

园艺植物 组织培养

吕晋慧 孔冬梅 编著

中国农业科学技术出版社

园艺植物 组织培养

吕晋慧 孔冬梅 编著



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

园艺植物组织培养/吕晋慧, 孔冬梅编著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2008. 5

ISBN 978 - 7 - 80233 - 622 - 3

I. 园… II. ①吕…②孔… III. 园林植物 - 组织培养
IV. S680. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 070437 号

责任编辑 张孝安

责任校对 贾晓红 康苗苗

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) 68919708 (编辑室) (010) 68919704 (发行部)
(010) 68919703 (读者服务部)

传 真 (010) 68919709

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 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 889 mm × 1 194 mm 1/16

印 张 11. 25

字 数 280 千字

版 次 2008 年 5 月第 1 版 2008 年 5 月第 1 次印刷

定 价 28. 00 元

前 言

植物组织培养是植物生物技术的基础，也是实用性极强的高新技术。目前世界上许多重要园艺植物包括花卉、蔬菜和果树都实现了组培工厂化生产，给企业带来高额利润。如果将其运用于种质资源的保存，将大大节约生产和保存成本；将其应用于脱毒苗生产，可以大大改善植物的品质；将其与转基因技术相结合，为新品系、新品种的创造提供了一条更加经济、高效的新途径。植物组织培养在园艺植物生产中的应用已为西方工业发达国家的经济繁荣做出了重要贡献，在发展中国家其发展和应用也取得了巨大进步。目前，分子生物学家、植物育种专家和企业家都对植物组织培养产生了极大的兴趣。鉴于植物组织培养技术的不断发展及其在园艺植物生产中的日益渗透，笔者在工作、研究的基础上，总结多年的实践经验，参阅大量中外文献，编著了此书，以期能对相关方面的研究人员和相关行业的生产者提供帮助。

本书分总论和各论两部分。总论部分重点介绍园艺植物组织培养的基本理论，包括园艺植物组织培养实验室与设备、园艺植物组织培养的操作流程、脱毒苗生产、体细胞胚胎发生、细胞培养、花药和花粉培养、原生质体培养、组培苗的工厂化生产、植物基因工程等九部分内容。各论部分重点介绍了 59 种常见园艺植物的组织培养技术和 7 种园艺植物的脱毒苗生产技术。其中第一章至第六章和第十三章由孔冬梅编写，第七章至第十二章由吕晋慧编写。

由于编者水平有限，书中尚有许多不足之处，恳请各位读者批评指正。

编 者

2008 年 3 月

目 录

第1章 绪 论	(1)
1.1 植物组织培养的定义	(1)
1.2 植物组织培养发展简史	(1)
1.3 植物组织培养研究的意义	(3)
1.4 植物组织培养在园艺植物上的研究及应用进展	(4)
1.5 与植物组织培养相关的几个概念	(8)
第2章 园艺植物组织培养实验室与设备	(10)
2.1 实验室组成	(10)
2.2 基本设备配置	(13)
2.3 实验室管理	(15)
第3章 园艺植物组织培养操作流程	(17)
3.1 培养基成分及其作用	(17)
3.2 基本培养基的种类与特点	(22)
3.3 培养基的选择与制备	(24)
3.4 无菌培养的建立	(26)
3.5 完整植株的形成	(28)
3.6 移栽	(28)
第4章 园艺植物组织培养脱毒	(29)
4.1 病毒相关知识概述	(30)
4.2 植物脱毒原理与方法	(30)
4.3 植物脱毒苗的检测与保存	(34)
4.4 无毒原种苗的保存与应用	(36)
第5章 园艺植物体细胞胚发生	(39)
5.1 体细胞胚发生概述	(39)
5.2 体细胞胚的形态建成	(40)
5.3 体细胞胚发生的生物学机理	(46)
5.4 体细胞胚发生在园林上的主要应用	(50)
第6章 园艺植物细胞培养	(52)
6.1 植物单细胞培养概述	(52)
6.2 植物细胞悬浮培养	(52)
6.3 细胞固相化培养	(55)
6.4 单细胞培养	(55)
第7章 园艺植物花药和花粉培养	(60)
7.1 花药培养	(60)
7.2 花粉培养	(61)
7.3 影响花药与花粉培养的因素	(63)

7.4 单倍体植株的加倍	(66)
第8章 园艺植物原生质体培养	(67)
8.1 原生质体的分离	(67)
8.2 原生质体的收集与纯化	(70)
8.3 原生质体的培养	(72)
8.4 影响原生质体培养的因素	(73)
8.5 原生质体再生技术	(74)
8.6 原生质体融合	(75)
8.7 杂种植株的鉴定	(76)
第9章 园艺植物组培苗的工厂化生产	(78)
9.1 初代培养	(78)
9.2 不定芽的获得	(80)
9.3 增殖培养	(82)
9.4 继代培养	(82)
9.5 无菌苗的生根培养	(83)
9.6 无菌苗的移栽	(83)
9.7 影响园艺植物组织培养的因素	(84)
第10章 植物基因工程	(91)
10.1 植物受体系统的建立	(91)
10.2 外源基因的导入	(94)
10.3 转基因植物的检测技术	(97)
第11章 常见草本园艺植物组织培养技术	(98)
11.1 蝴蝶兰 (<i>Phalaenopsis</i>)	(98)
11.2 石斛兰 (<i>Dendrobium nobile</i>)	(99)
11.3 建兰 (<i>Cymbidium ensifolium</i>)	(101)
11.4 蕙兰 (<i>Cymbidium grandiflorum</i>)	(101)
11.5 杏黄兜兰 (<i>Paphiopedilum armeniacum</i>)	(102)
11.6 菊花 (<i>Chrysanthemum morifolium</i>)	(104)
11.7 紫菀 (<i>Radix asteris</i>)	(105)
11.8 球根鸢尾 (<i>Dutch iris</i>)	(106)
11.9 乌头 (<i>Aconitum carmichaeli</i>)	(107)
11.10 蚊净香草 (<i>Pelargonium graveolens</i>)	(108)
11.11 香石竹 (<i>Dianthus caryophyllus</i>)	(109)
11.12 须苞石竹 (<i>Dianthus barbatus</i>)	(110)
11.13 丝石竹 (<i>Gypsophila elegans</i>)	(110)
11.14 桔梗 (<i>Platycodon grandiflorum</i>)	(112)
11.15 红景天 (<i>Rhodiola rosea</i>)	(113)
11.16 唐松草 (<i>Thalictrum</i>)	(114)
11.17 非洲菊 (<i>Gerbera jamesonii</i>)	(115)
11.18 鹤望兰 (<i>Strelitzia reginae</i>)	(116)
11.19 桂竹香 (<i>Cheiranthus cheiri</i>)	(117)

11.20	海棠 (<i>Begonia</i>)	(118)
11.21	凤尾蕨 (<i>Pteriscretica</i>)	(119)
11.22	凤梨 (<i>Bromeliaceae</i>)	(120)
11.23	薰衣草 (<i>Lavandula pedunculata</i>)	(122)
11.24	贝母 (<i>Fritillaria</i>)	(123)
11.25	美丽竹芋 (<i>Calathea ome var. sanderiana</i>)	(123)
11.26	红脉竹芋 (<i>Maranta leuconeura var. erythroneura</i>)	(124)
11.27	大岩桐 (<i>Sinningia speciosa</i>)	(125)
11.28	马蹄莲 (<i>Zantedeschia aethiopica</i>)	(126)
11.29	大丽花 (<i>Dahalia variabilis</i>)	(128)
11.30	唐菖蒲 (<i>Gladiolus hufriedus</i>)	(128)
11.31	仙客来 (<i>Cyclamen persicum</i>)	(130)
11.32	风信子 (<i>Hyacin thorientalis</i>)	(131)
11.33	石蒜 (<i>Lycoris radiata</i>)	(132)
11.34	花毛茛 (<i>Ranunculus asiaticus</i>)	(133)
11.35	海芋 (<i>Alocasiae macrorrhiga</i>)	(134)
11.36	花叶芋 (<i>Caladiurn bicolor</i>)	(134)
11.37	喜林芋 (<i>Philodendron erubescens</i>)	(135)
11.38	非洲紫罗兰 (<i>Saintpaulia ionantha</i>)	(136)
11.39	金线莲 (<i>Anoectochilus Formosahus</i>)	(137)
11.40	绿巨人 (<i>Spathiphyllum floribundum</i>)	(138)
11.41	长生花 (<i>Sempervivum tectorum</i>)	(140)
11.42	仙人掌 (<i>Opuntia ficusindica</i>)	(140)
第12章	常见木本园艺植物组织培养技术	(142)
12.1	富贵榕 (<i>Ficuselastica Roxb. "Schryveriana"</i>)	(142)
12.2	欧洲七叶树 (<i>Aesculus hippocastanum</i>)	(142)
12.3	一品红 (<i>Euphorbia pulcherrima</i>)	(143)
12.4	叶子花 (<i>Bougainvillea glabra</i>)	(145)
12.5	月季 (<i>Rosa chinensis</i>)	(146)
12.6	金边瑞香 (<i>Daphne odora var. marginata</i>)	(147)
12.7	云南拟单性木兰 (<i>Magnoliaceae Parakmeria yunnanensis</i>)	(147)
12.8	榆叶梅 (<i>Prunus triloba</i>)	(148)
12.9	山杜英 (<i>Elaeocarpus sylvestris</i>)	(149)
12.10	球花石楠 (<i>Photinia glomerata</i>)	(150)
12.11	红蝉花 (<i>Mandevilla sanderi</i>)	(151)
12.12	长春花 (<i>Catharanthus roseus</i>)	(151)
12.13	龙血树 (<i>Dracaena fragrans</i>)	(152)
12.14	橡皮树 (<i>Ficus elastica</i>)	(153)
12.15	常春藤 (<i>Hedera nipalensis</i>)	(154)
12.16	变叶木 (<i>Codiaeum variegatum</i>)	(155)
12.17	金橘 (<i>Fortunella margarita</i>)	(156)

第 13 章 几种主要园艺植物的脱毒苗生产技术	(158)
13.1 马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	(158)
13.2 甘薯 (<i>Lpomoea batats</i>)	(159)
13.3 甘蔗 (<i>Saccharum officenarum</i>)	(159)
13.4 苹果 (<i>Malus pumila</i>)	(160)
13.5 草莓 (<i>Fragaria ananassa</i>)	(161)
13.6 柑橘 (<i>Citrus</i>)	(163)
13.7 香蕉 (<i>Musa</i> spp.)	(164)
参考文献	(166)

第1章 绪 论

1.1 植物组织培养的定义

植物组织培养 (plant tissue culture) 也称离体培养 (*in vitro* culture) 是指分离植物的器官、组织、细胞、甚至原生质体, 通过无菌操作接种于人工配制的培养基上, 在人工控制的条件下培养, 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。无菌条件、离体的植物材料 (外植体)、人工培养基与培养环境是组织培养的基本特点。

根据培养材料的不同, 植物组织培养可分为植株培养、胚胎培养、器官培养、组织或愈伤组织培养、细胞或原生质体培养 5 类, 根据培养目的分为试管嫁接、试管受精、试管加倍、试管育种等, 根据培养方法又有平板培养、微室培养、悬浮培养、单细胞培养等 (沈海龙, 2005)。

1.2 植物组织培养发展简史

1.2.1 理论准备时期

植物组织培养的起源可以追溯到 19 世纪 30 年代。早在 1838 年和 1839 年, 德国植物学家 Schleiden 和动物学家 Schwann 就分别提出了细胞学说, 其核心内容是: 细胞是有机体, 也是生物体的基本机构单位, 由它构成整个生物个体。同时, 植物细胞又是在生理和发育上具有潜在全能性 (totipotent) 的功能单位。随后, Schwan 在 1839 年更明确地指出: “如果具有与有机体内一样的条件时, 每个细胞应该可以独立生活和发展。”这一论点是植物组织培养研究的思想基础。

在此基础上, 德国著名植物学家 Haberlandt 于 1902 年提出, 高等植物的组织和器官可以不断分割, 直到单个细胞, 单个细胞还能形成一个完整的新个体。如植物的体细胞, 在适当的条件下, 具有不断分裂和繁殖, 并发展成完整植株的潜在能力, 这被称为植物细胞全能性理论。为了验证自己的观点, 他曾对高等植物的气孔保卫细胞、叶肉细胞、髓细胞等植物材料进行无菌培养。但是, 由于当时对这些植物的化学成分、材料的性质、离体培养所需的各种条件研究甚少, 离体培养中始终没有发生细胞的分裂和增殖。尽管如此, 由他开创的理论假说引导许多学者不懈探索。直到 20 世纪 60 年代中期, 他所作出的种种预言, 在胡萝卜体细胞胚发生等一系列成功的实验中先后得到验证 (沈海龙, 2005)。

细胞学说的产生和细胞全能性学说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, 促进了植物组织培养技术的建立。

1904 年, Hanning 在添加无机盐和有机物的培养基上对萝卜和辣根菜的幼胚进行培养, 发现离体胚可以充分发育至成熟并且能提前形成小苗, 这是世界上首次胚培养获得成功的例子。此后, Brow 于 1906 年在人工合成培养基上进行无菌外植体的培养, 发现各种胚在培养基上有增殖生长的反应。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, Haberlandt 的学生 Kotte 和美国的 Robbins 分别报道了根尖离体培养并获得成功, 其中 Kotte 用稀释的 Knop 溶液加入相当复杂的有机物质, 培养豌豆和玉米的根尖, 获得成功。

同年, Robbins 把玉米、棉花等植物的茎尖放在由多种无机元素和糖合成的人工培养基上培养, 形成了缺绿的叶和根。1925 年, laibach 对亚麻的种间杂种胚进行了培养, 成功地获得杂种植株, 从而证明了利用胚培养进行植物远缘杂交的可能性。1926 年, Harlan 报道了有关大麦幼胚的培养。1933 年, 我国学者李继侗等在进行银杏的离体培养时, 证明了大小约 3mm 的幼胚能正常生长。这一发现对植物组织培养的发展和利用植物自身的提取物促进培养物的生长具有重要的意义。

在这一时期, 主要对植物胚和根的培养进行了初步探索, 尽管失败多、成功少, 但已有一些植物的幼胚培养获得了成功, 离体器官的培养也有了一定的发展。

1.2.2 理论与技术发展时期

从 20 世纪 30 年代初至 50 年代末, 植物组织培养技术得到了逐步发展和完善。在这期间, 两个重要模式——培养基模式和激素调控模式的建立 (谢从华等, 2004), 使植物组织培养技术具有了一定的程序性。

1934 年, 美国的 White 通过对番茄离体根的培养, 形成了第一个可以正常生长的无性系, 从而使非胚器官的培养首先获得了成功。White 在实验中还发现, B 族维生素 (硫胺素、吡哆醇、烟酸) 在离体培养中具有及其重要的作用, 从而产生了由无机盐与有机成分组成的 White 培养基, 并且建立了植物根的离体培养技术。1937 年, 法国 Gautheret 在培养山毛柳和黑杨等形成层的培养基中加入 B 族维生素和 IAA (吲哚乙酸), 使生长大大加快。1939 年, 他在添加这些物质的培养基上连续培养胡萝卜根的形成层首次获得成功。法国的 Nobecourt 在 1938 年用胡萝卜的根在固体培养基上培养诱导形成了愈伤组织。

由于上述著名的科学研究, White、Gautheret 和 Nobecourt 一起被誉为植物组织培养的奠基人。他们的贡献在于: 建立了包含无机盐、有机物和生长调节物质的综合培养基, 发现了 B 族维生素在植物组织培养中的作用, 基本建立了植物组织培养技术。我们现在所用的若干培养方法和培养基, 基本上是这 3 位科学家所建立的方法和培养基的演变。

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效果。1948 年, Skoog 和 Tsuihui (崔徽) 对烟草髓部和茎段进行培养, 观察到腺苷或腺嘌呤可以解除 IAA 对芽形成的抑制作用, 使烟草茎段形成丛生芽。1957 年, Skoog 等又发现腺嘌呤与生长素的比例较低时有利于根的形成, 当这一比例较高时则有利于芽的发生, 由此发现了腺嘌呤与生长素的比例是控制芽和根分化的重要因素之一。这一发现为植物组织培养的形态发生和人为控制提供了调控模式, 结合激动素的发现, 也建立了用激动素与生长素的比例控制芽和根分化的模式。

伴随培养基模式和激素调控模式的建立, 细胞悬浮培养、看护培养、微室培养、悬滴培养、平板培养技术等相继建立, 有关器官形成和个体发生的研究迅速发展, 植物离体培养的基本技术方法已经成熟。

到 20 世纪 50 年代末期, 几位科学家几乎同时在胡萝卜愈伤组织培养中诱导出了体细胞胚, 至此植物组织培养的技术体系已基本建立。但在这一时期, 植物组织培养技术还只是停留在试验研究阶段, 并没有直接用于生产。

1.2.3 蓬勃发展和应用时期

从 20 世纪 60 年代开始, 随着植物组织培养技术的不断完善, 以及对离体培养中细胞的生长、分化规律的逐步认识, 有关学者在植物组织培养的研究中都具有较明确的目标, 并尝试把植

物组织培养技术应用于生产实践。

1952年, Morel 和 Martin 首次证实, 通过茎尖分生组织的离体培养, 可以由已受病毒侵染的大丽花中获得无病毒植株。1960年, Morel 提出并建立了第一个离体无性繁殖兰花的方法, 其后国际上相继建立了“兰花工业 (orchidindustry)”。现在, Morel 建立的脱毒技术和离体繁殖技术已广泛用于甘蔗、草莓、马铃薯等多种作物无毒苗的生产。

1960年, 英国学者 Cocking 等首次成功地用真菌的纤维素酶分离了番茄幼根原生质体。1971年, Takek 等人在烟草叶肉原生质体培养中获得了再生植株, 并建立了适于烟草原生质体培养的 NT 培养基。1972年, Carlson 以 NaNO_3 融合剂, 对 2 个种的烟草 (粉兰烟草和郎氏烟草) 原生质体进行了融合培养, 并获得了第 1 个体细胞杂交的杂种植株, 开创了植物原生质体培养和体细胞杂交的工作。1974年, Bonne 和 Eriksson 将具有叶绿体的海藻和不具有叶绿体的胡萝卜根原生质体, 在聚乙二醇诱导下融合成功, 发现活胡萝卜原生质体中含有叶绿体, 成功地完成了细胞器 (叶绿体) 的摄入, 证明原生质体是引入外源遗传物质的极好受体材料, 为基因工程奠定了良好基础。

1964年, Guha 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, 继曼陀罗花药培养获得单倍体植株后, Bourgin 等人于 1967 年又从烟草花药培养中获得单倍体植株, 从此开创了利用花粉培育单倍体植株的新途径, 加快了育种进程, 取得了一批有实用价值的育种材料。我国学者首先完成了水稻、小麦等 20 多种植物的花粉培养, 使我国在这一领域处于世界领先地位。

随着植物组织培养技术的发展及逐渐成熟, 花药培养、花粉培养、原生质体培养和细胞融合等方面的研究也逐步展开。以烟草为模式植物的相关研究取得了突破性进展, 并很快将这一技术推广应用到果树、花卉、蔬菜等经济作物的快速繁殖和脱毒等方面, 甚至开始了产业化生产。

在此基础上, 细胞培养技术由于具有广泛的应用前景而得到了迅速的发展。由于从细胞悬浮培养和单细胞培养中筛选突变体比组织培养具有更大的优越性, 因此, 在进行突变体筛选时通常采用的是细胞培养技术。将细胞培养与人工诱变相结合的方法应用于突变体筛选, 已在多种作物中选育出具有抗病、抗虫、抗除草剂、耐盐、矮秆、高蛋白等优良特性的新品种。利用大规模细胞培养技术生产植物次生代谢产物的研究也取得了成功, 这进一步拓宽了细胞培养的研究领域, 并使工厂化生产植物天然产物的设想变成了现实。以细胞大规模培养技术为依托的新型轻化工、医药产业蓬勃发展。

将植物的组织、细胞和原生质体培养技术与重组 DNA 技术相结合而产生的植物遗传转化, 逐渐成为植物生物工程的重要内容, 并在许多植物中获得成功, 为植物的遗传育种开辟了崭新的途径和广阔前景。

1.3 植物组织培养研究的意义

植物组织培养是现代生物技术的一个重要部分, 是植物生物技术最根本的基础。植物组织培养技术渗透到与生命科学各领域, 其发展有力地推动了生命科学各个领域的发展。

(1) 植物的形态发生 植物细胞培养技术的理论研究和品种改良的实际应用依赖于长期培养细胞或原生质体的再生能力, 植物的遗传工程和转基因植株的鉴定亦依赖于转化细胞再生植株的能力, 原生质体培养和细胞融合の利用同样依赖于杂种细胞再生植株的频率, 无性系变异与突变体筛选也是当培养物有效地再生时才成为可能。因此, 离体培养细胞形态发生 (morphogenesis) 的研究是首要而关键的问题。

(2) 植物发育生物学 在离体条件下进行细胞和组织培养,可以进一步探索植物细胞的生长、分化与发育规律,营养生长与生殖生长的转化等;研究植物外植体的发育规律,搞清外植体发育的年龄效应、位置效应与启动培养、分化能力的关系,细胞培养时间及培养周期与再生能力的关系;从形态发生规律中,探明个体发育、细胞分化和脱分化的条件。

(3) 植物生理学 利用组织培养可以研究植物生长中各种内外因子之间的相互关系,及其对植物生长的影响,如不同发育阶段外植体的内源激素水平与培养基中生长调节物质的关系,外植体的大小及营养状态对培养结果的影响;培养基营养成分与培养效果的关系;光照强度、光周期、温度、湿度和气体成分如何影响离体材料的生长等。植物组织培养的细胞在生理上不同于完整植株的细胞,可在离体状态下研究细胞的生理代谢活动与生物合成等情况。

(4) 植物生殖生物学 离体条件下进行胚培养,有助于探明胚胎发生条件,胚乳作用,助细胞、反足细胞的作用;组织培养中诱导体细胞胚胎发生,可为离体条件下研究植物胚胎的发生发育提供操作性强的实验体系,有助于探明植物胚胎发生的形态学、生理和生化过程。

(5) 植物细胞学 植物组织培养技术是研究细胞分化、脱分化、再分化的良好系统,离体条件下培养单细胞,一方面避免了植株整体对细胞的影响,另一方面由于受到的外界刺激均匀一致,因而能较好地反映外界环境与细胞的关系;利用细胞悬浮培养体系,可以实现细胞规模化繁殖,一方面实现苗木快速繁殖,另一方面可以进行次生代谢物生产。

(6) 遗传学 植物组织培养可用于研究染色体数量变异和结构变异、染色体工程等。由于生长环境不同,离体培养的细胞或组织(尤其是单细胞),在植物生长调节物质或其他诱变因子作用下发生的染色体变异,与自然条件下生长的完整植株所发生的变异会有很大区别。

(7) 育种学 植物组织培养为新种和新品种的培育开辟了新途径。单倍体培养可缩短育种周期;利用试管受精和原生质体融合技术可克服远缘杂交不亲和性,创造自然界新物种;通过DNA微注射引入花粉、胚、胚乳和培养的细胞,也是育种学研究的一个热点。

(8) 病理学 组织培养系统可用来研究寄主与病原体之间的相互作用和影响;研究冠瘿瘤的形成、病毒分类及在植物体内的分布、脱除病毒的方法以及病毒快速检测方法等。

(9) 基因工程 植物基因工程在园林生产中有广泛应用前景和巨大经济价值。离体培养条件下的茎尖分生组织、愈伤组织、体细胞胚、单细胞以及脱除细胞壁的原生质体等都是基因工程中遗传转化的良好受体。将外来的遗传信息(基因),通过一定的基因载体(Ti或Ri)引入上述各种类型的细胞,然后利用植物组织培养技术,即可从转化的细胞获得转基因的完整植株。由此可见,基因工程只有与植物组织培养紧密结合,才能使生物技术取得突破性进展。

1.4 植物组织培养在园艺植物上的研究及应用进展

1.4.1 植物快繁

用组织培养法繁殖植物的突出特点就是速度快、周期短,往往十几天到几十天即可完成一个培养周期,每一培养周期植物材料可按几何级数大量繁殖,利于工厂化大批量生产。尤其对一些繁殖系数低且种子繁殖困难的名特优植物品种而言,植物组织培养的意义尤为重大。1978年,Murashige在第4届国际植物组织和细胞培养会议上报告用组织培养进行快速繁殖的植物达255种。罗士韦1982年在第5届国际植物组织和细胞培养会议上所作的专题学术报告中统计,无性系快速繁殖植物的种类已达500种以上。Brown等1986年统计进行快繁研究的植物已超过1000种。目前进行无性快繁研究的植物种类仍在不断增加。植物组织培养方法用于无性繁殖已

成为农林园艺中应用广泛的技术之一。

植物离体快速无性繁殖是植物组织培养技术应用最广泛的一个方面。自20世纪60年代建立了世界第一家兰花组培苗工厂后,国内外相继建立了兰花工业,目前世界上80%~85%的兰花是通过组织培养进行快繁的。在兰花工业的带动和刺激下,花卉组培苗产业化生产发展很快,尤其是进入20世纪80年代以来,能用试管繁殖的花卉近200种,通过组培能再生的植物种类已有130科1500种以上,世界各国看准花卉组培苗市场,竞相投资,展开激烈角逐。据资料估计,美国已建立起200多个植物离体繁殖公司,中小公司的年均生产能力为200万~400万株;英国有100多家生物工程研究机构,其中都有组培工作的开展;日本把组培技术纳入国家三大全新产业之一;以色列的Benzur苗圃可提供100多种盆栽观赏植物组培苗;花卉王国荷兰有80%以上花卉种苗是通过组培繁育的。总之,世界工业化生产的观赏花卉种类有60余科、近千种,组培苗的生产量从1985年的1.3亿株猛增到2002年的10.0亿株。

在发达国家建立的组织培养实验室较多,多数从事商业化生产,主要繁殖观赏花卉如兰花、鲜切花等,其次是果树、观赏树木,造林树种较少。发达国家的实验室数量有减少的趋势,但生产规模却不断扩大,繁殖苗木数量有所增多,试管植物在商业化植物中所占比例也有增大的趋势。发展中国家大部分从事与育种和生理有关的研究,少数实验室进行果树和农作物的繁殖,如香蕉、马铃薯、甘蔗等,该技术在发展中国家被视为农业发展的高新技术,并将得到快速发展和应用。

我国近20年来开展植物快速繁殖的研究也有很大发展。全国各地的农业、林业科研机构、大专院校以及大型的生物技术公司都设有组培室,部分省(市)或地区在园艺植物组培苗产业化方面已成规模:广州花卉研究中心工厂化生产观叶植物组培苗产量在1000万株以上;云南农科院园艺所花卉研究中心的组培室年生产能力达5000万株;云南玉溪高新技术开发区实现了热带兰花组培苗规模化生产;湖南省森林植物园生物技术中心已实现专业化、规模化、商品化生产桉树试管苗,年生产能力数百万株,在国内率先探索出桉树试管苗产业化开发之路。全国已建成葡萄、苹果、香蕉、马铃薯、甘蔗、兰花、桉树等快繁生产线10余条,年供应试管苗上亿株,其中生产的香蕉试管苗已进入国际市场。在快速繁殖珍稀、濒危植物方面,我国也取得了大的突破,如安徽黄里从仅有的几株软子石榴繁殖到2万株,樱桃珍品中的太和樱桃用成年树的芽离体培养成苗,用快繁技术保存棉花的野生种等,使珍贵物种得以保存。

快速繁殖可用于常年的无性系繁殖,尤其对那些常规方法繁殖困难的物种、新品种、珍贵稀有种或品种等的快繁具有重要意义。

1.4.2 脱毒

用于无性繁殖的供体植株一般会感染一种或几种病毒或类病毒。在许多情况下植物感染病毒后症状并不明显,但生长缓慢、商品性状劣化、产量大幅度下降,给园艺作物生产带来巨大损失。植物病毒已成为引起植物种或品种退化的主要因素。利用组织培养技术为植物脱除病毒却可以使植物的生长得到明显改善。早在20世纪80年代,人们就已经广泛采用了茎尖脱毒的方法。到1989年,应用茎尖脱毒获得无病毒种苗的植物达48种,被除去的病毒有77种。茎尖培养之所以能够脱毒是因为所用的外植体是茎尖或顶端分生组织,由于病毒在植物体内的分布是不均匀的,在受侵染的植株中茎尖或顶端分生组织一般无病毒或者只携带极少的病毒。

无菌条件下仔细地剥离微茎尖,然后按照组织培养的一般程序在适当培养基上进行离体培养,就可以由无病毒的茎尖再生出无病毒的植株。利用植物茎尖对植物进行脱毒和扩繁的同时,除去了真菌、细菌和线虫等寄生物,无病毒苗产量大幅度增加,最高可增产300%,平均增产也在30%以上。同时无病毒种苗减少了检疫手续,有利于国际间的交流。

在发达国家利用植物组织培养技术已经实现了植物脱毒和无毒化育苗,栽培花卉和果树基本上已脱除病毒,使花卉、果树的质量和产量大幅提高,据 Sikan 等报道,增产幅度为 23.8% ~ 128.1%,产生了显著的经济效益。国际热带农业研究中心(IEA)、国际马铃薯研究中心(CIP)和亚洲蔬菜研究中心(AY-RDC)均以生产无病毒种苗为中心课题。发展中国家对植物的病毒病才刚刚开始重视,部分植物实现了茎尖脱毒处理和无毒化育苗,但大多数花卉和果树的脱毒研究处于起步阶段,有待进一步研究。

1.4.3 培育新品种

植物组织培养技术在培育与筛选园艺植物新品种或新种质上的应用主要有以下几个方面:

1.4.3.1 单倍体育种

利用花药培养诱导花粉产生单倍体植株,单倍体经人工染色体加倍后可以形成同源二倍体的纯合体,其后代不会分离,这样可以快速纯化物种,对利用异交作物杂种优势迅速获得纯系十分有利。自从 Cuha 和 Maheshwari 首次通过植物花药培养出花粉植株以来,目前世界上已有 260 多种植物成功地获得了花粉植株。此后,各国科学家致力于花药培养,使其成为诱导单倍体植株的重要手段。据 Maheshwad 等 1983 年统计,已有 34 科 88 属 247 种植物的花药培养获得成功。单倍体育种是常规育种程序和方法的重大改革,为新品种的培育开辟了一条新途径。

我国自 20 世纪 70 年代开始进行该领域的研究,已经培育了 40 多种由花粉或花药发育成的单倍体植株,其中有 10 余种为我国首创。如“京花 1 号”小麦、“中花 1 号”水稻品种的种植面积均已达百万亩以上,还有具有抗稻瘟病和抗白叶枯病特性的水稻“单 209”与水稻“单 209 矮”、甜椒新品种“海花 3 号”等(沈海龙, 2005)。玉米获得了 100 多个纯合的自交系;橡胶获得了二倍体和三倍体植株。在观赏植物方面,褚云霞等多年对大百合“Pollyanna”进行花药培养所获得的花粉植株中,既有单倍体植株,也有二倍体植株。

以花药为外植体,无论花粉为纯合体还是杂合体,经加倍后均能得到纯化,比常规杂交育种可加快 2 ~ 3 年。由于单倍体是简单的基因组,可显示隐性基因及增益的特性,诱发的突变易于发现,单倍体染色体加倍立即成为纯合的植株,同时还具有育种周期短、程序简单、选择效率高等优点,因此在作物育种中具有很大的应用价值。

1.4.3.2 突变体育种

栽培中出现的芽变种、杂交新品种等,对其进行离体培养,可迅速繁殖出一定规模的有价值的新品系或新品种。如花大、叶厚的四倍体花叶芋、金色兼绿色斑点的玉簪、紫色的菊花、有香味的天竺葵品种“天鹅绒玫瑰”等(沈海龙, 2005)。

将物理的、化学的诱变方法应用于组织培养也可培育出新品种,如用秋水仙素处理可获得花期提前、花径增大的多倍体百合。在突变体育种上已形成了一套包括诱变剂的利用、诱变手段、分离筛选技术等在内的较为完善的诱变体系。荷兰正是利用植物组织培养技术不断开发新的品种或品系,使其郁金香生产一直处于国际领先地位。在荷兰最大的花卉公司——SBW 花卉种苗公司,每年都有 1 200 多种新的园艺植物品种问世。利用植物组织培养技术进行玫瑰商业化育种已成为玫瑰新品种培育的主要途径。

利用植物组织培养过程可以产生体细胞变异这一特性,不仅可以诱导新的变异,缩短品种改良周期,而且还可以进行抗性育种,目前利用该方法已成功筛选出具有抗病、抗虫、抗盐、抗高温、抗寒、高蛋白、高产等特性的植物细胞突变体,部分已应用于生产中。如抗盐、抗干旱的番茄品种,抗病的橡胶、草莓、芹菜、玫瑰、桃等抗病良种。利用这一技术,我国也获得了不少具有抗性的突变体,如烟草抗高盐(1% ~ 2% NaCl)、高色氨酸等突变体;胡萝卜高色氨酸突变体;

辣椒抗盐(1%~2% NaCl)、抗低温突变体等(沈海龙, 2005)。由于体细胞无性系变异的范围较广, 单基因或少数基因变异较多, 植株形态或经济性状发生不少可遗传的变异, 适合于对现有品种进行有限的修饰与改良。

1.4.3.3 通过胚拯救克服远缘杂交不亲和性

远缘杂交可以获得品种间杂交难以得到的变异类型, 如通过栽培种和野生种间的杂交, 可以从杂交后代中筛选获得抗逆性强的种或品种。但由于生理上和遗传上的障碍, 远缘杂交往往难以成功。在远缘杂交中, 杂交后形成的胚珠往往在未成熟时就停止生长, 不能形成有生活力的种子, 因而杂交不孕给远缘杂交造成极大困难。通过组织培养, 对未成熟胚进行拯救, 即对子房、胚珠和胚培养等进行离体培养, 使其发育成完整的植株, 从而克服受精后的不亲和性障碍。19世纪20年代末, Laibach 利用胚培养技术培养亚麻种间杂种胚, 首次获得了杂种植物, 为克服远缘杂交不亲和性提供了范例。该项技术现已相当成熟, 成熟或未成熟胚通过培养都可获得成功。该技术在梅花、兰花、百合、油菜、瓜类、葡萄、欧李等多种园艺植物上应用, 已获得了有较大经济价值的杂交种或品种。近年来更侧重于培养较小的胚与微小的胚胎细胞, 可将5个细胞大小的极幼龄胚状结构培养成植株。采用试管受精克服远缘杂交不亲和性, 即将母本胚珠离体培养, 使异种花粉在胚珠上萌发受精, 为诱导3倍体植物开辟了一条新途径。3倍体加倍后得到6倍体, 可育成多倍体品种。最近, 由山东农业大学发明的“利用远缘杂交创造核果类果树新种质的三级放大法”将物理手段、有性杂交、组织培养及分子生物学技术有机结合在一起, 也创造了一批果树新种质。

1.4.3.4 原生质体培养

原生质体培养就是以去除细胞壁、裸露、有生活力的原生质团为外植体所进行的离体培养。其主要目的是实现远缘物种的体细胞杂交和外源染色体、DNA 或细胞器的导入, 对植物进行改良。原生质体培养在植物育种中应用最多且期望值最高的是原生质体融合, 即体细胞杂交。较有性杂交而言, 体细胞杂交可以克服杂交不亲和性障碍, 使得杂交范围扩大, 而且将融合双方的核基因组以及质基因组进行重组。因此, 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, 从而创造新种质或培育优良品种; 此外原生质体可作为良好的受体, 用于外源基因的导入。

自 Cocking (1960) 用纤维素酶和果胶酶获得番茄原生质体并再生出细胞壁, 进一步分化获得具芽、根的完整植株后, 已有250多种植物通过原生质体培养获得再生植株, 其中我国首次培养成功30多种, 主要包括小白菜、矮牵牛、金鱼草、百合、石刁柏、莲花掌等。Carlson 等(1972)用聚乙二醇(PEG)为诱导剂, 使郎氏烟草和粉蓝烟草的原生质体发生融合, 得到第一个种间杂种。迄今为止, 细胞融合技术已在许多植物上获得成功, 园艺植物上成功的有柑橘不同种、品种间细胞融合, 马铃薯不同种、品种间细胞融合, 矮牵牛和面龙花、百合和延龄草的原生质体融合等(沈海龙, 2005)。

1.4.4 种质资源保存

长期以来, 人们想了许多方法来保存植物, 如利用常温、低温、变温、低氧、充惰性气体等来储存果实、种子、块根、块茎、种球、鳞茎。这些方法在一定程度上收到了较好的效果, 但仍存在许多问题。主要问题是成本过高, 占据空间偏大, 保存时间过短, 而且容易受环境条件的限制。随着社会的发展, 环境的不断变化使许多植物种类面临着灭绝的危险, 如何长期稳定地保存这些资源, 挽救这些植物, 成为人们必须面对的问题。植物组织培养技术的诞生和发展, 使在有限的空间里和简单的维护条件下, 长期稳定地保存植物的种质资源成为可能。

用植物组织培养结合超低温保存技术,可以在有限空间保存大量的种质资源,如结合 -193°C 的液氮低温保存,则可延长种质资源保存时间,从而减少了频繁接种造成的人力、物力投入等成本。据统计,1个 0.28m^3 的普通冰箱可存放2 000支试管,而容纳相同数量的苹果植株则需要 $60\,000\text{m}^2$ 土地。

1975年Nag和Street首次成功地用超低温保存胡萝卜悬浮培养细胞以来,已对包括花卉、果树、蔬菜在内的百余种植物材料进行了超低温保存的研究,并开发了快速冷冻法、缓慢降温法、分步降温法、干燥冷冻法等多种降温冷冻保存法。近年来又发展了方法简单而快速的玻璃化冷冻保存法,可以克服以前各种方法操作繁琐以及程序降温设备昂贵而难以推广的缺陷。保存的植物材料包括茎尖、芽、胚状体、幼胚、花粉、悬浮培养细胞、原生质体等。陈维伦等已将200多个种和品种保存2年以上。其优点是:①在较小空间内便可保存大量克隆的植物资源,即所谓“营养体种子”(vegetative seeds);②具有很高的繁殖系;③避免外界不利气候及其他栽培因素的影响;④在隔离昆虫、病原体和病毒的条件保存;⑤由于不带有已知病毒和病原体,有利于国际间物种种质的交换与交流。

1.4.5 人工种子研究

植物组织培养过程中能够产生与正常合子胚相似的结构,即胚状体(embroid),也称体细胞胚(somatic embryo)。将胚状体包裹在含有养分和具有保护功能的胶囊(人工胚乳)中,并在适宜条件下能够发芽出苗的颗粒体称为植物人工种子(plant artificial seeds)。广义的人工种子还包括用胶囊包裹的顶芽、腋芽、小鳞茎等各种营养繁殖体。

人工种子是20世纪80年代初在植物快速繁殖的基础上发展起来的一项新技术,它在推广良种与无性系品种、固定杂种优势、脱毒、简化育种程序等方面具有积极的作用。自Murashige1977年在国际园艺植物学会议上首次提出研制人工种子的设想以来,人工种子引起各国的重视。我国罗士韦教授于1984年最早介绍了人工种子,1987年开始我国将人工种子纳入国家高技术发展计划(“863”计划)。十多年来,国内外对胡萝卜、苜蓿、莴苣、芹菜、根芹、小麦、大麦、水稻、柑橘、葡萄、黄连、西洋参、松树、云杉、杨树、橡胶树、百合、红鹤芋、花叶芋等30余种植物进行了人工种子的研究。在美国,芹菜、苜蓿、花椰菜等人工种子已投入生产并打入市场。人工种子研究虽然刚刚起步,但已给农林园艺各行业展示了诱人的前景。

就目前研究情况来看,某些对控制体细胞变异要求不十分严格的种子以及花卉、蔬菜、林木的杂交种,可能比禾本科粮食作物更容易利用人工种子技术。包裹芽或小鳞茎等营养体与扦插繁殖相类似,若能在有菌条件下直接萌发成苗,会有更大的应用价值。人工种子与设施农业、无土栽培技术相结合,将大大推动人工种子的早日应用。

1.5 与植物组织培养相关的几个概念

1.5.1 植物细胞的全能性

植物细胞全能性(totipotency)是指植物体的每个细胞都含有该植物全部的遗传信息,在合适的条件下,具有形成完整植株的能力。

细胞全能性的定义主要有下面3个含义:

- (1) 植物细胞无论是体细胞还是生殖细胞均具有该物种的全套遗传信息。
- (2) 只有在适宜的条件下,植物细胞才具有发育成完整植株的能力。

(3) 植物每个细胞均具有发育成完整植株的能力。

从理论上讲,只要是一个生活的细胞,都有再生出一个完整植株的潜力,但实际情况并非如此简单。比如,在自然状态下,由于细胞在植物体内所处位置及生理条件的不同,它的分化受到各方面的调控,致使其所具有的遗传信息不能全部表达出来,所以只能形成某种特化细胞,构成植物体的一种组织或一个器官的一部分。由此可以说明条件是十分重要的,或者说是关键的,只有在合适的条件下,细胞潜在的遗传能力才会表现出来。植物组织和细胞培养技术就是以细胞全能性作为理论依据,用人为的方法创造出一个适合于生长的理想条件,使细胞的全能性得以发挥。

1.5.2 细胞分化、脱分化与再分化

细胞分化(differentiation),是指由于细胞的分工而导致的细胞结构和功能的改变或发育方式改变的过程,即细胞功能特化的过程。在植物个体发育过程中,细胞分化是“前导”,细胞的分化导致形态的发生,从而形成不同器官,不同器官又执行着不同功能。分化主要是由细胞内的基因决定的,也就是说分化是基因在时间和空间两个方面顺次表达的结果。

高等植物中,细胞分化的结果是形成具有根端和茎端的胚胎(种子),根端和茎端分生细胞不断分裂和分化导致种子萌发,接着经过一系列的形态发生过程,建成具有不同功能的器官(根、茎、叶、花、果、种子),最后完成植物个体发育周期。

细胞脱分化(dedifferentiation),是指一个成熟细胞回复到分生状态或胚性细胞状态的现象,即失去已分化细胞的典型特征。

在正常的自然状态下,已经分化的细胞不会再恢复分裂能力重新开始细胞分裂,直到植物体死亡为止。而植物组织培养中,一个已分化的、功能专一的细胞要表现它的全能性,首先要经过一个脱分化的过程,改变细胞原来的结构、功能而回复到无结构的分生组织状态或胚性细胞,然后细胞再分化,经过形态建成,最后产生完整的植株。

细胞再分化(ridifferentiation),是脱分化的分生细胞重新恢复细胞分化能力,沿着正常的发育途径,形成具有特定结构和功能的细胞。

细胞再分化通过两种途径实现,一种是胚胎发生;另一种是直接分化器官,再形成植株。大多数培养物是从器官发生的途径再生植株的,即脱分化的细胞在适当的条件下分化出不同的细胞、组织,直至形成完整的植株。

一个已分化细胞要表达出其全能性,就要经过脱分化和再分化的过程,这就是植物组织和细胞培养所要达到的目的。设计培养基和创造合适培养条件的主要原则就是如何促使植物组织和细胞完成脱分化和再分化,培养的主要工作就是设计和筛选培养基,探讨和建立合适的培养条件。

1.5.3 形态建成

形态建成(morphogenesis),又称形态发生,就是生物个体发育或再生过程中,机体及其器官形态结构的形成过程。植物组织或细胞离体培养中的形态发生由器官发生或体细胞胚胎发生这两种途径形成再生植株。