

全国高等职业教育园林园艺专业精品系列教材

植物组织培养

ZHIWU ZUZHI PEIYANG

■ 主 编 袁学军 王志勇



北京师范大学出版集团
BEIJING NORMAL UNIVERSITY PUBLISHING GROUP
北京师范大学出版社

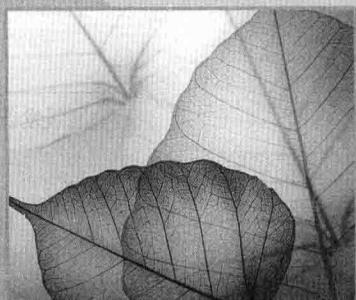
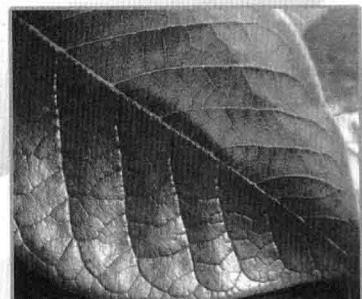
全国高等职业教育园林园艺专业精品系列教材

植物组织培养

ZHIWU ZUZHI PEIYANG

■ 主 编 袁学军 王志勇

副主编 陈光宙 李艳丽 廖 丽



北京师范大学出版集团
BEIJING NORMAL UNIVERSITY PUBLISHING GROUP
北京师范大学出版社

图书在版编目(CIP) 数据

植物组织培养 / 袁学军, 王志勇主编. —北京: 北京师范大学出版社, 2011.11

(全国高等职业教育园林园艺专业精品系列教材)

ISBN 978-7-303-13253-9

I. ①植… II. ①袁… ②王… III. ①植物组织—组织培养—中等专业学校—教材 IV. ① Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 160611 号

出版发行: 北京师范大学出版社 www.bnup.com.cn
北京新街口外大街 19 号

邮政编码: 100875

印 刷: 北京京师印务有限公司

经 销: 全国新华书店

开 本: 184 mm × 260 mm

印 张: 15.5

插 页: 2

字 数: 330 千字

版 次: 2011 年 11 月第 1 版

印 次: 2011 年 11 月第 1 次印刷

定 价: 28.80 元

策划编辑: 宋淑玉 责任编辑: 宋淑玉

美术编辑: 高 霞 装帧设计: 高 霞

责任校对: 李 茵 责任印制: 孙文凯

版权所有 侵权必究

反盗版、侵权举报电话: 010-58800697

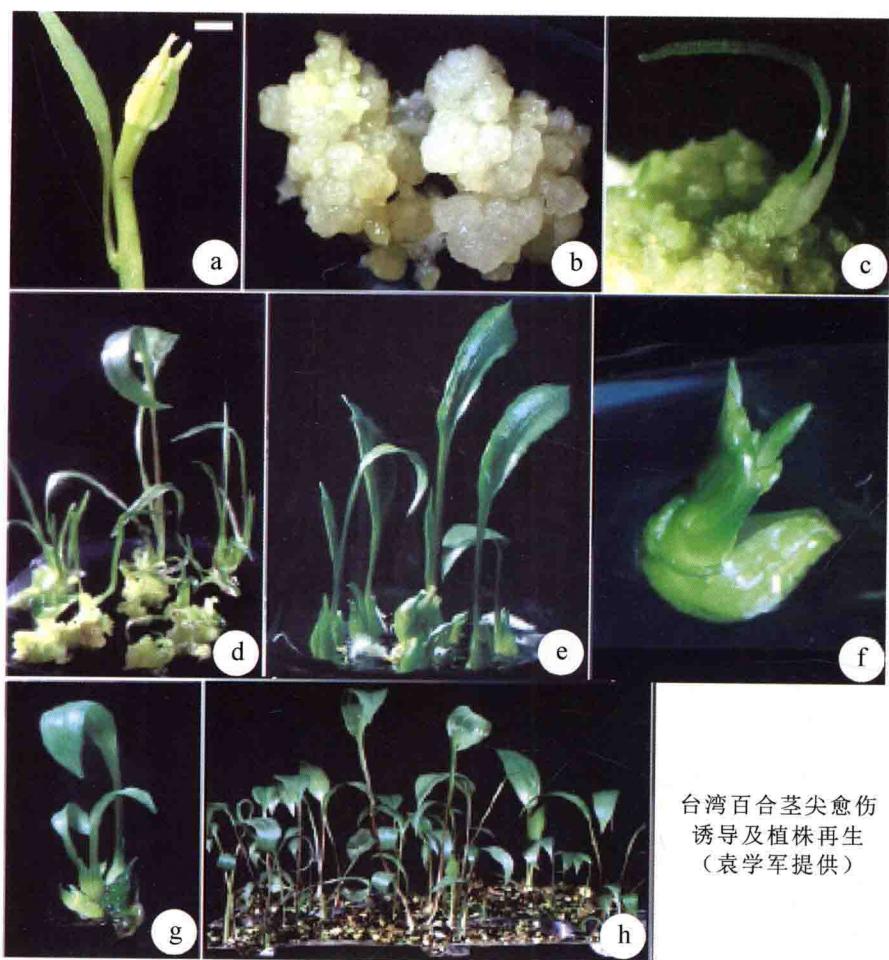
北京读者服务部电话: 010-58808104

外埠邮购电话: 010-58808083

本书如有印装质量问题, 请与印制管理部联系调换。

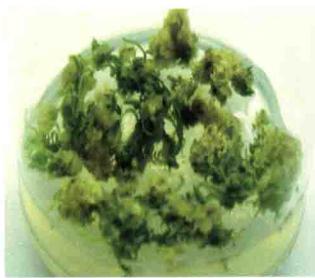
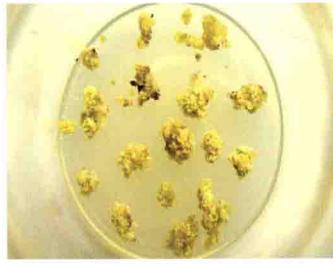
印制管理部电话: 010-58800825

植物组培再生图

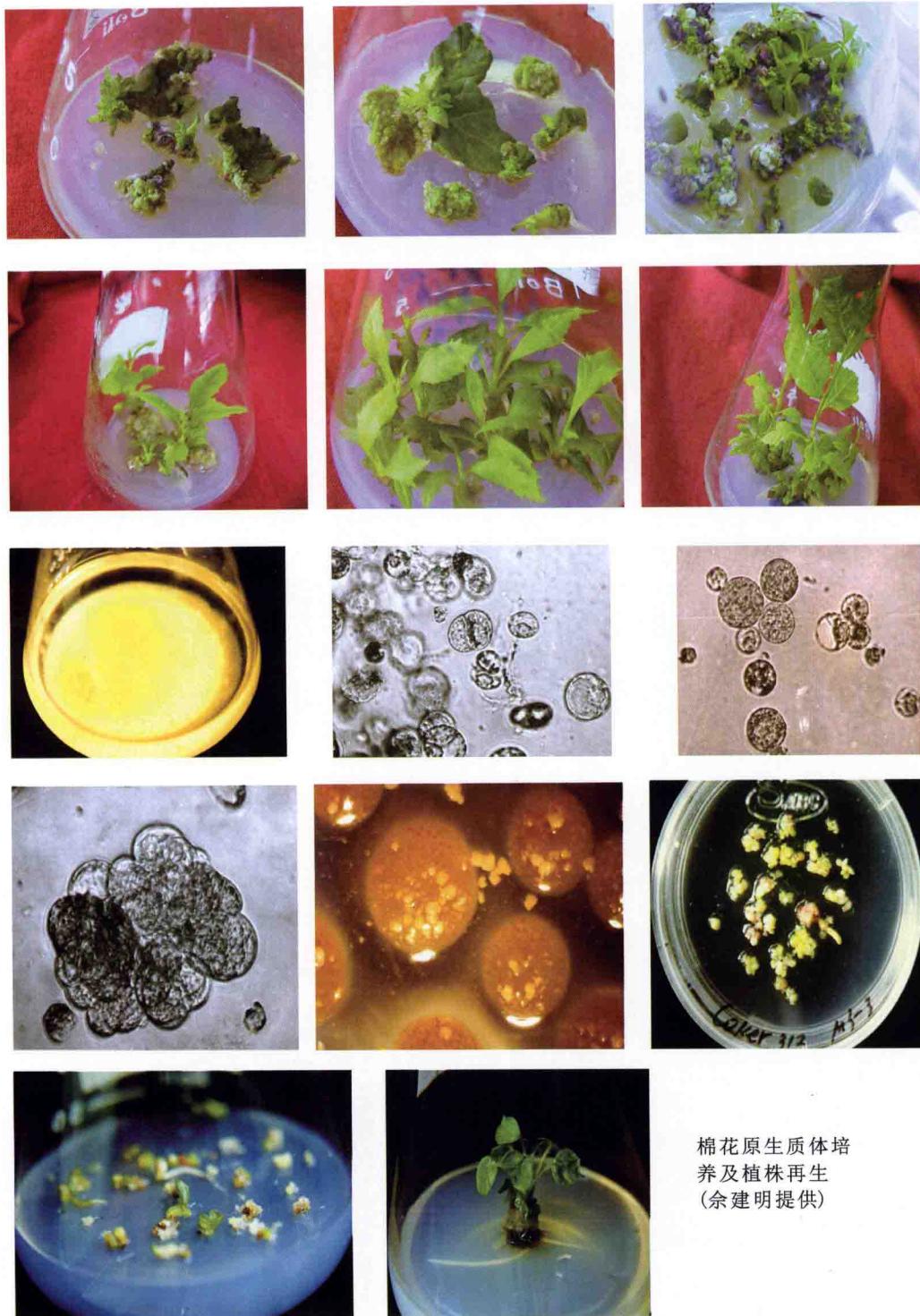




大蒜根尖培养和植株再生
(王广东提供)

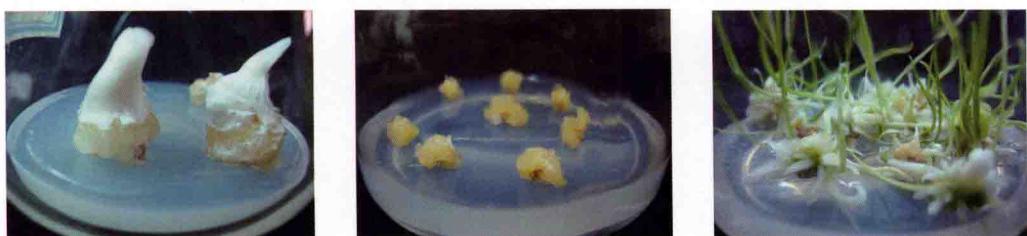


海雀稗种子愈伤
诱导及植株再生
(余建明提供)





矮牵牛茎尖离体培养
(王广东提供)



大蒜茎尖愈伤诱导
及植株再生 (袁学军
提供)



柱花草种子愈伤诱
导及植株再生 (王志
勇提供)



前　　言

植物组织培养技术不仅具有遗传性状相对稳定、增殖快、繁殖系数大、产量高、品质好、生产周期短等特点，而且受气候、季节影响小，又便于操作，可节省大量人力、物力，已成为生物科学中重要的研究技术和手段之一，推广应用前景广阔。我国农业正从传统农业走向现代农业，作为现代生物技术的基础和重要组成之一的植物组织培养技术有力地推动了我国农业现代化进程，社会对植物组织培养人才的需求也越来越大。为适应这种农业人才需求形势的变化，各职业学校在种植类专业中陆续开设了植物组织培养这门实用性很强的技术课程。为此，我们吸纳国内外最新研究成果和企业先进实用技术，从组织培养岗位的要求出发，根据生源的特点和人才培养方向，本着突出职业能力培养、强调理论应用、科学性与实用性相结合和有利于教学的原则编写了此教材。

本书的编写是在广泛调查研究、参阅大量文献资料的基础上，运用最新的科研成果，结合我国植物组培快繁技术的实际，进行分析、归纳和消化吸收而形成的。该书的主要内容包括组培快繁的概念、原理、操作技术和在草坪草、牧草、花卉、蔬菜、水果、药用植物、农作物突变体筛选等植物上的应用。所介绍的内容具有较强的科学性、先进性、实用性和可操作性，对提高组培快繁技术水平、加快组培快繁技术的推广应用，将会起到重要作用。

本教材的编写分工为：第二章、第三章、第九章的第五节、第五章的第七节由袁学军编写；实验部分由袁学军和李艳丽共同编写；第一章、第五章、第七章、第九章的第三节、第九章的第六节由王志勇编写；附录由廖丽和王志勇共同编写；第四章、第六章、第八章、第九章的第一、第二节和第四节由陈光宙编写。

该书在编写过程中得到了许多热心的朋友和同志的帮助、支持，对引用科研成果和文献资料的研究人员，在此一并深表感谢。

编　者
2011年3月

目 录

第一章 绪 论	1
第一节 组培术语	2
第二节 植物组织培养的优点	4
第三节 植物组织培养在农业生产过程中的主要应用	4
第四节 植物组织培养发展简史	7
第二章 实验设备及一般技术	10
第一节 实验室的设计和仪器	11
第二节 培养基的成分、配制及灭菌	16
第三节 植物体对环境条件的要求	26
第三章 植物体细胞突变体技术	29
第一节 植物体细胞突变体技术的原理	30
第二节 组培快繁技术	34
第三节 植物体细胞突变体技术	58
第四节 植物脱毒技术	62
第四章 细胞培养	69
第五章 花药培养和花粉培养技术	80
第一节 花药培养和花粉培养	81
第二节 花药和花粉培养的应用	84
第六章 原生质体的培养和融合	86
第一节 原生质体的分离与纯化	87
第二节 原生质体培养	90
第三节 原生质体融合	92
第七章 种质保存	95
第一节 种质资源保存的一般概念	96
第二节 种质保存的意义	96
第三节 低温保存	96
第四节 超低温保存	97
第八章 植物胚胎培养和人工种子	100
第一节 植物胚胎培养	101
第二节 人工种子	103
第九章 组培技术在生产中的应用	106
第一节 草坪草快繁技术	107
第二节 牧草快繁技术	119
第三节 花 卉	129

第四节 蔬菜	140
第五节 药用植物	153
第六节 水果作物的组织培养	165
第七节 突变体筛选	174

植物组培实验

实验 1 玻璃器皿的选择与清洗	182
实验 2 显微镜的结构和使用	184
实验 3 培养基配制技术	187
实验 4 外植体的选择与灭菌	188
实验 5 接种操作技术	190
实验 6 植物组织培养技术	192
实验 7 植物茎尖培养技术	194
实验 8 种子培养繁殖技术	195
实验 9 小麦花药培养技术	197
实验 10 悬浮培养细胞和愈伤组织的超低温保存	199
实验 11 种胚的离体培养	200
实验 12 烟草原生质体培养	202
实验 13 细胞原生质体的聚乙二醇法融合	204
实验 14 烟草遗传转化实验	207

附录

附录 1 常用培养基配方	210
附录 2 几种常用培养基中各种无机离子浓度的比较	220
附录 3 常用药品 μmol 和 ppm 的换算表	221
附录 4 温湿度换算表	227
附录 5 椰子液体胚乳所含成分	229
附录 6 香蕉中营养成分的含量	231
附录 7 培养物的不良表现及改进措施	232
附录 8 一些植物染色体数目一览表	234
附录 9 植物组织培养常用缩略语	238
参考文献	239
教学支持说明	241

第一章

绪 论

● ● ● ● 本章学习目标

1. 掌握植物组织培养常见术语
2. 熟悉植物组织培养在农业生产过程中的主要应用
3. 了解植物组织培养发展简史

第一节 组培术语

1. 植物组织培养的含义

广义：又叫离体培养，指从植物体分离出符合需要的组织、器官或细胞、原生质体等，通过无菌操作，在人工控制条件下进行培养以获得再生的完整植株或生产具有经济价值的其他产品的技术。

狭义：指用植物各部分组织，如形成层、薄壁组织、叶肉组织、胚乳等进行培养获得再生植株，也指在培养过程中从各器官上产生愈伤组织的培养，愈伤组织再经过再分化形成再生植物。

2. 细胞全能性(cell totipotency)

指每个植物细胞都具有形成完整植株的能力，因为每个细胞都具有全套的遗传基因，无论是性细胞还是体细胞在特定条件下均可以进行表达。

3. 外植体(explant)

从植物体上分离下来的用于离体培养的材料。

4. 分化(differentiation)

细胞在分裂过程中发生结构和功能上的改变，从而在发育中形成各类组织和器官完成整个生命周期。

5. 脱分化(dedifferentiation)

已分化好的细胞在人工诱导条件下，恢复分生能力，回复到分化组织状态的过程。

6. 再分化(redifferentiation)

脱分化后具有分生能力的细胞再经过与原来相同的分化过程，重新形成各类组织和器官的过程。

7. 愈伤组织(callus)

在离体培养过程中形成的具有分生能力的一团不规则细胞，多在外植体切面上产生。

8. 胚状体(embroid)

对应于胚(embryo)，在离体培养过程中产生一种形似胚(具有明显的根端和芽端)，功能与胚相同的结构。

9. 初始培养

最初接种在培养基上的外植体的培养。

10. 继代培养

将获得的增殖的培养体移植到新鲜的培养基上再次或反复多次地切割移植培养。

11. 继代周期

前后二代继代培养的间隔时间称为继代周期。

12. 增殖系数

后一次培养物的数量比前一次培养物增加的倍数称为增殖系数。

13. 分化培养

经过脱分化阶段的外植体，转移到另一培养基上分化出芽或胚时，则称为分化培养。

14. 增殖培养

已分化芽、小球茎和无性幼胚再继续进行增殖，即为增殖培养。所用培养基为增殖培养基。

15. 生根培养

诱导生根形成完整植株，就是生根培养，所得到的完整小植株便称组培苗。

16. 人工种子

指将植物离体培养产生的体细胞胚包埋在含有营养成分和保护功能的物质中，在适宜条件下发芽出苗的颗粒体。人工种子包括体细胞胚、人工胚乳和人工种皮三部分。

17. 器官培养

主要指植物根、叶、茎、花及小果实等器官在离体条件下的无菌培养。

18. 茎段培养

指带有腋(侧)芽或叶柄、长数厘米的茎节段进行离体培养。

19. 驯化现象

在开始继代培养要加入生长调节物质，其后加入少量或不加入生长调节物质就可以生长的现象。

20. 衰退现象

长期培养的材料也会逐渐衰退，丧失形态发生能力，具体表现在生长不良、再生能力和增殖率下降等。

21. 单倍体细胞

植物的花粉母细胞经减数分裂形成的，其染色体数目只有体细胞的一半。

22. 花粉和花药培养

指花粉在培养基上改变其正常发育和机能，不经受精而发生细胞分裂，由单个花粉发育成完整植株的技术。

23. 单倍体植物

用离体培养花药的方法使其中的花粉发育在一个完整的植株。

24. 种质

是指亲代通过生殖细胞或体细胞传递给子代的遗传物质。

25. 植物种质保存

是利用天然或人工创造的适宜环境，使个体中所含有的遗传物质保持其遗传完整性，有高的活力，能通过繁殖将其遗传特性传递下去。

26. 植物快速繁殖

就是应用组织培养技术，快速繁殖名优特新品物，使其在较短时间内繁衍较多的植株。

27. 基因

是含有表达某一功能蛋白质或核糖核酸(RNA)全部信息的核酸片段(DNA 或 RNA)，是生物遗传的基本功能单位。

28. 基因克隆

特定 DNA 片段的合成及在适当寄主细胞内的增殖。

29. 克隆载体

体外合成的 DNA 片段一般不能在细胞内增殖，必须与适当的具有自身复制能力的 DNA 分子耦连才能复制，这个 DNA 分子叫复制子，又叫克隆载体。

30. 茎尖培养

切取茎尖的先端部分或茎尖分生组织进行无菌培养。

第二节 植物组织培养的优点

一、培养条件可以人为控制

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。

二、生长周期短，繁殖率高

植物组织培养是由人为控制培养条件，根据不同植物不同部位的不同要求而提供不同的培养条件，因此生长较快。另外，植株也比较小，往往 20~30 d 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。

三、管理方便，利于工厂化生产和自动化控制

植物组织培养是在一定的场所和环境下，人为提供一定的温度、光照、湿度、营养、激素等条件，极利于高度集约化和高密度工厂化生产，也利于自动化控制生产。它是未来农业工厂化育苗的发展方向。它与盆栽、田间栽培等相比省去了中耕除草、浇水施肥、防治病虫等一系列繁杂劳动，可以大大节省人力、物力及田间种植所需要的土地。

第三节 植物组织培养在农业生产过程中的主要应用

一、在植物育种上的应用

(1)通过花药或花粉培养为单倍体育种。由于单倍体植株往往不能结实，在花药或花粉培养中用秋水仙素处理，可使染色体加倍，成为纯合二倍体植株，它已成为一种崭新的育种手段，具有高速、高效率、基因型一次纯合等优点。目前，我国科学家育成的烟草、小麦、水稻新品种已大面积种植。

(2)在植物种间杂交或远缘杂交中，杂交不孕给远缘杂交带来了许多困难，采用胚的早期离体培养可以使胚正常发育并成功地培养出杂交后代，并通过无性系繁殖获得数量多、性状一致的群体，胚培养已在 50 多个科属中获得成功。荔枝幼胚和蝴蝶兰的种子内部没有胚乳，种子的萌发缺乏营养物质，发芽率极低。用组织培养的手段给蝴蝶兰种子以外部营养，促使其萌发。用胚乳培养可以获得三倍体植株，为诱导形成三倍体植物开辟了

一条新途径。

(3)细胞融合通过原生质体融合，可部分克服有性杂交不亲和性，而获得体细胞杂种，从而创造新种或育成优良品种，最近浙江农业科学研究院和中国水稻研究所合作研究野生稻与栽培稻体细胞杂交创造新种质。小麦与燕麦不对称体细胞杂交，目前已获得40余个种间、属间甚至科间的体细胞杂种、愈伤组织，有些还进而分化成苗。

(4)基因工程就是把目标基因切割下来并通过载体使外来基因整合进植物的基因组，克服作物育种中的盲目性，而变成按人们的需要操纵作物的遗传变异，育成优良品种，实现作物改良，以增加产量和改善品质。目前已在马铃薯、番茄、水稻和瓜类植物上获得成功。我院培育成功抗白叶枯病的转基因水稻新品种。

(5)细胞工程即诱发细胞突变。培养细胞均处在不断分生状态，容易受培养条件和外界压力(如射线、化学物质等)的影响而产生诱变，已诱发筛选出植物抗病虫性、抗寒、耐盐、抗除草剂毒性、生理生化变异等所需要的突变体，然后分化成植株，经诱发细胞突变培育了辣椒、白菜新品种。目前，用这种方法已筛选到抗病、抗盐、高赖氨酸、高蛋白、矮秆高产的突变体，有些已用于生产。

二、在植物脱毒和快速繁殖上的应用

(1)植物脱毒和离体快速繁殖是目前植物组织培养应用最多、最有效的一个方面。很多作物都带有病毒，尤其是无性繁殖植物，如马铃薯、甘薯、草莓、大蒜等。长期的病毒感染并在植物体内的积累，使植物的产量和品质不断下降。比如我们看到合肥市场供应的草莓越来越小，就是病毒病感染的结果。White早在1943年就发现植物生长点附近的病毒浓度很低甚至无病毒。利用组织培养方法，取一定大小的茎尖进行培养，再生的植株有可能不带病毒，从而获得脱病毒苗，再用脱毒苗进行繁殖，种植的作物就不会或极少发生病毒。目前利用茎尖脱毒技术组织培养在甘蔗、菠萝、香蕉、草莓、甘薯、马铃薯等主要经济作物上已成功应用。无毒种苗和微型脱毒种薯已在马铃薯生产上广泛应用，从根本上解决了植物的退化问题。脱去病毒的植物不仅恢复了原来的优良种性，而且产量一般比原来提高30%以上。另外一些重要园林观赏植物菊花、香石竹、唐菖蒲、水仙、郁金香、百合、大丽花、白鹤芋等一大批花卉靠无性繁殖的植物，取0.1~0.5 mm大小的生长点，培养得到的基本上是无病毒苗。去病毒后，植株生长势强，花朵变大，色泽鲜艳，抗逆能力提高，产花数量上升。

(2)由于植物组织培养有快速繁殖的突出特点，对一些繁殖系数低、不能用种子繁殖的“名、优、特、新、奇”作物品种的繁殖，包括脱毒苗、新育成、新引进、稀缺种苗、优良单株、濒危植物和基因工程植株等都可通过离体快速繁殖，它可不受环境、气候的影响，以比常规方法快数万倍到数百万倍的速度扩大繁殖，及时繁育出大量优质种薯和种苗。目前，观赏植物、园艺作物、经济林木等无性繁殖作物等部分或大部分都用离体快繁提供苗木，试管苗已出现在国际市场上并形成产业化。预计在21世纪，这一技术的应用将更为广泛。

三、在植物次生产物上的应用

利用组织或细胞的大规模培养，有可能生产出人类所需要的一切天然有机化合物，如

蛋白质、脂肪、糖类、药物、香料、生物碱及其他活性化合物。目前，用单细胞培养生产蛋白质，将给饲料和食品工业提供广阔的原料生产前景；用组织培养方法生产微生物以及人工不能合成的药物或有效成分，有些已投入生产。大约已有 20 多种植物在培养组织中有效物质高于原植物，国际上已获得这方面专利 100 多项。

四、在植物种质资源保存和交换上的应用

具有独特遗传性状的生物物种的绝迹是一种不可挽回的损失。利用植物组织和细胞低温保存种质，可大大节约人力、物力和土地，同时也便于种质资源的交换和转移，防止有害病虫的人为传播，给保存和抢救有用基因带来了希望。例如胡萝卜和烟草等植物的细胞悬浮物，在 $-196^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$ 的低温下贮藏数月，尚能恢复生长，再生成植株。

五、在遗传、生理、生化和病理研究上的应用

组织培养推动了植物遗传、生理、生化和病理学的研究，已成为植物科学研究中的常规方法。在细胞培养中很容易引起变异和染色体变化，从而可得到作物的附加系、代换系和易位系等新类型，为研究染色工程开辟新途径。植物组织培养有益于植物的矿质营养、有机营养、生长活性物质等方面的研究。用单细胞培养研究植物的光合代谢是非常理想的，取得有意进展。

六、工厂化育苗

近年来，组培苗工厂化生产已作为一种新兴技术和生产手段，在园艺植物的生产领域蓬勃发展。组培苗工厂化生产，是以植物组织培养为基础，在含有植物生长发育必需物质的人工合成培养基上，并附加一定量的生长调节物质，把脱离于完整植株的本来已经分化的植物器官或细胞，接种在不同的培养基上，在一定的温度、光照、湿度及 pH 条件下，利用细胞的全能性以及原有的遗传基础，促使细胞重新分裂，分化长成新的组织、器官或不定芽。最后长成和母株同样的小植物体。例如非洲紫罗兰组培苗的工厂化生产，就是取样品株一定部位的叶片为材料，消毒后切成一定大小的块，接种在适宜的培养基上，在培养室内培养，两个月左右在切口处产生不定芽，这些不定芽再切割后又形成新的不定芽，如此继续，即可获得批量的幼小植株，按需要量生产与样品株完全相同的苗子。

工厂化生产组培苗，是按一定工艺流程规范化程序化生产的，具有繁殖速度快、整齐一致、无虫少病、生长周期短、遗传性稳定的特点，可以加速产品的发展，尽快获得繁殖无性系。特别是对一些繁殖系数低、杂合的材料有性繁殖优良性状易分离，或从杂合的遗传群体中筛选出表现型优异的植株，需要保持其优良遗传性，有更重要的作用。组培苗的无毒生产，可减少病害传播，更符合国际植物检疫标准的要求，扩大产品的流通渠道，增加产品市场的销售能力，同时减少了气候条件对幼苗繁殖的影响，缓和了淡、旺季供需矛盾。

世界上一些先进国家园艺植物组织培养技术的迅速发展从 20 世纪 60 年代就已经开始，并随着生长、分化规律性探索逐步深化，到了 70 年代仅花卉业就已在兰花、百合、非洲菊、大岩桐、菊花、香石竹、矮牵牛等二十几种花卉幼苗生产上建立起大规模试管苗商品化生产，到 1984 年世界花卉幼苗产业的生产总值已达 20 亿美元，其中美国花卉幼苗

市场总值为 6 亿多美元，日本三友种苗公司有 60% 的幼苗靠组织培养技术繁殖。1985 年仅兰花一项，在美国注册的公司就有 100 余家，年销售额在 1 亿美元以上。由于组织培养技术的应用，加快了花卉新品种的推广。以前靠常规方法推广一个新品种要几年甚至十多年，而现在快的只要 1~2 年就可在世界范围内达到普及和应用。

我国采用快速繁殖技术，也使优良品种达到迅速的推广和应用。如广东切花菊“黄秀风”的应用，使菊花变大，长势加强，花色鲜艳，抗病力增强，打开了进入香港市场的渠道，使三十多种观叶植物的推广很快遍及全国，丰富了人们的生活；并将自然界的几百个野生金钱莲品种繁种驯化，培养了一批园林垂直绿化的材料，促进了园林业的发展。

植物组织培养也存有一定的困难，首先是繁殖效率与商品需要量的矛盾，有些作物由于繁殖方法尚未解决，因而无法满足生产的需要，其次是在培养过程中如何减少变异株的发生。更重要的是应降低组培苗工厂化生产的成本，只有降低成本，才能更好地投产应用。总之，随着组织培养这一技术的发展及各种培养方法的广泛应用，使这一技术在遗传育种、品种繁育等方面表现出了巨大的潜力，特别是生物工程和工厂化育苗实施以后，它将以新兴产业的面目在技术革命中发挥重大作用。

总之，植物组织培养在农业上应用广泛，它具有培养条件可以人为控制生长周期短，繁殖率高、管理方便，利于工厂化生产和自动化控制等特点，已渗透到农作物、经济作物、园林绿化等各种作物的生产中，将对我国农林生产带来革命性的变化，希望广大农业技术人员和农民朋友都来学习和重视植物组织培养技术，并应用到农业生产之中，它的应用将给农民带来意想不到的收获。

第四节 植物组织培养发展简史

植物组织培养与细胞培养开始于 19 世纪后半叶，当时植物细胞全能性的概念还没有完全确定，但基于对自然状态下某些植物可以通过无性繁殖产生后代的观察，人们便产生了这样一种想法，即能否将植物体的一部分在适当的条件下培养成一个完整的植物体，为此许多植物科学工作者开始了培养植物组织的尝试。最初的问题仍然是集中在植物细胞有没有全能性和如何使这种全能性表现出来。

1839 年 Schwann 提出细胞有机体的每一个生活细胞在适宜的外部环境条件下都有独立发育的潜能。1853 年 Trecul 利用离体的茎段和根段进行培养获得了愈伤组织，愈伤组织是指一种没有器官分化但能进行活跃分裂的细胞团，但这还不能证明细胞具有全能性，因为由愈伤组织没能再生出完整植物体。1901 年 Morgan 首次提出一个全能性细胞应具有发育出一个完整植株的能力。所谓全能性细胞就是指具有完整的膜系统和细胞核的生活细胞，在适宜的条件下可通过细胞分裂与分化，再生出一个完整植株。White 指出，如果一个给定的有机体的所有细胞都大致相同，并具有全能性，那么在有机体内所观察到的细胞分化必定是这些细胞对有机体内微环境和周围环境的反应。就是说机体内每个细胞之所以没有表现出全能性，是因为该细胞所处位置的不同，致使其某些功能被抑制(suppressed)，这充分说明机体内的微环境因素在细胞分化中起了十分重要的作用。按照现代发育生物学和细胞生物学的理论，细胞分化是受基因在时间和空间两个方面的调控，空间就是指细胞在机体内所处的位置。不同位置的细胞，其基因的表达不同，细胞所表现出的形态结构和