

全国高等农业技术师范教育类专业教材

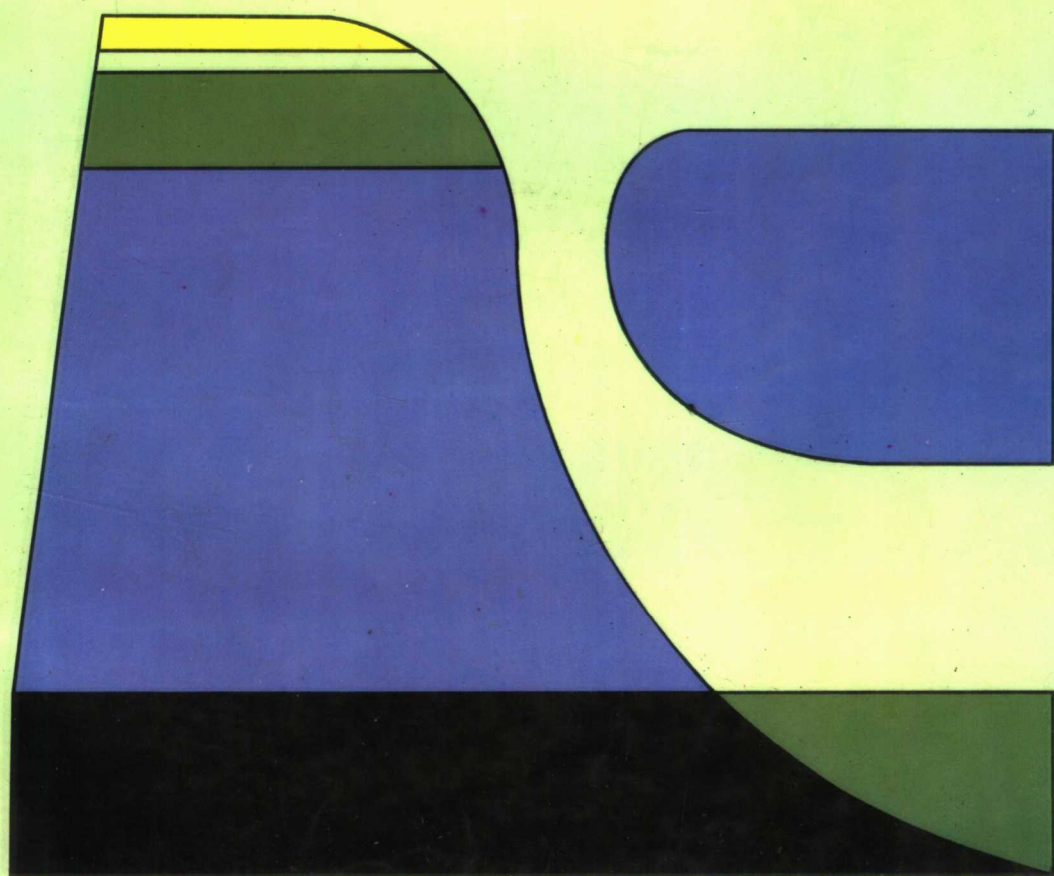
全国高等农业技术师范教育教材指导委员会审定

应用生物技术



王 蒂 李友勇 主编

中国农业科技出版社



全国高等农业技术师范教育类专业教材
全国高等农业技术师范教育教材指导委员会审定

应用生物技术

王 蒂 李友勇 主编

中国农业科技出版社

(京)新登字 061 号

图书在版编目(CIP)数据

应用生物技术/王蒂,李友勇主编.-北京:中国农业科技出版社,1997.9

ISBN 7-80119-478-0

I. 应… I. 王… III. 生物技术-应用 N. Q-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(97)第 20066 号

责任编辑
出版发行

经 销
印 刷
开 本
印 数
版 次
定 价

胡越

中国农业科技出版社

(北京市海淀区白石桥路 30 号)

新华书店北京发行所

河北农业技术师范学院印刷厂

787×1092 1/16 印张:16.625

1~2000 册 字数:394 千字

1997 年 10 月第一版 1997 年 10 月第一次印刷

23.50 元

编写人员

责任主编 王 蒂

主 编 李友勇

副主编 乔亚科 马子骏

冉毅东 王雪敏

编 者 (按姓氏笔画排序)

马子骏(浙江农村职业技术师范专科学校)

王 蒂(甘肃农业大学)

王巧玲(河南职业技术师范学院)

王雪敏(河北邯郸高等农业专科学校)

田文勋(吉林农业大学)

冉毅东(甘肃农业大学)

李友勇(河南职业技术师范学院)

乔亚科(河北农业技术师范学院)

主 审 董洪平(河北农业技术师范学院)

内 容 简 介

《应用生物技术》一书是以高科技基础上发展起来的组织及细胞培养、基因工程和蛋白质技术为主线综合编写而成。在编写过程中,作者广泛、深入地收集和研究了国内外最新科技文献和相近书籍,认真吸收它们的长处,并针对我国的实际情况,以可操作性和实践性为目的,在理论上作了系统和简明扼要的介绍,使读者能够获得有关生物技术的全面知识并紧跟学科发展进程;实践上辅之以一、二种应用成功的作物为实例重点详细地论述。本书既可以作为农业技术高师教育作物类本科专业使用教材,也可作为其它农业院校农林专业、综合性大学生物专业大学生、研究生及教师的教学用书和相关专业研究人员的教学和科研参考书。

本教材共分3单元16章;第1单元1~11章,组织及细胞培养技术;第2单元12~14章,基因工程技术;第3单元15~16章,蛋白质工程技术。

前 言

本教材是国家教委师范教育司委托中国职业教育学会高等农业技术师范教育工作委员会为实施国家教委颁布试行的《农艺教育专业本科教学方案》而组织编写的 28 种教材之一。

为贯彻落实《中国教育改革和发展纲要》，进一步推进高等职业技术师范教育的建设和发展，国家教委师范教育司在高等农业技术师范教育中，首先选择了由传统农学专业改办的农艺教育专业为突破口，进行系统整体教育改革，以求全面推动高等农业技术师范教育的改革。为此，从 1992 年开始组织有关高校专家、教授研制《农艺教育专业本科教学方案》，1994 年国家教委以教师字〔94〕8 号文件颁布了《农艺教育专业本科教学方案（试行）》（以下称《方案》）在全国农业技术师范院校和普通高校职业教育系（部）试行。这一《方案》是在科学总结多年来农艺教育专业教改实践的基础上，按照高等农业技术师范教育的特点和规律、以专业为单位全面系统改革的试验，是近年来高等农业技术师范教育重大的改革成果。

该专业的教材建设不但是全面实施《方案》的保证，而且也是巩固高等农业技术师范教育教改成果，继续深化改革和真正办出特色的需要。为此国家教委师范教育司把农艺教育专业教材建设作为一项基础工程来抓，自始至终亲自领导了整个教材编写过程。

高等农业技术师范教育工作委员会根据国家教委师范教育司的要求于 1994 年 5 月在安徽农技师院组建了由 13 人组成的高等农业技术师范教育教材指导委员会，并举行了工作会议。会议对各院校多年来试用、代用的教材和讲义进行了分析和评价，全面总结了教材建设经验。为保证教材建设科学有序地进行，会议制定了教材建设规划、实施计划和编审工作规程。本着各院校自愿申报、公开竞争、专家评议、师范教育司批准来确定参编人员的原则，会议布署了遴选编审人员的工作。

1995 年 2 月在东北农业大学召开了农艺教育专业教材建设评选会议，会上由教材指导委员会聘请 10 名有关学科专家，对申编人员提出的各教材的“编写大纲”进行认真地评审。会议通过专家评审和领导协调确定了 28 种教材的编写人员，组建了编写组。1995 年 6 月国家教委师范教育司以教师司〔95〕46 号文件印发了《农艺教育专业教材编写人员名单及出版规划》的通知。1995 年 5 月又在河南职业技术师范学院召开主编工作会议，与会人员再次认真学习国家教委关于高等教育改革的有关精神，深入领会《方案》，进一步明确教材编写的指导思想，完善了各门教材的编写大纲，较好地解决了课程间的分工和衔接问题，帮助主编在专业整体教学层次而不是在本门课程的层次上研究了教材的内容和要求。会后教材编写工作进入了实施阶段。

这套教材适于全国高等农业技术师范院校和普通高等农林院校师范教育学院（系、部）的农艺教育专业使用，高等农业职业学校也可借用，其中的基础课教材还可供园艺教育、畜禽生产教育等专业使用，本教材也可作为农林专业技术人员、中等专业学校和中等职业学校的参考用书。

高等农业技术师范教育是一个新兴的教育门类,在教育、教学方面有很多问题需要我们不断地探索,我们组织编写这套教材,就是在教学上一次较大规模整体改革的探索,但是能不能准确地体现高等农业技术师范教育的特定培养目标和培养规格的要求,尚需实践检验。为此,恳请同行专家、应用本套教材的广大师生以及广大读者提出宝贵意见,以便提高我们的教材建设水平,进而促进高等农业技术师范教育水平的提高,以更好地适应我国职业教育事业发展的需要。

全国高等农业技术师范教育教材指导委员会

1997年7月

序 言

生物技术跨越多个学科,它的研究与应用正以日新月异的速度向前发展。为了能全面系统地介绍生物技术,本教材将分散在不同学科中的有关技术和知识,以细胞工程技术、基因工程技术和蛋白质工程技术三个单元分别阐述,以方便查阅和选择使用。

根据我国农业生产和农村经济发展实际,生物技术中以细胞工程技术最为实用,因此以较大篇幅予以介绍。基因工程技术在使用时需要较复杂的设备和训练有素的人员,但作为大学本科用教材,对目前最具经济效益和研究最为活跃的基因工程技术和蛋白质工程技术也作了详细阐述,以期扩大本书的适用性,使读者能够获得生物技术的系统知识,并跟上该学科的发展进程。由于技术的进步,基因工程已能够在不同水平上进行操作,大大推动了生物技术的普及和应用。本教材正是以生物技术的普及和应用为目的,介绍目前国内外发展起来的、且较为成熟的生物技术——它们的意义、价值、应用前景,以及从教学出发,介绍它们的操作方法和实验程序。

本教材在编写过程中注意对必要的理论基础简单明了地介绍,实际应用部分重点详细地论述,对涉及实际的各项指标尽可能多地举例说明,并加以图示。此外,对每一项技术都举出一、两个作物作为应用实例加以全面介绍,一方面加强此技术的可操作性和实用性,另一方面也可作为实习实验指导使用。为了不使篇幅过大和避免重复,在章节内容中有详细实例说明的技术,就不再另附实习实验指导。

由于本教材偏重生物应用技术,涉及内容十分广泛,有些理论方面的问题不能进行过细探讨,因此给出参考文献,以便读者根据个人兴趣作进一步的深入研究。

本教材各章节编写人员为:王蒂、冉毅东(甘肃农大),第1、2、9、11、12和16章;田文勋(吉林农大),第3章;乔亚科(河北农技师院),第4章;李友勇、王巧玲(河南职技师院),第5、10、14章;马子骏(浙江农技师专),第6、7、8章;王雪敏(邯郸农专),第13、15章。

王蒂、冉毅东对全书进行了最后审定。乔亚科在王蒂责任主编,董洪平主审和有关专家的指导下,据其具体意见,对全部书稿进行了系统全面的审改、补充,并完成了全部书稿的一、二、三校工作。

由于《应用生物技术》是一门涉及面广、实践性强的新兴农业科学技术,在国内尚属首次编写,无前车之鉴;加之我们水平有限,时间仓促,错误和缺点在所难免,敬请有关专家、读者批评指正,以便今后进一步修订和改进。

王蒂
1997年9月

目 录

第一章 组织培养概述	(1)
第一节 组织培养所需营养与环境条件.....	(1)
第二节 细胞全能性和器官分化.....	(3)
第三节 培养基的配制.....	(5)
第四节 组织培养设备和技术.....	(7)
第二章 单倍体诱导	(12)
第一节 花药及花粉培养中雄核发育机制及其单倍体发生过程	(13)
第二节 花药培养方法	(15)
第三节 花粉离体培养	(16)
第四节 影响雄核发育的因素	(19)
第五节 花药培养白化苗问题	(20)
第六节 通过球茎大麦技术丢失染色体	(21)
第七节 单倍体的鉴定和多倍化	(23)
第八节 花药培养及花粉培养应用	(23)
实验 离体花药和花粉培养程序	(24)
第三章 染色体加倍技术	(27)
第一节 染色体加倍的意义	(27)
第二节 秋水仙素加倍	(29)
第三节 愈伤组织加倍法	(31)
第四节 倍性鉴定	(33)
实验 植物染色体加倍与鉴定	(35)
第四章 植物细胞培养	(38)
第一节 单细胞分离方法	(38)
第二节 细胞培养技术	(39)
第三节 细胞培养的应用	(43)
第四节 人工种子	(44)
实验 细胞悬浮培养	(48)
第五章 植物胚胎培养	(51)
第一节 胚胎培养的意义及作用	(51)
第二节 胚胎离体下的发育途径及营养需要	(52)
第三节 胚胎培养的其它类型	(56)
第四节 胚胎培养的无性变异	(59)
第五节 胚胎培养实验	(60)
第六章 植物快速繁殖技术	(63)

第一节	快速繁殖的意义及其原理	(63)
第二节	快速繁殖方法	(64)
第三节	快速繁殖的应用	(66)
第七章	植物脱毒技术	(75)
第一节	植物脱毒的意义	(75)
第二节	植物脱毒方法	(76)
第三节	植物脱毒的应用	(84)
第八章	植物种质离体保存技术	(87)
第一节	种质离体保存的意义	(87)
第二节	种质离体保存方法	(88)
第三节	种质离体保存的应用	(92)
第九章	植物原生质体培养和细胞杂交技术	(94)
第一节	植物原生质体培养的意义	(94)
第二节	植物原生质体的培养	(94)
第三节	原生质体培养示例	(101)
第四节	体细胞杂交	(102)
第五节	细胞质杂种和器官及 DNA 转移	(110)
第六节	植物原生质体培养和融合技术在育种上的应用	(111)
第十章	植物抗性突变体及其选择	(115)
第一节	抗性突变体的分类	(115)
第二节	常见抗性突变体	(116)
第三节	抗性突变体的选择	(123)
第四节	抗性突变体选择实验	(128)
第十一章	微生物细胞技术	(132)
第一节	微生物细胞融合基础知识	(132)
第二节	原核细胞原生质体融合技术	(135)
第三节	真核细胞的原生质体融合	(137)
第四节	微生物细胞技术的应用	(139)
第十二章	基因工程概述	(142)
第一节	目的基因的分离与合成	(142)
第二节	重组 DNA 分子的转移方法	(143)
第三节	基因受体	(146)
第四节	重组体 DNA 分子的选择与鉴定	(147)
第五节	PCR 扩增技术	(148)
第六节	基因工程的成果及展望	(149)
第十三章	微生物基因工程技术	(150)
第一节	大肠杆菌转化和噬菌体 DNA 导入	(150)
第二节	分子克隆技术	(153)
第三节	重组 DNA 克隆的筛选方法	(162)

第四节	基因表达及表达体系·····	(167)
第五节	微生物基因工程的应用·····	(174)
第十四章	植物基因工程 ·····	(176)
第一节	植物基因工程进展·····	(176)
第二节	植物基因工程目的基因的获得·····	(179)
第三节	植物基因工程载体系统·····	(184)
第四节	植物基因工程受体系统·····	(193)
第五节	植物基因转移方法·····	(194)
第六节	外源基因在受体中表达及转基因植物鉴定·····	(200)
第七节	植物基因工程操作技术实验·····	(204)
第十五章	单细胞蛋白质生产技术 ·····	(211)
第一节	单细胞蛋白生产学概述·····	(211)
第二节	从石油化工产品中生产单细胞蛋白·····	(221)
第三节	从可再生资源中生产单细胞蛋白·····	(224)
第四节	单细胞蛋白中蛋白质的提取和核酸分离·····	(229)
实验	利用发酵废液生产单细胞蛋白·····	(230)
第十六章	酶制剂生产 ·····	(232)
第一节	酶制剂生产概述·····	(232)
第二节	酶的提纯和活性测定·····	(238)
第三节	酶制剂生产实例·····	(243)
第四节	固定化酶和固定化细胞·····	(248)
	主要参考文献 ·····	(252)

第一章 组织培养概述

在无菌条件下利用人工培养基对包括植物原生质体、悬浮细胞和器官的培养称为植物组织培养。根据所培养的植物材料的不同,把组织培养分为5种类型:愈伤组织培养、悬浮细胞培养、器官(胚、花药、子房、根和茎)培养、茎尖分生组织培养和原生质体培养。组织培养在作物改良、突变体筛选、种质资源保存、次生代谢物生产和遗传工程操作方面均具有重要意义。

第一节 组织培养所需营养与环境条件

一、营 养

(一)无机营养

1. 大量元素 包括碳(C)、氢(H)、氧(O)、氮(N)、磷(P)、钾(K)、钙(Ca)、镁(Mg)和硫(S)等元素。氮常用的是硝态氮(如硝酸钾等)和铵态氮(如硫酸铵等)。植物组织从培养基中吸收 NO_3^- 或 NH_4^+ 后,经过一系列的反应转化成氨基酸,进而合成蛋白质,成为植物体的主要组成部分。磷常由磷酸盐来提供,是植物必需元素之一。植物组织培养中需要大量的磷。钾在近代培养基中,用量有提高的趋势,钙、镁、硫的需要量较少,这些元素的浓度大致在 $1\sim 3\mu\text{mol/L}$ 比较合适。

2. 微量元素 包括铁(Fe)、铜(Cu)、钼(Mo)、锌(Zn)、钠(Na)、锰(Mn)、钴(Co)、硼(B)和碘(I)等。在植物组织培养中需要量极微,多了就会引起植物细胞的酶系失活、代谢障碍、蛋白质变性,以及组织死亡等毒害现象。培养基中添加 $10^{-5}\sim 10^{-7}\text{mol/L}$ 浓度就可满足需要。

(二)有机营养

1. 维生素类 植物组织培养中经常使用维生素C、维生素B₁(盐酸硫胺素)、维生素B₆(盐酸吡哆素)、维生素H(生物素)、叶酸和烟酸等,一般使用浓度为 $0.1\sim 10\text{mg/L}$,有的外植体的愈伤组织会合成维生素,可以不必添加,但生长早期往往会缺乏。

维生素在植物中以辅酶的形式参与生物催化剂——酶系的活动,参与细胞的蛋白质、脂肪、糖代谢等重要生命活动。

2. 氨基酸 有甘氨酸、丝氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、水解酪蛋白(CH)和水解乳蛋白(LH)等,是重要的有机氮源。氨基酸通常用量为 $2\sim 3\text{mg/L}$ 。水解酪蛋白和水解乳蛋白是多种氨基酸的混合物,对培养材料胚状体或不定芽的分化有良好的促进作用,通常用量是 $300\sim 2000\text{mg/L}$ 。

3. 有机添加物 成分比较复杂,大多是含氨基酸、激素、酶等的复杂化合物,它们对细胞和组织的增殖与分化有明显的促进作用,但成分大多不清楚,含量也不稳定,所以一般应尽量避免使用。有机添加物主要有椰乳、香蕉汁、马铃薯汁、酵母提取液(YE)、麦芽提取

液、苹果汁、番茄汁和柑桔汁等。

4. 琼脂 是一种从海藻中提取出来的凝胶性物质,作为凝固剂使用,一般使用浓度为0.6%~1%。琼脂在植物组织培养中除固化作为培养材料的支持物外,还具吸附能力,能象活性炭一样除去细胞代谢废物。

5. 活性炭 加入活性炭的目的是除去琼脂中的毒物或培养物产生的芳香族的代谢废物。活性炭可防止组织变褐并刺激胚胎的发生与生根。

(三)植物生长调节物质

植物生长调节物质是培养基中的关键物质,对植物组织培养起着重要而明显的调节作用。植物生长调节物质包括生长素、细胞分裂素及赤霉素等。

生长素常用的有2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、萘乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA)、吲哚乙酸(IAA)等。它们作用的强弱顺序为2,4-D>萘乙酸>吲哚丁酸>吲哚乙酸。吲哚乙酸为天然植物生长素,也可用化学方法合成,它见光易分解,高温高压时易被破坏,故应置于棕色瓶中,放在4~5℃下保存。萘乙酸和2,4-D都是人工合成的物质,它们在120℃下仍然稳定。

细胞分裂素常用的有激动素(KT)、6-苄基氨基嘌呤(BA)、玉米素(ZT)和2-异戊烯腺嘌呤(Zip)等。它们作用的强弱顺序为玉米素=2-异戊烯腺嘌呤>6-苄基氨基嘌呤>激动素。它们经高温高压灭菌后性能仍稳定,只有激动素受光易分解,故应在4~5℃低温黑暗下保存。细胞分裂素有促进细胞分裂和分化、延迟组织衰老、增强蛋白质合成、抑制顶端优势、促进侧芽生长及显著改变其他激素作用的特点。

赤霉素在组织培养中使用的只有GA₃一种,它是一种天然产物,能促进已分化的芽的伸长生长。其他如脱落酸(ABA)、乙烯利(CEDP)及三十烷醇也有使用。

通常认为生长素和细胞分裂素的比值大时有利于根的形成,比值小时则促进芽的形成。低浓度2,4-D有利于胚状体的分化,但妨碍胚状体进一步发育。萘乙酸有利于单子叶植物的分化。吲哚丁酸诱导生根效果最好。故应根据植物的种类和培养部位,选择适宜的生长调节物质的种类和浓度,以有效地控制器官的分化。

(四)能源和渗透压

通常植物本身能进行光合作用,产生糖类,不需要从外部供给糖,但在植物组织培养进行异养的情况下,大多不能进行光合作用来合成糖类,因此必须在培养基中添加糖,作为碳素来源和能量物质,同时糖对保持培养基的渗透压也有重要作用。使用最普遍的是蔗糖,此外还有葡萄糖和果糖。使用浓度大多在2%~3%。近来发现使用麦芽糖,对植物的诱导率的提高有一定作用。

二、环境

(一)温度

1. 最适温度 在植物组织培养中大多采用最适温度,并保持恒温培养,以加速生长。通常采用25±2℃的温度,对大多数植物来讲是合适的,但也因种类而异。温度不仅对增殖和器官形成有作用,还能控制内源细胞分裂素代谢系统的变化。

2. 温度处理的影响 在植物组织培养以前先对培养材料进行低温或高温预处理,往有促进诱导生长的作用,为此,常在培养实践中采用。

胡萝卜切片在 4℃ 下处理 16~32 分钟,比未处理的可大大加快生长。马铃薯花药培养经 4~9℃ 低温处理 1~4 天和 30~35℃ 高温 1~2 天处理,可显著提高其单倍体诱导频率。

(二)光照

组织培养中光照起重要作用的主要有光照强度和光质,有些需要暗培养,另一些则需要光照培养。不同波长的光对细胞的分裂和器官的分化也有影响。红光对杨树愈伤组织的生长有促进作用,而蓝光则有抑制作用。

第二节 细胞全能性和器官分化

高等植物是由无数不同形态、不同生理生化特点及执行不同功能的细胞构成。一部分细胞继续保持分生能力,如分生组织;而另一部分细胞失去分生能力而执行其它功能,如永久组织。植物组织培养就不仅能使处于分生状态的细胞继续保持分裂和分化能力,同时也能使永久组织的细胞恢复分裂能力,如同生殖细胞或合子胚一样。

一、植物细胞的全能性及脱分化

一个植物细胞能产生一个完整植株的固有称之谓细胞的全能性(cell totipotency)。换句话说,细胞全能性是指植物细胞具有全套遗传信息,不管是性细胞还是体细胞,在特定环境下仍能进行表达,而产生一个独立完整的个体。

对植物细胞而言,只要有一个完整的膜系统和一个有生命力的核,即使是已经高度成熟和分化的细胞,也还保持着恢复到分生状态的能力,其恢复过程取决于该细胞原来所处的自然部位及生理状态。一个已停止分裂的成熟细胞转变为分生状态并形成未分化的愈伤组织的现象叫脱分化。一个已分化的细胞若要表现其全能性首先要经历脱分化过程,然后再经历分化过程。

组织培养中,利用特定的条件,促进细胞脱分化,即原已分化并具有一定功能的植物细胞脱离原有轨道,失去原有状态和功能而恢复到未分化的愈伤组织状态,这就是植物组织培养中的去分化或脱分化过程。然后经过继代培养,通过人为控制又可产生分化,产生分生组织,继而分化出根、芽或胚状体(embryoid)。把这种原已分化的细胞,经脱分化培养后再次分化的现象叫再分化。其过程为:

植物体 $\xrightarrow{\text{脱分化}}$ 愈伤组织 $\xrightarrow{\text{再分化}}$ 生长点或胚状体 $\xrightarrow{\text{生长}}$ 根 \rightarrow 小植株

在有些情况下,再分化也可不经愈伤组织阶段,而直接产生胚状体。

二、植物细胞全能性的实现

参考陈正华(1986)用图式来表示生命周期、细胞周期和组织培养周期之间的关系,以图 1-1 表示。

图中 A 循环表示生命周期,它包括孢子体和配子体世代交替,即从种子到种子。B 循环表示细胞周期,包括核质互换、DNA 复制、转录及翻译、细胞分裂、细胞全能性的形成和保持。C 循环是组织培养周期,从人工切取植物体部分器官、组织和细胞,失去与原母体的

联系,在无菌条件下,靠人为补给的营养物质和植物激素等,使其处于异养状态,而经历脱分化和再分化过程,成为能自养的个体而再进入 A 循环。C 循环可与 B 循环结合,繁殖具有特殊遗传性状或目的基因的个体,而后再进入 A 循环。

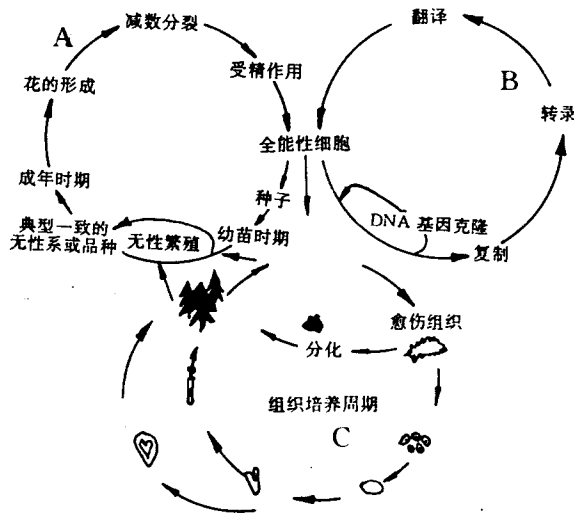


图 1-1 生命周期、细胞周期和组织培养周期之间的关系示意图

三、植物离体分化过程的类型

罗士韦(1978)根据植物组织培养再分化过程的类型不同,将其分为以下 5 种类型。

(一) 无菌短枝型

又称节培法或微型扦插法。此法最早见于 Gralzy(1969)的报道,他将待繁殖的材料剪成带一叶的单芽茎段,转入成苗培养基,一定时间后可成苗,再剪成带一叶的单芽茎段,继代又可成苗。这是试管苗繁殖最常用的,也是其他方法最后阶段的常用方法,但繁殖初期速度较慢。

(二) 丛生芽增殖型

茎尖或初代培养的芽,在适宜的培养基上诱导,不断发生腋芽,而成丛生芽,然后转生根培养基,诱导生根成苗,扩大繁殖。

(三) 器官发生型

从植物叶片、子房、花药、胚珠、叶柄等,诱导出愈伤组织,从愈伤组织上诱导不定芽。

(四) 胚状体发生型

从植物叶片、子房、花药、未成熟胚等诱导体细胞胚胎发生,其发生和成苗过程类似于胚或种子。这种胚状体具有数量多,结构完整,易成苗和繁殖速度快的特点,是植物离体无性繁殖最快方法,也是人工种子和细胞工程的前提,受到国内外的普遍重视。

(五) 原球茎型

大部分兰花的培养属于这一类型。原球茎是一种类胚组织,培养兰花类的茎尖或腋芽可直接产生原球茎,可以分化成植株,也可以继代增殖产生新的原球茎,这取决于培养条件和培养基。

第三节 培养基的配制

植物组织培养的成功与否,除培养材料本身的因素外,第二个因素就是培养基。其种类和成分直接影响到培养材料的生长,故应根据培养植物的种类和部位,选择适宜的培养基。

一、常用培养基主要特性

(一)高盐成分的培养基

包括 MS、LS、BL、BM、ER 等培养基。它应用最广泛,其钾盐、铵盐及硝酸盐含量均较高,微量元素种类全。

(二)硝酸钾含量较高的培养基

包括 B₅、N₆、LH、GS 等培养基。

1. B₅ 培养基 B₅ 培养基除含有较高的钾盐外,还含有较低的铵态氮和较高的盐酸硫酸素,较适合南洋杉、葡萄及豆科与十字花科植物等的培养。

2. N₆ 培养基 N₆ 培养基,系我国学者创造(朱至清等,1975),获国家发明二等奖,适用于单子叶植物花药培养,柑桔花药培养也适合,在楸树、针叶树等的组织培养中使用效果也好。

3. SH 培养基 是矿盐浓度较高的一种培养基,其中铵与磷酸是由磷酸二氢铵(NH₄H₂PO₄)提供的。

(三)中等无机盐含量的培养基

1. H 培养基 本培养基大量元素约为 MS 培养基的一半,仅磷酸二氢钾及氯化钙稍低,微量元素种类减少,而含量较 MS 为高,维生素种类比 MS 多。适于花药培养。

2. 尼奇培养基(Nitsch 1969) 与 H 培养基成分基本相同,仅生物素比 H 培养基高 10 倍。也适合于花药培养。

3. 米勒培养基(Miller 1963) 与 Blaydes(1966)培养基二者成分完全相同。适合大豆愈伤组织培养和花药培养等用。

(四)低无机盐的培养基

大多情况下用于生根培养基。有以下几种:

1. 改良怀特培养基(White 1963)。

2. WS 培养基(Wolter & Skoog 1966)。

3. 克诺普液(Knop 1965) 花卉培养上用得多。

4. 贝尔什劳特液(Berthelot 1934)。

5. HB 培养基(Holley & Baker 1963) 此培养基在花卉脱毒培养和木本植物的茎尖培养中效果良好。其成分是大量元素比 1/2 克诺普液稍多,微量元素用贝尔劳什特液,每升培养基中加 0.5ml。

二、培养基的配制方法

(一)母液的配制和保存

需要经常配制培养基,为减少工作量,方便工作,一般配成比所需浓度高10~100倍的母液。每种药品称量一次,可以使用多次,并可减少多次称量所造成的误差。

在配制大量元素无机盐母液时,要防止在混合各种盐类时产生沉淀,为此各种药品必须在充分溶解后才能混合,同时在混合时要注意先后次序,把钙离子(Ca^{2+})、锰离子(Mn^{2+})、钡离子(Ba^{2+})和硫酸根(SO_4^{2-})、磷酸根(PO_4^{3-})离子错开,以避免相互结合生成硫酸钙、硫酸钡、磷酸钙或磷酸锰沉淀。配制母液时,要用重蒸馏水等纯度较高的水。药品应采用等级较高的化学纯CP(三级)及分析纯AP(二级),以免所带杂质对培养物造成不利影响。药品的称量及定容都要准确,最好有两人校正,以避免因一次的差错而造成的多次失误。

现以MS培养基为例,说明母液的配制方法。可参照表1-1进行称量、溶解、配制,每称好一种药剂即应作一记号,以免重复搞错。

表 1-1 MS 培养基母液的配制

(单位:mg)

母液 编号 种类	成 分	规定量	扩大倍数	称取量	母液体积 (ml)	配一升培养 基吸取量 (ml)
1 大量 元素	KNO_3	1 900	10	19 000	1 000	100
	NH_4NO_3	1 650	10	16 500		
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	10	3 700		
	KH_2PO_4	170	10	1 700		
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	10	4 400		
2 微量 元素	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	100	2 230	1 000	10
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	100	860		
	H_3BO_3	6.2	100	620		
	KI	0.83	100	83		
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	100	25		
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	100	2.5		
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	100	2.5		
3 铁 盐	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	37.3	100	3 730	1 000	10
	$\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	27.8	100	2 780		
4 维 生 素	甘氨酸	2.0	50	100	500	10
	盐酸硫胺素	0.4	50	20		
	盐酸吡哆素	0.5	50	25		
	烟 酸	0.5	50	25		
	肌 醇	100	50	5 000		

配制好的母液应分别贴上标签,在2~4℃的冰箱中贮存。激素与有机类物质贮存要求较严,故贮存时间不宜过长,无机盐母液最好在一个月之内用完。如发现有霉菌和沉淀产生,就不能再使用。

有些药品在配制时不溶于水,可以加热并不断搅拌促使溶解。萘乙酸、吲哚乙酸、赤霉素、2,4-D等生长素和玉米素可先用少量95%酒精溶解,然后加水,如溶解不完全再加