

ZHIWUZHUSHIPEIYANGDAOLUN

植物组织 培养导论

安利佳 姜长阳



辽宁师范大学出版社

植物组织培养导论

安利佳 姜长阳

辽宁师范大学出版社

(辽)新登字 18 号

植物组织培养导论

安利佳 姜长阳

出版发行: 辽宁师范大学出版社	社址: 大连市黄河路 850 号
电话: (0411)4206854	邮编: 116029
经销: 新华书店	印刷: 大连海事大学出版社印刷厂
责任编辑: 汪 洋	责任校对: 姜 利
开本: 850×1168 1/32	字数: 220 千
印张: 8.875	印数: 1000 册
版次: 1996 年 3 月第 1 版	印次: 1996 年 3 月第 1 次印刷

ISBN 7-81042-123-9/S·6

定价: 9.80 元

目 录

第一章 绪论	(1)
一、植物组织培养研究的历史发展	(1)
二、植物组织培养的理论 and 实践意义	(5)
第二章 植物组织培养的基本条件	(9)
一、常用玻璃器皿	(9)
二、常规设备	(13)
三、操作用具	(19)
四、其它辅助用具	(20)
五、植物组织培养室的设计	(21)
第三章 培养基	(23)
一、培养基成分	(24)
二、常用的基本培养基及特点	(30)
三、培养基的选择及改进	(34)
四、培养基的配制	(36)
第四章 基本操作技术	(43)
一、材料的选择	(43)
二、材料的灭菌	(46)
三、接种技术	(52)
第五章 愈伤组织的诱导与分化	(54)
一、愈伤组织的诱导	(55)
二、愈伤组织的继代培养	(59)
三、诱导期启动细胞的变化	(61)
四、愈伤组织中的组织类型及发生规律	(62)
五、器官的发生	(68)

第六章 胚状体的发生和人工种子	(73)
一、胚状体	(74)
二、人工种子	(93)
第七章 快速繁殖技术	(101)
一、外植体的选择	(102)
二、外植体的预处理	(104)
三、植物快速繁殖的途径及影响因素	(105)
四、快速繁殖中的继代培养	(113)
五、生根培养	(113)
六、试管苗的储藏	(117)
七、种苗工厂化生产的条件	(118)
第八章 脱病毒技术	(120)
一、病毒的侵染途径	(121)
二、脱病毒的原理及方法	(122)
三、脱病毒培养与快速繁殖培养的关系	(124)
四、脱病毒苗的检测	(125)
五、病毒种类对脱病毒效果的影响	(127)
六、脱病毒苗的繁育和管理	(128)
第九章 试管苗的栽培和田间管理	(130)
一、试管苗的移栽	(130)
二、试管苗的扦插	(145)
三、试管苗的嫁接	(148)
第十章 几种果树快速繁殖的研究	(155)
一、苹果茎尖培养及移栽技术	(155)
二、樱桃试管苗扦插技术	(162)
三、葡萄试管苗嫁接技术	(165)
第十一章 细胞培养	(169)
一、细胞的分离	(169)

二、细胞的培养	(171)
三、影响细胞悬浮系建立的几种因素	(173)
四、培养细胞的形态特征与分裂分化能力	(177)
五、影响细胞培养的因素	(178)
六、细胞培养技术的应用	(179)
第十二章 原生质体培养	(184)
一、原生质体培养的基本条件	(186)
二、原生质体的分离与培养	(194)
三、原生质体早期培养中的形态结构和生理变化	(202)
第十三章 植物体细胞无性系变异及产生机理	(213)
一、染色体变异	(213)
二、基因突变	(235)
三、生理适应与外遗传变异	(242)
第十四章 植物遗传转化	(245)
一、遗传转化的产生和发展	(245)
二、农杆菌介导的遗传转化	(248)
三、基因直接导入法	(251)
四、基因枪转化法	(254)
五、花粉管通道和子房注射法	(264)
六、转基因植株的证明	(266)
主要参考文献	(267)

第一章 绪论

植物组织培养通常具有狭义的和广义的两个方面含义。狭义的植物组织培养主要是指植物愈伤组织的无菌培养技术。广义上的植物组织培养则是指在人为的控制条件下,把植物体的器官、组织、细胞或原生质体放在无菌的容器中,供给它们充足的营养物质,置于适宜的环境中,使它们得以生存和生长的一种培养方法。

植物组织培养产生于一百多年以前,在以后的发展中特别是近二十年来,由于不断与细胞学、遗传学、分子生物学等学科交叉结合,逐渐形成了一个独立的学科,并日益显示出无限的发展前景和广泛的用途。

一、植物组织培养研究的历史发展

(一)植物组织培养的早期探索

早在1838年,德国植物学家施莱登发表了《植物发生论》的论文;1839年,德国动物学家施旺发表了《关于动植物的结构和生长一致的研究》的专著。这两位科学家论著的发表,创立了细胞学说。该学说认为,细胞是动物、植物有机体基本结构的单位,也是生命活动的基本单位。

在这个基础上,德国植物学家哈伯兰特于1902年提出,对高等植物的组织和器官可以进行不断地分割,直到单个细胞还能形成一个完整新个体,即植物细胞全能性学说。为了验证自己的观点;他曾对高等植物的保卫细胞、叶肉细胞、髓细胞、雄蕊毛等进行

了植物组织培养。但是,由于当时对这些植物的化学成分了解得不够,这些材料的性质也没有得到深入地研究,对离体培养所需其它条件也是一无所知,致使在培养中没有看到细胞的分裂。

1904年,Hanning 通过对萝卜和辣根胚的培养,发现离体胚可以充分发育并且能提前形成小苗。据此,Brow 于1906年提出在人工合成培养基上进行无菌外植体的培养,能使各种胚在培养基上有增殖生长的反应。1922年,Kotte 和 Robbins 分别报导了根尖离体培养并得到成功。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。1926年,Harlan 报道了有关大麦幼胚的培养。

在这一时期,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进展,属于植物组织培养的探索时期。

(二)植物组织培养技术的建立时期

二十世纪30年代开始,植物组织培养技术得到了逐步发展和完善。1933年,我国学者李继侗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。这一发现对科学家在后来的植物组织培养中,用植物自身的提取物促进培养物的生长具有重要意义。1934年,White 通过对蕃茄离体根的培养,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 在他的实验中还发现,IAA(吲哚乙酸)和B族维生素在植物组织培养中具有极其重要的作用。在这个基础上,White 于1939年以种间杂种烟草茎段的形成层为材料,成功地进行了组织培养和继代培养,并首先建立了人工综合培养基。

上述工作结果使植物组织培养技术得到建立和发展,为以后的深入研究奠定了基础。

(三)器官形成和个体发生的研究时期

从二十世纪四十年至五十年代,植物组织培养技术进入了器

官形成和个体发生的研究时期。

1941年,Overbeek 进行曼陀罗(*Daturastramonium*)的幼胚培养时,在培养基中加入了天然产物 CM(椰乳),使幼胚在离体培养条件下达到了成熟。1946年,罗士韦在菟丝子茎尖培养时发现了花的器官形成,这使人们利用组织培养技术对花器官的形成和发育进行研究变成了可能。1948年,Skoog 和崔微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。他们的研究表明,当腺嘌呤与生长素的比例较低时有利于根的形成,当这一比例高时则有利于形成芽。由此发现了腺嘌呤与生长素的比例是控制芽或根分化的重要因素之一。这一发现为植物组织培养中形态的发生和人为控制提供了激素模式。1956年,Millor 等人发现了一种促进芽形成的效果要比腺嘌呤高几万倍的细胞分裂素——激动素(KT),这一发现使以后的植物组织培养研究中用 KT 代替了腺嘌呤,并极大地提高了植物组织离体培养芽的分化率,建立了用激动素与生长素的比例控制芽分化的模式。

1956年,Steward 和 Shantz 开始用胡萝卜根外植体愈伤组织进行液体培养,并把含有游离细胞的悬浮液进行继代培养。1958年,Steward 等人通过对胡萝卜愈伤组织进行悬浮培养获得了完整小植株。后来,许多研究者重复 Steward 的上述实验又相继发现,胡萝卜悬浮细胞可以形成类似正常胚胎那样的胚状体。

在这二十年时间里,植物组织培养中有关器官形成和个体发生的研究发展很快。由于人工合成激素种类的增多和使用,使得植物组织和悬浮细胞都能在人为控制的条件下进行培养和分化。

(四)植物组织培养快速发展时期

六十年代到八十年代,由于植物组织培养技术不断地完善,以及对离体培养中细胞的生长、分化规律的逐步认识,使研究者在植物组织培养的研究中都具有较明确的目标,并开始了把植物组织

培养技术应用于生产实践。

1962年, Murashige 和 Skoog 在烟草的培养中筛选出至今仍被广泛使用的 MS 培养基。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。1971 年, Takebe 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。次年, Carlson 以 NaNO_3 为融合剂, 对两个种的烟草原生质体进行了融合培养, 并获得了第一个体细胞杂交的杂种植株。

在这一时期的研究中, 人们以烟草为主要材料获得了许多突破性的进展, 使得植物组织培养技术取得了迅速的发展, 并将研究范围扩展到花药培养、花粉培养、原生质体培养和细胞融合等方面。

(五) 植物生物工程的发展时期

植物生物工程是在植物组织培养研究的基础上, 在近十多年来迅速得到发展的一个十分广泛的研究和技术应用领域。就其研究的内容来看, 主要包括了组织培养、细胞培养以及基因转化三个层次的工作。

植物组织培养技术是目前植物生物工程中研究最为完善、应用最为广泛的领域, 这一技术在果树、花卉、蔬菜等经济作物的快速繁殖和脱病毒等方面得到了普遍的使用并进入了产业化生产。

在植物组织培养的研究不断发展和完善的基础之上, 细胞培养技术由于具有广泛的应用范围而得到了迅速的发展。利用体细胞无性系产生的大量变异, 再结合人工诱变方法对培养的植物组织或细胞进行突变体筛选, 已在多种作物中选育出抗病、抗虫、抗除草剂、矮秆、高蛋白等新品种。由于从细胞悬浮培养或单细胞培养中筛选突变体较之其它培养有更大的优越性, 因此在进行突变体筛选时通常采用的是细胞培养技术, 这使得细胞培养的研究得到了迅速的发展和进一步完善。

此外,利用大规模细胞培养技术进行植物次生代谢产物的生产及获得的成功,进一步拓宽了细胞培养的研究领域,并使得工厂化生产植物天然产物这一设想变成了现实。

在植物组织和细胞培养技术不断完善的基础上,与重组体DNA技术相结合而产生的植物遗传转化的研究是植物生物工程的另一个重要内容。利用植物的组织、细胞和原生质体培养技术进行的植物遗传转化,已经在众多植物中获得成功,因而为农作物的遗传育种开辟了一条崭新的途径和广阔的前景。

二、植物组织培养的理论 and 实践意义

植物组织培养技术之所以能引起人们广泛的重视和迅速的发展,是因为它在理论和应用上都具有极其重要的意义。

众所周知,植物的各种器官、组织和细胞,在正常情况是受各种组织、细胞的相互制约、相互作用和相互影响的。因此,如果以完整的植物体来研究器官的发生、形态建成的机理、影响器官发生的因素以及生理生化上的变化等问题是极其困难的,并有极大的局限性。如果采用植物组织培养手段,就能在一定程度上克服上述困难。这是因为,一方面植物材料是离体的,它能够减少组织和细胞间的互相干扰。另一方面,在组织培养中几乎所有条件都是人为控制的,影响组织和细胞活动的环境因素在一程上是可预知的,从而更有助于对器官、组织和细胞变化规律的研究,也弥补了在自然条件下利用植物体进行研究的不足。

近几十年来,在进行植物的个体发育、器官发生、生理代谢等理论的研究中,植物组织培养方法已经成为一种重要的实验手段。同时,根据研究的目的不同,所采用的方法也各有所异,并得到发展。随着这一领域研究的不断深入,从事这项研究的人越来越多,所涉及的问题也愈来愈广泛。由于理论研究的不断深入,这项技术

在生产实践中的应用取得到了令人瞩目的发展,并为人们展示了无限广泛的前景。

在植物组织培养技术应用于理论研究的同时,理论研究的成果又为组织培养技术的发展提供了依据,并将这一技术应用于生产实践。近年来,植物组织培养技术已在生产上得到了多方面的应用,并引起社会各界的广泛重视。根据植物组织培养技术的应用,大致可以分为下述几个方面:

(一)快速繁殖

在植物组织培养中,离体的组织和细胞通过试管内的培养获得的小植株叫试管苗。采用组织培养方法可以使试管苗具有很高的繁殖速度,因此人们又将这一繁殖方式称作快速繁殖。由于试管苗种植中所具有的生产性能及主要的经济指标与采用其它无性繁殖方法所生产的幼苗差异不大,并且具有增殖速度快、成本低、易于批量生产和管理等特点,因而被人们广泛用于树木、蔬菜、花卉等经济植物苗木的工厂化生产。

(二)脱病毒技术

长期以来,人们已意识到病毒对农作物造成的危害,并探讨了各种解决的办法,但收效甚低。随着植物组织培养的不断发展和完善,人们已将这一技术应用到植物脱病毒的生产实践,并取得十分理想的效果。目前,通过植物组织培养过程生产的果树、蔬菜、花卉等脱病毒苗,已在国内外的农业生产上得到普遍使用。

(三)培育远缘杂种

从遗传学的角度看,亲缘关系越远的两个种作为亲本进行杂交,所获得的杂种后代表现得杂种优势越强。因此育种学家经常进行远缘杂交,以期选育出理想的品种。但由于多数远缘杂种不能形成正常的后代,致使杂交难以获得成功。为此,人们把植物组织培养技术与常规远缘杂交方法结合起来,对远缘杂交所形成的幼胚进行组织培养,使远缘杂种幼胚在离体条件下生长发育并形成试

管苗,从而使远缘杂交获得成功。辽宁省果树研究所的科研人员,就是利用这种方法获得了苹果与梨的杂交后代。经过各种科学方法鉴定证明,这种后代既具有苹果的特性,又具有梨的性状。

(四)突变体育种

从自然突变和人工诱变中筛选突变体并进行作物的新品种选育,是常规遗传育种工作中经常采用的方法。传统的筛选突变体及选育新品种的过程需要经过许多年的艰苦工作,而利用植物组织培养技术可以在实验室内完成筛选过程并极大地缩短选育时间。

例如,可以把试管苗置于低温的条件下筛选作物的抗寒植株,也可以把试管苗置于盐份含量高的培养基上筛选耐盐性品种。这种通过试管苗筛选植物有利性状的方法由于具有很多的优越性,因此目前在育种实践中被广泛使用。

(五)次生代谢产物生产

多年来,人们一直从各种植物中提取可用于工业、医药生产的次生代谢产物。但由于野生资源的不断减少及人类需要的不断增加,再加上这类植物往往生长较慢,生长环境特殊及不断遭到破坏等原因,导致这些植物天然产物供不应求,价格昂贵。近年来,采用植物组织培养的技术生产植物次生代谢产物已引起人们的重视,并在人参、紫草、紫杉、高山红景天等多种植物中获得成功,从而实现了野生植物资源的工厂化生产。

(六)缩短育种周期

农业生产上培育优良的杂交种,需要以基因型一致的纯系为亲本。采用传统的方法获得纯系,通常需要多代的自交才能完成。多数作物的繁殖周期为一年,因此要获得纯系作为育种材料的亲本,需要花费育种工作者多年的时间。即使采用在海南岛加代繁殖的措施,也只能缩短一半的时间。

从七十年代开始,人们开始采用植物组织培养的方法,对所需要的材料进行花粉或花药培养,并对得到的单倍体植株进行人工

加倍,从而获得了杂交育种上的纯系材料。采用优良杂交种花粉培养的方法,也可以获得杂交的原始纯合材料。

(七)体细胞杂种

在进行作物的杂交育种时,通常采用的是异花授粉和有性生殖的传统方法。在进行远缘杂交时,亲缘关系非常远的两个种很难获得可育的杂交后代。采用细胞融合技术可以克服远缘杂交的局限性,从而获得体细胞杂种。

(八)人工种子

自从有了种植业以来,人们取得农业上的收获多是播种天然种子的结果。近年来,随着植物组织培养技术的发展和研究的深入,一个以生产人工种子为目的的研究领域得到了迅速的发展和极大的成功。

人工种子是模拟天然种子的基本构造,对组织培养中得到的胚状体进行加工而制出的。人工种子在自然条件下能够像天然种子一样正常生长,因此可用于那些难以制种的优良杂交种的种子繁育。

上面列出的仅是植物组织培养技术目前在生产实践中应用的一部分。随着这项技术的不断发展和完善,其应用领域也将不断拓宽,从而在工农业生产中起到越来越大的作用。但是,由于植物组织培养技术仍处于发展时期,许多理论上的问题并不十分清楚,并且在实际应用中由于受诸多因素的限制也还存在着不少问题。因此,植物组织培养技术的未来发展及应用仍需科研工作者的努力。

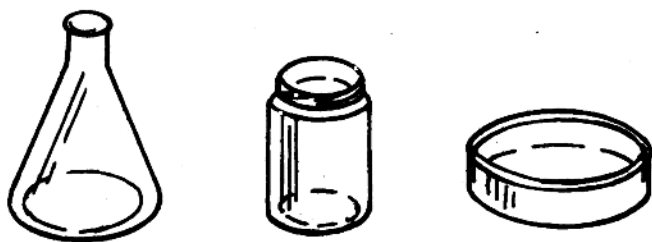
第二章 植物组织培养的基本条件

一、常用玻璃仪器

植物组织培养中使用的玻璃仪器很多,根据用途可以分为培养容器、容量器具和辅助用具等。

(一)培养容器

植物组织培养的目的和所用的材料往往是不同的,因此所用的培养容器也各不相同(图 2.1)。



三角瓶 培养瓶 培养皿

图 2.1 培养容器

1. 三角瓶又称锥形瓶,是植物组织培养中最常用的培养容器。培养中通常采用容量为 50ml 和 100ml 两种类型的三角瓶。市售三角瓶有的在瓶壁上标有容量刻度、有的没有刻度。做为研究用的三角瓶,以标有刻度的种类为宜,它有利于研究人员随时掌握瓶中培养基的体积。不同厂家生产的三角瓶在质量和规格上存在很大差异,应尽可能地选用耐用不易碎,且瓶口较大的三角瓶。三角瓶是否耐用在外观上难以鉴别,可根据瓶壁的厚度和重量进行挑选。一般来说,相同体积的三角瓶,瓶壁厚、重量大的种类往往较耐用。

2. 培养皿是是微生物培养中广泛使用的一种玻璃器皿,现在在植物组织培养中使用得也比较普遍。培养皿为扁形,分为底和盖两部分,根据其直径大小可分为多种规格。10cm 直径的培养皿常用于愈伤组织的固体培养,5 cm 直径的培养皿则通常用于细胞或原生质体的液体培养。国外常使用塑料培养皿进行细胞培养的研究,但价格较为昂贵。

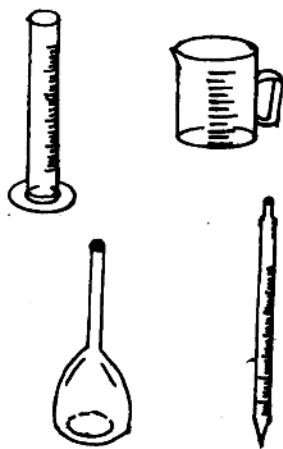
3. 圆形培养瓶通常用于试管苗的快速繁殖。这种圆形瓶形状与罐头瓶相似,只是它的口部直径与下部基本相同,呈圆柱形。由于圆形瓶体积较大,可培养较多数量的试管苗,且瓶口大易于试管苗的转移,因此在试管苗的工厂化生产时被普遍使用。

4. 试管有圆底和平底两种类型。把几个平底试管捆在一起放在培养架上培养,容易平稳放置且占用的空间很少。试管的口径不同长短各异,在培养中应根据需要采用合适规格的试管。一般来说,直径较大长度较短的试管有利于操作,常用于植物组织培养中的培养基筛选、以及愈伤组织诱导和试管苗生根过程。

除了上述四种培养容器外,根据培养的需要有时也采用长方形扁瓶、圆形扁瓶、凹面载片等作为培养容器。在实际操作中应根据培养对象选择价格便宜、便于操作、不宜污染的器皿作为培养容器。

(二)容量器具

在植物组织培养的操作中,除了培养容器外,在配制培养基等过程中还需要下述容量器具(图 2.2)。



1. 量筒 2. 量杯 3. 容量瓶 4. 刻度移液管

图 2.2 容量器具

1. 量筒有 10ml 到 2000ml 等各种不同的规格,主要用于量取水和各种体积较大的溶液。在植物组织培养中经常使用的有 10ml、25ml、50ml、100ml、500ml、1000ml 几种。

2. 吸量管亦称移液管,主要用于量取 10ml 以下的溶液。吸量管主要有 1ml、2ml、5ml、10ml 等几种规格,实际操作中应根据吸取溶液容量的多少选用相应的吸量管。吸量管有的从下向读刻度,有的则从上向下读刻度,有的在上面标有“吹”字,这表示吸量管内的液体自动流出后,还须将管口端部的存液吹出才能使量取的溶液达到所标出的量。