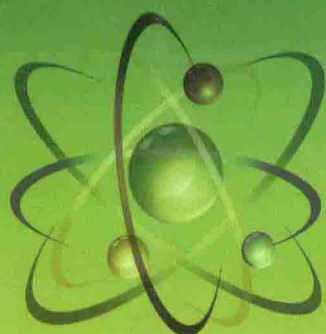
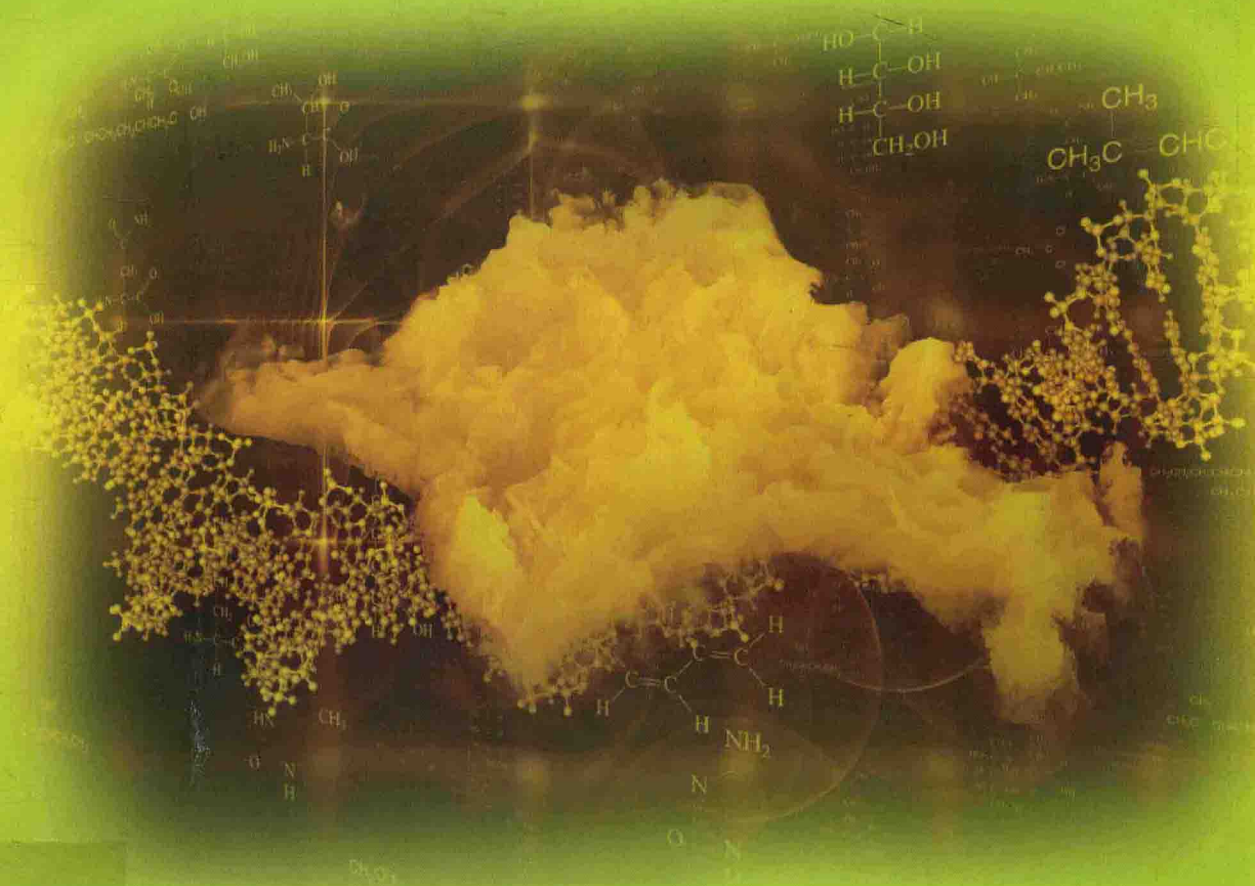




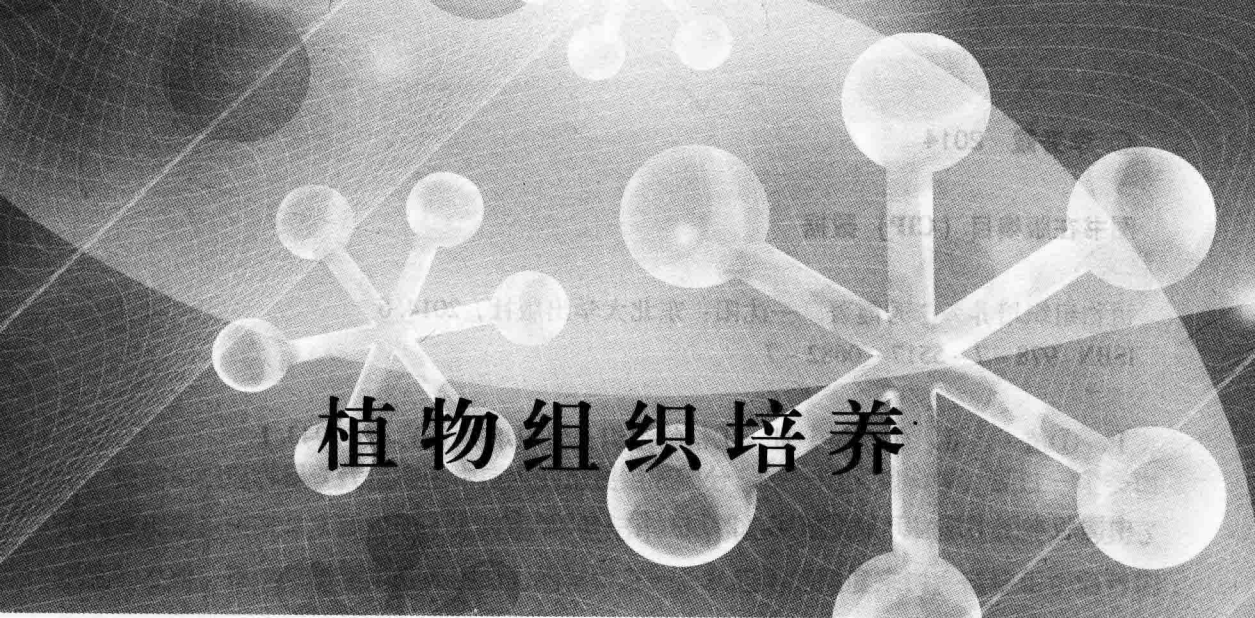
植物组织培养

ZHIWU ZHUZHI PEIYANG

李秀霞 著



東北大學出版社
Northeastern University Press



植物组织培养

李秀霞 著

东北大学出版社

· 沈 阳 ·

© 李秀霞 2014

图书在版编目 (CIP) 数据

植物组织培养 / 李秀霞著. —沈阳: 东北大学出版社, 2014. 6

ISBN 978 - 7 - 5517 - 0682 - 7

I. ①植… II. ①李… III. ①植物组织—组织培养 IV. ①Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 146826 号

出 版 者: 东北大学出版社

地址: 沈阳市和平区文化路 3 号巷 11 号

邮编: 110819

电话: 024 - 83687331 (市场部) 83680267 (总编室)

传真: 024 - 83680180 (市场部) 83680265 (社务部)

E-mail: neuph@neupress.com

http: //www. neupress. com

印 刷 者: 沈阳航空发动机研究所印刷厂

发 行 者: 东北大学出版社

幅面尺寸: 185mm × 260mm

印 张: 16

字 数: 399 千字

出版时间: 2014 年 6 月第 1 版

印刷时间: 2014 年 6 月第 1 次印刷

组稿编辑: 郭爱民

责任编辑: 孙 锋 潘佳宁

封面设计: 刘江旸

责任校对: 叶 子

责任出版: 唐敏志

ISBN 978 - 7 - 5517 - 0682 - 7

定 价: 42.00 元

植物组织培养是现代植物生物技术的重要组成部分，是一门实验科学，经过一个多世纪的基础理论与实践应用，尤其是 20 世纪 60 年代以来，取得了丰硕的成果，得到了迅猛的发展，是生物科学中最具生命力的学科之一。从应用的角度来讲，植物组织培养也是现代生物科学的重要研究技术与手段，它已渗透到生物科学的各个领域，促进了植物生理学、植物病理学、植物遗传学、植物育种学及细胞生物学等学科的研究。伴随着植物组织培养技术的逐步成熟，广泛应用于农业、林业、园艺、工业及医药业，获得了十分可观的经济效益和社会效益。

本书是著者根据多年的植物组织培养研究工作以及教学工作积累的经验，同时参考了同行的一些文献资料的基础上撰写的。

全书主要包括两部分，即理论篇和实验篇，书末有附录和主要参考文献。书中“理论篇”共 13 章，内容包括植物组织培养的基本原理、植物组织培养设施和基本条件、植物组织培养的一般操作技术、植物的器官培养、愈伤组织的形成和形态发生、植物的胚胎培养、植物的花药和花粉培养、植物的细胞培养、原生质体培养、植物离体快繁技术、植物无糖组织培养技术、植物脱毒技术和植物组织培养苗的工厂化生产等；“实验篇”包括实验须知和实验内容，其中实验内容共包含 31 个实验项目。本书力求将理论基础、操作技术与科学研究三者结合起来，增强其系统性与实用性。希望本书能够为高等院校的各相关专业本科生和研究生的学习提供参考，对相关学科的科技工作者的研究有所帮助。

由于著者水平及精力所限，书中不足之处在所难免，恳请广大读者批评指正。

著者

2014 年 5 月

第一部分 理论篇

绪 论	3
-----------	---

第一章 植物组织培养的基本原理	10
------------------------------	-----------

第一节 植物细胞全能性	10
第二节 植物细胞分化与脱分化	10
第三节 植物离体分化成苗的类型	12

第二章 植物组织培养设施和基本条件	14
--------------------------------	-----------

第一节 实验室设计	14
第二节 实验室常备的仪器设备	17
第三节 常用的实验器材	24

第三章 植物组织培养的一般操作技术	28
--------------------------------	-----------

第一节 洗涤与灭菌	28
第二节 无菌操作	34
第三节 培养基及其制备	36

第四章 植物的器官培养	42
--------------------------	-----------

第一节 离体根培养	42
第二节 离体茎培养	44
第三节 离体叶培养	52
第四节 花器官和种子培养	53
第五节 植物组织培养中的器官形成和体细胞胚胎发生	54

第五章 愈伤组织的形成和形态发生 66

- 第一节 愈伤组织的形成 66
- 第二节 愈伤组织的生长和形态发生方式 68
- 第三节 愈伤组织形态发生的调控 71

第六章 植物的胚胎培养 77

- 第一节 离体胚培养 78
- 第二节 胚珠培养 81
- 第三节 子房培养 83
- 第四节 胚乳培养 85

第七章 植物的花药和花粉培养 88

- 第一节 小孢子的发育 89
- 第二节 花粉培养 91
- 第三节 花药培养 94
- 第四节 离体条件下花粉发育成小植株的途径 97
- 第五节 影响花药和花粉培养成功的因素 98
- 第六节 花药和花粉培养的应用价值 101

第八章 植物的细胞培养 104

- 第一节 单细胞的分离 104
- 第二节 单细胞培养 106
- 第三节 悬浮细胞培养 111
- 第四节 细胞突变体筛选 117

第九章 原生质体的培养 121

- 第一节 原生质体的分离 121
- 第二节 原生质体的培养 126
- 第三节 原生质体融合与体细胞杂交 131

第十章 植物离体快繁技术 139

- 第一节 植物离体快繁的意义 139

第二节	植物离体快繁的培养技术	139
第三节	影响植物离体快繁的因素	147
第四节	几种植物的组织培养	149

第十一章 植物无糖组织培养技术 157

第一节	植物无糖组织培养的概念及意义	157
第二节	植物无糖组织培养技术	158
第三节	影响植物无糖组织培养的因素	163
第四节	植物无糖组织培养技术的成本与局限性	165

第十二章 植物脱毒技术 167

第一节	植物脱毒方法	167
第二节	脱毒效果的检验方法	171
第三节	脱毒原种的保存和应用	173

第十三章 植物组织培养苗的工厂化生产 175

第一节	组培苗生产工厂的设计及设施、设备	175
第二节	组培苗工厂化生产的工艺流程	179
第三节	组培苗工厂化生产技术	180
第四节	组培苗生产计划的制订	183
第五节	组培苗的质量鉴定与运输	185
第六节	组培苗生产成本核算与效益分析	187

第二部分 实验篇

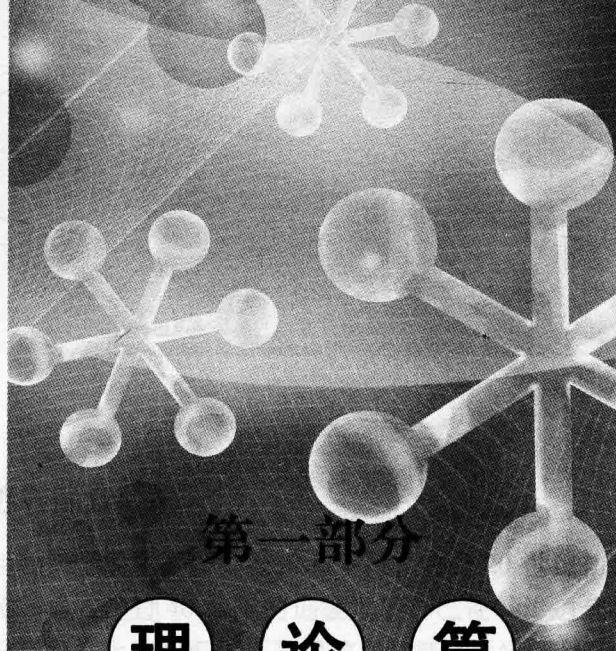
实验一	植物组织培养实验室的参观以及器材的准备	194
实验二	植物组织培养实验室的灭菌及器皿的洗涤	194
实验三	培养基母液的配制与保存	195
实验四	培养基的配制与分装	197
实验五	培养基及实验用品的灭菌	199
实验六	培养材料的灭菌和接种	200
实验七	植物离体培养中的形态观察	202
实验八	菊花茎段培养	203
实验九	玉米成熟胚的培养	204
实验十	小麦幼胚培养	206
实验十一	小麦成熟胚培养	207
实验十二	水稻幼胚培养	209

实验十三	胡萝卜离体根培养	210
实验十四	猕猴桃茎段培养	211
实验十五	马铃薯茎尖脱毒	212
实验十六	百合鳞茎培养	213
实验十七	烟草叶片组织培养	214
实验十八	组培苗的驯化与移栽	215
实验十九	细胞分离与细胞悬浮培养	216
实验二十	细胞微室培养	218
实验二十一	原生质体培养	219
实验二十二	烟草原生质体融合	220
实验二十三	愈伤组织的诱导与增殖	222
实验二十四	愈伤组织的分化	223
实验二十五	水稻花药培养	224
实验二十六	小麦花药培养	226
实验二十七	菊花茎尖培养与快速繁殖	227
实验二十八	马铃薯试管微薯的诱导	228
实验二十九	月季组织培养	229
实验三十	花粉发育时期的鉴定	230
实验三十一	植物组织培养快速繁殖的实验方案设计与实施	231

附 录	232
-----------	-----

附录 A	植物组织培养基常用化合物相对分子质量	232
附录 B	常用的培养基配方	234
附录 C	相对原子质量表	242
附录 D	常用英文缩略语表	243
附录 E	培养物的异常表现、产生原因及改进措施	244
附录 F	植物生长调节物质溶液的配制	245

主要参考文献	247
--------------	-----



第一部分

理 论 篇

一、植物组织培养

植物组织培养是指将植物的器官、组织、细胞或原生质体，在无菌条件下，接种到人工配制的培养基上，在适宜的光照、温度、湿度等条件下，进行离体培养，使其生根发芽，长成完整植株的过程。植物组织培养是现代生物技术的重要组成部分，广泛应用于农业、林业、医药、工业等领域。

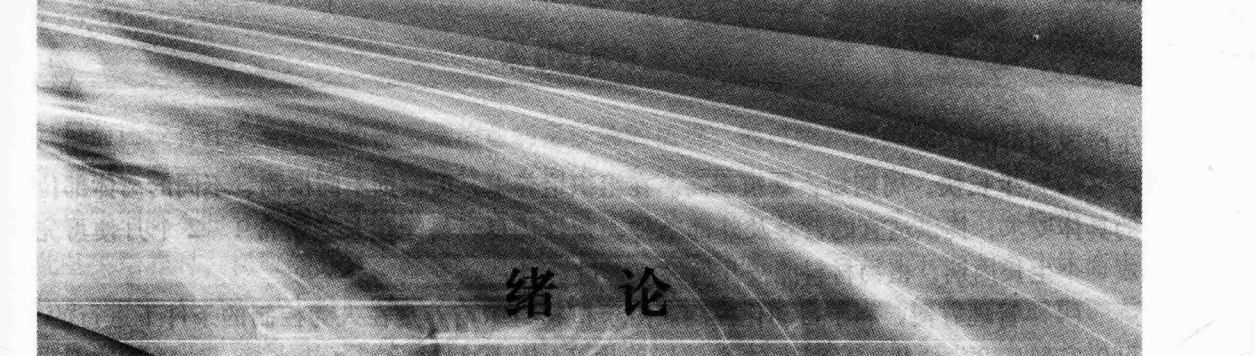
植物组织培养的基本原理是植物细胞的全能性。植物细胞具有发育成完整植株的潜力，只要提供适宜的条件，就能实现离体培养。植物组织培养的过程包括取材、消毒、接种、培养、生根、移栽等步骤。

1. 植物组织培养的材料：可分为：(1) 植物组织：如根、茎、叶、花、果等；(2) 植物细胞：如原生质体、愈伤组织、悬浮细胞等；(3) 植物器官：如根、茎、叶、花、果等。植物组织培养的材料选择应根据不同的培养目的而定。一般来说，植物组织培养的材料应具有活力、无病虫害、易于消毒等特点。

2. 植物组织培养的培养基：培养基是植物组织培养的关键因素之一。培养基的成分包括无机盐、有机碳源、维生素、生长素、细胞分裂素等。培养基的配制应根据不同的植物种类和培养目的而定。一般来说，植物组织培养的培养基应具有无菌、无毒、营养丰富等特点。

3. 植物组织培养的培养条件：植物组织培养的培养条件包括光照、温度、湿度、pH值等。光照是植物组织培养的重要因素之一，不同的植物种类对光照的要求不同。一般来说，植物组织培养的培养条件应具有无菌、无毒、营养丰富等特点。

4. 植物组织培养的应用：植物组织培养在农业、林业、医药、工业等领域具有广泛的应用。在农业领域，植物组织培养可用于快速繁殖优良品种、脱除病毒、改良品种等。在林业领域，植物组织培养可用于快速繁殖优良品种、脱除病毒、改良品种等。在医药领域，植物组织培养可用于生产药物、研究疾病等。在工业领域，植物组织培养可用于生产生物制品、研究生物过程等。



绪 论

一、植物组织培养简介

植物组织培养是生物科学的重要研究技术和手段，它是 20 世纪初以植物生理学为基础发展起来的一项生物技术，经过 40 多年的迅猛发展，已使其渗透到生物学科的多个领域，无论是在科学研究还是在生产方面，所取得的成就都是举世瞩目的，所以植物组织培养已是目前生物科学中最具生命力的学科之一。

所谓植物组织培养，是指在无菌和人工控制的营养（人工配制培养基）以及环境条件（光照、温度等）下，将离体的植物器官（根、茎、叶、花、果实等）、组织（形成层、花药组织、胚乳、皮层等）、细胞（体细胞、生殖细胞以及原生质体等）进行培养，从而使其长成完整植株的技术。

根据培养材料的不同，可分为：① 植物培养。对幼苗及较大植株的培养。② 器官培养。即对植物的根尖、茎尖、叶片、茎段、花器官各部分以及果实的培养。③ 胚胎培养。即对未成熟或成熟的胚胎的离体培养。④ 愈伤组织的培养。即对愈伤组织的培养。所谓愈伤组织，原指植物受伤之后在伤口表面处形成的一团薄壁细胞，在组织培养中，则指在人工培养基上由外植体（被培养的离体植物部分）长出来的一团无序生长的薄壁细胞。⑤ 细胞培养。即对分散的细胞或小的细胞团的培养。⑥ 原生质体培养。即培养物为去除细胞壁而成为裸露的原生质体的培养。一般培养什么即称什么培养。

根据培养方法不同，又可分为：平板培养；悬浮培养；微室培养；单细胞培养等。

另外，还可根据培养目的不同将植物组织培养分为：试管加倍培养、试管嫁接培养、试管育种培养、试管授精培养，等等。根据培养过程分类可分为初代培养和继代培养。初代培养是将外植体进行的第一次培养；继代培养是将外植体或培养物转接到新的培养基上，防止老化、营养不良或代谢物积累产生的毒害。依据培养基的物理状态可分为固体培养和液体培养。

1. 植物组织培养的优越性

（1）取材少，用材经济。根据植物细胞具有全能性的原理，在组织培养中，无论采用器官、组织、细胞或原生质体，都可以培养出新植株。进行器官培养仅需几毫米大小的材料就可以组培成功，进而大量繁殖。一枚非洲紫罗兰叶片培养三个月就可获得五千株幼苗。

（2）培养条件可控，不受自然因素影响。离体的植物材料在组培中的生长条件完全是人工控制的。如培养基成分、培养温度及光照等。培养材料不受自然气候的影响，这样方便试验处理，有利于人工调控植物生长发育，可稳定地进行连续培养生产，使周年试验或

生产成为可能。

(3) 生长快, 周期短, 繁殖率高。在组织培养中, 可根据不同植物、不同的离体部位的具体要求, 提供适宜的营养及外部条件, 条件优良, 易于生长, 常常 1~2 个月便可完成一个生长周期, 植物材料能按几何级数大量繁殖。

(4) 管理方便, 利于自动化控制。由于植物组织培养是在人为控制的条件下进行的, 可以实现高度集约化、高密度的科学培养生产, 比田间试验、盆栽水培、沙培都精细得多, 还可以免去中耕除草、浇水施肥、病虫害防治以及其他生物的干扰, 大大地节约人力、物力及土地面积, 可自动控制条件, 方便管理, 有利于工厂化生产。

(5) 研究材料来源单一, 无性系遗传背景一致。在生物科学研究中, 试验材料遗传性的一致是至关重要的因素, 否则试验结果是没有意义的。在组织培养中, 可以获得各种水平的无性系, 如细胞、组织块、器官或小植株。这些材料均来自单一的植物个体, 因此遗传性一致。将它们用于试验可避免许多误差, 减少重复试验而并不影响试验的精确度。

2. 植物组织培养的意义

(1) 理论研究方面: 通过组织培养进行离体植物材料的研究, 可以了解在不受植物体其他部分干扰下的生长和分化规律。组培技术具有在自然条件下所不能达到的无菌、离体以及能够严格控制环境因素等优点, 该技术既能用于研究植物的各种细胞、组织和器官所需要的条件以及生理生化的特点, 又可用于研究在细胞水平上进行诱变、筛选等遗传操作。目前, 它不仅是在植物生理学范围内研究, 而且已经渗透到生物科学的各个领域, 如细胞学、遗传学、育种学、生物化学、药物学等。

(2) 实践应用方面: 通过多年来的研究与实践, 植物组织培养将逐渐成为植物育种、快速繁殖、获得无病毒植物、种质资源的保存以及植物次生产物的工业化生产的有效手段之一。

植物组织培养在植物育种方面的应用前景是广泛的。在自花授粉作物杂交育种中, 或在异花授粉作物自交系选育过程中, 采用花药培养技术可缩短杂合体纯合化所需的时间, 快速组合多种性状, 缩短育种进程, 简化选育程序, 并可节约大量土地面积。目前利用此项技术已培育出一大批高产优质品种, 在生产中已得到广泛应用。通过体细胞无性系变异及突变体的选育, 也已培育出有利用价值的特殊品种或材料。利用胚培养和试管内授粉受精技术克服杂交的不亲和性及杂种胚的早期败育。通过体细胞融合还有可能制造出细胞质杂种。1972 年, Carlson 首先报道了属间体细胞杂交成功, 到目前已有数十种属间体细胞杂种和几例科间体细胞杂交成功的报道。由此可见, 植物组织培养可以从多方面建立起新的育种系统, 加速育种进程, 成为更多更好更快地创造出植物新品种、新物种的有效手段。

植物组织培养应用最为广泛的一个方面是无性系快速繁殖。对于各种植物如脱毒苗、新引进种、新育成种、珍稀良种、优良单株、濒危植物和基因工程植株等均可通过组织培养技术进行离体快速繁殖, 比常规的速度可快数万倍至数百万倍, 可为生产及时提供大量规格统一的优质种薯和种苗。有人计算, 一个苹果茎尖一年可繁殖 1000 亿个小苗。一支试管的优良树种可供数万公顷的土地造林。采用植物组织培养, 年增殖率可达数百万倍的植物种类比比皆是, 其中有一部分原来是难以无性繁殖的。

无性繁殖的农作物常可能感染一种或数种病毒, 造成作物的产量及品质受到影响, 而

且目前还没有什么有效的药物可能治愈病毒侵染的植物。通过组织培养技术进行植物茎尖培养可以脱毒。病毒在植株体内是分布不均的。在分生组织区无维管束,病毒扩散慢,加之植物细胞不断分裂增殖,所以生长点的病毒含量少,茎尖生长点几乎检测不出病毒。因此茎尖培养时,切取部分越小越好,但太小了不容易培养成活,过大又不能去毒,故而操作难度大。只要获得少量脱毒苗,便可利用组培技术迅速扩大繁殖。马铃薯茎尖脱毒、无毒种苗和微型脱毒种薯已在马铃薯生产国广泛应用,根本上解决了马铃薯品种的退化问题。

植物组织培养在植物种质资源的保存和交换中起着重要的作用。有人断言:谁掌握了植物种质资源,谁就掌握了农业的未来。此言充分强调了种质资源的重要性。种质资源有多方面的用途,可用于育种、改造环境与建立合理的生态平衡和种种科学研究等。植物资源及其保存有两大难题:一是遗传资源日趋枯竭,造成有益基因的丧失。目前全世界面临着环境污染和热带森林资源的破坏,平均每天有种植物从地球上消失,这是全人类物种财富的损失。二是常规田间保存耗资巨大,且常常达不到万无一失的水平。如要保存 800 个品种葡萄种质,需占地 15 亩,而维持费用也十分昂贵,借助组培,利用试管培养可以保存它们。采用低温离体保存种质,可大大节约人力、物力和土地,同时也便于种质资源交换、转移、购买以及有效防止病虫害的人为传播。

植物组织培养技术使植物次生产物的工业化生产成为可能。这些次生产物主要有药物、香精、色素及生理活性物质等。利用植物组织培养进行大规模生产,用以合成人们所需要的各种天然有机物,对人类的生产生活有显著意义。目前有些已投入工业化生产,发展前景是十分美好的。

另外,植物组织培养也为生物科学的其他许多学科如细胞学、遗传学、植物生理生化、育种学、病理学等的研究提供了有效的技术手段和良好的试验条件。

二、植物组织培养与生物科学的关系

(1) 植物组织培养学科的建立依赖于生物学科理论的发展。植物组织培养的理论基础来源于植物生理学、植物学、遗传学、发育学和微生物学等,研究技术需要相关技术协作和补充。

(2) 植物组织培养为生物学研究提供新的实验体系。植物组织培养是植物学、植物生理学、植物病理学、细胞学、遗传学、发育学、生物化学和药理学等学科研究的重要手段。

(3) 植物组织培养与其他生物技术相互促进。植物生物技术是按人类的意愿有目的地改良植物的一种新技术,组织培养为基因表达及其调控的研究提供有效方法。

三、植物组织培养的发展概况

植物组织培养的产生与发展是在著名的细胞学说理论的推动下实现的。植物组织培养研究的开始若以 1902 年德国的植物生理学家 Haberlandt 发表的第一篇植物细胞培养论文为起点,至今已有一百多年的研究历史。根据其一个世纪以来的研究历程,将其发展过程分为如下三个阶段。

(一) 萌芽阶段 (20 世纪初至 30 年代中)

Schleiden 和 Schwann 于 1838—1839 年创立了细胞学说, 认为植物和动物都是由细胞构成的, 细胞通过分裂从而增多, 并建组成生物体。同时指出, 如果所具备的条件能同在活体的一样, 每个细胞都应能独立生存和发展。Haberlandt 用实验来验证此理论, 于 1902 年首次提出了高等植物的器官和组织可以不断分割, 直至单个细胞的观点。他认为人们可以培养植物的体细胞成为人工胚, 并提出了植物单细胞经人工培养, 通过细胞分裂可恢复成完整植株, 并具有原植物的全部遗传特性。他采用加入了蔗糖的 Knop 溶液来培养小叶芝麻和凤眼兰的栅栏组织, 以及虎眼万年青属等植物的表皮细胞, 限于当时的知识与技术水平, 他在栅栏细胞中虽然看到了细胞的生长、细胞壁的加厚和淀粉的形成等, 却没有一个细胞在培养中能够进行分裂。尽管 Haberlandt 没能成功, 但由他开创的组培事业引导着众多的科学探索者不断地努力, 在 20 世纪 60 年代中期把 Haberlandt 的种种预言变成了现实。因此他是植物组织培养的先驱, 被人们誉为“植物组织培养之父”。1904 年, E. Hannig 第一个在无机盐溶液及有机营养成分的培养基上培养萝卜和辣根菜的胚取得了成功, 观察到离体胚均能正常发育, 同时发现有促进提早发育成苗的现象。1908 年, S. Simon 研究白杨嫩茎在培养基中的发育, 观察到愈伤组织的产生和根、芽的形成。1922 年美国的 Robbins 和德国的 W. Kott 就培养离体根尖获得某些成功进行了报道。1925 年 Laibach 培养亚麻种间杂交形成的不能成活的种子中的胚, 成功地将此幼胚培养成熟。在 20 世纪 30 年代, 我国植物生理学创始人之一李继侗进行银杏离体胚胎的培养, 发现 3mm 以上大小的胚能够正常生长, 同时还观察到银杏胚乳提取物能有效地促进离体胚的生长, 后者对于后人利用植物胚乳汁、幼小种子以及果实的提取物促进培养组织的生长具有重要的意义。

(二) 奠基阶段 (20 世纪 30 年代中至 50 年代末)

20 世纪 30 年代, 有以下几方面的工作为以后的植物组织培养研究奠定了基础: 一是 B 族维生素对植物生长的重要性被人们认识; 二是 1934 年荷兰植物学家 F. W. Went 发现了生长素, 生长素被应用于植物组织培养中, 取得了可喜的成果; 三是由 White, Gautheret 和 Nobecourt 所建立的基本实验方法。1934 年, White 用番茄离体根进行培养实验, 并建立了第一个活跃生长的无性繁殖系, 使根的离体培养实验首次获得了真正的成功。还是这位学者用已感染烟草花叶病毒的番茄植株离体根进行了培养实验, 发现根尖的不同部位含病毒的浓度不同, 其旺盛生长的根尖部位病毒浓度很低, 而成熟区则很高。通过在茎尖中发现的类似规律导致后来采用茎尖培养法获得无病毒植物 (Morel 等, 1952)。White 在实验中最初使用的培养基包含无机盐、酵母浸出液和蔗糖。1937 年他在原培养基中添加了吡哆醇、硫胺素和烟酸等 B 族维生素, 用以取代酵母浸出液获得成功。White 首先建立了人工合成的综合培养基, 证明了在根尖培养中, 至少要补充 B 族维生素, 根尖才能存活与生长。同时, Gautheret 于 1934 年以山毛柳和黑杨等形成层组织为材料培养时发现, 尽管在含有葡萄糖和盐酸半胱氨酸的 Knop 溶液中, 这些组织可以不断增殖几个月, 但在培养基中加入了 B 族维生素和 IAA (吲哚乙酸) 以后, 山毛柳形成层组织的生长迅速增加。1939 年 Gautheret 连续培养胡萝卜根形成层首次获得成功。同年, White 用烟草种间杂种的瘤组织, Nobecourt 用胡萝卜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。我们现在所用的若干培养方法和培养基, 原则上都是这三位作者在 1939 年所建立的方法和培养基发展而来的。

在 20 世纪 30 年代末至 40 年代, 大多数是研究植物培养器官和组织与有关营养需要之间的关系。1941 年 Overbeek 等在曼陀罗幼胚(心形期)的培养基中, 曾用椰子乳(液体胚乳)作为附加物, 结果幼胚在离体的情况下可培养成熟。而 50 年代初 Steward 等在胡萝卜组织培养中也利用椰子乳获得成功, 结果为椰子乳在组织培养中的广泛应用起到了推动作用。在茎尖培养方面最早的研究工作是从罗士韦(1946)利用寄生植物菟丝子茎尖培养观察到花的形成开始的。对于后人用组织培养方法诱导花芽形成的研究起到了促进作用。在 40 年代和 50 年代, 由于植物生理及实验形态研究方面提出了许多问题, 促进植物组织培养工作又进入了一个崭新的时期, 并得到很大的发展。Camus(1949)通过把芽嫁接在培养的组织上, 使其诱导分化出维管组织(Vascular tissue), 后人对控制维管组织分化的因素又进行了很多重要的工作。1951 年, Skoog 和崔澈在烟草茎段和髓培养及其器官形成的工作中, 发现腺嘌呤或腺苷能够解除培养基中生长素(IAA)对芽形成的抑制作用并诱导芽的形成, 确定了腺嘌呤/生长素的比例是控制芽和根形成的主要条件之一, 明确指出, 这一比例高时, 产生芽; 比例低时, 形成根。为了探讨促进细胞分裂的物质, Miller 等(1955)发现了激动素, 而且后来又发现激动素可替代腺嘌呤促进芽的形成, 其效力约增加三万倍。因此上述控制器官分化的激素模式应改成与激动素/生长素比例相关。而最早对培养基中的生长进行定量分析工作的, 是由 Steward 等(1952)开始用胡萝卜根外植体进行的研究工作。不久, 在 1958 年, 他们通过悬浮培养研究又成功地诱导出胚状体。Steward 等及 Skoog 等的研究工作, 为其后的组织培养中的器官发生及胚胎发生奠定了基础。至今, 在组织培养中能诱导分化出完整植物的品种已达数百种, 从而为细胞全能性的假说提供了科学的证据。植物组织培养在 50 年代还有一些突出的贡献。1952 年, Morel 和 Martin 首次通过茎尖分生组织的离体培养, 由已受病毒侵染的大丽花中获得无毒植株。1953—1954 年, Muir 进行单细胞培养获得初步成功。他们把万寿菊(Tagetes erecta)和烟草的愈伤组织转移到液体培养基中, 放在摇床上振荡, 使组织破碎, 形成由单细胞和细胞聚集体组成的细胞悬浮液, 然后通过继代培养进行繁殖。Muir 等还用机械方法由细胞悬浮液和容易散碎的愈伤组织中分离得到单细胞, 把它们置于一张铺在愈伤组织上面的滤纸上培养, 使细胞发生了分裂。这种“看护培养”技术揭示了实现 Haberlandt 培养单细胞这一设想的可能性。1958 年, Wickson 和 Thimann 指出, 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, 将可使侧芽解除休眠状态, 而且, 能够从顶端优势下解脱出来的不只是那些原来茎尖上的腋芽, 还有由原来的茎尖在培养中长成的侧枝上的腋芽, 结果就会长出很多小枝条, 其中每个小枝条又可取出来重复上述过程, 于是在相当短的时间内, 就可以得到成千上万的小枝条。当把这些小枝条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, 制订了一系列标准程序, 把这一方法广泛用于由蕨类植物、花卉和果树的快速繁殖上。1958—1959 年, Reinert 和 Steward 分别报道, 在胡萝卜愈伤组织培养中形成了体细胞胚。这是一种不同于通过芽和根的分化而形成植株的再生方式。现在知道有很多植物都能形成体细胞胚。

(三) 迅速发展阶段(20 世纪 50 年代末至今)

从 20 世纪 60 年代开始, 植物组织培养进入了蓬勃发展的时期, 研究工作不断深化, 组织培养的成果在生产中得到了广泛的应用, 尤其是近几十年在生物学科的多个领域以及

生产中的应用取得了丰硕的成果和巨大的经济效益与社会效益。

1960年,英国人 E. C. Cocking 采用纤维素酶、果胶酶等酶制剂分离番茄幼根,获得大量健康的原生质体,创建了植物原生质体培养和体细胞杂交的工作,这是植物组织培养的又一项突破。1971年, I. Takebe 等首次报道由烟草原生质体通过细胞壁再生、细胞分裂等过程再生出了完整的植株,证实了原生质体的全能性。1972年, P. S. Carlson 等完成了粉蓝烟草和长花烟草的原生质体融合,实现了体细胞杂交。1962年, K. Kanta 完善了试管内传粉受精技术,这可以克服发生在花粉与柱头间的两性不亲和现象。同年, Murashige 和 Skoog 发表了促进烟草组织快速生长的培养基成分,这就是目前非常流行的、卓有成效的 MS 培养基。1960年, Morel 以兰花的茎尖为培养材料,可以脱除病毒并能快速繁殖兰花。其后,国际上相继建立了“兰花工业”,在“兰花工业”高效益的刺激下,植物离体微繁殖技术和脱毒技术得到了迅速发展,实现了试管苗产业化,取得了巨大的经济效益和社会效益。1964年,印度的 Guha 和 Mabeshwari 成功地从曼陀罗花药培养出花粉单倍体植株,从而促进了植物花药单倍体育种技术的发展。自 1958 年以来,植物组织培养得到了迅速发展,在现代科学技术中得到多方面的应用,也是现代科学相互渗透、相互促进的结果。20 世纪 60 年代初,世界上只有十多个国家的少数实验室从事植物组织培养,到 20 世纪 70 年代已发展到众多国家和实验室;到 20 世纪 90 年代已基本遍及世界各国,不论是发达国家还是发展中国家,几乎所有大学、研究机构、农林单位都有人在从事这方面的研究和应用(罗士韦, 1978; 许智宏 1991, 1994)。由于 20 世纪 60 年代植物组织培养的迅猛发展,1973 年在英国成立了国际植物组织培养协会(IAPTC),至今已召开过八次国际会议,论文和与会人数不断增加,较多的相关方面专著和丛书相继得到出版。

我国植物组织培养研究作为组织培养发展作出过许多的贡献。1931年,李继侗培养银杏的胚。1935—1942年,罗宗洛进行了玉米根尖离体培养。其后,罗士韦进行了植物幼胚、根尖、茎尖和愈伤组织的培养;李正理进行了离体胚培养中的形态发生及离体茎尖的研究;王伏雄进行了幼胚培养。70 年代以来,我国组织培养研究进入了新的阶段,发展速度较快,在某些方面已经做出了国际公认的重要成绩,特别是在花药培养和原生质体培养方面,我国学者的工作已经受到世界各国同行的普遍重视和赞赏。我国植物组织培养技术普及程度及技术水平均居世界领先地位(周永春, 1990)。在植物组织培养和应用方面已有多项成果获得国家和省、部、委、厅局级科技成果奖。中科院植物研究所朱至清创制的 N_6 培养基获国家发明二等奖。国家“六五”“七五”“八五”“九五”都把生物技术列为国家重点攻关项目。20 世纪 70 年代以来,我国学者结合自己的工作 and 国内外进展出版了很多专著和译著。

四、植物组织培养的应用及展望

1. 应用

(1) 组织培养在植物快繁方面的应用。① 良种快繁;② 脱毒苗的快繁;③ 特殊育种材料的快繁;④ 植株的快繁;⑤ 自然和人工诱导有用突变体的快繁;⑥ 离体保存种质的快繁;⑦ 濒危植物的离体快繁,如康乃馨、兰花和桉树等。

(2) 组织培养与植物脱毒。许多植物,特别是无性繁殖的植物均受到多种病毒的感染,造成严重的品种退化,产量降低,品质变劣。目前,利用一定的脱毒方法生产脱毒种

苗,已在菊花、兰花、康乃馨、草莓、苹果、香蕉、马铃薯、甘薯、大蒜等多种主要经济作物上大规模应用。

(3) 组织培养与育种。胚培养和试管内授粉受精技术的应用方面:① 幼胚的体外培养,可以挽救杂种后代;② 试管内授粉与受精,可克服杂交不亲和性。

花药与花粉培养技术的应用:进行单倍体育种,缩短杂合体纯合化所需的时间,缩短育种年限。

原生质体融合技术的应用:实现种间、属间、科间等不同物种来源的细胞融合,克服远缘杂交不亲合性。1972 年获得烟草第一个种间体细胞杂种。

(4) 组织培养与种质保存。一些珍贵、濒危植物资源日趋枯竭,有益基因不断丧失,田间保存耗资巨大,利用试管培养可以进行低温或超低温的离体保存,便于种质资源保存、交换、购买及有效防止病虫害的人为传播。目前,我国已在数处建立了植物种质资源离体保存设施。

(5) 组织培养与次生代谢。利用植物组织的大规模培养,可以高效生产各种天然化合物,如食用香料、香精、重要的油脂、颜料、甜味剂、化工原料、抗菌剂、药物以及其他活性物质。因此,近年来这一领域已引起人们的广泛兴趣和重视,国际上已获得这方面专利 100 余项。例如,用组织培养生产人工不能合成的药物或有效成分等的研究正在不断深入,有些已开始工业化生产。

(6) 植物组织培养技术在理论研究中的应用。① 遗传、生理、生化和植物病理研究,单倍体育种、生理活动、合成代谢、抗性研究;② 细胞生物学、发育生物学研究,细胞培养、原生质体培养等。

2. 展 望

近 20 年植物组织培养研究成果显著,随着近代细胞培养技术的不断完善,分子生物学的进展将推动应用科学发展。应用范围和前景更加广泛,将会成为现代生产中重要的技术手段。植物组织培养的理论研究也更加深入。