

# 园艺植物生物技术

(校内教材)

华南农业大学园艺生物技术研究所编

2002年2月

## 前 言

在这新世纪之初，生物技术的发展日新月异。园艺植物作为一类独具特色的作物种类，应用生物技术的研究和生产也正在突飞猛进！

园艺生物技术研究所于2001年向学校提交的编写校内教材《园艺植物生物技术》的申请，很快得到批准。我们在短短的一学期内，从编写原则和编写大纲的讨论确定，到内容的分工编写，再到原稿的互校和初审，直至付梓，一环紧接一环，日程甚为紧张。好在编者们多年从事园艺生物技术研究，都有一定的经验和资料的积累；而且我们是依各自的研究专长来分工编写各章的。在初稿出来后，我们又安排了互校互审，最后由副主编和主编先后进行了通校。编写者录入相应章节后，由刘成明进行编辑排版。因此，如果说本书有什么可取之处的话，那是我们研究所集体经验与智慧的结晶。

在本书即将付梓之际，我们深感自己有限的见解，在宽阔的园艺生物技术知识海洋里，不啻为沧海一粟；再加上编写时间如此匆促（应春季新学期开学所需），本书里一定有不少需要改进的地方。我们诚挚地欢迎提出批评意见。

另外，有一点必须在此说明的是：本书参考了大量文献，很多的原始文献都是园艺生物技术上的重要进展。但是，由于本书是一本教科书，篇幅所限，无法一一列出原始参考文献，只能列出个别经典性的论文和一些参考书。在此向有关作者表示谢意和歉意。

本书内容大致由四部分组成：绪论、细胞工程、基因工程和其它（分子标记和生物反应器）。本书的主要对象是园艺学硕士生。细胞工程部分可作为本科生的教材，但对于未曾完整修读过《植物离体（组织）培养》的硕士生而言，细胞工程部分是后两部分的必要基础和垫铺。教师在使用本教材时，可根据学生的情况灵活处理讲授内容。

编者

2002年春

植物组织培养

实验

模式

目 录

- √ 绪 论 ..... 1
  - ① 一、园艺植物生物技术的含义和内容 ..... 1
  - 2' 二、植物生物技术的发展简史 ..... 3
  - 三、园艺生物技术的作用 ..... 14
- √ 第一章 细胞工程原理 ..... 17
  - 第一节 细胞全能性 ..... 17
    - 5' 一、细胞全能性概念的发展 ..... 17
    - 二、植物活细胞具有生命特征属性 ..... 18
    - 三、细胞在合适的离体培养条件下可以展现该物种的生命特征属性 ..... 20
  - 第二节 培养细胞的营养及代谢 ..... 21
    - 一、培养细胞的营养和初级代谢 ..... 21
    - 二、次级代谢 ..... 22
  - 第三节 脱分化与再分化 ..... 24
    - 一、脱分化 ..... 24
    - 二、细胞分化和组织分化 ..... 26
    - 三、器官分化和植株形成 ..... 29
    - 四、体细胞胚胎发生 ..... 30
  - 第四节 培养细胞的遗传变异 ..... 31
    - 一、培养细胞变异增多现象及其利用价值 ..... 31
    - 二、变异增多的原因 ..... 33
    - 三、培养细胞变异的遗传机理 ..... 34
- √ 第二章 离体培养基本技术 ..... 36
  - 第一节 外植体的类型及其选择与处理 ..... 36
    - 10' 一、外植体的类型及选择依据 ..... 36
    - 二、外植体的预处理及灭菌 ..... 40
    - 三、褐变的防止 ..... 41
  - 第二节 培养基及其配制 ..... 43
    - 一、培养基的种类及组成 ..... 43
    - 二、几类常用培养基的特性 ..... 49
    - 三、培养基的配制 ..... 51
  - 第三节 无菌技术 ..... 54
    - 一、接种室（无菌操作室）和培养室 ..... 54
    - 二、超净工作台 ..... 54
    - 三、试材和器具的灭菌 ..... 55
    - 四、无菌操作要点 ..... 57
  - 第四节 培养条件的影响 ..... 57
    - 一、光照 ..... 57
    - 二、温度 ..... 58
    - 三、湿度 ..... 59

固体培养基 液体培养基 完全培养基 不完全培养基

接种室 超净工作台 接种室 超净工作台

光照 温度 湿度 培养基的作用

四、培养基的 pH 值 .....	60
五、氧和其它气体 .....	60
第三章 细胞培养 .....	61
第一节 悬浮培养 .....	61
一、悬浮培养的基本特点及起始悬浮液的制备 .....	61
二、悬浮培养的种类和方法 .....	62
三、连续培养 .....	64
第二节 固相化细胞培养 .....	67
一、固相化细胞培养的特点 .....	67
二、植物细胞的固定化方法 .....	68
三、固相细胞培养系统 .....	69
第三节 单细胞培养 .....	71
一、植物单细胞培养的意义 .....	71
二、单离细胞的方法 .....	71
四、单细胞培养的程序 .....	74
五、影响培养细胞生长的因素 .....	74
六、培养细胞的密度及生活率的测定 .....	76
第四章 原生质体技术 .....	78
第一节 原生质体分离 .....	78
一、游离原生质体的材料来源 .....	78
二、酶混合液 .....	79
三、分离原生质体的操作程序 .....	80
四、花粉原生质体的分离 .....	81
五、原生质体的活力测定 .....	81
第二节 原生质体培养 .....	82
一、培养基 .....	82
二、培养方法 .....	82
三、原生质体的分裂与增殖 .....	82
四、植株再生 .....	83
第三节 原生质体融合 .....	83
一、聚乙二醇(PEG)与高 pH 的 $Ca^{++}$ 相结合的诱导融合法 .....	84
二、电融合 .....	85
三、非对称融合 .....	85
四、杂种细胞的选择及体细胞杂种植株的再生与鉴定 .....	86
第五章 生殖细胞工程 .....	89
第一节 花药与花粉培养 .....	89
一、花药培养 .....	89
二、花粉培养 .....	90
三、离体培养下雄核发育的途径 .....	91
四、影响雄核发育的因素 .....	92
第二节 未授粉胚珠和子房培养 .....	94
一、未授粉胚珠培养 .....	94
二、未授粉子房培养 .....	95

第三节	离体受精 .....	95
一、	离体子房授粉 .....	96
二、	胚珠试管授粉 .....	96
三、	影响离体受精的因素 .....	96
四、	离体受精的研究进展和概念变化 .....	97
第四节	杂种胚挽救 .....	97
一、	成熟胚的培养(Mature Embryo Culture) .....	97
二、	原胚培养(Immature Embryo Culture) .....	98
第五节	胚乳培养 .....	99
一、	胚乳愈伤组织的建立 .....	100
二、	影响胚乳培养的因素 .....	101
三、	胚乳再生植株的染色体倍性 .....	101
第六章	离体繁殖 .....	103
第一节	离体繁殖 .....	104
一、	离体繁殖特点及其应用 .....	104
二、	离体繁殖再生植株途径 .....	104
三、	离体繁殖技术体系及其影响因素 .....	106
四、	试管育苗商业性生产需要估算的参数 .....	110
第二节	人工种子的研制 .....	111
一、	人工种子的优点和局限性 .....	111
二、	人工种子的结构 .....	112
三、	人工种子的制作 .....	113
第三节	培育无病毒苗 .....	117
一、	培育无病毒苗的意义 .....	117
二、	脱除病毒的方法 .....	118
三、	脱毒苗的鉴定 .....	120
四、	无病毒良种的保存和应用 .....	122
第七章	种质离体保存和细胞工程育种 .....	124
第一节	种质离体保存 .....	124
一、	常温限制生长保存 .....	124
二、	中低温调控生长保存 .....	125
三、	超低温“长期”保存法 .....	126
第二节	细胞工程在园艺植物品种改良上的应用 .....	129
一、	获得无性系变异 .....	129
二、	获得体细胞杂种 .....	130
三、	挽救杂种胚 .....	131
四、	快速纯化亲本 .....	132
五、	保存珍贵的育种材料 .....	132
第八章	基因工程基本原理 .....	134
第一节	基因的分子生物学基础 .....	134
一、	基因概念的形成与发展 .....	134
二、	核酸的结构与性质 .....	135
三、	真核生物的基因组 .....	142
第二节	真核基因的结构与类型 .....	143

一、基因转录有关的结构 .....	143
二、基因的不同区域及其作用 .....	146
三、基因的命名 .....	149
四、植物基因的基本类型 .....	149
第三节 基因的表达与调控 .....	149
一、基因的表达 .....	150
二、原核生物和真核生物在基因表达调控的差别 .....	153
三、真核生物基因表达调控的基本方式 .....	154
第九章 基因工程基本技术 .....	160
第一节 核酸分离 .....	160
一、DNA 的分离 .....	160
二、RNA 的分离 .....	161
三、DNA 及 RNA 含量测定、纯度及质量的评定 .....	163
第二节 分子杂交 .....	163
一、分子杂交的基本理论 .....	163
二、用于核酸杂交的膜 .....	164
三、探针的种类及制备 .....	164
四、DNA 和 RNA 电泳及其从凝胶向尼龙膜的转移 .....	165
五、分子杂交基本步骤 .....	167
六、地高辛标记的探针 Southern 和 Northern 杂交方法 .....	169
七、Western 杂交 .....	170
第二节 PCR 技术 .....	170
一、PCR 的基本原理及影响因素 .....	170
二、RT-PCR 技术 .....	173
三、PCR 技术的其它应用 .....	174
第十章 基因分离与克隆 .....	176
第一节 基因克隆策略与载体 .....	176
一、基因克隆策略 .....	176
二、基因克隆载体 .....	177
第二节 基因分离 .....	184
一、目的基因的获得 .....	184
二、重组体 DNA 分子的构建 .....	189
三、重组体分子导入受体细胞 .....	194
四、重组体分子的筛选 .....	197
第十一章 植物遗传转化 .....	201
第一节 植物基因工程载体及其构建 .....	201
一、植物基因工程载体种类及命名规则 .....	202
二、根癌农杆菌 Ti 质粒的结构与功能 .....	203
三、Ti 质粒基因转化的原理 .....	204
四、Ti 质粒的改造与载体构建 .....	206
五、植物遗传转化中常用的选择标记及报告基因 .....	209
第二节 植物遗传转化方法和技術 .....	213
一、载体转化 .....	213
二、直接转化 .....	215

三、利用种质系统转化.....	216
第三节、转化体的筛选与检测.....	217
一、转化体的选择和筛选.....	217
二、外源基因整合的检测.....	217
三、转录水平的检测.....	218
四、蛋白质水平的检测.....	219
五、转基因植物性状检测.....	219
六、转基因植物研究中存在的问题.....	219
第十二章 基因工程在园艺植物遗传改良中的应用.....	222
第一节 应用基因工程改良园艺植物的性状.....	222
一、抗病性状.....	222
二、抗虫性状.....	223
三、抗逆性状.....	223
四、抗除草剂性状.....	224
五、延缓果实成熟.....	224
六、促进生根.....	225
七、培育雄性不育系.....	225
八、改变花色.....	226
九、改变花形.....	226
十、改变花香.....	226
十一、改良其它性状.....	227
第二节 存在的问题和展望.....	227
一、转基因植物的安全性评价和环境释放问题.....	227
二、转基因植物的安全性问题.....	228
三、知识产权与商品化发展问题.....	229
四、遗传转化后的一些问题.....	229
五、未来展望.....	229
第十三章 分子标记技术.....	231
第一节 分子标记概述.....	231
一、多态性与分子标记.....	231
二、分子标记的性质与种类.....	231
三、分子标记技术的优越性及其作用.....	233
四、分子标记的选择.....	235
第二节 常用分子标记的种类、原理及实验技术.....	236
一、RAPD 标记.....	236
二、RFLP 标记.....	239
三、SSR.....	242
四、AFLP.....	247
五、SNP (基于单个核苷酸多态性的 DNA 标记).....	252
第三节 分子标记数据的处理与分析.....	252
一、数据的获得.....	252
二、统计学处理.....	253
三、表征分析与系统发育分析.....	255
第四节 分子标记的应用.....	259

# 绪 论

## 一、园艺植物生物技术的含义和内容

园艺植物生物技术 (Biotechnology in Horticultural Plants) 是园艺学和生物技术的交叉技术学科, 是以园艺植物为材料, 利用生物技术, 创造或改良种质或生产生物制品的一门技术。它也是生物技术的一个分支。

生物技术 (Biotechnology) 是以生命科学为基础, 利用生物体系和工程原理生产生物制品和创造新物种的综合性科学技术 (百科全书生物卷, 1991)。1973 年发明的 DNA 重组技术标志着现代生物技术的诞生。现代生物技术包括众多领域, 通常包括 细胞工程 (Cell engineering)、基因工程 (Genetic engineering)、酶工程 (Enzyme engineering) 和 发酵工程 (Fermentation engineering) 四大领域。此外, 还有一些相对新的领域, 例如: 染色体工程、蛋白质工程、生化工程 (Biochemistry engineering) 等。目前, 我国的生物工程学会和微生物学会下均设有 细胞工程、基因工程、酶工程、发酵工程 和 生化工程 五个专业委员会。酶工程、发酵工程 (也称微生物工程) 和生化工程三者的相互联系较为紧密。在生物技术中, 以酶为催化剂的酶促反应, 其工业过程即为酶工程; 以细胞为催化剂者, 常称发酵, 相应的工业过程为发酵工程 (顾其丰, 1997)。而生化工程是解决酶工程和发酵工程 (甚至细胞工程) 产业化过程中生物的遗传特性、代谢特性和工程水平的传递特性耦合在一起所形成的特殊问题, 称为生物技术的下游工程 (顾其丰, 1997; 欧阳藩, 1998)。

生物技术还可依研究材料的不同而分为植物生物技术、动物生物技术和微生物生物技术。

植物生物技术是以 植物离体培养和分子生物学为基础技术, 所形成的以细胞工程和基因工程为主体、酶工程和生化工程等也有不同程度发展的技术科学。

植物离体培养 (In vitro culture) 是指通过无菌操作, 把植物细胞或其他类型的外植体 (Explant), 接种于人工配制的培养基上, 给予人工控制的环境条件, 使培养或操作对象表现生长发育等生命活动。离体培养, 是植物生物技术尤其是细胞工程的基础技术。借助离体培养技术, 人们证明了每一个植物活细胞都具有再生完整植株的能力, 建立了细胞全能性的概念。植物细胞全能性概念的建立使植物离体培养的不同研究领域都有了一个共同的理论基础。即不管培养或操作的对象是胚胎、器官、组织或细胞, 由于起决定性作用的是 细胞的全能性, 所以, 所有的离体培养或操作的内容均归入植物细胞工程。也就是说, 虽然有时培养的直接对象不是细胞, 而是其他对象, 例如器官或组织, 但研究的目的是为了 使细胞全能性向操作者所需的方向表达。

植物细胞工程 (Plant cell engineering) 目前尚无明确、统一的定义。在本书中, 植物细胞工程的含义是指: 通过细胞培养、融合等细胞水平的操作, 以及包含有多细胞的植物结构的离体培养或操作, 实现以 细胞全能性为基础的改良品种或生产生物产品的目的。

植物基因工程 (Plant genetic engineering) 是指通过重组 DNA 技术, 获得转基因再生植物,



从而定向地改变植物性状，使之更符合人类的要求。

园艺植物生物技术是植物生物技术下的一个分支。在植物生物技术中，园艺植物生物技术的发展特别活跃而富有特色。这与园艺植物的某些特点有关。

园艺植物包括果树、蔬菜、茶树和观赏植物等。这些植物具有如下特点：①多数园艺植物常规上是采用无性繁殖的，再生性强，但易积累病毒，因此脱毒与快繁的研究特别活跃，也特别有效；②大多杂合性强，不易获得纯系，采用常规育种方法品种改良的速度慢、效果差，因此就特别借重生物技术；③比较而言，园艺植物是集约栽培的农作物，单位面积的生产效益较高，有较高的研究价值。另一方面，不少园艺植物的童期长和遗传背景复杂不清，是导致分子生物学的基础研究薄弱原因之一。

同其他所有的技术学科一样，园艺植物生物技术也包括原理、方法技术和应用这三大部分。园艺植物生物技术的基本原理是细胞全能性，细胞全能性的展现基于两个基本事实，一是每一个植物活细胞都具有该物种的全套遗传信息；二是活细胞具有新陈代谢能力、脱分化和再分化以及遗传变异的潜能。对于基因工程而言，虽然其基本原理也包括在上述之中，但必须涉及到分子生物学的基本轮廓。

园艺植物生物技术的方法技术除了离体培养基本技术外，还涉及体细胞和生殖细胞的培养和操作、原生质体技术、基因操作技术和分子标记技术等。

园艺植物生物技术的应用领域相当广泛，将在本绪论的第三部分中详述。

同植物生物技术的其他分支相类似，园艺植物生物技术也包括细胞工程、基因工程、酶工程和生化工程等领域，不过，不同的“工程”领域的发展程度有较大的不同。

在园艺植物生物技术的不同领域中，细胞工程技术较为成熟，而且应用越来越广。以脱毒和快繁为代表的包括种质保存和作为品种改良辅助手段等多方面的园艺植物细胞工程，是迄今为止农业生物技术中应用最普遍、效益最好的领域之一；同时也是园艺植物生物技术中较突出的领域。

园艺植物基因工程起步较早、进展较快，众所周知的耐贮藏番茄、嵌合花色的矮牵牛都是较早取得成功并被批准投放市场的转基因作物产品。不过，由于园艺植物的分子生物学基础薄弱，近几年的发展优势削弱了。但是，由于园艺植物在人类生活中的重要性日益显现，其基因工程不但终将发展成为园艺生物技术的主角，而且将在植物生物技术中扮演重要角色。

园艺植物生物技术发展的另一个方面是 DNA 分子标记技术 得到广泛的应用。如：数量性状的多重效应、环境因素的影响、对育种材料的分析评价、亲本的选择选配、选育种材料的检测与早期鉴定等，均可借助分子标记技术开展研究。从而大大加快育种速度，降低选育种的成本，有效提高品种改良的成效。

利用园艺植物进行酶工程研究，尚未形成独立的领域，但个别的研究已显示很好的前景，例如：木瓜（蛋白）酶的生产 and 利用魔芋葡甘露聚糖载体制备的固定化糖化酶等。由于新兴的生化工程与酶工程相交叉，更因为生物反应器是酶工程和生化工程的核心设备，近年来利用生物反应器生产有用物质领域进展较快，因此，本书中把生物反应器独立列为一个领域，置于最后一章。

酶工程和生化工程在这章中一并简要介绍。

## 二、植物生物技术的发展简史

虽然园艺植物生物技术研究在所有植物的生物技术中通常处于较领先的地位，而且植物生物技术研究中的不少重大突破，都是以园艺植物为材料获得的，但是，就发展史而言，仅介绍园艺植物毕竟是不完整的，甚至会使历史发展的链条断裂。因此，本文介绍的是植物生物技术发展史，其中，将更多关注园艺植物。

### 1、理论渊源

植物生物技术始于细胞培养。而细胞培养研究的理论渊源可以追溯至十九世纪三十年代德国的植物学家 Schleiden 和动物学家 Schwann 的“细胞概念”(Cell concept)。细胞概念中包含如下主要观点：细胞是生物体的基本结构单位，由它构成整个生物个体；植物细胞是在生理上，发育上具有潜在功能的单位。Schwann 还指出：“每一个细胞应该可以独立生活和发展，假如具有的条件正如它存在于有机体内一样……”。1858 年，德国的细胞病理学家 Virchow 提出“一切细胞来自细胞”的观点，并进一步提出细胞学说 (Cell theory)。他认为“细胞是生命单位 (Vital unit)”，他说：“每个生物是许多生命单位的总和，每个生命单位本身带有生命的全部特性”。1901 年，Morgan 首次使用 totipotency(全能性)一词，不过，并未作出定义。

### 2、细胞培养的早期尝试

1902 年德国著名植物学家 Gottlieb Haberlandt (1854-1943) 发表了“关于单离的植物细胞培养实验”的著名论文。在该论文中，Haberlandt 描述了培养细胞的生长情况，但没有观察到细胞分裂增殖。

近代关于植物细胞与组织培养的文献反复引用了 Haberlandt 的论文，但实际上很少有人研读原始论文，因为这篇论文是用德文发表的。好在 Krikorian 和 Berquam (1969) 把这篇德文论文完完整整地翻译为英文，并加了一篇精到的评论。此外，还有其他不少研究者对 Haberlandt 的远见卓识、认识上的时代局限性、成功之处、失败的原因等进行了评述。这些评述主要涉及无菌技术、植物材料和培养基这三个方面。

在无菌技术方面，令人费解的是，Haberlandt 认为没必要达到完全无菌，他解释道：“被培养的植物细胞在溶液中存在大量细菌时只受轻微影响”。事过境迁，后人已很难估价细菌污染对其所培养细胞的影响。因此，几乎所有评论文章都是主要讨论材料和培养基这两个方面。

材料方面，Haberlandt 采用的是紫花野芝麻 (*Lamium purpureum*)、紫露草 (*Tradescantia virginiana*) 和腺毛肺草 (*Pulmonaria mollissima*)，他在论文中提供了这三种植物细胞培养的图片，并在论文中提及了凤眼莲 (*Eichhornia crassipes*)、狗牙堇 (*Erythronium dens-canis*) 和伞花虎眼万年青 (*Ornithogalum umbellatum*) 等多种植物的细胞培养。其中有不少是园艺植物。

Haberlandt 所用的材料还有两个特点：一是紫露草属、赤莲属、虎眼万年青属等，全是单子叶植物；二是外植体为已分化组织（栅栏组织）里的分化细胞。

现在我们已经清楚：虽然从理论上讲，所有植物的组织与器官都可以进行培养，但单子叶植物组织培养相对难一些。而且细胞越分化，要使其再分裂与生长就越不容易。时至 1968 年，Joshi 和 Ball 报道从许多植物分离的

栅栏细胞都有良好的生长情况。但从 Haberlandt 试验过的物种——凤眼莲的叶片外植体细胞仍没能培养成功。

Haberlandt 当时选择初始材料的出发点，是企求利用光合材料作为营养来源，而选择了成熟而高度分化的叶肉与栅栏细胞。另外，也与取材的难易有关。取叶片细胞要比取自初生和侧生分生组织的细胞更容易。他故意选择松散结合的部分……“使它们容易通过机械分离”。

一心致力于细胞理论的 Haberlandt 将精力全部投向最基本的组织结构——细胞，他将细胞看作“最基本的器官”，所以他着手从细胞进行培养。

培养基方面，二十世纪初，人们对植物营养知识很有限。Haberlandt 缺乏分离细胞对营养和激素特殊要求的代谢知识。他所用的培养基只是简单矿质盐溶液里添加了一些有机混合物。尽管如此，Haberlandt 曾用过的 Knop 的配方，经 Nitsch 修改后至今还在使用。

但是，细胞分裂需要的条件不是单一的，Haberlandt 所用的培养基不可能满足细胞分裂对营养的全面需求。现在我们很容易知道培养基中还缺有机物和植物生长调节剂。

尽管 Haberlandt 坚信离体叶片组织可在有光的条件下继续光合作用，从而为细胞的存活和生长提供必要的糖等有机物，但试验仍然基本上失败了，Haberlandt 认为是因为缺乏某种生长因子。

Haberlandt 建议从花粉管释放出一种物质使细胞开始生长。后来，Fitting(1909)在兰花花粉管发现的一种物质导致兰花中合蕊柱的膨胀，这就是后来所知的植物生长素，“荷尔蒙”这个词由 Fitting(1910)在植物学文刊中首次使用。

Haberlandt 是一位有着广泛兴趣的科学家，并密切注意各类文章。Van Tieghen 对从根长出的组织很有兴趣(Van Tieghen 和 Donliot, 1888)。虽然根经常从中柱鞘长成，但已发现根原始体可以从几乎所有活组织中产生。植物与园艺的营养繁殖已充分说明了这一点。Haberlandt 还对 Windler 致谢，Windler 已发现一个重要而有建设性的事实：即叶片上的不定芽既可来源于表皮单个细胞也可来源于几个细胞的结合体(Windler, 1903)。

Haberlandt 最著名的观点是他所称之为的“细胞全能性”（经查证，此名词是 Morgan 首先使用的）。在这个问题上，他提出了自己的观点“若不允许我提出更进一步的问题，我想在这个方向指出其可能性，应该不至于说我作出了一个不切实际的设想：人们可以成功地从营养细胞培养出人工胚”。这些话透露出他对最新的发展有高屋建瓴的目光。他的观点在时隔半个世纪后，被人们普遍接受（稍后将述及）。

可惜 Haberlandt 本人并没有沿着细胞培养的道路走下去，实际上他将精力投入到“感觉生理”的研究中。正像我们后来所见那样，虽然他的实验室转向根的培养、其他的实验室转向胚的培养，并取得了长足进展，而他本人再也没有回到原来的问题上来。

### 3、胚培养的探索

除了 Winkler(1902)对 Haberlandt 工作的评价外，Haberlandt 的工作几乎没有立即引起人们的注意。Winkler 描述了在含 0.002%  $\text{CoSO}_4$  的溶液中培养分离的蚕豆根尖细胞（3 个细胞）的分裂，但好像并没有出版这方面的详细报道。Hanning（1904）选用萝卜和辣根菜的胚培养，结果发现离体胚可以充分发育，并可提早萌发形成小苗。但在他的工作中并没有参考 Haberlandt 的论文。

胚培养探索中，值得详细介绍的是美国的 Knudson 在 1922 年采用胚培养法获得兰花幼苗，克服了兰花种子发芽困难的问题。Knudson 发明的“胚培养”法，严格说来是种子培养，实际上是兰花种子非共生萌发的一种方法。

Lewis Knudson 于 1884 年 10 月 15 日在米尔沃基 (Milwaukee) 出生, 他在密苏里大学获得农学学士学位, 然后到康乃尔大学念硕士, 开始了持续 51 年的工作, 直到 1958 年他去世。他的工作是从作为 Duggar 的助手研究植物生理开始的。1911 年, 他获得博士学位, 同年被任命为植物生理学的助教授。1952 年他退休后仍继续定期地去看看实验室, 他最后一篇关于兰花的论文在 1957 年发表在植物学杂志上。

起初, Knudson 并没有对兰花产生专门的兴趣, 他研究的内容涉及糖的利用、被子植物的有机营养、丹宁酸发酵作用、以及玉米和豌豆的根、真菌和无菌培养的植物所分泌丹宁酸酶、淀粉酶等。这些使他去查阅 Bernard 和 Burgeff 关于兰花种子萌发的论文, 他立即察觉到两位欧洲植物学家的过失, 并开始研究兰花种子非共生萌发。

长年以来, 人们认为兰花产生的种子不具萌发力, 只能通过分株繁殖。直至 1804 年, 英国植物学家 Richard Anthony Salisbury(1761-1829)首次观察并描述了兰花实生苗后, 旧的观点才被推翻。1822 年人们才知道兰花种子萌发技术。兰花种子的萌发, 是通过膨胀使菌根共生体入侵后而发生的, 接着形成称作原球茎的小球体。原球茎能够形成叶子, 随后还能形成根。

法国植物学家 Noel Bernard (1874-1911)最早认识到菌根在兰花种子萌发中的作用, 他在 1899 年把它描述出来。Bernard 在他去世之前的 10 年里分离了许多兰花内生植物 (orchid endophytes), 预测将来某一天兰花将在实验室中生产。尽管他取得了伟大的成绩, Bernard 却没能发展兰花种子萌发的非共生的方法。

Bernard 去世后, 德国维尔茨堡大学的植物学教授 Hans Bugeff(1883-1976)成为兰花菌根方面著名的专家, 他用共生方法萌发了许多兰花, 但像 Bernard 一样, 他也没有发展非共生萌发的方法。

当 Knudson 查阅 Bernard 和 Burgeff 的论文时,他立即察觉两位欧洲植物学家的过失: Bernard 使用一种称作 Salap 的物质使兰花种子萌芽, 它富含多聚戊糖和淀粉, 真菌的影响可能就在于消化这些淀粉。基于这些原因, Knudson 认为可以通过控制糖的使用量而促进兰花种子的萌发, 为了检验这个设想, 他加糖到溶液中去(原来标记的溶液为 Knudson A, 改良后的溶液称 Knudson B)。关于这个课题的第一篇论文在西班牙发表, 可能是 1920 他去西班牙访问的结果。回到美国后, Knudson 发表更详细、经典的论文(Knudson 1922), 从那以后, 他继续研究这个课题(发表的文章有 Knudson 1925,1927,1929,1930), 最后形成改良培养基(Knudson 1946)。这种溶液就是 Knudson C, 至今仍普遍应用于兰花种子萌芽, 也用作离体无性繁殖的培养液。

按理人们会一致赞同 Knudson 的发现,但事实并非如此,他的论文被一些困惑的怀疑者质疑(Ramsbotlom,1922 a,b)、攻击或者争论(Arditli 1972,1984)。Ramsbotlom 是英国研究真菌的专家, 他宣称:“兰花种子没有真菌就像哈姆雷特没有丹麦的王子一样”。

然而, Knudson 关于兰花种子非共生萌芽的发现在印度尼西亚和新加坡有很大影响; 在美国、英国和欧洲国家, Knudson 的发现使得兰花杂种大规模商业生产成为可能; 而且许多种植爱好者, 通过兰花属间杂交, 获得了成千种新杂种。

Knudson 的方法降低了兰花生产的成本, 并且使兰花由富人欣赏的东西转变为任何人都能种植的植物, Knudson 方法的另一个影响是快速大量繁殖优良杂种所必需的生殖方法。因此可以说, Knudson 是微繁殖的第一个发明者(Rotor, 1949)。

除了 Knudson 的贡献, Laibach(1925)进行亚麻种间杂种幼胚培养也成功地获得杂种植株。我国的李继侗于 1933 年发现胚乳提取物对培养的银杏胚生长有很好的促进作用。这是中国人介入离体培养领域的最早报道。在三十年代中, Turkey 对蔷薇科几种果树的胚培养, 使本来会中途败育的胚可以萌发成植株。

#### 4、根培养研究

紧随胚培养之后, 根培养也取得了成功。

Knudson 除了研究兰花种子非共生萌发，还利用附在有菌的芽上的无菌根去研究碳水化合物代谢与酶分泌。他在与康乃尔大学植物生理学先驱 B.M.Duggar 联系后，在根系统的处理中开发了无菌培养技术。同在康乃尔大学的 W.J.Robbins (1890-1979) 就是在此出发点上完成了他著名的根离体培养实验。根能够生长很长的一段时间，并进行继代培养。

同年，Robbins (是他第一个发现酵母提取液的作用) 还进行豌豆等的茎尖培养，形成一些缺绿的叶和根。

曾在 Haberlandt 实验室工作的 Kotte(1922)紧接着在 Robbins 关于根尖离体培养的研究后也单独地发表此类文章。他用实例引起人们对 Robbins 论文的注意,从 Kotte 的简介中很清楚地发现正是他致力于测试离体分生组织的生长潜力。“直到现在”，他写道“已经进行无菌培养的材料，都是永久组织；清楚地被分离的分生组织的培养并没有建立”(Kotte,1922)。最后 Robbins 和 Kotte 同时被誉为第一次进行了植物培养实验的人。

## 5、植物组织培养基本技术的建立

与 Robbins 和 Kotte 的器官培养相比，第一个真正的组织培养目标是建立无菌培养和证明其可否存活。植物组织培养基本技术体系的建立，始于三十年代中期几位科学家卓有成效的工作。

1934 年美国的 White(1901-1968)等用番茄根尖的组织培养，首次建立了活跃生长的无性繁殖系。1937 年，White 又发现 B 族维生素和吲哚乙酸，对离体根的生长有重要作用。他最早设计出适于植物组织培养的合成培养基配方。1939 年报道了烟草种间杂种(*Nicotiana glauca* × *N. congsdorffi*)幼茎切段的形成层组织培养，并成功地进行继代培养。由于 White 在植物组织培养早期研究上的多方面贡献，在美国他被誉为“植物组织培养之父”。

这个时期，在欧洲法国形成了组织培养的另一个研究中心。Gautheret 1934 年报道了培养山毛榉、黑杨的形成层时，可以不断地增长几个月。这项技术的关键是使用了固体培养基。时过半个世纪，1982 年 7 月在东京召开的第五次国际植物组织培养大会上，Gautheret 回忆道：当我起初用液体培养完全失败后，我把外植体移植到以琼脂作凝固剂的固体培养基（内含 Knop 溶液加葡萄糖和水解乳蛋白），我并没有预期会获得什么好结果，只是把培养瓶放置在培养橱里。可是在两个月后观察培养物时，使我非常吃惊的是：外植体的表面竟然披覆着一层看来是很健康的愈伤组织！随后，1937~1938 年他在培养基中加入 IAA 和维生素 B 等物质，结果使柳树形成层的生长大为增加。

与此同时，法国的另一位学者 Nobécourt(1937—1938)培养胡萝卜根和马铃薯的块茎薄壁组织，也使细胞增殖获得成功。

由于 White、Gautheret 和 Nobécourt 等科学家杰出的工作和发现，初步建立起植物离体培养的基本方法。

## 6、离体形态建成研究

三十年代末，很多研究者开始注意培养物的器官形态建成。不幸的是，第二次世界大战的战火在全世界许多地方，尤其是在欧洲迅速蔓延开来，欧洲的许多组织培养实验室被迫停止工作。幸而美洲大陆的有关实验室的工作仍能继续进行。

1938 年，著名的植物生理学家、生长素的发现者 Went 提出“器官形成的特殊物质”的假说，促使许多植物生理学家都致力于寻找这种“特殊物质”。

四十年代初，著名遗传学家 Blakslee 试图获得曼陀罗属的种间杂种，杂交成功了，可惜幼胚早期死亡。他的合作者 J.Van Overbeek 试用各种物质去刺激曼陀罗心形胚的发育，结果发现用浓缩 170 倍的椰乳效果最好，这使得 Blakslee 成功地获得所需杂种 (Overbeek, 1942)。当时还不知道椰乳里含有细胞分裂素，但猜测椰子汁中含有刺激细胞分裂的因子。

Caplin 和 Steward (1948) 借鉴了 Overbeek 等关于曼陀罗心形胚发育的研究成果，用椰汁作补充的基础培养

基解决了从萝卜根形成层中移出一小块，细胞很难增殖的问题。当时也认为椰子汁是刺激细胞分裂的因子。不过，花了不长时间就建立了一种“一系列物质联合起来起作用、甚至达到调节生长的促进与抑制相平衡的程度”的观点。蕴含在高等植物中生长调控的化学基础的哲理早期出现在 Steward 的名言警句里“没有单一的物质能锁住细胞分裂的大门”。

1939年，White 发现：在培养基中加入 IAA，对一种烟草杂种愈伤组织并不产生有益的效应。那时，他相信生长素并不是一种真正的生长因子，在他的报告中，他强调烟草杂种离体培养体系表现“不依赖生长素而生长”。幸而，他同时将培养的愈伤组织送一份给 Skoog，要求他检查其中是否含有生长素。Skoog 推测 White 培养的烟草杂种组织实际上可“不依赖于光和光合作用而产生生长素”，结果，他的确从愈伤组织提取得到“相当数量”的生长素。

Folke Skoog 出生于瑞典的 Fjärås，分别于 1932 年和 1936 年在加利福尼亚技术学院获得学士学位和博士学位。他长期而卓越的学术生涯包括在哈佛、霍布金斯大学 (Johns Hopkins)、威斯康辛大学的工作，并在后来成为威斯康辛大学的植物学荣誉教授。他一直致力于植物细胞培养和植物激素特别是细胞分裂素的研究。在加利福尼亚时，他首先跟 Herman Dolk，然后与 Kenneth Thiman 和 Frits Went 一起工作，在那时，加利福尼亚技术学院里还有 J. Van Overbeek 和 James Bonner。这个小组成为致力于研究第一类生长调节物质——生长素的科学家的核心。

Thimann(1934)已经指出在蚕豆 (*Vicia faba*) 和萝卜 (*Raphanus*) 中存在生长素。这两种植物和豌豆 (*Pisum*) 能在有光条件下连续不断地产生生长素(Skoog, 1944)。如前已述，White 培养的烟草杂种组织实际上可“不依赖于光和光合作用而产生生长素”，是因愈伤组织本身有“相当数量”的生长素。

1944年，Skoog 用烟草愈伤组织研究器官发生，证实了生长素对根有促进作用，同时对芽的形成有抑制作用，而这种抑制作用可部分地为有机磷酸盐和蔗糖所克服。1948年 Skoog 和我国崔徵在烟草茎切段和髓的培养及其器官形成研究中，发现腺嘌呤或腺苷可以解除培养基中生长素(IAA)对芽的抑制作用，而诱导烟草茎段形成芽，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因素之一。1955年 Miller 和 Skoog 在寻找促进烟草瘤细胞分裂的过程中，偶然使用了放置很久的鲑鱼精子 DNA，发现其可促使愈伤组织加快生长，而新鲜的 DNA 处理则没有效果。分析表明，起作用的是精子 DNA 的降解物——腺嘌呤的一种衍生物，6-糖基氨基嘌呤，被命名为“激动素”，它对促进芽的形成，效果比腺嘌呤增强约 3 万倍。1957年 Skoog 和他的同事又发现生长素与激动素不同配比对植物生长和分化的作用。即激动素 / 生长素的比例高形成芽；比例低则形成根，从根本上否定了 Went 的“器官形成特殊物质学说”，建立起离体培养中器官分化的激素配比模式，这一规律的发现，为植物离体形态建成的调控奠定了重要基础。

Skoog 对于植物生物技术还有其他方面的重要贡献，将在稍后进一步介绍。

## 7、细胞培养方法的建立和“细胞全能性”的证实

从 Haberlandt 1902 年的细胞培养尝试到 1950 年代初的半个世纪中，植物离体培养取得长足的进步。那么，此时离实现 Haberlandt 的梦想究竟还有多远呢？要使细胞培养获得成功，还有那些技术障碍呢？

以现在的眼光看来：一是怎样获得游离细胞；二是提供足够营养的培养基；三是防止培养细胞通气不足。

当时，不少研究者已不同程度认识到这些问题，对细胞培养技术方法上作了大量探索，取得了重要的进展。1953~1954 年间，威斯康星大学的 W.H. Muir 等首次成功培养了高等植物的单个细胞。他们将琼脂中生长成的愈伤组织放在液体培养基中“破碎”获得万寿菊和烟草细胞。对这样分离获得的单个细胞进行“看护培养”（用埋在琼脂培养基中的愈伤组织作“看护者”，在琼脂培养基上用一片滤纸使之与培养细胞隔开）。这种别出心裁的技术为单个细胞能够增殖并形成大的愈伤组织提供了有利的环境，但是，这种方法既不容易追踪它们的发育，也不利于

数量特别大的细胞的生长(Muir 等, 1958)。

De Ropp 1955 年发明了“微室培养法”, Bergmann(1960 年)建立了“琼脂平板培养法”。

然而, 关键性的突破出现在美国康乃尔大学 Steward 研究室。F.C.Steward(1904- )既是发明家又是科学家。Steward 通过化学而涉足植物学, 当时他已是英国 Leeds 大学最早的植物学家 Joseph H. Priestley(1883-1844)的研究生。Priestley 对园艺学和无性繁殖也很感兴趣。细读一下 Steward 的论文就会发现, 他的大多数工作都是在园艺植物或主要农作物上进行的, 组织培养工作也不例外。

1952 年, Steward 与他的同事共同设计一种培养装置 auxophyton (细胞增殖器)。把添加液体培养基的 T 形管固定在每分钟 1 转的旋转器上, T 形管内培养胡萝卜根的薄片(数 mm 厚)的小外植体(2.5mg), 通过一个转动的管状器的转动, 使得培养器皿里的外植体轮流地暴露在液体培养基和空气中。这就为培养细胞提供了充足的营养和理论上可控制的通气条件。椰乳作为生长补充物添加到由大量元素、微量元素、蔗糖、维生素组成的相当简单的基本培养基中。整个系统置于连续光照以及温度大约为 21.1℃ 的条件下。

1955 年首次利用上述装置进行胡萝卜的组织培养, 培养瓶内含有 100 多个胡萝卜根韧皮部外植体。这种充满胡萝卜接种物的培养瓶里经常出现浑浊, 起先以为是被污染了。然而, 当仔细检查时, 被疑为污染的东西很明显不是细菌也不是真菌生长, 显微镜检查发现, 培养液里充满飘浮的植物细胞。当把这些细胞捞出来放在琼脂培养基上, 或者通过干酪包布把它们从大量的组织群过滤分离, 这些细胞通过一系列的培养可以保存下来 (Steward 等, 1956), 最终能够依次长成细胞团。

以这种方式生长的胡萝卜细胞培养代表了第一例高等植物细胞真正成批培养的全部实际目的 (Krikorian, 1989)。

1958 年 11 月, Steward 和他的不同合作者连续发表胡萝卜细胞培养的一个系列 3 篇文章。第一篇中详细地测定了培养的细胞以及它们的习性和生长。第二篇提供了悬浮的细胞如何分裂并形成两种重要的有组织的形状的观察。一种包括小的极化愈伤组织块发出根, 当放置在琼脂上时, 形成茎然后形成小植物体; 另一种, 一群细胞生长过程中可以极化并产生一个原胚, 从原胚可以发育形成非合子胚或体细胞胚。第三篇文章只署 Steward 一个人的名, 是更具分析性和理论性的一篇, 强调了前两篇出现的数据。

Steward 显然被培养细胞具有再生植物体能力的事实所吸引, 特别是植物体可以从继代悬浮物产生, 这种产生在很大程度上经历了与合子胚发生相似的一系列事件。Steward 甚至在为一家资助机构的报告中写道“Haberlandt 的梦想就这样实现了……”(Krikorian, 1975)。

令人惊奇的事实是: 当时大多数植物学团体对这一发现的印象不深。动物学家更快地欣赏这项研究工作, 因为后者一直在一种压抑的观点下工作, 该观点认为, 发育的过程中遗传物质永久地丢失了或失活了。胡萝卜体细胞胚的发生帮助他们改变了这种观点。

因为 Steward 过去是一个严厉的批评家, 这回轮到一些组织培养学家倒过来不原谅他了, 一些植物学家吹毛求疵地说他没有对分离的单个细胞从头到尾的追踪过程。另外, 其他人则抱怨椰子汁不是绝对必需的。就像其他的前驱工作经常出现的那样, 任何事情最初并不是最完美的或完全的, 争议在所难免。Steward 本人到处作“胡萝卜和椰子——关于生长的一些解释”或类似的演讲。以至数年后一位高级科学家甚至问: 是否有什么地方的什么人没有注意到 Steward 的精心杰作?!

直到 20 世纪 60 年代末, 威斯康星大学植物系的一个博士后 A.C.Hildebrandt, 分离培养烟草的单细胞, 能够长出大片愈伤组织, 接着又产生茎和不定根, 这样形成的小植物体能够生长和成熟(Vasil 和 Hildebrandt, 1965)。至此, 没有人再严肃地怀疑高等植物细胞的全能性了。Steward 等人发表的关于栽培胡萝卜细胞的全能性及形态发生能力表达的实验论证的经典论文, 为全面认识潜在、活的正常植物二倍体细胞保持完整的形成合子核的全部遗

传信息,开辟了道路(Terzi等,1985)。

## 8、MS培养基——“坚实的轮子”

如果把驱动离体培养研究进展的两个关键性的因素:外植体和培养基,比作两个车轮,那么完全可以说,MS培养基配方的公布,等于为离体培养换上一个坚实耐用的轮子。

自从 Haberlandt(1902)的细胞培养尝试实验起,人们就一直在探索如何为离体组织提供足够的营养。选择和修改配方以寻找一个合适的培养基的工作由于一些人的努力而大大简化了,这些人包括 Knudson, Robbins, White, Thimann, Skoog, Miller 等。而根本性的变化则在于 Murashige 和 Skoog 1962 年发表的无机盐配方(MS培养基),它在园艺、农业和生物学上得到了广泛的应用,成为细胞和组织培养历史上的主要成就之一。

MS 的两位发明者之一——Skoog,已在前面作了介绍。

另一作者 Toshio Murashige 于 1930 年出生在夏威夷的 Kapoho。1952 年在夏威夷大学获得学士学位,1954 在 Ohio 州立大学获得硕士学位,并于 1958 年在威斯康辛大学获博士学位。他成长在夏威夷一个村庄的大家庭里,上学前,他先是在他家的农场里,尔后在一家蔗糖厂里干活。在学时甚至后来工作时,他总被认为是一个特殊的人物,并被鼓励去继续他的学业,这样他可以更好地与糖业界的学者相处。这早年间形成努力工作的习惯,在后来他十分注意论据细节的研究作风中得到充分的反映。

Murashige 于 1954 到 Skoog 的实验室工作。那时,正好有一个与生物化学系的 K.M.Strong 实验室联合的项目进展良好。他们于 1954 年获得 KT 的结晶,并于 1955 年 3 月成功地人工合成 KT 和 6-BA。他们的兴趣集中于:分离和合成其他细胞分裂素物质、CTK 在植物生长发育中的作用,特别是 CTK 与生长素还有其他一些因素在量上的互作对植物细胞培养中生长与器官发生影响。研究指出(Wiggans,1951),叶的提取液可使在改良的 White 培养基中生长的愈伤组织的产量增加 4~5 倍。Murashige 的博士论文的预备实验(predoctoral work)定在致力于分离出 CTK 以外的干扰 CTK 生物测定的有机物质(Murashige 1959)。在接下来一系列对叶片提取液生物活性成分的系统分析中, Murashige 发现愈伤组织产量的增加多半是由于无机成分,主要是  $K^+$ 、 $NO_3^-$ 、 $NH_4^+$ 。

在细胞分裂素和 IAA 和  $VB_1$  存在的情况下,培养基的无机营养的成分变得不够理想。为了将这其中对 CTK 定量物测定的干扰降到最小,“建立一种含有适量的各种所需矿质营养和普通的有机成分的培养基,以便能在通常的含量之外再加入额外的量对培养物的生长速率或产量不会有可见到的明显变化”,这项工作已经变得很有必要了。与当时使用的培养基比较,该培养基含相对较高的  $NO_3^-$ 、 $K^+$ 、 $NH_4^+$ 。经过广泛的研究,调整了培养基有机成分特别是碳水化合物和维生素的成分(参看 Linsmaier 和 Skoog,1965),还有氨基酸和核酸成分。Linsmaier 对碳水化合物的研究结果也被写入 Murashige 和 Skoog 的文章中。

Murashige 和 Skoog 发表的培养基是一个经典之作。经过威斯康辛小组精确和小心细致的基础工作产生的这个无机盐配得到世界范围内的广泛应用,这么多年来从未改变。虽然任何一个再好的培养基也不可能适应所有植物的生长,但是 MS 培养基是植物组织培养研究中最广泛应用的。Evans 等(1981)检索有关组织细胞培养再生的资料时发现,成功地再生单子叶和双子叶小植株的试验中,有超过 70%是使用 MS 基本培养基的。而其他研究者要建立一种新的培养基时,MS 基本培养基则作为一个基准(或起点)。根据 SCI(科学引文索引),仅在 1984~1986 年间,有不止 2220 篇文章引用 Murashige 和 Skoog 发表的培养基。在植物科学领域,很少有哪篇文章能像这篇论文一样这么长时间起作用并且反复被引用。

Murashige 和 Skoog 的工作证明了科学突破的源头并不一定是显要的。他们的工作并不是为植物组织培养建立一个世界性的无机盐配方;在研究细胞分裂素的领域中也并不是一个惹人注意的工作。进行这个研究只是为了优化当时在 Skoog 实验室使用的烟草愈伤组织生物检测系统的培养基,以便于细胞分裂素的研究。



尽管这个配方在技术上是巨大成功的，而且在世界范围内广泛使用，但现在很少有人引用这篇文章时真的去阅读它。若现在真的去阅读它，读者可能会发现 Murashige 和 Skoog 在文章引言中所述的研究的背景和目的，真的令人惊讶 (Smith, 1989)!

## 9、脱毒快繁——从兰花到木本植物

1960 年，在一个比较专业的期刊——《美国兰花学会通讯》上, Georges M. Morel 发表了题为：“生产无病毒兰花”的论文。利用组织培养，消除兰花营养繁殖中的病毒感染，这是 Morel 最初的动机和目标——这也在题目中得到体现。利用离体培养技术进行珍贵植物的增殖，这种观点的产生和提出几乎是事后的想法。直到论文的结尾一段，他陈述了这个新的论点。他以一种谦逊的口吻陈述了他的重要发现，即“每个芽可以产生许多棵植株，因此，可以增多珍稀和贵重品种的苗木”。

早在三十年代,在 Rockefeller 学院的 Wendell Stanley 在进行烟草花叶病毒的生化成份的分析时，就是从植物根中获取病毒的，为了达到实验目的，则需要大量受感染的植物，以提供足够多的病毒。Stanley 与 White 熟悉，他们是同学院的同事，他曾向 White 建议，试着利用分离的茎在离体的条件下培育烟草花叶病毒。White 开始时在根基部组织中可以获得病毒的繁殖，但是，后来他注意到，如果是这些外植体的小尖端被用于再次培养,病毒将会被消除。Stanley 和 White 随后揭示了这意外发现的内在原因:病毒在根尖的分生组织细胞中不存在。后来,法国科学家证明了：茎分生组织的细胞中是无病毒区，越靠近分生组织的顶端，植物组织的病毒滴定度越低。Morel 总结说：在植物营养繁殖中，基尖的离体培养可能是消除病毒的有效手段。

Morel 和他的同事在四十至五十年代已经成功地完成了对石竹、大丽花和马铃薯的消除病原体的工作，应用分生组织培养技术，兰属植物可以避免全身性花叶病毒的感染，可以获得无病毒的克隆植株。

当然，Morel 的发明并不是凭空而来的，一些科学家为 Morel 的研究工作奠定了基础工作，前述的 Knudson 和其它的一些科学家建立了兰花的合适培养基。

创始茎尖分生组织培养繁殖的荣誉被归功于 Morel。当时，他工作于法国凡尔赛的国立农业研究所。在 1960 年发表的文章中，Morel 第一个提议应用离体培养技术进行营养繁殖，在理论上和实践上开辟了一条有商业吸引力的途径：在相对短的时间内，进行兰花的大量增殖，从而产生大量有商品价值的植株。

商业中兰花品种一般是杂合的，这种独一无二的结合所产生的一些优良的品种，其特征很少能通过种子进行传递，而应用营养繁殖，则可以维持品种的一致性，但是，分株法进行营养繁殖的速度很慢，在兰花上更是慢得出奇，而且，还要冒着受病菌(尤其是病毒)感染的危险。

带有许多腋生分生组织的幼嫩球茎，是离体培养中最好的外植体材料。将一个芽片分成 0.5~1 毫米的尖端分生组织，在进行离体培养时，每个外植体产生了数个原球胚或类似胚胎的东西，每个原球胚又能被分为四到八小块，一个月内，这些小块又可以发育成一个完整的原球胚，然后原球胚又可以被进一步地分块和培育，从而增加它们的原球胚的数量，最终再生成完整的植株。

Morel 建议说，应用组织培养技术，可以在大规模上获得兰花。在一年中的特定要求的时间里生产大量的质量好和颜色艳的兰花就容易了，因此，组织培养技术的应用变革了兰花生产。

Morel 在兰花繁殖上做的早期工作，和他后来利用 MS 培养基进行的开发和推广，有力刺激植物组织培养技术应用于大量观赏植物，随着兰花离体快繁技术的巨大成功，植物细胞组织培养技术被应用到别的类群的草本观赏植物的商业繁殖。

Morel 爱好植物和园艺工作。他似乎天生是一个植物学家，1973 年，Morel 刚 57 岁就逝世了，这位为植物生物技术的许多方面奠定了基础的科学家，过早地结束了他作为一个卓越科学家的生涯。可幸，他在文章中似乎只