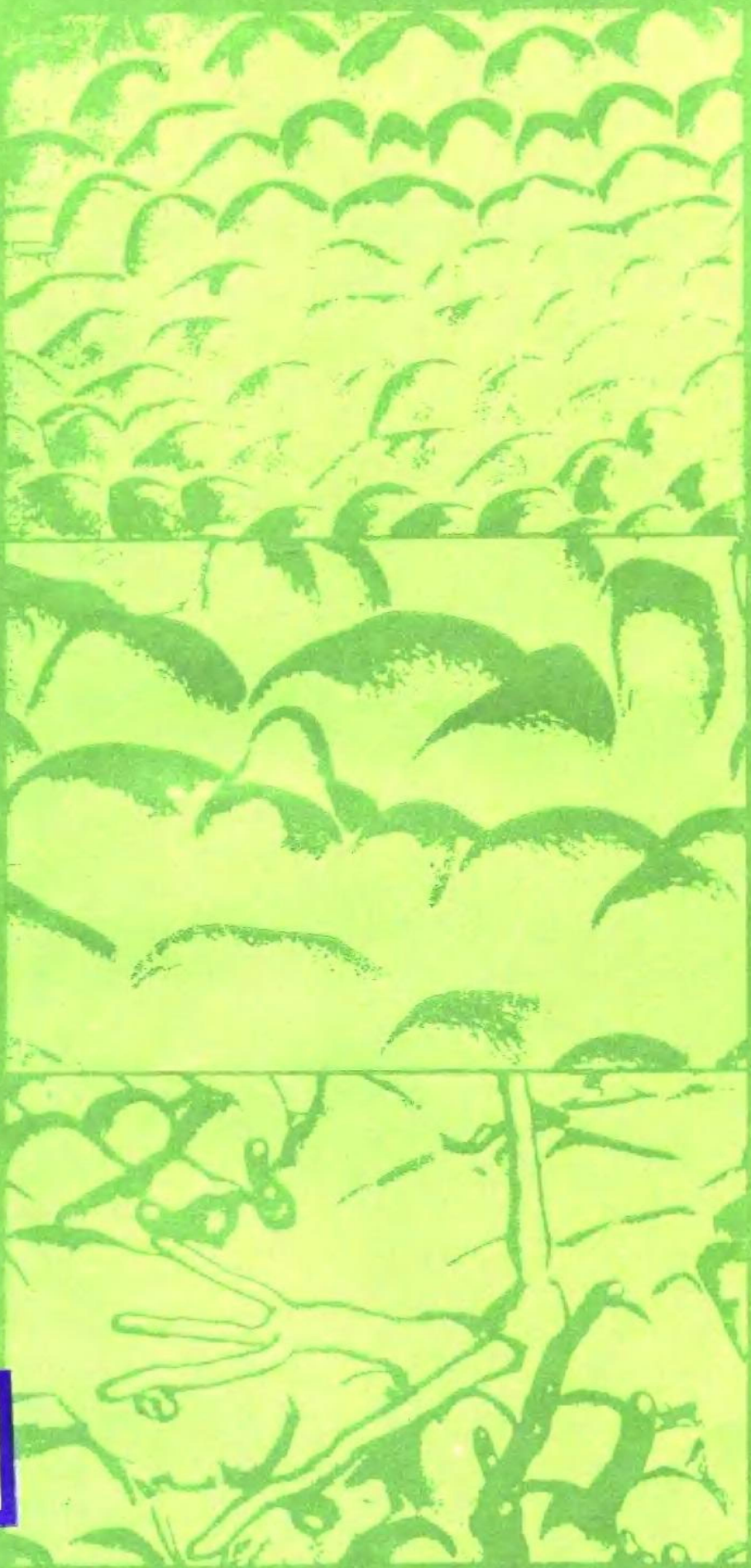




经济 植物 组织 培养

罗士韦 许智宏 主编

科学出版社

内 容 简 介

本书是罗士韦、许智宏邀请全国各地在组织培养技术方面有经验并在应用组织培养技术于生产实际方面作出一定成绩的科技工作者分别撰写成文的。全书共 29 篇文章,分为两部分。其中 13 篇文章为综述,分别阐述植物组织和细胞培养的技术,它们的超低温保藏及其应用;花药和花粉的培养;植物的试管受精以及十年来植物细胞杂交研究的进展等。另 16 篇文章为各论,分别介绍各种经济植物(如药用植物、甘蔗、苧麻、菊花、兰花、牡丹、罗汉果、无籽西瓜、菠萝、柑桔、桉树、杉木、泡桐、玉米及山茶科植物等)的组织培养技术。

本书可供从事细胞学、植物组织培养研究及应用此技术的生产单位的科技人员及大专院校生物系、农、林院校师生等参考。

经济植物组织培养

罗士韦 许智宏 主编

责任编辑 梁淑文

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1988 年 9 月第一版 开本:787×1092 1/16

1988 年 9 月第一次印刷 印张:15 1/4 插页 1

印数:0001—2,050 字数:355,000

ISBN 7-03-000480-9/Q.87

定价:8.90 元

本书常用缩写

IAA	吲哚乙酸
NAA	萘乙酸
2,4-D	2,4-二氯苯氧乙酸
2,4,5-T	2,4,5-三氯苯氧乙酸
KT	激动素
BA	6-苄基腺嘌呤
ZT	玉米素
2 ip	6-(γ,γ -二甲基丙烯基氨基)嘌呤或 N^6 -(2-异戊烯基)腺嘌呤
GA	赤霉素
CH	水解酪蛋白
LH	水解乳蛋白
YE	酵母提取物
CM	椰乳

目 录

植物组织和细胞培养的应用与展望	罗士韦(1)
植物组织和细胞培养技术	李文安 罗士韦(10)
花药培养和花粉培养	朱至清(29)
十年来植物细胞杂交研究的进展	夏镇澳(52)
植物的试管受精及其技术	叶树茂(61)
禾谷类植物的细胞培养和体细胞胚胎发生	王大元(73)
蔬菜作物组织培养的研究与应用概况	周荣仁(79)
果树的组织培养	王大元(100)
植物组织培养与植树造林(通过组织培养繁殖木本植物)	王怀智(105)
药用植物组织培养及其在工业生产上应用研究的进展	郑光植(116)
植物组织培养生产有用化合物的潜力与问题	何卓培(133)
药用植物——人参的组织培养方法	丁家宜(141)
甘蔗组织培养育苗和大田栽培技术	曾吉恕(153)
苧麻组织培养育苗方法及组培植株的大田经济性状观察	莫荣达 黄记生(160)
菊花名贵品种试管苗的培育	裘文达 李曙轩(164)
兰花的组织培养	王 熊(170)
牡丹的快速无性繁殖	
.....李玉龙 吴德玉 潘淑珑 徐少丽 卫志明 许智宏 李晓娟	(176)
罗汉果组织培养育苗及栽培技术	林 荣 王秀琴 王润珍(180)
无籽西瓜无性系繁殖及其生产试验	许智宏 卫志明 周士贤 王希林(186)
菠萝的组织培养育苗及栽培技术	林惠端 傅锡稳(192)
柑桔组织培养技术	孔 焱(196)
桉树的组织培养方法	欧阳权(200)
桉树试管苗的移栽及造林	彭海忠(202)
几种山茶科植物的组织培养育苗及栽培技术	颜慕勤 陈 平(205)
杉木的组织培养育苗	阙国宁(210)
泡桐的离体培养	姜国武 林证明 郭达初(216)
玉米单倍体育种及其大田生产性状	吴甲林(221)
植物组织和细胞的超低温保藏的研究概况	唐 惕(227)
植物细胞解壁酶——EA ₃ -867 纤维素酶的制备	叶桂珍 徐竹筠(236)
编后记	(240)

植物组织和细胞培养的应用与展望*

罗 士 韦

(中国科学院上海植物生理研究所细胞生理室)

本文是植物组织和细胞培养在应用方面取得的成就的综述。因为题目涉及的内容广泛,我仅把报告的内容限于下列八个部分。

一、花药培养与单倍体育种

自 1964 年 Guha 和 Maheshwari 报告了从曼陀罗(*Datura*)首次成功地诱导出单倍体植株以来,在花药及花粉培养和单倍体育种这一领域里做了大量的工作^[1-5]。在过去的二十年中,在这些问题的各个方面,所得到的结果是如此之多,因而不可能在这里都加以引述(这些方面包括:细胞学与超微结构;分化和生物化学;花药培养技术特别是游离花粉培养技术的改进;单倍体植株和纯合植株在单倍体育种中的利用等)。

据 Maheshwari^[1]的统计,已有 23 科、52 属、160 多个种得到花粉或单倍体植株。

大多数用单倍体育种技术得到的纯合植株只具有理论上的重要性。就我目前所知,这是因为诱导所得的单倍体植株之中,农艺上有价值的基因型出现的频率比人们所预期的要低得多。这也就是为什么用单倍体育种得到的实用的栽培品系非常少的原因。据我了解,下列栽培品系据称是有用的(表 1)。此外,利用染色体消除并结合胚培养,以及用未受精子房培养来得到单倍体也已取得进展^[8,8a]。

表 1 据称从单倍体育种所得到的栽培品系

植物名称	作者国籍、姓名	年份
石刁柏	法国 C. Dore	1977[7]
马铃薯	联邦德国 Wenzel	1976[4]
油菜	联邦德国 Wenzel	1976[4]
小麦	联邦德国 Wenzel	1976[4]
油菜	加拿大 Keller & Stringman	1978
烟草 田间应用	苏联 Sarutchev	1971[6]
水稻 田间应用	苏联 Kutcherenko	1977[6]

二、离体无性系的繁殖

自本世纪 50 年代以来,将无性系繁殖应用于实用的工作已在全世界开展起来。现在,有多得不可计数的材料得到了无性繁殖系,要对此作一精确的数字估计是颇为困难的。如英国 Kew 皇家植物园,在过去的七年中,就经手过 4000 种以上不同的无性繁殖系

* 本文承何卓培同志对发表在植物生理学通讯 1983(2):1—6 上的同名文加以补充和修改,附此致谢。

材料(A. Woods, 私人通信)。Morel(1960)在兰花(*Cymbidium*)上的先驱性工作推动了今天兰花工业的发展。据 Rao^[9]和 Arditti^[10]的统计,可以用无性系繁殖的兰花已有 66 个属,但在园艺上实际应用的还只是少数。用于切花的主要兰花有:石斛(*Dendrobium*),兰花(*Cymbidium*),卡德兰(*Cattleya*),飞燕兰(*Oncidium*),万带兰(*Vanda*),*Aranda*,蜘蛛兰(*Arachnis*)和少数其它兰花。事实证明兰花工业不仅在发达国家是有利可图的,而且也已在东南亚国家发展起来(表 2)。

(一) 观赏植物

除兰花外,还有很多种的观赏植物也已成功地得到了无性系,名录正在日益增加。粗略估计有 600 个以上的种已得到了无性系^[12]。其中有相当一部分无性繁殖后,由苗圃作为花卉与观赏植物供应市场,如用作装饰的蕨类植物,以及在世界上居于首位的菊(*Chrysanthemum*)和康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)。

表 2 组织培养无性系的繁殖

植物名称	科、属、种数	作者及年份
兰花	66 属	Hughes 1981, 王熊 1982
蕨类	9 科 17 种	Hughes 1981
果树	28 科	Skirvin 1981
农作物	46 种	Conger 1981
树木	28 科 99 种	Mott 1981, 王怀智 1982
蔬菜	39 种	Botteno 1981, 周荣仁 1982

(二) 经济植物

经济植物中包括林木、果树、油料作物,蔬菜和许多可食用的作物已得到了无性系并应用于实际。如桉树(*Eucalyptus*),油棕,油茶(*Camellia oleifera*),草莓,石刁柏(*Asparagus*)等。木本植物已有 28 科约 99 种得到了无性繁殖系,其中有 74 个种是通过胚状体途径再生的。

在最近的 10 年中有 100 多个机构用组织培养技术繁殖各种各样的植物来进行商品生产。

在许多观赏植物、蔬菜和果树中用试管繁殖的方法对杂合的、有性不亲和的和不育的基因型繁殖是特别有价值的。它的便利之处是非常清楚的,如新杂种的快速繁殖;从受感染的原种和其他有病的植株除去病毒;常年繁殖无性系;繁殖大批遗传性状一致的亲本以供大规模的杂交制种;马铃薯变种的原生质体无性系(protoclones);常规方法繁殖有困难的物种;感病或将要死亡的材料的“挽救”;繁殖稀有的和有灭绝危险的物种等方面。

在离体无性系的繁殖方面,我想提醒所有从事试管植物推广的人们注意防止病毒与其他疾病的传播。R. A. de Fossard 说:“我们在大量繁殖之前,对所用的无菌材料都应作适当的微生物试验”。也就是说应该遵守严格的检疫规则。通过用指示植物、电子显

显微镜和精细的血清学试验检出主要由病毒或真菌致病的植株并从培养物中根除病原。

三、从植物组织培养得到的突变体

早就知道育种工作者从农作物、果树、特别是花卉植物中选择自发突变或人工诱发突变的突变体。然而在最近的二十年中,人们发现了细胞与组织培养这一更为便利的技术。已经知道植物细胞和组织的培养过程同时往往也伴随着基因型的变异。因此,可以有意地从培养物中选择突变细胞。从甘蔗中筛选出抗眼点病和抗斐济(Fiji)病毒病的两个众所周知的抗病突变体^[23],已应用于实际。

Maliga(1978)在加拿大举行的第四届会议上详细综述和讨论了抗性突变体的问题。此后,在高等植物组织培养中筛选突变体的研究有了相当的发展。现在,在细胞和组织培养的水平上,至少又在14种植物中筛选出了31个表现型(包括营养缺陷型)。其中有14个再生了植株,5例报道了所选择的性状能经有性过程传递^[24-29]。这些突变体在理论研究中都有意义,为原生质体融合和遗传操作并导致作物的改良提供了可以利用的材料。在此把所讲的内容限制于从有抗性的细胞株再生的高等植物。这方面的最新成就见表3。

表3 从有抗性的细胞系再生的植物

种 名	表 现 型	作者及年份
油菜	抗蔬菜茎点霉病*	Sacristan, 1982
烟草	抗异烟肼*	Berlyn, 1980
野生烟草 (<i>Nicotiana sylvestris</i>)	抗链霉素*	Maliga, 1981
野生烟草	抗 AEC, 积累游离赖氨酸, 具有被改变的二氢二吡啶羧酸合酶*	Negrutiu 等, 1981
玉米	抗(lys+thr), 积累游离苏氨酸*	Hibberd 等, 1982
胡萝卜	抗 5 FU	Sung, 1980
烟草	抗链霉素	Umtel, 1979
烟草	抗 NaCl	Nabors 等, 1980
烟草	抗氧赖氨酸, 赖氨酸积累	罗士韦等, 1982
水稻	抗 AEC, 赖氨酸和蛋白质积累	Schaeffer 等, 1981
水稻	抗海水	Yamada 等, 1981
马铃薯	抗马铃薯疫霉病	Behnke 等, 1980

* 能通过有性过程传递。

四、植物细胞遗传工程

仅仅是在最近的几年中,遗传工程的风暴冲击了农业或植物科学。科学家用原核生物作材料已能进行基因操作,并进一步加以应用,目的在于医学和药物市场,如有可能用来生产干扰素、胰岛素等。科学家特别是专业家预见到将来植物细胞遗传工程(农业遗传学)的可能作用,在这类研究中正在试图利用作物,特别是从谷物来的细胞,甚至原生质体来代替在目前仍然是遗传工程最重要对象的细菌。在不多的几年中,大西洋的两岸出现了一百多个公司。BSERC 公司估计,在将来的10年中,英国在生物工程方面将需要1000多个大学毕业生和4000个经过训练的技术员。他们的最终目的是着眼于改良谷物和增

加产量——也就是所谓的第二次绿色革命。这对遗传学家、生物化学家特别是进行植物细胞和组织培养的植物细胞生物学家确实是一个富有想象和有吸引力的目标。

看来在这一领域中正在作巨大的努力。但就我所知在从事这一课题的人们面前的最大困难是缺乏适当的载体。人们现在正在试用花椰菜花叶病毒(CaMV)、Ti-质粒,新近也在试图利用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)的有致病力的质粒等。总的看来至今全世界在这方面的工作成就还很少。Timothy Hall 在美国威斯康星宣称将菜豆蛋白基因导入向日葵细胞。联邦德国科隆大学的 Jeffrey Shell 做了大量工作,试图从 Ti-质粒得到能将基因导入植物的载体,但用 Ti-质粒将基因导入另一植物时,时常同时带入冠瘿肿瘤基因。加利福尼亚的 James Bonner 说:“现在已可随意地从遗传基因文库将基因从一个植物种导入到另一个植物种。但还没有解决的问题是:从一种植物导入到另一种植物的基因是否能在合适的器官和适当的时间表达”。最近,在美国农业部(USDA)Beltsville 试验站就“植物遗传工程改进农业——今天的挑战”为题举行了讨论会。

就我现在所知,在我们能得到任何有理论和实践重要性的明确结果以前,首先要做大量的工作。人们尤其期待能将固氮的 Nif-基因导入谷物并能固氮。希望这一设想能在将来获得成功^[30-35]。

五、植物组织培养物的低温保存和基因库

在畜牧业中将精子保存在液氮中已是一种常规技术,现在也试图对植物材料进行同样的处理以保存种质。所用材料,从非细胞结构(如质体,DNA)、原生质体、细胞、组织到有高度结构的器官如茎尖与小植株。重点放在用营养繁殖和难于产生种子的一些种,如薯蓣(*Dioscorea*)(它的块茎很容易变质),可可(*Theobroma cacao*)(味道好的种子也易于变质),三叶橡胶(种子生命周期很短)和许多其他材料,或者那些有价值 and 存活时间短暂的培养系统,象原生质体、培养的细胞或愈伤组织以及花粉,它们通过周密的处理能根据需要保存一段时期而不改变。还有那些通过组织培养得到的去除亚稳态病原体的种质也值得保存,以便进一步利用^[36]。

冰冻干燥被广泛地在微生物学中使用,但这一技术不能应用于高等植物的组织培养物。唯一可能的选择是冰冻保存—储藏在液态氮的低温下。很少有材料本来就能忍受液氮(-196°C)这样极端的低温。因此,化学冰冻保护剂(二甲基亚砷、甘油和蔗糖等或它们的混合物)和适宜的冰冻与融解过程是两个必要条件。已有表列出了冰冻保存方面到目前为止的工作^[37,38]。看来这一新领域正在非常迅速地发展。希望在不久的将来能建立真正的基因库或有价值的基因文库。

六、原生质体培养和体细胞杂交

1960年 Cocking 用纤维素酶处理番茄幼苗的根分离得原生质体。时至今日,从原生质体培养可再生植株的材料约近 70 种。这项技术的发展可以利用于:

1. 直接用于改良作物的栽培品系或食品加工。例如,Shepard(1980)从马铃薯叶肉原生质体细胞克隆再生植株群中表现出的有益变异,筛选出抗马铃薯早疫病的无性系,并

已在大田试验。Pais 等(1983)研究把 *Sylibum marianum* 的原生质体用来使牛奶凝结, 据称比用蛋白酶更为便利。

2. 进行体细胞杂交研究, 希望克服有性杂交不亲和性或转移母性遗传性状。1972 年 Carlson 首先把粉蓝烟草与朗氏烟草通过原生质体融合得到种间体细胞杂种(*Nicotiana glauca* $\otimes$ *Nicotiana langsdorffii*)植株。十年来, 全文发表能得到再生植株的(包括我国的工作)种内杂种有 8 例, 种间杂种 32 例, 均以茄科为主, 其中烟草属占过半。大多数种间杂种可以通过回交或自交得到后代。观察到后代性状的分离有偏离孟德尔定律的现象。至于细胞质遗传在后代的情况是复杂的。有的报告, 线粒体或叶绿体的 DNA 之间都有重组存在; 有的指出, 杂种的叶绿体有的是两亲本的嵌合体, 有的只有一个亲本的叶绿体。至于属间杂种, 从 Melchers 等 1978 年报告得到番茄 $\otimes$ 马铃薯开始, 至今有 8 例, 也是以茄科为主^[50]。但未能获得能育的植株。属间杂种细胞内染色体在数量和结构上都往往发生变化。而科间, 只有得到杂种细胞系, 至今未能得到再生植株。往往是一方亲本的染色体被排斥直到排除干净, 并出现有大量畸形染色体。

3. 原生质体作为一个单细胞系统是研究多种细胞生物学的基本问题的良好实验材料。例如基因结构, 核质关系, 筛选突变体和植物基因工程研究中作受体^[35]。

七、植物组织培养生产有用化合物

自从 1950 年 Arreguin 和 Bonner 报告了培养橡胶茎愈伤组织以来, 至 1980 年, 已有植物组织培养能产生 50 多类化合物及其中有 28 类有可能成为产品的介绍。在植物组织培养物中积累量等于或超过其原植物产量之化合物, 近来报告已达 30 种以上, 其中包括人参皂苷、迷迭香酸、蒽醌、辅酶 Q-10 和小檗碱等^[51]。在日本, 黄连原药材要进口。日本京都大学农化系山田等和 Fukui 等 1982 年报告, 得到稳定、高产小檗碱和生长迅速的日本黄连(*Coptis japonica*)细胞系。据说他们将进行中间性试验。

除了能产生原植物含有的天然化合物之外, 植物组织培养物还能够作生物转化和产生原植物不含有的化合物。联邦德国蒂宾根(Tübingen)的 Reinhard 实验室从植物组织培养选出的毛花毛地黄(*Digitalis lanata*)细胞系, 其悬浮培养物能将毛地黄毒苷(digitoxin), 通过在 C-12 位置羟基化, 几乎全部转化成更有医药价值的地谷辛(digoxin)。他们已进行了 300 升罐的中间性试验。

八、中国的植物组织和细胞培养工作

早在 30 年代初, 我国两位已故的著名教授罗宗洛和李继侗就已经是远东植物组织培养的先驱者。罗宗洛教授研究离体根尖培养的适宜条件, 李继侗教授发现了胚乳提出物对离体胚发育的促进作用。从 30 年代以来, 只是由于那些意外的和不必要的干扰, 我们的组织培养工作才被迫一再中断。然而, 1976 年我们终于迎来了科学春天的黎明, 我国的同行在植物组织培养研究工作中一直在加紧努力, 并已取得迅速的进展。由于篇幅所限, 我只能介绍近年来的主要成就^[39]。至于在台湾的同行的工作, 在另文介绍。

(一) 花药培养和单倍体育种

改良的 N_6 花药培养基^[40]和马铃薯培养基^[41]在别的国家已广泛地用来进行花药培养。此外,还发现了一个适于花药与花粉培养的条件培养基^[42]。大约有 24 个种的花粉植株是首先在中国得到的。下表列的是我国同行近两年宣称用花药培养得到的作物品系(表 4)。

据我目前所知,虽然花药培养与单倍体育种曾一度被认为是育种技术的捷径,但是由于有用的基因组的产生频率是如此之低,还不能认为可以取代常规育种。无论如何,我们有如此之多的同行在单倍体育种方面进行研究,试图创造新的和有实用价值的变种和品种,特别是在禾谷类作物方面^[43]。我们期望他们在这一领域里取得成功。另外,我们还开展了试管受精和胚培养的实验。

表 4 据称用单倍体育种方法得到的作物新品系(中国)

植物名称	作者及年份
小麦:京单 2288	胡道芬等,1982
水稻:79—66	赵成章等,1981
水稻:79—30 滇花 1 号	胡忠等,1981
水稻:南花 11 号	吴晓煜等,1982
三叶橡胶(<i>Hevea brasiliensis</i>)	陈正华等,1980
	王泽云等,1980

(二) 离体无性系的繁殖

据粗略估计,已有约 100 个植物种建立了离体无性系。其中有少数已被应用于实际栽种,如马铃薯(“去病毒”)、甘蔗、桉树、油茶、罗汉果(*Momordica growenosi*)、苧麻(表 5)。此外,一些有价值的经济植物如兰花、杉树、杨树,梓树和银杉等也得到了无性系。已建立无性繁殖系的植物名录,由于太多,因此不在这里引用了。

表 5 离体无性系的繁殖(中国)

植物名称	地 区	作 者
马铃薯(“去病毒”)	中国北部和东北	殷蔚慈等,吴秀珠等
甘蔗(胚状体)	广 西	曾吉恕等
桉树(胚状体)	广 西	彭海忠等
罗汉果(器官发生)	广 西	林 荣等
菠萝(器官发生)	广 西	林惠端等
菊(器官发生)	杭 州	李曙轩等
花椰菜(器官发生)	杭 州	李曙轩等
白菜(器官发生)	杭 州	李曙轩等

(三) 从植物组织培养得到的突变体

直到 1977 年,我们才开始从组织培养的高等植物材料中筛选突变体^[3]。过去的 4 年

中,企图从烟草、石刁柏和马铃薯等培养的体细胞中筛选对某些必需氨基酸类似物有抗性的细胞系。目前,我们已从烟草愈伤组织成功地得到了抗 4-氧赖氨酸的突变细胞系,它的赖氨酸含量高于亲本^[44,45]。从突变细胞再生了植株,突变细胞系的那些不同于亲本的、所选择的特征能传递到第二级愈伤组织^[46,47]。最近,又建立了抗正亮氨酸的单倍体烟草突变细胞系,它的游离蛋氨酸含量高于亲本。也再生了植株^[47]。还有中国科学院遗传研究所和中国科学院植物研究所用水稻和甘蔗体细胞筛选耐盐和高糖突变体的试验正在进行。

(四) 植物细胞遗传工程

我们现在有三组科学家在进行这方面的工作,它们是北京的中国科学院遗传研究所、在上海我们的细胞生理实验室以及中国科学院昆明植物研究所。

(五) 原生质体培养和体细胞杂交

许智宏等发现,用萌发了 1—3 天苜蓿种子的胚根分离原生质体,可以通过胚状体而得到小植物^[48]。王大元从紫狼尾草(*Pennisetum purpureum* Schum.)的原生质体获得胚状体和植株。另方面,正式报告得到再生植株的体细胞杂种,有:王培田等(1981),中国农业科学院烟草研究所(1981)和赵世民等(1982)三组作者分别报告的烟草⊗黄花烟草。李向辉等(1982)报告的烟草瘤 B6S3 ⊗矮牵牛 W43 和孙勇如等发表的粉蓝烟草⊗矮牵牛^[49,50]。

(六) 药用植物组织培养

自从 1964 年我们报告建立了人参愈伤组织培养,到现在我国约有 30 多个单位开展药用植物组织培养的研究。目前,已建立了罗汉果(*M. growenosi*)的试管苗无性系,可用于快速繁殖;应用组织培养怀地黄,可望解决植株去病毒问题;以及人参组织培养的工业化生产的中间性试验等均取得了可喜的进展。此外,还对三七、三分三、人参属植物、青蒿、番红花、元胡、薯蓣、贝母、石斛、薯蓣、重楼、天麻、紫背天葵、太白米和黑节草等多种药用植物的组织培养进行了应用基础的研究^[51,52]。

九、结 束 语

在过去的二十年中,植物组织和细胞培养的工作是富有成效的并正在很好地应用来造福人类,特别是在离体无性繁殖和从组织培养得到了可用于植物细胞遗传和育种工作的各种有用的材料方面更是如此。我希望植物细胞遗传工程、单倍体育种和体细胞杂交以及从植物组织培养物中得到天然产物诸方面将有大的进展。

应用植物组织和细胞培养技术的鼓舞人心的可能性还仍然有待于开拓。我们可以预见在不久的将来这一领域的繁荣与巨大成功。

参 考 文 献

- [1] Maheshwari, S. C. *et al.*, 1980, *Theor. Appl. Genet.*, 58: 193—206.
- [2] Sunderland, N., 1979, Guidelines in the Culture of Pollen *in vitro*. In: *Tissue Culture Methods, Plant Pathology*. Conf. I. D. Stanley (eds), Oxford Press.
- [3] Hu Han *et al.*, 1981, *Adv. Agron.*, 34: 1—13.
- [4] Wenzel, G. 1980 Anther culture & its role in plant breeding. In: *Symp. on Plant Tissue Culture, Genetic Manipulation & Somatic Hybridization of Plant Cells*. Bombay, Bhabha Atomic Res. Centre.
- [5] Nitsch, C., 1977, *Applied & Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, & Organ Culture*. J. Reinert & Y. P. S. Bajaj, (eds), Springer-Verlag, Berlin, pp. 268—278.
- [6] Butenko, R. G., 1982, 私人通讯.
- [7] Dore, C. 1977, *Acta Horti*, 78: 89—93.
- [8] Kasha, K. J. & E. Reinbergs, 1981, In: *Barley Genetics 1981*, pp. 655—665.
- [8a] Yang, H. Y. & C., Zhou, 1982, *Theor. Appl. Genet.*, 63: 97—104.
- [9] Rao, A. N., 1977, 私人通讯, 5. pp. 44—69.
- [10] Arditti, J., 1982, 私人通讯, 1977, *Orchid Biology*, Cornell Univ. Press, Ithaca.
- [11] Conger, B. V., 1981, *Clonal Agricultural Plants via in vitro Techniques*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- [12] Murashige, T., 1977, *Plant Tissue Culture & Its Biotechnological Application*. W. Barz E. Reinhard, & M. H. Zenk, (eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 392—403.
- [13] Bonga, J. M., 1980, *Plant Cell Culture: Results & Perspectives*. I. Vasil, (ed), pp. 253—264.
- [14] Afocel, 1979, *Micropropagation d'arbres Forestiers*. Ass. Foret-Cellulose-Domaine de Letancon.
- [15] Eriksson, G. & K. Lundkvist, 1981, *Symposium on Clonal Forestry*. Uppsala, Sweden.
- [16] Howland, G. P. 1981, *Eucalyptus Plantation*. Biomass Energy System, Inc.
- [17] Round-Table Conference 1978, "In vitro" Multiplication of Woody Species. CRA Gembloux.
- [18] Karnosky, D. F., 1981, *Bioscience* 31: 114.
- [19] Pierik, R. L. M., 1979, *in Vitro Culture of Higher Plants*. Ponsen en Looijen.
- [20] Proc. of the Conf. on Nursery Production of Fruit Plants through Tissue Culture—Application & Feasibility. USDA 1980.
- [21] Programme, Intern. Workshop on *in vitro* Cultivation of Forest Tree Species. Colloque Organisé avec la Collaboration de LAFOCEL. (Assoc. Foret Cellulose). France, 1981.
- [22] Kako Seiji, 1978, *Tissue Culture of Horticulture Plants*.
- [23] Larkin, P. J. & W. R. Scowcroft. 1981, *Theor. Appl. Genet.*, 60: 197—212.
- [24] Thomas, E., P. J. King, & I. Potrykus, 1979, *Z. Pflanzenzüchtung*, 82: 1—30.
- [25] Maliga, P. 1980, *Int. Rev. Cytology Suppl.* 11 A. Perspectives in Plant Cell & Tissue Culture. I. K. Vasil (ed.), Academic Press. N. Y., pp. 225—250.
- [26] Shaeffer, G. W. & F. T. Sharpe, 1981, *in Vitro*, 17: 345—352.
- [27] Hibberd, K. A. & C. E. Green, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79: 559—563.
- [28] 罗士韦, 何卓培, 1982, *细胞生物学杂志*, 4(2): 1—9.
- [29] Ingram, D. S. & J. P. Helgeson, 1980, *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*. Oxford, Blackwell.
- [30] Old, R. W. & S. B. Primrose, 1980, *Principle of Gene Manipulation*. Blackwell Scientific Publications.
- [31] Cocking, E. C. *et al.*, 1981, *Nature*, 293: 265—270.
- [32] Fox, J. L. 1981, *Chem. Engineer. News* 59: 33—44.
- [33] Leemans, J. *et al.*, 1981, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1: 149—164.
- [34] Mary-Dell, C. *et al.*, 1982, *Nature*, 295: 432—434.
- [35] 罗士韦等, 1982: *细胞生物学杂志*, 4(4): 1—9.
- [36] Bajaj, Y. P. S. & J. Reinert, 1977, In: the same book as ref 5, pp. 757—777.
- [37] 罗士韦, 唐 惕, 1983, *细胞生物学杂志* 5(1): 1—7.
- [38] Withers, L. A. 1982, *Germplasm storage in plant. biotechnology*. In: SEB Seminar Series

on Plant Biotechnology.

- [39] 罗士韦, 1979, 自然年鉴, 1: 54—77.
- [40] Chu Chihching *et al.*, 1975, *Sci. Sinica* 18: 659—668.
- [41] Chuang Chiachum *et al.*, 1978: Proc. of Symposium on Plant Tissue Culture, (Peking). Science Press, Peking. pp. 51—56.
- [42] Xu, Z. H. *et al.*, 1981, *J. Exp. Bot.*, 32: 767—778.
- [43] 胡 含, 1982, 植物生理学通讯, 3: 1—7.
- [44] 何卓培等, 1980, 植物生理学报, 6: 213—219.
- [45] 徐竹筠等, 1982, 实验生物学报, 15(2): 131—136.
- [46] Loo, Shihwei *et al.*, 1982, *Scientia Sinica B*(7): 423—429.
- [47] 何卓培等, 1984, 实验生物学报, 17(2): 171—176.
- [48] Xu, Z. H. *et al.*, 1982, *Z. Pflanzenphysiol.*, 107: 231—235.
- [49] 李向辉等, 1982, 中国科学, (B辑), 3: 233.
- [50] 夏镇澳, 十年来植物细胞杂交研究的进展, 本书.
- [51] 何卓培, 植物组织培养生产有用化合物的潜力与问题, 本书.
- [52] 《全国第一次药用植物组织培养讨论会论文集》1983, 中国植物生理学会细胞生理专业组, 江苏省植物生理学会编印.

植物组织和细胞培养技术*

李文安 罗士韦

(中国科学院上海植物生理研究所)

植物组织和细胞培养是指用无菌培养方法,在人工制备的培养基上培养植物的一个离体部分、组织或细胞,包括根、茎、叶、花、果实、种子、胚、胚珠、子房、花序、花药、花粉,甚至无菌短枝扦插和种子繁殖等等。这些离体的器官、组织、细胞在无菌条件下培养不断生长并经过转移,能够一代一代地连续生长下去^[2]。在植物细胞的全能性被证实以后,利用植物组织和细胞培养技术、尤其培养的组织或细胞可以再生成植株,至今已有六百余种植物^[3]。这已成为试管苗繁殖及利用培养的植物细胞进行遗传操作的实验基础之一。然而,植物组织培养工作,在很大程度上仍带有经验性。不同的植物培养材料,往往有不同的最佳培养方法(包括不同的培养基和操作程序),而并无完全统一的规范可循。但就其基本技术而言则大致相同。植物组织和细胞培养的关键是无菌操作。本文将着重介绍这一技术的基本原则及操作程序。

一、植物材料的灭菌和取用方法

植物的培养材料均采集生长于外界的植物,植物体的外表会带有各种微生物。一般健康的植物体内是无菌的,只需进行表面消毒。如不消毒,外植体上的微生物在适当的培养基上会很快地繁殖,影响离体组织的生长。培养材料消毒处理的目的是获得无菌的仍保持着生命活力的外植体。

(一) 培养材料的灭菌

为使培养的材料既无菌又保持生命活力,可根据不同的植物种类及所选用的器官或组织的类型,选择不同的消毒剂、消毒时间及程序。

理想的消毒剂应具有杀菌力强、易于清除,而又不伤害外植体等性质^[2]。常用的次氯酸盐如漂白粉(或漂白精片)能分解成具有杀菌效能的初生态氯原子。如果浓度适中,外植体一般不会受伤害。70%酒精也是具有杀菌能力,并易挥发的药品。但由于有较强的渗透性,灭菌时间不宜过长。外植体表面有伤口时,易受损伤,故使用时应予以注意。氯化汞是杀菌力极强的消毒剂,其缺点是不易被除尽,又易伤害材料,故需用大量水反复冲洗,甚至有时用水冲洗4—5小时方能除尽残留的药剂。其他消毒剂如过氧化氢、溴水也可用以表面消毒,但不易保存,久存易丧失杀菌效果,故需注意保存方法。

具体消毒程序:

* 本文承陈乃先同志协助摄影,特此致谢。本文文献到1983年为止。

(1) 外植体用清水漂洗,洗去灰尘。如材料表面带有绒毛,可用皂液或吐温(tween)洗涤,再用清水洗去皂液。

(2) 用滤纸吸干表面水分后浸于70%乙醇中15—30秒。

(3) 再浸入消毒剂5—20分钟或更长时间。

(4) 取出后用无菌水冲洗3—4次。滤纸吸干备用。

由于外植体的种类不同,消毒剂种类和程序,以及消毒的时间各不相同,须在实际操作中探索适宜的程序。

据我国已发表的论文,各种外植体所用消毒剂和程序列于表1。表2—4所列出的是不同植物材料用不同种类的消毒剂时所需的时间。外植体表面如凹凸不平,使消毒剂不易均匀接触各部位,可用真空减压渗入法,消毒效果较好。表面光滑的材料,或者如花药、髓部组织等位于内部的外植体,只需用乙醇擦洗材料外部即可。

(二) 植物材料的取用方法

表1 国内常用的消毒剂及程序^[4-16]

类别	植物种类	消毒前	消毒	消毒后
种子	小黑麦	0.1%SLS*, 10分钟水洗	70%乙醇, 15秒; 0.1%HgCl ₂ , 10—15分钟	水洗
	西瓜	水洗(剥去种壳)	0.1%HgCl ₂ , 10分钟	水洗
	水稻	剥去种壳, 水洗	3%有效氯, 30分钟以上	水洗
	豆粒	水洗	3%有效氯, 15—30分钟	水洗
果实	油茶	去果皮	70%乙醇, 2分钟; 0.1%HgCl ₂ , 10分钟	水洗4—6次
幼茎	甘蔗	—	70%乙醇擦外鞘	剥去外鞘
叶	水稻(花药)	—	70%乙醇擦外鞘	剥去外鞘和护颖
花药	莴苣(茎)	水洗	70%乙醇, 两端切口火灼	取中部组织
成年茎、叶	烟草(叶)	水洗, 吐温液内浸泡5—10分钟	70%乙醇浸2秒, 3%有效氯10—15分钟	水洗4—5次
	泡桐种苗	水洗	70—75%乙醇30秒, 0.1%HgCl ₂ , 3—5分钟	水洗4—6次
	地钱	水洗	15%H ₂ O ₂ , 5—7分钟	水冲洗
根	胡萝卜(根)	水洗	75%乙醇擦, 3%有效氯15—20分钟	水冲洗, 取中部
鳞茎	百合(茎)	水洗	两次3%有效氯液体浸15—20分钟	水洗
茎尖	兰花	剥出茎端	0.1%HgCl ₂ , 水冲洗, 漂白粉液15分钟	水洗

* SLS——十二烷基磺酸钠。

表2 过氧化氢(H₂O₂)消毒的最适时间^[1]

浓度	材料种类	时间(分钟)
10—12%	干燥种子	10—12
	水浸后种子	6—8
	茎切段	8—10

表 3 不同植物于漂白粉液中的消毒时间^[4]

浓度(%)	植 物 材 料	杀 菌 时 间
9	肉质根(胡萝卜, 菊芋)	20—25 分钟
	草本茎、芽(烟草, 向日葵)	5—10 分钟
	木本茎、枝(蔷薇)	15—30 分钟
5	茎生长点、展开叶	15 分钟
	羊齿类孢子	20 分钟
3	种子: 萝卜	30 分钟
	羽扇豆	3 小时
	豌豆	4.5 小时
	菜豆	5 小时
	玉米	8 小时

表 4 0.1% 升汞(HgCl_2)灭菌的最适时间^[4]

植 物 材 料		时 间(分钟)	结 果
叶	浮 萍	0.5	充 分
顶芽	紫 苏	3	良 好
	羽 扇 豆	4	良 好
	大 豆	15	良 好
	烟 草	12	充 分
	番 茄	1.5	良 好
	牵 牛 花	1.5	良 好
	马 铃 薯	3	充 分
	小 麦	2	充 分
茎	烟 草	8	充 分
	向 日 葵	6	充 分
肉质根	胡 萝 卜	15	充 分
	菊 芋	15	充 分
种子	小 麦	10—20	良 好
	豌 豆	8	充 分
	萝 卜	8	良 好

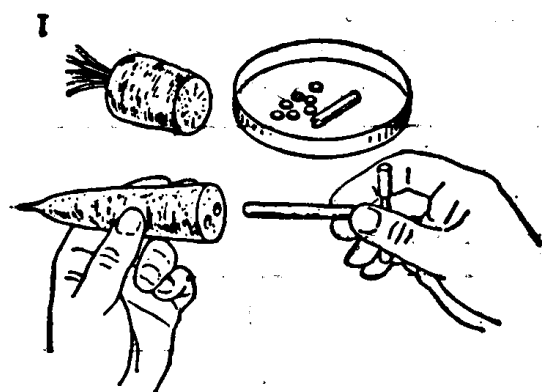


图 1 用打孔器由胡萝卜贮藏根内部取出无菌组织块

为取得均匀一致的培养材料,切取时尽可能取相同部位。取材的部位大小以及植物的生理状态都会影响培养的效果。不同材料的具体取用方法如下:

(1) 块根,块茎的取样方法 将已消毒的材料横切后,再用灭菌钻孔器直插入组织,取出圆柱状组织块,再用组合刀切成相同厚度的组织块(图 1)^[4]。

(2) 树木形成层的断面取材方法 选择树干健康部位,先用水洗净树皮,再用 70%乙醇表面消毒,然后用刀刮去一层表皮,露出形成层部位,用利刀将露出的剖面切成相同大小的方

块,取下即可。也可以将树皮剥下,在其内面再用刀切取小块(图 2、3)^[4]。

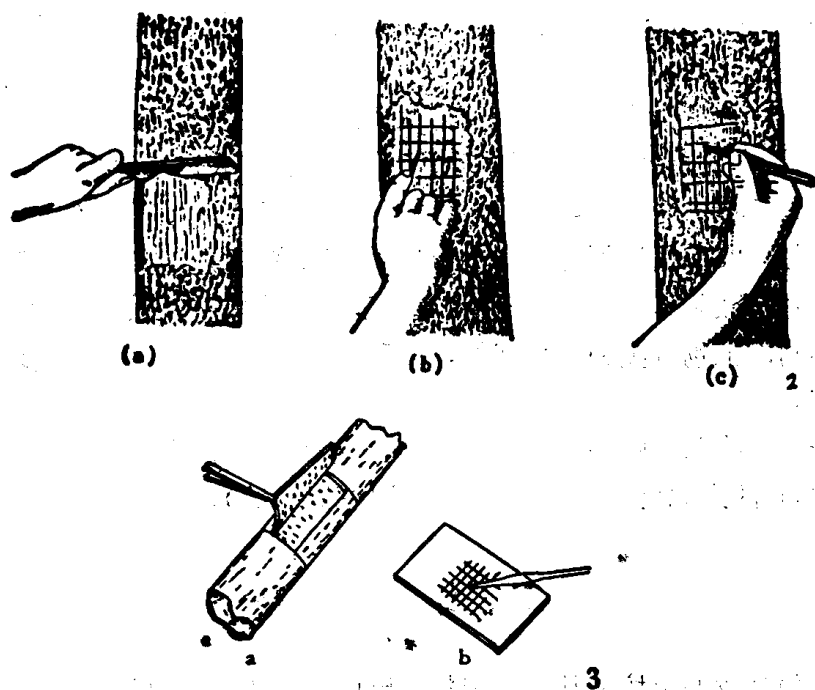


图 2.3 木本植物的形成层的切取方法

(3) 无菌苗的材料取用方法 种子消毒后于无菌培养基上萌发,长成幼苗,取所需部位,如根、子叶、幼芽、上胚轴或下胚轴等进行培养。

(4) 外植体大小 最初培养用的外植体大小,大多根据原来植物材料的形状而定,太小则不能产生愈伤组织。一般情况下外植体大小多为数十毫克至百毫克。植物种类繁多,外植体能否产生愈伤组织原因也很多。首先要考虑的是为了细胞分裂生长所必须的微量物质,如在培养基中缺少或不足,可以考虑外植体适当大些,原来组织中的微量物质可渗漏到培养基中,有利于发生愈伤组织。此外愈伤组织发生困难的原因可能在外植体中存在多量的生长抑制物质,在这种情况下,外植体可小些,或者先在液体培养基或者水中洗涤数次,然后再移入诱导发生愈伤组织的培养基上^[34]。

(三) 细胞培养物的制备

细胞培养的含义严格地讲应该是单细胞培养,实际上很难做到,通常是单细胞及小细胞团的混合培养,细胞团的大小及所占的比例与外植体种类以及培养基等条件有关。其制备方法如下:

(1) 从外植体直接产生单细胞和小细胞团。将已经表面消毒的植物材料,切成小片(小块)置于液体培养基中培养,外植体被诱发产生愈伤组织,愈伤组织的细胞随着振动脱离原来的组织游离到液体中。游离的细胞能正常地分裂和增殖,液体培养液由清变混浊,表明单细胞和小细胞团增多,增殖到一定的密度后即可除去外植体,而取用悬浮的细胞。

(2) 固体培养基培养外植体产生愈伤组织,经过反复继代培养形成松散的愈伤组织。