只有 10 多个国家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, 组织培养领域仍然空白的国家已屈指可数; 到了 90 年代, 植物组织培养已基本遍及世界各国。20 世纪 60 年代以后组织培养技术之所以能迅速发展, 其原因一方面是由于有了前 60 年建立的理论和技术基础; 另一方面是由于这项技术开始走出了植物学

家和植物生理学家的实验室，通过与常规育种、良种繁育和转基因技术相结合，在植物改良中发挥了重要的作用，并在若干方面取得了可观的经济效益。20 世纪 70 年代以来组织培养技术的发展，主要表现在以下 5 个方面。

(1) 原生质体培养取得重大突破 在 Cocking 等 (1960) 用真菌纤维素酶分离植物原生质体获得成功以后，1971 年 Takebe 等首次由原生质体获得了烟草再生植株。这不仅在理论上证明了除体细胞和生殖细胞之外，无壁的原生质体同样具有全能性，而且在实践中可以为外源基因的导入提供理想的受体材料。继烟草原生质体成株之后，表现这种潜力的植物种类不断增加。特别是 1980 年以后，作为粮食和饲料主要来源的禾谷类作物如水稻、玉米、小麦、大麦、高粱、谷子等的原生质体培养相继成功。在这方面，中国学者作出了重要贡献。

(2) 细胞融合技术应运而生 原生质体培养的成功，也促进了体细胞融合技术的发展。1972 年，Carlson 等通过两个烟草物种之间原生质体的融合，首次获得了体细胞杂种；1978 年，Melchers 等获得了马铃薯和番茄的体细胞杂种。以后在有性亲合及有性不亲合的亲本之间，不同研究者又获得了一些其他的体细胞杂种。在这方面，高国楠等建立的用 PEG (聚乙二醇) 处理促进细胞融合的方法得到了广泛的应用。

(3) 花药培养取得显著成绩 在 Guha 和 Maheshwari (1964) 的开创性工作之后，由于认识到单倍体在突变选择和加速杂合体纯合化过程中的重要作用，20 世纪 70 年代花药培养的研究得到了迅速发展，获得成功的物种数量也不断增加。尤其在烟草、水稻和小麦等的花培育种方面，中国取得了非常突出的成绩。

(4) 离体快繁和脱毒技术得到广泛应用 1960 年，Morel 创立了离体无性繁殖兰花的方法，后被兰花生产者广泛采用并迅速建立起“兰花工业”。进入 70 年代，用这种方法繁殖的兰花已达到至少 35 个属 150 余种。除兰花外，在其他很多观赏植物和经济作物（如甘蔗、香蕉、马铃薯和草莓等）以及在林木、果树和蔬菜中，离体快繁已形成了工厂化的生产规模。在以无性繁殖为主的一些重要作物中，通过与茎尖培养相结合进行脱毒，也产生了可观的经济效益。

(5) 与分子生物学联姻，产生了转基因育种技术 作为组织培养与分子生物学结合的产物，转基因育种技术在 20 世纪 70 年代中期得以诞生，从而为定向改变植物遗传性以满足人类需要开辟了一条崭新的途径，并成为当今植物遗传改良领域的研究热点。如今，转基因抗虫棉、抗虫玉米、抗除草剂大豆和抗虫油菜等已在生产中大面积推广。据 2000 年统计，全世界转基因作物种植面积已占农作物种植总面积的 16%，取得了巨大的经济效益。

目前常用的转基因方法有农杆菌介导法和 DNA 直接转化法两类。但无论采用哪类转化方法，外植体的种类和培养条件都会显著影响转化效果。在农杆菌介导法中，叶盘法和共培养法已得到广泛应用；而在 DNA 直接转化法中，愈伤组织培养、器官培养和原生质体培养等则起着十分重要的作用。

在整个植物组织培养发展历史中，我国许多学者也曾经做出了多方面的贡献。除前面提到的崔激的工作以外，1933 年李继侗等关于银杏胚胎培养的工作，1935~1942 年罗宗洛等关于玉米等植物离体根尖培养的工作，以及后来罗士韦等关于幼胚和茎尖培养的工作，李正理等关于离体胚培养中形态发生及离体茎尖培养的工作，王伏雄等关于幼胚培养的工作等，都是植物组织培养中各有关领域分阶段的很有价值的文献。20 世纪 70 年代以来，我国组织培养的研究出现了全新的局面，发展速度也更快，并在某些方面取得了举世公认的重要成果，尤其是在花药培养和原生质体培养方面，我国学者的研究工作已受到世界各国同行的普

遍重视和赞赏。

从上述组织培养发展简史中我们可以看到，植物组织培养也与任何其他科学领域一样，在开始阶段只是一种纯学术性的研究，主要用以回答有关植物生长和发育的某些理论问题。但其发展的结果，却显示出了巨大的应用价值，某些技术已在生产实践中直接或间接地产生了显著的经济效益，随着科学技术的进步，今后必将会产生更大的经济效益。

三、植物组织培养在生产中的应用

1. 在植物育种中的应用

植物组织培养目前已广泛应用于植物育种的各个方面，如单倍体育种、胚培养、体细胞杂交、细胞突变体筛选、遗传转化等，并取得了显著的成绩。

在单倍体育种方面，自从 Guha 和 Maheshwari (1964) 获得世界上第一株花粉单倍体植株以来，现在世界上已有 300 余种植物成功地获得了花粉植株。通过花药（花粉）培养获得单倍体植株，再经秋水仙素处理使其染色体加倍，可以迅速使后代基因型纯合，可加速育种进程。1974 年，我国科学家通过花药培养，育成了世界上第一个作物新品种——烟草品种单育 1 号，之后又育成水稻中花 8 号、小麦京花 1 号等优良品种。

早在 20 世纪 40 年代，人们就开始应用胚（胚胎）培养克服植物远缘杂交不亲和性。目前采用幼胚（或胚胎、胚珠等）离体培养，促使自然条件下早夭的幼胚发育成熟，以获得杂种后代，这在 50 多科属植物中已获得成功。

体细胞杂交可打破物种间生殖隔离，实现有益基因的交流，是改良植物品种并创造新类型的有效途径。目前，已通过体细胞杂交选育成细胞质雄性不育烟草、水稻、马铃薯等栽培种及其野生种的杂种，以及番茄栽培种及其野生种的杂种、甘薯栽培种及其野生种的杂种、马铃薯与番茄的杂种、甘蓝与白菜的杂种、柑橘类杂种等一批新品种（系）和用于育种的新材料。

在组织培养过程中，培养物的细胞处于不断分裂的状态，易受培养条件和外界压力（如射线、化学物质等）的影响而发生变异。大量研究表明，细胞水平的诱变，其突变频率远远大于个体或器官水平的诱变，而且在较小的空间内一次可处理大量材料。如能通过体细胞胚胎发生途径再生植株，还可克服个体或器官水平诱变所存在的嵌合体现象，获得同质突变体。目前，运用体细胞无性系变异和离体诱变技术已获得一批抗病虫、抗除草剂、耐寒、耐盐碱的新品种。

用遗传转化即基因工程的方法，解决传统育种方法不能解决的问题，并与常规方法有机结合，建立高效育种技术是目前世界共同努力的方向。通过对基因的提取和转移，可以克服常规育种工作中的随机性和不可控制性。基因工程育种必须在组织培养的条件下进行，一般通过农杆菌在试管苗上感染，使目的基因通过农杆菌转移到试管苗上，再将农杆菌杀死，然后再经过愈伤组织培养而诱导分化成苗。基因工程已成为改良植物抗病虫性、抗逆性及品质等方面新的重要手段。通过农杆菌导入有用的外源基因，目前已培育出很多优良品种，有些已在生产上大面积推广应用。

2. 在植物脱毒和离体快繁中的应用

植物脱毒和离体快速繁殖是目前植物细胞组织培养应用最多、也是最有效的一个方面。许多植物，特别是无性繁殖植物往往受到多种病毒的侵染，造成严重的品种退化、产量降低、品质变劣。如马铃薯、甘薯、芋头、草莓、姜等植物及长期进行无性繁殖的菊花、百合、唐菖蒲、火鹤、香石竹等花卉，以及香蕉等大多数果树及甘蔗等，都会由于病毒侵染而

造成损失,有时甚至会带来毁灭性的灾难。早在1943年White就发现植物生长点附近的病毒浓度很低甚至无病毒,利用茎尖分生组织培养可脱去病毒,获得脱毒植株。利用这种方法,目前已在多种主要作物上大规模生产脱毒种苗,如北方的脱毒马铃薯、中原地区的脱毒大蒜、华南地区的脱毒香蕉组培苗以及一些花卉组培苗等已进入规模化生产,并已在生产中取得了巨大的经济效益。

植物离体繁殖的突出优点是快速、材料来源单一、遗传背景均一旦不受季节和地区等条件的限制,重复性好。离体快速繁殖比常规方法通常要快数万倍至百万倍,例如1株试管苗,一般1个月能增加4倍,通过继代培养1年后,则能形成 $(1 \times 4)^{12}$ 即1678万株苗。目前,组织培养工厂化育苗已成为发展苗木生产的主要手段,已成为有些植物如兰花等的主要繁殖方法,并已在观赏植物、园艺植物、经济林木、无性繁殖作物等多种植物上得到了广泛的应用。专家预测,到21世纪中期,大量无病毒无性系苗木的生产都将通过植物组织培养快速繁殖的手段来实现。

3. 在次生代谢产物生产中的应用

利用植物细胞组织的大规模培养,可提取由组织和细胞产生的次生代谢物质,从而达到高效生产各种天然代谢产物的目的。工业上利用微生物培养提取微生物产生的抗生素等代谢产物早已获得成功。植物细胞培养同微生物培养一样,也可生产许多有用的次生物质,如蛋白质、脂肪、糖类、药物、香料、生物碱、天然色素以及其他活性物质等。近年来这一领域已引起人们的广泛兴趣和高度重视,国际上已获得这方面的专利100余项。例如,用细胞培养生产蛋白质,将给饲料和食品工业提供广阔的原料生产前景;用组织培养生产药用植物中的有效药物成分人参皂苷、紫草宁、蒽醌和咖啡因,香料植物中的香精,以及彩色果实中的天然色素等。目前有的次生物质已投入工业化生产,预计今后将会进一步发展。

4. 在植物种质资源保存和交换中的应用

植物种质资源是研究遗传和育种的重要基础。植物种质资源一方面不断大量增加,另一方面一些珍贵、濒危植物资源又日趋枯竭,不但造成田间保存耗资巨大,而且易导致有益基因的不断丧失。利用植物组织培养进行离体低温或冷冻保存,可大大节约人力、物力和土地,还可挽救濒危物种。同时,离体保存的材料不受病虫害侵染和季节的限制,有利于种质资源在地区间及国际交换。目前,我国已在数处建立了植物种质资源离体保存设施。

5. 在遗传、生理、生化、病理等研究中的应用

植物细胞组织培养的发展推动了植物遗传、生理、生化和病理学的研究,已成为植物科学研究中的常规技术。利用花药和花粉培养获得的单倍体和纯合二倍体植株,是开展基因的性质和作用、染色体组同源性等遗传研究的理想材料;利用细胞培养中易引起染色体变化的特点,可得到植物的附加系、代换系、易位系等,将为染色体工程研究开辟一条新途径。

植物组织培养也为植物生理活动的研究提供了强有力的手段。植物组织培养发展过程中曾在矿质营养、有机营养、生长活性物质等方面开展了很多研究,有利于增进对植物营养问题的认识;在细胞生化合成研究中,细胞组织培养也极为有用,如查明了尼古丁在烟草中的部位等;在单细胞培养中,可研究植物的光合代谢途径;在植物病理学研究中,可用单细胞或原生质体培养快速鉴定植物的抗病性、抗逆性等。

总之,植物组织培养经过几代人孜孜不倦的追求和探索,目前已发展成为一门年轻而富有生命力的学科,也是当前生物工程的基础和关键环节之一。它不但给遗传学、细胞学、植物生理学、植物胚胎学、植物病理学等方面的研究提供了条件和方法,同时也对农业、工

业、医药、环境卫生等方面的发展产生了巨大的影响。可以预计，随着科技的进步和市场需求增加，植物组织培养在生产中的实际应用将会越来越广泛，所发挥的作用也会越来越大。

思 考 题

1. 什么叫植物组织培养？什么叫脱分化和再分化？什么叫植物细胞全能性？
2. 植物组织培养的发展历史可以分为哪三个阶段？各有何主要特征？
3. 植物组织培养在生产实践中具有哪些重要意义？