

果树组织 培养技术及其应用

侯义龙 主编



中国农业科学技术出版社

果树组织培养技术及其应用

侯义龙 主编

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

果树组织培养技术及其应用 / 侯义龙主编. —北京:
中国农业科学技术出版社, 2007. 8
ISBN 978 - 7 - 80233 - 326 - 0

I. 果… II. 侯… III. 果树 - 组织培养 IV. S660.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 096408 号

责任编辑 冯凌云

责任校对 马丽萍 张京红 贾晓红

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) 68919704 (发行部) (010) 62150862 (编辑室)
(010) 68919703 (读者服务部)

传 真 (010) 62189012

网 址 <http://www.castp.cn>

经 销 者 新华书店北京发行所

印 刷 者 北京科信印刷厂

开 本 850mm × 1 168mm 1/32

印 张 8.75

字 数 200 千字

版 次 2007 年 8 月第 1 版 2007 年 8 月第 1 次印刷

定 价 23.00 元

本书由

大连市人民政府

资助出版

The published book is sponsored
by the Dalian Municipal Government

《果树组织培养技术及其应用》编委会

主 编 侯义龙

副 主 编 赖钟雄 张立娟 于亚军

编写人员 侯义龙 赖钟雄 张立娟 于亚军

赖呈纯 郭玉琼 于大永 夏秀英

冯晓元 刘爱华 姜国斌 尚敏克

高凤山

前 言

植物组织培养技术的研究基础是 Schleiden 和 Schwann 创立的细胞学说。1943 年 White 提出了植物细胞全能性学说,并出版了《植物组织培养》手册,使植物组织培养成为一门新兴的学科。而植物组织培养技术的迅猛发展是从 20 世纪 50 年代后期开始的,近三十年来,植物组织培养技术在生物学和农业科学领域得到更广泛的应用。果树组织培养技术是在植物组织培养的基础上发展起来的,它是一种分离一个或数个体细胞或果树植物体的一部分,在无菌的人工配制培养基上培养的技术。不论是果树植物体的细胞、组织或器官,均可在培养基上生长发育。

果树组织培养除了在基础理论的研究上有重要价值外,在实际应用中也日益显示出它的巨大价值。果树组织培养是果树无性繁殖的一种重要方法,具有繁殖速度快、性状保持稳定、苗木整齐均一等特点。果树组织培养在遗传育种上更有其独特的价值,胚胎培养可以克服远缘杂交的障碍,有利于种属间杂交的进行。花药和花粉培养,可用于单倍体育种,得到纯合的二倍体。原生质体培养,体细胞杂交的技术使人们有可能在更大范围内进行基因重组,在育种上创造新的极为罕见的品种及种类。利用果树的组织培养技术进行优良种质材料的繁殖、保存及突变体的诱导、筛选等工作与常规育种相比,无论在时间或空间上都要优越得多。通过组织培养还可以对被病毒感染而导致产量下降及品质降低的优良果树品种进行脱毒处理,使其恢复原有的品种特性,果树组织培养这一优点在实践中得到了广泛的应用。

本书系统地介绍了果树组织培养的设施建设、工艺流程、试管苗培养过程中的常见问题及解决方法、果树组织培养技术的具体应用。本书的编者来自大连大学、福建农林大学、北京市农林科学院林业果树研究所、大连市农业科学院、大连理工大学、大连民族学院等科研院所和

大专院校，均为从事组织培养教学、科研工作多年，有丰富的理论知识和实践经验的专家、学者。该书适合生物、农业类大中专学生作为学习用书或教学参考书，适合从事生物农业研究的科研院所及公司企业作为指导性参考书。

限于作者水平，书中难免存在不当之处甚至错误，恳请读者指正。

作 者

2005 年 7 月

目 录

第一章 果树组织培养的发展概况	(1)
第一节 果树组织培养的概念和意义	(1)
第二节 果树组织培养的历史、现状及发展趋势	(2)
第二章 果树组织培养设施建设	(11)
第一节 果树组织培养实验室规划	(11)
第二节 果树组织培养所需仪器、设备	(12)
第三节 实验室仪器、设备的使用及日常维护	(15)
第三章 果树组织培养工艺流程	(20)
第一节 培养基成分及制备	(20)
第二节 初代培养	(28)
第三节 继代培养	(33)
第四节 试管苗的生根及移栽	(37)
第五节 果树组织培养脱毒技术	(45)
第六节 原生质体培养	(55)
第七节 胚乳培养	(60)
第八节 花药培养	(63)
第九节 胚培养	(64)
第四章 果树组织培养中的常见问题及解决方法	(67)
第一节 污染的问题	(67)
第二节 试管苗玻璃化的问题	(70)
第三节 试管苗褐变的问题	(71)
第四节 试管苗畸形的问题	(73)
第五节 试管苗褪绿及变色的问题	(74)
第五章 果树组织培养技术应用	(76)
第一节 苹果组织培养技术	(76)
第二节 梨组织培养技术	(86)

第三节	山楂组织培养技术	(91)
第四节	樱桃组织培养技术	(93)
第五节	桃组织培养技术	(104)
第六节	李组织培养技术	(110)
第七节	杏组织培养技术	(111)
第八节	葡萄组织培养技术	(115)
第九节	草莓组织培养技术	(142)
第十节	树莓组织培养技术	(150)
第十一节	蓝莓组织培养技术	(152)
第十二节	枣组织培养技术	(155)
第十三节	核桃组织培养技术	(159)
第十四节	板栗组织培养技术	(162)
第十五节	榛子组织培养技术	(163)
第十六节	猕猴桃组织培养技术	(165)
第十七节	柿树组织培养技术	(167)
第十八节	柑橘组织培养技术	(168)
第十九节	香蕉组织培养技术	(179)
第二十节	龙眼组织培养技术	(198)
第二十一节	荔枝组织培养技术	(209)
第二十二节	枇杷组织培养技术	(222)
第二十三节	菠萝组织培养技术	(230)
主要参考文献		(238)
附 录		(247)
一、	果树组织培养常用培养基主要成分表	(247)
二、	常用植物生长激素浓度单位换算表	(256)
三、	常用英文缩略词表	(256)
四、	光照强度单位 klx 和 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 之间的换算	(259)
五、	正交试验常用正交表	(259)
六、	重要名词解释	(262)

第一章 果树组织培养的发展概况

第一节 果树组织培养的概念和意义

果树组织培养 (tissue culture) 技术是指分离一个或数个体细胞或果树植物体的一部分, 在无菌的人工配制培养基上培养的技术。不论是植物体的细胞、组织或器官, 均可在培养基上生长发育。

果树组织培养的概念有狭义和广义之分。狭义的概念是专门指对于果树组织 (如茎尖分生组织、愈伤组织等) 的培养, 而广义的概念则是指通过无菌操作分离植物体的一部分, 即外植体 (explant), 接种在培养基上进行培养, 进而形成完整的植株。这里所说的植物体的一部分 (即外植体) 可以是果树器官、组织、细胞、原生质体, 甚至可以是完整的植株本身。

果树组织培养可严格控制培养的有关条件, 且根据现已掌握的培养技术, 几乎所有的果树离体部位皆可单独均匀一致的培养生长, 排除了许多不利因子的干扰, 大大提高了试验研究的准确性, 所以广泛用在细胞、组织的代谢生理以及生化等方面的研究。

果树组织培养除了在基础理论的研究上有重要价值外, 在实际应用中也日益显示出它的巨大作用。果树组织培养是果树无性繁殖的一种重要方法, 具有繁殖速度快、性状保持稳定、苗木整齐均一等特点。这对于果树这种需要采用无性繁殖的方法来大量培育种苗的植物来说, 无疑是具有十分重要的意义的。仅就繁殖一项来说, 果树组织培养法就可以克服常规繁殖方法 (扦插、嫁接、压条等) 繁殖速度慢、苗木不整齐的缺点, 大幅度地提高果树苗木的繁殖速度, 因而更适合于工厂化生产, 由此产生的经济效益也十分显著。它在世界上的不少国家和地区, 已从实验室的研究手段一跃而成为大规模成批量的一种工厂化生产方法, 得到广泛的利用。果树组织培养在遗传育种上更有其独特的价值, 胚胎培养可以克服远缘杂交

的障碍,有利于种属间杂交的进行。花药和花粉培养可用于单倍体育种,得到纯合的二倍体。原生质体培养、体细胞杂交的技术使人们有可能在更大范围内进行基因重组,在育种上创造新的极为罕见的品种及种类。在优良种质材料的繁殖、保存及突变体的诱导、筛选等方面与常规育种可比,无论在时间或空间上都要优越得多。当然,常规育种始终是一种基本的育种方法,但组织培养在某些方面的长处也确实是其不可及的。通过组织培养从感染病毒的植株得到无病毒植物,也是组织培养的一大优点,并已在不少作物的实践生产中得到应用。此外,现在已开始进行从大量培养植物组织或细胞,来生产药物或其他有价值的天然产物。

果树组织培养技术作为现代生物技术的一个重要组成部分,已由实验室走向商业化生产,为人类创造着巨大财富。随着科学技术的进步,特别是生命科学的发展,可以预测,未来的果树组织培养技术的科技含量将会进一步的提高,在果树生产中发挥更大的作用。

第二节 果树组织培养的历史、现状及发展趋势

一、果树组织培养的历史和现状

1893年,细胞学家施旺(Schwann)就曾经在他发表的细胞学说中提出过:“每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”。1902年,德国植物学家哈伯兰德(G.Haberlandt)曾经预言,植物细胞具有全能性,即每个细胞都像胚胎细胞一样,可以经过在体外培养成为一棵完整的植株。这一理论最早被应用于实践的植物种类是胡萝卜和烟草,可能是由于这两种植物的组织培养相对容易一些。1937年前后,法国科学家高特里特(R.T.Gautheret)和诺比考特(Nobecourt)几乎同时培养了胡萝卜肉质根组织,并使细胞增殖获得成功。美国科学家怀特(White)用烟草的茎段形成层为材料成功地进行了初代培养和继代

培养。1948年,我国植物生理学家崔激和美国科学家 Skoog 利用植物激素处理培养的烟草组织块,诱导培养获得了器官的分化,从而揭开了离体培养中组织能发生器官的奥秘。1958年,美国植物学家斯图尔德 (F.C.Steward) 用液体悬浮培养法把胡萝卜的体细胞经胚状体途径培养成了植株,并且开花结实,为植物组织培养领域打开了新的局面。到了20世纪60年代初期,科金 (E.C.Cocking) 等人开始用真菌的纤维素酶分离植物原生质体获得成功,为以后的原生质体融合技术、体细胞杂交等遗传工程的迅速发展创造了条件。从20世纪60年代到80年代,组织培养技术在生产上的应用得到了重视和发展,已经逐渐成为农业、林业、园艺等方面的重要研究手段;同时,它又进一步促进了相关基本理论的研究,例如,器官的形态发生、细胞组织的生长分化、代谢调节、遗传变异等基本理论,从而越来越受到各国科学家的广泛重视。许多果树种类和品种的组织培养体系就是在这时期建立和发展起来的。

以苹果的组织培养为例,苹果 (*Malus pumila* Mill.) 是苹果属 (*Malus*) 中最重要的一個种,它是自花不孕的多年生果树,因此,要想获得完全纯合的苹果无性系是相当困难的,采用花药培养的方法可以获得单倍体的纯系材料。1971~1972年间,Nakayama 和 Saito 等将苹果花药培养在含有 2,4-D、IAA 和 KIN (KT) 的 Miller 培养基上,获得了愈伤组织;1975年,Kubicki 等利用苹果的愈伤组织在分化培养基上得到了较多根和少量类芽器官,但并未分化出真正的芽,也未分化出小植株;1978年,我国的科学工作者开始了对于苹果的组织培养研究工作,山东农学院首先从花药诱导出了胚状体,但未分化出植株;1979~1980年,中国农业科学院果树研究所利用大苹果品种元帅的花药诱导出了胚状体,并分化出完整的小植株;1981年,东北农学院利用小苹果黄太平品种的花药诱导出了完整的单倍体植株。实践证明,通过花药培养可以成功地获得许多苹果优良品种的植株,选用这些品种的纯系材料作为亲本再进行杂交,就可能利用纯系之间的杂种优势,从而推动苹果遗传和育

种理论的研究。除了花药培养之外,苹果组织培养工作中广泛采用的外植体种类还包括茎尖和胚等,采用茎尖培养的方法可以实现苹果苗木的无病毒繁殖,而采用胚培养的方法则可以解决苹果远缘杂交种子在发育中的败育问题。

再以梨的组织培养为例,梨在植物分类学上属于蔷薇科(Rosaceae)梨属(*Pyrus*),包括60多个种,分别产于欧洲、东亚、中亚和地中海附近。梨是一种高产果树,由于优良株系亟待扩大繁殖推广,所以市场上对苗木的需求量较大。采用胚培养的方法可以克服远缘杂交胚发育不良或败育,也可以克服早熟种胚发育不完全;采用胚乳培养的方法可以创造三倍体品种;采用茎尖培养的方法可以快速扩大苗木的繁殖,也可以获得无病毒苗木。1979年,我国的科技工作者将杂种梨早熟系208与早酥梨杂交,得到了杂交后代,以后又对其进行了离体培养,获得了比其父母本更加早熟的优良单株;1983年,石荫平研究了梨胚培养不定梢及分枝的起源与诱导,以及激素对于梨胚发生不定梢及分枝的作用;1981年,赵惠祥以锦丰梨胚乳为材料,培养诱导出完整的植株,并移栽成活。而梨的茎尖培养在国内外研究甚少,1979年,David得到了茎尖培养成功的试管苗;1982年,赵惠祥用梨的试管实生苗茎尖进行离体培养得到了完整的小植株并移栽成活。

1914年Morel开始了葡萄愈伤组织的培养。1955年Fallot、1959年Pelet等培养葡萄的茎生成不定根。1961年Galzy成功地培养了葡萄茎尖,并开始了葡萄低温离体保存,并首创节培法(Node cuttings)。Mullines和Srinivasan(1976)第一个报道了葡萄体细胞胚胎发生。1978年曹孜义等从欧亚品种葡萄花药培养诱导出大量二倍体植株。同年Kruel等也从杂种葡萄花药愈伤组织上诱导出大量不定胚。1978年Barlass和Skene报道了葡萄试管快繁技术。1979年曹孜义等在国内首先报道了葡萄试管繁殖技术,并于翌年建立了我国第一个植物组织培养的葡萄园。齐与枢、曹孜义等历经8年,完成了葡萄试管繁殖生产技术试验,并取得明显的经济效益和社会效

益。1985年4月在法国召开葡萄组织培养与葡萄育种国际学术讨论会，是对葡萄组织培养的一次大检阅。1989年 Monette 在国际农林生物技术丛书上做了详尽的综述。1989年 Mullins 在第五届国际葡萄育种学术讨论会上，做了“组织培养在葡萄遗传改良中的应用”的大会报告，总结了这方面的研究进展。第五届、第六届国际葡萄育种学术讨论会都列为一个专题，提交论文都是最多的。曹孜义和齐与枢结合多年研究出版《葡萄组织培养应用》专著一书，对离体快繁和脱毒进行了系统总结。“七五”和“八五”期间，国家都把葡萄脱毒及无毒苗试管快繁技术列入攻关计划，组织全国有关专家协作攻关，使葡萄离体快繁得到了更快地发展和应用。

20世纪60~80年代是果树组织培养蓬勃发展的时期，利用组织培养法在这一时期建立和发展起来的果树种类包括苹果、梨、桃、葡萄、山楂、荔枝和龙眼等等。科研工作者往往根据生产和科研上的需要，以及各个果树种类本身的特性制定出相应的培养方法，创造出了较大的社会效益和经济效益。但由于我国果树资源丰富且分布较广，要想充分地挖掘现有资源并科学地研究其组织培养体系的建立，绝非一件容易的事，本书将在第五章果树组织培养技术应用中具体地介绍几种较难培养的特色果树种类的培养方法和技术，以供读者参考。

从20世纪80年代至今，分子生物学、分子遗传学以及细胞生物学的概念和方法与植物组织培养结合了起来，从而给植物科学的研究带来了完全崭新的面貌。主要开展了两方面的工作：一是在细胞水平上，开展了细胞杂交、细胞器移植、变种筛选等工作；二是在分子水平上，开展了遗传信息、分子吸收、通过不同基因载体（噬菌体、细菌质粒等）把不同来源的基因导入植物细胞、体外酶促基因重组等工作。在细胞水平或分子水平上遗传特性的改变，都可以通过适当的培养而反映到整株植物体上，这是培育果树植物新品种的理想手段。由于大多数的果树植物都具有多年生、茎干高度木质化、植株高大的特点，用常规的方法培育新品种需要花费很长

时间,并存在着很多困难,采用组织培养的方法就可以在一定程度
上弥补这些缺点。对于细胞水平上的研究,果树植物原生质体研究
相对其他植物来说起步比较晚,20世纪80年代前期,Vardi等获得
了柑橘的原生质体再生植株;1987年,Ochatt等获得了樱桃的原生
质体再生植株;1986年,Ochatt和Caso获得了野生梨的原生质体再
生植株;1988年,Cai成功地培养出了中华猕猴桃原生质体再生植
株。这些成功的实例为更多的果树植物原生质体培养再生植株积累
了经验,同时也为果树植物体细胞杂交和应用原生质体开展遗传工
程研究创造了条件。人们利用体细胞无性系产生的大量变异,结合
人工诱变的方法对培养出的植物组织或细胞进行突变体筛选,选育
出了抗病、抗虫、抗除草剂、高蛋白等新品种,这使细胞培养的研
究得到了迅速发展和进一步完善,另外,利用大规模细胞培养技术
进行植物次生代谢产物的生产也获得了成功,从而进一步拓宽了细
胞培养的研究领域。对于分子水平上的研究,是在果树植物组织和
细胞培养技术不断完善的基础上进行的,它是果树植物生物工程的一
项重要的研究内容,为果树植物遗传育种开辟了一条崭新的途
径。

在这一时期,果树快速繁殖已经开始进入“工厂化”时期。中
国科学院广州华南植物所首先从澳大利亚引进了“威廉斯”等香蕉
品种的试管苗,建立起了面积达5000m²的果苗工厂,年产香蕉种
苗约300万株;此外,辽宁省兴城市中国农业科学院果树研究所和
河北农业大学的苹果和砧木试管苗的生产规模也均达到了百万株的
规模。科研工作者对于果树快速繁殖中出现的問題不断进行研究和
总结,使得这项技术更加趋于完善。当然,此时的试管苗工厂化生
产仍然存在着一些问题和不足,例如,有一些优良种苗还需要从国
外进口和引进;用于试管苗驯化移植栽培的自动化温室等相应的配
套设备也过分地依赖进口;将果树组织培养快速繁殖技术应用于大
规模种苗生产的经验不足等。

二、果树组织培养的发展趋势

近年来,果树组织培养技术已经在生产上得到了广泛的应用,并逐渐成为果树生物工程中的一项重要的高新技术,引起社会各界的广泛重视和关注。总的来说,果树组织培养的应用和发展趋势大致可以分成以下几个方面:

1. 快速繁殖

由于采用组织培养的方法可以使果树植物试管苗保持较高的繁殖速度,因此将这一方法称为快速繁殖。快速繁殖技术不仅解决了果树苗木的供应问题,同时也为长期保存和应用优良的果树种质资源提供了重要手段。快速繁殖的苗木具有长势一致、根系好、生长快等优点。

苗木繁殖数可以用公式表示为: $Y = m \times x^n$ 。其中, Y 为年繁殖数, m 为无菌母株数, x 为每个培养周期增殖的倍数, n 为全年可增殖的周期次数。从公式中可以看出,苗木繁殖速度是以几何级数增殖的,这就是采用组织培养的方法能够实现果树苗木快速繁殖的关键。

2. 苗木脱毒

目前,人们已经意识到了病毒对于果树植物的危害性,由于病毒的原因可以导致果实畸形,果园减产,甚至于可能导致绝收的致命性危害。通过植物组织培养过程生产的果树脱病毒苗木已经在国内外农业生产上得到了普遍的应用。一般认为,果树苗木顶端分生组织内不含病毒或者只含有少量的病毒;在高于正常的温度下,果树组织中的很多病毒都可以被部分或全部钝化。因此,如果采用微茎尖技术与热处理技术或者将这两项技术相结合,就可以达到果树脱毒的目的。目前,已经建立起来了枣树、苹果、葡萄、草莓等果树种类的脱毒技术,大大提高了果品的产量、抗性和品质。近年来,与之相应的采用免疫学、分子生物学等手段检测果树病毒的研究工作也在积极进行当中。

3. 用于遗传育种，培育远缘杂种

由于果树植物是多年生植物，远缘杂交后代生长周期长、杂交不亲和、杂交后种子生活力不强等原因往往会导致常规远缘杂交工作难度比较大，如果将植物组织培养技术与常规远缘杂交技术相结合，对远缘杂交形成的幼胚进行离体组织培养，使之在离体的条件下形成完整的试管植株，就可能培育出优良的果树新品种。中国农业科学院果树研究所利用这种方法获得了苹果与梨的杂交后代，这种后代兼有苹果和梨的特性。

花药和花粉培养，可用于单倍体育种，得到纯合的二倍体。原生质体培养、体细胞杂交技术使人们有可能在更大范围内进行基因重组，在育种上创造极为罕见的品种及种类。其他在优良种质材料的繁殖、保存及突变体的诱导、筛选等方面与常规育种相比，无论在时间上或空间上都要优越得多。

4. 缩短育种时间

果树植物大多数是异花授粉植物，一般要经过 7~8 个世代的自交，才能获得遗传性状比较稳定的纯系品种。经实生繁殖的果树从种子发芽到开花结果也大约需要 10~20 年甚至更长的时间，要获得稳定的纯系必须自交，也需要相当长的时间，且自交结实率也往往比较低。通过组织培养的方法，对果树植物的花粉、花药、未受精的子房以及胚珠进行培养，得到单倍体植株以后，再采用染色体人工加倍的方法使其恢复成为二倍体植株，从而培育成为新的果树品种。这种方法大大缩短了育种周期，简化了育种程序，提高了选择效率，例如，荔枝的常规育种选育期需要 7 年，而采用组织培养法后，育种选育期则只需要 1 年。

5. 培育体细胞杂种

采用细胞融合技术可以克服果树植物远缘杂交不亲和性，获得体细胞杂种，而原生质体培养是细胞融合的前提。果树植物原生质体培养研究工作起步比较晚，从 1990 年开始，科研工作者对美味猕猴桃的原生质体培养成功，首次获得了果树原生质体培养再生植