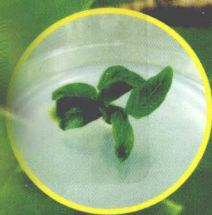


普通高等教育“十二五”规划教材

植物组织培养

巩振辉 申书兴 主编

第二版



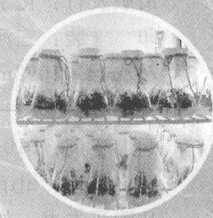
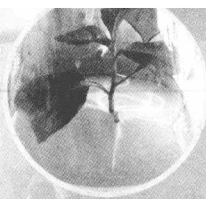
化学工业出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

植物组织培养

巩振辉 申书兴 主编

第二版



化学工业出版社

·北京·

本教材全面系统地介绍了植物组织培养的概念、原理、方法与应用技术,分理论篇和应用篇,共18章。理论篇包括绪论、植物组织培养的基本原理、实验室的布局及设备、植物组织培养的基本技术、植物器官培养、植物组织培养、植物细胞培养、植物原生质体培养等内容,阐述了植物组织培养的基本概念、基本原理、基本方法与技术、历史、发展方向与最新技术;应用篇,包括植物胚培养、植物离体快繁、人工种子、植物脱毒苗培育、植物体细胞无性系变异及筛选、次生代谢产物生产和生物转化、植物种质资源的离体保存、植物单倍体培养、体细胞杂交、植物遗传转化等内容,详细介绍了植物组织培养在农业、林业、工业、医药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与动态,并重点描述了75项经典或最新应用实例。

本教材概念准确,内容丰富,资料翔实,信息量大,技术方法详细具体,图文并茂,理论与实践并举,可作为植物生产类、草业科学类、森林资源类、环境生态类及生物科学类等各专业高年级本、专科生及研究生教材,也可供相关科研人员与生产者使用。

图书在版编目(CIP)数据

植物组织培养/巩振辉,申书兴主编.—2版.—北京:
化学工业出版社,2013.4
普通高等教育“十二五”规划教材
ISBN 978-7-122-16344-8

I. ①植… II. ①巩…②申… III. ①植物组织-组
织培养-教材 IV. ①Q943.1

中国版本图书馆CIP数据核字(2013)第009708号

责任编辑:尤彩霞

装帧设计:张辉

责任校对:陶燕华

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印装:三河市延风印装厂

787mm×1092mm 1/16 印张18 字数473千字 2013年5月北京第2版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:32.00元

版权所有 违者必究

本书编写人员名单

主 编 巩振辉 申书兴

编写人员 (以姓氏拼音排序)

成善汉 (海南大学)

杜晓华 (河南科技学院)

巩振辉 (西北农林科技大学)

顾爱侠 (河北农业大学)

韩德果 (东北农业大学)

琚淑明 (徐州工程学院)

刘珂珂 (河南农业大学)

逯明辉 (西北农林科技大学)

申书兴 (河北农业大学)

石 岭 (内蒙古农业大学)

汤浩茹 (四川农业大学)

王 萍 (内蒙古农业大学)

徐凌飞 (西北农林科技大学)

轩淑欣 (河北农业大学)

张成合 (河北农业大学)

张恩让 (贵州大学)

张菊平 (河南科技大学)

张喜春 (北京农学院)

张雪艳 (宁夏大学)

主 审 崔鸿文 (西北农林科技大学)

第二版前言

植物组织培养是当代生物学科中最有生命力的重要学科之一，它既是植物遗传工程、生理生态研究的重要工具，又是植物遗传育种、植物种子学、植物生产学的一种实用性极强的高新技术，已经发展成为植物生产类、草业科学类、森林资源类、环境生态类，以及生物科学类的重要课程，成为这些专业本科生和研究生需要掌握的重要技术之一。

《植物组织培养》（第一版）自 2007 年 8 月出版以来，得到了国内各高等院校广大师生的认可，发挥了其在教学中的重要纽带作用，并已成为许多高校相关专业的骨干教材。

《植物组织培养》（第二版）基本保持了第一版的内容体系。在章节安排上，根据各个高校教学一线反馈的意见，一是将第一版中“植物组织培养和基本技术”一章分为“植物组织培养实验室的布局及设备”与“植物组织培养的基本技术”两章；二是将第一版中“植物无糖组织培养技术”一章并入“植物离体快繁”一章；三是注重植物组织培养应用实例的遴选，除经典实例外，绝大多数实例选用了近年的最新科研成果；四是为了便于同学自学，每章有小结、复习思考题，书后附有参考文献。同时，在编写过程中，体现了多接口的自学内容和研究生进一步学习的空间。总之，修订后的第二版全面、系统地介绍了植物组织培养的概念、原理、方法与应用技术。全书概念准确，内容丰富，资料翔实，信息量大，理论叙述清晰，方法、技术详细具体，图文并茂，实用性强，通俗易懂。全书分理论篇和应用篇，前者阐述了植物组织培养的基本概念、基本原理、基本方法与技术、历史、发展方向与最新技术，后者详细介绍了植物组织培养在农业、林业、工业、医药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与动态，并重点描述了 75 项经典或最新应用实例。

全书共 18 章，书末附有附录。绪论由巩振辉编写；第 1 章由张菊平编写；第 2 章、第 13 章由逯明辉和巩振辉编写；第 3 章由王萍编写；第 4 章由张喜春编写；第 5 章由琚淑明编写；第 6 章由韩德果编写；第 7 章由杜晓华和巩振辉编写；第 8 章由张成合和顾爱侠编写；第 9 章由张雪艳编写；第 10 章由成善汉编写；第 11 章由汤浩茹编写；第 12 章由张恩让编写；第 14 章由石岭编写；第 15 章由申书兴和轩淑欣编写；第 16 章由徐凌飞编写；第 17 章由刘珂珂和巩振辉编写；附录由巩振辉编写。全书由巩振辉、申书兴统稿和定稿。

本书在编写过程中，西北农林科技大学崔鸿文教授对全书进行了系统审阅并提出宝贵修改意见，西北农林科技大学吕元红同志对全书图表进行了编辑和绘制。谨在此表示衷心的感谢！

本课程为西北农林科技大学校级精品课程，植物组织培养所涉及的领域广泛，由于作者们的教学与科研的局限性，遗漏和不妥之处在所难免，恳切希望使用本教材的师生和读者不吝赐教，提出宝贵意见，以利再版时修正。

巩振辉

2013 年 1 月

第一版前言

植物组织培养技术的研究与应用是生命科学的主要组成部分,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必要的方法和手段,并广泛应用于农业、林业、工业、医药业等多种行业,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具生命力的学科。

《植物组织培养》是植物生产类、草业科学类、森林资源类、环境生态类及生物科学类等各专业本科生的重要课程。自从20世纪80年代以来,国内外出版了不少有关植物组织培养方面的著作、教材,这些著作、教材无疑对推动植物组织培养的教学、科研和应用发挥了重要作用。但是,真正能适应教学需要的优秀教材很少。此外,近二十年来,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,应用技术也在不断革新。基于此,我们组织了西北农业大学、河北农业大学、东北农业大学、南京农业大学、四川农业大学、内蒙古农业大学、宁夏大学、海南大学、河南科技大学、贵州大学、四川师范学院、徐州工学院、北京农学院和莱阳农学院等高等院校的19位长期从事植物组织培养教学和科研的专家教授编写了这本教材。希望本教材对各高校相关专业本、专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。

本书分理论篇和应用篇:理论篇全面、系统地介绍与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、历史、发展方向与最新技术;应用篇详细介绍了植物组织培养在农业、林业、工业、医药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74项应用实例。同时,每章都有小结、思考题,便于学生自学。本书概念准确,内容丰富,资料翔实,信息量大,技术方法详细具体,图文并茂,实用性强,通俗易懂。

全书共18章,书末附有附录与主要参考文献。绪论由巩振辉和张菊平编写;第1章植物组织培养的基本原理由李群和张菊平编写;第2章植物组织培养的设备 and 基本技术由吴震编写;第3章植物器官培养由张喜春和巩振辉编写;第4章植物组织培养由琚淑明和张菊平编写;第5章细胞培养由霍俊伟编写;第6章植物无糖组织培养技术由黄炜和巩振辉编写;第7章植物胚培养 and 第14章单倍体培养由申书兴和张成合编写;第8章植物离体快繁由平吉成和巩振辉编写;第9章人工种子由成善汉和巩振辉编写;第10章植物脱毒苗培育由汤浩茹编写;第11章体细胞无性系变异及筛选由张恩让和巩振辉编写;第12章次生代谢产物生产和生物转化由逯明辉和巩振辉编写;第13章植物种质资源的离体保存由石岭和巩振辉编写;第15章原生质体的分离与培养由孙世盟编写;第16章体细胞杂交由王飞编写;第17章植物的遗传转化由陈银华和巩振辉编写;附录由巩振辉和张菊平编写。全书由巩振辉和申书兴统稿和定稿。

本书在编写过程中,崔鸿文教授对全书进行了系统审阅并提出宝贵修改意见,西北农林科技大学吕元红同志对全书图表进行了编辑和绘制。谨在此表示衷心的感谢!

巩振辉

2007年3月

目 录

0 绪论	1	0.3.1 探索阶段	5
0.1 植物组织培养的简介	1	0.3.2 奠基阶段	5
0.1.1 植物组织培养的概念	1	0.3.3 迅速发展阶段	7
0.1.2 植物组织培养的类型	1	0.4 植物组织培养的应用及展望	10
0.1.3 植物组织培养的优越性	2	0.4.1 植物组织培养的应用	10
0.1.4 植物组织培养的任务	3	0.4.2 植物组织培养的展望	14
0.2 植物组织培养与生物科学的关系	4	小结	15
0.3 植物组织培养的发展简史	4	思考题	15

理 论 篇

1 植物组织培养的基本原理	17	2.2.3 培养设备	33
1.1 植物细胞的全能性	17	2.2.4 检测设备	35
1.1.1 细胞全能性的绝对性与相对性	17	2.2.5 驯化设备	36
1.1.2 植物细胞全能性表现	18	2.2.6 其它辅助设备	36
1.2 植物细胞的分化与脱分化	18	小结	38
1.2.1 植物细胞的分化	18	思考题	38
1.2.2 植物细胞的脱分化	19	3 植物组织培养的基本技术	39
1.2.3 植物细胞的再分化	19	3.1 培养基的成分与配制技术	39
1.3 植物的形态建成	20	3.1.1 培养基的成分	40
1.3.1 愈伤组织诱导与器官分化	20	3.1.2 培养基的类型	43
1.3.2 植物体细胞胚胎发生	21	3.1.3 培养基的选择	43
1.3.3 离体器官诱导	22	3.1.4 培养基的制备	44
1.3.4 影响植物离体形态发生的因素	22	3.2 灭菌技术	47
1.4 基因表达与位置效应及器官分化信息传递	24	3.2.1 环境灭菌	47
1.4.1 基因表达与位置效应	24	3.2.2 培养基灭菌	48
1.4.2 器官分化信息传递	26	3.2.3 外植体灭菌	49
小结	27	3.2.4 用具灭菌	50
思考题	27	3.2.5 污染的类型及克服方法	51
2 植物组织培养实验室的布局及设备	28	3.3 外植体种类及其接种技术	52
2.1 实验室布局	28	3.3.1 外植体的种类	52
2.1.1 准备室	28	3.3.2 外植体的选择	53
2.1.2 接种室	29	3.3.3 外植体的接种	53
2.1.3 培养室	30	3.4 培养条件及其调控技术	54
2.1.4 驯化室	30	3.4.1 温度	54
2.1.5 其它部分	30	3.4.2 光照	54
2.2 基本仪器设备	31	3.4.3 气体	55
2.2.1 灭菌设备	31	3.4.4 湿度	55
2.2.2 接种设备	32	3.4.5 培养基的渗透压	55
		3.4.6 培养基 pH 值	55

3.5 继代培养技术	55	小结	83
3.5.1 继代培养的作用	55	思考题	83
3.5.2 继代培养中的驯化现象和 衰退现象	55	6 植物细胞培养	84
3.6 试管苗驯化移栽技术	56	6.1 植物单细胞的分离	84
3.6.1 试管苗特点	56	6.1.1 由植物器官分离单细胞	84
3.6.2 试管苗驯化	57	6.1.2 由培养组织中分离单细胞	85
3.6.3 移栽	58	6.2 植物单细胞的培养	85
小结	59	6.2.1 单细胞培养方法	86
思考题	59	6.2.2 单细胞培养的影响因素	89
4 植物器官培养	60	6.3 植物细胞的悬浮培养	90
4.1 植物器官培养的程序	60	6.3.1 细胞悬浮培养方法	90
4.1.1 外植体的选择和消毒	60	6.3.2 培养基	93
4.1.2 形态发生	61	6.3.3 悬浮培养细胞的同步化	93
4.1.3 诱导生根与再生植株的移栽	63	6.3.4 细胞增殖的测定	95
4.2 植物营养器官培养	64	6.3.5 悬浮培养细胞的植株再生	95
4.2.1 植物根段培养	64	6.3.6 影响细胞悬浮培养的因素	96
4.2.2 植物茎段培养	66	小结	98
4.2.3 植物叶培养	70	思考题	98
4.3 植物繁殖器官培养	71	7 植物原生质体培养	99
4.3.1 植物花器官培养	71	7.1 植物原生质体培养的意义	100
4.3.2 植物幼果培养	72	7.2 植物原生质体的分离	100
小结	73	7.2.1 取材	100
思考题	73	7.2.2 分离原生质体所用的酶类	101
5 植物组织培养	74	7.2.3 酶液的 pH 值与反应温度	102
5.1 植物分生组织培养	74	7.2.4 酶液的渗透压	102
5.1.1 植物分生组织培养的概念和意义	74	7.2.5 原生质体的游离	103
5.1.2 分生组织培养的方法	74	7.2.6 原生质体的纯化	104
5.1.3 影响分生组织培养的因素	76	7.2.7 原生质体活力的鉴定	105
5.2 植物愈伤组织培养	78	7.3 植物原生质体的培养	105
5.2.1 愈伤组织培养的基本过程	78	7.3.1 原生质体的培养方法	105
5.2.2 影响愈伤组织培养的因素	80	7.3.2 原生质体培养基	106
5.3 其他组织培养	82	7.3.3 植板密度	107
5.3.1 植物薄层组织培养	82	7.3.4 培养条件	107
5.3.2 髓组织培养	82	7.3.5 原生质体再生	107
5.3.3 韧皮组织培养	83	小结	108
		思考题	108

应 用 篇

8 植物胚培养	110	8.2.3 成熟胚培养	113
8.1 植物胚培养的类型和意义	110	8.2.4 幼胚培养	113
8.1.1 植物胚培养的类型	110	8.2.5 胚乳培养	115
8.1.2 植物胚培养的意义	110	8.3 植物的离体授粉技术	117
8.2 植物胚培养的方法	111	8.3.1 离体授粉的方法	117
8.2.1 子房培养	111	8.3.2 影响离体授粉的因素	119
8.2.2 胚珠培养	112	8.4 几种植物的胚培养技术	119

8.4.1	大田作物胚培养技术	119	10.4.4	药用植物人工种子制作技术	156
8.4.2	园艺植物胚培养技术	120	小结		157
8.4.3	林木胚培养技术	121	思考题		157
8.4.4	药用植物胚培养技术	122	11 植物脱毒苗培育		158
小结		123	11.1	植物脱毒的意义	158
思考题		123	11.2	植物脱毒的方法	158
9 植物离体快繁		124	11.2.1	热处理脱毒	158
9.1	植物离体快繁的意义	124	11.2.2	茎尖培养脱毒	160
9.2	植物离体快繁的方法	124	11.2.3	微体嫁接脱毒	161
9.2.1	无菌培养的建立	124	11.2.4	抗病毒剂的应用	161
9.2.2	茎芽增殖的途径	125	11.2.5	其它脱毒方法	161
9.2.3	影响茎芽增殖的因素	126	11.3	脱毒苗的鉴定	162
9.3	植物离体快繁中存在的问题 及解决途径	126	11.3.1	脱毒效果的检测	162
9.3.1	培养物污染	126	11.3.2	脱毒苗农艺性状的鉴定	167
9.3.2	褐化	127	11.3.3	无病毒原种的保存和应用	168
9.3.3	玻璃化	129	11.4	几种植物的脱毒苗培育技术	168
9.3.4	性状变异	131	11.4.1	大田作物的脱毒苗培育技术	168
9.4	植物无糖离体快繁技术	131	11.4.2	果树的脱毒苗培育技术	170
9.4.1	植物无糖组织培养的概念	131	11.4.3	蔬菜的脱毒苗培育技术	172
9.4.2	植物无糖组织培养技术	131	11.4.4	花卉的脱毒苗培育技术	174
9.4.3	影响植物无糖培养的因素	134	11.4.5	药用植物的脱毒苗培育技术	175
9.4.4	无糖组织培养技术的局限性	135	11.4.6	林木的脱毒苗培育技术	177
9.5	几种植物的离体快繁技术	135	小结		178
9.5.1	大田作物离体快繁技术	135	思考题		178
9.5.2	园艺植物离体快繁技术	136	12 植物体细胞无性系变异及筛选		179
9.5.3	林木离体快繁技术	140	12.1	植物体细胞无性系变异的来源	179
9.5.4	药用植物离体快繁技术	141	12.1.1	源于外植体的变异	179
小结		142	12.1.2	离体培养诱导的变异	180
思考题		143	12.2	植物体细胞无性系变异的 遗传学基础	182
10 人工种子		144	12.2.1	染色体变化	182
10.1	人工种子的概念及意义	144	12.2.2	基因突变	183
10.1.1	人工种子的概念	144	12.2.3	基因扩增	183
10.1.2	人工种子的结构	144	12.2.4	细胞质基因变异	183
10.1.3	人工种子的意义	145	12.2.5	转座因子活化	184
10.2	人工种子的制备方法和技术	146	12.2.6	DNA 甲基化	184
10.2.1	目标植物和外植体的选取	146	12.3	植物体细胞无性系的筛选	184
10.2.2	胚状体和胚类似物的诱导	146	12.3.1	突变细胞离体筛选的方法	185
10.2.3	人工种子的包埋	149	12.3.2	影响细胞筛选效果的因素	185
10.3	人工种子的贮藏与萌发	152	12.3.3	体细胞无性系的鉴定	186
10.3.1	人工种子贮藏技术	152	12.3.4	几种体细胞突变体筛选技术	186
10.3.2	人工种子发芽试验	153	小结		190
10.4	几种植物的人工种子制备技术	154	思考题		191
10.4.1	大田作物人工种子制备技术	154	13 次生代谢产物生产和生物转化		192
10.4.2	园艺植物人工种子制作技术	154	13.1	细胞的大量培养	192
10.4.3	林木人工种子制作技术	155	13.1.1	培养系统	192

13.1.2 培养技术	195	15.5.2 未受精胚珠培养	231
13.2 天然化合物的生产	197	15.5.3 未受精子房、胚珠培养	
13.2.1 生物反应器的放大	198	的影响因素	231
13.2.2 目的产物的分离纯化	199	15.6 单倍体植株鉴定及染色体加倍	231
13.3 生物转化	201	15.6.1 单倍体植株鉴定方法	231
13.3.1 生物转化的原理	201	15.6.2 单倍体植株的染色体加倍	232
13.3.2 生物转化的方法	203	15.7 几种植物的单倍体培养技术	232
13.3.3 影响植物生物转化的因素	204	15.7.1 大田作物单倍体培养技术	232
13.4 几种次生代谢产物的生产与应用	205	15.7.2 园艺植物单倍体培养技术	234
13.4.1 次生代谢产物生产在制药工		15.7.3 林木植物单倍体培养技术	236
业上的应用	205	15.7.4 药用植物单倍体培养技术	236
13.4.2 次生代谢产物生产在食品工		小结	237
业上的应用	207	思考题	238
小结	208	16 体细胞杂交	239
思考题	209	16.1 原生质体融合	239
14 植物种质资源的离体保存	210	16.1.1 自发融合与诱发融合	239
14.1 限制生长保存	210	16.1.2 对称融合与非对称融合	242
14.1.1 低温保存	210	16.2 杂种细胞的选择	242
14.1.2 高渗透压保存	210	16.2.1 互补筛选法	243
14.1.3 生长抑制剂保存	211	16.2.2 利用物理特性差异的选择方法	244
14.1.4 降低氧分压保存	211	16.2.3 利用生长特性差异的选择方法	244
14.1.5 干燥保存法	211	16.3 杂种细胞的培养和杂种植株再生	245
14.2 超低温保存	211	16.3.1 杂种细胞培养的方法和技术	
14.2.1 超低温保存的原理	211	关键	245
14.2.2 超低温保存的基本程序	212	16.3.2 杂种植株再生	246
14.2.3 超低温保存的方法及技术	212	16.3.3 杂种植株的核型	246
14.2.4 离体保存种质的完整性	214	16.4 体细胞杂种的鉴定	246
14.3 几种植物离体保存技术	215	16.4.1 形态学鉴定	246
14.3.1 大田作物离体保存技术	215	16.4.2 细胞学鉴定	247
14.3.2 园艺植物离体保存技术	216	16.4.3 同工酶鉴定	247
14.3.3 林木离体保存技术	218	16.4.4 分子生物学鉴定	247
14.3.4 药用植物离体保存技术	220	16.5 细胞质杂交	249
小结	221	16.6 几种植物体细胞杂交成功的例子	250
思考题	222	16.6.1 油菜种内杂交直接转移雄性	
15 植物单倍体培养	223	不育细胞质	250
15.1 单倍体的起源	223	16.6.2 马铃薯栽培种与野生种的杂种	250
15.2 离体条件下的小孢子发育	224	16.6.3 花椰菜和黑芥体细胞杂交获得	
15.2.1 离体小孢子发育途径	224	抗黑腐病异附加系新材料	251
15.2.2 离体小孢子发育的影响因素	225	16.6.4 香蕉种间体细胞杂交	251
15.2.3 花粉植株形态发生方式	229	16.6.5 沙打旺与紫花苜蓿的属间	
15.3 花药培养	229	体细胞杂种	251
15.4 小孢子培养	230	16.6.6 草木樨状黄芪和木本霸王	
15.4.1 小孢子培养技术	230	的科间体细胞杂交	251
15.4.2 小孢子培养的优越性	230	16.6.7 柑橘不对称体细胞杂交育种	
15.5 未受精子房与胚珠培养	230	进展	252
15.5.1 未受精子房培养	231	小结	252

思考题	252	17.3.3 林木遗传转化的技术	265
17 植物遗传转化	253	17.3.4 药用植物遗传转化的技术	265
17.1 植物遗传转化的方法	253	小结	266
17.1.1 农杆菌介导法	253	思考题	266
17.1.2 基因枪法	256	附录	267
17.1.3 其它常用的转化方法	258	附录1 植物组织培养常见的英文缩略语 ...	267
17.2 转化植株的检测	260	附录2 植物组织培养基常用化合物的	
17.2.1 报告基因检测	260	分子式及相对分子质量	268
17.2.2 分子杂交检测	261	附录3 温湿度换算表	269
17.3 几种植物遗传转化的技术	262	附录4 常用培养基的配方	270
17.3.1 大田作物遗传转化的技术	262	参考文献	273
17.3.2 园艺植物遗传转化的技术	263		

0 绪 论

植物组织培养 (plant tissue culture) 是以植物生理学为基础发展起来的一门重要的生物技术学科, 其发展的理论基础是植物细胞全能性 (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活跃、应用最为广泛的技术, 已渗透到植物生理学、病理学、药理学、遗传学、育种以及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上的重要研究技术和手段之一, 并广泛应用于农业、林业、工业、医药卫生等行业, 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。

0.1 植物组织培养的简介

0.1.1 植物组织培养的概念

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 (如成熟胚、幼胚等)、器官或器官原基 (如根、茎、叶、花、果实、种子、叶原基、花器原基等)、组织 (如分生组织、形成层、木质部、韧皮部、表皮、皮层、薄壁组织、髓部、花药组织等)、细胞 (如体细胞、生殖细胞等)、原生质体等进行精细操作与培养, 使其按照人们的意愿增殖、生长或再生发育成完整植株的一门生物技术学科。在植物组织培养中, 由活体 (*in vivo*) 植物体上分离出来, 接种在培养基上的无菌植物胚胎、器官、组织、细胞和原生质体等均称为外植体 (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*)。

无菌操作 (asepsis) 是进行植物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增殖、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。

愈伤组织 (callus) 常见于植物体的局部受到创伤刺激后, 在伤口表面新生的一团不定形的组织, 它可帮助伤口愈合; 在嫁接中, 可促使砧木与接穗愈合, 并由新生的维管组织使砧木和接穗沟通; 在扦插中, 从伤口愈伤组织可分化出不定根或不定芽, 进而形成完整植株。在植物器官、组织、细胞离体培养时, 条件适宜也可以长出愈伤组织。其发生过程是: 外植体中的活细胞经诱导, 恢复其潜在的全能性, 转变为分生细胞, 继而其衍生的细胞分化为薄壁组织而形成愈伤组织。从植物器官、组织、细胞离体培养所产生的愈伤组织, 在一定条件下可进一步诱导器官再生或胚状体而形成植株。

0.1.2 植物组织培养的类型

0.1.2.1 根据培养对象分类

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

(2) 胚胎培养 (embryo culture) 指从果实或子房中分离出来的成熟或幼胚为外植体的离体无菌培养技术。

(3) 器官培养 (organ culture) 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。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、果实等。

(4) 组织培养 (tissue culture) 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、皮层组织、胚乳组织、薄壁组织和髓部等, 或由植物器官培养产生的愈伤组织进行无菌培养, 二者均通过再分化诱导形成植株。

(5) 细胞培养 (cell culture) 对植物器官、组织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无菌培养, 形成单细胞无性系或再生植株的技术。

(6) 原生质体培养 (protoplast culture) 以采用酶、物理等方法除去植物细胞壁的、裸露的、有生活的原生质体为外植体进行的无菌培养技术。

0.1.2.2 根据培养过程分类

(1) 初代培养 (primary culture) 将外植体接种后的第一次培养, 称为初代培养。初代培养的目的在于获得无菌材料和无性繁殖系。初代培养时, 常用诱导或分化培养基, 即培养基中含有较多的细胞分裂素和少量的生长素。

(2) 继代培养 (subculture) 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毒害的影响, 或改变培养物增殖、生长、分化的方式, 要及时将其转接到新鲜培养基中, 继续进行培养, 以使其能够按照人们的意愿顺利地增殖、生长、分化乃至长成完整的植株。这一过程称为继代培养。根据继代培养的次数, 可分为1次继代培养、2次继代培养和多次继代培养等。继代培养次数对不同培养材料的影响不同, 如葡萄、黑穗醋栗、月季和倒挂金钟等植物, 长期继代可保持原来的再生能力和增殖率; 香蕉等植物随继代次数增加其变异频率提高, 实践表明, 香蕉组织培养苗继代培养不能超过1年。还有一些植物长期继代培养, 会逐渐衰退, 丧失形态发生能力, 具体表现为生长不良、再生能力和增殖率下降等。

继代培养常应用增殖培养, 根据外植体分化和生长的方式不同, 继代培养中培养物的增殖方式也各不相同。主要的增殖方式有: ①多节茎段增殖。将顶芽或腋芽萌发伸长形成的多节茎段嫩枝, 剪成带1~2枚叶片的单芽或多芽茎段, 接种到继代培养基进行培养的方法。②丛生芽增殖。将顶芽或腋芽萌发形成的丛生芽分割成单芽, 接种到继代培养基进行培养的方法。③不定芽增殖。将能再生不定芽的器官或愈伤组织块分割, 接种到继代培养基进行培养的方法。④原球茎增殖。将原球茎切割成小块, 也可以给予针刺等损伤, 或在液体培养基中振荡培养, 来加快其增殖进程。⑤胚状体增殖。通过体细胞胚的发生来进行无性系的大量繁殖。一种植物的增殖方式不是固定不变的, 有的植物可以通过多种方式进行快速繁殖。如葡萄可以通过多节茎段和丛生芽方式进行繁殖; 蝴蝶兰可以通过原球茎和丛生芽方式进行繁殖。实践中, 具体应用哪一种方式进行, 主要看他们的增殖系数、增殖周期、增殖后芽的稳定性及适宜生产操作等因素而定。

0.1.2.3 根据培养基的物理状态分类

(1) 液体培养 (submerged culture) 把植物细胞或植物体的一部分, 置于液体培养基中使其发育, 并不断振荡, 使之均匀地在悬浊液中进行培养的一种方法。可用于单细胞或由少数细胞构成的细胞团的培养和原生质体的培养, 或以迅速得到大量培养细胞为目的大量培养。

(2) 固体培养 (solid culture) 在液体培养基中加入琼脂、明胶等凝固剂使培养基呈固体状态的培养, 称为固体培养。固体培养常用的凝固剂是琼脂, 其主要成分为多聚半乳糖硫酸酯, 植物组织、细胞不能直接利用, 在培养基中仅起支撑作用。琼脂的熔点约98℃, 凝固点42℃, 1.5%~2%的水溶液在一般培养温度下呈凝胶状态。

0.1.3 植物组织培养的优越性

植物组织培养的优越性在于既可以不受植物体其他部分干扰, 也不受外界环境条件的影响

来研究植物器官、组织、细胞、原生质体的生长和分化规律。同时，它在离体繁殖诱变、种质资源保存、无毒苗生产、快速繁殖、周年生产等方面具有十分突出的优越性。

(1) 外植体材料来源单一，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，均可来自同一植物个体，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，能保持原有品种的优良性状，可获得大量的统一规格、高质量的苗木，对于品种的保质、保纯与扩繁具有特殊作用。

(2) 环境条件可控，误差小 培养基中各种成分，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，处理间误差很小，极利于高度集约化和高密度工厂化生产。

(3) 生长快、周期短，可重复性强 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，外植体生长、分化快，可控程度高，重复性高。

(4) 离体繁殖诱变，可避免嵌合体的形成 用诱变剂直接处理悬浮培养物的单细胞和原生质体，筛选所需要的突变体，可以避免或限制嵌合体的形成，具有不受环境条件限制、节省大量人工财力和时间、能扩大变异谱和提高变异率等优点。

(5) 植物种质离体保存，占用空间小，可长期保存 常规种质资源保存代价高，占的空间大，保存时间短，而且易受环境条件的限制。植物组织培养结合超低温保存技术，给植物种质保存带来一次大的飞跃。因为保存一个细胞就相当于保存一粒种子，但所占的空间仅为原来的几万分之一，而且在 -193°C 的液氮中可以长时间保存，不像种子那样需要年年更新或经常更新。同样，离体保存在濒危植物资源的延续和保存上具有独特的意义。

(6) 短期获得无毒苗，提高植物品质与产量 采用茎尖培养的方法或茎尖培养结合热处理可除去绝大多数植物的病毒、真菌和细菌，使植株生长势变强、抗逆性提高、产品品质提升、产量增加。

(7) 繁殖速度快，效率高 用组织培养快繁技术繁殖，可节约繁殖材料，只取原材料上的一小块组织或器官就能在短期内生产出大量市场所需的优质苗木，每年可以繁殖出几万甚至数百万的小植株，与盆栽、田间栽培等相比，组织培养省去了中耕除草、施肥、灌溉、防治病虫害等一系列繁杂劳动，大大节省人力、物力及田间种植所需要的土地。

(8) 可连续运行、周年试验或生产，利于自动化控制 组织培养采用的植物材料完全是在人为提供的培养基质和小气候环境条件下进行生长，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，对植物生长极为有利，便于稳定地进行周年培养生产，也利于自动化控制生产。

(9) 经济效益高 植物组织培养快速繁殖由于种苗在培养瓶中生长，立体摆放，所需要的空间小，节省土地。生产可按一定的程序严格执行，生产过程可以微型化、精密化，能最大限度发挥人力、物力和财力，取得很高的生产效率，如在一个 200m^2 的培养室内一年可生产上百万株兰花试管苗，其产值每年超过百万元。

0.1.4 植物组织培养的任务

植物组织培养的任务在于：研究离体条件下，细胞、组织、器官所需的营养条件和环境条件以及培养技术；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；植物幼胚、远缘杂种胚、子房、胚珠、胚乳培养的方法与技术；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；细胞

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。

0.2 植物组织培养与生物科学的关系

由于科学技术的进步，尤其是外源激素的应用，使组织培养不仅从理论上为相关学科提出了可靠的实验证据，而且一跃成为一种大规模、批量工厂化生产种苗的新方法，并在生产上得到广泛的应用。植物组织培养既是一门相对独立的学科，同时又与其它生物学科有着密切的联系，它为植物学、植物生理学、植物遗传育种学、胚胎学、解剖学、分子生物学、细胞生物学、生物工程等许多学科研究植物生长发育、抗性生理、激素及器官发生与胚胎发生等提供了许多良好的试材和有效、快速的方法途径。

(1) 植物组织培养学科的建立依赖于相关学科理论的发展 植物组织培养的重要理论基础是植物生理学、植物学、遗传学、发育学以及微生物学等学科。没有这些基础学科的指导，就不可能建立植物组织培养学科。只有对生物细胞的结构、机能以及发育特性等的深入了解，才有可能对其控制培养。只有对细胞遗传物质的本质具有清楚认识，才有可能对其进行定向培养。由于植物组织培养是一个综合性的实验技术体系，每一项技术均要涉及其他有关领域，它的研究和利用需要相关技术的协作和补充。

(2) 植物组织培养为生物学研究提供新的实验体系 植物组织培养技术使人们可以在人工控制和模拟条件下对植物进行研究和改造，这不仅免除了自然环境中不可预测性因素的干扰，而且还可以大大缩短研究周期，加速相关学科的研究进程。组织培养在理论上是研究细胞学、植物学、遗传学、基因工程、发育学、生物化学和药理学等学科的重要手段。

细胞融合、核移植为人类定向改造生物遗传性状提供了有效技术途径。细胞培养使多细胞生物的单细胞生命活动研究成为可能，从而促进了人类对生命活动的认识。植物试管内传粉受精技术、子房培养技术、利用未成熟花药进行单倍体育种、细胞悬浮培养技术、看护培养技术以及植物茎尖脱毒快速繁殖技术等极大地丰富了植物学研究的手段，拓展和加深了植物学研究的广度与深度。用单细胞培养研究植物光合代谢是非常理想的，在细胞生化合成研究中，通过组织培养查明了尼古丁在烟草中的部位。在植物病理学中，可用单细胞或原生质体培养快速鉴定植物的抗病性、抗逆性等，几天内就可获得抗性结果。

(3) 植物组织培养与其它生物技术相结合能更好地发挥作用 植物生物技术是按人类的意愿有目的地改良植物的一种新技术，它是当前世界新技术革命的一个重要组成部分。植物遗传转化技术属于生物技术的组成部分，虽然不直接属于植物组织培养，但与组织培养有密不可分的关系。植物组织培养既是遗传转化的基础，又是遗传转化获得种质材料并用于生产的桥梁。在基因表达及其调控的研究上组织培养技术为其提供了有效方法，通过对转化组织、器官、细胞、原生质体的培养与再生，可揭示基因的表达与功能、基因之间的互作关系，以及植物体内物质信号的传递规律等。

0.3 植物组织培养的发展简史

植物组织培养技术是在细胞学、植物生理学、微生物无菌培养技术的基础上建立与发展起来的，其研究历史从1902年Haberlandt首次进行离体细胞培养实验以来，经过了110年漫长而艰难的发展，已成为理论基础完备、实验手段先进、应用成效显著的生物科学的重要分支。它的发展过程大致分为以下3个阶段。

0.3.1 探索阶段

从 1902 年 Haberlandt 首次进行离体细胞培养实验至 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实验,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。细胞学说的创立是人类认识生命历史上的里程碑,被认为是 19 世纪自然科学的三大发现之一,细胞学说理论也为植物组织培养理论的建立提供了理论基础。在细胞学说的指导上,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,并预言植物细胞在适宜的条件下,具有发育成完整植株的潜力,即植物细胞全能性的设想。为了论证这一观点,他首次在加入蔗糖的 Knop's 溶液中培养小野芝麻 (*Galeobdolon chinense*) 栅栏细胞、大花凤眼兰 (*Eichhornia crassipes*) 的叶柄木质部髓细胞、紫鸭跖草 (*Setcreasea pallidacv. Purple*) 的雄蕊绒毛细细胞、虎眼万年青 (*Orthogalum caudatum*) 属植物的表皮细胞等。遗憾的是限于当时的技术和水平,结果仅观察到细胞的生长、细胞壁的加厚和淀粉形成等,而未看到细胞分裂。然而,作为植物细胞组织培养的开创者,Herlandt 的贡献不仅在于首次进行了离体细胞培养实验,而且在其 1902 年发表的“植物离体细胞培养实验”报告还提出了胚囊液在组织培养中的作用和看护培养法等科学的预见。

1904 年, Hannig 在无机盐和蔗糖溶液中培养了萝卜和辣根的胚,并使这些胚在离体条件下长到成熟。这是世界上胚胎培养最早获得成功的一例。1908 年, Simon 研究白杨嫩茎在培养中的发育,观察到愈伤组织的发生和根、芽的形成。1922 年,德国的 Kotte 采用了无机盐、葡萄糖、蛋白胨、天冬酰胺,及添加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、玉米和棉花的茎尖和根尖,形成了一些缺绿的茎和根。这是有关根尖培养的最早的实验。1922 年和 1929 年, Kundson 先后采用胚胎培养获得了大量兰花幼苗,解决了兰花种子发芽困难的问题。Laibach (1925, 1929) 将由亚麻种间杂交形成的幼胚在人工培养基上成功培养获得了种间杂种,从而证明了胚培养在植物远缘杂交中利用的可能性。

0.3.2 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领域出现了两个重要发现:一是认识 B 族维生素对植物生长的重要意义;一是发现了植物激素控制器官形成。

1933 年中国的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。

1934 年,美国的 White 利用包含无机盐、酵母浸出液 (yeast extract, YE) 和蔗糖的培养基进行番茄根的离体培养,建立了第一个活跃生长并能继代增殖的无性繁殖系,1937 年,他用 3 种 B 族维生素 (吡哆醇、硫胺素和烟酸) 取代了酵母浸出液获得成功。White 的工作是开创性的,直到今天他提出的吡哆醇、硫胺素和烟酸仍是许多培养基中不可缺少的成分。同一时期,法国学者 R. J. Gautheret (1934) 在山毛柳 (*Salix permollis*) 和欧洲黑杨 (*Populus nigra*) 等形成层组织的培养中发现,虽然在含有葡萄糖和盐酸半胱氨酸的 Knop 溶液中,这些组织可以不断增殖几个月,但只有在培养基中加入了 B 族维生素和 IAA 后,山毛柳形成层组织的生长才能显著增加。这一时期的另一个重要事件是 1926 年,荷兰科学家 P. W. Went

发现了可以促进植物子叶鞘生长的物质，后来 F. Kogl 等（1934）从玉米油、根霉、麦芽等材料中分离和提取出这种促进植物生长的物质，经鉴定是吲哚乙酸（ $C_{10}H_9O_2N$ ），简称 IAA。

由于生长素物质的发现和它在控制生长中的作用不断地被认识，以及 White 发现了 B 族维生素的作用，使得 Gautheret（1937, 1938）在他使用的培养基上加入了这些生长因子，结果使得柳树的形成层的生长大为增加。与此同时，Nobecourt（1937, 1938）培养胡萝卜根的外植体并使细胞增殖获得成功。1939 年，Gautheret 连续培养胡萝卜根形成层也获得成功。同年，White 由烟草种间杂种幼茎切段的原形成层组织建立了类似的连续生长的组织培养物。因此，Gautheret、White 和 Nobecourt 一起被誉为植物组织培养的奠基人。现在所用的若干培养方法和培养基，基本上都是在这 3 位科学家建立的方法和培养基基础上的演变。当时这 3 位科学家所使用的组织都包含了分生细胞。诱导成熟和已高度分化的细胞发生分裂和分化的研究直到后来发现了细胞分裂素才成为可能。

1941 年，J. Van Overbeek 等首次把椰子汁作为附加物引入到培养基中，使心形期曼陀罗幼胚离体培养至成熟。到 20 世纪 50 年代初，由于 Steward 等在胡萝卜组织培养中也使用了这一物质，从而使椰子汁在组织培养的各个领域中得到了广泛应用。

1942 年，Gautheret 在植物愈伤组织培养中观察到次生代谢物质。

1943 年，White 出版了第一本专著《植物组织培养手册》。

1944 年，中国的罗士韦研究菟丝子（*Cuscuta chinensis*）的茎尖培养，于 1946 年发表了茎尖分化成花芽的报告，开创了用组织培养方法研究植物成花生理学的先河。

1951 年，Skoog 和崔澈等发现腺嘌呤或腺苷不但可以促进愈伤组织的生长，而且能解除培养基中 IAA 对芽形成的抑制作用，诱导芽的形成，从而确定了腺嘌呤与生长素的比例是控制芽和根形成的主要条件之一。

1952 年，Morel 和 Martin 首次证实通过茎尖分生组织的离体培养，由已受病毒侵染的大丽花中获得去病毒（virus-free）植株。

1953 年，Tulecke 利用银杏花粉粒进行培养获得单倍体愈伤组织。

1953~1954 年，Muir 进行单细胞培养获得初步成功。方法是把万寿菊（*Tagetes erecta*）和烟草的愈伤组织转移到液体培养基中，放在往复式摇床上振荡，使组织破碎，形成由单细胞或细胞聚集体的细胞悬浮液，然后通过继代培养进行繁殖。Muir 等还用机械方法从细胞悬浮液和容易散碎的愈伤组织中分离得到单细胞，把它们置于一张铺在愈伤组织上面的滤纸上培养，使细胞发生了分裂。这种“看护培养”技术揭示了实现 Haberlandt 培养单细胞设想的可能性。

1955 年，Miller 等从鲱鱼精子 DNA 热压水解产物中，发现了有高度活力的促进细胞分裂和芽形成的物质，鉴定了结构式，并把它定名为激动素（kinetin, KT）。现在，具有和激动素类似活性的合成的或天然的化合物已有多种，它们总称为细胞分裂素（cytokinin）。

1957 年，Skoog 和 Miller 提出了植物激素控制器官形成的概念，指出在烟草髓组织培养中，根和茎的分化是生长素对细胞分裂素比率的函数，通过改变培养基中生长素和细胞分裂素的比例，可以控制器官的分化，即生长素和细胞分裂素比例高时促进生根，低时则促进芽的分化，相等时倾向于愈伤组织生长。后来证明，激素可调控器官发生的概念对于多数物种都适用，只是由于在不同组织中这些激素的内源水平不同，因而对于某一具体的形态发生过程来说，它们所要求的外源激素的水平也会有所不同。

1958 年，Steward 等以胡萝卜为材料，首次通过实验证实了 Haberlandt 关于细胞全能性的设想，成为植物组织培养研究历史中的一个里程碑。同年，Wickson 和 Thimann 发现采用