

植 15

# 植物組織培養

罗士韦

(中国科学院上海植物生所)

一九七九年八月 保定

# 植物生理學

第二版

李承華 主編



南京師範大學出版社

# 植物组织培养

罗士菁

(中国科学院上海植物生理研究所)

(本稿未经本人审阅)

植物的组织培养已有几十年的历史，近年来引起了广泛的注意。七十年代以来，利用这种技术研究了各方面的问题，所以组织培养不仅已经成为植物生理学的一个分支，而且已经渗透到各门科学，为植物学，分子生物学，遗传学等。植物组织培养的文章登载在一百多种杂志上(就我所看到的而言)。这个课题不仅有理论意义，而且在工、农、医各方面都有利用的途径。总之，植物组织培养已成为生物科学中引人注目的问题。

现在谈《植物组织培养的历史》。它是本世纪的产物。1902年 Haberlandt 开始进行本科植物的细胞培养，但因当时条件所限，他的结果不很理想。不过他有很好的想法，他相信：人们有可能把体细胞培养成为人工的胚。这是他的大胆设想，他认为可能将体细胞培养成为一个植株。用现在的术语，就是植物细胞有全能性。半个世纪以后他的设想实现了。

1943年美国的 P.R. White 在实验中发现烟草的愈伤组织能发展成为一个植株。这一实验实际上又一次提出了植物细胞全能性的设想。

1958年 Steward 等将胡萝卜根中的髓细胞培养成为一个植株，从而证实了植物细胞全能性的设想。这是近代植物组织培养中的第一个突破。只有在细胞全能性的这一概念的基础上以后的工作才能发展起来。

后来英国的 Cocking 等用酶法分离植物细胞的原生质体

获得成功，这是第二个突破。在此基础上才能进行原生质培养与原生质体融合的工作，才能进行细胞杂交。七十年代植物组织培养工作之所以突飞猛进，和上述两个突破是分不开的。

## 一、植物原生质体的培养和原生质体融合

### 1. 原生质体的制备

原生质体是一个去掉了细胞壁的裸露的细胞。细胞壁是由纤维素，半纤维素，果胶物质和少量蛋白质组成的。制备原生质体必须去壁。过去用机械方法可以得到原生质体，但活力很低。1960年起，Cocking用酶处理细胞得到原生质体，他用纤维素酶处理蕃茄的根头，得到成功。今天可以用纤维素酶处理植物细胞产生原生质体。全世界所用的纤维素酶主要是日本生产的P1500, P5000, R10等。R10是由绿色木霉(*Trichoderma*)分离出来的，另外还有离析酶(macerase)，果胶酶maceroglyma等。这些都是复合酶，其中含有不少杂质，为酚类，核酸酶，蛋白酶，过氧化物酶等。这些杂质对酶的活力有一定影响。最好是用纯的纤维素酶，半纤维素酶和果胶酶按一定比例配合使用。因为复合酶有缺点，所以有许多人将粗的酶制剂溶解后再进行提纯。

我们研究所用的是由绿色木霉的诱变株制成的酶制剂/23867酶。这种酶制剂活力稳定，含有纤维素酶C<sub>1</sub>和C<sub>2</sub>，还有半纤维素酶和果胶酶，是比较理想的分离原生质体的复合酶。利用这种酶制剂已经能够从几十种植物材料中分离出原生质体，并将其培养成植株，例如从烟草的叶肉细胞，烟草的愈伤组织细胞和胡萝卜根的细胞中分离出原生质体并将其培养成植株。现在谈之花粉母细胞即四分体细胞原生质体的分离。因为这种细胞壁与一般细胞不同，其细胞壁中除含有纤维素外，还含

有胼胝质和脂蛋白，所以普通酶法不能去壁。其中的纤维素也与一般的不同，不是 $\beta$ -1,4-葡聚糖，而是 $\beta$ -1,3-葡聚糖，不分支。需要用 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶才能水解这种纤维素。蜗牛酶含有 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶( $\beta$ -1,3-glucanase)，也含有 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶，因此用蜗牛酶可以去花粉母细胞的壁。

关于去壁所用酶的制备，应注意酶液需加渗透稳定剂，可以用糖类，如葡萄糖、蔗糖，甘露醇，山梨醇；也可以用无机盐，如 $KCl$ 、 $MgSO_4$ 、 $CaCl_2$ 、 $Ca(H_2PO_4)_2$ 等，pH一般为5.5-6.2。我们所制备的123867酶是用0.7%葡聚糖 $K_2PO_4$ 溶于0.5M甘露醇中配成溶液，溶后在5000-8000转/分下离心10-15分钟，取上清液，再通过0.45 $\mu$ m的微孔滤膜过滤灭菌而制成的。

现在谈取材问题。同一种植物材料生长在不同条件下时，分离死生质体的难易不同。栽培条件，叶片年龄，甚至不同季节都有影响。比如芸苔叶片，生长至19-21°C和40-45%相对湿度下能最好，比生长在26°C、50%相对湿度下的好。推测可做是由于细胞壁的物理化学性质上的差异。如细胞壁的组织就可能因发育年龄而不同。制备死生质体时一般用混合酶，如前所述。用123867酶一步即可分离出叶细胞的死生质体，1-2g叶细胞+10ml酶液，保温1-2h。也可以用单独的酶进行处理将细胞壁除去。经酶处理后，细胞悬液中有许多残渣（如叶绿体壁，细胞核等），必需弄干净。其方法可以过滤，将悬液通过400目的筛网布，再低速离心收集死生质体，并悬浮于0.5M甘露醇中洗去各种杂质碎片。另外可用漂浮方法，即处理死生质体后放在15-20%的蔗糖溶液中，使死生质体漂浮，或用离心法使之沉淀。

培养死生质体的方法和培养细胞的方法相同，注意渗透质光培养成愈伤组织，再放在分化培养基中，为MS培养基加IAA与激

幼素即可将愈伤组织诱导成植株。

## 2. 原生质体融合

原生质体融合是远缘杂交的另一种途径。远缘杂交的困难是不亲和性，原生质体融合亦然。这次工作目前尚在试验阶段，不能随心所欲。要做到原生质体融合，得到细胞杂种，有四点关键：a) 制备具有活力的原生质体；b) 使两个亲本的原生质体完全融合，成为杂种细胞；c) 细胞融合后会有几种成份，即杂种组合，和亲本与亲本的组合，如何在这些组合中将杂交的组合选择出来是一关键；d) 将杂交组合的细胞培养成植株。

这四点中a)点已在前节谈过。现谈b、c、d三点。

先谈融合问题。自然界本来就有原生质体融合的现象，如穿壁运动，对于植物的受精作用。人工诱导融合，可以用化学药品，最常用的是 $\text{NaN}_3$   $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ， $\text{CaCl}_2$ 等，现常用多聚化合物聚乙二醇如多聚赖氨酸。原生质体膜上带带有负电荷，诱导融合必须使原生质体紧密接触，只有这样，两个原生质体的膜才能融合。诱导剂的作用就是中和负电荷。其步骤如下：先得到有活力的两个母本的原生质体浓度相近，制成每毫升含有 $10^4$ — $10^5$ 个原生质体的悬液，取0.1—0.5 ml，加入诱导剂在 $20$ — $30^\circ\text{C}$ 下进行保温，0.5至一小时。下一步是用培养液或德压剂，洗3—4次，将融合剂去掉，而后进行镜检，再进行培养。目前常用的诱导剂是PEG 聚乙二醇，poly ethylene glycol，因为它的主链中有醚键，分子末端带有正电荷，能使原生质体上的负电荷与之结合。也可用聚丙烯醇（poly propylene glycol）PPEG等。用PEG诱导，在 $\text{Ca}^{++}$ 浓度， $\text{pH}$ 下可得到20—30%甚至47%的融合体。目前世界上用这种方法进行种内、种间和远缘的细胞杂交，已得到数十对融合体，这些融合体已经分化长成植株。

PEG也可用于细胞间，如细胞核，叶绿体的实验。

其次讲融合体的筛选，即从母本与母本的融合体和杂种的融合体中将后者筛选出来，这是比较困难的，也是细胞杂交中的关键性问题。最初的筛选方法是看融合体的形状，结构，颜色，核中染色体的形态等。这些是比较容易看到的，也仍然是筛选的根据。另一类方法就是设计一种条件，在这种条件下只有异融合体能生长或长得快，两个亲本的细胞长得很慢，或不能生长，甚至死亡。也可以用显微技术进行挑选，但工作起来困难很大。

现在举几个例子。第一个例子是最成功的，美国的Carlson用两种烟草的原生质体在NT培养基上得到了杂种，因为两种亲本在培养基上均不能生长，只有杂种才可以生长（1972）

第二个例子是西德人Malchers 1974年得到的烟草种间杂种，利用的光敏性，叫做颜色突变，用此法选出了杂种。

第三个例子是英国人Cocking 1976年利用原生质体对药物敏感性的差异以及对生长条件的要求不同，选出了烟草牛蒡的种间杂种。

关于如何鉴定细胞杂种的问题，有以下几种方法：

1) 根据形态上的特征，如植株的大小，形状，颜色，细胞的大小和形状等。但是在培养过程中会引起变异，因此单纯形态上不能肯定融合体是否为杂种。

2) 进行细胞学分析，如杂种植株细胞的染色体数目，大小，长短，分配？配对情况的分析。但也有与上边所述同样的一况，在培养过程中可能引起变异。

3) 用同功酶带谱进行鉴定，同功酶可以反映有机体功能分子结构问题遗传和代谢各个方面变化，如用乙醇脱氢酶

乳酸脱氢酶、过氧化物酶、酯酶、氨基肽酶、R<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 羧化酶等来鉴定烟草、蕃茄、马铃薯的杂种。用同工酶带谱进行鉴定时也有一些情况需要注意，如要求杂种的酶谱带清晰，亲本的酶谱带稳定等。在杂种的同工酶谱带中有以下几种情况：

第一种：有的杂种的酶带是亲本的酶带的总合；

第二种：杂种的酶带是亲本的部分酶带；

第三种：杂种的酶带保留或缺少亲本的部分同工酶带或出现新的同工酶带。

这是细胞杂交中的问题。

七十年代以来，国际上对细胞杂交很感兴趣。自从1972年Cochran获得烟草体细胞杂种以来，到目前为止，已有十八种体细胞杂种植株获得成功，大部分是种间的，也有种内的。1978年西德的Melchers用马铃薯和蕃茄获得体细胞杂种植株，他去年曾来中国访问，当时还说得到杂种尚不肯定，但今年就以发表了论文。应当承认此杂种还有缺陷，还不能认为是完全成功的杂种，植株形态上有若干变异，但不能以结蕃茄，下结土豆，花的颜色也有变化，染色体鉴定尚无照片，酶谱鉴定比较好，用R<sub>2</sub>D<sub>2</sub>羧化酶进行鉴定的，酶谱表明，杂种植株含有蕃茄和马铃薯按基因表达形成的小亚基产物，证明确实是体细胞杂种。

国内也在此方面的的工作，尚无多大进展。这是细胞培养中比较难作的问题，需要一定的人力，物力条件。目前设备条件差，如分离原生质体的酶靠我们自己来制备，尚有缺点。几年来得到一些杂交组合，但并不理想。要用多种来源的酶来制备原生质体，只用混合酶不好，进口的酶也不一定是纯，如何提纯，制备有力度的原生质体是中心问题。

我国在原生质体培养上也得到一些初步结果，可从原生质



体分化成植株，这仅是初步成就，应在此基础上进一步工作，希望在座同志从各方面努力，迎头赶上，如能生产出地球上没有的植物，是大家都非常有兴趣的。

附带谈一下，可以往原生质体中引入大分子，再使之变成植株，以此来改变其特性，如引入核酸，细菌、叶绿体，这些方面工作也不少，但尚无肯定结果。如DNA引入原生质体的实验结果尚不能肯定，国内也有人开展这方面的工作，其次，要把两个原生质的膜融合，但目前对膜的了解很不够，远落后于动物的工作，正急起直追。目前已有少数单位开展这方面的工作。

## 二、花药培养问题

印度 Guha (1964) 第一个用曼陀罗花药培养成单倍体植株，这是了不起的发现，与 Steward 工作一样得到全世界的重视。1964年花药培养工作开展以来，利用此法进行单倍体育种，引起全世界很大兴趣。在我国也受到很大重视，目前开展此项工作的科研和群众性的单位共有1000以上，5000以上人员从事此项工作，并取得一定成绩。已培育出十二种经济植物——小麦、水稻、烟草等的单倍体植株及经济栽培品种。问题在于如何利用单倍体植株进行育种。单倍体植株可用于进行生化遗传工作，重要的是用作育种材料。除我国已有几种在生产上推广外，现正在我国访问的法国遗传学代表团——法国 Doré 遗传育种站专家利用石刁柏 (*Asparagus*) 的花药培养获得单倍体。石刁柏是一种比较贵重的蔬菜，是雌雄异株植物，雄株的产量通常比雌株为优。她用花药培养已培育出的石刁柏单倍体，经人工加倍后得到具有性染色体YY的纯合体，即超雄植株。将超雄植株以及同时由

单倍体加倍后选出的另一优良雌株( $X \times$ )用组织培养法进行快速无性繁殖,而后接植大田杂交,所得杂种种子长出的植株全部为雄株,产量高,品质优良,已用于生产。我国重点放在禾本科,取得一定成绩,但也有些问题,普遍是白苗率,绿苗率低。其中原因复杂,看法不同。有人说花粉发育不充分,实际上也是并非所有花粉粒均发育成熟,只有少数发育好。进行温度预处理可使花粉在药内长出愈伤组织,这可能与花粉发育充分与否有关。再有也观察到染色体有缺陷,花粉在培养过程中发生突变,禾本科的单倍体植株发生白苗的多,原因目前不清,也无好办法,只能采取一些措施,相对提高成活率。

另一问题,推广上遇到困难,我只能从生理上考虑,只由于纯合体的依值左性所引起的,所以育出的单倍体植株在推广上有困难,可否参攷Dore's的毛刁柏的方法,用两个单倍体形成的植株杂交。

### 三、组织培养无性系的快速繁殖

这是细胞全能性的理论的具体应用。1960年Moyel首次用组织培养法获得了兰花植株,导致目前快速繁殖兰花的兰花工业的建立。繁殖无性系的方法很多,过去用扦插法繁殖也是无性系,现在用植物体细胞,植物组织培养法繁殖无性系获得后代,可概括为五个不同的类型:

- 1) 原形性型 —— 类似大部分兰花,如用兰花的茎尖,嫩叶,叶组织诱导原形性。
- 2) 器官发生性型 —— 用组织和细胞培养法使产生不定芽,如烟草愈伤组织培养,分化产生。
- 3) 内胚体发生型 —— 通过细胞组织培养通过胚状体(embryoid)的途径经过一系列发生过程由球形胚,鱼雷期心

胎形胚——到子叶，胚根形成，发育为完全植株，最早成功的是胡萝卜，而在烟草，玉米等上也获得成功。

4) 器官型 (organ type) 用鳞茎，花芽等产生植株，如贝母，百合等；

5) 无菌短枝型——用发育成熟的侧芽连同短枝培养成植株，可用 GA 处理促进其萌发，用这种方法短期内可得到许多植株，目前部分植物园以及林业研究人员用此法保存优良树种。

无性系快速繁殖发展很快，可用此法繁殖的植物达 300 种以上。试管苗已出现在国际市场上，我国近年来也在大力发展，如北方马铃薯的无毒种苗已在北方推广，普遍有效。广西等地的甘蔗组织培养法育苗也在大力推广。

快速无性繁殖法在花卉，果树，蔬菜，林木甚至水稻上都正在推广。

问题在于对细胞分化与器官形成机理还不了解，如植物激素对细胞分化，脱分化和器官形成是不可缺少的，但机理不明，目前仍然只能凭经验来决定所采用的激素种类，浓度等等。

试管苗存在的主要问题是折茎，马铃薯病毒危害严重，故减产，去掉病毒后增产效果显著，经过折茎的苗称为折茎苗，试管苗一定要是折茎苗才能推广。

另一个问题是植物性药物的安全问题，如植物药，生物碱等，经 20 多年的努力，才有进行工业生产的可能了。目前鱼藤酮，甘草，人参，烟草，薯蓣等等，可能加以提纯，香料为添加剂……利用组织培养的生物合成过程，是在人工控制条件下进行不受病虫害，三是收获是生产可以有功化，有一定生产速度。

利用组织培养生产药物有效成份的优点主要有：

- 1) 生产是在控制条件下进行的；
- 2) 不与农业争夺可耕田地；
- 3) 生产可在半自动或全自动化条件下进行，因此细胞生长速度比在自然条件下快得多，产生蛋白质的量比平时约大1000倍；
- 4) 可采用各种细胞杂交方法改良品种，提高产量；
- 5) 便于控制其生物转化，代谢过程，而且占空间少，有效地发挥人力，物力资源的潜力；
- 6) 我国不生产或没有的药材或进口的药材可用此法引种少量作为原始材料然后进行组织培养大量生产。

利用组织培养生产药物的好处多，潜力大，但不是所有药物均能用此法生产，其先决条件是：

- 1) 药效要十分肯定；
- 2) 对有效成份要完全了解；
- 3) 测定有效成份的方法要十分可靠，可以是生物测定或化学分析；
- 4) 生物合成的问题要能把低产提高到专产水平。有效成份要逐步提高。只有满足以上要求时才能试新生产。

1976年在西德召开过这种会议以来，已在国际上形成药用植物的培养研究的浪潮，我国已有50个研究单位，国际文献上已出现了100个专利，同时还在进行10吨以上工业生产的试制。目前生产条件成本太高，只生产少数贵重药只种200种以上，人参、三七、莖蕨、三棱、莨菪、鱼藤、甘草等有效成份会是大于天然的。采用各拉拾施和条件配合培养，提高生产。

植物生理学工作者的兴趣在于：

- 1) 了解各种植物药物的生物合成过程，以及采用各种条件

，配方变化，加入前体者，像生产抗菌素一样，来提产产量；  
2) 发现原来没有发现的新成份，如用鸭脚树等生产利血平，长春花碱，蛇根碱等，通过组织培养生产其他生物制品如溶菌素，蛋白酶抑制剂等。

3) 促进物质转化，将一种物质转变为另一物质，如毛地黄的组织培养工作能用毛地黄培养把它水解为毛地黄素B-甲基毛地黄素变成强心药，价值之数十倍。

药用植物的组织培养很有前途，但也存在有若干问题需要解决。

首先是细胞无性系植株的选择，把植物的细胞可当作微生物一样看待，但细胞的繁殖速度却远比微生物为低，慢得多，大概是  $5-10=1$ ，微生物比细胞的繁殖速度快  $5-10$  倍，故如何选择生长快的，适应性强的细胞系是一个问题；

其次是已选好的细胞无性系能保持其代谢特性而不退化也是一个主要的问题，此问题要通过研究试验。

目前还是试验阶段，还未达到工业生产水平，因所用成本太高，要研究培养基的代用品，不用或少用化学药品和活性物质。更急是重要问题。

药用植物的繁殖方面也可采用上述无性系的繁殖方法来繁殖，如引种国外药用植物，也可用该法繁殖。

以上讲的几方面的问题，下面用就此课题谈一谈对组织培养这个课题的总的看法：

1) 植物组织培养中的细胞培养问题是典型的理论结合实际的课题，适于大专院校来做；

2) 原生质体的培养，融合和遗传修饰工作，几年来作了大量工作，但有些摇摆，我认为此题值得作，我们不能急功近利，要契而不舍。细胞融合是近缘杂交，一般近缘杂交很困难，

不融合，而目前边缘杂交已得到宝贵成果，细胞融合问题也该如此看。细胞融合还不到十年时间，已得到许多好结果。

3)目前工作对象主要是真核的而且是高等植物。我认为八十年代是无核体成果用于真核体的时代，但会遇到许多困难，应有足够清楚认识，否则对工作遇到困难会动摇，怀疑；

4)试管植物的试研与扩大推广在我国是很有必要的，无论对农林，还是对果木，花卉都会带来革命性的变化。如农作物能用试管植物繁殖可能引起农业的革命化；

5)植物性药物生产将发生大的变革，发展，对材料选择，培养技术方面等还要深思熟虑；

6)花药培养已有成绩，问题是如何在现有基础上继续向前推进，真正能放在生产上发挥作用，顺利推广单倍体育种新品种。

总之，植物组织培养的内容广泛，只能简单地谈到这里，不能全面介绍其全部内容。这里谈的仅是个人看法，不一定对。有参考文献列在后边，请参阅。

根据纪录整理，未经本人审阅