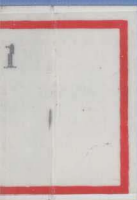
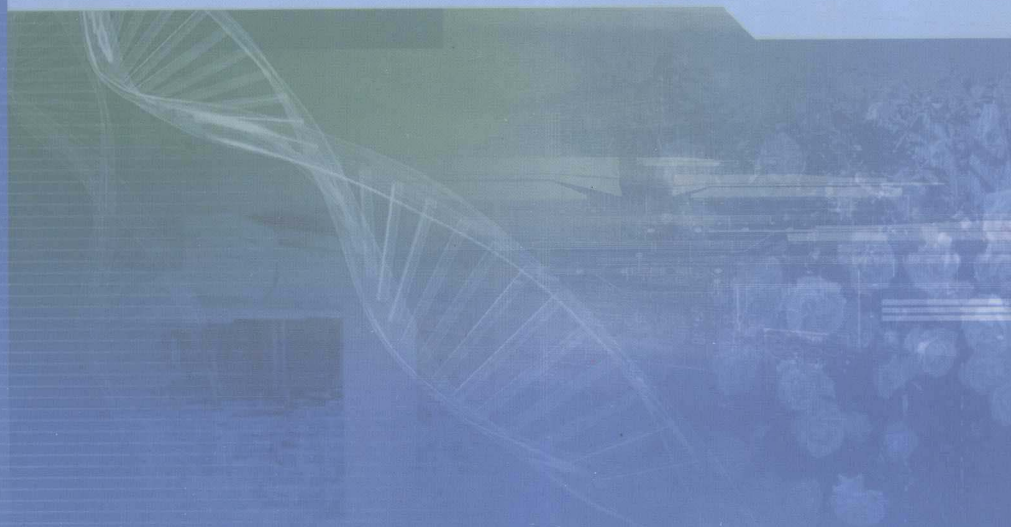


植物组织培养

石晓东 高润梅 编著



中国农业科学技术出版社

植物组织培养

石晓东 高润梅 编著

中国农业科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

植物组织培养/石晓东, 高润梅编著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2009. 2

ISBN 978-7-80233-802-9

I. 植… II. ①石…②高… III. 植物—组织培养
IV. Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 036882 号

责任编辑 张孝安 赵 赟

责任校对 贾晓红

出 版 者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82109708 (编辑室) (010) 82106624 (发行部)
(010) 82109703 (读者服务部)

传 真 (010) 82109709

网 址 [http:// www. castp. cn](http://www.castp.cn)

经 销 者 新华书店北京发行所

印 刷 者 北京华正印刷有限公司

开 本 787 mm × 1092 mm 1/ 16

印 张 16

字 数 240 千字

版 次 2009 年 2 月第 1 版 2009 年 2 月第 1 次印刷

定 价 30.00 元

前 言

植物组织培养是生命科学的重要研究内容，已渗透到植物生理学、病理学、药学、遗传学、育种学以及生物化学等生命科学的各个领域，成为许多基础理论深入研究的必要手段和方法，并广泛应用于农业、林业、工业、医药业等多种行业，创造了巨大的经济效益和社会效益，已成为当代生物科学中最具生命力的学科之一。

植物组织培养是植物生产类、草业科学类、森林资源类、环境生态类和生物科学类等各专业本科生的重要课程。此外，近三十年来，植物组织培养在理论上不断完善和创新，在实践上应用范围迅速扩大，应用技术在不断发展。基于此，我们编写了这本著作。希望本书对各高校相关专业本科生和研究生的学习有所帮助，为科研人员、开发应用人员提供参考。

本书侧重理论，全面、系统地论述了植物组织培养的基本概念、基本原理、基本方法与技术；最后一章举例介绍了植物组织培养在农业、林业、园艺、医药行业等方面的应用方法与技术，全面地反映了国内外最新研究成果，并重点描述了 21 项应用实例，技术方法详细具体，实用性强。

全书包括绪论部分，共计十二章，书末有附录与参考文献。其中绪论到第六章由高润梅编写，第七章至第十一章由石晓东编写，附录与参考文献部分由岳文英整理编写。全书由石晓东统稿。

由于编者水平有限，编写时间仓促，其中一定存在诸多错误和不足之处，敬请各位读者朋友提出宝贵意见！

编 者

2008 年 12 月

目 录

绪论	(1)
第一章 植物组织培养基本设备和一般技术	(11)
第一节 实验室建设	(11)
第二节 培养基	(19)
第三节 外植体	(35)
第四节 培养条件	(42)
第五节 继代培养	(44)
第六节 试管苗驯化移栽	(46)
第二章 植物器官和组织培养	(50)
第一节 植物器官和组织培养的基本程序	(50)
第二节 植物营养器官培养	(55)
第三节 植物繁殖器官培养	(61)
第四节 植物组织培养	(63)
第三章 植物胚培养	(67)
第一节 植物胚培养	(67)
第二节 植物胚乳培养	(73)
第三节 植物胚珠和子房培养	(77)
第四节 植物离体授粉	(81)
第四章 单倍体细胞培养	(87)
第一节 单倍体的起源	(87)
第二节 离体条件下的小孢子发育	(88)
第三节 花药培养	(93)
第四节 小孢子培养	(94)
第五节 未受精子房及胚珠培养	(96)
第六节 单倍体植株鉴定及染色体加倍	(97)
第七节 小孢子(花粉)植株中的倍数变异	(99)

第五章 植物细胞培养	(100)
第一节 单细胞培养	(100)
第二节 植物细胞培养的应用	(115)
第三节 人工种子	(119)
第六章 植物原生质体培养与细胞融合	(132)
第一节 植物原生质体分离	(132)
第二节 原生质体培养	(137)
第三节 植物细胞融合	(140)
第七章 植物体细胞无性系变异及筛选	(150)
第一节 植物体细胞无性系变异的来源	(150)
第二节 植物体细胞无性系变异的遗传学基础	(154)
第三节 体细胞无性系的筛选	(157)
第四节 植物体细胞无性系变异在育种中的应用	(161)
第八章 植物离体繁殖与脱毒苗培育	(164)
第一节 植物离体繁殖的意义与方法	(164)
第二节 离体繁殖中存在的问题及解决途径	(167)
第三节 植物脱毒苗培育	(171)
第九章 植物种质资源的离体保存	(184)
第一节 限制生长保存	(185)
第二节 超低温保存	(187)
第十章 植物遗传转化	(193)
第一节 农杆菌介导法	(193)
第二节 基因枪法	(200)
第三节 其他常用的转化方法	(203)
第四节 转化植株的检测	(206)
第十一章 常见植物的组织培养	(208)
第一节 果树的组织培养	(208)
第二节 花卉植物的离体繁殖	(219)
第三节 林木的离体繁殖	(227)
第四节 药用植物离体繁殖技术	(234)
附录	(241)
参考文献	(243)

绪 论

植物组织培养 (plant tissue culture) 的研究历史可以追溯到 19 世纪中期, 理论基础是植物细胞的全能型 (totipotency) 及植物生长调节剂 (growth regulator) 的应用。植物组织培养是现代生物技术中最为活跃、应用最为广泛的生物技术之一, 已经渗透到植物生理学、植物病理学、药学、植物遗传学、植物育种学、植物生物化学等各个研究领域, 成为现代植物生物技术和农业生产方面的重要研究技术和手段之一, 并广泛的应用于农业、林业、工业、医学等行业, 产生了巨大的经济效益和社会效益, 已成为当代生物科学中最有生命力的一门学科。

一、植物组织培养

(一) 基本概念

植物组织培养是指在无菌和人工控制的环境条件下, 利用人工培养基, 对植物的胚胎 (成熟和未成熟的胚)、器官 (根、茎、叶、花、果实、种子等)、组织 (分生组织、形成层、木质部、韧皮部、表皮、皮层、胚乳组织、薄壁组织、髓部、花药组织等)、细胞 (体细胞、生殖细胞等)、原生质体等进行离体培养, 使其再生发育成完整植株的过程。用于培养的植物胚胎、器官、组织、细胞和原生质体通常称为外植体 (explant)。由于外植体已脱离了母体, 因此, 植物组织培养又称植物离体培养 (plant culture *in vitro*)。无菌 (asepsis) 是进行组织培养的基本要求, 它是指使培养器皿、器械、培养基和外植体等处于无真菌、细菌、病毒等有害生物状态, 以保证外植体在培养器皿中正常生长和发育。人工控制的环境条件是指对光照、温度、湿度、气体等条件进行人工调控, 以满足培养材料在离体条件下的正常生长和发育。

植物组织培养的概念有广义和狭义之分, 前者不仅包括在无菌条件下利用人工培养基对植物组织的培养, 而且包括对原生质体、悬浮细胞和植物器官的培养, 是细胞工程的实验基础; 后者主要指对植物的组织

(分生组织、表皮组织、薄壁组织等)及培养产生的愈伤组织(callus)进行培养。愈伤组织是指在植物受伤后的伤口处或在植物组织培养中外植体切口处产生的一团不定形的薄壁组织。愈伤组织可使伤1:1愈合,使表面细胞呈木栓化而起到保护作用;植物扦插时,愈伤组织可形成不定根;植物嫁接时,愈伤组织可使接穗和砧木愈合;在组织培养中,愈伤组织可独立分化出芽或根,也可同时分化出芽和根。

(二) 基本类型

1. 按培养基分类

(1) 固体培养 加入琼脂等凝固剂使培养基呈固体状态的培养,称为固体培养(solid culture)。

(2) 液体培养 在培养基中不添加任何凝固剂使培养基呈流体状态的培养,称为液体培养(liquid culture)。

2. 按培养过程分类

(1) 初代培养 将外植体进行的第一次培养,称为初代培养(primary culture)。

(2) 继代培养 组织培养中,外植体或培养物培养一段时间后,为了防止培养的细胞老化,或培养基养分利用完而造成营养不良及代谢物过多积累而产生毒害的影响,要及时将其转接到新鲜培养基中继续进行培养,以使其能够顺利地增殖、生长、分化,长成完整的植株。这一过程称为继代培养(subculture)。根据继代培养的次数,可分为1次继代培养和2次继代培养等。

3. 按培养对象分类

(1) 植株培养 对完整植株材料的离体无菌培养称植株培养(plant culture),如幼苗及较大植株的培养。

(2) 胚胎培养 从果实或子房中分离出成熟或未成熟的胚进行离体无菌培养的技术称胚胎培养(embryo culture)。

(3) 器官培养 以植物的根、茎、叶、花、果等器官为外植体的离体无菌培养技术称器官培养(organ culture)。常见的培养器官有根尖、根段、茎尖、茎段、叶原基、叶片、子叶、叶柄、叶鞘、花瓣、雄蕊、胚珠、子房和果实等。

(4) 组织培养 对植物体的各部分组织,如茎尖分生组织、形成层、木质部、韧皮部、表皮组织、胚乳组织和薄壁组织等,或对植物器官培养产生的愈伤组织进行培养称组织培养(tissue culture),二者均通过再

分化诱导形成植株。

(5) 细胞培养 对植物器官或愈伤组织上分离出的单细胞、花粉单细胞或很小的细胞团进行培养,形成单细胞无性系或再生植株的技术称细胞培养 (cell culture)。

(6) 原生质体培养 对用酶、物理等方法除去植物细胞壁的、裸露的、有活性的原生质体团进行培养的技术称原生质体培养 (protoplast culture)。

(三) 优缺点

植物组织培养的优越性主要表现在以下几个方面:

1. 研究材料来源单一, 无性系遗传背景一致

在生物学研究中, 试验材料的遗传性是否一致, 是至关重要的因素, 否则试验结果是没有意义的。在植物组织培养中这是很容易解决的问题。培养中可获得各种水平的无性系, 即克隆 (clone), 如细胞、组织块、器官或小植株。这些材料均来自单一的个体, 遗传性非常一致, 将它们用于试验, 可避免许多误差, 试材纯度很高, 可以减少试验的重复而又不影响试验的精度。

2. 经济方便效率高

试验微型化、精密化, 节约人力物力, 方便管理。比田间试验、盆栽、水培和沙培试验都精细得多, 还避免了其他生物, 尤其是微生物等的干扰。工作效率提高, 一个人可同时做多项试验。

3. 条件可控误差小

培养基中各种成分, 环境条件的温度、光强光质、光周期、变温处理等, 完全可控, 试验处理易于安排调配, 处理间误差很小。

4. 生长快周期短重复性强

这是因为营养及外在条件优良, 所以生长迅速。加上前几项优点, 试验结果重现性很高, 提高了结论的可信程度。

5. 周年试验或生产

因为条件可控, 所以不受季节限制, 可全年连续试验或生产。

组织培养也有自身的局限性, 不能代替田间生产性能试验、大的生态环境因素试验、整体或群体的试验等。

二、植物组织培养发展史

植物组织培养的起源可以追溯到 19 世纪 30 年代。从诞生至现在, 大体可分为 3 个时期:

(一) 萌芽阶段 (19 世纪 30 年代至 20 世纪 30 年代)

根据细胞学说, 1902 年德国植物生理学家 Haberlandt 提出细胞全能性概念, 认为离体培养的植物细胞具有通过体细胞胚胎发生过程而发育成完整植株的潜在能力, 即植物细胞全能性的设想。为了证实这一点, 他用小野芝麻、凤眼兰的叶肉细胞和万年青属植物的表皮细胞等进行培养。遗憾的是限于当时的技术和水平, 培养并没有获得成功。但它对植物组织培养发展起了先导作用, 激励了后人继续从事这方面的研究, 在技术上也是一个良好的开端。

在这个时期人们对植物组织培养进行了一些简单的探讨。1922 年 Haberlandt 的学生 Kotte 和美国的 Robbins, 采用无机盐、葡萄糖和各种氨基酸培养玉米和豌豆的茎尖, 结果形成能进行有限生长的缺绿的叶和根。1925 年 Laibach 将亚麻种间杂交不能成活的胚取出来培养, 使杂种胚成熟, 继而萌发成苗, 从而证明了胚培养在植物远缘杂交中利用的可能性。

(二) 奠基阶段 (20 世纪 30 年代至 50 年代)

在萌芽阶段的基础上, 人们对植物组织培养的各个方面进行了大量的研究, 从而为植物组织培养的快速发展和应用奠定了基础。1934 年美国植物生理学家 White 培养番茄的根, 建立了活跃生长的无性繁殖系, 并能进行继代培养, 在以后的 28 年间转接培养 1 600 多代仍能生长。利用这些根系培养物, 人们有效地研究了光、温、pH 值和培养基组成对根生长的影响, 为以后的棉花等组织培养技术的成熟奠定了基础。1937 年他们首先配制适合于根培养的综合培养基, 并发现了 B 族维生素对离体根生长的重要性。同年法国的 Cauthert、Nobecourt 培养块根和树木形成层使其生长。White、Cauthert 和 Nobecourt 确立的植物组织培养的基本方法成为以后各种植物组织培养的技术基础。1943 年, White 提出了植物细胞“全能性”学说, 并出版了《植物组织培养手册》, 从而使植物组织培养成为一门新兴学科。

(三) 快速发展和应用阶段 (20 世纪 50 年代至现在)

自从 20 世纪 50 年代末, 植物组织培养得以快速发展, 在这个时期先后从大量的物种诱导获得再生植株, 并广泛地应用于园艺和农业生产, 单倍体育种、无菌苗的获得和快速繁殖等均是这个阶段的成就。

1958 年, 英国学者 Steward 在美国将胡萝卜髓细胞通过体细胞胚胎发生途径培养成为完整的植株。这是人们第一次实现人工体细胞胚, 使 Haberlandt 的愿望得以实现, 同时也证明了植物细胞的全能性。这是植物

组织培养的第一个突破，他对植物组织和细胞培养产生了深远的影响。

1960年，英国学者 Cocking 用酶法分离原生质体成功，开创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第二个突破。同年，Morel 等培养兰花的茎尖，获得了快速繁殖的脱毒兰花。其后，国内外先后开创了兰花快速繁殖工作，并形成了“兰花产业”。在“兰花产业”高效益的刺激下，植物离体快速繁殖和脱毒技术得到了快速发展，实现了试管苗产业化。目前这一技术已在国内外大量应用，香蕉、甘蔗等不少作物均是这一技术直接应用的结果，并取得了巨大的经济效益和社会效益。另外，在这个时期人们对植物组织培养的条件不断完善，其中最典型的是：1962年，Murashige 和 Skoog 发表的一种适用于烟草愈伤组织快速生长的改良培养基，该培养基后来被称为 MS 培养基，现已经广泛应用于植物组织培养。

1964年，印度学者 Guha 和 Maheshwari 成功地培养曼陀罗花药获得单倍体再生植株，从而促进了植物花药培养单倍体育种技术的发展。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 和 Wallin 等人建立了原生质体的高 Ca^{2+} 、高 pH 值 PEG 融合法，把植物体细胞杂交技术推向新阶段。1975年，Kao 和 Michayluk 开发出专门用于植物原生质体培养的 KM-8P 培养基，被研究者们广泛使用。1978年，Melchers 等将番茄与马铃薯进行体细胞杂交获得成功。

1978年，Murashige 提出了“人工种子”（artificial seed）的概念，之后的几年在世界各国掀起“人工种子”开发热潮。

1981年，Larkin 和 Scowcroft 提出了体细胞无性系变异（somaclonal variation）的概念。

1982年，Zimmermann 开发了原生质体的电融合（electrofusion）。20世纪80年代中期，由于水稻（Fujimura 等，1985；Yamada 等，1985）、大豆（Wei 和 Xu，1988）、小麦（Harris 等，1989；Ren 等，1990；Wang 等，1990）等主要农作物原生质体植株再生的相继成功，将植物原生质体研究推向高潮。实际上，20世纪70~80年代，原生质体植株再生与体

细胞杂交研究一直是植物细胞组织培养研究领域的主旋律。

20 世纪 80 年代初,随着土壤农杆菌包括根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和发根农杆菌 (*A. rhizogenes*) 成功地应用于植物遗传转化 (genetic transformation), 植物基因工程研究开始成为研究的热点和重点。1983 年, Zambryski 等用根癌农杆菌转化烟草, 在世界上获得首例转基因植物, 使农杆菌介导法很快就成为双子叶植物的主导遗传转化方法。Horsch 等于 1985 年建立了农杆菌介导的叶盘法 (leaf discs), 该方法操作简单, 效果理想, 开创了植物遗传转化的新途径。但是, 这个时期所利用的农杆菌主要感染双子叶植物, 对单子叶植物的转化未能成功。为了克服这一困难, 美国的 Sanford 等人于 1987 年发明了基因枪法 (particle bombardment) 用于单子叶植物的遗传转化, 这一技术广泛应用于水稻、小麦、玉米等主要农作物的遗传转化。

进入 20 世纪 90 年代, 农杆菌介导法在水稻、玉米等主要农作物上取得突破性进展。Gould 等 (1991) 利用农杆菌转化玉米茎尖分生组织获得转基因植株。Chart 等 (1993) 在水稻的农杆菌介导的遗传转化上也获得成功, 他们使用的材料是水稻的未成熟胚。Hiei 等 (1994) 和 Ishida 等 (1996) 用农杆菌介导法高效转化水稻和玉米获得成功。之后在小麦 (Cheng 等, 1997)、大麦 (Tingay 等, 1997) 等单子叶植物上也相继获得成功。

截至目前, 已从 10 个科 24 个属的 250 多种植物的花药培养获得单倍体再生植株并在生产上大面积推广种植。我国在这个领域发展较快, 在这 250 种植物中, 约有 1/4 的植物 (如小麦、玉米、大豆、甘蔗、橡胶、杨树和棉花等) 是我国科技人员首先诱导获得的。

三、植物组织培养的应用及展望

随着植物组织培养技术的日益完善, 其应用也越来越广泛。其主要应用领域有以下几个方面:

(一) 快速繁殖

在植物组织培养技术研究基础上发展起来的植物快速繁殖方法, 由于材料均来自单一的个体, 遗传性状非常一致, 试验与生产过程中可以微型化和精密化, 节约人力和物力, 可人为地控制培养基中的各种成分、环境条件中的温湿度与光强、光质和光周期, 全年均可连续试验和生产, 因而近年来在农业上的应用发展十分迅速。

近年来利用快速繁殖的物种越来越多, 到目前为止已有几千种。但

采用快速繁殖进行工厂化大规模生产的品种主要为花卉（如康乃馨、兰花等）、热带水果（如香蕉、甘蔗、草莓等）、树木（如桉树等）和珍稀植物（如软子石榴、太和樱桃、猥实等）。植物组织培养快速繁殖不仅可以繁殖常规品种，而且还可以繁殖植物不育系和杂交种，从而使这些优良性状得到很好的保持。

（二）植物脱毒

在植物的生长和发育过程中，由于病毒的感染而严重影响作物的产量和品质。柑橘的衰退病、葡萄的扇叶病、番木瓜的叶环斑病、草莓的病毒病等均使许多国家遭受极大的损失，我国的枣疯病几乎毁灭密云的金丝小枣，而苹果锈果病、香蕉和马铃薯的病毒病曾使我国各个生产基地遭受极大的损失。康乃馨、菊花、百合和风信子等的鳞茎、球茎、宿根类花卉及兰科植物退化严重，极大地影响其观赏价值。在一般情况下，一种植物往往受到至少一种病毒的感染，例如草莓受到 62 种病毒和支原体类菌质体的感染，马铃薯受到 30 种病毒的感染。在多数情况下，植物感染病毒后，症状并不明显，但却使产量大幅度下降，对农业生产为害十分严重。

大量的生产和实践证明，利用植物组织培养技术可有效地去除植物体内的病毒。其具体方法是培养植物茎尖分生组织。由于在植物的生长发育过程中，病毒逐渐感染新生细胞，但茎尖分生组织细胞分裂很快，在初期并不含有病毒。如果在病毒感染之前，将其切下，并放在合适的培养条件下让其发育成完整的植株，这样由无病毒的茎尖分生组织培养获得的植株就不含有病毒。但是有一点需要注意，并不是所有茎尖培养获得的植株均为无病毒植株，这取决于你的选材是否含有病毒，所以在获得再生植株后，需要对其进行鉴定，以确保是否含有病毒。

由于利用茎尖培养脱毒技术成功地克服了病毒的感染，因而在栽培这些脱毒植株时，往往不需要化学农药防治，从而减轻了生产投入，同时还减轻了环境污染，因而具有良好的经济效益和社会效益。目前这种方法已成为有效克服病毒病为害的主要方法之一，自从 20 世纪 50 年代发现通过植物组织培养技术可以去除植物体内的病毒以来，这方面发展很快。目前通过茎尖脱毒获得无病毒种苗的植物已超过 100 多种，被脱除的病毒更多。20 世纪 60 年代后，国际上逐渐建立了无病毒试管苗工厂，欧、美国家无病毒种苗年产值已达千万元以上，预计今后无病毒种苗的需求量还会不断增加。

在植物的脱毒生产中，茎尖培养往往与快速繁殖相结合。即先进行茎尖培养脱除病毒，然后通过快速繁殖以获得大量的材料用于生产。

(三) 体细胞无性系变异和新品种培育

在植物组织培养中，往往存在着大量的变异，这种变异称为体细胞无性系变异。体细胞无性系变异具有以下几个特点：

1. 变异的多方向性

植物体细胞无性系变异具有多方向性，既有有利的变异，也有不利的变异；既有可以看到的变异（如株高、花的特征、不育性等），也有生理变异（如蛋白质含量等）。只要你能发现的性状，变异就有可能在此发生。

2. 变异的普遍性

变异在植物组织培养中经常发生，无处不有，无处不在。植物组织培养植株再生过程中存在着广泛的变异，它出现在植物组织培养植株再生的各个时期，分布于植物的各种性状。这些变异既有数量性状变异，又有质量性状变异；既有农艺性状变异，又有经济性状变异；既有表型变异，又有内在生理变异。与常规杂交和辐射诱变相比，变异既广泛又普遍，且具有随机性，其中有些变异是常规育种难以获得的。而且这些变异大多数是由少数基因突变引起的，因而变异后代极易纯合，而不像常规杂交一样需要7~10年才能获得稳定的品种，而植物体细胞无性系变异一般仅需要2~3年即能获得纯合的品系。

3. 植物体细胞无性系变异的类型

植物组织培养再生植株后代的变异可分为两类。一类是可遗传的变异，称为遗传型变异，这类变异可遗传给后代，是由于培养过程中遗传物质的改变（尤其是基因突变）所引起的；这类变异较多，如棉花衣分、绒长、铃重、株形、成熟期等的变异。另一类变异是不能遗传的变异，为生理型变异，这类变异是由于培养过程中的化学物质尤其是激素的作用而引起的，这类变异仅仅是培养过程中的一种生理适应，当将其移入田间后，随着在自然条件下生长发育时间的推移就会自动恢复为原来的性状；属于这类变异的性状也较多，其中常见的有叶形、育性等，如植物再生植株在刚移栽出来时大多表现出雄性不育，但随着生长时间的延长其育性就会逐渐恢复。植物再生植株的生理变异在经过一个世代的生长发育后，大多均能恢复正常。

植物再生植株的两类变异，并不是相互独立的，有时也可交替或兼容出现的。如在植物再生植株中表现为雄性不育的个体中经过一到两代

的培养大多恢复正常育性,但有少数仍保持不育,且其不育性可以稳定地遗传下去。这就是说植物再生植株中的不育这种体细胞无性系变异性状既有遗传型变异,也有生理型变异,因而在观察和研究中应分别对待。

4. 引起植物体细胞无性系变异的原因

引起植物组织培养中产生体细胞无性系变异的原因很多,其中培养基中激素的种类和浓度是一重要原因,高浓度的 GA 和 IAA 往往会造成畸形胚的高频发生,TDZ 的使用使产生的再生植株大多数是白化苗或玻璃化苗,其再生植株后代也变化多样。培养时间是造成表型变异的另一重要原因。实验证明,随着培养时间的延长,染色体变异的频率升高,变异的性状和变异的范围扩大。另外,培养材料中自身存在的变异细胞也是造成植物组织培养中体细胞无性系变异的一个原因。

在植物组织培养中,由于外界调控与内在机制的不同,从而造成了变异。这些变异有些是可遗传的变异,即控制性状的基因发生了变化;有些则是不可遗传的变异,这些变异为了适应周围的培养环境而暂时适应,但在培养一段时间后就会恢复原来的性状。因而在体细胞无性系筛选中要注意区分这两类变异,只有在可遗传的变异中才能筛选出有益的性状。

5. 植物体细胞无性系变异的利用价值及途径

体细胞无性系变异是一种重要的遗传变异来源,是一种重要的遗传资源,它既丰富了种质资源库,又拓宽了植物基因库的范围,在作物育种中具有深远的意义和广泛的应用前景因而受到了国内外生物技术学者、育种家的高度重视,并先后在玉米、水稻、甘蔗等作物上取得了较大的进展。

在植物体细胞无性系变异的可遗传变异中大多是不利的变异,不能直接服务于育种和生产,仅有极少数变异是有利的变异,可以直接或用作杂交亲本材料服务于育种。

(四) 单倍体育种

花药培养应用于农业的研究起始于 1964 年 Guha 与 Maheshwari 的毛叶曼陀罗的花药培养,随后在世界范围内掀起一个高潮。据 Maheshwari 等 1983 年统计,已经有 34 科 88 属 247 种植物对花药培养获得成功,其中小麦、水稻、大豆、玉米、甘蔗、棉花、橡胶和杨树等 40 余种植物花药培养单倍体再生植株是由我国学者首先培育出来的。在其基础上的单倍体育种也获得了辉煌的成绩,如“京花一号”小麦、“中花一号”水稻品种的种植面积均已经达到百万亩以上,还有具有抗稻瘟病和抗白叶枯病的“单 209”与“单 209 矮”水稻、“海花三号”甜椒新品种等。

(五) 种质保存

用植物组织培养技术保存种质具有以下优点:

第一, 在较小的空间内可以保存大量的种质资源。

第二, 具有较高的繁殖系数。

第三, 避免外界不利气候及其他栽培因素的影响, 可常年进行保存。

第四, 在保存过程中, 不受昆虫、病毒和其他病原体的影响。

第五, 有利于国际间的种质交换与交流。

因而近来人们研究较多。用于组织培养保存的材料很多, 如茎尖、花粉、体细胞胚、细胞系等。

(六) 遗传转化

这是组织培养应用的另外一个重要领域, 因为到目前为止的大多数遗传转化方法仍需要通过植物组织培养来进行。另外, 组织培养的应用还有人工种子、有用物质的生产等。

近年来, 植物组织培养取得了引人瞩目的进展, 许多成果与技术已应用于生产和科研, 已解决了一些其他方法不易解决的难题, 有些难题则可能在不久的将来被突破。无疑, 这将鼓舞人们更加信心百倍地对植物组织培养技术进行研究探讨。随着近代细胞培养技术的不断完善, 显微分辨力的提高以及分子生物学、分子遗传学的进展, 必将推动应用科学的迅速发展。如用原核生物作材料来生产胰岛素、干扰素等, 利用植物的细胞甚至原生质体来代替目前仍然是遗传工程最重要的细菌, 将固氮的 *nif*-基因导入非豆科植物并能固氮等。展望未来, 无论在理论上或实际应用上, 植物组织培养无疑将会使植物器官、组织、细胞培养的技术与方法、无性系快速繁殖、无病毒苗的工厂化生产、新品种新物种的创造和培育、突变体的选择和利用、体细胞杂交、基因转移、次生代谢物质生产、人工种子技术以及建立真正的植物基因库或有价值的基因型的基因文库等各个方面的研究更加深入; 涉及的植物种类、品种, 尤其是一些珍贵植物和在人类社会发展中的重要植物会更多; 应用的范围和前景更加广泛。有理由相信, 随着科学技术的不断进步, 植物组织培养这门崭新的技术将日益普及和深入, 展现出诱人的前景, 必将成为现代生产中重要的技术手段。

第一章 植物组织培养基本设备和一般技术

植物组织培养是一项技术性较强的工作。为了确保组织培养工作的顺利进行,达到无菌条件,就必须保证与植物组织培养研究或试管苗商业化生产任务、规模及当地条件等相适应的硬件条件与软件条件。硬件条件包括实验室与设施、环境、仪器、设备、器皿、器具等;软件条件就是指无菌条件和管理体系。要按照工作的目的和规模决定实验室的设计。实验室要合理布局,通常按自然工作程序先后,安排成一条连续的生产线。一般组织培养的工序为:培养器皿的清洗——培养基的配制、分装和高压灭菌——无菌操作(材料的表面灭菌和接种)——接种好的培养物放入培养室培养——试管苗驯化、移栽和初期的管理。

第一节 实验室建设

一、实验室的建立

用于植物组织培养操作的场所称植物组织培养实验室,简称组培室,是用来进行培养基配制、灭菌、接种和培养的地方。以试管苗规模化生产为目的的大型组织培养实验室也称组培车间或组培工厂。完整的组织培养实验室是由一组执行不同功能的区间组成,并且按组织培养操作程序设置和排列,一般应包括准备室、接种室、培养室(图1-1),另加一定面积的试管苗驯化室、温室或大棚等。

(一) 准备室

准备室也称化学实验室或通用实验室(图1-1A),30m²左右,要求通风、明亮,一般具有洗涤、药品贮存、称量、培养基配制和灭菌等功能。

1. 洗涤功能

主要用于培养用的容器、玻璃器皿、接种用具和培养材料的清洗。新购进的玻璃器皿一般应先用1%的盐酸除去可溶性无机物,再用中性洗