

绪 论

一、植物组织培养的概念

1904年，Hannig 提出了一种新的植物培养方式，称之为胚培养（embryo culture）。他将几种十字花科（Cruciferae）植物的胚剥离下来，并在离体（in vitro）的条件下得到成活的植株。从1920年起，许多植物培养方法得到发展，如体外播种兰花种子、愈伤组织培养（callus culture）、器官培养 organ culture 等。1945年后，种种不同的培养都划归到植物组织培养名下，所以，广义的植物组织培养（plant tissue culture）包括了多种离体培养（in vitro culture）技术，即在无菌条件下，在营养培养基上对离体的植物器官、组织、细胞和原生质体，甚至包括完整植株所进行的培养。其主要特征是：一般在玻璃培养器皿（试管、培养皿、三角烧瓶等）中进行；培养环境排除了微生物如病毒、细菌和真菌，以及植物害虫如昆虫和线虫侵入的可能，保持无病、无菌、无虫害的生长条件；各种环境条件如营养因子、激素因子，以及光照、温度等物理因子处于人工控制之下，并可达到最适水平；通常打破了正常的植物发育路线和格局；随着单细胞和原生质体培养技术的发展，对植物体显微结构进行操作成为可能，并为遗传操作奠定了重要基础。

二、植物组织培养的分类

由于植物组织培养所采用的培养基、培养材料、培养方法和培养目标的不同，因而可以划分为种种不同的类型。例如，根据培养基固化程度的不同，可分为固体培养（一般采用琼脂固化培养基）、半液半固体培养和液体培养。液体培养按培养方法又可分为振荡培养、旋转培养和静置培养等。如果在液体培养基中放入滤纸作为培养物的支持物，则可称之为纸桥培养。根据培养材料不同，可分为：完整植株培养。胚胎培养。器官培养，包括花序培养，花器官（子房、胚珠及胎座组织、雌雄蕊、花萼和花冠）培养，根（尖）、茎（尖）、叶、果实种子及其切段或原基的培养。组织培养，包括（茎尖）分生组织、薄壁组织、输导组织、胚乳组织等的培养，以及对由各种外植体诱导形成的愈伤组织的培养。愈伤组织培养也称狭义的“组织培养”。细胞培养，包括从活体组织上游离分散性较好的细胞或微细胞团的培养，也称为（细胞）悬浮培养。⑥原生质培养 protoplast culture 和体细胞杂交 包括对去掉细胞壁的细胞原生质体培养及杂种细胞原生质体的培养。在单细胞培养中，可以采用看护培养、平板培养和微室培养三种方法。

三、植物组织培养的用途

植物组织培养的用途可分为四大类：首先可以对植物体进行无性快速繁殖（即微繁殖）。第二是大规模细胞培养可以用来生产次生代谢物质（如医药、香料等植物化学成分）。第三是用于育种，如花药花粉培养产生单倍体；胚乳培养产生三倍体；胚培养挽救杂种胚；原生质

体培养进行体细胞杂交，以及植物组织培养用于突变体筛选和遗传操作；离体种质保存等。第四是用于理论研究，如植物组织培养用于植物生理学、病理学、（比较）胚胎学、细胞与分子生物学等的研究。

四、植物组织培养发展简史

植物组织培养的发展可追溯到 19 世纪。Schwann 和 Schleiden(1839) 提出细胞学说 Cell theory 及细胞全能性理论 (totipotency theory)。细胞全能性理论认为，每一个细胞都是一个自主的基本的有机体，原则上具备再生完整植株的能力。细胞全能性理论已成为植物细胞和组织培养的理论基础。

1902年 德国植物生理学家 Haberlandt 第一次尝试采用植物组织培养技术，对小野芝麻凤眼兰的叶肉组织，以及万年青属植物的表皮细胞等进行培养，但未能诱导细胞分裂。

1904 年，Hannig 首次在培养基上对十字花科的萝卜和辣根菜的胚培养获得成功。

1909 年，Kuster 进行了植物原生质体的融合工作，但未能培养成活。

1922 年，Knudson 将兰花种子在离体的条件下非共生萌发。同年，Knotte 和 Robbins 对离体的根尖进行了培养。Robbins(1922) 还对豌豆、玉米及棉花的茎尖进行了培养，只形成一些缺绿的叶和根。

Laibach(1925) 利用胚培养技术对亚麻 (*Linum*) 的种间杂种胚进行了培养，并于 1929 年利用亚麻的胚培养来克服杂交不亲合性 (cross incompatibility)。

1933 年，中国生理学家李继侗培养银杏胚胎，并发现银杏胚乳提取液可促进离体胚的生长。这一发现启发后来的工作者在培养基中加入胚乳乳汁液、幼嫩种子或果实提取液，促进外植体的生长和分化。

1934 年，White 对番茄的离体根培养获得成功，并发现番茄根尖不同部位的烟草花叶病毒浓度不同：旺盛生长的根尖部位低，而成熟部位则很高。这种病毒浓度梯度为后来采用茎尖培养进行脱除病毒开辟了道路。由于生长素尚未发现，Gautheret(1934) 离体培养山毛柳、墨杨等一些树和灌丛的形成层组织，在含有葡萄糖和水解乳蛋白的 Knop 溶液的固体培养基上连续培养几个月后，只得到了近似藻类的突起物，但未能获得再生植株。

1936 年，LaRue 对多种裸子植物的胚进行了培养。

White(1937) 发现 B 族维生素对离体根培养的重要性，并指出生长素 IAA 对植物生长发育的控制有着重要作用。

Gautheret(1937,1938) 在培养基中加入上述生长因子，使得柳树形成层诱导形成的愈伤组织连续生长。Nobecomt(1937,1938) 对烟草种间杂种幼茎切段的原形成层培养也获得类似的结果。

1940 年，Gantberet 对榆属 (*Ulmus*) 的形成层组织进行离体培养，以研究不定芽的形成。

1941 年，Van Overbeek 利用椰子汁（内含一种细胞分裂因子），对曼陀罗的幼胚进行了培养，并达到成熟。同年，Braun 进行了瘿组织的离体培养。

1943 年，White 重新提出植物细胞全能性学说，并出版了《植物组织培养手册》。

1944 年，Skoog 首次采用烟草的离体培养来研究不定芽的形成。

Loo(1945) 对天门冬属 (*Asparagus*) 离体茎端进行了培养。

1946 年，Ball 从羽扇豆属 (*Lupinus*) 和旱金莲属 (*Tropaeolum*) 的茎尖培养中首次得到完整的植株。

1948 年，Skoog 和 Tsui 通过对烟草茎段和髓培养发现，不定芽和不定根的发生由生长素

/腺嘌呤的比例决定。

1950年, Ball从红杉 *Sequoia semperrirens* 愈伤组织培养中再生获得器官。

1952年, Morel 和 Martin 通过分生组织培养获得大丽花的脱病毒植株; 同年, 他们首次应用微型嫁接技术。

1953年, Tulecke 首次从花粉培养中获得银杏 (*Ginkgo biloba*) 的单倍体愈伤组织。

Strauss(1954)在玉米胚乳培养中对核型和染色体行为的变化进行了观察; 同时, Muir 等首次从单个细胞培养中获得再生植株, 但其使用的培养材料为冠瘿细胞, 而非正常组织细胞。

1955年, Miller 等发现了一种促进细胞分裂的植物激素——激动素, 后来发现激动素可用来代替腺嘌呤促进芽的形成, 而且其效力比后者高 3 万倍。

1956年, Tulecke 和 Nickell 利用复升悬浮系统 (multi-litre suspension systems) 从培养物中生产次生代谢产物。

1957年, Skoog 和 Miller 发现改变细胞分裂素/生长素的比例, 可以控制根和芽的发生。

1958年, Maheshwari 和 Rangaswamy 从柑橘胚珠的珠心组织培养中再生获得体细胞胚; 同年, Reinert 和 Steward 分别从胡萝卜 (*Daucus carota*) 的愈伤组织和细胞培养中再生得到原胚, 为以后的组织培养中器官发生和体细胞胚胎发生奠定了基础, 也为植物细胞全能性理论提供了证据。

1959年, Gantheret 出版了第一部涉及范围广泛的《植物组织培养手册》。

1960年, Kanta 首次成功地对虞美人 (*Papaver rhoeas*) 进行试管授精 (test tuber fertilization)。同年, Cocking 利用真菌的纤维酶酶解植物细胞壁, 获得大量原生质体; Morel 利用兰花茎尖培养对兰花进行营养繁殖。Bergmann(1960) 对细胞悬浮液进行过滤 并利用植板法游离单个细胞。

1962年, Murashige 和 Skoog 开发出最著名的 Murashige 和 Skoog 培养基 (MS 基本培养基), 并成为后来广泛采用的基本培养基。

1964年, 印度人 Guha 和 Maheshwari 利用曼陀罗 *Datura* 花粉培养获得第一例单倍体植株, 从而开辟了后来以花药培养为基础的单倍体育种技术。

1964年, Mathes 在颤楸 (*Populus tremaloids*) 的愈伤组织上实现根和芽的再生。

1965年, Aghion-Prat 对烟草离体组织诱导成花。同年, Vasil 和 Hildebrandt 从烟草的微培养 (micro-culture) 游离到单个细胞进行植株分化。

1967年, Pierik 利用春化处理对缀花 *Lunaria annaria* 进行开花诱导。同年, Bourgin 和 Nitsch 从烟草花粉培养中获得单倍体植株。

1969年, Sacristan 和 Melchers 对烟草愈伤组织培养产生的再生植株进行核型分析。同年, Eriksson 和 Jonassen 首次成功地从 *Hapopappus gracilis* 的悬浮培养中游离得到原生质体。

1970年, Carlson 进行离体生化突变体的筛选工作。同年, Kasha 和 Kao 利用胚培养技术产生大麦的单倍体。Power 等(1970)首次实现原生质体的融合。

1971年, Takebe 等获得第一例原生质体培养的再生植株。

1972年, Carlson 等利用原生质体融合, 在两个烟草属 *Nicotiana* 中进行种间杂交 (interspecific hybridization)。

1973年, Pierik 等发现细胞分裂素可以打破扶郎花属 (*Gerbera*) 头状花序的休眠。

1974年, Murashige 等利用细胞分裂素诱导茎尖侧芽分枝 (axillary branching)。同年,

Binding 从矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 的原生质体培养再生出单倍体植株。Melchers 和 Labib (1974) 发现单倍体原生质体的融合可以产生杂种。Reinbard (1974) 在植物组织培养中进行生物转化 (biotransformation)。Zaenen 等 (1974) 和 Larebeke 等 (1974) 发现土壤农杆菌 *Agrobacterium* 中根瘤诱导的主要成分是 Ti 质粒。

1975 年, Gengenbach 及 Green 在玉米愈伤组织培养中进行抗长孺孢菌 (*Helmintho Sporium mayclis*) 的正向选择。

1976 年, Seibert 对低温培养贮存的康乃馨茎端进行芽启动。同年, Power 等利用原生质体融合技术进行矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 和拟矮牵牛 (*Petunia parodii*) 的种间杂交。Bomhoff 等 (1976) 发现章鱼碱 (octopine) 和胭脂仙人掌素 (nopaline) 的合成和阻遏是受土壤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的 Ti 质粒遗传控制。

1977 年, Chilton 等成功地将土壤农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 中的 Ti 质粒 DNA 整合到植物体中。

1978 年, Melchers 等进行了番茄和马铃薯的体细胞杂交。

1979 年, Marton 等提出了利用植物原生质体和土壤农杆菌 (*Agrobacterium*) 共培养 (cocultivation) 的方法进行转化。

1980 年, Alfermann 等对固定细胞进行毛洋地黄毒苷 (digitoxin) 向异羟基洋地黄毒苷 (digoxin) 的生物转化。

1981 年 Larkin 和 Scowcroft 引入“体细胞无性系变异 (somaclonal variation)”这个术语。同年, Siderov 等通过对诱变剂处理的白花丹烟草 (*Nicotiana plumbaginifolia*) 的单倍体原生质体的细胞群落的大规模检测来分离营养缺陷型。

1982 年, Krens 等的工作表明, 原生质体可以摄入裸露的 DNA, 表明可以用外源 DNA 对原生质体进行遗传转化。Zimmermann (1982) 利用电刺激进行原生质体融合。

1983 年, Palletier 等在小红萝卜属和芸苔属间进行属间细胞质杂交 (intergeneric-cytoplasmic hybridization)。

1984 年, Paszkowski 等利用质粒 DNA 对植物细胞进行转化。

1985 年, Horsch 等用土壤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 对叶盘进行感染和转化 并得到再生的转化植株。

经过近十多年的发展, 人们对多种培养基和培养条件进行了革新、探索和尝试, 利用一切可行的物质和手段对植物组织、器官和细胞进行培养, 如电刺激 (electrostimulation) 呼吸气体的调控 (manipulation), 培养筛、培养膜和玻璃棒 (culture rafts, membranes and glass rods), 看护培养 (nurse culture), 非离子表面活性剂 (nonionic surfactants), 生物反应器 (bioractor), 机器人和自动化 (robot and automation) 等。目前, 植物组织培养已成为多项技术的基础, 如脱病毒和微繁殖、次生代谢物的生产, 以及作为植物遗传工程的平台进行遗传转化和体细胞杂交等。

虽然可以进行植物组织培养的植物种类已经很多, 但是仍有许多种群如藻类植物 (Algae)、苔藓植物 Bryophytes)、蕨类植物 Pteridophytes 和裸子植物 Gymnosperms 等仍有待于开发和培养。另外, 依然存在许多难以进行组织培养的植物种类, 以及某些植物种类培养技术仍不成熟和不完善。随着自然界生物多样性的萎缩, 以植物组织培养技术为基础的遗传资源保存与创新, 并通过生物技术提高农作物的产量, 生产农业生物化学和医药急需的次生代谢物, 将为新一轮的“绿色革命”创造重要条件。因而, 在未来的世纪中, 植物组织

培养技术仍将是生命科学的前沿阵地。

(郑成木)

参 考 文 献

- 1 Pierik RLM. In vitro culture of higher plants. Dordrecht/Boston/Lancaster; Martinus nijhoff Publishers, 1987.
- 2 赵国凡, 王兴理. 植物组织培养概论. 大连: 大连理工学院出版社, 1988
- 3 杨增海. 园艺植物组织培养. 北京: 农业出版社, 1987

第一章

植物组织培养理论原理

第一节 植物细胞全能性

一、植物细胞全能性

作为植物组织培养的理论基础，植物细胞全能性 (plant cellular totipotency) 概念是与细胞学说 (cell theory) 分不开的。Schleiden 和 Schwann(1839) 提出的细胞学说认为细胞是多细胞有机体的结构和功能单位，它本身也是一个基本的有机体。细胞是通过细胞分裂而产生的。在多细胞生物的发育过程中，受精卵或合子同其他的细胞类型截然不同，它可以经过一系列分裂而形成形态、结构和功能不同的子细胞或细胞群，进而形成一个具有完整的形态结构和功能的有机体。合子内在固有包含形成一个新的有机体的基本的遗传信息。特殊地，种子植物的合子要经过一个胚性发生阶段 (embryogenic phase) 以形成未来植物体的发育模式。由于胚包含未来植物体营养器官的形态上已经分化的原基，当遇到合适的水、光、温条件，它将很快生长形成一个新的植株。由于体细胞是由合子经有丝分裂产生的，因而也应具备合子所赋予的全部遗传信息和发育潜力。

从理论上讲，植物细胞全能性是指植物体的每个生活细胞都具有该植物体的全部遗传信息，在特定的离体培养条件下，具有发育成完整植株的潜在能力。显然，那些高度特化的组织和细胞，几乎不可能再分裂以进一步表达其遗传潜力，因而也不能表现细胞全能性，如细胞核已经开始崩解、细胞壁增厚超过 $2\mu\text{m}$ 成熟管胞的细胞壁有 $7\mu\text{m}$ 厚的筛管和木质部成分。全能性表达最有力的证据应该是通过胚状体阶段分化形成完整的植株。

二、分化、脱分化与再分化

细胞分化 (differentiation) 是指个体发育过程中，不同部位的细胞的形态结构和生理功能发生改变，形成不同的组织和器官。一般而言，分化是一个不可逆转的过程，但是植物细胞即使高度成熟和分化，只要它们有一个完整的膜系统和一个生活的核，它们就具有向分生状态逆转的能力。在一个完整植株上，某一部位上的体细胞只表现特定的形态和行使特定的功能，虽然其遗传潜力并未丧失，但它们的特化程度不同，因而这种向分生状态逆转的程度和能力有赖于其原位所达到的细胞学状态和生理状态。如上所述，高度特化的某些筛管和木质部成分，几乎丧失这种能力。

将从已分化的组织上游离得到的处于不分裂、静止状态的细胞生长在促进其增殖的营养

培养基上培养，这些细胞首先要经历一定的变化才能达到分生状态。这种变化包括在细胞静止(cytoquiescence)过程中 被溶酶体活动破坏的那些无功能的细胞成分的更新。我们将成熟细胞恢复分裂活性、向分生状态逆转和形成脱分化的愈伤组织的现象称之为脱分化(dedifferentiation)。一般而言，外植体通常包含不同类型的细胞，因而在形成愈伤组织后，其组成上，它们形成一个完整植株或植物器官的能力是异质的。

对于一个已分化的细胞，表达其全能性的过程应该首先经历脱分化，尔后再经历一个再分化的过程。再分化(redifferentiation)是指脱分化的细胞或组织在特定的条件下转变成各种不同的细胞类型的现象。但也有例子表明，一个分化的细胞可以不经愈伤组织化阶段而直接发生再分化。

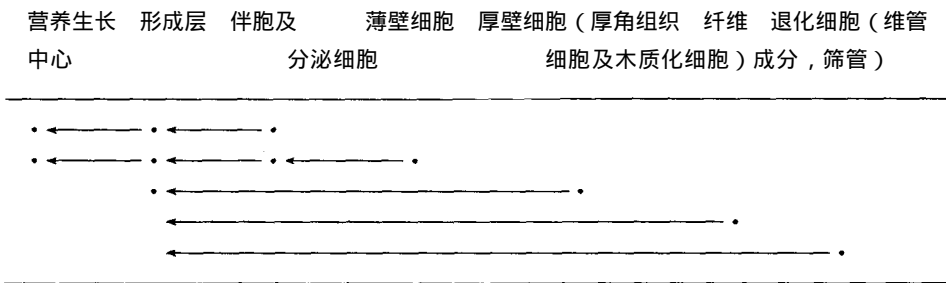


图 1.1 不同细胞类型脱分化过程可能进行的程度
(引自 Gautheret, 1966)

三、细胞全能性与细胞类型

尽管理论上每个生活的植物细胞都具有全能性，但其实际表达的难易程度却随植物种类、组织和细胞的不同而异。通常，受精卵或合子、分生组织细胞和雌雄配子体细胞较易表达其全能性。

(一) 体细胞全能性的表达

Haberlandt(1902 首次进行离体植物细胞的培养 虽然未能成功 却预示了未分化的植物细胞具有向正常的胚胎发生逆转的能力。真正表明植物细胞全能性的例子是 Steward 和他的合作者在 50 年代利用胡萝卜根组织作外植体所做的培养工作。他们把胡萝卜的次生韧皮组织薄片培养在含有椰子汁的固体培养基上，产生由薄壁组织细胞构成的增殖细胞团。将这些愈伤组织转移到具有同样成分的培养基上振荡培养时，会产生单个细胞和细胞团。这些细胞是否成活，可通过镜检其细胞质流 cytoplasmic streaming 得知。通过检查发现 单个细胞是从愈伤组织上游离下来的，而细胞团块是由细胞分裂后聚集在一起形成的。不经继代培养，这些细胞团块会在液体培养基中形成根原基。当将这种生根的细胞团块转移到固体培养基表面时，会有芽发生，继而形成一个完整的植株。但是，他们对单个细胞在游离状态下经不同阶段发育成一个完整植株的尝试却并未成功。直到 1965 年，Vasil 和 Hildebrandt 的试验表明，杂种烟草的 1 个单个细胞可以在特定的培养基上形成一个能够开花的完整的植株。

上述结果极大地鼓舞了这个领域的工作者，但却离严格的全能性的定义相差甚远，因为上述单个细胞并未遵循像合子那样的发育路线，即在形成 1 个植株之前要经历 1 个胚胎发生阶段。从这一点看，Reinert(1959)的工作尤为重要。他将从胡萝卜根诱导形成的愈伤组织继代培养在一系列培养基上，经球形胚形成双极胚，最后发育成完整的植株。但体细胞的单细胞起源的证据并不充分。一直到 1963 年，Steward 和 Wetherell 与 Halperin 几乎同时报道了

胡萝卜的游离细胞培养在琼脂植板上可产生上千个胚胎，就如真正的合子胚胎发生那样，经历球形胚、心形胚及鱼雷形胚阶段。最后，Backsh usemann 和 Reinert(1970)的工作表明游离的单个细胞也可以转变成胚胎，即得出胚状体(embryoid)是单细胞起源的结论。其后的工作表明，植物体的任何部位，合子、胚珠、珠心、根、茎、上下胚轴、叶柄、叶肉原生质体、花芽等，几乎都可以像合子发育那样表达其全能性。但是，由于技术原因，体细胞胚胎发生的植物种类还很有限。

(二) 性细胞全能性的表达

精子、卵子以及与此相关的配子体世代的单倍体细胞不仅仅是特化的生殖单位，而且也具有发育成多细胞有机体的潜在能力。在活体状态下，单倍配子体可以经单性生殖(parthenogenesis)、孤雌生殖或孤雄生殖而发育成单倍体胚，继而形成单倍体植株。在远缘杂交时，温度剧变、辐射或化学试剂处理时多出现此种情况。在离体培养条件下，尤其是雄配子体花粉粒的营养细胞和生殖细胞有极大的倾向经胚胎发生途径发育成完整植株。对天仙子(*Hyoscyamus niger*)花药培养的观察已表明这一点。

第二节 决定作用与形态发生感受态

植物器官的形成是一个有序而可以预测的过程，细胞和组织由于被决定而经历特定的形态发生途径。所以，植物组织培养的启动、分化的诱导，甚至由培养细胞再生获得完整植株，都有赖于对决定过程的操作。

单细胞和原生质体培养再生植株，诱变处理细胞获得目标变异，原生质融合获得种间杂种，以及外源基因在培养细胞中的表达，都受到组织培养技术本身的限制。例如，某些植物种类难以进行植株再生和遗传操作，亲缘关系很近而基因型不同的品种对组织培养的反应有很大差异，另外，简单的培养细胞会导致非表型和非遗传的变异等等。这些都制约着上述技术在品种改良中的应用。但是，植物组织培养与其说是一门科学，倒不如说是一门技术。启动培养和植株再生在很大程度上依靠经验改变培养条件来实现，对于一些关键因素，如激素如何改变决定状态(the determined state)，为什么不同植物种类及不同组织对培养的反应存在能力上的差异等，仍然所知不多。

一、决定

决定(determination)在动物胚胎发育生物学中的原意是指胚胎某一部位的组织或细胞向特定器官分化的发育状态。移植实验表明，即便将原肠胚发育后期的表皮和神经细胞改变位置，这些细胞仍将形成在原先位置时应该形成的器官。细胞的发育命运一旦决定，就保持稳定的发育特性，不受环境条件的变化而改变。决定状态或程度可以由异位移植和离体培养来测定。

决定同大多数发育过程不同，只有当有机体的部分置于实验操作时，才可知道其存在与否。也就是说，组织或细胞置于新的环境条件下仍可继续形成其在原先环境条件下发育形成的特定结构，我们才说这些组织或细胞是被决定了的。因而，决定包含两方面的含义：首先，它是相对的，既依赖于组织或细胞的特性，又有赖于实验处理；其次，决定能引起稳定的表型变化，即当能引起某种表型变化的外部因子去掉后，仍将产生原来的表型变化，这种稳定性使得这些细胞保留了对过去的“记忆”。这也是发育前进性的基础。

Sussex 认为决定作用有四个特点：高频率存在；是直接性的；是相对稳定的；

可以通过无性过程（有丝分裂）传递下来。人们很早就注意到植物发育可以带来稳定的表型变化。例如，在胚胎发生中，根和芽分生组织都从同一个细胞合子产生，即使从植物体上游离下来进行离体培养，根分生组织仍旧形成根，而芽分生组织仍旧形成芽。这种稳定的变化在光诱导开花现象中尤为明显。例如，种子植物在发育过程的某个时候会由营养生长向生殖生长转变，早先产生芽的分生组织会发育成花。苍耳（*Xanthium pennsylvanicum*）的开花诱导中需要短日照处理。这种成花状态一旦确定，就将终生继续，即使在非诱导性条件（如长日照条件）下仍将如此。嫁接实验证明，诱导信号是由叶片接受并传递给芽分生组织，即使数天后叶片丧失这种诱导状态，芽分生组织仍确定地向花发育。

对于一个既定的发育过程，稳定性事件何时发生，在植物的哪个部位发生，存在着很大的差异。例如，紫苏属（*Perilla*）的光诱导成花状态，可以通过诱导后的叶片的系列嫁接向未诱导植株上传递，但这种诱导状态却需要诱导叶片来维持。因而可以说，紫苏属（*Perilla*）成花状态的稳定转变是在叶片中发生，而苍耳属（*Xanthium*）的成花状态却是在芽分生组织中发生，而且这些稳定性事件是在花形成开始前。菊花属（*Chrysanthemum*）的形成花状态转变则发生在心皮发生之后，而凤仙花（*Zmpatiens balsamina*）的成花分生组织即便形成几轮花后仍可向营养生长状态逆转。

随着决定作用的继续，组织的发育潜能会受到限制。桂皮紫箕（*Osmunda cinnamonea*）的叶原基离体后培养在包含无机盐和蔗糖的培养基可以继续其发育。与早期的叶原基相比较，尽管形态上已有区别，但却能产生完整的芽。随着离体时叶原基发育年龄的增加，芽发育的机会降低，而叶发育机会增加。所以，在较早期阶段，叶原基与产生叶原基的芽分生组织具有同等发育潜力。在发育的晚期，叶原基发生稳定变化，因而其发育潜力受到限制，只能形成叶。对花形成过程作同样的试验发现，伴随着发育潜能的限制，不同的花器官依次固定化。

在分生组织中也存在这种相继决定状态（*successive states of determination*）。南美杉（*Arancaria excelsa*）的树形是在单个直立的茎干上，初级枝条以层状排列，次级枝条从初级枝条上发出并与初级枝条在同一水平面分布排列。Vochting(1904)发现，生根插条的直立茎尖可以生长成完整的植株，而且外形也正常；但是生根的初生茎尖尽管可以分枝，却不能垂直生长；而生根的次生茎尖却不能分枝，只水平生长出纤细的枝条。在发育过程中，直立茎干的分生组织不仅产生茎干结构，也产生初级枝条分生组织，初级枝条分生组织依次产生次级枝条分生组织。因而，Vochting 的实验表明，这些分生组织经历一个发育潜能的顺序限制过程，而在分裂细胞群中保持着不同的决定状态。

二、感受态

感受态 *competence* 早期指固有全能性的表达或形态建成的能力。在后来的发展中 感受态的定义逐渐扩宽，是指细胞的反应状态，即对特殊刺激或信号的反应能力。这个术语在与决定一起讨论时，有两个方面的含义。第一，感受态是指细胞在诱导被决定时的一种短暂状态。例如， Sl_2 等位基因纯合的番茄植株，雄蕊发育异常，短而侧向分离，花药退化。当用生长素吲哚乙酸处理正在发育的花后，雄蕊原基会形成心皮状器官；而用赤霉素处理后，则形成正常的雄蕊。这说明，在雄蕊形成过程中存在一段有限的感受态时期。因为实验表明，当雄蕊原基长度不到 0.15mm 时，赤霉素处理才有效。

感受态的另外一个含义是，它常用来描述由决定引起的细胞反应的变化。将营养生长的烟草离体茎段外植体，培养在诱导培养基上会形成叶芽；而开花的烟草近花端茎段外植体，在同样条件下培养则形成花。向开花状态的转变引起茎段组织感受态的变化，虽都以器官发生

反应，但却形成不同的器官。对于日中性的烟草，这种变化极为短暂，在培养中按一定的顺序多次转接，这种开花的感受态就会丧失。

但在另外一些例子中，这种感受态却相当稳定。某些植物光诱导成花时需要冷处理（春化作用）才能感受成花。二年生天仙子（*Hyoscyamus niger*）品种在 17℃ 下可以生长形成器官，但无论在长日照或短日照条件下均不能开花。但如果将其实生苗低温培养数天后，再到短日照条件下生长，则只有经长日照处理后它才能感受成花。而这种感受态可以在旺盛生长的植株上持续 190 天之久。

三、决定状态及其稳定性机制

需要强调的是，决定状态的稳定并不意味着它不可逆转。有充足的证据表明，高度决定了的器官上的许多细胞类型仍具有全能性，即其决定态是可以逆转的。分生组织尽管发育潜能的限制较为稳定，但只要给予适当的刺激，这种潜能仍可改变。卷柏（*Selaginella willdenovii*）休眠芽分生组织离体培养在含有生长素的培养基上，可形成根。把仙人掌（*Opuntia polycantha*）的离体芽分生组织培养在含细胞分裂素的培养基上可形成叶，而培养在含青霉素的培养基上则形成刺。

能够说明分生组织的决定作用既具有稳定性，又具有潜在的可逆转性的一个例子来自对植物幼态阶段和成年阶段的发育的研究。英国常春藤（*Hedera helix*）在幼态阶段时，藤蔓匍匐，叶呈掌状，浅裂，交替式叶序。这种植物有时会转变为成年阶段，成年阶段的常春藤为灌木，椭圆形叶片，全绿，螺旋或叶序，并且可以开花结果，表现幼年或成年形状的枝条做成的插条嫁接到任何一种阶段的寄主砧木上，它都可以无限生长，并且表现出产生插条的那一种枝条的生长阶段。成年枝条若用赤霉素处理则会稳定地向幼态逆转。所以，生长阶段的改变，尽管可相当稳定，但却并非永远不变，茎尖可以可逆地在两种发育状态间转变。

植物体的决定并不像动物决定那么严格和稳定。动物细胞一旦被决定，其发育途径就不再改变；而植物的决定则有相对潜在的可逆转性和不稳定性。

决定态的稳定性与植物细胞全能性之间存在某种不一致，为了协调这两个概念，Henshan 等（1982）强调决定作用在器官化统摄水平上发生。他们提出，植物体中的决定发生在器官和组织水平，只有其上的细胞才具有稳定性。那么是什么样的机制将这种稳定性传递给这些细胞群的呢？一种可能性是细胞的布局，即细胞的空间排列以一种类似晶体的方式，自我繁衍生长，在某些情形下打破这种格局后进行再生。满江红属（*Azolla*）的根发育就是一个最好的例子。这种水蕨的根就是通过细胞规则的分裂格局，从单个顶端细胞开始分裂，固定这些细胞后代形成的。以细胞分裂板为界，根以两个自我繁衍的对映细胞形状发育。在其他例子中，分生组织的原初的结构和组织并非为决定态的稳定性所必需，发育潜能的稳定性变化有时在无序的愈伤组织上仍可维持。

第二种传递决定态的稳定性是组织和器官的动态组织化。如果细胞之间存在某种信号相互作用，原则上就可产生稳定的格局或自我繁衍状态。例如，在同质化诱导中，一个细胞可以在邻近细胞中诱导出相同或相似的表型，即便在一个细胞不存在特定空间排布的组织中仍具有稳定性。有充足的证据表明，这种传递机制在维管组织分化中存在。

第三种传递机制为外遗传变化（epigenetic change），即决定状态的稳定性传递发生在单个细胞水平上。果蝇的器官芽实验、哺乳动物的细胞培养和原生动物的发育学实验表明，某些决定状态是在单细胞水平遗传的。这使得人们产生这样一个疑问，细胞在遗传上是等价的，如何能够遗传不同的表型。为了解决这个问题 Nannay（1958）提出细胞有两种遗传体系：一种

是与有机体有性世代间发育潜能传递有关的遗传体系，另一种为外遗传体系，即发育体系，即基因表达方式在体细胞间的传递。因而外遗传变化是指不是由细胞基因组永久性变化引起的遗传的、细胞的变化。这与经典遗传突变有以下几个方面的不同：

(1) 外遗传变化经常是直接的，即对特异性诱导物的一种固定的反应。在诱导条件下，外遗传变化的频率较高，每个细胞世代可达 10^{-3} 以上。

(2) 外遗传变化具有潜在可逆性，这种逆转过程也是直接的。

(3) 外遗传变化产生的表型范围受细胞遗传潜力限制。

(4) 根据外遗传变化定义，是不能通过细胞减数分裂而传递的。

细胞和组织水平上的稳定性可以通过从组织上游离细胞克隆来鉴别，克隆后确定组织表型是否得以继续，从而知道这种稳定性是在哪一个水平上传递的。曾用此法鉴定和分析烟草在对细胞分裂素的需求上存在的组织特异性差别。

烟草叶组织在培养中持续生长需要外源细胞分裂素；而取自同一植株的茎外皮组织培养，在同样的条件下则是细胞分裂素自养的。这两种表型在细胞克隆后仍可延续，说明细胞分裂素异养和自养两种状态是细胞传递的。这种细胞遗传的对细胞分裂素的需求状态是稳定的，但不是永久不变的，在烟草植株从单细胞后代开始的发育过程中，至少一些细胞经历外遗传变化。

外遗传变化同超细胞水平上的稳定变化存在着重要的区别，它接触到发育生物学一个基本的问题，即细胞命运在何种程度上决定于其历史，而又在何种程度上决定于其在植株中的位置。可惜的是，这方面的研究仍不充分。

四、细胞和组织培养的建立

(一) 培养的启动

组织外植体增殖培养的启动会引起深刻的发育状态的变化：组织的基本结构发生改变；某些特化细胞类型丧失；新的细胞类型产生；通常静止的细胞开始分裂。许多植物组织培养除需要包括碳源、氮源、无机盐分和维生素在内的基本培养基成分外，还需要外源生长素和细胞分裂素来保持增殖。

启动培养还取决于植物的基因型和组织的发育状态。例如，在 2, 4-D 存在的情况下 蜀黍 (*Sorghum bicolor*) 幼叶近基部的组织外植体可进行增殖培养 而叶子的其他部位则否 烟草髓组织外植体因取材部分不同，在增殖能力上也存在类似差异，其生理基础在于沿茎干长轴髓组织对细胞分裂素的需求存在差异。

通常人们认为，无论其来源如何，所建立的培养都可以最终转变成脱分化的表型。但一般而言，这是不真实的。培养物可以从由薄壁细胞组成的松脆的愈伤组织到带有某些器官原基特性的高度器官化的团块的任何类型，而这种器官化类型主要取决于培养基的激素组成、植物种类和植物体上组织的来源。

(二) 培养中组织特异性的延续

作为惯例，当组织培养后，其分化的组织特异性格局和生物合成就不再持续下去。但也有例外，某些器官特异性抗原（假定为蛋白质）可以由烟草和櫻桃的非器官化愈伤组织、玉米的器官状体培养中产生；由玉米胚乳建立的培养物仍可继续产生胚乳特异性蛋白质——玉米朊，并且其组成细胞仍具有蛋白体及与玉米朊合成和贮藏有关的细胞器。组织特异性的次生代谢物生产也可以在组织培养中得以延续。从芸香 (*Ruta graveolens*) 根发生的愈伤组织培养可产生根特异性的香料油成分，而自茎产生的愈伤组织培养则形成茎干特异性成分。有时，

组织特异性性质可以在培养中持续较长时间。例如，烟草表皮、髓和叶组织培养对细胞分裂素的需求不同，而这种差异可以由单细胞得到遗传。从豆类植物的根、下胚轴和子叶细胞悬浮培养中得到的蛋白提取物中发现，同工酶谱存在差异，这种差异可以在长期培养中得以维持。但是，在稻类植物中却未发现各部位同工酶谱的差异。

同一植物上的不同部位建立的培养，其发育方式也存在差异。将幼态英国常春藤的未器官化的愈伤组织置于诱导条件下培养时，可形成芽；而成年植株的愈伤组织则形成体细胞胚胎。柑 (*Citrus grandis*) 的叶和茎诱导形成愈伤组织，可分化成芽；而从生殖部位子房组织诱导形成的愈伤组织则分化成体细胞胚胎。家黑种草 (*Nigella sativa*) 根、茎和叶建立的培养在诱导条件下可形成根，而只有茎和叶建立的培养可以形成芽，并进一步发育成完整植株。以玉米的许多部位 (如实生苗的茎段、根、幼叶基部和居间分生组织) 为外植体，在含有 2, 4-D 的培养基上培养，形成异质和高度器官化的愈伤组织，在发育的不同阶段都可见到有根原基发生。这种愈伤组织可以连续增殖，当撤去 2, 4-D 时可形成根。有时培养物会形成典型的愈伤组织，即松脆的非器官化。这种类型的愈伤组织在继代培养时不能增殖。将从未成熟胚的盾片建立的培养，转接到无 2, 4-D 的培养基上时会发育成完整的植株。这些胚性愈伤组织只能在盾片愈伤组织发育的一段短时间内获得，并可含有不同数量的根原基。可见，这种愈伤组织的胚胎发生感受态很短暂。

有时这种发育潜力在某个器官内的一段很短的距离内都存在差异。把蜀黍 (*Sorghum bicolor*) 幼叶着生处附近的一个特殊区段作为外植体，培养在含有 2, 4-D 的培养基上，会形成根状培养物；而将这个区段内的片段进行培养，则会形成胚胎发生培养物，当转接到不含 2, 4-D 的培养基上时，会形成完整的植株。

总之，植物体上组织发育状态是影响启动培养和长期培养特性的一个重要因素。培养中存在持续的差异不知是否涉及细胞遗传或细胞群之间的互作。有时，从同一组织得到的亚系之间的酶谱差异竟比同一植株的不同组织得到的无性系之间的差异还要大。

五、植株再生

许多因素影响组织培养中的植株再生，如碳源、氮源，pH 值和物理条件等，但最重要因素是植物激素。Skoog 和 Miller (1957) 认为，细胞分裂素和生长素的浓度决定不同的器官发生。当细胞分裂素浓度高而生长素浓度相对低时，诱导产生芽；当细胞分裂素浓度低而生长素浓度相对高时，诱导产生根；当两种激素的浓度在一个中间水平时，诱导形成脱分化的愈伤组织。通过改变细胞分裂素浓度和生长素浓度，可以在许多双子叶植物中获得植株再生。但单子叶植物一般对细胞分裂素无明显反应，它们往往需要高浓度和高强度的生长素，如 2, 4-D 来实现植株再生。有时，赤霉素和脱落酸对植株再生也有一定作用。

对激素在细胞分子水平诱导形态发生的机制目前了解很少，因而人们在用反应细胞的发育状态来解释。第一种理论认为，激素是原初形态发生原 (primary morphogen) 细胞或细胞群对激素响应而达到感受态，激素处理后，细胞开始趋向特殊的发育途径，但并未被决定其发育命运。第二种理论认为，细胞对激素响应而被决定，激素激发细胞发育命运的表达。这两种理论都有一定的论据，在禾谷类作物的组织培养中，组织学研究表明，培养物上的器官原基发育可被培养基中的生长素所阻止。而在双子叶植物组织培养中，用不同激素组合处理同一克隆细胞系，可以导致不同的发育命运。在某些例子中，激素在同一发育途径的不同阶段表现不同的作用。

植物可以有两种再生方式：器官发生和体细胞胚胎发生。两种发生途径都涉及发育潜能

的渐进而又稳定的限制。可以利用两种方法知道什么时候决定作用得以固定下来。烟草髓组织培养中，紧靠琼脂培养基的外植体区域形成芽，如果在培养后第六天之前将外植体反置，则会在外植体的新的基部形成芽。随后，外植体底部和顶部都可产生芽。显然，这些细胞或细胞群在诱导培养基中要培养大约 6 天的时间才能决定形成芽。另一种方法是从诱导培养基向非诱导培养基转接，经过一段时间对形成的器官进行计数。利用这种方法发现，在田旋花 (*Convolvulus arvensis*) 叶组织中成芽决定的获得是高度同时性的，而且随基因型不同而异。只要芽决定状态得以确定，即便在诱导非决定态组织形成根的条件下仍可持续下去。

全能性细胞具有形成各种植物器官的潜能，在一定的实验条件下，只有某种特定的器官发生。这表明培养细胞在形态发生感受态和对诱导物的响应是不同的。获得体细胞胚胎发生、根形成和芽形成的感受态，可以通过其稳定性及诱导条件加以识别。在某些例子中，在植物体内已确立感受态，同一植株上采取不同组织，培养在同样的条件下形成不同的器官。在另外一些例子中，形态发生感受态是在培养中诱导出来的。对紫花苜蓿未成熟子房的愈伤组织进行培养，发现感受态的获得和继后的表达是两个不同的事件。根据诱导培养基中生长素和细胞分裂素浓度的不同，当转移到无激素培养基上时，可形成根、苗，或保持原来的脱分化状态。

感受态的稳定性也存在差异，有时感受态是短暂的；组织表现出一个反应时限，这个反应时限相对于器官形成所需时间是短的。如可从田旋花 (*Convolvulus arvensis*) 叶愈伤组织成芽时间中估测出这个反应时限来。但更为平常的是，形态发生感受可以在连续转接培养中持续较长一段时间，即便改变感受态表达所需的培养条件也可以得到持续。培养物会经历一种类似转决定 (transdetermination) 的过程，即组织从一种感受态向另一种感受态的转化。

形态发生感受态通常会在长期培养的过程中逐渐下降，有人认为是由于染色体变异等遗传损害引起全能性的丧失。因为在培养细胞的非整倍体频率与植株再生能力之间存在一种负相关。另外，发现从非整倍体培养物中获得的再生植株，其核型比母体组织的核型更为正常。这也表明，只有正常核型的细胞才能进入发育途径，再生植株。

在连续培养中，培养物通常在形态、某种特殊功能及器官发生潜能方面发生变化。这种变异的主要来源在于细胞选择作用 (cell selection)。一般而言，不同类型的细胞以不同的速率进行增殖，从复杂的组织外植体上建立的培养物在细胞组成上会发生变化。在长期培养的组织中会达到一种组织发生的平衡：细胞的相互作用，增殖率的差异，细胞类型的相互转化及平衡，而相对丰富的细胞会保持常态。当由不同丰度的细胞类型组成的组织区块被分离后继代培养，它们就保持各自特征。但是感受态是否在细胞水平上遗传，或在超细胞水平、组织水平上遗传，仍难以进行研究。虽然超细胞的相互作用，如位置效应和生理梯度作用确实影响感受态的获得和器官决定的总体过程。如在烟草培养中，芽只在组织外植体的特殊部位产生；而苜蓿感受态的获得依赖于细胞团块的大小。另外，物理游离及组织与组织的互作也影响器官发生。但是，这却难以解释为什么转决定中短暂的变化，以及长期培养中胚胎发生感受态的加速度丧失。这方面的研究有赖于将来获得适当的细胞和分子标志，来阐明器官发生前的事件和过程。

第三节 器官发生和体细胞胚胎发生

植株再生是组织培养的终极目的之一。植株再生有两种基本的发生途径，即器官发生

(organogenesis, organformation 和体细胞胚胎发生 somatic embryogenesis)。器官发生是指在自然生长或离体培养条件下形成根、芽、茎、枝条和花等器官的过程，分直接器官发生和间接器官发生两种。直接器官发生是指直接从腋芽、茎尖、茎段、原球茎、鳞茎、叶柄、叶片等外植体上进行的器官发生；而间接器官发生则须先经历一个脱分化形成愈伤组织，然后诱导发生再分化才能进行器官发生。体细胞胚胎发生是指在离体培养条件下，单倍体细胞或双倍体细胞（未经性细胞融合）诱导形成类似合子胚结构的体细胞胚胎，并进一步发育成完整植株的过程。体细胞胚不仅在结构上与合子胚类似，而且发生与发育途径也极为类似，如都经历球形胚、鱼雷形胚和子叶胚阶段，或球形、盾形和胚芽鞘形阶段（单子叶植物）。与器官发生类似，体细胞胚胎发生也可分为直接体细胞胚胎发生和间接体细胞胚胎发生。不定（adventitious）器官发生或不定胚发生是指从原本不是这些结构通常起源的地方进行的器官（根、芽、花等）或胚状体的发育。如果从原始器官或器官原基的器官发生或合子胚的发育就不能使用这个术语。为了叙述方便，以下先从愈伤组织的诱导开始论述。

一、愈伤组织培养

（一）愈伤组织

愈伤组织 (callus) 是指植物细胞脱分化而不断增殖形成的，主要由薄壁细胞构成的非器官化组织或不定形组织。它可以是植物在自然生长条件下，从机械损伤或微生物损伤、昆虫咬伤的伤口处产生，也可在特定的离体培养条件下诱导形成。

愈伤组织一般为淡黄色或白色，也有淡绿色、绿色、红色等，随其基因型与何种色素存在有关。老化的愈伤组织多转变为黄色或褐（黑）色。愈伤组织很少是均一的薄壁细胞构成。愈伤组织在分化阶段会出现导管细胞、筛管细胞、分泌细胞、毛状体细胞及木栓细胞等类型细胞，并出现小而密集的分裂细胞构成的细胞团，为拟分生组织，其后会形成芽原基及根原基的中心。愈伤组织结构一般为松散型和致密型两种。愈伤组织内部不仅细胞大小结构类型不均一，有时还有空洞存在。外表可以是光滑表面，也可以是颗粒状表面，这些突起的颗粒中含有韧皮部、木质部和形成层组织，这种结构具有分化形成不定芽和不定根的能力。

愈伤组织具有结构的不均一性（异质性），还具有生理和遗传上的不稳定性（或嵌合性）和变异性。愈伤组织结构上的不均一性是指，由于原初细胞遗传组成、外遗传变化、与周围细胞相互作用，以及营养物质和水分供应及生长调节物质的刺激等，造成愈伤组织块中不同区域细胞结构类型不同，遗传组成不同，增殖速度或和器官分化能力及程度的不同。在组织培养中可以利用一定的形态颜色或生理生化标志，进行选择继代培养，达到一定的培养目标。愈伤组织遗传和生理不稳定性和变异性是指，由于培养环境的条件胁迫、高浓度生长调节物质的作用等，植物细胞在脱分化和再分化过程中永久性的遗传变异或某一生理特性的丧失或获得。例如，组织培养中常可观察到细胞核破碎，染色体畸变，多倍体和非整倍体细胞的出现，则是基因水平上的遗传变异。生理特性的变异如铁海棠 *Euphorbia milii* 愈伤组织经过 21 次继代（10 天继代 1 次）选择后，可获得花青素含量丰富的愈伤组织；天仙子的愈伤组织经 44 次继代（21 天继代 1 次）培养后，逐渐损失细胞中的生物碱。其他次生代谢物生产也会有类似情况发生。另外是组织培养中细胞分裂素（CK）需求的驯化现象、植物材料在长期继代培养中增殖速度减慢或停止生长等。因而在植物组织培养中采用愈伤组织培养结合或不结合诱变处理筛选突变体。

（二）愈伤组织的诱导

愈伤组织的诱导形成是一个内外环境因素相互作用的复杂过程，它可分为 3 个时期。

1. 诱导期（启动期）外植体在诱导期受到外界环境条件的刺激，应激改变原有的代谢，加强核酸和蛋白质等的合成代谢，为进入分裂期作准备。诱导期的期限因植物材料、培养基和环境条件不同而异。菊芋等诱导期仅需 1 天，而胡萝卜则需 2 天。刚收获的菊芋块茎只需 22 小时，而贮藏 5 个月后则需 2 天。另外，源植株在弱光下比强光下生长得到的外植体易诱导。

2. 分裂期 如果在游离的外植体上有分生组织存在，这些组织可以不经脱分化而直接进入分裂，而已分化的细胞一般必须在细胞分裂之前脱分化。脱分化可以使成熟树体上的外植体重新决定，并由成熟向幼态逆转，即复幼过程。复幼细胞比成熟细胞具有更大的分裂和分化潜力。进入分裂期的外层细胞开始分裂，并使细胞脱分化，这个时期的特征是分裂快，结构疏松，未器官化，颜色浅而透明，如果在原培养基上继续生长，则不可避免地发生分化；若立即转移到新鲜的培养基上，则愈伤组织可无限地进行细胞分裂，并保持不分化状态。

3. 分化期 在这个时期，细胞停止分裂，生理生化代谢变化而形成不同形态和功能的细胞。分化期的细胞体积不再减小，而是保持相对稳定。分裂期的细胞分裂局限在组织外缘，主要进行垂周分裂。进入分化期后，愈伤组织表层细胞的分裂逐渐减慢，直至停止。与此同时，愈伤组织内部细胞突然开始分裂，并且改变分裂面的方向，出现瘤状结构的外表面，内部开始分化。这一时期，愈伤组织出现瘤状结构的拟分生组织，成为暂不再进一步分化的生长中心。在分化的愈伤组织中会出现维管组织，但不形成维管系统，而呈分散的节状和短束状结构。

（三）愈伤组织的增殖

将诱导形成的愈伤组织转接到新鲜的培养基上时，愈伤组织就会进一步增殖生长，生长一段时间后，又必须重新将愈伤组织切割成一定大小的愈伤组织块（直径约为 5mm，重量约 100mg），转接到新鲜的培养基上继续增殖。如不转接，由于培养基中营养物质、生长调节物质和水分的消耗，愈伤组织向培养基中分泌代谢产物，这些代谢产物累积到一定浓度的受害水平时，愈伤组织会生长放慢或停止生长，甚至老化，变黑死亡。继代转接时，愈伤组织块不可太小，否则就会难以恢复分裂和生长，或者生长相当缓慢。转接必须及时，因为愈伤组织的生长也基本符合 S 形生长曲线，在转接后 3~7 天内恢复生长期，随后在 2~3 周内进入旺盛生长期，到达生长的顶点便会缓慢生长，直至生长停止。进行愈伤组织转接的最佳时间是生长即将达到顶峰之前，若在愈伤组织停止生长较长一段时间后才进行转接，就难以恢复细胞的分裂增殖。

如果在第一次继代培养中愈伤组织生长不好，则须将产生愈伤组织的外植体部分同时转接。继代增殖所用的培养基一般与诱导培养基相同，只是生长素和细胞分裂素的浓度略比正常低一些。如果在继代培养中愈伤组织生长停滞，则说明继代培养基不适合。若在人工合成的培养基上不能生长，则需加入一些椰乳、水解酪氨酸等天然混合物。

不同植物种类的愈伤组织在颜色、结构及其他生长特性上也不同，如白色或有色，松脆易分离或结构致密坚硬，难以分离，以及在液体培养基中分离的难易程度等。同一植物种类也可以随外植体在植株中部位的不同及生长条件的不同而异，即便在同一块愈伤组织块上，也会由于这些因素及可能产生的变异而在颜色和结构上存在差异。

植物生长调节物质的驯化在愈伤组织培养中起着一定的作用：即愈伤组织在多次继代培养后不再对生长素或（和）细胞分裂素需要，或对这些生长调节物质自养。驯化作用是由于变异引起的还是属于外遗传变化，仍是文献中争论的问题。

愈伤组织是一种极易生长的旺盛生长组织，但能否通过愈伤组织培养来对植物进行营养繁殖，取决于以下两点：在多次重复继代培养后再生潜能不会丧失；保持遗传稳定性，即再生植株应与起始培养的源植株在遗传和表型上保持一致。

(四) 愈伤组织的分化

愈伤组织在转入分化培养基时会出现不定器官发生或(和)体细胞胚胎发生。属于哪一种情况将依赖于植物种类、外植体类型和生理状态，以及生长条件等。愈伤组织在器官发生时，会有四种情况：仅有根和芽的分别再生，形成无芽根和无根苗；先形成芽，后基部形成根，最后发育完整植株；先形成根后在同一位置形成芽，这种情况多发生在双子叶植物中，单子叶植物则极少发生；在愈伤组织邻近部位分别形成根和芽，两者由维管相连发育成完整植株。第四种情形较为少见，多数为第一种情况，根和芽之间无维管相连。

(五) 愈伤组织培养的影响因素

1. 外植体 虽然所有的植物都有诱导产生愈伤组织的潜能，但是不同的植物种类诱导形成愈伤组织的敏感性和难易程度不同。裸子植物、蕨类植物及系统演化上较低级的苔藓植物诱导较难，而被子植物对愈伤组织的诱导则较敏感；双子叶植物要比单子叶植物容易诱导成功；单子叶植物和双子叶植物在诱导条件与反应性上也有较大差异，单子叶植物需要加入生长素，且由于难以诱导形成愈伤组织而常以胚、幼叶、实生苗或幼嫩花(芽)原基作为起始材料。幼嫩的材料比成熟材料，草本比木本易进行愈伤组织诱导及其后的形态建成。有的植物形成的愈伤组织只能通过器官发生来进行植株再生；有的植物则只能经体细胞胚胎发生途径实现植株再生；有的植物既能进行器官发生，又可进行体细胞胚胎发生；而有的则两者都不可。愈伤组织在长期继代培养后，往往会降低或甚至完全丧失再生能力。所有这些原因目前都不甚明了。

实际上，同科的不同属，同属的不同种，同种的不同基因型个体在愈伤组织的诱导及植株再生能力上都有差别。例如，在豆科植物的 15 个属 31 种 黄芪属中夏黄芪 (*Astragalus complanatus*) 和细叶黄芪 (*A. tenuis*)，薯蓣属的 2 个种 *Dioscorea composita* 和 *D. cayenensis* 中就存在较大差异。

一般而言，分生细胞和薄壁细胞较易诱导出愈伤组织。分生细胞不必经脱分化就可进行细胞分裂；而薄壁细胞的分化程度低，具有较大的发育可塑性，这种分裂潜力可以长期保持，如 25 年树龄椴属茎的薄壁细胞仍可以诱导形成愈伤组织。这些细胞在不同的植物体部分存在多少比例也不同，例如根、茎的髓部和皮层、块茎、叶肉组织、肉质果果肉，以及种子胚乳中都含有大而完整的薄壁细胞组织，在木质部和韧皮部中薄壁细胞仅存在于射线和纵束中。由此可知，不同的外植体类型对愈伤组织诱导及再生能力上存在差异。另外，外植体的幼嫩程度及在植株上的部位(反映内源激素水平)也影响器官发生的潜力，如油菜茎段下部器官分化率低，而上部分化率增加。木本植物几乎难以从成熟或衰老的组织进行成功的愈伤组织培养，因而多采用幼嫩材料或复幼材料进行愈伤组织培养。

另外，愈伤组织一般随着继代时间的延长，分化能力随之下降。但这种变化程度随基因型不同而异，如高粱(*Sorghum bicolor*)8 个基因型花序外植体诱导形成的愈伤组织，在继代培养过程中，大多数基因型再生植株数目下降，但下降程度不同，而有一些基因型则随着继代数增加而提高。

2. 培养基 一般选择盐浓度较高的基本培养基如 MS, B₅ 及它们的改良培养基来进行愈伤组织诱导。不同的植物种类、基因型和外植体诱导形成愈伤组织的难易程度不同，因而对

培养基的敏感性也不同。可可几乎可从各种外植体上诱导形成愈伤组织，但却难以进一步获得再生植株。茎和树皮在含盐量低的 White 和 Guatheret 基本培养基上不添加任何生长调节物质就可诱导形成愈伤组织，而基因型 Amazon 最适宜的基本培养基为 MS。在研究不同基本培养基对西黄松子叶愈伤组织增殖效果中表明，培养 90 天后，在含盐浓度高的 LS 基本培养基中，鲜重增加最多。在北美短叶松下胚轴和子叶的愈伤组织诱导中发现，随着盐浓度的降低，愈伤组织的生长也随之下降。

在愈伤组织继代增殖中，一般采用固体培养基，但也可在液体培养基中进行振荡培养，经过一段时间后再转移到固体培养基上进行分化再生。在液体培养基中，体细胞胚胎发生比固体培养基更容易进行，随后的体胚可转移到固体培养基上进一步发育成完整植株。实际上，在液体培养基振荡培养中，愈伤组织远比固体培养基中增殖生长快得多。这是因为：在液体培养中愈伤组织的吸收充分；在液体培养中，氧气供应充分；愈伤组织块在液体振荡培养中会分裂成更小的愈伤组织细胞团或单细胞，因而产生更大的吸收表面积；在固体培养上存在一定的浓度梯度，因而会促进愈伤组织较早分化，抑制愈伤组织生长。

愈伤组织在液体培养基中培养应符合：培养用三角烧瓶容纳培养基占总容积的 20%~30%，培养基含量可随培养物量的减少而减少；转速一般为 80~100r/min，有时可采用 40r/min 或 120r/min 的转速，但要避免植物材料沉埋于液体培养基中和培养基溢出；液体培养中，细胞或愈伤组织的生长呈典型的 S 型曲线，即开始时为延滞期 (lag phase)，随后进入快速生长的对数生长期，然后逐渐减慢，直至停止。

在液体培养基中培养可以称为悬浮培养（单细胞和细胞团的混合物），也可称为愈伤组织块培养，属于哪一种情况，要依植物种类及细胞类型而定。例如，哥伦比亚安组蕨 (*Anthurium andreaeanum*) 愈伤组织在液体培养基中以愈伤组织块形式生长，而难以获得悬浮培养；与此相反，胡萝卜愈伤组织则很容易分离成细胞和细胞团进行悬浮培养。不管是悬浮培养，还是愈伤组织块培养，它们在形态学和细胞学上都是异质的。

在愈伤组织培养中，一般采用外源生长调节物质如生长素和细胞分裂素，但外源生长素的种类、浓度及比例取决于基因型和内源激素浓度。植物生长调节物质可能在脱分化和再分化中起着“扳机”作用，首先诱导出组织的感应态，并出现一系列细胞水平和分子水平的变化，包括特定的基因表达与调节。对外源生长素和细胞分裂素的需求可分为三种类型：只需要生长素（主要是单子叶植物）；只需要细胞分裂素；既需要生长素，又需要细胞分裂素。

一般而言，高的生长素浓度和低的 CK 浓度有利于愈伤组织的诱导和增殖。其中，2, 4-D 是诱导愈伤组织和细胞悬浮培养最有效的物质，使用浓度为 0.2~2.0mg/L。BA 则与多聚核糖体合成及核活性提高有关，主要在翻译水平上调节蛋白质的合成诱导脱分化形成愈伤组织，首先必须使已停止分裂活动的细胞恢复分裂活性。*cdc2/CDC28* 基因被证明是调节细胞分裂周期的基因。在它的作用下，细胞分裂可从 G₁ 期转入 S 期、G₂ 期和 M 期。该基因的产物为一个 3kba 的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 P34^{cdc2} 的磷酸化作用调节。在分化细胞中 P34^{cdc2} 水平降低，说明调节已决定的细胞退出周期，而 2, 4-D 具有通过调节 P34^{cdc2} 蛋白合成而控制脱分化和细胞分裂重新启动的作用。在未发现细胞分裂素之前，2, 4-D 与椰乳组合对愈伤组织诱导极为有效。而 KT 的发现使得在绝大多数情况下，可以用 KT 替代椰乳，尽管并非总是可以用 KT 代替椰乳，因为椰乳中除含有细胞分裂素外，还含有其他一些活性物质。酵母、麦芽提取物与椰乳类似。在 33 种禾本科牧草中，仅用 2, 4-D (2.3~67.8μmol/L) 可诱导愈伤组