

热带亚热带植物微繁殖

REDAI YAREDAI ZHIWU WEIFANZHI

郑成木 刘进平/主编

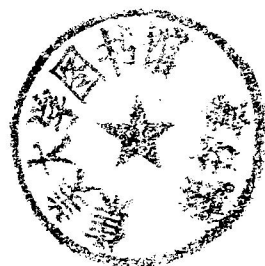


湖南科学技术出版社

Q948.31
ZC13

热带亚热带植物微繁殖

REDAI YAREDAI ZHIWU WEIFANZHI

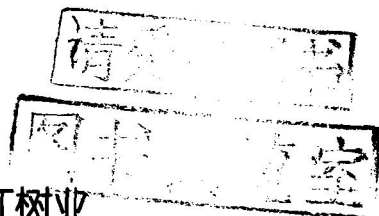


主 编

郑成木 刘进平

编 委

王胜培	庄东红	刘进平	江树业
朱靖杰	张开云	沈汉清	李志英
陈扬祥	李克烈	陈菁英	郑成木
季彪俊	姚 军	唐跃东	黄东益



B1191801

湖南科学技术出版社



热带亚热带植物微繁殖

主 编:郑成木 刘进平

责任编辑:刘奇琰

出版发行:湖南科学技术出版社

社 址:长沙市湘雅路 280 号

<http://www.hnstp.com>

邮购联系:本社直销科 0731-4375808

印 刷:国防科技大学印刷厂

(印装质量问题请直接与本厂联系)

厂 址:长沙砚瓦池正街 47 号

邮 编:410073

经 销:湖南省新华书店

出版日期:2001 年 6 月第 1 版第 1 次

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:15.5

字 数:384000

书 号:ISBN 7-5357-3188-0/Q·58

定 价:26.00 元

(版权所有·翻印必究)

前 言

热带亚热带地区是我国植物资源最丰富的地区。尽管经过近一个世纪的发展,植物组织培养理论和技术已经相当完善,这个地区的许多植物如香蕉和热带兰花等已可以成功地进行组织培养和商业化微繁殖生产,产生了巨大的经济效益和生态效益,但是仍有相当数量的植物种类,主要是一些木本植物难以进行组织培养,因而有必要加强这方面的研究与开发。因此,我们组织编写了本书。

为了兼顾不同层次读者的需要,本书尽可能对组织培养和微繁殖的理论和实践进行全面、系统地论述,资料和内容尽可能详实而赅博,并能反映当前的研究水平。编著者大多是来自植物组织培养研究和微繁殖生产第一线的研究人员和管理人员,具有较高的理论水平和丰富的实践经验。由于编写时间紧张,编者水平有限,本书会存在不少缺点和错误,希望读者批评指正。本书可作为本专科生的教材,也可供植物组织培养有关的研究人员和微繁殖生产人员参考使用。

编者

2001 年 3 月

目 录

绪论	(1)
第一章 植物组织培养理论原理	(6)
第一节 植物细胞全能性	(6)
第二节 决定作用与形态发生感受态	(8)
第三节 器官发生和体细胞胚胎发生	(13)
第二章 植物组织培养实验室的设计与设备	(41)
第一节 植物组织培养实验室的设计	(41)
第二节 植物组织培养实验室的设备	(44)
第三章 植物组织培养的程序和技术	(48)
第一节 植物组织培养器皿和用具的洗涤	(48)
第二节 培养基成分、选择与配制	(48)
第三节 植物材料的准备	(88)
第四节 无菌操作	(94)
第五节 初代培养及继代培养	(94)
第六节 驯化与移栽	(98)
第四章 微繁殖	(107)
第一节 微繁殖的优缺点	(107)
第二节 微繁殖方式	(108)
第三节 植物组织培养脱除病毒	(116)
第四节 组织培养植株的变异	(123)
第五节 微繁殖的经济学	(131)
第五章 果树作物微繁殖	(135)
第一节 柑橘类果树	(135)
第二节 枇杷	(143)
第三节 柿树	(151)
第四节 香蕉	(152)
第五节 菠萝	(154)
第六节 椰子	(155)
第七节 枣椰子	(160)
第六章 观赏植物微繁殖	(167)
第一节 热带兰花	(167)
第二节 百合	(170)
第三节 郁金香	(171)
第四节 菊花	(173)

第五节 麝香石竹·····	(174)
第六节 唐菖蒲·····	(175)
第七节 红掌·····	(176)
第八节 绿巨人·····	(177)
第九节 月季·····	(178)
第七章 药用植物微繁殖·····	(180)
第一节 芦荟·····	(180)
第二节 苦丁茶·····	(182)
第八章 饮料作物微繁殖·····	(185)
第一节 可可·····	(185)
第二节 咖啡·····	(189)
第三节 茶树·····	(192)
第九章 香料作物微繁殖·····	(194)
第一节 胡椒·····	(194)
第二节 香茅·····	(195)
第三节 香子兰·····	(196)
第十章 产胶植物微繁殖·····	(198)
第一节 巴西橡胶·····	(198)
第二节 银胶菊·····	(202)
第十一章 林木植物微繁殖·····	(204)
第一节 檀木·····	(204)
第二节 桉树·····	(206)
第三节 杉木·····	(208)
第四节 柚木·····	(209)
第十二章 纤维植物微繁殖·····	(211)
第一节 剑麻·····	(211)
第二节 苧麻·····	(212)
第十三章 其他经济植物微繁殖·····	(216)
第一节 甘蔗·····	(216)
第二节 油棕·····	(218)
第三节 石刁柏·····	(222)
第四节 水稻·····	(225)

绪 论

一、植物组织培养的概念

1904年, Hannig 提出了一种新的植物培养方式, 称之为胚培养(embryo culture)。他将几种十字花科(Cruciferae)植物的胚剥离下来, 并在离体(in vitro)的条件下得到成活的植株。从1920年起, 许多植物培养方法得到发展, 如体外播种兰花种子、愈伤组织培养(callus culture)、器官培养(organ culture)等。1945年后, 种种不同的培养都划归到植物组织培养名下, 所以, 广义的植物组织培养(plant tissue culture)包括了多种离体培养(in vitro culture)技术, 即在无菌条件下, 在营养培养基上对离体的植物器官、组织、细胞和原生质体, 甚至包括完整植株所进行的培养。其主要特征是: ①一般在玻璃培养器皿(试管、培养皿、三角烧瓶等)中进行; ②培养环境排除了微生物如病毒、细菌和真菌, 以及植物害虫如昆虫和线虫侵入的可能, 保持无病、无菌、无虫害的生长条件; ③各种环境条件如营养因子、激素因子, 以及光照、温度等物理因子处于人工控制之下, 并可达到最适水平; ④通常打破了正常的植物发育路线和格局; ⑤随着单细胞和原生质体培养技术的发展, 对植物体显微结构进行操作成为可能, 并为遗传操作奠定了重要基础。

二、植物组织培养的分类

由于植物组织培养所采用的培养基、培养材料、培养方法和培养目标的不同, 因而可以划分为种种不同的类型。例如, 根据培养基固化程度的不同, 可分为固体培养(一般采用琼脂固化培养基)、半液半固体培养和液体培养。液体培养按培养方法又可分为振荡培养、旋转培养和静置培养等。如果在液体培养基中放入滤纸作为培养物的支持物, 则可称之为纸桥培养。根据培养材料不同, 可分为: ①完整植株培养。②胚胎培养。③器官培养, 包括花序培养, 花器官(子房、胚珠及胎座组织、雌雄蕊、花萼和花冠)培养, 根(尖)、茎(尖)、叶、果实种子及其切段或原基的培养。④组织培养, 包括(茎尖)分生组织、薄壁组织、输导组织、胚乳组织等的培养, 以及对由各种外植体诱导形成的愈伤组织的培养。愈伤组织培养也称狭义的“组织培养”。⑤细胞培养, 包括从活体组织上游离分散性较好的细胞或微细胞团的培养, 也称为(细胞)悬浮培养。⑥原生质培养(protoplast culture)和体细胞杂交, 包括对去掉细胞壁的细胞原生质体培养及杂种细胞原生质体的培养。在单细胞培养中, 可以采用看护培养、平板培养和微室培养三种方法。

三、植物组织培养的用途

植物组织培养的用途可分为四大类: 首先可以对植物体进行无性快速繁殖(即微繁殖)。第二是大规模细胞培养可以用来生产次生代谢物质(如医药、香料等植物化学成分)。第三是用于育种, 如花药花粉培养产生单倍体; 胚乳培养产生三倍体; 胚培养挽救杂种胚; 原生质

体培养进行体细胞杂交,以及植物组织培养用于突变体筛选和遗传操作;离体种质保存等。第四是用于理论研究,如植物组织培养用于植物生理学、病理学、(比较)胚胎学、细胞与分子生物学等的研究。

四、植物组织培养发展简史

植物组织培养的发展可追溯到 19 世纪。Schwann 和 Schleiden(1839)提出细胞学说(Cell theory)及细胞全能性理论(totipotency theory)。细胞全能性理论认为,每一个细胞都是一个自主的基本的有机体,原则上具备再生完整植株的能力。细胞全能性理论已成为植物细胞和组织培养的理论基础。

1902 年,德国植物生理学家 Haberlandt 第一次尝试采用植物组织培养技术,对小野芝麻、凤眼兰的叶肉组织,以及万年青属植物的表皮细胞等进行培养,但未能诱导细胞分裂。

1904 年, Hannig 首次在培养基上对十字花科的萝卜和辣根菜的胚培养获得成功。

1909 年, Kuster 进行了植物原生质体的融合工作,但未能培养成活。

1922 年, Knudson 将兰花种子在离体的条件下非共生萌发。同年, Knotte 和 Robbins 对离体的根尖进行了培养。Robbins(1922)还对豌豆、玉米及棉花的茎尖进行了培养,只形成一些缺绿的叶和根。

Laibach(1925)利用胚培养技术对亚麻(*Linum*)的种间杂种胚进行了培养,并于 1929 年利用亚麻的胚培养来克服杂交不亲合性(cross incompatibility)。

1933 年,中国生理学家李继侗培养银杏胚胎,并发现银杏胚乳提取液可促进离体胚的生长。这一发现启发后来的工作者在培养基中加入胚乳乳汁液、幼嫩种子或果实提取液,促进外植体的生长和分化。

1934 年, White 对番茄的离体根培养获得成功,并发现番茄根尖不同部位的烟草花叶病毒浓度不同:旺盛生长的根尖部位低,而成熟部位则很高。这种病毒浓度梯度为后来采用茎尖培养进行脱除病毒开辟了道路。由于生长素尚未发现, Gautheret(1934)离体培养山毛柳、墨杨等一些树和灌丛的形成层组织,在含有葡萄糖和水解乳蛋白的 Knop 溶液的固体培养基上连续培养几个月后,只得到了近似藻类的突起物,但未能获得再生植株。

1936 年, LaRue 对多种裸子植物的胚进行了培养。

White(1937)发现 B 族维生素对离体根培养的重要性,并指出生长素 IAA 对植物生长发育的控制有着重要作用。

Gautheret(1937,1938)在培养基中加入上述生长因子,使得柳树形成层诱导形成的愈伤组织连续生长。Nobecomt(1937,1938)对烟草种间杂种幼茎切段的原形成层培养也获得类似的结果。

1940 年, Gautheret 对榆属(*Ulmus*)的形成层组织进行离体培养,以研究不定芽的形成。

1941 年, Van Overbeek 利用椰子汁(内含一种细胞分裂因子),对曼陀罗的幼胚进行了培养,并达到成熟。同年, Braun 进行了瘿组织的离体培养。

1943 年, White 重新提出植物细胞全能性学说,并出版了《植物组织培养手册》。

1944 年, Skoog 首次采用烟草的离体培养来研究不定芽的形成。

Loo(1945)对天门冬属(*Asparagus*)离体茎端进行了培养。

1946 年, Ball 从羽扇豆属(*Lupinus*)和旱金莲属(*Tropaeolum*)的茎尖培养中首次得到完整的植株。

1948 年, Skoog 和 Tsui 通过对烟草茎段和髓培养发现,不定芽和不定根的发生由生长素

/腺嘌呤的比例决定。

1950年, Ball 从红杉(*Sequoia semperrirens*)愈伤组织培养中再生获得器官。

1952年, Morel 和 Martin 通过分生组织培养获得大丽花的脱病毒植株; 同年, 他们首次应用微型嫁接技术。

1953年, Tulecke 首次从花粉培养中获得银杏(*Ginkgo biloba*)的单倍体愈伤组织。

Strauss(1954)在玉米胚乳培养中对核型和染色体行为的变化进行了观察; 同时, Muir 等首次从单个细胞培养中获得再生植株, 但其使用的培养材料为冠瘿细胞, 而非正常组织细胞。

1955年, Miller 等发现了一种促进细胞分裂的植物激素——激动素, 后来发现激动素可用来代替腺嘌呤促进芽的形成, 而且其效力比后者高3万倍。

1956年, Tulecke 和 Nickell 利用复升悬浮系统(multi-litre suspension systems), 从培养物中生产次生代谢产物。

1957年, Skoog 和 Miller 发现改变细胞分裂素/生长素的比例, 可以控制根和芽的发生。

1958年, Maheshwari 和 Rangaswamy 从柑橘胚珠的珠心组织培养中再生获得体细胞胚; 同年, Reinert 和 Steward 分别从胡萝卜(*Daucus carota*)的愈伤组织和细胞培养中再生得到原胚, 为以后的组织培养中器官发生和体细胞胚胎发生奠定了基础, 也为植物细胞全能性理论提供了证据。

1959年, Gantheret 出版了第一部涉及范围广泛的《植物组织培养手册》。

1960年, Kanta 首次成功地对虞美人(*Papaver rhoeas*)进行试管授精(test tuber fertilization)。同年, Cocking 利用真菌的纤维酶酶解植物细胞壁, 获得大量原生质体; Morel 利用兰花茎尖培养对兰花进行营养繁殖。Bergmann(1960)对细胞悬浮液进行过滤, 并利用植板法游离单个细胞。

1962年, Murashige 和 Skoog 开发出最著名的 Murashige 和 Skoog 培养基(MS 基本培养基), 并成为后来广泛采用的基本培养基。

1964年, 印度人 Guha 和 Maheshwari 利用曼陀罗(*Datura*)花粉培养获得第一例单倍体植株, 从而开辟了后来以花药培养为基础的单倍体育种技术。

1964年, Mathes 在颤杨(*Populus tremaloids*)的愈伤组织上实现根和芽的再生。

1965年, Aghion-Prat 对烟草离体组织诱导成花。同年, Vasil 和 Hildebraudt 从烟草的微培养(micro-culture)游离到单个细胞进行植株分化。

1967年, Pierik 利用春化处理对缀花(*Lunaria annaria*)进行开花诱导。同年, Bourgin 和 Nitsch 从烟草花粉培养中获得单倍体植株。

1969年, Sacristan 和 Melchers 对烟草愈伤组织培养产生的再生植株进行核型分析。同年, Eriksson 和 Jonassen 首次成功地从 *Hapopappus gracilis* 的悬浮培养中游离得到原生质体。

1970年, Carlson 进行离体生化突变体的筛选工作。同年, Kasha 和 Kao 利用胚培养技术产生大麦的单倍体。Power 等(1970)首次实现原生质体的融合。

1971年, Takebe 等获得第一例原生质体培养的再生植株。

1972年, Carlson 等利用原生质体融合, 在两个烟草属(*Nicotiana*)中进行种间杂交(inter-specific hybridization)。

1973年, Pierik 等发现细胞分裂素可以打破扶郎花属(*Gerbera*)头状花序的休眠。

1974年, Murashige 等利用细胞分裂素诱导茎尖侧芽分枝(axillary branching)。同年,

Binding 从矮牵牛(*Petunia hybrida*)的原生质体培养再生出单倍体植株。Melchers 和 Labib (1974)发现单倍体原生质体的融合可以产生杂种。Reinbard(1974)在植物组织培养中进行生物转化(biotransformation)。Zaenen 等(1974)和 Larebeke 等(1974)发现土壤农杆菌(*Agrobacterium*)中根瘤诱导的主要成分是 Ti 质粒。

1975 年, Gengenbach 及 Green 在玉米愈伤组织培养中进行抗长孢菌(*Helmintho Sporium mayclis*)的正向选择。

1976 年, Seibert 对低温培养贮存的康乃馨茎端进行芽启动。同年, Power 等利用原生质体融合技术进行矮牵牛(*Petunia hybrida*)和拟矮牵牛(*Petunia parodii*)的种间杂交。Bomhoff 等(1976)发现, 章鱼碱(octopine)和胭脂仙人掌素(nopaline)的合成和阻遏是受土壤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的 Ti 质粒遗传控制。

1977 年, Chilton 等成功地将土壤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中的 Ti 质粒 DNA 整合到植物体中。

1978 年, Melchers 等进行了番茄和马铃薯的体细胞杂交。

1979 年, Marton 等提出了利用植物原生质体和土壤农杆菌(*Agrobacterium*)共培养(cocultivation)的方法进行转化。

1980 年, Alfermann 等对固定细胞进行毛洋地黄毒苷(digitoxin)向异羟基洋地黄毒苷(digoxin)的生物转化。

1981 年, Larkin 和 Scowcroft 引入“体细胞无性系变异(somaclonal variation)”这个术语。同年, Siderov 等通过对诱变剂处理的白花丹烟草(*Nicotiana plumbaginifolia*)的单倍体原生质体的细胞群落的大规模检测来分离营养缺陷型。

1982 年, Krens 等的工作表明, 原生质体可以摄入裸露的 DNA, 表明可以用外源 DNA 对原生质体进行遗传转化。Zimmermann(1982)利用电刺激进行原生质体融合。

1983 年, Palletier 等在小红萝卜属和芸苔属间进行属间细胞质杂交(intergeneric-cytoplasmic hybridization)。

1984 年, Paszkowski 等利用质粒 DNA 对植物细胞进行转化。

1985 年, Horsch 等用土壤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)对叶盘进行感染和转化, 并得到再生的转化植株。

经过近十多年的发展, 人们对多种培养基和培养条件进行了革新、探索和尝试, 利用一切可行的物质和手段对植物组织、器官和细胞进行培养, 如电刺激(electrostimulation), 呼吸气体的调控(manipulation), 培养筛、培养膜和玻璃棒(culture rafts, membranes and glass rods), 看护培养(nurse culture), 非离子表面活性剂(nonionic surfactants), 生物反应器(bioractor), 机器人和自动化(robot and automation)等。目前, 植物组织培养已成为多项技术的基础, 如脱病毒和微繁殖、次生代谢物的生产, 以及作为植物遗传工程的平台进行遗传转化和体细胞杂交等。

虽然可以进行植物组织培养的植物种类已经很多, 但是仍有许多种群如藻类植物(Algae)、苔藓植物(Bryophytes)、蕨类植物(Pteridophytes)和裸子植物(Gymnosperms)等仍有待于开发和培养。另外, 依然存在许多难以进行组织培养的植物种类, 以及某些植物种类培养技术仍不成熟和不完善。随着自然界生物多样性的萎缩, 以植物组织培养技术为基础的遗传资源保存与创新, 并通过生物技术提高农作物的产量, 生产农业生物化学和医药急需的次生代谢物, 将为新一轮的“绿色革命”创造重要条件。因而, 在未来的世纪中, 植物组织

培养技术仍将是生命科学的前沿阵地。

(郑成木)

参 考 文 献

- 1 Pierik RLM. In vitro culture of higher plants. Dordrecht/Boston/Lancaster; Martinus nijhoff Publishers, 1987.
- 2 赵国凡, 王兴理. 植物组织培养概论. 大连: 大连理工学院出版社, 1988
- 3 杨增海. 园艺植物组织培养. 北京: 农业出版社, 1987

第一章

植物组织培养理论原理

第一节 植物细胞全能性

一、植物细胞全能性

作为植物组织培养的理论基础，植物细胞全能性(plant cellular totipotency)概念是与细胞学说(cell theory)分不开的。Schleiden 和 Schwann(1839)提出的细胞学说认为，细胞是多细胞有机体的结构和功能单位，它本身也是一个基本的有机体。细胞是通过细胞分裂而产生的。在多细胞生物的发育过程中，受精卵或合子同其他的细胞类型截然不同，它可以经过一系列分裂而形成形态、结构和功能不同的子细胞或细胞群，进而形成一个具有完整的形态结构和功能的有机体。合子内在固有包含形成一个新的有机体的基本的遗传信息。特殊地，种子植物的合子要经过一个胚性发生阶段(embryogenic phase)以形成未来植物体的发育模式。由于胚包含未来植物体营养器官的形态上已经分化的原基，当遇到合适的水、光、温条件，它将很快生长形成一个新的植株。由于体细胞是由合子经有丝分裂产生的，因而也应具备合子所赋予的全部遗传信息和发育潜力。

从理论上讲，植物细胞全能性是指植物体的每个生活细胞都具有该植物体的全部遗传信息，在特定的离体培养条件下，具有发育成完整植株的潜在能力。显然，那些高度特化的组织和细胞，几乎不可能再分裂以进一步表达其遗传潜力，因而也不能表现细胞全能性，如细胞核已经开始崩解、细胞壁增厚超过 $2\mu\text{m}$ (成熟管胞的细胞壁有 $7\mu\text{m}$ 厚)的筛管和木质部成分。全能性表达最有力的证据应该是通过胚状体阶段分化形成完整的植株。

二、分化、脱分化与再分化

细胞分化(differentiation)是指个体发育过程中，不同部位的细胞的形态结构和生理功能发生改变，形成不同的组织和器官。一般而言，分化是一个不可逆转的过程，但是植物细胞即使高度成熟和分化，只要它们有一个完整的膜系统和一个生活的核，它们就具有向分生状态逆转的能力。在一个完整植株上，某一部位上的体细胞只表现特定的形态和行使特定的功能，虽然其遗传潜力并未丧失，但它们的特化程度不同，因而这种向分生状态逆转的程度和能力有赖于其原位所达到的细胞学状态和生理状态。如上所述，高度特化的某些筛管和木质部成分，几乎丧失这种能力。

将从已分化的组织上游离得到的处于不分裂、静止状态的细胞生长在促进其增殖的营养

培养基上培养，这些细胞首先要经历一定的变化才能达到分生状态。这种变化包括在细胞静止(cytoquiescence)过程中，被溶酶体活动破坏的那些无功能的细胞成分的更新。我们将成熟细胞恢复分裂活性、向分生状态逆转和形成脱分化的愈伤组织的现象称之为脱分化(dedifferentiation)。一般而言，外植体通常包含不同类型的细胞，因而在形成愈伤组织后，其组成上，它们形成一个完整植株或植物器官的能力是异质的。

对于一个已分化的细胞，表达其全能性的过程应该首先经历脱分化，尔后再经历一个再分化的过程。再分化(redifferentiation)是指脱分化的细胞或组织在特定的条件下转变成各种不同的细胞类型的现象。但也有例子表明，一个分化的细胞可以不经愈伤组织化阶段而直接发生再分化。

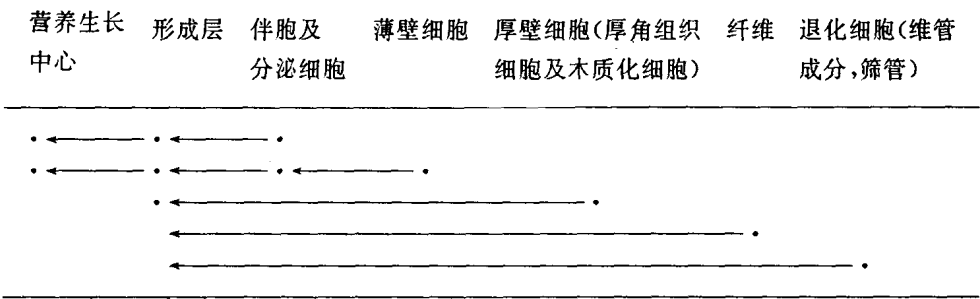


图 1.1 不同细胞类型脱分化过程可能进行的程度
(引自 Gautheret, 1966)

三、细胞全能性与细胞类型

尽管理论上每个生活的植物细胞都具有全能性，但其实际表达的难易程度却随植物种类、组织和细胞的不同而异。通常，受精卵或合子、分生组织细胞和雌雄配子体细胞较易表达其全能性。

(一) 体细胞全能性的表达

Haberlandt(1902)首次进行离体植物细胞的培养，虽然未能成功，却预示了未分化的植物细胞具有向正常的胚胎发生逆转的能力。真正表明植物细胞全能性的例子是 Steward 和他的合作者在 50 年代利用胡萝卜根组织作外植体所做的培养工作。他们把胡萝卜的次生韧皮组织薄片培养在含有椰子汁的固体培养基上，产生由薄壁组织细胞构成的增殖细胞团。将这些愈伤组织转移到具有同样成分的培养基上振荡培养时，会产生单个细胞和细胞团。这些细胞是否成活，可通过镜检其细胞质流(cytoplasmic streaming)得知。通过检查发现，单个细胞是从愈伤组织上分离下来的，而细胞团块是由细胞分裂后聚集在一起形成的。不经继代培养，这些细胞团块会在液体培养基中形成根原基。当将这种生根的细胞团块转移到固体培养基表面时，会有芽发生，继而形成一个完整的植株。但是，他们对单个细胞在游离状态下经不同阶段发育成一个完整植株的尝试却并未成功。直到 1965 年，Vasil 和 Hildebrandt 的试验表明，杂种烟草的 1 个单个细胞可以在特定的培养基上形成一个能够开花的完整的植株。

上述结果极大地鼓舞了这个领域的工作者，但却离严格的全能性的定义相差甚远，因为上述单个细胞并未遵循像合子那样的发育路线，即在形成 1 个植株之前要经历 1 个胚胎发生阶段。从这一点看，Reinert(1959)的工作尤为重要。他将从胡萝卜根诱导形成的愈伤组织继代培养在一系列培养基上，经球形胚形成双极胚，最后发育成完整的植株。但体细胞的单细胞起源的证据并不充分。一直到 1963 年，Steward 和 Wetherell 与 Halperin 几乎同时报道了

胡萝卜的游离细胞培养在琼脂植板上可产生上千个胚胎，就如真正的合子胚胎发生那样，经历球形胚、心形胚及鱼雷形胚阶段。最后，Backsh usemann 和 Reinert(1970)的工作表明，游离的单个细胞也可以转变成胚胎，即得出胚状体(embryoid)是单细胞起源的结论。其后的工作表明，植物体的任何部位，合子、胚珠、珠心、根、茎、上下胚轴、叶柄、叶肉原生质体、花芽等，几乎都可以像合子发育那样表达其全能性。但是，由于技术原因，体细胞胚胎发生的植物种类还很有限。

(二) 性细胞全能性的表达

精子、卵子以及与此相关的配子体世代的单倍体细胞不仅仅是特化的生殖单位，而且也具有发育成多细胞有机体的潜在能力。在活体状态下，单倍配子体可以经单性生殖(parthenogenesis)、孤雌生殖或孤雄生殖而发育成单倍体胚，继而形成单倍体植株。在远缘杂交时，温度剧变、辐射或化学试剂处理时多出现此种情况。在离体培养条件下，尤其是雄配子体花粉粒的营养细胞和生殖细胞有极大的倾向经胚胎发生途径发育成完整植株。对天仙子(*Hyoscyamus niger*)花药培养的观察已表明这一点。

第二节 决定作用与形态发生感受态

植物器官的形成是一个有序而可以预测的过程，细胞和组织由于被决定而经历特定的形态发生途径。所以，植物组织培养的启动、分化的诱导，甚至由培养细胞再生获得完整植株，都有赖于对决定过程的操作。

单细胞和原生质体培养再生植株，诱变处理细胞获得目标变异，原生质融合获得种间杂种，以及外源基因在培养细胞中的表达，都受到组织培养技术本身的限制。例如，某些植物种类难以进行植株再生和遗传操作，亲缘关系很近而基因型不同的品种对组织培养的反应有很大差异，另外，简单的培养细胞会导致非表型和非遗传的变异等等。这些都制约着上述技术在品种改良中的应用。但是，植物组织培养与其说是一门科学，倒不如说是一门技术。启动培养和植株再生在很大程度上依靠经验改变培养条件来实现，对于一些关键因素，如激素如何改变决定状态(the determined state)，为什么不同植物种类及不同组织对培养的反应存在能力上的差异等，仍然所知不多。

一、决定

决定(determination)在动物胚胎发育生物学中的原意是指胚胎某一部位的细胞或组织向特定器官分化的发育状态。移植实验表明，即便将原肠胚发育后期的表皮和神经细胞改变位置，这些细胞仍将形成在原先位置时应该形成的器官。细胞的发育命运一旦决定，就保持稳定的发育特性，不受环境条件的变化而改变。决定状态或程度可以由异位移植和离体培养来测定。

决定同大多数发育过程不同，只有当有机体的部分置于实验操作时，才可知道其存在与否。也就是说，组织或细胞置于新的环境条件下仍可继续形成其在原先环境条件下发育形成的特定结构，我们才说这些组织或细胞是被决定了的。因而，决定包含两方面的含义：首先，它是相对的，既依赖于组织或细胞的特性，又有赖于实验处理；其次，决定能引起稳定的表型变化，即当能引起某种表型变化的外部因子去掉后，仍将产生原来的表型变化，这种稳定性使得这些细胞保留了对过去的“记忆”。这也是发育前进性的基础。

Sussex 认为决定作用有四个特点：①高频率存在；②是直接性的；③是相对稳定的；④

可以通过无性过程（有丝分裂）传递下来。人们很早就注意到植物发育可以带来稳定的表型变化。例如，在胚胎发生中，根和芽分生组织都从同一个细胞合子产生，即使从植物体上分离下来进行离体培养，根分生组织仍旧形成根，而芽分生组织仍旧形成芽。这种稳定的变化在光诱导开花现象中尤为明显。例如，种子植物在发育过程的某个时候会由营养生长向生殖生长转变，早先产生芽的分生组织会发育成花。苍耳(*Xanthium pennsylvanicum*)的开花诱导中需要短日照处理。这种成花状态一旦确定，就将终生继续，即使在非诱导性条件（如长日照条件）下仍将如此。嫁接实验证明，诱导信号是由叶片接受并传递给芽分生组织，即使数天后叶片丧失这种诱导状态，芽分生组织仍确定地向花发育。

对于一个既定的发育过程，稳定性事件何时发生，在植物的哪个部位发生，存在着很大的差异。例如，紫苏属(*Perilla*)的光诱导成花状态，可以通过诱导后的叶片的系列嫁接向未诱导植株上传递，但这种诱导状态却需要诱导叶片来维持。因而可以说，紫苏属(*Perilla*)成花状态的稳定转变是在叶片中发生，而苍耳属(*Xanthium*)的成花状态却是在芽分生组织中发生，而且这些稳定性事件是在花形成开始前。菊花属(*Chrysanthemum*)的形成花状态转变则发生在心皮发生之后，而凤仙花(*Zmpatiens balsamina*)的成花分生组织即便形成几轮花后仍可向营养生长状态逆转。

随着决定作用的继续，组织的发育潜能会受到限制。桂皮紫萁(*Osmunda cinnamomea*)的叶原基离体后培养在包含无机盐和蔗糖的培养基可以继续其发育。与早期的叶原基相比较，尽管形态上已有区别，但却能产生完整的芽。随着离体时叶原基发育年龄的增加，芽发育的机会降低，而叶发育机会增加。所以，在较早期阶段，叶原基与产生叶原基的芽分生组织具有同等发育潜力。在发育的晚期，叶原基发生稳定变化，因而其发育潜力受到限制，只能形成叶。对花形成过程作同样的试验发现，伴随着发育潜能的限制，不同的花器官依次固定化。

在分生组织中也存在这种相继决定状态(successive states of determination)。南美杉(*Arancaria excelsa*)的树形是在单个直立的茎干上，初级枝条以层状排列，次级枝条从初级枝条上发出并与初级枝条在同一水平面分布排列。Vochting(1904)发现，生根插条的直立茎尖可以生长成完整的植株，而且外形也正常；但是生根的初生茎尖尽管可以分枝，却不能垂直生长；而生根的次生茎尖却不能分枝，只水平生长出纤细的枝条。在发育过程中，直立茎干的分生组织不仅产生茎干结构，也产生初级枝条分生组织，初级枝条分生组织依次产生次级枝条分生组织。因而，Vochting 的实验表明，这些分生组织经历一个发育潜能的顺序限制过程，而在分裂细胞群中保持着不同的决定状态。

二、感受态

感受态(competence)早期指固有全能性的表达或形态建成的能力。在后来的发展中，感受态的定义逐渐扩宽，是指细胞的反应状态，即对特殊刺激或信号的反应能力。这个术语在与决定一起讨论时，有两个方面的含义。第一，感受态是指细胞在诱导被决定时的一种短暂状态。例如， Sl_2 等位基因纯合的番茄植株，雄蕊发育异常，短而侧向分离，花药退化。当用生长素吲哚乙酸处理正在发育的花后，雄蕊原基会形成心皮状器官；而用赤霉素处理后，则形成正常的雄蕊。这说明，在雄蕊形成过程中存在一段有限的感受态时期。因为实验表明，当雄蕊原基长度不到 0.15mm 时，赤霉素处理才有效。

感受态的另外一个含义是，它常用来描述由决定引起的细胞反应的变化。将营养生长的烟草离体茎段外植体，培养在诱导培养基上会形成叶芽；而开花的烟草近花端茎段外植体，在同样条件下培养则形成花。向开花状态的转变引起茎段组织感受态的变化，虽都以器官发生

反应,但却形成不同的器官。对于日中性的烟草,这种变化极为短暂,在培养中按一定的顺序多次转接,这种开花的感受态就会丧失。

但在另外一些例子中,这种感受态却相当稳定。某些植物光诱导成花时需要冷处理(春化作用),才能感受成花。二年生天仙子(*Hyoscyamus niger*)品种在17℃下可以生长形成器官,但无论在长日照或短日照条件下均不能开花。但如果将其实生苗低温培养数天后,再到短日照条件下生长,则只有经长日照处理后它才能感受成花。而这种感受态可以在旺盛生长的植株上持续190天之久。

三、决定状态及其稳定性机制

需要强调的是,决定状态的稳定并不意味着它不可逆转。有充足的证据表明,高度决定了的器官上的许多细胞类型仍具有全能性,即其决定态是可以逆转的。分生组织尽管发育潜能的限制较为稳定,但只要给予适当的刺激,这种潜能仍可改变。卷柏(*Selaginella willdenovii*)休眠芽分生组织离体培养在含有生长素的培养基上,可形成根。把仙人掌(*Opuntia polycantha*)的离体芽分生组织培养在含细胞分裂素的培养基上可形成叶,而培养在含青霉素的培养基上则形成刺。

能够说明分生组织的决定作用既具有稳定性,又具有潜在的可逆转性的一个例子来自对植物幼态阶段和成年阶段的发育的研究。英国常春藤(*Hedera helix*)在幼态阶段时,藤蔓匍匐,叶呈掌状,浅裂,交替式叶序。这种植物有时会转变为成年阶段,成年阶段的常春藤为灌木,椭圆形叶片,全绿,螺旋或叶序,并且可以开花结果,表现幼年或成年形状的枝条做成的插条嫁接到任何一种阶段的寄主砧木上,它都可以无限生长,并且表现出产生插条的那一种枝条的生长阶段。成年枝条若用赤霉素处理则会稳定地向幼态逆转。所以,生长阶段的改变,尽管可相当稳定,但却并非永远不变,茎尖可以可逆地在两种发育状态间转变。

植物体的决定并不像动物决定那么严格和稳定。动物细胞一旦被决定,其发育途径就不再改变;而植物的决定则有相对潜在的可逆转性和不稳定性。

决定态的稳定性与植物细胞全能性之间存在某种不一致,为了协调这两个概念,He-nshan等(1982)强调决定作用在器官化统摄水平上发生。他们提出,植物体中的决定发生在器官和组织水平,只有其上的细胞才具有稳定性。那么是什么样的机制将这种稳定性传递给这些细胞群的呢?一种可能性是细胞的布局,即细胞的空间排列以一种类似晶体的方式,自我繁衍生长,在某些情形下打破这种格局后进行再生。满江红属(*Azolla*)的根发育就是一个最好的例子。这种水蕨的根就是通过细胞规则的分裂格局,从单个顶端细胞开始分裂,固定这些细胞后代形成的。以细胞分裂板为界,根以两个自我繁衍的对映细胞形状发育。在其他例子中,分生组织的原初的结构和组织并非为决定态的稳定性所必需,发育潜能的稳定性变化有时在无序的愈伤组织上仍可维持。

第二种传递决定态的稳定性是组织和器官的动态组织化。如果细胞之间存在某种信号相互作用,原则上就可产生稳定的格局或自我繁衍状态。例如,在同质化诱导中,一个细胞可以在邻近细胞中诱导出相同或相似的表型,即便在一个细胞不存在特定空间排布的组织中仍具有稳定性。有充足的证据表明,这种传递机制在维管组织分化中存在。

第三种传递机制为外遗传变化(epigenetic change),即决定状态的稳定性传递发生在单个细胞水平上。果蝇的器官芽实验、哺乳动物的细胞培养和原生动物的发育学实验表明,某些决定状态是在单细胞水平遗传的。这使得人们产生这样一个疑问,细胞在遗传上是等价的,如何能够遗传不同的表型。为了解决这个问题,Nanney(1958)提出细胞有两种遗传体系:一种

是与有机体有性世代间发育潜能传递有关的遗传体系,另一种为外遗传体系,即发育体系,即基因表达方式在体细胞间的传递。因而外遗传变化是指不是由细胞基因组永久性变化引起的遗传的、细胞的变化。这与经典遗传突变有以下几个方面的不同:

(1) 外遗传变化经常是直接的,即对特异性诱导物的一种固定的反应。在诱导条件下,外遗传变化的频率较高,每个细胞世代可达 10^{-3} 以上。

(2) 外遗传变化具有潜在可逆性,这种逆转过程也是直接的。

(3) 外遗传变化产生的表型范围受细胞遗传潜力限制。

(4) 根据外遗传变化定义,是不能通过细胞减数分裂而传递的。

细胞和组织水平上的稳定性可以通过从组织上游离细胞克隆来鉴别,克隆后确定组织表型是否得以继续,从而知道这种稳定性是在哪一个水平上传递的。曾用此法鉴定和分析烟草在对细胞分裂素的需求上存在的组织特异性差别。

烟草叶组织在培养中持续生长需要外源细胞分裂素;而取自同一植株的茎外皮组织培养,在同样的条件下则是细胞分裂素自养的。这两种表型在细胞克隆后仍可延续,说明细胞分裂素异养和自养两种状态是细胞传递的。这种细胞遗传的对细胞分裂素的需求状态是稳定的,但不是永久不变的,在烟草植株从单细胞后代开始的发育过程中,至少一些细胞经历外遗传变化。

外遗传变化同超细胞水平上的稳定变化存在着重要的区别,它接触到发育生物学一个基本的问题,即细胞命运在何种程度上决定于其历史,而又在何种程度上决定于其在植株中的位置。可惜的是,这方面的研究仍不充分。

四、细胞和组织培养的建立

(一) 培养的启动

组织外植体增殖培养的启动会引起深刻的发育状态的变化:组织的基本结构发生改变;某些特化细胞类型丧失;新的细胞类型产生;通常静止的细胞开始分裂。许多植物组织培养除需要包括碳源、氮源、无机盐分和维生素在内的基本培养基成分外,还需要外源生长素和细胞分裂素来保持增殖。

启动培养还取决于植物的基因型和组织的发育状态。例如,在 2,4-D 存在的情况下,蜀黍(*Sorghum bicolor*)幼叶近基部的组织外植体可进行增殖培养,而叶子的其他部位则否;烟草髓组织外植体因取材部分不同,在增殖能力上也存在类似差异,其生理基础在于沿茎干长轴髓组织对细胞分裂素的需求存在差异。

通常人们认为,无论其来源如何,所建立的培养都可以最终转变成脱分化的表型。但一般而言,这是不真实的。培养物可以是从小薄壁细胞组成的松脆的愈伤组织到带有某些器官原基特性的高度器官化的团块的任何类型,而这种器官化类型主要取决于培养基的激素组成、植物种类和植物体上组织的来源。

(二) 培养中组织特异性的延续

作为惯例,当组织培养后,其分化的组织特异性格局和生物合成就不再持续下去。但也有例外,某些器官特异性抗原(假定为蛋白质)可以由烟草和櫻桃的非器官化愈伤组织、玉米的器官状体培养中产生;由玉米胚乳建立的培养物仍可继续产生胚乳特异性蛋白质——玉米朊,并且其组成细胞仍具有蛋白体及与玉米朊合成和贮藏有关的细胞器。组织特异性的次生代谢物生产也可以在组织培养中得以延续。从芸香(*Ruta graveolens*)根发生的愈伤组织培养可产生根特异性的香料油成分,而自茎产生的愈伤组织培养则形成茎干特异性成分。有时,