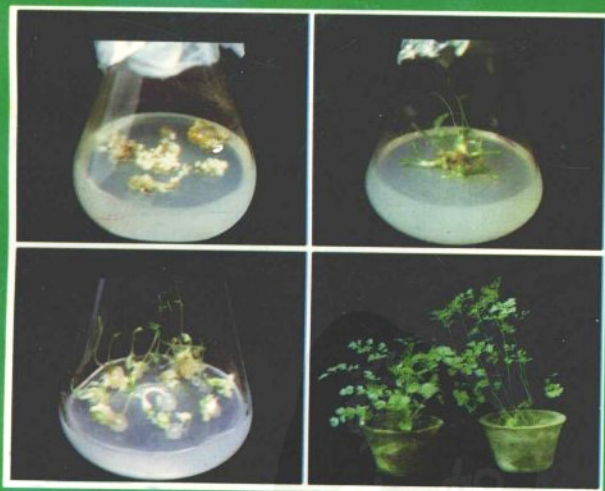


植物组织培养技术

李宝平 茹文明 编著



中国农业科技出版社

植物组织培养技术

李宝平 茹文明 编著

中国农业出版社

PDG

图书在版编目 (CIP) 数据

植物组织培养技术/李宝平, 茹文明编著. —北京:
中国农业科技出版社, 2000. 5
ISBN 7-80119-933-2

I. 植… II. ①李…②茹… III. 植物-组织培养
IV. Q944. 6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 25153 号

责任编辑	冯凌云
出版发行	中国农业科技出版社 邮编: 100081 北京市白石桥路 30 号 电话: (010) 68919711 传真: 62189014
经 销	新华书店北京发行所
印 刷	运城市福利文化用品印刷厂
开 本	850 mm×1168 mm 1/32 印张: 11
印 数	1~1000 册 字数: 244 千字
版 次	2000 年 5 月第 1 版, 2000 年 5 月第 1 次印刷
定 价	18.00 元

前 言

生物技术是一门新兴的学科领域，是将物理学、数学、化学、遗传学、细胞学以及工程学的理论和技术相结合，从而应用于生物学研究的一门综合技术。它体现了现代科学发展的总体方向，是生物科学发展的前沿领域，代表了现代生物学的发展水平和研究方向。生物技术的迅速发展与其显示出的巨大潜力使人们预见到 21 世纪将是生物学的世纪。生物技术研究已成为新技术科学的组成部分。因此，生物技术也必然成为生物学及相关专业的一门必修课程。

植物生物技术是整个生物技术领域的一个组成部分，是在植物组织培养基础上逐渐发展起来的一门技术。它所包含的内容极为丰富，从个体水平、器官水平、细胞水平直到分子水平无所不有。随着研究的不断深入，植物组织培养技术不仅为生物科学的理论研究提供了极好的实验方法和技术，帮助解决了许多重大理论问题，而且已被广泛应用于生产实际。在苗木生产、作物改良、新品种培育、有用物质生产和种质保存等方面产生了巨大的经济效益和社会效益，成为现代农业发展一个不可缺少的组成部分。

为了系统地了解 and 掌握有关植物组织培养技术方面的基础知识、基本理论和基本技能，我们在多年从事教学的基础上总结了自己教学的经验和体会，同时参考了许多有关的专著和文献资料，编写出了这本较为系统的《植物组织培养技术》，以作为高等师范院校生物专业的基础教材。在此，

我们对所参考书目及文献的作者表示衷心的感谢。

由于时间仓促，资料不全，加之编者的水平有限，不足之处在所难免，恳切希望读者在使用之后提出宝贵意见，以便在以后得到修正。

编者

1999.12.30

内 容 简 介

本书系统阐述了植物组织培养各研究领域的基本方法与技术。全书共包括十六章内容。第一章为绪论；第二章至十五章为愈伤组织培养、细胞培养、原生质体培养、形态建成、体细胞杂交、体细胞胚胎发生和人工种子、胚胎培养、花药培养、脱病毒技术、无性系繁殖、无性系变异、突变体筛选、种质保存、遗传转化等方面的基础知识、基本理论、基本技术以及在生产实践中的应用；第十六章为植物组织培养的基础实验。

本书主要作为高等师范院校生物专业的试用教材，也可供农学、生物工程学等方面的科技人员参考。

目 录

第一章 绪论	(1)
一、植物组织培养的概念	(1)
二、植物组织培养的理论依据	(2)
三、植物组织培养的发展简史	(6)
四、植物组织培养的应用	(11)
第二章 植物组织培养中的细胞学基础及形态建成	(14)
一、植物细胞的全能性	(14)
二、植物组织培养中外植体生长的诱导、脱分化 以及愈伤组织的形成	(16)
三、愈伤组织的分化和植物器官的形成	(18)
第三章 植物组织培养的基本方法与技术	(25)
一、外植体的制备	(25)
二、灭菌技术	(26)
三、无菌操作技术	(29)
四、植物组织培养的类型与方法	(30)
第四章 植物组织培养的基质	(33)
一、培养基的组成	(33)
二、培养基的选择	(38)
三、培养基的制备	(40)
第五章 植物愈伤组织和细胞的培养	(44)
一、愈伤组织的诱导和培养	(44)

二、植物细胞的培养·····	(49)
三、植物细胞培养生产次生代谢产物·····	(58)
第六章 植物体细胞胚胎发生和人工种子的制作·····	(73)
一、植物体细胞胚胎发生的普遍性及其意义·····	(73)
二、植物胚状体的形成方式·····	(75)
三、植物胚状体的发生过程·····	(77)
四、胚状体发生的细胞学及生理生化变化·····	(78)
五、影响胚状体发生和发育的因素·····	(84)
六、植物人工种子的概念及意义·····	(95)
七、人工种子制作的基本流程·····	(98)
第七章 植物原生质体的培养·····	(105)
一、植物原生质体的分离·····	(106)
二、植物原生质体的纯化·····	(112)
三、原生质体活力的测定·····	(113)
四、植物原生质体的培养·····	(114)
第八章 植物体细胞杂交·····	(128)
一、植物原生质体融合的方法·····	(130)
二、融合体的细胞学·····	(137)
三、杂种细胞的筛选·····	(141)
四、体细胞杂种的鉴定·····	(146)
第九章 植物胚胎培养·····	(150)
一、植物的离体胚培养·····	(151)
二、胚乳培养·····	(167)
三、胚珠培养·····	(177)
第十章 植物花药培养和单倍体的产生·····	(181)
一、花药培养技术·····	(182)
二、离体培养条件下雄核的发育过程·····	(186)

二、植物细胞遗传转化的研究简史·····	(271)
三、植物遗传转化的受体细胞·····	(273)
四、转化载体·····	(274)
五、农杆菌介导的植物遗传转化·····	(275)
六、转化体的筛选与检测·····	(289)
第十六章 植物组织培养技术基础实验·····	(297)
一、植物组织培养中的无菌操作技术·····	(297)
二、培养基的配制·····	(298)
三、植物愈伤组织的诱导和培养·····	(301)
四、植物体细胞胚胎发生的诱导·····	(302)
五、植物原生质体的制备·····	(304)
六、马铃薯茎尖培养脱病毒·····	(306)
七、植物的无性系快速繁殖·····	(307)
八、烟草花药培养·····	(309)
九、农杆菌介导的植物遗传转化·····	(310)
附录 I 植物组织细胞培养常用的培养基·····	(312)
附录 II 常用植物生长调节物质的浓度及其换算·····	(331)
附录 III 植物生物技术常用符号术语及缩写·····	(332)
参考文献·····	(335)

第一章 绪 论

一、植物组织培养的概念

植物组织培养是指在无菌条件下，将离体的植物细胞、组织或器官在人为提供营养的条件下生长发育的培养技术的总称。植物组织培养实际上包括了细胞、组织、器官等不同层次的培养，这些用于培养的离体植物材料统称为外植体(explant)。Gamborg 曾根据外植体的不同，将组织培养分为 5 种类型：

器官培养 将植物的某个器官作为外植体进行培养，如根尖、茎尖、芽、花蕾、幼嫩的果实等。

胚胎培养 用成熟或未成熟的植物胚作外植体，这种培养可使得在正常情况下不能发育成植株的胚形成新个体。

愈伤组织培养 顾名思义，愈伤组织是在植物伤口表面形成的一团愈合伤口的薄壁细胞。在组织培养中，所谓愈伤组织(callus)是指成熟的植物组织在培养基上经过诱导脱分化后，形成的无特定结构和功能的细胞团。愈伤组织通过培养可不断增殖，它可以作为悬浮细胞培养、原生质体培养、次生物质生产等材料的来源，也能通过诱导重新分化为新的再生植株。

细胞悬浮培养 简称细胞培养，是指以单细胞或小细胞团形成在液体培养基中进行的一种培养方式。通过细胞悬浮培养可以获得生理状态相一致的细胞群体，从而进行细胞的

生理生化研究，也可以为原生质体的分离和培养提供材料。同时，细胞悬浮培养也是次生物质生产在实验研究阶段的一种方式。

原生质体培养 原生质体 (protoplast) 是指植物细胞去掉细胞壁后的生活部分。所谓原生质体培养，就是将原生质体放在适当的培养基中，使其再生出细胞壁成为完整的植物细胞，再进一步分裂形成细胞团和愈伤组织，最后分化形成小植株的全过程。原生质体培养是植物基因工程的一项基础性工作。

植物组织培养经过几十年的发展，由一个一般性的技术发展成为重要的实验研究手段，被生物学领域的多个分支学科如植物生理学、生物化学、遗传学、病理学等所应用；作为植物生物工程的重要手段，组织培养贯穿于全部生物工程之中。在生产应用领域，植物组织培养可以解决许多用传统方法无法解决的问题，极大地节省了人力、物力和财力。因此，学习和掌握植物组织培养技术在理论和实践上都有着极其重要的意义。

二、植物组织培养的理论依据

任何一个完整的植物细胞，无论其分化程度怎样，均保持着恢复到分生状态的能力，因此在培养状态下，外植体能够分裂和生长。这种特性称为植物细胞的全能性 (totipotency)，即一个植物细胞携带有形成一个完整植株所必需的全部遗传信息，具有形成完整植株的能力。

植物细胞的全能性理论是由德国植物学家 Haberlandt 于 1902 年提出的，但该学说从实验的角度被证实则是在 50 多年后的 1958 年，由 Sterward 等人在胡萝卜根的组织培养中

完成的。这就是说，尽管植物细胞具有全能性，但全能性的实现需要一定的条件：一是细胞要从植物体的抑制性影响中解脱出来，即处于离体状态下；二是要提供一定的营养条件。由于不同的细胞在母体中的状态存在有差异，因而不同的植物或同一植物的不同细胞所需要的营养条件就不完全相同。只有满足了这些条件，细胞才能实现其全能性的表达。Sterward 在总结全能性在植物发育中的作用时，认为它是植物体细胞在生命周期中的基本特性。全能性的表达是通过细胞周期中的核质互作得以实现的。其过程包括细胞的脱分化 (dedifferentiation) 和再分化 (differentiation)。

全能性最强的植物细胞大体可分三种类型：

合子细胞 即受精卵。合子细胞具有巨大的发育潜力，自然界中的绝大多数植物是通过这种细胞来实现其全能性的，由合子进一步发育成种子。大多数植物是通过种子繁殖后代的。但由于合子的基因组成未经孢子体时期的鉴定，其未来的表型是未知数，因此一般不适合作为组织培养的外植体。除非是两个优良纯系杂交形成的合子，才可以通过组织培养进行大量的繁殖。

分生组织细胞和幼嫩器官的细胞 这类细胞的全能性保持得最好。由于这些材料可以在鉴定植株表型后采取，因而可以有目的地选择所期望的优良或珍贵材料作为外植体，通过繁殖获得与供体相一致的大量植株。

雌、雄配子和单倍体细胞 这类细胞的特点是只含有体细胞基因组中成对基因的一份，因而所有的基因均能充分表达，隐性基因的表达不会被掩盖。这对育种过程中的选择和淘汰是十分有利的。通过组织培养获得的单倍体植株有用与否一看便知，不需经过若干代的选择。但由于单倍体植株是

高度不育的，因此需要通过染色体加倍方可应用于生产。这就是 70 年代风行全球的单倍体育种。

图 1-1 表示了生命周期、细胞周期和组织培养周期以及它们之间的联系，由此可以看出细胞全能性的实现过程。

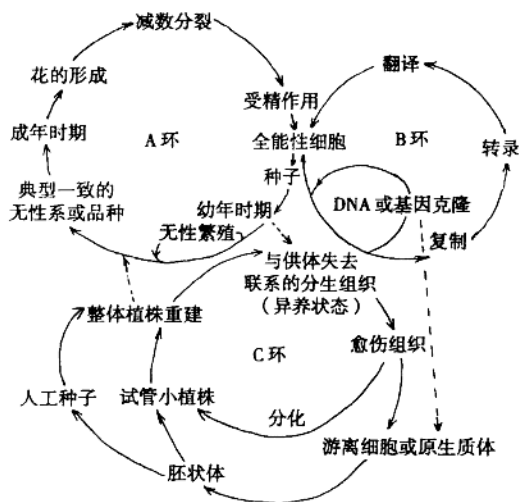


图 1-1 植物细胞全能性实现过程示意图

A 环表示了自然界中植物由合子实现其细胞全能性的过程，它包括了孢子体和配子体的世代交替，即植物的个体发育史，称为生命周期。

在生命周期中，我们应注意到一些木本植物可通过无性繁殖（如插枝、分根、压条等）来保持遗传上的稳定性，即间接实现其全能性。

B 环表示了植物细胞在分子水平上其全能性的保持和实

现过程，即遗传信息传递的中心法则。该过程是在细胞周期中通过核质互作完成的，因而称之为核质周期或细胞周期。

在细胞周期中，细胞内的基因连续复制就会产生出许多相同的基因，这一过程称为基因的克隆（gene clone）。克隆基因可以是细胞中的某一个或某几个甚至是全部的基因，用于基因工程中遗传转化的材料。

C 环表示的是与母体失去联系的植物细胞实现其全能性的过程，需要人为提供培养条件，因而称之为组织培养周期。

在组织培养周期中，组织细胞可通过三种途径实现其全能性：（1）直接通过分生芽形成植株，这一过程极少发生无性系变异，试管苗的快速繁殖就是通过这一途径实现的；（2）首先经过脱分化形成愈伤组织，再经分化产生出再生植株，即所谓的器官发生途径。这一途径程序较复杂且常常出现体细胞变异；（3）胚胎发生方式，即由愈伤组织或悬浮细胞形成胚状体（或称体细胞胚）。胚状体具有与合子胚相同的结构，是双极性的，有共同的维管束贯穿两极，可脱离愈伤组织在无激素的培养基上独立萌发，形成完整的植株，也可制成人工种子（artificial seeds）保存。

三个循环不是孤立存在的，无论是生命周期或组织培养周期，都是在细胞周期基础上进行的；由细胞周期中获得的克隆基因可转入组织培养周期中进行表达；通过组织培养周期获得的具有优良性状的植株，可以在生命周期中经过无性繁殖得以增殖和扩大。

由此可见，植物细胞全能性的进一步开发和利用，可以制造出更多的新品种，并在现有品种改造以及苗木的生产中大大节约空间和时间。

三、植物组织培养的发展简史

植物组织培养的研究始于 20 世纪初，经过一个世纪的发展，它已经由一个简单的培养技术发展成为在生物科学领域得到广泛应用的一门植物生物技术。概括起来，对植物组织培养的研究大致可划分为 4 个阶段。

（一）假说和探索阶段（1902~1929）

“再生”是生物的一个基本特征。在农业和园艺生产中广泛采用的无性繁殖方式，就是利用了生物的这一基本特性。那么，植物再生的最小极限是多少呢？在 19 世纪曾有人用实验方法证明，小于 20 mm 的组织切块不能再生出植株，而且再生植株的组织切块必须具有维管束组织。由于这一实验不是在无菌的条件下进行的，所以不能作为植物组织培养的开端。

1902 年德国植物学家 Haberlandt 在 Schleiden 和 Schwann 所提出的细胞学说影响下，大胆地提出了高等植物的器官组织可以不断分割繁殖，直至分到单个细胞的观点。为了证实所提观点的正确性，他在加入蔗糖的 Knop 溶液中培养小野芝麻、凤眼兰、虎眼万年青属植物的单个细胞。遗憾的是，他虽然观察到了一些细胞的生长、细胞壁的加厚和淀粉的形成等过程，但是并无细胞分裂发生。后来许多人也进行了这方面的研究工作，但始终没有太大进展。现在看来，这些研究工作失败的原因主要有 3 个方面：一是生长素和维生素尚未发现，而这两类物质是植物生长发育所必需的；二是选用的材料是高度分化了的细胞；三是缺乏必要的植物生理学基础。尽管如此，Haberlandt 作为植物组织培养

研究领域的开拓者，不仅首次进行了离体细胞的培养实验，而且在其所发表的“植物离体细胞培养实验”报告中，还提出了胚囊液在植物组织培养中的作用和看护培养等科学的预见。

总之，这一时期除了少数的胚培养略有成效外，在实验方面没有什么突破性的成果，因此是理论上假说的提出和实验上的探索阶段。1928年荷兰植物生理学家 Went 发现了生长素之后，才有力地推动了植物组织培养的向前发展。

(二) 方法和定义的建立阶段 (1930~1939)

生长素作为一种天然的生长调节物质被发现后，1934年 White 用植物组织培养方法建立了第一个番茄根尖的无性繁殖系，使根的离体培养实验首次获得真正的成功。同年，德国的 Gautheret 培养山毛柳和黑杨等树木的形成层，诱导出了愈伤组织。1937年他们又分别在各自的实验中发现了 B 族维生素在植物组织细胞离体培养中的作用。这一发现又直接导致了 1939 年 Gautheret 连续培养胡萝卜根形成层获得成功。同时，White 由烟草种间杂种的瘤组织，Nobecourt 由胡萝卜，都分别建立起了类似的连续生长的组织培养物。因此，White，Gautheret 和 Nobecourt 三人被誉为植物组织培养的奠基人。他们所建立的实验方法和所采用的培养基，被后人不断改良应用。

我国学者在这一研究领域也做出了多方面的贡献，1933年李继侗在银杏胚胎培养中发现 3 毫米大小的胚能正常生长，银杏胚乳提取物可促进离体胚的生长。1935 年罗宗洛和罗士韦发现桑叶提取物可促进玉米离体根的生长。这些发现与同年代发现的“生长素和维生素是植物组织培养中不可