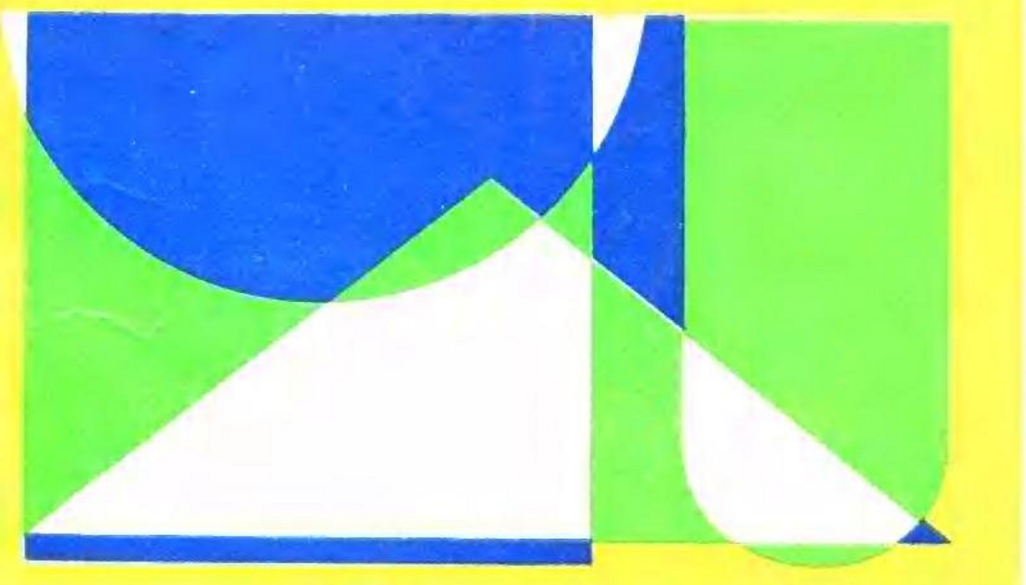


黄学林 李筱菊 编著



高等植物组织离体培养 的形态建成及其调控



科学出版社

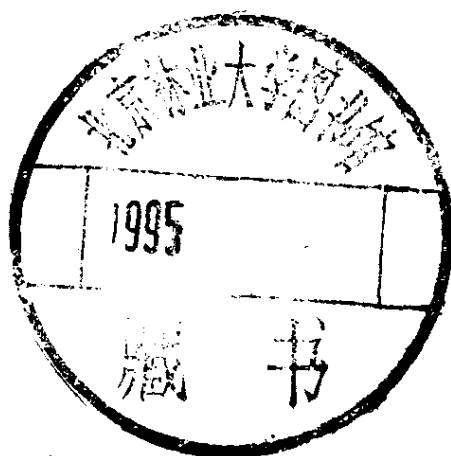
144/08

高等植物组织离体培养的 形态建成及其调控

黄学林 李筱莉 编著



北林图 A00046579



436673

科学出版社

1995

(京) 新登字 092 号

内 容 简 介

本书较系统地从植物生理生化的角度论述植物体细胞组织在离体培养时的形态建成及其调控因素。全书共七章，内容包括：有关的重要理论假说和概念，如全能性，决定作用，感受态和驯化作用；愈伤组织的形成及其形态建成；不定芽、苗的再生；根发生和生根；体细胞胚胎发生；离体成花；原生质体培养及其植株再生。书中还收集了乙烯、多胺以及苯基脲衍生物对上述形态建成的调控作用资料。本书附有图 54 幅，文献 531 条，供进一步查阅。

可供从事植物组织培养及有关生物技术的研究和生产单位人员、大专院校师生参考。

高等植物组织离体培养的 形态建成及其调控

黄学林 李筱菊 编著

责任编辑 彭克里

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

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

*

1995 年 3 月第 1 版 开本：850×1168 1/32

1995 年 3 月第一次印刷 印张：9 1/4

印数：1—1000 字数：253 000

ISBN 7-03-004377-4/Q·540

定价：17.50 元

前 言

植物组织离体培养的形态建成是细胞全能性表达的组成部分，它包含了植株再生的两个基本途径：器官发生和体细胞胚胎发生。组织培养是研究植物离体培养形态建成的基本手段，在某种意义上说，组织培养的历史就是植物细胞全能性理论的提出、证明和应用的历史。经过数十年努力，组织培养结合相关的生物技术如基因工程及原生质体融合等，已在作物改良，良种快繁等方面发挥了巨大的作用，这些技术给农林、医药等生产发展带来的深刻变化已为世人所瞩目。

然而在实践中，组织培养的成功与否往往取决于操作者的经验，有些实验结果难以重复。其原因之一就是对在培养条件下，植物外植体的形态建成的基本机制研究不足和缺乏理论上的总结。

在我国，植物组织培养研究非常活跃，有些研究结果很出色，处于国际先进行列。近年来陆续出版了蔬菜、园艺、树木、花卉、药用植物和经济植物、农作物组织培养的专著（或译著），这进一步推动了我国的组织培养及其相关生物技术的普及和发展。但相比之下，较系统地论述植物组织离体培养的形态建成及其调控的书籍尚十分缺乏，基于此我们编写了《高等植物组织离体培养的形态建成及其调控》一书。

本书是在给研究生开设课程及研究工作的基础上编写而成的，主要涉及植物体细胞组织相关的形态建成，内容共设七章。首先介绍了与形态建成相关的主要理论假说及概念，如全能性、决定作用、感受态和驯化作用等（第一章），接着介绍了愈伤组织形成及其形态建成（第二章）、植株再生的两个基本途径：器官发生〔苗再生（第三章）、根发生和生根（第四章）〕和植物体细胞胚胎发生（第五章），还有离体成花（第六章），最后讨论了原生质体

培养及其植株再生（第七章）。在编写过程中，尽管我们主观上本着阐明基本理论，提出主要问题，反映新近进展的原则，但由于我们水平有限，加上本领域研究进展迅速，资料、信息累积速度惊人，遗漏乃至错误之处，诚望同行及读者们批评指正。

在成书过程中，傅家瑞、张宏达、王永锐、黄溢明等教授给予了热情的鼓励及指导，本研究小组的同志也给予了无私的帮助，在此一并表示衷心的感谢。

黄学林 李筱莉

1994年3月于广州中山大学

用于本书的缩写词

ABA	abscisic acid	脱落酸
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid	1-氨基环丙烷-1-羧酸
ADC	arginine decarboxylase	精氨酸脱羧酶
AOA	aminooxyacetic acid	氨基氧乙酸
AVG	aminoethoxymethylvinylglycine	氨基羟乙基乙烯基甘氨酸
BA	6-benzylaminopurine	6-苄基氨基嘌呤
BIA	1,2-benzisothiazole-3-acetic acid	1,2-苯并异噻唑-3-醋酸
BOA	1,2-benzisoxazole-3-acetic acid	1,2-苯并异恶唑-3-醋酸
CCC	chlorocholine chloride	矮壮素, 氯化胆碱
CK	cytokinin	细胞分裂素
CH	casein hydrolase	水解酪蛋白
CHAS	cyclohexylammonium sulfate	环己氨硫酸盐
CPPU	N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenyl urea (4PU-30, 4PU-Cl)	N-(2-氯-4-吡啶基)-N'-苯基脲
2,4-D	2,4-dichlorophenoxy acetic acid	2,4-二氯苯氧乙酸
DFMA	DL- α -difluoromethylarginine	DL- α -二氟甲基精氨酸
DFMO	DL- α -difluoromethylornithine	DL- α -二氟甲基鸟氨酸

DHZ	dihydro zeatin	二氢玉米素
DHZR	dihydro zeatin-riboside	二氢玉米素核苷
DTT	dithiothretol	二硫苏糖醇
DPU	N-N'-diphenylurea	二苯基脲
EDTA	ethylene diamine thtra acetic acid	乙二胺四乙酸
EFE	ethylene foming enzyme	乙烯形成酶
GA	gibberellin	赤霉素
IAA	indole-3-acetic acid	吲哚乙酸
IBA	indole-3-butyric acid	吲哚丁酸
IEDC	induced embryogenic deter- mined cells	诱导胚胎决定细胞
iP	isopentenyl adenine	异戊烯基腺嘌呤
iPA	isopentenyl adenosine	异戊烯基腺苷
IPA	indole-3-propanoic acid	吲哚丙酸
KT	kinetin (或 KN, KIN)	激动素
MGBG	methylglyoxal bis (guanyl- hydrazone)	甲基乙二醛-双-(脒基脒)
NAA	naphthylene acetic acid	萘乙酸
2, 5-	2,5-norbornadine	2,5-降冰片二烯
NBD		
NOA	β -naphthoxyacitic acid	β -萘氧乙酸
NOP	naphthoxy propanoic acid	萘氧丙酸
ODC	ornithine decarboxylase	鸟氨酸脱氨酶
PCPA	P-chlorophenyloxy acetic acid	对氯苯氧乙酸
PEDC	preembryogenic determined cells	预胚胎决定细胞
PIC	picloram	毒莠定
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇

PUD	phenylurea derivatives	苯基脲衍生物
Put	putrescine	腐胺
9-R-BA	9- β -D-ribofuranosyl-BA	9-D-核糖-呋喃基-BA
SAM	S-adenosylmethionine	S-腺苷甲硫氨酸
SAMDC	S-adenosylmethionine decarboxylase	S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶
Sp	spermine	精胺
Spd	spermidine	亚精胺
STS	silver thiosulfate	硫代硫酸银
2,4,5-T	(2,4,5-trichlorophenoxy) acetic acid	2,4,5-三氯苯氧乙酸
TCA	trichloroacetic acid	三氯醋酸
TDZ	thidiazuron. N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-yl urea	噻重氮苯基脲
TIBA	triiodobenzoic acid	三碘苯甲酸

目 录

前言

第一章 全能性、决定作用、感受态和驯化作用	1
一、植物细胞的全能性及其表达	1
二、感受态和决定作用	2
三、外遗传变化	7
四、驯化作用	8
(一) 驯化作用的诱导	10
(二) 驯化机制	12
(三) 一些类似驯化作用的正常植物发育过程	13
第二章 愈伤组织的形成及其分化	17
一、愈伤组织的形成	17
(一) 诱导期	17
(二) 分裂期	18
(三) 分化期	18
二、愈伤组织的保持	19
三、愈伤组织的形态建成	21
(一) 愈伤组织形态建成的方式	21
(二) 具形态建成和不具形态建成能力的愈伤组织	21
四、愈伤组织诱导、增殖及其形态建成的调控	24
(一) 外植体材料	24
(二) 培养基类型	26
(三) 培养基成分	30
(四) 培养条件	52
五、愈伤组织的形成及其形态建成的某些生理生化基础	57
第三章 器官发生——苗的再生	64

一、器官发生过程中的细胞学和组织学的观察	64
二、苗再生的主要途径	66
(一) 从腋生分生组织中诱导	67
(二) 从不定分生组织中诱导	67
(三) 从茎尖或顶端分生组织中诱导	70
三、苗再生的一些主要调控因素	71
(一) 外植体	71
(二) 培养基	78
(三) 培养条件及其他因素	90
四、苗再生的生理生化基础	92
(一) 含氮化合物(蛋白质、氨基酸和多胺)的合成代谢 和氮同化的变化	93
(二) 碳水化合物的代谢及其利用	94
(三) 自然条件下和基因转化后内源激素变化	95
第四章 器官发生——生根和根发生	101
一、插条不定根的形成及其调控因素	101
(一) 插条生根的类型	101
(二) 不定根发育的主要阶段及其主要调控因子	103
二、组织培养物(无根苗、愈伤组织)的不定根形 成或根发生	128
(一) 不定根形成的细胞学观察	128
(二) 生根培养基成分对不定根形成的影响	132
(三) 培养条件及其他因素的影响	143
第五章 植物体细胞胚胎发生	150
一、体胚发生的几个例子	151
(一) 石龙芮	151
(二) 胡萝卜体胚发生	152
(三) 原生质体的体胚发生	153
二、体胚发生的方式	153
三、胚性和非胚性细胞或愈伤组织	156
(一) 胚性细胞、胚性愈伤组织的特点	156
(二) 胚性感受态及其重要的影响因素	157

四、体胚发生的主要阶段	159
(一) 胚性愈伤组织和体胚的诱导	160
(二) 体胚的早期分化发育	161
(三) 体胚的后期生长发育	162
五、影响体胚发生的主要因素	164
(一) 外植体	164
(二) 生长调节物质	165
(三) 培养基及其主要营养因素	179
(四) 光照和其他培养条件	184
六、合子胚与体胚发育的某些生理生化差异	185
(一) 种胚和体胚成熟及其贮藏物质的合成	186
(二) 种胚、体胚的静止和休眠现象以及它们的耐脱水 能力	187
(三) 种皮和营养组织的作用及其对体胚发育的启示	189
七、体胚发生的分子生物学基础	190
(一) 体胚发生过程中基因表达及其调控	190
(二) 生长素在体胚发生过程中的分子作用机制	194
八、有关体胚发生机理的假说	198
(一) 预决定和诱导决定学说	198
(二) 细胞隔离学说	199
(三) 生理逆境学说	200
(四) 体胚发生是单细胞还是多细胞起源的问题	201
第六章 离体成花及其调控	206
一、研究离体成花的实验体系概述	207
(一) 生殖原基的培养	207
(二) 结合微型手术的离体花芽培养	209
(三) 薄层细胞培养	213
(四) 可直接成花的其他外植体的培养	214
二、花芽和花序外植体在培养过程中形态建成的主要 类型	215
(一) 花芽外植体的愈伤组织化及其进一步分化	215
(二) 逆转为营养性组织	218

三、离体成花的调控	219
(一) 外植体因素	219
(二) 生长调节物质	225
(三) 生长调节物质对花性别和性表现的控制	242
(四) 其他调节因子	249
第七章 原生质体培养及其植株再生	263
一、原生质体的制备和培养方法概述	264
(一) 原生质体的制备	264
(二) 原生质体的培养方法	267
二、游离原生质体的一些重要性质	269
(一) 形态和结构特征	269
(二) 一些生理生化特征	269
(三) 原生质体膜的一些性质	270
(四) 原生质体融合特性	271
三、原生质体的生长、分化及其植株再生	274
(一) 原生质体细胞壁的再生	274
(二) 细胞分裂和愈伤组织的形成	276
(三) 原生质体的植株再生	277
四、影响原生质体培养及其分化发育的主要因素	281
(一) 供体植物种类及其基因型	282
(二) 供体植物的生理状态	283
(三) 酶及酶解反应基质	286
(四) 原生质体存放条件	287
(五) 培养基成分	288
(六) 电激和热冲击处理	295
(七) 培养密度和培养方法	296

第一章 全能性、决定作用、 感受态和驯化作用

一、植物细胞的全能性及其表达

植物组织和细胞培养的理论基础是建立在细胞的全能性的概念上。植物细胞的全能性 (totipotancy) 是指植物的每个细胞具有该植物的全部遗传信息和离体细胞在一定培养条件下具有发育成完整植株的潜在能力。根据细胞理论, 细胞是生物有机体的基本单位。特别是植物细胞又是在生理上、发育上具潜在性的全能单位。在植物的生长发育中, 从一个受精卵分裂到产生具有完整形态和结构机能的植株, 这是该受精卵具有该物种全部遗传信息的表现。同样, 植物的体细胞也是从合子的有丝分裂产生的, 也具有全能性, 即具备着遗传信息的传递、转录和转译的能力。在一个完整植株上, 某部分的体细胞只表现一定形态、行使一定的功能, 这是由于它受到具体器官或组织所在环境的束缚, 但其遗传潜力并没有丧失。一旦脱离其原来的器官或组织影响, 如处于离体状态时, 在一定的培养条件下, 就可能表现出全能性, 并发育成完整植株。

早在 1902 年德国植物学家 Gottlieb Haberlandt 就认为植物单细胞有再生完整植株的潜在能力, 并首次作了离体植物细胞在人工培养基上进行培养的尝试 (转引自 [11]), 尽管当时他未获得实验上的成功, 但提出了一个重要的有关全能性的假设。经过科学家的数十年不断努力, 现在已经完全证实了植物细胞的全能性。其中 50 年代, F. Skoog, F. C. Steward 及其他的一些学者确定了植物组织生长所必须的营养成分, 设计了许多适合各种植物组织培养的有效配方, 如 MS、B₅、N₆、SH 等。使植物的外植

体（即用于第 1 次接种的植物材料）培养在适宜的培养基上形成脱分化而待分化的细胞团——愈伤组织，Skoog 等人又证实了改变培养基中的植物生长调节物质（生长素和 CK）相对浓度可使烟草愈伤组织分化出苗或根。Steward 等人发现了胡萝卜细胞（一小块愈伤组织）在适宜培养条件（液体悬浮培养）下会形成体细胞胚（亦称胚状体），其发育阶段与合子胚相似，最后形成小植株。此后又证实了胡萝卜单一的细胞（不必依赖于其他细胞的参与）亦具有这种能力，这些研究结果都是细胞全能性经典例证。

然而，尽管已确立了植物细胞全能性的理论，但实践上，全能性表达的难易程度在各种植物，甚至在同一植物，同一组织的不同细胞之中都有很大的差别。一般来说，较易表达全能性的细胞可有 3 类：即受精卵、发育中的分生组织细胞和雌雄配子体及单倍体细胞。在绝大多数的情况下，植物细胞全能性的表达要经过一个从分化状态到脱分化的愈伤组织（或悬浮细胞）的中间形式，然后进入再分化和再生的阶段，但也有的在植物组织中直接发生脱分化和再分化的过程，而不需经历愈伤组织的中间形式。所谓脱分化是已分化的组织（细胞分裂已停止）在适当的培养条件下恢复细胞分裂活性，从已分化的状态转变为分生状态。愈伤组织即为典型的脱分化的组织。脱分化的组织或细胞在一定的条件下可有转变为各种不同细胞类型的能力，这一过程即称为再分化。在脱分化和再分化的过程中，细胞的全能性得以表达。植物细胞的脱分化、再分化的过程可以在不同程度上和层次上得以表现。这些表现形式包括离体细胞的分化、器官发生（见第三、第四章）体细胞胚胎发生（第五章）及其植株再生的过程。

二、感受态和决定作用

有关感受态 (competence) 的早期概念是指表达固有的全能性或形态建成的能力^[6]，然而这种能力包括什么，为什么有些细胞或组织具有或将有这种感受态，而其他细胞或组织却无，均无从解

释。近期提出的感受态的概念，相对来说较为专一，认为感受态实际上是一个接受某一发育信号或对某一发育信号的效应能力^[1]。因此可以将它看成一种进行下一步特定的形态建成途径所必须的生理性的，细胞或分子水平上的准备状态。

“决定作用”(determination)这一术语来自动物胚胎发育生物学，意指胚胎某一区域的组织或细胞只能向某一特定方向分化的发育状态。例如在原肠胚发育的后期阶段将其表皮或神经细胞移植于胚中的另一位置，这些细胞将会持续形成其原先所在位置时应该形成的器官。这些细胞及其发育的命运即已被决定，已决定的细胞是稳定的，其特性不被其环境所改变。某组织或细胞的决定状态及其程度必须用离体培养或异位移植的方法来测定。

I. M. Sussex 认为“决定作用”有 4 个特点：①高频率存在；②是直接性的；③是相对稳定的；④可以通过无性（有丝分裂）传递下来^[16]。在植物中是否存在着“决定作用”，人们一直给予极大的研究兴趣。植物全能性的证实，使植物“决定作用”的概念面临着极大的挑战。一般认为植物的“决定作用”不像动物中那样明显，如将蕨类的叶原基离体培养，在培养的早期，其叶发育的命运并非已决定，而可以通过改变培养条件使之发育成芽；但培养一段时间后，它则成为决定状态发育成叶；因此在整体上说，叶原基是处于决定状态。还有不少例子证明植物器官发育显示决定作用，如烟草离体胎座组织，在培养条件下伸长形成带顶生柱头的花柱状结构，这说明离体胎座组织显示作为雌性组织的决定状态。有些植物的茎尖表现出两种不同的稳定状态，如对春化作用的反应即表现种属的特性。有的植物茎尖完成春化作用之后，它不可能再进行春化；除非春化处理（冷处理）相隔时间尚不长。如冬黑麦茎尖一旦完成春化之后，它可通过许多连续的细胞分裂而毫不减弱地传递下去。木本植物常常表现出“幼龄”和“成年”两种状态，来自不同状态的外植体在离体条件下其生根能力有很大差别，这是木本植物无性繁殖过程中的普遍现象。

为了更好地说明这两个发育上的概念，这里先结合 2 个有关

例子进一步讨论：苜蓿愈伤组织在含有 2, 4-D 和 KT 的培养基上仍以愈伤组织的形式持续生长。一旦转入无激素的培养基后，其器官发生的形式则决定于原培养基（诱导培养基）中 2, 4-D 和 KT 的比例，若该比例高则形成苗，若低则形成根（这一现象刚好与烟草愈伤组织分化的情况相反）。愈伤组织的大小亦影响其转移培养后的器官发生能力，如直径小于 $100\mu\text{m}$ 则丧失器官发生能力，最适直径为 $200\text{—}800\mu\text{m}$ ，而且愈伤组织块中所含的细胞数不能少于 12 个（图 1-1）^[19]。

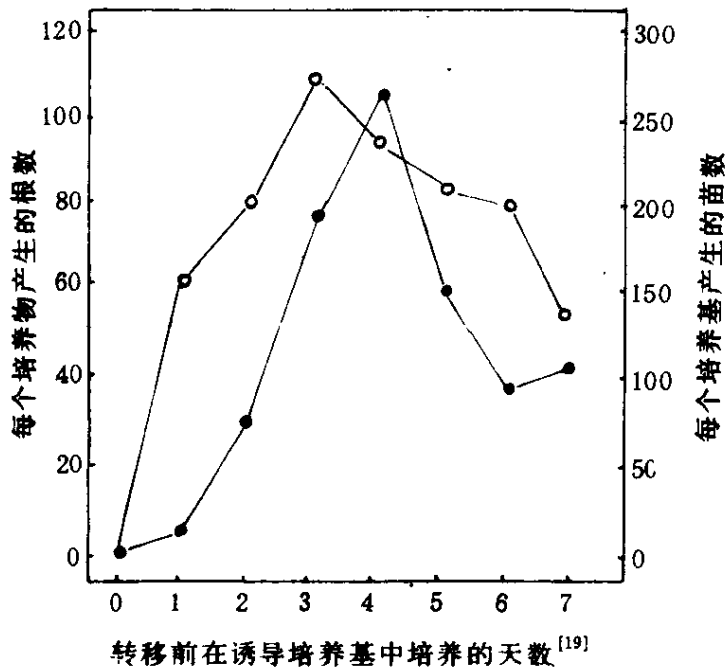


图 1-1 苜蓿愈伤组织诱导成苗或根的情况

根诱导培养基 SH+ $5\mu\text{mol/L}$ 2, 4-D, $50\mu\text{mol/L}$ KT

芽诱导培养基 SH+ $50\mu\text{mol/L}$ 2, 4-D, $50\mu\text{mol/L}$ KT, 在

诱导培养基中培养 3—4 天可得器官发生最强的感受态

从这个实验可知：①愈伤组织已具有对于 2, 4-D 和 KT 诱导效应进行响应的感受态。②当诱导培养时，在器官真正形成及所要求的分化条件获得之前，已有器官发生的决定作用存在。③对器官发生产生响应的感受态还取决于愈伤组织细胞团的大小。

田旋花 (*Convolvulus arvensis*) 叶外植体器官发生过程中也存

在着类似的现象。在该外植体进行器官发生之前，先形成愈伤组织。在这里愈伤组织对于诱导培养基的反应能力可称为器官发生的感受态（图 1-2）。

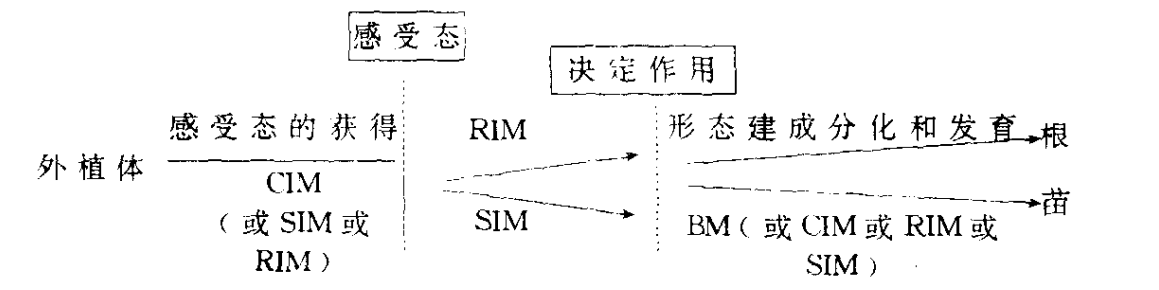


图 1-2 田旋花叶外植体苗和根的诱导
外植体可在各种培养基中获得感受态。诱导作用需要专一性的诱导因子，随后在基本培养基（BM）中进一步发育^[2]

诱导培养基可分为愈伤组织诱导培养基（CIM），成苗诱导培养基（SIM）和成根诱导培养基（RIM）。转移到 SIM 之前在 CIM 中预培养可缩短 SIM 上决定苗形成所需的时间（表 1-1），当愈伤组织在 CIM 上预培养不同时间，然后转移到 SIM 上不同时间后，最后转入基本培养基（BM）上，此时只有具苗决定的外植体才能形成苗。田旋花基因型 19 的叶外植体在 SIM 中需 14 天的诱导才能实现苗决定（表 1-1），如在 CIM 中预培养 3 天，则在 SIM 中诱导时间可缩短 3 天，便可在 BM 中形成苗，在一定时间范围内随着在 CIM 中预培养的时间延长，在 SIM 中诱导苗决定的时间也进一步缩短。但在 CIM 预培养一定时间之后，若再继续延长培养时间，则不能继续缩短苗决定的诱导时间。实际上这种在 SIM 上培养的最低限度时间是根的诱导所要求的。从培养的总时间里减去苗形成的决定所需时间便是外植体获得感受态所需的时间（表 1-1）。基因型 19 获得感受态时间是在 SIM 上培养 7 天。