



全国高等农业院校教材

全国高等农业院校教材指导委员会审定

园艺植物离体 培 养 学

● 陈振光 主编

● 果树、蔬菜、观赏园艺专业用

中国农业出版社

全国高等农业院校教材

园艺植物离体培养学

陈振光 主编

果树、蔬菜、观赏园艺专业用

中国农业出版社

全国高等农业院校教材
园艺植物离体培养学
陈振光 主编

责任编辑 王琦睿

出版 中国农业出版社

(北京市朝阳区农展馆北路2号)

发行 新华书店北京发行所

印刷 中国农业出版社印刷厂

* * *

开本 787×1092mm16开本

印张 13.75 字数 307千字

版、印次 1996年10月第1版

1996年10月北京第1次印刷

印数 1—3,000册 定价 10.90元

书号 ISBN 7-109-04267-7/Q·271

ISBN 7-109-04267-7



9 787109 042674 >

前 言

《园艺植物离体培养学》是根据农业部(1993)农(教)函字第20号通知,编写的全国高等农业院校的基本教材。为了编好这本教科书,我们曾于1993年9月,拟定《园艺植物离体培养学》教材编写大纲,向全国四十余所高等农业院校的园艺系征求意见,并于1994年组织编写。教材稿最后经全国高等农业院校教材指导委员会审定。

《园艺植物离体培养学》是研究园艺植物(含果树、蔬菜和花卉)离体培养的方法技术、原理和应用的一门技术学科。它作为“生物工程学”的一个分支和“第二次绿色革命”的一个组成部分,将对园艺生产的现代化产生重要的影响。

本书分绪论、总论和各论。绪论简述园艺植物离体培养学的含义、植物离体培养学的产生与发展以及园艺植物离体培养学与其它学科和园艺生产的关系;总论部分简明阐述园艺植物离体培养的方法技术(第一至五章),基本理论(第六至九章)和目前较流行、也较实用的几个应用领域(第十至十四章)。各论部分因我国幅员辽阔,南北气候悬殊,园艺植物种类繁多,限于篇幅,选编一些有代表性的园艺植物种类,各校可根据各地具体情况,挑选几种果树、蔬菜和花卉讲授。书末附有主要参考文献和两个附录,以备查用。

本书编者虽力求既在基本方法和理论上有简明的阐述;又能为读者铺设通向实际应用的桥梁。既反映编者的研究所得;又能博采众长,着力反映世界各国的主要最新成果。但由于《园艺植物离体培养学》是一门新学科,发展日新月异。限于编者水平,难免还有缺点和不足,诚望科教界同仁和广大读者提出宝贵意见,以便今后修改和补充。

本教材初稿完成之后,蒙石荫坪研究员审阅,提出不少宝贵意见,在此表示衷心感谢。

编 者

1995年3月

目 录

前言

绪论	1
一、园艺植物离体培养学的基本含义	1
二、园艺植物离体培养学的形成与发展	1
三、园艺植物离体培养学与园艺科学的关系	5

总 论

第一章 离体培养的基本操作方法	7
第一节 外植体的选择与处理	7
第二节 培养基的制备	8
一、培养基的种类及其组成	8
二、配制培养基的准备工作	9
三、配制培养基的方法	10
第三节 无菌技术	10
第四节 环境条件的控制	12
第二章 胚胎培养和离体受精	14
第一节 离体胚培养	14
第二节 胚乳培养	16
第三节 胚珠和子房培养	18
第四节 离体受精	19
第三章 器官和组织培养	22
第一节 茎尖培养	22
第二节 花药培养和花粉培养	23
一、花药培养	23
二、花粉培养	25
第三节 其他器官和组织培养	27
一、离体根的培养	27
二、离体叶的培养	27
三、花的培养	28
四、幼果的培养	28
五、愈伤组织的培养	28
第四章 细胞培养	31
第一节 悬浮培养	31

一、悬浮培养的基本特点及起始悬浮液的制备	31
二、成批悬浮液培养	32
三、连续培养	33
第二节 固相化细胞培养	34
第三节 单细胞培养	37
第五章 原生质体培养与融合	40
第一节 原生质体分离	40
第二节 原生质体培养	42
第三节 原生质体融合	43
一、无机盐诱导融合	44
二、聚乙二醇 (PEG) 与高 pH 的 Ca^{++} 相结合的诱导融合法	44
三、电融合技术	44
四、杂种细胞的选择和体细胞杂种的鉴定	45
第六章 细胞全能性及其营养代谢	47
第一节 植物细胞全能性	47
第二节 培养物的营养	48
第三节 培养物的次级代谢	51
一、次级代谢概况及生物转化举例	51
二、次级代谢的调节	53
第七章 外植体的脱分化与生长	55
第一节 外植体脱分化	55
一、诱导期间的细胞生物学变化	55
二、与脱分化有关的因子及其作用	57
第二节 愈伤组织的生长	58
第三节 悬浮培养细胞的生长	59
一、成批培养的细胞生长动态	59
二、连续培养下的细胞生长	60
三、悬浮培养细胞周期	61
第八章 培养物再分化	63
第一节 细胞分化和组织分化	63
一、细胞分化	63
二、组织分化	65
第二节 器官分化和植株形成	66
一、茎、根器官分化	66
二、植株的形成	69
第三节 离体胚胎发生	69
一、各种培养类型的离体胚发生	69
二、影响离体胚胎发生的因素	70
三、离体胚胎发生的机制	71
第九章 培养物的遗传与变异	73
第一节 培养细胞的变异	73

一、培养细胞高频率变异的起因	73
二、培养细胞变异的遗传机理	74
第二节 花粉植株的遗传变异	76
第三节 体细胞融合体的遗传变异	78
第十章 离体繁殖	80
第一节 离体繁殖的特点及其应用	80
第二节 外植体的类型与发育途径	81
第三节 离体繁殖的技术与方法	83
一、无菌材料的建立	83
二、培养材料的增殖	84
三、芽苗生根培养	85
四、小苗移植驯化	86
第四节 人工种子的研制	86
一、研制人工种子的意义	86
二、人工种子制作方法及其程序	87
第十一章 离体培育无病毒苗	89
第一节 培育无病毒苗的意义	89
一、园艺植物病毒病的严重性	89
二、脱除病毒的研究概况	89
三、离体培养脱毒的意义	90
第二节 脱除病毒的方法	90
一、茎尖分生组织培养脱毒法	90
二、其它器官培养脱毒	92
第三节 脱毒苗的鉴定	92
第四节 无病毒原种的保存和应用	94
第十二章 离体保存种质资源	95
第一节 离体保存种质的意义	95
第二节 限制生长保存	95
第三节 中低温调控生长保存	96
第四节 超低温保存种质	98
一、超低温保存的基本原理和主要环节	98
二、超低温保存技术	99
第十三章 离体培养在品种改良上的应用	101
第一节 培养细胞变异系的利用	101
一、自发变异系的利用	101
二、培养细胞的人工诱发突变	102
第二节 遗传转化	103
一、原生质体转移核、质基因组	104
二、直接转化	105
三、载体介导的转化	107
第十四章 离体培养生产次生物质	110

第一节 细胞培养生产次生物质的意义及特点	110
一、利用细胞培养生产次生物质的意义	110
二、细胞培养生产次生物质的特点	110
第二节 植物细胞培养工厂化生产技术	111
一、一般发酵罐的生产程序	111
二、筛选高产细胞系	111
三、采用高效率的培养方法	112
第三节 若干有用物质的生产	113

各 论

第十五章 苹果	115
第一节 茎尖培养和种质保存	115
第二节 无病毒苗的培育	121
第三节 花药培养和胚乳培养	122
第四节 叶片培养及遗传转化	123
第五节 原生质体培养	124
第十六章 葡萄	127
第一节 离体繁殖	127
第二节 胚胎培养	128
一、胚培养	129
二、胚珠培养	130
三、胚乳培养	131
第三节 花药培养	131
第四节 其它材料培养及其应用	132
一、果肉组织培养及其在代谢和基因转化上的应用	132
二、花丝培养	132
三、原生质体培养	133
四、种质资源保存	133
第十七章 草莓	135
第一节 离体繁殖	135
第二节 无病毒苗培育	137
一、脱毒技术	137
二、病毒检测	139
第三节 叶片培养及其应用	139
第十八章 柑桔	141
第一节 茎尖微芽嫁接与脱毒	141
第二节 胚培养	142
第三节 胚乳培养	144
第四节 花药培养	145
第五节 原生质体培养与融合	147
第十九章 香蕉	150

第一节 离体繁殖	152
第二节 无病毒种苗培育	154
第三节 悬浮细胞和原生质体培养	155
第四节 离体培养的育种应用潜力	157
第二十章 马铃薯	159
第一节 茎尖培养与脱毒	159
第二节 花药和花粉培养	161
第三节 原生质体培养与融合	163
一、原生质体培养方法	163
二、影响原生质体培养和植株再生的因素	164
三、体细胞杂交	165
第二十一章 甘蓝	166
第一节 离体繁殖	166
第二节 花药和花粉培养	168
第三节 原生质体培养与融合	170
一、原生质体培养方法	170
二、原生质体融合方法	171
三、杂种细胞的筛选	172
四、原生质体技术在育种中的应用	173
第二十二章 胡萝卜	174
第一节 体细胞胚胎发生与人工种子	174
一、胡萝卜体细胞胚胎发生	174
二、人工种子	175
第二节 花药和花粉培养	177
第三节 体细胞杂交	178
一、原生质体融合方法	179
二、杂种细胞的筛选	180
三、体细胞杂种植株的鉴定	180
第二十三章 兰花	182
第一节 离体繁殖	182
第二节 胚培养与杂交育种	185
第三节 离体培养诱变与遗传转化	186
第二十四章 水仙花	188
第一节 离体繁殖	188
第二节 无病毒苗的培育	190
第三节 离体受精与原生质体培养	193
一、试管受精	193
二、原生质体分离与培养	193
第二十五章 杜鹃花	195
第一节 离体繁殖	195
一、初代培养	195

二、芽的增殖	195
三、生根培养	196
第二节 其它器官培养	197
一、花芽培养	197
二、子房培养	197
三、上胚轴培养	198
四、叶片培养	199
附录1 缩写字及其英中名称对照	200
附录2 常用基本培养基配方	201
主要参考文献	204

绪 论

一、园艺植物离体培养学的基本含义

植物离体培养 (Plant in vitro culture) 是指通过无菌操作, 把植物体的各类结构材料, 即外植体 (Explant), 接种于人工配制的培养基上, 在人工控制的环境条件下, 进行离体培养的一套技术与方法, 通常称之为植物组织培养 (Plant tissue culture), 或植物的细胞与组织培养。

植物离体培养是建立在植物细胞全能性学说的理论基础上, 经过长期反复科研实践, 逐步发展形成一套较为完整的技术体系。现在几乎所有的植物细胞与组织材料均可以培养成功。按植物的不同结构材料(外植体), 将离体培养技术体系分为: (1) 胚胎培养及以胚胎为基础的培养技术, 包括原胚和成熟胚培养, 胚乳培养, 胚珠或子房培养等等; (2) 器官及器官原基培养, 包括根、茎、叶、花器官及其原基的培养(含根、茎段和花药等); (3) 组织培养, 包括分生组织、形成层组织或其他组织结构(含愈伤组织)的培养; (4) 细胞培养, 包括单细胞、多细胞或悬浮细胞和细胞的遗传转化体的培养; (5) 原生质体培养及其以原生质体为基础的培养技术, 包括原生质体、原生质融合体和原生质体的遗传转化体的培养等等。

由于植物离体培养技术及其理论基础研究的不断深入, 其应用研究的范围也日益扩大。特别是近二三十年来, 以植物离体培养技术为手段, 广泛地进行园艺植物的良种繁育与脱毒; 种质资源的贮存; 细胞次生代谢物质的生产; 细胞工程和基因工程的生物技术育种; 以及遗传学和生物学基础的研究, 已取得引人注目的进展, 产生了巨大的影响, 也有力地推动了生物科学中有关领域的研究。

园艺植物离体培养学是农业生物技术的重要组成部分之一, 它是研究园艺植物(含果树、蔬菜和花卉观赏植物)离体培养的原理和方法的科学。离体培养技术的进一步研究和应用, 必将大大提高园艺植物生产水平与技术水平, 加速我国园艺科学现代化的进程。

二、园艺植物离体培养学的形成与发展

(一) 植物离体培养的渊源及其早期的实践 植物离体培养的理论, 渊源于十九世纪30年代德国的植物学家 Schleiden 和动物学家 Schwann 在“细胞学说”(Cell theory), 其主要观点: 细胞是生物体的基本结构单位, 由它构成整个生物个体; 同时认为植物细胞又是在生理上, 发育上具有潜在的全能性功能单位。Schwann 还指出: “每一个细胞应该可以独立生活和发展, 假如具有的条件正如它存在于有机体内一样……”。1858年 Virchow 在“细胞病理学”一书中所提出“一切细胞来自细胞”的观点和证据, 有力地支持细胞是生命的结构和功能的单位的学说。

1902年德国著名植物学家 Haberlandt, 根据细胞学说, 提出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, 这种单个细胞是具有潜在的全能性功能单位。为了论

证这个观点，他首次进行高等植物的细胞培养实验，利用野芝麻和紫鸭跖草等植物，分离出叶肉栅状组织，表皮，毛刺的细胞进行培养。在他所发表的“关于单离的植物细胞培养实验”论文中写道“我愿意指出：在我的培养实验中，虽然经常观察到细胞的明显生长，但从未观察到细胞分裂。发现单离细胞分裂的条件，将是未来培养试验的难题”。他还预言：“在未来人们可以成功地从营养细胞培养出人工胚”。由于当时的技术水平限制，实验没有获得成功，但却对植物离体培养的发展起了先导的作用。此后多年，其他研究者继续进行类似的细胞培养实验，同样未能取得成功。因为采用的材料是单子叶植物成熟的细胞，没有成功，但其它一些科学家以胚为材料进行研究，即获得成功。如 Hanning 在 1904 年选用萝卜和辣根菜的胚，结果发现离体胚可以充分发育，并有提早萌发形成小苗的现象。1922 年 Haberlandt 的学生 Kotte 和美国的 Robbins 分别获得离体根尖培养的某些成功，能生长很长的一段时间，并进行继代培养。同年，Robbins 进行豌豆、玉米和棉花的茎尖培养，形成一些缺绿的叶和根。美国的 Knudson 在 1922 年采用胚培养法获得兰花幼苗，克服了兰花种子发芽困难的问题。Laibach (1925) 进行亚麻种间杂种幼胚培养也成功地获得杂种植株。

(二) 植物离体培养基本技术体系的形成 植物离体培养基本技术体系的形成，始于 30 年代中期几位科学家卓有成效的工作。1934 年美国的 White 等用番茄根尖的组织培养，首次建立了活跃生长的无性繁殖系；同时用带有花叶病毒的烟草根离体培养，发现迅速生长的根尖病毒浓度很低，往根颈成熟区的根组织的病毒浓度逐渐升高。1937 年，White 发现 B 族维生素和吡啶乙酸，对离体根的生长有重要作用。1939 年又报道了烟草种间杂种 (*Nicotiana glauca* × *N. congsdorffi*) 幼茎切段的形成层组织培养，并成功地进行继代培养。法国 Gautheret (1934 年) 报道了培养山毛榉、黑杨的形成层时，可以不断地增长几个月；随后 1937—1938 年在培养柳树的培养基中，加入 IAA 和维生素 B 等生长因素，结果使柳树形成层的生长大为增加。与此同时，法国的另一位学者 Nobecourt (1937—1938) 培养胡萝卜根和马铃薯的块茎薄壁组织，也使细胞增殖获得成功。由于 White、Gautheret 和 Nobecourt 等科学家杰出的工作和发现，初步建立起植物离体培养的基本方法。1943 年 White 发表了《植物组织培养手册》(A handbook of plant tissue culture)，这是世界上第一部有关植物离体培养技术专著。在这本书中 White 又重新提出了细胞全能性，即每个植物细胞都具有发育成为一个完整植株的潜能。由于 White 在植物离体培养方法等多方面的贡献，被誉为“植物组织培养之父”。

30 年代末，很多研究者开始注意培养物的器官形态建成。1938 年著名的植物生理学家生长素的发现者 Went 提出“器官形成的特殊物质”的假说，对器官形成起控制作用，促使许多植物生理学家都致力于寻找这种“特殊物质”。1941 年 Van Overbeek 等想刺激曼陀罗没有受精的卵细胞发育试验时，发现椰乳可以促进曼陀罗胚的发育，使心形期幼胚离体培养至成熟。当时还不知道椰乳里含有细胞分裂素，但很快被许多美国的研究者用来促进器官发生的研究。1944 年美国的 Skoog 用烟草愈伤组织研究器官发生，他观察到生长素对根有促进作用，同时对芽的形成有抑制作用，而这种抑制作用可部分地为有机磷酸盐和蔗糖所克服。1948 年 Skoog 和崔微在烟草茎切段和髓的培养及其器官形成研究中，发现腺嘌呤或腺苷可以解除培养基中生长素 (IAA) 对芽的抑制作用，而诱导烟草茎段形成芽，从而确定了腺嘌呤/生长素的比例是控制芽和根形成的主要因素之一。1955 年 Miller 和 Skoog 在

鲱鱼精子的提取物中发现激动素,它对促进芽的形成,效果比腺嘌呤增强约3万倍。1957年Skoog和他的同事又发现生长素与激动素不同对比对植物生长和分化的作用。即激动素/生长素的比例高形成芽,而比例低则形成根,从根本上否定了Went的“器官形成特殊物质学说”,建立起离体培养中,器官分化的激素配比模式。这一规律的发现,不仅在植物离体培养中具有极其重要意义,而且揭示了植物生长发育生理学中的一个奥秘。

在40年代末至50年代末,许多研究者对离体培养技术方法上作了大量探索,取得了重要的进展。Muir(1953)最早报道细胞悬浮培养法。他将万寿菊和烟草的愈伤组织在液体培养基振荡培养获得了细胞悬浮培养的成功。同时,他还应用“看护培养”技术,将冠瘿瘤组织分离培养得到单细胞,并建立单细胞培养系。还有De Ropp(1955)发明的“微室培养法”,Bergmann(1960年)建立的“琼脂平板培养法”。

还值得介绍的,作出与Skoog同等重大贡献的是在美国康乃尔大学工作的英国人Steward。他在1948年开始进行胡萝卜离体培养研究,1952年与他的同事共同设计出一种培养装置Auxophyton(细胞增殖器)。他们在胡萝卜组织培养过程中,观察到培养液常常出现混浊的现象,并查明是由于培养组织上散落的游离细胞和细胞团。1956年他发表了可以利用愈伤组织液体培养产生悬浮细胞,悬浮细胞可以继代培养的论文。1958年他们又报道,利用胡萝卜的次生韧皮部的悬浮培养物,在含椰乳的培养基中观察到类似胚胎发生的结构(胚状体)。由胚状体先长根,后长芽,并形成完整植株,为植物细胞全能性的理论提供了有力的实验证据。

上述一系列的研究表明,植物离体培养的基本技术方法已相当成熟,并初步形成了植物离体培养的一套技术体系,为植物离体培养学科的建立奠定了基础。

(三) 园艺植物离体培养学科的建立 从本世纪初Haberlandt离体培养细胞研究开始,至60年代已半个多世纪,植物离体培养方法和培养基配方的不断改进,实验采用的植物材料也更为广泛。在植物离体培养技术体系逐步完善的同时,基础理论及其应用的研究也向纵深方向发展,开始逐步形成新的学科。

早在50年代初,人们便开始用裸子植物,如银杏、红豆杉属植物的花粉进行离体培养(Tulecke 1953, La Rue 1959)。1964—1966年Güha和Maheshwari首次从毛叶曼陀罗花药培养中,诱导未成熟花粉形成单倍体植株,从此开创了利用花粉培育单倍体植物的新途径。1970年Kameya和Hinata用悬滴法培养甘蓝×芥蓝的杂种一代成熟的花粉,获得单倍体再生植株。1973年Debergh和Nitsch培养番茄小孢子获得单倍体植株。1974年Greshoff从葡萄花药培养中,得到单倍体愈伤组织。1975年Rosati从草莓花药培养中,获得小孢子发育的植株。1979年日高哲意,陈振光等分别从枳壳和四季桔的花药培养中诱导花粉植株。随后在许多果树、蔬菜 and 观赏花卉植物花药培养中,获得花粉单倍体植株。据不完全统计已有200多种植物的花药或花粉培养获得再生植株(Dunwell, 1986)。

1960年Cocking等人用真菌的纤维素酶分离番茄幼根原生质体,首次获得成功。1971年Tekebe和Nagata用烟草叶肉细胞分离原生质体,并培养再生完整植株。1972年Carlson等利用粉蓝烟草和郎氏烟草原生质体进行融合,获得了烟草体细胞杂种。同年Grambow等用胡萝卜原生质体培养获得由胚状体发育成的植株。随后有洋葱、芹菜、石刁柏、白菜、结球甘蓝、青花菜、花椰菜、黄瓜、莴苣、番茄、辣椒、豌豆和马铃薯等均获得原生质体再

生植株。1978年 Melchers 等,首次获得了番茄和马铃薯属间体细胞杂种——“Potamato”。尔后有近 20 个蔬菜种类获得体细胞融合的再生植株,主要集中于茄科和十字花科蔬菜。在观赏植物方面,1973 年最早报道矮牵牛叶肉原生质体再生植株;矮牵牛 (*P. hybrida*) 和拟矮牵牛 (*P. parviflora*) 的叶肉原生质体融合再生植株。近来观赏植物细胞融合的有些报道,主要在生殖细胞之间或生殖细胞与体细胞之间进行了原生质体融合技术的探索。如石蒜生殖细胞与其花瓣原生质体融合;麝香百合花粉原生质体与生殖细胞原生质的融合,并已取得成功。果树原生质体培养研究,最早是以色列 Vardi 等 (1977),获得柑桔原生质体再生植株。至今已有梨、樱桃、猕猴桃、龙眼和枇杷等多种果树获得原生质体再生植株。1985 年日本 Ohgawara 首先获得枳壳和 Trovita 甜橙体细胞杂种。至 80 年代末果树原生质体培养,已有 20 个种和品种得到再生植株,种间体细胞杂种 7 个,属间杂种 13 个,还有些胞质杂种,尤其是柑桔类体细胞融合的研究进展最快。

80 年代以来,植物基因工程的研究进展十分迅速。目前国际上已分离出来的目的基因有近百个,包括抗病基因、抗虫基因、抗逆境基因、抗除草剂基因、提高蛋白质质量基因、色素基因、延缓果实成熟基因,以及高效表达的启动子。目前在分离目的基因方面,还发展出一种新的技术,用跳跃因子进行钩基因。主要原理是利用跳跃因子在植物中跳跃,而引起一些性状突变,然后利用跳跃因子为探针,可以较容易地分离出目的基因。

植物基因的转移也是研究的重点。最早是以土壤农杆菌中的 Ti 质粒为载体,目前利用土壤农杆菌 Ti 质粒转化基因,是双子叶植物转化的主要方法,对单子叶植物的应用,仍受到很大的限制。近来国际上还在探索其他种类的载体,如利用病毒,脂质体构建载体。对导入基因的方法,还研究 DNA 直接导入法,如 PEG (聚乙二醇) 法,电击穿孔法 (Electroporation) 和基因枪法 (Particle gun bombardment 或 microprojectile bombardment——微弹射击法),或直接 DNA 注射,包括花粉管转基因法等。

植物细胞的全能性为植物基因转化提供方便,在高等植物中已有许多植物获得成功,目前已转化成功的植物有矮牵牛、番茄、马铃薯、花椰菜、胡萝卜、豌豆、拟南芥菜、莴苣、向日葵、芹菜、芦笋、荷花、兰花、核桃、苹果、柑桔、草莓、桃、番木瓜、猕猴桃、枇杷、橄榄、李、樱桃等,花卉转基因也是十分引人注目的研究课题。最早是 1987 年德国人将玉米色素合成中的一个还原酶基因导入矮牵牛,产生一种砖红色的矮牵牛。随后,荷兰报道在红色矮牵牛,引入苯基乙烯酮合成酶的反义基因,以抑制该酶的合成,获得了白色的矮牵牛。最近美国报道进行玫瑰、菊花、康乃馨三大切花品种的遗传转化研究。几种玫瑰用农杆菌共培养已获得转化植株。另外从矮牵牛中分离出一种新编码蓝色基因导入玫瑰中,获得世界上独一无二的“蓝玫瑰”。在菊花的大量栽培种中,采用叶、叶柄、花、花柄等器官进行转化,获得转基因植株。康乃馨用 GUS 基因转化频率相当高,其转化率可达 40%—60%,但多数是嵌合体。目前已获得延缓衰老的转基因植株。现在有些研究人员正在试图将萤火虫的虫荧光酶基因导入花卉,使花和叶在晚上闪闪发光。转基因植物的研究最成功的是保鲜番茄新品种。1988 年美国科学家运用反义基因,延缓果实的成熟达到果实保鲜的目的。美国现在批准的第一批转基因植物可以大量生产,就是通过转基因工程培育的保鲜番茄新品种。

随着园艺植物离体培养的技术体系的建立,植物离体培养在理论上也取得了丰富的成果。60 年代以来,许多园艺植物的花粉离体培养发育成单倍体植株;胚乳培养三倍体植株;

原生质体培养再生植株；基因分离，构建与转化细胞的培养成功，进一步证实了植物细胞全能性的理论及其普遍性的意义。体细胞胚胎的发生从 50 年代末的 Steward 和 Reinert 胡萝卜体细胞胚胎发生报道之后，园艺植物的体细胞胚胎发生的报道急剧增加。1971 年 Johri 评论说：每个营养细胞或生殖细胞，在适当条件下都能够产生胚状体，但胚乳细胞还不能产生胚状体。到了 1975 年胚乳培养胚状体的发生已屡见不鲜了，特别是果树胚乳培养研究，我国科技工作者作出很大贡献。与此同时，细胞胚胎发生的理论也得到进一步发展。人们认识到胚胎发生不再是受精后发生在胚珠内的特发事件。正如 Reinert (1978) 所提出：“胚状体发生的能力是植物体细胞的一个基本特性”。Raghavan 也指出：“任何活细胞（不管是单倍体，二倍体或三倍体）潜在地产生一个胚状体”。胚状体理论对植物离体培养学的形成和实验植物胚胎学均有重要意义。70 年代以来原生质体的培养成功对生物学的发展是极其重要的。特别是植物遗传学，体细胞的杂交成为研究体细胞遗传学的有力工具，体细胞遗传研究又促进普通遗传学的进一步深化。总之，离体培养研究结果大大丰富生物科学若干领域的基础理论。如细胞、组织器官的脱分化与再分化的机理，离体细胞与组织的营养和代谢，植物细胞组织器官的生长、发育的规律等等。

在完善离体培养技术、探索理论基础的同时，研究者们还不断开拓植物离体培养的应用研究领域，促进生物技术产业化发展。在生产上应用最广泛，最成功的一个领域是植物离体快速繁殖，应用离体培养繁殖的种类日益增多。据粗略的估计有 600 多种，其中绝大部分是园艺植物类。我国目前已有香蕉、柑桔、葡萄、草莓、苹果、凤梨、猕猴桃、罗汉果、枇杷、马铃薯、西瓜、兰花、杜鹃、水仙、月季、百合、康乃馨、菊花、唐菖蒲、小苍兰、金线莲等数十种园艺植物，建成了离体培养快速繁殖的生产线，生产试管苗投放市场。

许多国家已成立离体培养快速繁殖专业公司，如荷兰是世界花卉生产出口国，也是组培苗的生产王国，年出口花卉苗 4000 万株。意大利主要生产桃、柑桔等果树砧木苗，年产量约 1000 多万株。据保守估计到本世纪末组培苗可达 6 亿株左右，此外，人工种子的研制，在欧洲尤里卡计划中成为生物技术研究的重点项目。德国、法国、瑞士的大公司正在联合研制开发蔬菜人工种子和胚芽生产，并取得阶段性成果。匈牙利研制的马铃薯人工种子，欧共体研制的非洲海枣人工种子，已进行大规模田间试验。苜蓿、芹菜、番茄、胡萝卜和绿胡椒已实现胚芽生产，现正在扩大到大田作物上的应用研究。

综上所述，植物离体培养经过无数科学家近百年的科研实践，从本世纪初的一个实验生物学技术，发展到本世纪末，已形成一套成熟的离体培养技术方法和理论体系，并有着极其广泛的应用领域，成为生物科学中有理论、方法和应用的一门技术学科。

三、园艺植物离体培养学与园艺科学的关系

(一) 离体培养与园艺植物良种繁育学 园艺植物绝大多数良种是采用无性繁殖，以保持其优良性状的遗传稳定性和一致性。但传统的无性繁殖方法繁殖的数量少、速度慢，不能适应现代化生产要求。而离体培养繁殖的技术特点是繁殖系数大，周年生产，繁殖速度快，苗木整齐一致。例如，兰花离体繁殖，一个外植体一年可繁殖 400 万个原球茎，草莓的一个顶芽，一年可繁殖 10^8 芽。因此，离体培养方法已成为园艺植物良种繁育的一种有力手段，并带来巨大的经济效益，形成一种新的产业。

许多园艺植物由于长期采用无性繁殖,还带来相当严重的病毒,对生产造成极大损失。植物离体培养技术的发展,利用微茎尖培养可以脱除病毒,因而离体培养成为培育无病毒木的主要途径。我国科技工作者采用离体培养脱毒,已在柑桔、草莓、马铃薯和兰花等多种园艺植物上取得成功,获得无病毒苗。如马铃薯脱毒苗,先后在内蒙古、黑龙江和河北等地建立无病毒马铃薯原种场,为全国各地提供无病毒种薯,平均增产30%以上,经济效益十分明显。优质草莓脱毒苗已向全国各省市推广,在草莓生产上发挥了重要作用。

(二) 离体培养与园艺植物育种学 园艺植物群体大,种类多而复杂,遗传性多样而高度杂合。现在的育种途径主要靠传统的芽变选种或杂交育种方法,效果慢。应用离体培养技术,在细胞水平上进行突变体筛选,可以大大提高选种效果。通常在离体培养中,可以发现各种各样的变异,如植株形态、高矮,花、叶、颜色及形态变异,以及果实形态特征特性的差异等等。在愈伤组织培养中最常见到染色体畸变,而且是可遗传的变异较多。因此离体培养诱变育种潜力很大,对观赏园艺植物育种更具有重要意义。

离体培养中胚培养是最早获得成功的,以及试管受精技术对于克服远缘杂交育种障碍有重要意义。如在兰花育种中,离体胚培养取得显著效果,对于败育胚的育种也有很大的潜在利用价值。胚乳培养三倍体是无籽果实育种的新途径之一。花粉单倍体育种对提高杂交育种效率,特别是多年生无性繁殖植物的杂交育种具有特别重要意义。石刁柏超雄植株的培育是单倍体应用的突出例证。

园艺植物原生质体培养已在多种植物中获得再生植株,给园艺植物品种改良展现出一幅崭新的前景。人们可以利用原生质体融合技术把不同品种,或种属之间的体细胞融合成一体,获得体细胞杂种,克服植物有性杂交和远缘杂交的不亲和性。特别对无性繁殖的园艺植物,或不能进行有性杂交的植物更具有重要的意义,可以培育出崭新的品种。由于原生质体是不同遗传信息的良好受体,把离体培养技术与分子生物学方法结合起来,在细胞水平上进行遗传修饰,重组DNA,改良园艺植物品种。因此,离体培养方法是把植物基因中的目的基因导入园艺品种的一座桥梁,以培育出高产、优质、高效的良种,促进园艺植物品种现代化。

园艺植物种质资源保存有很多种类是采用无性系,建立田间种质资源保存圃,占用大量土地,耗费人力物力等。利用离体培养保存方法可以克服上述缺点,并方便种质资源交换,避免病虫的人为传播,这也是当前离体培养在园艺上应用研究的重要领域。

(三) 离体培养与园艺植物基础学科 植物离体培养学是多学科相互渗透的产物,它与园艺的各个基础学科关系密切。如植物学、细胞生物学、生物化学、植物生理学、植物病毒学以及微生物学等等,为植物离体培养研究提供基础知识。而植物离体培养学反过来,也为园艺植物的各个基础学科的研究提供有力的手段。应用离体培养技术,在人工控制的环境条件下,可以进一步深入地研究植物细胞的生长、分化与发育;细胞与细胞之间的生理代谢活动与生物合成;营养细胞与生殖细胞的转化等等。同时,以细胞生物学为基础,研究组织分化,器官形态建成;根、茎、叶、花、果的发育;营养生长与生殖生长的植物发育生物学。

园艺植物离体培养在园艺学的基础理论研究上占有重要的地位,并具有广泛的应用前景,对园艺科学的发展有着极其深远的影响。

总 论

第一章 离体培养的基本操作方法

植物离体培养中,由于材料的多样性及其培养目的的不同,所采用的操作方法也不一,不能一概而论,具体操作方法将分别在各个章节中叙述。本章着重介绍离体培养的基本操作方法,包括:一般的材料选取、无菌技术、培养基配制和环境条件调控等基本原则及操作方法。

第一节 外植体的选择与处理

外植体(Explant)是指植物离体培养中的各种接种材料。包括植物体的各个器官、组织、细胞和原生质体等。为了使外植体适于在离体培养条件下生长,必须对外植体进行选择与处理。包括切取外植体之前,对供试植株的预处理,接种材料的制备和灭菌等。

(一) 外植体的选择

1. 选择优良的种质 无论是离体培养繁殖种苗,或者是进行生物技术研究,离体培养的试材选择都应该从主要的园艺植物入手,选取性状优良的种质,或特殊的基因型。对试材的选择要有明确的目的,具有一定的代表性,提高成功机率,增加其实用价值。

2. 选择健壮的植株 离体培养的试材,最好从生长健壮的无病虫害的植株上,选取发育正常的器官或组织,其代谢旺盛,再生能力强,离体培养容易取得成功。

对于植株的发育阶段的选择,则不能一概而论,在一二年生的园艺植物中,离体培养差异不大。对多年生木本的果树和观赏植物来说,从成年树或幼年树上所取的外植体,培养结果截然不同。尤其是良种繁殖,应从成年树上取材,结果早,性状稳定。在细胞工程或基因工程研究中,既有利用成熟的器官,诱导愈伤组织,也有选取个体发育的早期,或胚胎发育期的外植体为试材。

3. 选择外植体的大小 建立无菌材料时,采用外植体的大小,根据不同植物材料而异。外植体太大易污染,也不需要;太小,多形成愈伤组织,甚至难于成活。一般选取外植体大小,在 0.5—1.0cm。如果是胚胎培养或脱毒的外植体,则更小。

4. 选取外植体的时期 在离体培养快速繁殖时,对选择外植体的季节显得特别重要。一般按照植物生长的最适时期取材,如番木瓜茎尖培养,冬季取材难于成活,夏季温热带取材,不仅成活率高,生长速度也快,增殖率高。有些含酚类物特多的植物,应在酚类分泌物含量低的季节,选取外植体,接种后成活率高。另一方面,也可以从种苗出圃推算苗期,增殖代数等因素,确定建立无菌材料,选取外植体的合适时期。