

# 园艺植物 组织培养

YUANYI ZHIWU  
ZUZHI PEIYANG

孟凡娟 黄凤兰 编著

东北林业大学出版社

# 园艺植物组织培养

孟凡娟 黄凤兰 编著

東北林業大學出版社

---

图书在版编目 (CIP) 数据

园艺植物组织培养/孟凡娟, 黄凤兰编著. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2007.4

ISBN 978-7-81076-999-0

I. 园… II. ①孟… ②黄… III. 园林植物—组织培养 IV. S68

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 056381 号

---

责任编辑: 付 佳

封面设计: 彭 宇



NEFUP

园艺植物组织培养

Yuanyi Zhiwu Zuzhi Peiyang

孟凡娟 黄凤兰 编著

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

哈尔滨市节能印刷厂印装

开本 787 × 960 1/16 印张 12.25 字数 200 千字

2007 年 4 月第 1 版 2007 年 4 月第 1 次印刷

印数 1—1 000 册

ISBN 978-7-81076-999-0

S·464 定价: 21.00 元

## 《园艺植物组织培养》编委会

- 主 编 孟凡娟 (东北林业大学)  
黄凤兰 (内蒙古民族大学)
- 副主编 郝中娜 (浙江省农业科学院)  
牛红云 (黑龙江省农垦职业技术学院)  
焦兴启 (大庆市绿化工程有限责任公司)
- 参 编 张 弢 (莱阳农学院)  
曲彦婷 (黑龙江省科学院自然资源研究所)

# 前 言

目前, 生物技术正在世界突飞猛进地发展, 并且在医学、农业、食品工业、能源工业、环境保护等各个领域显示出极大的生产潜力。作为生物技术有力手段的组织培养技术, 也日益受到重视。组织培养在农林作物的脱毒快繁、突变诱发、细胞工程和基因工程等方面都可以发挥作用。现在已不能确切统计有多少种植物通过组织培养的方法获得了再生植株, 几乎每天都有可能出现利用新的植物种类获得培养成功的报道。植物组织培养已经变成了一种常规的实验技术, 广泛应用于植物的脱毒、快繁、基因工程、细胞工程、遗传研究、次生代谢物质的生产、工厂化育苗等方面; 从高级的研究机构、大专院校到普通的生物技术公司, 甚至农民专业户都在不同程度地利用或开展组织培养工作。

总之, 组培技术的广泛应用给我国农林生产带来革命性的变化。希望本书中所编写的植物组织培养的基本原理及其应用, 能引起读者的广泛兴趣, 并为各大专院校学生及科研院所的研究人员提供一些有益的参考和启迪。

本书的编写人员均来自各大院校及科研院所, 长期以来一直从事关于组织培养方面的研究。为了充分发挥各自的专长, 在编写这本书的过程中, 由黄凤兰执笔总论部分; 孟凡娟执笔各论部分的蔬菜植物的组织培养; 郝中娜、牛红云、焦兴启共同执笔果树植物的组织培养部分; 张弢、曲彦婷共同执笔花卉植物的组织培养部分。

编 者  
2007.01

## 目 录

## 总 论

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| 1 绪 论 .....                     | ( 3 )  |
| 1.1 植物组织培养发展简史 .....            | ( 3 )  |
| 1.2 园艺植物组织培养的应用前景及产业化前景分析 ..... | ( 5 )  |
| 2 植物组织培养的基础知识 .....             | ( 10 ) |
| 2.1 植物组织培养原理 .....              | ( 10 ) |
| 2.2 实验室和基本操作 .....              | ( 13 ) |
| 2.3 愈伤组织培养 .....                | ( 25 ) |
| 2.4 茎尖培养——植物脱毒技术 .....          | ( 29 ) |
| 2.5 微 繁 .....                   | ( 34 ) |
| 2.6 植物胚胎培养 .....                | ( 38 ) |
| 2.7 花粉与花药培养 .....               | ( 44 ) |
| 2.8 细胞培养 .....                  | ( 47 ) |
| 2.9 原生质体培养与体细胞杂交 .....          | ( 54 ) |

## 各 论

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| 3 蔬菜植物的组织培养 .....     | ( 69 )  |
| 3.1 茄果类蔬菜的组织培养 .....  | ( 69 )  |
| 3.2 十字花科蔬菜的组织培养 ..... | ( 80 )  |
| 3.3 瓜类蔬菜的组织培养 .....   | ( 93 )  |
| 3.4 葱蒜类蔬菜的组织培养 .....  | ( 104 ) |
| 3.5 其他蔬菜的组织培养 .....   | ( 108 ) |
| 4 果树植物的组织培养 .....     | ( 122 ) |
| 4.1 仁果类果树的组织培养 .....  | ( 122 ) |
| 4.2 浆果类果树的组织培养 .....  | ( 136 ) |
| 4.3 核果类果树的组织培养 .....  | ( 144 ) |
| 4.4 其他果树的的组织培养 .....  | ( 151 ) |
| 5 花卉植物的组织培养 .....     | ( 162 ) |

## 2 园艺植物组织培养

|                     |       |
|---------------------|-------|
| 5.1 草本花卉的组织培养 ..... | (162) |
| 5.2 木本花卉的组织培养 ..... | (174) |
| 5.3 其他花卉的组织培养 ..... | (180) |
| 参考文献 .....          | (185) |



# 总 论





# 1 绪 论

## 1.1 植物组织培养发展简史

植物组织培养与细胞培养开始于 19 世纪后半叶, 当时植物细胞全能性的概念还没有完全确定, 但基于对自然状态下某些植物可以通过无性繁殖产生后代的观察, 人们便产生了这样一种想法即能否将植物体的一部分在适当的条件下培养成一个完整的植物体。为此许多植物科学工作者开始了培养植物组织的尝试。最初的问题仍然集中在植物细胞有没有全能性和如何使这种全能性表现出来。

1839 年 Schwann 提出细胞有机体的每一个生活细胞在适宜的外部环境条件下都有独立发育的潜能。1853 年 Trecul 利用离体的茎段和根段进行培养获得了愈伤组织。1901 年 Morgan 首次提出一个全能性细胞应具有发育出一个完整植株的能力。White 指出: 如果一个给定的有机体的所有细胞都大致相同, 并具有全能性, 那么在有机体内所观察到的细胞分化必定是这些细胞对有机体内微环境和周围环境的反应。也就是说机体内每个细胞所以没有表现出全能性, 是因为该细胞所处位置的不同, 致使其某些功能被抑制 (Suppressed), 这充分说明机体内的微环境因素在细胞分化中起到十分重要的作用。按照现代发育生物学和细胞生物学的理论, 细胞分化是受基因在时间和空间两个方面的调控, 空间就是指细胞在机体内所处的位置。不同位置的细胞, 其基因的表达不同, 细胞所表现出的形态结构和行为就不同。如果将一个生活的细胞从植物体内分离出来, 使之脱离原有的环境, 细胞被抑制的功能将有望得以恢复, 重新表现出全能性。基于这种认识, 科学工作者便萌生出了植物组织培养的念头。

首次提出细胞培养概念 Haberlandt (1902), 也是第一个用人工培养基对分离的植物细胞进行培养的人, 与 rechingner 不同, Haberlandt 相信切块大小不会影响细胞增殖, 但由于 Haberlandt 使用的培养液成分简单, 培养的细胞是高度分化的细胞, 又没采取消毒技术, 所以实验失败, 培养的细胞虽然存活了几个月但没能分裂。Haberlandt 转而对损伤修复发生兴趣, 提出激素作用的概念 (Lepto hormone), 与维管组织特别是韧皮部有关; 另一类是创伤激素 (Wound

hormone), 与细胞损伤有关, 为后来激素理论的建立和在组织培养中的广泛应用奠定了基础。但自 Haberlandt 的实验到 1934 年 White 培养番茄离体根尖的成功, 这 30 多年里, 植物组织培养技术几乎没有什么进展。分析其原因, 主要就是培养基的成分和实验所选取的材料不够合适。

1934 年 White 用离体的番茄根建立了第一个活跃生长的无性系, 使根的离体培养实验首次获得了真正的成功, 并首次发现和提出 B 族维生素  $B_1$ 、维生素  $B_6$  和烟酸的重要性。与此同时, Cautheret 在山毛柳和黑杨形成层组织的培养中也发现了 B 族维生素的作用, 并使培养获得了成功。Nobecourt 也用胡萝卜建立了类似的连续生长的组织培养物。因此, Haberlandt、White 和 Nobecourt 一起被誉为植物组织培养的奠基人。人们现在所用的若干培养方法和培养基, 原则上都是他们在 1939 年所建立的方法和培养基演变的结果, 几乎所有的培养基中都添加了不同种类和不同数量的 B 族维生素。从此植物组织培养进入快速发展时期。1941 年, Overbeek、Conklin 和 Blakeslee 等用附加椰乳到培养基中, 获得了 *Datura* 离体胚培养的成功。椰乳成分复杂, 含有多种不同的有机物, 后来的研究发现, 其中在组织培养中起主要作用的是腺嘌呤类激素或类似物。1944 年, Skoog 报道 DNA 的降解产物腺嘌呤和腺苷可以促进愈伤组织的生长, 解除生长素对芽形成的抑制作用, 诱导芽的形成。1948 年, Caplin 和 Steward 用实验证明椰乳与 2, 4-D 配合, 对培养的胡萝卜和马铃薯组织的增殖起到明显的促进作用。在用烟草髓细胞诱导愈伤组织的实验中, Skoog、Miller 等分离确定了 6- 咪唑氨基嘌呤对细胞分裂有促进作用, 并命名为“激动素”(Kinetin)。之后, 与此相关的同系物 6- 苄氨基嘌呤被合成, 它也刺激培养物的细胞分裂。于是, 出现了“细胞分裂素”这一集合名词, 专门用来指能刺激培养物细胞分裂的一组 6- 某基团的氨基嘌呤化合物。尔后, 玉米素、异戊烯基腺嘌呤和其他细胞分裂素等植物激素的相继发现, 更增加了细胞分裂素的种类。由于发现生长素和细胞分裂素相互配合能调节细胞的分裂与分化, 控制器官的分化, 生长素高时可诱导根的形成, 细胞分裂素高时可促进芽的分化, 使植物组织培养的工作迅速取得突破。1958 年美国的 Steward 和德国的 Reinert 分别由培养的胡萝卜细胞诱导形成了胚状体, 1965 年由 Vasil 和 Hildebrandt 用单个分离的细胞培养获得整个植株的再生, 从而使植物细胞全能性的理论真正得到了科学的证实。从此之后, 一批又一批植物的组织或器官通过培养的方法获得了再生植株。

20 世纪 60 年代, 在植物组织培养方面的另外两项成就就是划分小孢子培养和原生质体培养的成功。Guha 和 Maheshwari (1966, 1967), Rourgin 和 Nitsch (1967) 先后利用烟草和胡萝卜的小孢子培养获得单倍体植株, 并成功地实现

了染色体的加倍,使这种同源二倍体植株在5个月内收获到种子。Cocking等用纯化的纤维素酶和果胶酶处理烟草细胞,获得原生质体,通过调节渗透压的方法控制原生质体膨胀,使培养获得成功,得到了再生植株。自20世纪60年代始,植物组织与细胞培养逐渐走向了工厂化和商品化阶段。

现在已不能确切统计有多少种植物通过组织培养的方法获得了再生植株,因为几乎每天都有可能出现利用新的植物种类获得培养成功的报道。植物组织培养已经变成了一种常规的实验技术,广泛应用于植物的脱毒、快繁、基因工程、细胞工程、遗传研究、次生代谢物质的生产、工厂化育苗等多个方面。从高级的研究机构、大专院校到普通的生物技术公司,甚至农民专业户都在不同程度的利用或开展组织培养工作。

植物组织培养已经走过了近百年的历程。它的历史不仅证明了植物的每一个生活细胞都含有一种植物的全部遗传信息,在一定的条件下可以发育成一个完整的植株,而且在一定范围内人们可以按照意愿,改变和调节植物的发育。但这种调节和改变只是局部的,主要是通过改变培养基中的激素和培养条件,从遗传基础上的彻底改造仅仅是个开始。但是,生命的奥秘是很深远的,科学家至今仍不能实现对所有植物的组织培养再生,基因型对组培成功的影响至今仍迷惑不解,而且对已经获得成功的植物,也还是有很多问题没有解决。即便像烟草和拟南芥这样的模式植物,也没能实现让它们在组培容器中遂愿地生长发育和开花结实。人们对植物的认识、了解和掌握,仍然处于必然王国阶段,单就其组织培养而言,还有十分漫长的道路要走。

## 1.2 园艺植物组织培养的应用前景及产业化前景分析

组织培养技术是农业高新技术中最重要、最活跃的领域之一,它不仅是农业继续发展的基础,而且是生物技术中应用最广、最具现实意义的领域,被誉为农业发展史上的第四次绿色革命,对解决经济和社会发展所面临的人口增长、农业资源匮乏、环境污染等重大问题,具有十分重要的战略意义。近年来,我国组培技术发展迅速,许多组培工厂应运而生,很有必要对其现状及产业化前景进行探讨。

### 1.2.1 园艺植物组培现状

#### 1.2.1.1 组培技术研究日益受到重视

当前,世界各国政府都十分重视组培技术研究。世界各国组织培养技术研究经费投入巨大,美国政府1989年就投资了60亿美元的研究开发经费,

1992 年投入科研经费达 42 亿美元。美国孟山都公司投资 1.65 亿美元兴建了生命科学研究中心, 英国也投巨资建立了植物研究中心。日本政府建立了“管、产、学”三位一体的组培技术联合开发体制, 仅 1990 年就拨款 100 亿日元, 企业资助 200 亿日元。我国政府也制定了“863”高新技术发展计划, 投资强度较高, “八五”期间每年投入 2 亿元人民币, 近年来在组培技术研究领域经费投入不断增加, 为我国组织培养产业化开发打下了坚实的基础。

### 1.2.1.2 组培技术应用领域十分广阔

#### (1) 采用脱毒技术使园艺植物大幅度提高产量和改善品质

很多作物因受病毒感染, 产量和质量下降, 有些创汇作物失去了国际贸易的竞争优势, 如大蒜、百合、薄荷等。利用脱毒技术可大幅度提高产量, 大蒜的蒜头直径由 4.7 cm 增加到 7.2 cm, 蒜头重由 29.2 g/个提高到 75.8 g/个。草莓经脱毒后增产 20% ~ 30%, 品质提高, 去毒苗生长快、长势旺, 茎叶粗壮, 抗病耐高温, 抗寒性能强, 延长寿命, 也是生产无公害食品的主要技术。我国近两年生产和推广脱毒薯解决了马铃薯退化问题, 无毒种薯已在主产区普及, 推广面积 667 万  $\text{hm}^2$ , 增产幅度在 30%, 每年增效 2.5 亿元人民币。脱毒马铃薯在日本、荷兰、越南等国也已大面积应用。日本草莓脱毒苗面积达 113 万  $\text{hm}^2$ , 占总面积的 80% 以上, 产量也提高 15% ~ 30%, 推广脱毒草莓 400 万  $\text{hm}^2$  可增加产值 11 亿日元。

#### 2. 无性系快繁技术使种苗繁殖速度和产量大幅度提高

由于试管苗繁殖周期短、繁殖系数高, 不受季节限制, 便于工厂化生产, 20 世纪 80 年代初, 在全世界范围内, 利用植物组织、细胞培养, 形成了一个新兴的产业, 如美国的兰花试管苗, 荷兰的花卉试管苗。据报道, 全球有 1000 多家组培公司。美国有 100 多家兰花组培公司, 年产值 5 000 ~ 6 000 万美元, 新加坡仅出口兰花组培苗一项年获利就达 500 多万美元, 泰国工业化生产兰花组培苗年产值也达到 650 万美元 (见表 1-1、表 1-2), 我国兰花生产情况见表 1-3。

表 1-1 近年来亚洲国家园艺植物试管苗生产情况

| 产品名称 | 年产量/万株 | 主产国                        |
|------|--------|----------------------------|
| 热带兰  | 3 800  | 泰国占 88%, 其次是新加坡、马来西亚、印度尼西亚 |
| 温带兰  | 600    | 日本、韩国                      |
| 温带花卉 | 1 300  | 日本、新加坡、韩国                  |

表 1-2 近年来欧美国家园艺植物试管苗生产情况

| 国家  | 规 模        | 年产量/万株 | 主要产品        |
|-----|------------|--------|-------------|
| 波兰  | 120 个组培室   | 2 000  | 非洲菊、观叶植物、百合 |
| 德国  | 4 个公司      | 1 500  | 月季、香石竹、苹果   |
| 匈牙利 | 17 个国家实验室和 | 400    | 观赏植物和蔬菜     |
| 俄罗斯 | 5 个私人组培室   | 6 000  | 近百种植物       |
| 荷兰  | 18 个组培室    | 1 000  | 近百种植物       |
| 意大利 | 67 个实验室    | 1 000  | 桃、苹果、梨、李、樱桃 |
| 美国  | 35 个实验室    | 2 000  | 花卉与观叶植物     |

表 1-3 1995 ~ 1999 年我国兰花试管苗生产情况

| 年份   | 幼苗种苗/万株 | 成苗 + 开花株/万株 | 试管苗/万株 |
|------|---------|-------------|--------|
| 1995 | 974     | 398         | 18.7   |
| 1996 | 946     | 443         | 23.4   |
| 1997 | 956     | 525         | 39.6   |
| 1998 | 998     | 598         | 78.1   |
| 1999 | 1 341   | 678         | 256.8  |

在 20 世纪 80 年代初,由国家科委和广西壮族自治区联合投资建成了第一个甘蔗试管苗工厂,年产苗达 200 万株,推广面积 114 万  $\text{hm}^2$ ,相比对照增产 2 815  $\text{t}/\text{hm}^2$ ,增加产值 8 000 万元/年。近年来,广东、广西在试管繁殖香蕉苗方面也达到了产业化生产水平,在广大农户中已普及种植试管苗并出口国外,获得了较好的经济效益。自 1960 年 Morel 成功地对兰花进行组织培养以来,目前已发展到大约有 35 属 150 种兰科植物可用组织培养技术进行工厂化生产。

#### 1.2.1.3 组培苗产业化存在的问题

##### (1) 技术问题

主要是培养基的配方问题和继代过程中小植株的遗传变异问题。由于组培技术朝产业化方向发展,经营者们过多考虑自身经济效益而不愿意提供优良品种进行关键技术交流。由于优良品种瓶苗难以获得、品种基数太小、外植体诱导时间长等原因导致种苗生产难以满足生产需求。

##### (2) 规模问题

当前许多地方盲目建设组培工厂,使得组培室多而乱,效益低下。科研



院所、示范园、乡镇都在搞组培，组培规模越来越大，但实际利用率很低，造成人财物的极大浪费，根本无效益可言，另外在布局上也不合理，简单重复现象严重。

### 3. 高成本问题

在组培种苗工厂化生产过程中，最突出的问题是成本过高，特别是能耗偏高、投入资金较大，加大了种苗成本，导致见效慢。

### 4. 市场开拓问题

组培苗具有快速、无毒优势，但是工厂化生产后若没有市场，会导致产品积压，生产停止。长期如此，瓶苗将失去生命力，最终导致失败。

#### 1.2.1.4 组培苗产业化生产前景

组培的快繁、脱毒优势明显，随着组织培养技术的不断完善，显微分辨力的提高，以及分子生物学、分子遗传学的研究不断深入，特别是在当前农业产业结构调整，开展新一轮农业科技革命的大背景下，其发展前景广阔。

##### 1. 在花卉种苗产业化生产方面

花卉是 21 世纪的希望产业，是人类社会经济发达与文明程度的重要标志，我国花卉需求量每年以 35% ~ 40% 的速度递增。在花卉生产方面种苗质量在栽培效果中的重要性在 50% 以上，因此花卉种苗工厂化生产是花卉种苗生产的主要途径，今后可主要生产以下几类品种：观叶植物，主要品种有花叶万年青、花叶芋、绿巨人、朱蕉、龟背竹等；木本花卉，主要品种有微型月季、比利时杜鹃、金边瑞香等；草本花卉，主要品种有大花惠兰、蝴蝶兰、国兰、百合花、非洲菊、非洲紫罗兰、一品红、红掌、彩色马蹄莲、大岩桐等。

##### 2. 在蔬菜种苗脱毒方面

马铃薯、食用百合、大蒜等是人们餐桌上的主要蔬菜品种，消费量和种植面积很大，也是我国出口创汇的主要品种。随着种植年限的增加，这些品种受病毒感染严重，产量、品质下降，运用组培脱毒可迅速恢复品种种性，提高生产力。这些品种的组培苗在市场上很受欢迎，进行工厂化生产经济效益可观。

##### 3. 在瓜果组培苗产业化生产方面

草莓果实中所含的鞣化酸具有抗癌效果，草莓易于栽培、产量高、经济效益好，在江浙一带发展迅速。草莓易感染各种病毒病，感病果实畸形、品质差，一般减产 30% ~ 80%。对草莓进行热处理一分生组织培养脱毒，种植去病毒苗可增产 15 000 kg/hm<sup>2</sup>，并且品质提高。甜瓜以肉质细脆、香气浓郁、味道甘甜而深受人们喜爱，种植效益较高，但长期种植会退化和混杂。



从大田壮植株上取嫩梢作为外植体可组培生产出优良种苗，其生产性状优于种子苗。欧亚葡萄是当前最热门的葡萄品种，果粒大、甜度高、价格昂贵，经济效益高。从国外引进不久，种苗基数小，价格贵，运用组培快繁技术大量生产具有良好的发展前景。

## 2 植物组织培养的基础知识

### 2.1 植物组织培养原理

#### 2.1.1 植物组织培养基本原理

广义的组织培养是指在无菌条件下利用人工培养基对植物组织、器官、悬浮细胞和原生质体等进行培养,使其再生植株的过程。植物组织培养从20世纪30年代开始,经历了探索阶段、奠基阶段和迅速发展时期,现在技术已经比较成熟。

组织培养的基本原理即细胞的全能性。所谓全能性,就是说任何具有完整细胞核的植物细胞,都拥有形成一个完整植株所必需的全部遗传信息。植物细胞和动物细胞在结构上有若干区别,同样它们在生理特性上也不完全一样。动物细胞的分化一般都是不可逆的,植物细胞则不然,只要具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,也还保持着回复到分生状态的能力。基于这个原理,如果我们对一个含有完整细胞核的植物细胞进行培养,理论上讲应该能够获得一个完整植株。一个单细胞再生完整植株的过程是:由离体的单细胞增殖成愈伤组织,之后将愈伤组织在培养基上继代,接下来促进愈伤组织分化和增殖、诱导茎芽生根,最后将再生的植株移栽。

#### 2.1.2 植物组织培养概念及专业术语

##### 2.1.2.1 再生

再生是指组织、器官、悬浮细胞和原生质体经培养后获得植株的过程。

##### 2.1.2.2 外植体

外植体是指植物组织培养中,由活植物体上切取下来进行培养的对象,如组织、器官、细胞和原生质体等。

##### 2.1.2.3 愈伤组织

愈伤组织原是指植物在受伤之后于伤口表面形成的一团薄壁细胞。在组织培养中,则是指在人工培养基上由外植体长出来的一团无序生长的薄壁细