



植物生物技术

陈维伦 陶国清 等 编著

科学出版社

内 容 简 介

生物技术是当今高科学高技术的重要组成部分之一。本书是阐述生物技术在植物中的应用和发展，包括植物细胞和组织的培养。作者除了介绍基本知识和基本操作技术外，还论述了这一研究在生物学理论上的意义，以及它的研究成果在生产实践中的应用。作者还实事求是地论述了植物生物技术进一步研究的问题和发展的远景。

本书可供中等以上文化水平的生物学、农学、园林等科技人员及管理干部阅读，也可供有关专业的师生参考。

植物生物技术

陈维伦 陶国清 等 编著

责任编辑 王伟济

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1987年8月第一版 开本：787×1092 1/32

1987年8月第一次印刷 印张：75/8

印数：0001—4,000 字数：173,000

统一书号：13031·3683

本社书号：5482·13-10

定价：1.45元

前 言

植物生物技术是一种新兴的技术，但作为它的一个主要组成部分的植物细胞组织培养方法已有八十多年的历史。本世纪初提出培养植物细胞的设想，三十年代初步获得成功；四十年代末到五十年代建立了各种培养技术，验证了细胞全能性，以及完善了器官发生的激素调节的理论。这些工作使六十年代以后在快速繁殖、无病毒植株的获得、次生物质的生产、新品种的创造和种质资源的保存等方面有了较大的进展。随着分子生物学的发展而发展起来的DNA重组技术和对高等植物基因载体的研究，又使遗传操作达到了一个全新的更高水平。植物生物技术的研究和应用将为新的农业革命带来巨大的活力。但这项新技术还有很多问题远没有得到彻底解决，加上生物本身的多样性和复杂性，因此植物生物技术还处在发展之中，我们在强调它的应用的同时，绝不能忽视进一步深入的研究。

在这一领域中我国老一辈科学家曾作出过不少开创性的研究。如李继侗先生关于银杏胚培养和银杏胚乳的作用的研究，罗士苇先生关于茎尖培养的研究和崔澂先生关于器官分化的化学控制的研究等。建国以来，特别是七十年代后我国年轻一代科学家又在单倍体育种、马铃薯无病毒种薯的生产上作出了新的贡献；并在快速繁殖、细胞培养、次生物质生产等各方面开展了大量的工作。但总的说来，由于我国现代生物技术的基础较差，研究水平还有待进一步提高。另外，由于对植物生物技术的认识上的片面性，因而大起大落、顾

此失彼的现象在研究和应用中还相当严重。当前生物技术已被国家列入长远重点规划，如能更好地处理传统技术和新技术的结合，加强生物技术各领域的结合和促使它的均衡发展，不断吸收和应用近代植物科学各领域的新成果，经过多方面的持续努力，一定能使研究水平和社会经济效益有更大的提高。

本书的作者都是从事各领域研究工作多年的中青年科学工作者，对各自的领域有较全面的了解和较客观的分析，相信本书对从事植物细胞组织培养的专业工作者、高等农林院校、综合大学、师范院校生物系和中等农林学校的师生会有一定参考价值。疏漏和错误之处希读者批评指正。

(陈维伦)

目 录

前言	(iii)
第一章 植物的快速繁殖技术	(1)
第二章 植物茎尖培养和去除病毒	(24)
第三章 花药培养在作物改良上的潜力	(46)
第四章 植物胚胎培养	(63)
第五章 植物胚乳培养	(77)
第六章 单细胞培养	(100)
第七章 植物细胞突变体的筛选与利用	(118)
第八章 体细胞无性系变异及其应用	(136)
第九章 植物原生质体的培养及其应用	(148)
第十章 体细胞杂交	(177)
第十一章 种质的冰冻保存	(191)
第十二章 植物细胞培养和次生物质生产	(210)

第一章 植物的快速繁殖技术

一、快速繁殖的概念

植物一般通过有性繁殖和无性繁殖两种方式繁衍后代。很多花卉、果树、林木和一部分粮食作物，由于它们的高度杂合性，常通过扦插、埋条、压条、嫁接或种植特殊的营养器官等方法进行营养繁殖，从而得到和亲本遗传性一致的后代；有些种子休眠期特别长的作物，用营养繁殖可以加快繁殖的速度；某些多年生作物用种子繁殖时要经过一个很长的幼年期，如用成年植物材料进行营养繁殖，常可大大缩短生长期。这些都是无性的营养繁殖。用组织培养繁殖植物的技术是一种特殊的营养繁殖方式，现在一般称之为“快速繁殖技术”（rapid propagation）或“微繁殖技术”（micropropagation）。它是在无菌条件下，利用植物体的一部分，包括细胞、组织或器官，在人工控制的营养和环境条件下繁殖植物的方法。这可以看作是常规营养繁殖方式的一种扩展和延伸，它不但保持了常规方法的特点，而且还具有以下几个明显的优点：

（1）使用的植物材料极少，往往只要少量的茎尖、叶片、茎切段或其他器官就能在试管中建立起反复增殖的系统。这样就可以节省常规营养繁殖时所需要的大量母本植株和因栽培和保持这些母株所需的土地和人力。对于珍贵稀有的植物材料还可能做到不毁坏原有的植株。

（2）由于每个外植体产生的芽或胚状体常多于常规繁

殖方法，每一个繁殖周期又比常规繁殖短得多，一般只要1—2个月，加上可以不受季节和气候条件的影响进行周年生产，所以繁殖速度往往比常规方法要高得多，繁殖的数量在一年中常可达几万、几十万甚至上百万倍。另外，由于试管中芽、植株或胚状体的小型化和利用多层的集约化培养架，可以在有限的空间生产大量的植株。在实际应用中，某些技术较完善的作物，每平方米培养面积一年约可生产一万到几万株苗，一个熟练工人一年约可生产数万试管苗。如萱草，从30个外植体开始，在1.8平方米的培养面积上，8个月可以生产二万棵试管苗。

(3) 由于快速繁殖是在无菌的容器中进行的，在繁殖过程中不受病虫害的侵害。如果和去病源技术相结合，可以大量生产高质、均一的无病苗木，而这一点用常规方法是很难做到的。这样的无菌无病的试管苗在远距离的运输中和国际交流中都是极安全和方便的，既可以防止病害的传播又可以免去复杂的检疫手续。

(4) 对于某些植物，组织培养产生的植株的表现型和从种子或常规营养繁殖方法得到的植株会有所不同，其性状要优于原植株。如波士顿蕨的试管植株由于不表现强烈的顶端优势而能形成更多的分枝，使植株形态更美观。非洲紫罗兰的试管植株呈莲座状，而用常规叶插方法得到的植株，叶柄长，整个植株更为直立，园艺性状也较差。

快速繁殖技术除了有上述明显的优点之外，和常规的营养繁殖方法相比也有其固有的一些特点，这方面常常容易被人们忽视而造成工作的失败或资金的浪费。首先，和常规方法相比较，要建立一个比较完整的组织培养实验室，需要相当的投资。在发达国家目前约要几万美元；在我国如建立一个包括实验室、培养室和有一定温室面积的系统也要投资几

万、十几万以至几十万元，而且如完全使用电能调控光照和温度的话，运转费用也是相当可观的（在我国大部分地区夏天需要降温，冬天需要升温，潮湿地区又需去湿，以及培养室的光照，都要消耗大量的电）。其次，此项工作对人员的要求比较高，除了要求能熟练和严格地进行无菌操作之外，对培养物的生长、分化和它的控制方法要有所了解。在探索一种新的植物的快速繁殖时需要进行大量的系统研究，这就要求有一定的理论知识和实践经验。另外，由于这种方法有可能在短时期内从极少量的外植体产生大量的新植株，所以在材料的选择、工艺流程的稳定性的控制、周年生产中的各个环节的安排和衔接上要作精心的组织，否则常可能由于某一环节的失误而导致整个工作的失败。如由于选择了不良的原始材料（不良的基因型、未发现的变异体等），或在培养过程中由于培养方法不当，或因其他原因产生的遗传变异未能及早发现等，而导致最后产生大量的具有严重缺陷的植株。这一点在多年生木本植物中的后果尤为严重，因为它们的某些性状要经过几年以至几十年的时间才表现出来。在某些培养系统中还会出现对于生产不利的遗传变异，如试管苗中残留的细胞分裂素效应常使分枝过多而影响某些作物的经济性状。

二、快速繁殖技术发展史简略 和应用概况

从本世纪初哈伯兰特（Haberlandt）提出植物细胞组织培养的设想到六十年代，通过长期的科学研究，植物细胞的全能性和器官分化、体细胞胚胎发生的激素调节都得到了

证实。同时对试管植物的营养研究发展了各种适合于不同植物细胞组织培养的培养基，基本完善了原生质体培养、单细胞培养、细胞悬浮培养、组织和器官培养（包括愈伤组织、胚培养、花药培养、茎尖培养）等各种技术；积累了几百种植物的器官发生和体细胞胚胎发生的资料。这些成果为六十年代以后细胞组织培养技术在生产上的应用奠定了坚实的理论和方法的基础。

最早使用细胞组织培养技术进行植物快速繁殖的是法国科学家莫里尔（Morel），六十年代他用茎尖培养的方法大量繁殖兰花获得成功，从而引起了人们的极大兴趣，促使了七十年代这方面工作的迅速发展。七十年代，穆拉希格（Murashige）作出了较为突出的贡献，他首先提出了快速繁殖技术应分成外植体的建立、芽的增殖、生根和试管苗移栽前的锻炼等三个阶段，每一个阶段又需要不同的培养基成分和环境条件。使用这种技术在很多草本园艺作物上获得了成功，并很快地投入了生产。草本园艺作物较易获得成功的原因，一方面是由于对它的器官分化和体细胞胚胎发生研究较多，同时它本身经济价值较高，易引起人们重视；另一方面在茎尖培养时由于顶端优势不强，侧芽增殖较快和容易生根。和草本园艺作物相比，木本植物的快速繁殖的研究发展较慢，这是由于很多木本植物的外植体在培养初期的褐变和不易打破茎尖的休眠状态，器官分化和体细胞胚胎发生的例子较少，以及诱导生根困难较多。直到七十年代后期这方面的研究才逐渐发展起来。其中有代表性的是琼斯（Jones）等人关于苹果茎尖培养的工作，1976年他们发现了一种酚类物质——根皮苷，在苹果成年树茎尖培养和诱导生根中有良好的促进作用，这项工作促使果树、木本经济作物和观赏树种的快速繁殖有一个较大的发展。大多数木本造林树种都是用

种子繁殖的，但是由于育种周期太长和大规模杂交制种的困难等原因，现在越来越重视在自然界已有群体中或杂种一代中选择优良单株发展无性系的工作，因此对快速繁殖技术提出了迫切的要求。但至今这方面成功的例子不多，只限于桉树、杨树和麻栗树等少数树种。

目前快速繁殖技术已用于一些苗木的大规模商业化生产中，其中多数是观赏植物，如兰花、波士顿蕨、非洲菊、百合、唐菖蒲、菊花、香石竹、花烛和大岩桐，还有草莓、芦筍、香蕉、桉树和桃树砧木等。其中相当大部分的年产量在100万株以上。正在进行田间试验而在不久的将来可能投入商品化生产的除了各种观赏植物之外，还有不少果树和经济林木，如油棕、苹果及其砧木、苹果和柑桔的无病毒苗等。我国这一方面的工作从七十年代开始，起步较晚但发展较快，现在除甘蔗和马铃薯无毒苗已进行了大规模的试验之外，在兰花、香石竹、月季、菊花、唐菖蒲、大花萱草、非洲紫罗兰、大岩桐、重瓣玉簪、花叶芋、瑞香、无籽西瓜、草莓、茶花、桉树、杨树、醋栗和葡萄等也进行了中间试验或一定规模的商品化生产。估计今后几年可能有较大的发展，并逐渐形成我国的试管苗产业。

三、快速繁殖技术的适用范围

到目前为止可以通过组织培养方法在试管中形成植株的植物已有几百种。因此可以说很多植物都具有进行快速繁殖的潜力。但是由于各种各样的原因，如某些技术环节还未突破、效率不高、成本过高、市场需要不大等，真正比常规繁殖方式优越而用于实际生产的只是其中一小部分。在今后一个相当长的时间内它还只能用于某些作物或用于一些特殊目

的的繁殖上。主要包括以下几个方面。

(1) 用于加速某些难繁殖或繁殖速度低的植物，如珍稀名贵的花卉、一些需要发展的濒危植物的繁殖上。

(2) 某些植物虽然容易繁殖但很易感染病毒，像香石竹、百合、草莓、马铃薯等，可以先用分生组织培养的方法去除病毒，经鉴定后确认是无病毒的植株再用此法大量繁殖，得到的无毒苗可用作原种或直接栽种。这样可以大大减少繁殖过程中再感染的机会，节省大量的时间和精力。

(3) 有些杂合的园艺作物，如非洲菊、花烛等用常规种子繁殖时，由于后代分离而不能得到性状一致的后代，用快速繁殖的方法可以产生均一的个体基因型无性系。

(4) 用于需要加速繁殖的特殊基因型，如由常规育种或通过生物工程产生的新品种、国外引入的优良品种、果树中的芽变品系、木本植物的优选单株、雌雄异株作物中有经济性状或经济性状较好的植株等的快速繁殖，以减少进行推广或投入市场所需的时间。也可用于育种过程中需要迅速扩大的自交系、原始材料、亲本和杂种子代的繁殖上，以缩短育种周期。

随着科学研究的发展，相信会有越来越多的植物可使用快速繁殖技术来进行繁殖。

四、快速繁殖的一般技术

快速繁殖过程一般可包括四个阶段，即无菌培养物的建立、芽的增殖、诱导生根和试管苗的移植。

1. 无菌培养物的建立

(1) 外植体的选择。选择适当的外植体对于快速繁殖

• • •

能否成功是极其重要的。而选择什么样的外植体首先决定于第二阶段芽的增值所采用的途径。

通过腋芽的形成来增加芽的数量时，应从带有营养芽的部分得到外植体，并注意以下问题。第一，外植体的大小。这要由培养的目的来决定，如为了得到无病毒植株需使用分生组织（生长锥带1—2个叶原基），如为一般繁殖或原材料经鉴定是不带病毒的可使用茎尖（除分生组织外还带有少量幼叶）、芽或带芽的切段作为外植体。外植体越小，带病毒和其他的病源体就越少，但是难培养；反之，则带病毒越多也越容易污染，但容易培养。第二，取材植株的生理状态对培养的成败也是极重要的。一般在春天植物开始生长，芽已膨大但芽鳞片还未张开时最为合适。此时芽生长旺盛，并有芽鳞片的保护，不易污染。为了避免季节的影响，在有条件时也可以将植物放在光、温条件稳定的人工气候箱或温室中，使植株保持营养生长状态。对某些需要低温或高温或特殊光周期处理才能打破休眠的块茎、鳞茎、球茎，常常要处理后才可剥取茎尖进行培养。第三，芽在植株上的部位也是需要注意的。在一些草本植物（如菊花和香石竹）中，使用顶芽或上部的芽作分生组织或茎尖培养时的成功率常常比侧芽或基部的芽要高，这可能和它们生长较旺盛有关，但由于顶芽数量有限也常使用侧芽作材料。第四，多年生的木本植物随着年龄的增加，分生组织、茎尖和芽的培养越困难，特别是成年树较幼态树的培养要困难得多。此时，常使用部分返幼、阶段年龄较低的根蘖苗或不定芽做材料，或采取某些措施，如将芽嫁接在实生苗上、修剪、保持高水平的施肥、进行营养繁殖或用细胞分裂素喷洒植株等方法。

在通过不定芽途径使芽增殖时，可以根据不同的植物采用不同的外植体，如根、茎、叶或花器官的各部分。在自然界中

能够产生不定芽的器官应首先被采用。如非洲紫罗兰、大岩桐、番茄、秋海棠等植物可用叶片；某些兰花和蕨类可以用茎尖；有些针叶树可用子叶、下胚轴；很多种植物，特别是单子叶植物，可以使用花器官，如萱草、鸢尾、玉簪、小菖兰、非洲菊和菊花等；还有，单子叶植物鳞茎的鳞片和叶基部也常用来作为外植体诱导不定芽的形成。

在使用体细胞胚胎发生途径时，常使用胚、分生组织或生殖器官作为外植体。

(2) 植物材料的消毒。由于大多数植物的内部是无菌的，所以只要进行彻底的表面消毒就可以得到无菌的材料。一般先用水将材料表面的尘土洗去（但不要刷子洗刷植物材料的表面），然后用表面消毒剂消毒灭菌。最常用的表面消毒剂是5—10%的安替福民（含有效氯5.25%的次氯酸钠溶液）、10%左右的漂白粉（次氯酸钙）或千分之一的升汞。使用的浓度和时间要根据植物材料而改变。幼嫩的组织时间要短，老的组织、有芽鳞片保护的芽或种子时间可以长些，范围在几分到十分钟左右。为了使消毒剂能更好地浸润表面，常在消毒剂溶液中加入0.01—0.1%的表面活性剂，如吐混20、吐混80等，或者在植物材料浸入消毒剂之前先用70—75%的酒精浸几秒到几十秒钟，这一点对于表面不光滑、多毛的植物材料来说尤为重要。消毒后要用无菌水将材料冲洗干净，特别是用升汞消毒后更要多洗几次。

能否得到无菌的培养物不但决定于所使用的表面消毒剂的种类和时间，更重要的还要决定于植物材料的状况，应尽可能使用在培养室和温室中栽种的健康的、生长旺盛的植株。从田间取回的材料消毒常是很困难的。有人将枝条采回室内扦插后利用新生的芽，或用抗生素溶液和杀菌剂预先处理植株，或用塑料袋包裹枝条等方法，可能得到较好的效果。

无菌培养物的获得也和正确的操作方法有关。如切除和剥去植物材料的外层（如种皮、芽鳞片、老叶等）、在接种过程中经常消毒工具、避免各个外植体和组织块之间的交叉感染等也是极重要的。

（3）褐变及其防止。很多植物含有丰富的多酚化合物，接种时由于切割和剥离使组织受到伤害，这些化合物在多酚氧化酶的作用下氧化发生褐变，此现象在很多木本植物的成年树中尤其严重。这些氧化产物能使外植体和培养基变黑并严重抑制外植体生长和分化的能力，褐变常使最初培养物的建立受到阻碍。

现在采用各种方法试图防止褐变的发生，并在某些植物上得到一定的效果，但还没有普遍适用的有效方法。常用的方法有：在培养基中加入抗坏血酸、柠檬酸、半胱氨酸、二硫苏糖醇或聚乙烯吡咯烷酮（PVP，有可溶和不溶性的两种）等抗氧化剂，或用抗氧化剂溶液预先处理外植体，或在抗氧化剂溶液中切割、剥离外植体，有时将以上几种处理结合使用；第二种方法是将外植体不断地转移到新鲜的培养基上；第三种方法是在培养基中加入1%左右的活性炭，但由于活性炭同时也能吸附培养基中的激素等物质，因此常会影响外植体的生长和分化；第四，开始阶段在黑暗中或弱光下进行培养，因为光照能促进多酚化合物的氧化。

（4）基本培养基和培养条件。现在用于快速繁殖的基本培养基有很多种，常用的有MS、B₅等（表1）。通常在整个培养过程的各个阶段使用同一种基本培养基，但有时在第三阶段诱导根的形成时使用盐浓度较低的基本培养基会得到更好的效果。在各种各样的基本培养基中用得最多的是MS培养基和它的改良形式。

对激素的要求，不同的外植体在各个培养阶段和采用

1 表 某些植物组织培养基的成分

成 分	培养基 (含量 毫克/升)				
	White	MS	B ₅	WPM ^①	Anderson ^②
NH ₄ NO ₃	—	1650	—	400	400
KNO ₃	80	1900	2527.5	—	480
CaCl ₂ ·2H ₂ O	—	440	150	96	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	750	370	246.5	370	370
KH ₂ PO ₄	—	170	—	170	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	—	134	—	—
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	300	—	—	556	—
Na ₂ SO ₄	200	—	—	—	—
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	19	—	150	—	380
K ₂ SO ₄	—	—	—	990	—
KCl	65	—	—	—	—
KI	0.75	0.83	0.75	—	0.83
H ₃ BO ₃	1.5	6.2	3	6.2	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	5	22.3	—	—	—
MnSO ₄ ·H ₂ O	—	—	10	22.3	16.9
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3	8.6	2	8.6	8.6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	—	0.25	0.25	0.25	0.25
MoO ₃	0.001	—	—	—	—
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01	0.025	0.025	0.025	—
CoCl ₂ ·6H ₂ O	—	0.025	0.025	—	0.83
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2.5	—	—	—	—

续表

成 分	培养基 (含量 毫克/升)				
	White	MS	B ₅	WPM ^①	Anderson ^②
FeSO ₄ ·7H ₂ O	—	27.8	—	27.8	55.7
Na ₂ ·EDTA·2H ₂ O	—	37.3	—	37.3	74.5
Fe-Na-EDTA	—	—	28	—	—
肌 醇	—	100	100	100	100
烟 酸	0.05	0.5	1	0.5	—
维 生 素B ₆	0.01	0.5	1	0.5	—
维 生 素B ₁	0.01	0.1	10	1.0	0.4
甘 氨 酸	3	2	—	2.0	—

① WPM是Woody Plant Medium的缩写

② Anderson培养基和它的改良形式和WPM常用于一些木本植物的培养中

不同增殖途径时，常是很不相同的，关于这方面的情况将在下文中分别叙述。但在第一阶段和第二阶段常常使用同一基本培养基和激素成分。

由于培养物在培养基中不进行光合作用，需要培养基提供碳源。用得最多的碳水化合物是蔗糖，有时也使用葡萄糖和果糖及其他糖类化合物，浓度一般在2—3%左右。在大量培养时，为了节省成本使用食糖往往也能得到同样的效果。目前在快速繁殖中使用得最多的是固体培养基，以琼脂作为固化剂。由于琼脂来源不同，用量也不相同(0.5—0.8%左右)，以掌握到容器倾斜时固体培养基不迅速变形为宜。

其他培养条件包括光照、温度和湿度等。除特殊要求

外，一般在整个过程中都采用日光灯或日光灯加白灼灯的混合光作光源，光强度在1000—3000勒克司左右。光周期使用24小时连续光照或16小时光照，8小时黑暗。在快速繁殖中光照的作用不是满足培养物光合作用的需要，而是用于植物的光形态建成。常用的培养温度在25℃左右，但因植物不同有时也使用较低或较高的温度。一般认为恒定的温度对生长有利，较少采用日夜变温的培养方法。由于在培养容器内的相对湿度接近于100%，对于培养室湿度的控制要求不十分严格。但在北方空气过于干燥时，培养基水分可能丧失过快（特别是在培养容器用棉塞或通气性能较好的纸张封口时），要适当提高空气湿度；在南方潮湿季节和地区，由于湿度过高，在棉塞或封口纸上霉菌生长加快以至透入容器引起污染，此时要用去湿器和其他方法降低空气湿度或改用不霉变的封口膜。

2. 芽的增殖

这是快速繁殖技术最重要的一环。在这一阶段潜在的植物个体（芽或胚状体）通过腋芽的形成和生长、外植体或愈伤组织上不定芽的形成和胚状体发生三条途径（图1）在数量上得以迅速增殖。由于植物种类的不同，在增殖时可能采用不同的途径。目前在快速繁殖中使用得最多的是第一条途径和第二条途径中的外植体上不定芽的形成。

（1）促进腋芽的形成和生长。在高等植物的每一个叶腋中通常都存在着腋芽，每一个腋芽在一定的条件下都能生长并形成一条枝条。在自然条件下，按照植物种类的不同，一般腋芽要保持一个或长或短的休眠期。顶端优势很强的植物只有在去除顶芽之后，腋芽才能生长。现在已经知道这一现象是由几种内源植物激素（如细胞分裂素、生长素等）调节控制的。使用外源的细胞分裂素常可以打破顶端优势，促