

植物组织培养法

中国植物学会编印

植物组织培养法



目 录

前言	孙敬三 (1)
实验室的设计与常用仪器设备	桂耀林 (3)
玻璃器皿的选择与清洗	桂耀林 (8)
常用药品的特点及其贮藏与配制	桂耀林 (12)
培养基的配制与简化	桂耀林 (17)
常用培养基配方	桂耀林 (23)
外植体的选择与灭菌方法	桂耀林 (33)
污染的原因和预防措施	桂耀林 (38)
快速繁殖技术	陈维伦 (41)
植物茎尖培养和去除病毒	陶国清 (58)
花药培养	孙敬三 (80)
获得单倍体的球茎大麦法	孙敬三 (88)
单花粉培养	陆文樑 (94)
胚珠培养	顾淑荣 (99)
未传粉子房的离体培养	郭仲琛 (103)
植物胚胎培养技术	郭仲琛 (107)
被子植物的胚乳培养	母锡金 (115)
种子和果实培养	顾淑荣 (128)
植物试管受精	郭仲琛 (134)
细胞突变体的筛选	
(一) 抗病细胞突变体的筛选	王敬驹 (140)
(二) 抗盐突变体的筛选	叶和春 (144)
(三) 抗除草剂突变体(烟草抗百草枯突变体)的筛选	朱宝清 (144)

(四) 抗氨基酸及其类似物细胞突变体的筛选

-王敬驹(149)
- 体细胞无性系变异.....朱至清(155)
- 微室培养.....陆文樑(161)
- 平板培养.....陆文樑(165)
- 植物细胞悬浮培养.....叶和春(170)
- 植物细胞培养和次生物质生产.....胡昌序(177)
- 植物原生质体培养.....钱迎倩 周云罗(187)
- 体细胞杂交.....钱迎倩(196)
- 冠瘿的诱导与培养.....吴玉华(204)
- 高等植物细胞的遗传转化.....胡志昂(212)
- 超低温种质保存.....简令成(221)

前 言

近年来，国外以植物组织培养为主要手段的植物生物技术发展迅速，在试管苗的大量繁殖、作物品种的改良、次生物质的大量生产和珍贵种质的超低温保存上，已经取得了巨大进展，有些领域（如试管苗的生产）已形成了新的产业，创造了可观的经济效益。植物组织培养的研究，我国有较好的基础，在不少方面（例如花药培养和单倍体育种、马铃薯茎尖培养和无毒苗生产等）做出了世人瞩目的科研成果，收到了一定的经济效益。但是，从植物生物技术的总体水平看来，我国还处在发展的初期阶段，和先进国家相比还有一定差距，有些领域尚属空白。为了推动我国植物生物技术的发展，使其尽快赶上世界先进水平，更好地为国民经济建设和提高人民生活水平服务，我们组织了中国科学院植物研究所从事这方面工作多年的专家，集体撰写了这本“植物组织培养法”。本书不仅对植物组织培养中各种技术细节，如实验室的设计、培养器皿的选择和清洗、培养基的配制、材料的表面消毒等作了详细描述，而且对现代植物生物技术的各个分枝，如经济植物的快速繁殖、利用离体技术进行作物改良、植物细胞的大量培养、超低温种质保存和植物遗传工程等，从国内外的最新进展到具体的研究方法、实验操作程序都进行了详细介绍。在介绍了每种方法之后，一般都附有实例，以便初学者参照实验。编者希望，这本书不仅对刚刚进入这一领域工作的初学者在掌握植物组织培养的基本操作中，起到“实验指导”的作用，而且也对已经从事植物组织

培养工作多年的专业工作者，了解自己专业之外的植物生物技术其他分枝学科的实验方法、技术细节有所帮助。如果本书被实验台上的各种溶液浸染得斑迹点点，而不是被整洁的陈列在书橱中，将是对编者的最大奖赏。

本书除了可作为从事植物组织培养工作的专业工作者的备查、参考书之外，还适用于高等农林院校、综合性大学和师范院校生物系以及中等农林学校植物生物技术课的实验指导，其中的部分内容也可作为植物实验胚胎学的实验指导。

为了使本书赶在中国植物学会和中国科学院植物研究所联合举办的“第一届全国试管苗信息技术交流交易会”之前出版，从落实撰稿任务到交付印刷，只有25天时间。由于编写时间仓促，书中的疏漏以至错误之处恐怕不少，尚希读者批评指正。

（孙敬三）

实验室的设计与常用仪器设备

植物组织培养的实验室，一般由配制培养基的化学实验室，消毒和接种的无菌操作室及培养室等组成。根据工作目的及实验规模不同，工作人员可以自行决定实验室的设计与排列，以便有利于连续工作。在安排上，最好能按工作的自然程序排列，使成为一流畅的生产线。如，清洗玻璃器皿的房间应放在制备培养基的实验室之前，然后消毒，再进入无菌操作室、培养室、显微观察室等。

组织培养所需的设备，也是依各种研究目的而定的，可以根据需要自行设计一些特殊仪器。用于微生物实验室、化学实验室及动物组织和细胞培养实验室的器皿和设备，多半也用于植物组织培养的研究工作。

(一) 实验室的设计

1. 房间的分配

实验室房间的合理安排是实验室设计首先要考虑的条件之一。以一个较好的实验室而言，对房间可做如下分配：用一间作配制培养基的主要房间。实验台上应装有煤气阀，水龙头，插座等，如有可能再配备一或数个水池。房间内最好多放置一些试管架、柜子及用来放置常用玻璃器皿，试剂瓶等的医用器械橱或玻璃柜。还应配备一台精密天平（灵敏度为0.01克），一个pH计，一或两个两眼煤气灶，一个冰箱。

作为放置和清洗玻璃器皿的房间可配备有高压消毒锅、水池或洗玻璃器皿的机器及干燥箱等。

其他，还可安排一个存放化学药品的房间，房间内最好不要放入易燃物品，这样做比较安全。

接种室和培养室也要单独建立，它们都要求尽可能保持清洁和安静。在接种室内，则配备有无菌操作台或接种箱等。在接种室外最好还设有准备室，使工作人员进入接种室前有一个过渡。在准备室中可放置工作服，拖鞋，帽子等，并可用紫外灯随时进行灭菌。在条件较差的情况下，亦可用木制的接种箱代替接种室，箱内也装有紫外灯供灭菌用。近来，很多单位采用超净工作台来代替无菌操作室。由于超净工作台有机的滤尘装置，可以使工作人员和操作台之间形成风幕，以保证工作台上处于无菌状态。

用于无菌操作的工具有酒精灯、贮存酒精（70%）棉球的广口瓶及各种镊子、接种针、解剖刀、手术剪，等等。

如果有条件，还可开辟一间冷藏室以用来存放配制好的培养基和培养材料。作为进行生物化学、组织学等项研究，也可专门用一个房间。

当然，这是作为较完整的方案而设计的，在一般条件下，如果实验室较小，也可以将几个房间合并到一起。

2. 培养室

培养室是进行组织培养工作的主要场所，因培养室内装有灯光，所以最好不要有窗户。在安装设备之前，先用次氯酸钠液把墙整个喷洒一遍，然后刷一层抗真菌的白漆，地面最好是瓷砖的。为了保证全室温度一致（24~26℃之间）故须有自动调温设备（空调机）。放置培养材料可以用摇床、

转床、培养架等。培养架最好为白色的木质结构，这样比金属结构安全。照明一般用40 W日光灯，光源可放在培养物的侧面或垂直悬挂于培养物之上。灯管安装在距离搁板约40厘米处，两根日光灯之间的距离为20厘米，这时光强度约为2000~3000勒克斯。安装日光灯时，镇流器应安在培养室外的墙上，以便于更好散热和控制培养室温度。为了方便，用自动计时器控制光照时间，以免每天要人开灯、关灯。

(二) 常用仪器设备

实验室常用仪器设备包括：试管或三角瓶1000~3000个；移液管，1毫升、5毫升、10毫升各5~10支；漏斗（直径4~5厘米）3~4个；烧杯，250毫升10个，500毫升及1000毫升各3~5个；细口玻璃瓶，100毫升、500毫升、1000毫升5~10个；酒精灯2个；不锈钢锅（煮大量的培养基用）1个；镊子、解剖刀等工具一套。较大型的器材有高压消毒锅1个；两眼煤气灶1个（也可用电炉再连一个调压变压器供消毒用）；干燥箱1台；机械盘式精密天平1台；电动精密天平1台；电冰箱1台；超净工作台1~2台；双筒解剖镜1台；酸度测定仪1台；空调机1~2台。

实验室仪器设备的型号及用途各有不同，在购置前应注意考虑、选择。

1. 双筒解剖镜

主要用来剥离一些较小的器官与组织，像生长点、胚乳、幼胚等，也可用来观察培养的细胞或组织的生长情况。低倍观察时因焦距较长便于边观察边操作，并可随时变更物镜。一般要求它的视野尽量大一些、景深长，至少可放大

40倍。接目镜上部还可装置照相机以用于照相。

2. pH计

用于校正培养基等的pH。以选择实验室类型的为好，不要携带式的。半导体小型酸度测定仪，不仅配制培养基时可用，而且可测定培养过程中的pH变化。

3. 消毒锅

消毒锅型号多，可根据不同要求选择。小型实验室可选用立式的医用手提高压灭菌锅，操作较方便。大的实验室可采用卧式的，它的优点是容量大，对不同形状的器皿均可进行消毒。

4. 超净工作台

用于进行无菌操作，无菌效果良好，工作起来也舒适满意。由于进入台面的空气已净化，保证台面尽量无尘，所以可以用来代替接种室。超净工作台应安装在较清洁的房间内，以避免外界尘粒的影响。地面应经常清除除尘。

5. 天平

根据用途不同，可配备各类天平。工业天平感量大，用于称量量大的药品或放在离心机附近用于称量平衡离心管的重量。较为精密的分析天平，精确度为0.1毫克，用于称量用量较微，称量必需准确的植物激素及维生素之类的药品。分析天平要放在安静、不常有人走动的地方或专门房间内，并且应有防震固定的台座，抗震台。

6. 烘箱和恒温箱

洗涤过的工具或玻璃器皿需迅速干燥，可放入电热烘箱80~100℃烘干；有时也可用它来进行高温（120~150℃）干燥灭菌。恒温箱也称为培养箱，可用于从植物组织分离原生质体与酶制剂的保温。

7. 培养基分装器

使配制好的培养基分装于培养器皿中。分装器可以自行设计，一般它由大型的滴管、漏斗、橡皮管及铁夹组成。用量筒式的分装器，上面有刻度，下面有橡皮管及铁夹来控制。平常也可用定量的匙进行分装，微量的则可用注射器。

其他较大型的仪器设备还有离心机、摇床及转床等。

(桂耀林)

玻璃器皿的选择与清洗

为了保证培养工作的顺利进行，其关键之一就是保证无菌，以免污染。培养前除了对培养材料和用具要进行严格消毒外，各种培养用具也需洗涤清洗，以防止带入一些有毒的或影响培养效果的化学物质。对于使用最多的玻璃用具的清洁程度要求更为严格，清洗的工作量也最大。

(一) 玻璃器皿的清洗

清洗玻璃器皿的设备包括自来水池，水桶、各种大小的试管刷、洗涤架及适用的工作台等。在有条件的地方，水槽内面包一层抗酸的铅皮，并有良好的下水道，使带酸的水液很快流出，不致腐蚀水管。干燥箱也是十分必需的，特别是对一些急需使用的器皿及一些不易晾干的玻璃用具如移液管、滴管及各种弯管等，需加热烘干以备急需。洗涤好而一时不用的器具可放至有盖的容器或器械柜中，以免落上尘土。

用于洗涤的洗涤剂有肥皂、洗衣粉和洗液（即铬酸-硫酸混合液，由40克工业用重铬酸钾经少量水溶化，然后缓缓加入粗制浓硫酸至1000毫升配成）等。清洗时，如一般玻璃器皿，可先用水洗净，再泡入热的肥皂水或洗衣粉水中，洗刷内外直至器皿壁上冲水后不挂水珠，然后再用清水反复冲洗以去除洗涤剂的沾附物，最后用蒸馏水淋一遍，凉干或烘干

后备用。对于较脏的玻璃器皿，可先用碱洗，再用酸洗。即先用洗衣粉刷洗，再用清水冲净后晾干浸入洗液（即酸洗）。浸泡时间根据器皿肮脏程度而定。为了便于清洗，洗涤可盛于1升或2升容量的圆形标本瓶中。如吸管、滴管之类的小器皿，经碱洗晾干后可浸入洗液中一至几天，取出经流水冲洗及用蒸馏水淋过一次就可放入烤箱中烘干备用。为了保持洗液的使用时间，盛洗液的容器上应盖一片大小合适的玻璃，以免洗液因吸水而冲淡。

对于一些带有石蜡或胶布的器皿，洗涤较为麻烦。洗涤前应将石蜡或胶布除去，再用常规方法进行洗涤。石蜡用水煮沸数次即可去掉。胶布粘着物则需用洗衣粉液煮沸数小时，再用水洗，晾干后再泡入洗液，以后的洗涤步骤同前。

（二）玻璃器皿的选择

配制培养基和用于培养的玻璃容器，有各种各样的类型和用途，工作时可根据研究目的不同而进行选择。

1. 试管

是植物组织培养中最常用的一种容器，特别适于用少量培养基及试验各种不同配方时用。在茎尖培养及移苗时有利于小苗向上生长。试管有圆底及平底两种，一般以 2×15 厘米或 2.5×15 厘米为宜，过长的试管不利操作。不过，进行器官培养及从培养组织产生茎、叶及进行花芽形成等试验，则往往需口径更大及更长的试管。试管塞多为棉塞，亦可用铝箔。

2. 三角锥形瓶

适于作各种材料的培养，一般用50毫升和100毫升两种，口径相同，均为2.5厘米。三角锥形瓶放置方便，亦可用于静置培养或振荡培养。瓶塞同上。

3. L型管和T型管

多为液体培养时用，有利于液体流动。由于在转动时可使管内培养的材料轮流交替地处于培养液和空气之中，这样，通气良好，利于培养组织的生长。

4. 长方形扁瓶及圆形扁瓶

前者可以用来离心，使所需材料沉积于尖形的底部。后者一般用于植物细胞培养及生长点培养，可在瓶外直接用显微镜观察细胞的分裂和生长情况及便于摄影。

5. 角形培养瓶和圆形培养瓶

角形培养瓶用于静置培养，圆形培养瓶常用来作植物胚的培养。

6. 培养皿

最适于作固体平板培养用，一般直径为6厘米。培养皿应上下密切吻合，使用前要进行选择。接种时也常用灭过菌的培养皿来盛切割的灭菌外植体。

7. 平型有角试管和无角试管

用于液体转动培养上，试管的上下都是平面，瓶口用双层橡皮塞塞住，这种设计便于低倍显微镜下观察及摄影。

8. 细胞微室培养器皿

用硬质玻璃管切成的小环及盖玻片和载玻片等组成。将玻璃环放在载玻片上，基部以凡士林和石蜡（1:3）固封起来，再在玻璃环上面放一块盖玻片并用凡士林将接触部分封闭加固，使成“微室”。通过细胞微室培养方法可用于悬滴培养，便于在显微镜下观察培养物的生长情况。

9. 离心管

在离心机上用于从液体培养中将细胞或制备的原生质体从培养基中分离出来并收集用于实验。如果需要更换新的培养基，也可以离心使培养物集中于底部，然后去掉原有培养基，再加入新鲜培养基。

此外，如容量瓶、移液管及量筒、量杯、试剂瓶、烧杯、滴管等，大多用于配制药剂及配制培养基时用。

（桂耀林）

常用药品的特点及其 贮藏与配制

目前，大多数植物组织培养中所用的培养基成分由无机营养物、碳源、维生素、生长调节物质及有机附加物等五类物质组成。

大部分药品如无机盐、溶剂等一般均可在实验室常温下贮存。有些药品，如某些生长调节物质，则需要置于 $0-4^{\circ}\text{C}$ 的冰箱或 0°C 的冷冻机内保存。像吲哚乙酸等在光中易分解的药品则应在暗中保存。平常应注意不同药品的存放条件，最好注明在药瓶的标签上，以免存放不当而变质。

特别是无机盐的种类较多，存放时要按名字的字母顺序放置（如硫酸钙名字的第一个字母是C，就放在C的位置）以便查找。使用药品时，每次只能打开一种，称后盖好盖子，药品消耗完应及时补充。

1. 无机营养物

无机盐基本都溶于水。配制培养基时可用一定量的蒸馏水分别溶化，然后按培养基表中的排列顺序加入，这样可把 Ca^{++} 与 $\text{SO}_4^{=}$ 和 $\text{PO}_4^{=}$ 错开，以免生成硫酸钙或磷酸钙的沉淀。作为无机营养，主要由大量元素和微量元素两部分组成。大量元素中，氮源通常用硝态氮或铵态氮，但在培养基中用硝态氮的较多，也有将硝态氮和铵态氮混合使用的。P和S则常用磷酸盐和硫酸盐来提供。K是主要的阳离子，在近代的培养基中K的水平有逐渐提高的趋势，而Ca、Na、

Mg的需要量则较少。通常营养培养基中至少含有各为25毫克分子(mM)的硝酸盐和钾。一般来说,铵的含量超过8毫克分子时对培养物有毒害作用。但对常规的愈伤组织培养和细胞悬浮培养来说,硝酸盐加上铵的浓度可以提高到60毫克分子,这也说明铵可能对某些培养物有重要作用。钙、硫和镁的浓度在1—3毫克分子范围内较合适。而所需的钠和氯化物则由钙盐、磷酸盐或微量营养物提供。

微量营养物包括碘(I)、硼(B)、锰(Mn)、锌(Zn)、钼(Mo)、铜(Cu)、钴(Co)和铁(Fe)。铁离子的供应,现在大多是以整合铁的形式,即 FeSO_4 与 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (整合剂)的混合。

2. 碳源

培养的植物组织或细胞,它们的光合作用能力较弱,因此,需要在培养基中附加一些碳水化合物以供需要。蔗糖是最好的碳素来源,大多数细胞对蔗糖的需要范围是2~4%,在有些植物组织或器官的培养中,所需蔗糖浓度有高达7%甚至15%的(如玉米的花药培养)。蔗糖除作为培养基中的碳源和能源外对维持培养基的渗透压也起重要作用。

蔗糖也能用葡萄糖、果糖来代替,其他糖类均不够理想。对培养基进行高压灭菌时,可能会使培养基内的蔗糖由于水解而发生变化,但这不会对培养材料有影响。

3. 维生素

培养基内附加各种维生素,常有利于离体培养物的发育,这些维生素属于B族维生素类,其中效果最佳的有以下几种:维生素 B_1 ,亦称盐酸硫胺素,可能是组织生长时必需