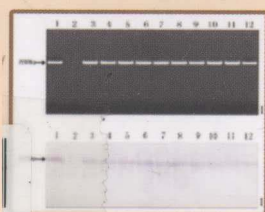
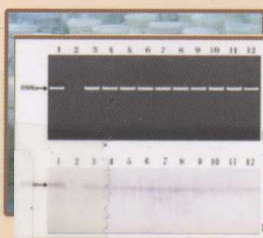


马铃薯

组织培养原理与技术

卢翠华 邸 宏 张丽莉 编著



中国农业科学技术出版社

马铃薯

组织培养原理与技术

卢翠华 邱 宏 张丽莉 编著

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

马铃薯组织培养原理与技术/卢翠华, 邸宏, 张丽莉编著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2009. 5

ISBN 978-7-80233-874-6

I. 马… II. ①卢…②邸…③张… III. 马铃薯 - 组织培养
IV. S532.035.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 059641 号

责任编辑 邬震坤

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) 82106626 (编辑室) (010) 82109704 (发行部)
(010) 82109703 (读者服务部)

传 真 (010) 82106626

网 址 <http://www.castp.cn>

经销者 新华书店北京发行所

印刷者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 850 mm × 1 168 mm 1/32

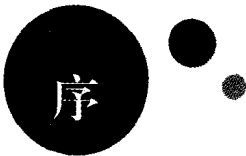
印 张 9.5 插页 2

字 数 206 千字

版 次 2009 年 5 月第 1 版 2009 年 5 月第 1 次印刷

定 价 30.00 元

— 版权所有 · 翻印必究 —



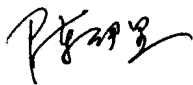
序

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是我国继水稻、小麦和玉米之后的第四大粮食作物, 由于马铃薯具有适应性强、产量高、营养成分全和加工产业链长的特点, 在提供营养全面的食品、保证粮食安全、帮助农民脱贫致富、促进冬季农业发展等方面发挥了巨大作用。根据联合国粮农组织 (FAO) 统计, 2006 年全世界种植马铃薯的国家有 155 个, 总面积约为 7 523 万亩。马铃薯已经成为全球粮食系统的重要部分, 是世界最大非谷类食品, 其产量在过去的十年间一直以每年 4.5% 的速度增长, 其全球产量在 2007 年达到 3.25 亿吨的创纪录水平。我国马铃薯种植面积增长 30%, 年产量已突破 7 000 万吨, 种植面积和总产量均跃升至世界首位。

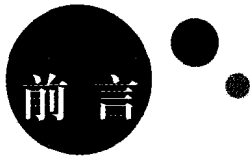
东北农业大学是中国最早开展马铃薯遗传育种教学、科研及研究生培养工作的单位之一, 以新品种选育和资源创新为基础, 东北农业大学马铃薯研究中心多年来在马铃薯茎尖脱毒快繁、气

雾法生产微型薯、花药培养、原生质体培养以及马铃薯遗传转化等领域做了大量的研发工作，取得了一定成绩，先后发表相关研究论文近百篇。

为了适应快速兴起的马铃薯产业，总结编写了《马铃薯组织培养原理与技术》一书。本书充分反映了东北农业大学马铃薯研究中心“六五”至“十一五”期间承担国家和省马铃薯攻关项目的成果，以及作者多年的实践经验，结合国内外的最新研究进展，内容丰富，资料翔实，全面具体。该书的撰写和出版，对我国从事马铃薯行业的科技工作者、生产者及农业高等院校的师生都具有一定参考价值。



中国作物学会马铃薯专业委员会副主任秘书长
东北农业大学马铃薯研究中心主任



前言

自 Haberlandt 提出植物细胞全能性理论以来,在科学家们的努力下,植物组织培养技术日趋完善成熟。近 40 年来,这项技术得到了迅速发展,已渗透到植物生理学、病理学、药学、遗传学、育种以及生物化学等各个研究领域,成为生物学科中的重要研究技术之一,产生了巨大的经济效益和社会效益。

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是茄科茄属双子叶植物,是世界四大粮食作物之一,由于它具有适应性强、产量高、营养成分全和加工产业链长的特点,受到了全世界的广泛重视。截至 2006 年,世界上主要种植马铃薯的国家有 155 个,总产量近 3 亿吨。

我国是世界马铃薯第一大生产国,面积和总产量约占世界的 1/4,但是单产水平还远低于世界平均水平,我国学者为此做了大量的研究工作,取得了长足进展。

随着生物技术的飞速发展,花药培养、原生

质体融合及遗传转化等技术的应用为解决马铃薯遗传资源狭窄开辟了一条新的育种途径。利用组织培养技术获得无毒苗生产马铃薯种薯,已在全国大面积应用,为提高马铃薯单产和质量作出了重要贡献,产生了巨大的经济和社会效益。为了推动植物组织培养技术更好地应用于马铃薯育种实践,我们结合国内外研究进展,总结东北农业大学马铃薯研究中心科学研究结果,撰写了《马铃薯组织培养原理与技术》一书。本书图文并茂,生动具体,实践性强,可作为从事马铃薯组织培养及相关专业的科技人员和学生的参考书。

本书分为七章,主要阐述了植物组织培养概况、马铃薯的一般生物学特性和组织培养应用前景、组织培养实验室、茎尖脱毒与快繁、马铃薯花药培养、原生质体培养及细胞融合、马铃薯遗传转化等几个方面的原理、操作方法及研究进展。卢翠华编写第一章、第二章和第五章,张丽莉编写第三章和第四章,邸宏编写第六章和第七章。全书由主编卢翠华研究员统稿和定稿。

感谢东北农业大学马铃薯研究中心的陈伊里教授、王凤义教授、吕文河教授、石瑛副研究员、中心的全体成员和研究生以及本研究领域的专家、学者多年来给予的积极支持和热情帮助。

本书所引用的资料来源较多,不可能全部引入参考文献目录,故仅在引述处注明著者和年份以便查阅。限于编者学术水平和经验不足,不当之处在所难免,恳请各位读者予以指正和谅解。

编 者

2009年4月

目 录

1 绪论	1
1.1 植物组织培养的优越性	1
1.2 植物组织培养的任务	3
1.3 植物组织培养的特点	3
1.4 植物组织培养研究的内容	4
1.5 组织培养中常用的名词术语	5
1.6 植物组织培养的发展简史	6
1.7 植物组织培养技术在农业上的应用	11
2 马铃薯的生物学特性与组织培养的应用前景	15
2.1 马铃薯的生物学特性	16
2.2 马铃薯组织培养的应用前景	37
3 植物组织培养实验室的设施和基本操作	43
3.1 植物组织培养实验室组成与设计	43
3.2 组织培养常用仪器设备与培养条件	49
3.3 组织培养的基本操作	60
3.4 培养基	75
3.5 MS 基本培养基的配制实例	83
4 马铃薯茎尖组织脱毒培养与快繁	87
4.1 马铃薯病原的主要类型及传染途径	88

4.2	马铃薯脱毒的主要方法	95
4.3	脱毒苗鉴定	104
4.4	马铃薯脱毒微型薯的快繁	120
4.5	马铃薯茎尖脱毒实例	131
5	马铃薯花药培养	141
5.1	植物单倍体概念	141
5.2	马铃薯花药培养	145
5.3	马铃薯花药培养再生植株的鉴定和染色体加倍	159
5.4	我国马铃薯花药培养的研究进展	164
5.5	马铃薯花药培养实例	165
6	马铃薯原生质体培养及原生质体融合	170
6.1	马铃薯原生质体培养	171
6.2	马铃薯原生质体融合	190
6.3	马铃薯原生质体培养与细胞融合的应用	204
6.4	马铃薯原生质体融合实例	206
7	马铃薯遗传转化	214
7.1	常用的马铃薯遗传转化受体系统	215
7.2	马铃薯常用的遗传转化方法	220
7.3	转化体的鉴定与分析	236
7.4	马铃薯遗传转化研究进展	247
7.5	马铃薯遗传转化实例	271
	参考文献	280



绪 论

植物组织培养是指在无菌和人工控制的环境条件下,利用适当的培养基,对离体的植物器官、组织、细胞及原生质体进行培养,使其再生细胞或完整植株的技术。由于培养的植物材料已脱离了母体,又称为植物离体培养。

植物组织培养可分为广义概念和狭义概念。广义概念是指对植物的器官、组织、细胞及原生质体进行离体培养的技术;狭义概念是指对植物的组织(如分生组织、表皮组织、薄壁组织等)及培养产生的愈伤组织进行离体培养的技术。

植物组织培养概念中所提到的无菌是指使培养器皿、器械、培养基和培养材料等处于无真菌、细菌、病毒等微生物的状态,以保证培养材料在培养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控制,以满足植物培养材料在离体条件下的正常生长和发育。

本章就植物组织培养的优越性、任务、特点、内容、发展简史及在农业上的应用加以阐述。

1.1 植物组织培养的优越性

植物组织培养的优越性在于研究植物器官、组织、细胞、

原生质体的生长和分化规律时，既可以不受植物体其他部分干扰，也不受外界环境条件影响。其主要优越性表现在以下几个方面。

1.1.1 试验材料来源单一，无性系遗传特性一致

由于植物组织培养材料是细胞、组织、器官、小植株等，个体微小，均可来自同一个体，遗传性状高度一致，培养中获得的各种水平的无性系（即克隆，clone）具有相同的遗传背景，极大地提高了试验的精确度。

1.1.2 成本低，效率高

组织培养试验微型化、精密化，管理集约精细，一个人可同时做多项试验，工作效率高。植株也比较小，往往 20～30d 为一个周期。所以，虽然植物组织培养需要一定设备及能源消耗，但由于植物材料能按几何级数繁殖生产，故总体来说成本低廉，且能及时提供规格一致的优质种苗或脱病毒种苗。

1.1.3 环境条件可人为控制

培养基中各种成分和环境条件（如温度、光强、光质、光周期、变温处理等）完全可以人为控制，试验处理易于安排调配，处理间误差小，极利于高度集约化和高密度工厂化生产。

1.1.4 生长周期短，繁殖率高

植物组织培养是根据不同植物不同外植体的不同要求而提供不同的培养基与培养条件，营养与环境条件优越且一致，外

植株生长、分化快，可控程度高，重复性好，植物材料能按几何级数繁殖生产，繁殖率高。

1.1.5 管理方便，利用工厂化生产和自动化控制

组织培养采用的植物材料完全是在人为提供的培养基和小气候环境条件进行生长的，摆脱了大自然中四季、昼夜的变化以及灾害性气候的不利影响，且条件均一，极利于高度集约化和高密度工厂周年培养化生产，也利于自动化控制生产。与盆栽、田间栽培等相比管理方便，可以大大节省人力、物力及田间种植所需要的土地。

1.2 植物组织培养的任务

植物组织培养的任务在于研究无菌及离体条件下，细胞、组织、器官所需营养条件和环境条件；细胞、组织、器官的形态发生和代谢规律；再生个体的遗传和变异；植物脱毒的方法和机理；人工种子制备的方法与技术；珍贵植物特别是一些繁殖系数低的植物的大量快速繁殖的方法与技术；体细胞变异的获得与筛选；次生代谢产物的生产与生物转化；种质资源的离体保存机理和方法；原生质体融合的方法和机理；遗传转化细胞、组织的再生与培养等，从而改良植物品种，创造新的植物种类，加速珍贵植物品种的繁殖，为人类造福。

1.3 植物组织培养的特点

主要是采用微生物学的试验手段来操作植物离体的器官、

组织和细胞。具体表现在以下几个方面：

(1) 组织培养的整个过程都是在无菌条件下进行的，外植体、培养基、接种环境都需经过无菌处理。

(2) 组织培养在多数情况下是利用成分完全确定的人工培养基进行的，除少数特殊情况（如进行营养缺陷型突变细胞的筛选）外，培养基中包括了植物生长所需的水分和一切大量元素、微量元素、有机物和植物激素。

(3) 组织培养的起始材料可以是植物的器官、组织，也可以是单个的细胞，它们都处于离体状态下。

(4) 组织培养通过连续继代培养可以不断增殖，形成克隆，或通过改变培养基成分，特别是其中的植物激素的种类和配比，而达到不同的试验目的，如茎芽增殖或生根。

(5) 组织培养是在封闭的容器中进行的，容器内气体和环境气体可通过瓶塞或其他封口材料进行交换。

(6) 组织培养的环境温度、光照强度和时间等都是人为设定的，找出这些物理因素的最适参数对组织培养的成功也很重要。

1.4 植物组织培养研究的内容

(1) 胚胎培养：是指对幼胚、胚珠、珠心及胚乳的离体培养。

(2) 器官培养：指对植物根、茎、叶、花、果实的培养。

(3) 组织培养：植物各部分组织的离体培养，使之形成愈伤组织的培养。

(4) 细胞培养：用能保持较好分散性的植物细胞或很小

的细胞团为材料进行离体培养，如叶肉细胞、根尖细胞等。

(5) 原生质体培养：借助某些方法，除去植物细胞的细胞壁，培养裸露的原生质体，使其在特定的培养基上，重新形成细胞壁并继续分裂、分化形成植株的方法。

(6) 细胞杂交：利用植物组织的原生质体融合成杂种细胞，进行体细胞遗传和育种研究。

从上面6个方面延伸的内容有：植物脱毒培养；突变体筛选；超低温冷冻贮藏；人工种子；遗传转化等。可见植物组织培养的内容非常丰富，从大到器官小到细胞，乃至脱除细胞壁的原生质体。

1.5 组织培养中常用的名词术语

(1) 外植体：由活植物体上切取下来用于组织培养的器官或组织叫外植体。

(2) 愈伤组织：在人工培养基上由外植体长出来的一团无序生长的薄壁细胞。

(3) 悬浮培养：细胞或细胞团培养于液体培养基中。

(4) 继代培养：将初代培养获得的培养体移植于新鲜的成分相同的培养基中，这种反复多次移植的培养称为继代培养。

(5) 脱分化：一个成熟细胞转变为分生状态的过程叫做脱分化。外植体在人工培养条件下通常不能保持已有的分化状态，而是通过细胞分裂逐渐丧失其原有分化的结构和功能，而形成愈伤组织等。

(6) 再分化：指脱分化的细胞或组织，经诱导产生新的

具有特定结构或功能的组织或器官的一种现象。

(7) 细胞全能性：植物细胞具有该植物体全部遗传的可能性，在一定条件下如同受精卵一样，具有发育成完整植物体的潜在能力。

(8) 器官发生：分生组织的突起成瘤状结构，可诱导出完全分化的根或芽。其中茎芽和根是在愈伤组织的不同部位分别独立形成的，形成的时间也不一致，为单极性结构，在根和芽之间没有共同的维管束把二者连在一起。

(9) 胚胎发生：在愈伤组织表面或内部形成很多胚状体，它们经历的发育阶段与合子胚相似，成熟胚状体的结构也与合子胚相同。胚状体是双极性的，有共同的维管束贯穿两极，可脱离愈伤组织在无激素培养基上独立萌发。

(10) 体细胞无性系变异：细胞、组织和器官在离体培养下诱导的愈伤组织或植株所产生的变异。

(11) 无性繁殖：植物的体细胞通过细胞分裂，在一定条件下产生新的器官和新的植株，这就是植物的无性繁殖。

1.6 植物组织培养的发展简史

植物组织培养技术的研究历史可以追溯到 19 世纪中期。从其诞生到现在，大体经历了探索、奠基和技术迅速发展 3 个阶段。

1.6.1 探索阶段

从 19 世纪中期至 20 世纪 30 年代初为植物组织培养理论探索和开创阶段。在这一阶段中，细胞学说的产生和细胞全能

性的提出为组织培养技术的产生奠定了理论基础。在这些理论的指导下所开展的有关试验，对组织培养技术的建立进行了有益的探索。

1838～1839年，德国的植物学家 Schleidon 和动物学家 Schwann 创立了细胞学说 (cell theory)，其核心内容是：一切生物都是由细胞构成的，细胞是生物体的基本结构单位，细胞只能由细胞分裂而来。在这一学说的基础上，1902年，德国著名植物生理学家 Haberlandt 提出了高等植物的器官和组织可以不断分割，直至单个细胞的观点，并首次进行了离体细胞培养试验。他用小野芝麻的叶栅栏组织和虎眼万年青属的表皮细胞进行离体培养。由于受到当时技术和设备的限制，结果仅观察到组织和细胞体积的膨大，而未见到细胞分裂。Haberlandt 试验失败的原因，现在看来主要是，他所选用的材料都是已经高度分化了的细胞，另外他所用培养基过于简单，特别是培养基中没有包括诱导成熟细胞分裂所必需的生长激素，这是因为生长激素在当时还没有发现。然而，作为植物组织培养的先驱者，Haberlandt 的贡献不仅在于首次进行了离体培养的试验，而且在1902年发表了“植物离体细胞培养实验”的报告，报告指出：作为高等植物的器官和组织基本单位的细胞有可能在离体培养条件下实现分裂分化，乃至形成胚胎和植株。这种见解后来被称为细胞全能性学说。

1904年 Hanning 在无机盐和蔗糖溶液中培养了胡萝卜和辣根菜的胚，并使这些胚在离体条件下长到成熟。另一方面是根培养的试验，1922年，美国的 Robbins 和德国的 Kotte 分别报道培养离体根尖获得某些成功，Kotte 采用了无机盐、葡萄糖、蛋白胨及添加天冬酰胺等各种氨基酸的培养基，Robbins 用含

无机盐、葡萄糖或果糖的琼脂培养基，培养了长度为 1.45 ~ 3.75cm 的豌豆、玉米和棉花的茎尖，形成了一些缺绿的茎和根，这是有关茎尖培养的最早试验。1925 年、1929 年，Lai-bach 通过培养亚麻种间杂交幼胚，成功地获得了种间杂种，从而证明了胚培养在植物远缘杂交中利用的可能性。1933 年，中国学者李继侗和沈同首次报道了利用天然提取物进行植物组织培养的研究，他们利用加有银杏胚乳提取物的培养基，成功地培养了银杏的胚。

1.6.2 奠基阶段

从 20 世纪 30 年代中期至 50 年代末期为植物组织培养的奠基阶段，此阶段植物组织培养建立了两个与培养技术有关的重要模式：一是培养基模式；二是激素调控模式。

1934 年，Gautheret 培养三毛柳和黑杨的形成层，成功地得到愈伤组织。同年，White 由番茄根建立了第一个活跃生长的无性系，使根的离体培养实验首次获得真正的成功。1937 ~ 1938 年，Nobecourt 使胡萝卜根组织培养而获得愈伤组织并继代培养了几十年。Gautheret、White 和 Nobecourt 一起被誉为植物组织培养的奠基人，初步建立起植物离体培养的基本方法。我们现在所用的若干培养方法和培养基，原则上都是这三位作者在 1939 年建立的方法和培养基演变的结果。

1948 年，Skoog 和崔微将 IAA 和腺嘌呤加入培养基中，使烟草茎段的髓组织的细胞可以分裂和生长，并且分化形成不定芽。这是人类第一次从离体培养的植物组织诱导出芽和植株。1951 年，Nitsch 将果实、子房、未受精的胚珠以及花器官的各个部分培养成功。1956 年，Miller 为了寻找细胞分裂物质，从