

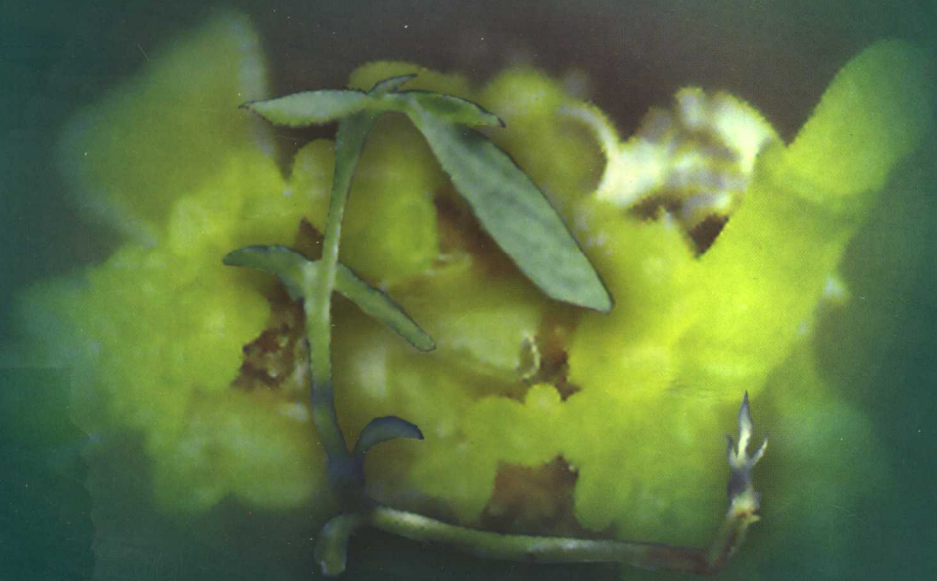
面向 21 世纪 课 程 教 材

Textbook Series for 21st Century

植物细胞组织培养

Plant Cell and Tissue Culture

刘庆昌 吴国良 主编



中国农业大学出版社

面向21世纪课程教材

Textbook Series for 21st Century

植物细胞组织培养

Plant Cell and Tissue Culture

刘庆昌 吴国良 主编

中国农业大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

植物细胞组织培养/刘庆昌,吴国良主编. —北京:中国农业大学出版社,2003.1

面向 21 世纪课程教材

ISBN 7-81066-529-4/Q·14

I. 植… II. ①刘… ②吴… III. 植物细胞-组织培养-高等学校-教材 IV. Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 079340 号

出版 中国农业大学出版社
发行 新华书店
经销 新华书店
印刷 北京鑫丰华彩印有限公司
版次 2003 年 1 月第 1 版
印次 2003 年 1 月第 1 次印刷
开本 16 印张 21.25 千字 390
规格 787×980
印数 1~5 050
定价 25.00 元

图书如有质量问题本社负责调换

社址 北京市海淀区圆明园西路 2 号 邮政编码 100094

电话 010-62892633 网址 www.cau.edu.cn/caup/

前 言

本教材是国家教育部面向 21 世纪教学内容和课程体系改革 04-13 项目研究成果。

植物细胞组织培养既是植物遗传工程的基础和关键环节之一,也是一种实用性极强的高新技术,已经发展成为植物生产类、草业科学类、森林资源类、环境生态类、生物科学类等各专业本科生的重要课程。开设《植物细胞组织培养》课程,是当今生命科学飞速发展的要求,也是学生今后实际工作的迫切需要。

自 20 世纪 80 年代以来,国内出版了不少有关植物细胞组织培养方面的著作,这些著作对推动植物细胞组织培养的研究与应用起了极大的作用。但是,这些著作中,能真正作为本科生教材而进行使用的书籍却很少。因此,我们在多年教学的基础上,编写了这本《植物细胞组织培养》教材。

本教材全面、系统地介绍了植物细胞组织培养的基本概念、基本原理、基本操作技术、研究方法等,较全面地反映了国内外最新研究成果,信息量大,概念准确,图文并茂,技术方法详细具体,实用性较强。

本书共分 12 章,第 1 章绪论、第 6 章细胞培养和第 8 章体细胞杂交由刘庆昌编写;第 2 章植物细胞组织培养的基本技术由翟红编写;第 3 章植物组织器官培养和第 10 章植物离体繁殖技术(其中的蔬菜部分由张成合编写)由吴国良编写;第 4 章茎尖分生组织培养由高遐虹和范双喜编写;第 5 章单倍体细胞培养由张献龙编写;第 7 章原生质体的分离和培养由王庆亚编写;第 9 章体细胞无性系变异由张成合编写;第 11 章种质离体保存由宋明编写;第 12 章植物遗传转化由巩振辉编写。另外,高美英参加了第 3 章的部分编写工作,屈红征参加了第 10 章的部分编写工作。全书由刘庆昌和吴国良统稿和定稿。

在本教材编写过程中,得到了中国农业大学戴景瑞院士的大力支持和热情指导,华南农业大学陈炳铨教授、中国医学科学院药用植物研究所张荫麟研究员、中国农业大学刘青林副教授对本书提出了宝贵的修改意见。谨在此表示衷心地感谢。

刘庆昌 吴国良

2002 年 7 月

目 录

1 绪论	(1)
1.1 植物细胞组织培养的一般概念	(1)
1.2 植物细胞组织培养的发展简史	(2)
1.2.1 探索阶段	(3)
1.2.2 奠基阶段	(3)
1.2.3 迅速发展阶段	(4)
1.3 植物细胞组织培养在农业中的作用	(6)
1.3.1 在植物育种上的应用	(6)
1.3.2 在植物脱毒和离体快繁上的应用	(7)
1.3.3 在次生代谢产物生产上的应用	(7)
1.3.4 在植物种质资源保存和交换上的应用	(7)
1.3.5 在遗传、生理、生化、病理等研究上的应用	(7)
2 植物细胞组织培养的基本技术	(9)
2.1 基本设备	(9)
2.1.1 无菌室、超净工作台	(9)
2.1.2 用具	(11)
2.1.3 小型器具	(16)
2.1.4 仪器	(17)
2.1.5 培养室	(20)
2.2 培养基	(21)
2.2.1 培养基的主要成分	(21)
2.2.2 培养基的制备	(32)
2.3 外植体	(35)
2.3.1 外植体的种类	(35)
2.3.2 外植体的消毒	(37)
2.3.3 外植体的培养	(38)
2.4 培养条件	(41)

2.4.1	温度	(42)
2.4.2	光照	(42)
2.4.3	通气	(42)
2.4.4	湿度	(43)
2.5	继代培养	(43)
2.5.1	继代培养	(43)
2.5.2	体细胞无性系变异	(44)
2.5.3	玻璃化	(44)
3	植物组织器官培养	(46)
3.1	器官形成	(46)
3.1.1	概念	(46)
3.1.2	愈伤组织诱导	(46)
3.1.3	器官分化	(48)
3.1.4	外植体的器官发生途径	(50)
3.1.5	影响器官分化的因素	(52)
3.1.6	试管苗的驯化	(54)
3.2	体细胞胚胎发生	(55)
3.2.1	概念与特点	(55)
3.2.2	体细胞胚发生的途径及类型	(59)
3.2.3	体细胞胚发生的机制	(60)
3.2.4	影响体细胞胚胎发生的因素	(61)
3.3	胚培养	(63)
3.3.1	胚培养的意义	(63)
3.3.2	离体胚培养的发育方式	(65)
3.3.3	胚培养方法	(65)
3.4	胚乳培养	(67)
3.4.1	胚乳培养的意义	(67)
3.4.2	胚乳培养的方法	(69)
3.5	离体授粉	(71)
3.5.1	离体授粉的概念	(71)
3.5.2	离体授粉的方法	(71)
3.5.3	影响离体授粉的因素	(72)
3.6	人工种子	(73)

3.6.1 人工种子的概念	(73)
3.6.2 人工种子的意义	(73)
3.6.3 人工种子的制作程序	(74)
3.6.4 人工种子的应用前景	(77)
4 茎尖分生组织培养	(78)
4.1 茎尖分生组织培养的目的和应用	(78)
4.1.1 形态建成研究	(78)
4.1.2 无病株的生产	(78)
4.1.3 营养繁殖	(79)
4.1.4 育种中的应用	(79)
4.2 茎尖分生组织培养的方法	(80)
4.2.1 材料的准备	(80)
4.2.2 材料的消毒	(80)
4.2.3 组织片的分离	(81)
4.2.4 培养基	(81)
4.2.5 培养条件	(82)
4.3 脱毒苗的培育和病毒检测	(83)
4.3.1 脱毒苗的培育	(83)
4.3.2 病毒检测	(88)
4.4 几种主要植物的脱毒苗生产技术	(91)
4.4.1 马铃薯	(91)
4.4.2 甘薯	(95)
4.4.3 甘蔗	(97)
4.4.4 苹果	(99)
4.4.5 草莓	(102)
4.4.6 柑橘	(105)
4.4.7 香蕉	(108)
5 单倍体细胞培养	(111)
5.1 单倍体的起源和遗传行为	(112)
5.1.1 单倍体的起源	(112)
5.1.2 单倍体的减数分裂行为	(113)
5.2 单倍体的应用价值	(113)
5.2.1 在植物育种中使后代迅速纯合	(114)

5.2.2 提高选择效率	(114)
5.2.3 排除杂种优势对后代选择的干扰	(114)
5.2.4 遗传研究的良好实验材料体系	(115)
5.2.5 突变体的筛选	(115)
5.2.6 消除致死基因	(115)
5.2.7 选育新型自交系	(115)
5.2.8 遗传转化的受体材料	(116)
5.3 离体培养条件下的小孢子发育	(116)
5.3.1 小孢子的正常发育	(116)
5.3.2 离体培养条件下的小孢子发育	(116)
5.4 花药培养	(118)
5.4.1 花药培养操作技术	(119)
5.4.2 影响花药培养的因素	(120)
5.4.3 逆境处理对小孢子胚胎发生的诱导作用	(127)
5.4.4 单倍体植株的加倍处理	(129)
5.4.5 孤雄生殖诱导的分子机理	(130)
5.5 花粉(小孢子)培养	(131)
5.5.1 花粉培养与花药培养的比较	(131)
5.5.2 分离花粉的方法	(132)
5.5.3 花粉(小孢子)培养方法	(133)
5.6 禾本科植物花药培养中的白化苗现象	(135)
5.7 从雌配子体诱导单倍体植株	(135)
5.8 单倍体细胞培养与植物育种	(136)
6 细胞培养	(139)
6.1 单细胞的分离	(139)
6.1.1 由植物器官分离单细胞	(139)
6.1.2 由愈伤组织分离单细胞	(141)
6.2 单细胞培养	(141)
6.2.1 单细胞培养方法	(141)
6.2.2 影响单细胞培养的因素	(145)
6.3 细胞悬浮培养	(147)
6.3.1 培养方法	(147)
6.3.2 培养基	(150)

6.3.3 培养基的振荡	(151)
6.3.4 悬浮培养细胞的同步化	(151)
6.3.5 细胞增殖的测定	(152)
6.3.6 悬浮培养细胞的植株再生	(152)
6.3.7 影响细胞悬浮培养的因素	(154)
6.4 细胞培养的应用	(159)
6.4.1 筛选突变体	(159)
6.4.2 生产次生代谢产物	(160)
6.4.3 其他应用	(162)
7 原生质体的分离和培养	(163)
7.1 原生质体分离	(163)
7.1.1 原生质体供体	(165)
7.1.2 分离原生质体所用酶类	(168)
7.2 原生质体培养	(170)
7.2.1 原生质体活性试验	(170)
7.2.2 培养基	(171)
7.2.3 植板密度	(174)
7.2.4 细胞分裂和愈伤组织形成	(176)
7.2.5 植株再生	(178)
7.3 部分植物的原生质体培养	(181)
7.3.1 水稻原生质体培养	(181)
7.3.2 小麦原生质体培养	(181)
7.3.3 油菜原生质体培养	(182)
7.3.4 棉花原生质体培养	(183)
7.3.5 大豆原生质体培养	(184)
7.3.6 马铃薯原生质体培养	(185)
7.3.7 枇杷原生质体培养	(186)
7.3.8 药用植物原生质体培养	(187)
8 体细胞杂交	(189)
8.1 原生质体融合	(189)
8.1.1 自发融合	(189)
8.1.2 诱发融合	(190)
8.2 杂种细胞的选择	(195)

8.2.1	细胞系互补的选择方法	(195)
8.2.2	利用物理特性差异的选择方法	(196)
8.2.3	依据生长特性差异的选择方法	(197)
8.3	杂种细胞培养和杂种植株再生	(197)
8.4	体细胞杂种的鉴定	(199)
8.4.1	形态学鉴定方法	(199)
8.4.2	细胞学鉴定方法	(199)
8.4.3	同工酶鉴定方法	(200)
8.4.4	分子生物学鉴定方法	(200)
8.5	体细胞杂种的核型	(202)
8.6	对称融合和非对称融合	(203)
8.6.1	对称融合	(203)
8.6.2	非对称融合	(204)
8.7	细胞质杂种	(205)
8.8	几个成功的植物体细胞杂交实例	(207)
8.8.1	细胞质雄性不育烟草	(208)
8.8.2	细胞质雄性不育水稻	(208)
8.8.3	马铃薯栽培种与野生种的杂种	(208)
8.8.4	甘薯栽培种与野生种的杂种	(208)
8.8.5	番茄栽培种与野生种的杂种	(209)
8.8.6	马铃薯与番茄属野生种的杂种	(209)
8.8.7	甘蓝与白菜的杂种	(209)
8.8.8	柑橘与枸橼的杂种	(209)
8.9	通过原生质体摄入细胞器、微生物及外源 DNA	(209)
8.9.1	叶绿体移植	(209)
8.9.2	核移植	(210)
8.9.3	微生物移植	(210)
8.9.4	外源 DNA 的摄入	(210)
9	体细胞无性系变异	(211)
9.1	体细胞无性系变异的来源	(211)
9.1.1	染色体数目变异	(212)
9.1.2	染色体结构变异	(213)
9.1.3	染色体变异频率	(213)

9.1.4 DNA 扩增	(213)
9.1.5 基因突变	(214)
9.2 影响体细胞无性系变异的因素	(214)
9.2.1 培养基成分	(214)
9.2.2 温度	(215)
9.2.3 组织原有的倍数性	(215)
9.3 花粉植株中的倍数性变异	(215)
9.4 嵌合性	(216)
9.5 植株再生的遗传调控	(217)
9.6 后生遗传变异	(218)
9.7 体细胞无性系变异的应用	(218)
9.7.1 生化代谢途径的研究	(219)
9.7.2 体细胞杂交的选择标志	(219)
9.7.3 作物遗传改良	(220)
10 植物离体繁殖技术	(223)
10.1 果树离体繁殖技术	(223)
10.1.1 苹果离体繁殖技术	(223)
10.1.2 桃离体繁殖技术	(225)
10.1.3 枣离体繁殖技术	(226)
10.1.4 柿离体繁殖技术	(228)
10.1.5 葡萄离体繁殖技术	(230)
10.2 蔬菜离体繁殖技术	(231)
10.2.1 大白菜腋芽培养技术	(232)
10.2.2 石刁柏离体繁殖技术	(233)
10.2.3 无籽西瓜离体繁殖技术	(234)
10.2.4 大蒜离体繁殖技术	(235)
10.2.5 甘蓝离体繁殖技术	(236)
10.3 观赏植物离体繁殖技术	(238)
10.3.1 月季离体繁殖技术	(239)
10.3.2 兰花离体繁殖技术	(240)
10.3.3 杜鹃离体繁殖技术	(242)
10.3.4 康乃馨离体繁殖技术	(243)
10.3.5 唐菖蒲离体繁殖技术	(244)

10.4 林木离体繁殖技术·····	(246)
10.4.1 毛白杨离体繁殖技术·····	(246)
10.4.2 雪松离体繁殖技术·····	(247)
10.4.3 泡桐离体繁殖技术·····	(248)
10.4.4 杉木离体繁殖技术·····	(250)
10.4.5 翅荚木离体繁殖技术·····	(251)
10.5 药用植物离体繁殖技术·····	(252)
10.5.1 芦荟离体繁殖技术·····	(252)
10.5.2 水母雪莲离体繁殖技术·····	(254)
10.5.3 苦丁茶离体繁殖技术·····	(254)
10.5.4 宁夏枸杞离体繁殖技术·····	(255)
10.5.5 党参离体繁殖技术·····	(257)
11 种质离体保存·····	(259)
11.1 超低温保存·····	(260)
11.1.1 植物超低温保存的概念及意义·····	(260)
11.1.2 超低温保存的原理·····	(260)
11.1.3 超低温保存主要设备和基本操作程序·····	(261)
11.1.4 超低温保存材料的类型·····	(262)
11.1.5 超低温保存的方法与技术·····	(264)
11.1.6 冻后细胞活力、存活率及遗传性检测·····	(271)
11.1.7 提高冷冻后细胞或组织存活率的方法·····	(274)
11.2 低温保存·····	(282)
11.2.1 低温保存概况·····	(282)
11.2.2 低温保存方法与技术·····	(283)
11.2.3 低温保存的主要影响因素·····	(288)
11.2.4 存活率及遗传稳定性的鉴定·····	(289)
11.2.5 低温保存与超低温保存的比较·····	(289)
12 植物遗传转化·····	(290)
12.1 农杆菌介导法·····	(290)
12.1.1 生物学特性与转化原理·····	(291)
12.1.2 基本程序·····	(294)
12.1.3 转化方法·····	(301)
12.1.4 优缺点分析·····	(303)



12.2 基因枪法.....	(303)
12.2.1 原理.....	(304)
12.2.2 基本程序.....	(305)
12.2.3 转化方法.....	(306)
12.2.4 优缺点分析.....	(307)
12.3 植株原位真空渗入法.....	(307)
12.3.1 原理.....	(308)
12.3.2 基本程序.....	(308)
12.3.3 转化方法.....	(310)
12.3.4 优缺点分析.....	(311)
12.4 其他较常用的转化方法.....	(312)
12.4.1 电击法.....	(312)
12.4.2 聚乙二醇法.....	(313)
12.4.3 花粉管通道法.....	(314)
12.4.4 显微注射法.....	(315)
12.4.5 其他方法.....	(317)
附表.....	(318)
参考文献.....	(322)

1 绪 论

1.1 植物细胞组织培养的一般概念

所谓植物细胞组织培养(plant cell and tissue culture),是指在离体(in vitro)条件下利用人工培养基(medium)对植物器官、组织、细胞、原生质体等进行培养,使其长成完整的植株。根据所培养的植物材料的不同,我们可以将细胞组织培养分为器官培养(organ culture)(胚、花药、子房、根、茎、叶等器官)、茎尖分生组织培养(shoot tip culture, shoot apex culture, apical meristem culture)、愈伤组织培养(callus culture)、细胞培养(cell culture)、原生质体培养(protoplast culture)等类型。其中愈伤组织培养是一种最常见的培养类型,因为除茎尖分生组织培养和少数器官培养外,其他培养类型都要经历愈伤组织阶段才能产生再生植株。

所谓愈伤组织(callus),原本是指植物在受伤后于其伤口表面形成的一团薄壁细胞。在植物细胞组织培养中,愈伤组织则指在人工培养基上由外植体(explant)形成的一团无序生长的薄壁细胞。在细胞组织培养中,一个成熟细胞或分化细胞转变成为分生状态的过程,即形成愈伤组织的过程,叫做脱分化(dedifferentiation)。将一外植体培养在培养基上,诱导其形成愈伤组织,我们说发生了脱分化。

在植物细胞组织培养中,由活体(in vivo)植物体上提取下来的,接种在培养基上的无菌细胞、组织、器官等均称为外植体。外植体通常是由多个细胞组成的,并且组成它的细胞常常包括不同的类型,因此由一个外植体形成的愈伤组织也常是异质性的,不同的细胞可能具有不同的形成完整植株的能力,即不同的再分化能力或再生能力。植物的成熟细胞经历了脱分化之后,即形成愈伤组织之后,由愈伤组织能再形成完整的植株,这一过程叫做再分化(redifferentiation),或简单地叫做分化(differentiation),或叫做再生(regeneration)。

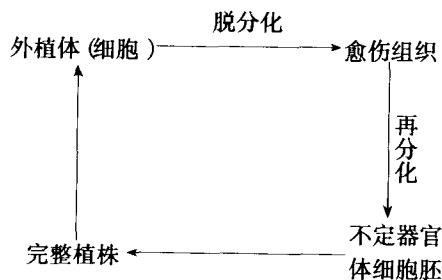
那么,一个脱分化的植物细胞,为什么能够再生成完整的植株呢?我们说植物细胞具有全能性(totipotency)。所谓细胞全能力,是指一个完整的植物细胞拥有形成一个完整植株所必需的全部遗传信息。早在1902年,Haberlandt就预言,植物



体细胞在适宜条件下具有发育成完整植株的潜在能力,只是由于受到当时技术和设备的限制,它的预言未能用实验证实。直到 1958 年,Steward 和 Shantz 用胡萝卜根韧皮部细胞悬浮培养,从中诱导出体细胞胚(somatic embryo)并使其发育成完整小植株,第一次证实了 Haberlandt 提出的组织全能性学说。因此,对于植物细胞来说,不仅受精卵,而且体细胞也具有全能性。对于动物细胞来说,随着最近克隆羊、克隆牛等的成功,也证实了动物体细胞的全能性。

由脱分化的细胞再分化出完整植株有两种途径:一种叫做不定器官形成(adventitious organ formation)或叫做器官形成(organogenesis),即在愈伤组织的不同部位分别独立形成不定根(adventitious root)和不定芽(adventitious bud);另一种叫做体细胞胚胎发生(somatic embryogenesis),即在愈伤组织表面或内部形成类似于合子胚的结构,我们称其为体细胞胚,或不定胚(adventitious embryo),或胚状体(embryoid)。体细胞胚胎发生所经历的发育阶段与合子胚相似,一般经历球形胚(globular embryo)、心形胚(heart-shaped embryo)、鱼雷形胚(torpedo-shaped embryo)和子叶胚(cotyledonary embryo)4 个发育阶段。一般认为,愈伤组织中的不定芽是多细胞起源的,而体细胞胚是单细胞起源的,因此由体细胞胚发育成的植株的各部分在遗传组成上应当是一致的,不存在嵌合体(chimera)现象。当然,也有少数研究者发现,由体细胞胚胎发生途径再生的植株也存在着嵌合体现象,因此认为在一些情况下体细胞胚也起源于多细胞。

综上所述,植物细胞组织培养的全过程可以简单地表示如下:



1.2 植物细胞组织培养的发展简史

植物细胞组织培养的研究开始于 1902 年德国植物学家 Haberlandt, 至今已有整整 100 年的历史。它的发展过程大致分为以下 3 个阶段:

1.2.1 探索阶段

在 Schwann 和 Schleiden 创立的细胞学说基础上,1902 年 Haberlandt 提出,高等植物的器官和组织可以不断分割,直至成单个细胞的观点。预言植物体细胞在适宜条件下,具有发育成完整植株的潜力,即植物细胞全能性的设想。为了证实这一观点,他在加入了蔗糖的 Knop 溶液中培养小野芝麻和凤眼兰的栅栏组织以及虎眼万年青属植物的表皮细胞等。遗憾的是限于当时的技术和水平,结果仅观察到细胞的生长、细胞壁的加厚等,而未看到细胞分裂。然而,作为植物细胞组织培养的开创者,Haberlandt 的贡献不仅在于首次进行了离体细胞培养的实验,而且在其 1902 年发表的“植物离体细胞培养实验”报告中还提出了胚囊液在细胞培养中的作用和看护培养法等科学预见。

1904 年 Hannig 在无机盐和蔗糖溶液中培养萝卜和辣根的胚,并使其在离体条件下发育成熟。1909 年,Kuster 将植物原生质体进行融合,但融合产物未能存活下来。1922 年,美国的 Robbins 和德国的 Kotte 分别报道离体培养根尖获得某些成功,这是有关根培养的最早的实验。Laibach(1925,1929)将由亚麻种间杂交形成的幼胚在人工培养基上培养至成熟,从而证明了胚培养在植物远缘杂交中利用的可能性。

1.2.2 奠基阶段

1933 年我国学者李继侗和沈同研究银杏的胚培养,将银杏胚乳的提取物加入培养基,获得成功。1934 年,美国的 White 由番茄根建立了第一个活跃生长的无性系,使根的离体培养首次获得了真正的成功。他使用的培养基含有无机盐、酵母提取液和蔗糖。1937 年,他用 3 种 B 族维生素即吡哆醇、硫胺素和烟酸,来取代酵母提取液获得成功。在这个后来被称为 White 培养基的人工合成培养基上,他将 1934 年建立起来的根培养物一直保存到 1968 年他逝世前不久。

与此同时,法国的 Gautheret(1934)在培养山毛柳和黑杨等植物的形成层组织时发现,虽然在含有葡萄糖和盐酸半胱氨酸的 Knop 溶液中,这些组织也可以不断增殖几个月,但只有在培养基中加入 B 族维生素和生长素 IAA 后,山毛柳形成层组织的生长才能显著增加。

1939 年 Gautheret 连续培养胡萝卜根形成层获得首次成功。同年,White 由烟草种间杂种的瘤组织,Nobecourt 由胡萝卜根组织,也获得了连续生长的组织培养物。

20 世纪 30 年代,植物细胞组织培养领域出现了两个重要发现:一是认识了 B

族维生素对植物生长的重要意义;二是发现了生长素是一种天然的生长调节物质。加上 Gautheret, White 和 Nobecourt 三者所建立的基本培养方法,奠定了之后各种植物细胞组织培养的技术基础。

1941 年 Overbeek 等在培养基中加入椰子汁,使曼陀罗的心形期幼胚培养成熟,自此,椰子汁开始广泛地应用于植物细胞组织培养中。Skoog (1944) 以及 Skoog 和 崔滋等 (1948) 在烟草离体培养中发现,腺嘌呤或腺苷不仅能促进愈伤组织的生长,而且还能解除培养基中生长素 (IAA) 对芽形成的抑制作用,诱导芽的形成,从而确定了腺嘌呤与生长素的比例是控制芽和根形成的重要条件。

1952 年, Morel 和 Martin 首次通过茎尖分生组织培养获得大丽花的无病毒植株。1953 年, Muir 将万寿菊和烟草的愈伤组织转移到液体培养基中,放在摇床上振荡,获得由单细胞和细胞团组成的悬浮培养物,而且可以继代繁殖。1955 年, Miller 等发现了激动素 (kinetin), 同时发现激动素比腺嘌呤活性高 3 万倍。1957 年, Skoog 和 Miller 提出通过改变细胞分裂素/生长素的比率,能够调节植物的器官形成。1958 年, Steward 等报道在胡萝卜根韧皮部细胞培养中,形成了体细胞胚,并使其发育成完整植株,第一次证实了植物细胞的全能性。

1.2.3 迅速发展阶段

20 世纪 60 年代以后,植物细胞组织培养进入了迅速发展时期,研究工作更加深入和扎实,并开始走向大规模的应用阶段。

1960 年, Cocking 用真菌纤维素酶由番茄幼根分离得到大量活性原生质体,开创了植物原生质体培养和体细胞杂交研究工作。1960 年 Kanta 在植物试管受精研究中首次获得成功,1960 年, Morel 利用兰花的茎尖培养,实现了脱去病毒和快速繁殖的两个目的,这一技术导致欧洲、美洲和东南亚许多国家兰花工业的兴起。

1962 年, Murashige 和 Skoog 发表了促进烟草组织快速生长的培养基组成,这就是目前广泛使用的著名的 MS 培养基。

1964 年, Guha 和 Maheshwari 成功地由曼陀罗花药培养获得单倍体植株,这一发现掀起了采用单倍体育种技术来加速常规杂交育种速度的热潮。1967 年, Bourgin 和 Nitsch 通过花药培养获得了烟草的单倍体植株。

1970 年, Carlson 通过离体培养筛选得到生化突变体。同年, Power 等首次成功实现原生质体融合。1971 年, Takebe 等首次由烟草原生质体获得再生植株,这一成功促进了体细胞杂交技术的发展,同时也为外源基因导入提供了理想的受体材料。1972 年, Carlson 等通过原生质体融合首次获得了两个烟草物种的体细胞杂种。1974 年, Kao, Michayluk, Wallin 等人建立了原生质体的高 Ca^{2+} 、高 pH PEG