

高职高专农林牧渔类工学结合系列教材

植物 组织培养



| 石玉波 刘和平 主编



P Plant Tissue Culture



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

高职高专农林牧渔类工学结合系列教材

植物组织培养

主 编 石玉波(嘉兴职业技术学院)

刘和平(阳江职业技术学院)

副 主 编 李 军(嘉兴职业技术学院)

张 平(嘉兴职业技术学院)

参 编 林剑波(阳江职业技术学院)

陈 勇(阳江职业技术学院)

王 娟(嘉兴碧云花园有限公司)

张俊丽(阳江职业技术学院)



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

植物组织培养 / 石玉波, 刘和平主编. —杭州:
浙江大学出版社, 2018. 5
ISBN 978-7-308-18086-3

I. ①植… II. ①石… ②刘… III. ①植物组织—组
织培养—高等教育—教材 IV. ①Q943. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 058199 号

植物组织培养

石玉波 刘和平 主编

策划编辑 阮海潮
责任编辑 阮海潮(ruanhc@zju.edu.cn)
责任校对 舒莎珊
封面设计 春天书装
出版发行 浙江大学出版社
(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)
(网址: <http://www.zjupress.com>)
排 版 杭州星云光电图文制作有限公司
印 刷 浙江良渚印刷厂
开 本 787mm×1092mm 1/16
印 张 11.5
字 数 287 千
版 次 2018 年 5 月第 1 版 2018 年 5 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978-7-308-18086-3
定 价 35.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行中心联系方式: 0571-88925591; <http://zjdxbs.tmall.com>

前 言

本教材是根据高职高专园林园艺类专业教学内容和课程体系改革的要求,以培养高素质技能型专门人才为目标,以强化组培快繁技术应用能力为主线,本着理论与实践相结合、科学性与实用性相结合的原则编写而成的。在教材体系构建上,根据植物组织培养完整的工作流程和工厂化育苗生产、管理、经营等环节,以项目及其典型工作任务为导向组织教学,提出学习目标,实行教、学、做一体化,突出能力培养,强化实验与技能考核,以利于教学实施。在教学内容选择上,围绕高职院校毕业生就业岗位(群)对知识、能力和素质的要求,以植物组织快速繁殖、脱毒苗生产为主线,突出植物组织培养技术应用,素材选择贴近生产实际,并反映植物组织培养技术的发展方向和生产中正在应用的新技术、新方法、新材料。

本教材内容丰富,图文并茂,技术方法详细具体,实用性强。全书内容分为七个项目,分别是植物组织培养概述、植物组织培养的基本条件、植物组织培养基本操作技术、植物器官培养技术、植物脱毒技术与种质资源的离体保存、植物组培苗工厂化生产与管理 and 植物组织培养技术的应用。在内容选取以及编写过程中充分考虑生产实践的需要,将植物组织培养的理论知识与实践技能紧密结合起来。教材中设置的典型工作任务,其工作流程绝大多数来源于企业实际生产,学生通过相应实验操练后,能够直接将学习内容应用于实际工作岗位,可实现教学与科研(生产)零对接。

本教材由长期从事相关内容教学的骨干教师和企业技术专家共同编写。由石玉波、刘和平担任主编并进行统稿,编写具体分工为:项目一、项目二、项目三(任务一)由石玉波编写;项目三(任务二)由张俊丽编写;项目三(任务三)、项目五(任务一至任务三)由李军编写;项目四(任务一至任务五)由陈勇、林剑波编写;项目四(任务六)、项目五(任务四)由王娟编写;项目六以及实验内容由张平编写;项目七由刘和平编写。本教材在编写过程中,引用了许多参考文献的文字和图片,在此向原作者致谢。

由于时间仓促和编者的业务水平有限,书中错误在所难免,敬请读者提出宝贵意见,以供再版时修正。

编 者

目 录

项目一 植物组织培养概述	(1)
任务一 植物组织培养的基本概念及理论依据	(1)
任务二 植物组织培养的类型及特点	(3)
任务三 植物组织培养的发展及研究热点	(5)
任务四 植物组织培养的应用	(7)
【知识小结】	(11)
【复习测试题】	(12)
项目二 植物组织培养的基本条件	(14)
任务一 植物组织培养实验室	(14)
任务二 植物组织培养常用的仪器设备	(17)
实验 2-1 植物组织培养实验室设计及常用设备仪器的使用	(24)
实验 2-2 器皿及用具的洗涤与环境消毒	(24)
【知识小结】	(26)
【复习测试题】	(26)
项目三 植物组织培养基本操作技术	(28)
任务一 培养基及其制备	(28)
任务二 无菌操作技术	(39)
任务三 植物组织培养中常见问题与解决措施	(50)
实验 3-1 MS 培养基母液的配制及保存	(57)
实验 3-2 固体培养基的配制与灭菌	(59)
实验 3-3 外植体的预处理与消毒技术	(61)
实验 3-4 无菌操作技术	(63)
实验 3-5 试管苗的继代扩繁技术	(64)
实验 3-6 试管苗的生根培养	(66)
实验 3-7 试管苗褐化与污染现象观察	(67)
【知识小结】	(68)
【复习测试题】	(69)
项目四 植物器官培养技术	(73)
任务一 根的培养	(73)
任务二 茎尖和茎段培养	(75)
任务三 叶的培养	(78)
任务四 花器官和种子的培养	(81)

任务五 胚胎培养	(82)
任务六 试管苗的驯化与移栽	(84)
实验 4-1 茎段培养技术	(86)
实验 4-2 叶片培养技术	(88)
实验 4-3 花药培养技术	(89)
实验 4-4 胚培养技术	(90)
实验 4-5 试管苗的驯化与移栽	(91)
【知识小结】	(94)
【复习测试题】	(95)
项目五 植物脱毒技术与种质资源的离体保存	(97)
任务一 脱毒苗培育的意义	(97)
任务二 常见的脱毒方法	(98)
任务三 脱毒苗的鉴定	(103)
任务四 脱毒苗的保存与繁殖	(106)
任务五 种质资源离体保存	(108)
实验 5-1 植物茎尖剥离与培养	(113)
实验 5-2 脱毒苗的指示植物鉴定	(114)
实验 5-3 试管苗的生长抑制剂保存	(115)
【知识小结】	(116)
【复习测试题】	(117)
项目六 植物组培苗工厂化生产与管理	(119)
任务一 组培苗生产计划的制订与实施	(119)
任务二 生产工艺流程与技术环节	(123)
任务三 组培苗生产成本核算与效益分析	(127)
任务四 组培苗工厂化生产管理与经营	(129)
实验 6-1 植物组培苗育苗工厂规划设计	(132)
实验 6-2 植物组培苗生产成本核算与效益分析	(133)
【知识小结】	(134)
【复习测试题】	(134)
项目七 植物组织培养技术的应用	(136)
任务一 花卉的组培快繁技术	(136)
任务二 林木的组培快繁技术	(151)
任务三 果树脱毒与快繁技术	(155)
任务四 药用植物组培快繁技术	(161)
【知识小结】	(175)
【复习测试题】	(175)
参考文献	(176)

项目一 植物组织培养概述



知识目标

- 掌握植物组织培养的概念、类型及特点；
- 了解植物组织培养的基本原理,理解细胞全能性理论；
- 了解植物组织培养的发展及应用。



教学素材

植物组织培养技术是 20 世纪初,以植物生理学为基础发展起来的一门生物技术学科。这一学科的建立和发展,对植物科学的各个领域如细胞学、胚胎学、遗传学、生理学、生物化学、植物病理学、发育生物学等的发展均有很大的促进作用,并在科学研究和生产应用上开辟了多个令人振奋的新领域。20 世纪 60 年代以后,植物组织培养技术研究发展迅速,并逐渐进入大规模应用阶段,广泛应用于植物的快速繁殖、植物品种改良、基因工程育种、种质资源保存、次生代谢产物生产等方面,为现代农业和医药等领域带来了巨大的经济效益和社会效益。

任务一 植物组织培养的基本概念及理论依据

一、植物组织培养的概念

植物组织培养(简称组培)是指在无菌和人工控制的环境条件下,将植物的外植体(胚胎、器官、组织、细胞或原生质体)培养在人工培养基上,使其再生发育成完整植株的技术。由于培养的植物材料脱离了植物母体,所以又称为植物离体培养。

无菌是指物体或局部环境中无活的微生物存在,这是进行组织培养的基本要求。在组织培养中,只有植物材料、培养基、培养器皿均处于无菌条件下,并通过人工控制适宜的温度、光照、湿度、气体等,才能使植物材料在离体条件下正常生长和发育。一切用于植物组织培养的接种材料均称为外植体。从理论上说,所有的植物细胞与组织材料都能培养成功。但实际上接种的外植体不同,培养的难易程度也不同。

二、植物组织培养的基本理论

(一)植物细胞的全能性

在植物有性繁殖过程中,一个受精卵经过一系列的细胞分裂和分化形成各种组织、器官,进而发育成为具有完整形态、结构和机能的植株,表明受精卵具有该物种的全部遗传信

息。由合子分裂产生的体细胞同样具备全能性。植物细胞全能性的概念是 1902 年由德国著名植物生理学家戈特利布·哈布兰特(Gotlieb Haberlandt, 1854—1945)首先提出来的。Haberlandt 认为,植物的体细胞含有本物种的全部遗传信息,具有发育成完整植株的潜能。因此,每个植物细胞都与胚胎一样,能经过离体培养再生出完整的植株。

植物细胞的全能性是指生活着的每个细胞中都含有产生一个完整机体的全套基因,在适宜的条件下能够形成一个新个体的潜在能力。植物体的所有细胞都来源于一个受精卵的分裂。当受精卵均等分裂时,染色体进行复制,这样分裂形成的 2 个子细胞里均含有与受精卵相同的遗传物质。因此,尽管经过不断的细胞分裂所形成的千千万万个子细胞在分化过程中会形成根、茎、叶等不同器官,但它们具有相同的基因组成,都携带着保持本物种遗传特性所需要的全套遗传物质,即在遗传上具有全能性。因此,只要培养条件适宜,离体培养的细胞就有发育成一株植物的潜在能力。1943 年,美国人 White 在进行烟草愈伤组织培养实验时,偶然发现了形成的一个芽,也证实了 Haberlandt 的观点。

植物细胞全能性的潜在能力可以理解为,在自然状态下,细胞在植物体内所处位置及生理条件不同,其细胞的分化受各方面因素的调控与限制,致使其所具有的遗传信息不能全部表达出来,只能形成某种特化细胞,构成植物体的一种组织或一种器官的一部分,表现出一定的形态和生理功能,但其全能性的潜力并没有丧失。

细胞全能性的表达能力与细胞分化的程度呈负相关,从强到弱依次为:生长点细胞、形成层细胞、薄壁细胞、厚壁细胞(木质化细胞)、特化细胞(筛管、导管细胞)。老化的细胞基因表达会受到制约,致使其功能丧失或功能基因表达不完整。

(二)植物细胞全能性与再生性的实现

要证实植物细胞的全能性,需要解决两个问题,一是离体单细胞增殖,二是从单细胞增殖的组织发育成完整植株。第一个问题在发展细胞培养装置后得到解决。人们先后发展了四种培养方式:振荡培养、平板培养、悬浮培养和悬滴培养。在细胞培养的基础上赖纳特(Reinert)和斯图尔德(Steward)报道了胡萝卜悬浮培养细胞和愈伤组织形成体细胞胚,首次用实验科学地论证了植物细胞全能性。细胞全能性表达的条件:细胞离体、无菌、一定的营养物质、植物激素和适宜的外界条件。也就是说,细胞在脱离原来所在器官或组织成为离体状态,不再受原植物的控制,在一定的营养、激素和外界条件的作用下,细胞的全能性才能得到充分表现,细胞开始分裂增殖、产生愈伤组织,继而分化器官,并再生形成完整的植株。

成熟植物细胞在离体条件下,经过脱分化、细胞分裂、再分化 3 个阶段才能形成完整的植株。但在某种情况下,再分化可以直接发生在脱分化的分生细胞中,期间不需生成愈伤组织,可直接分化出芽或根,形成完整植株。细胞的分化是指细胞的形态结构和功能发生永久性的适度变化的过程。细胞分化是组织分化和器官分化的基础,是离体培养再分化和植株再生得以实现的基础。脱分化是由高度分化的植物器官、组织或细胞产生愈伤组织的过程。细胞脱分化的难易程度与植物种类和器官及其生理状况有很大关系,一般单子叶植物、裸子植物比双子叶植物难,成年细胞和组织比幼龄细胞和组织难,单倍体细胞比二倍体细胞难,茎、叶比花难。再分化是指脱分化产生的愈伤组织重新分化成根或芽等器官的过程,表现为由无结构和特定功能的细胞转变为具有一定结构、执行一定功能的组织和器官,从而构成一个完整的植物体或植物器官。愈伤组织是植物细胞经脱分化不断增殖形成的一团不规则的、具有分生能力而无特定功能的薄壁组织。它既可以在人工培养基上培养形成,也可以在

自然生长条件下在机械损伤或微生物损伤的伤口处产生。在人工培养基上,愈伤组织的形成是一个内、外环境因素相互作用的结果。

在植物中很多是靠种子生长来产生完整的植株,但也有不少可通过根、茎、叶等器官再生而成为完整的植株,这种特性叫细胞的再生性。从植株分离出根、茎、叶的一部分器官,其切口处组织受到了损伤,但这些受伤的部位往往会产生新的器官,长出不定芽和不定根,人们利用这一特点来进行营养繁殖。新器官产生的原因是受伤的组织产生了创伤激素,促进了周围组织的生长而形成愈伤组织,凭借内源激素和储藏营养的作用,就产生了新的器官。而在自然条件下,一些植物的营养器官和细胞难以再生主要是由内源激素调整缓慢或不完全,外界条件不易控制等因素所致。在人工控制的条件下,通过对培养基的调整,特别是对激素成分的调整,这些营养器官和细胞就有可能顺利地再生。植物组织培养植株再生过程如图 1-1 所示。



图 1-1 植物组织培养植株再生过程示意

任务二 植物组织培养的类型及特点

一、植物组织培养的类型

根据培养材料(外植体)、培养过程以及培养基的物理形态,可将植物组织培养分为以下几种类型。

(一)根据培养材料划分

1. 植株培养

对具有完整植株形态的幼苗进行无菌培养的方法称为植株培养。一般多以种子为材料,以无菌播种诱导种子萌发成苗。

2. 胚胎培养

对植株成熟或未成熟胚以及具胚器官进行离体培养的方法称为胚胎培养。胚胎培养常用的材料有幼胚、成熟胚、胚乳、胚珠或子房等。

3. 器官培养

器官培养指分离根(根尖、根段)、茎(茎尖、茎段)、叶(叶片、叶原基、叶柄、子叶)、花(花瓣、花药、花粉)、果实、种子等作为外植体,在人工合成的培养基上培养,使其发育成完整的植株。

4. 组织培养

分离植物体的各部分组织(如分生组织、形成层组织或其他组织)来进行培养或从植物器官培养产生的愈伤组织来培养,通过分化诱导最后形成植株。这是狭义的组织培养。

5. 细胞培养

细胞培养是对植物的单个细胞或较小的细胞团的离体培养。常用的细胞培养材料有性细胞、叶肉细胞、根尖细胞和韧皮部细胞等。

6. 原生质体培养

原生质体培养是对除去细胞壁的原生质体的离体培养,包括原生质体、原生质融合体和原生质体的遗传转化体的培养等。

(二)根据培养过程划分

1. 初代培养

初代培养是对外植体进行的第一次培养,也称为启动培养或诱导培养。其目的是建立无菌培养物,通常是诱导外植体产生愈伤组织、不定芽、原球茎,或直接诱导侧芽和顶芽萌发,这是植物组织培养中比较困难的阶段。

2. 继代培养

继代培养是将培养一段时间后的外植体或产生的培养物转移到新鲜培养基中继续培养的过程,也叫增殖培养。其目的是防止培养材料老化,或培养基养分耗尽而造成营养不良,以及代谢物过多积累而产生毒害的影响,使培养物能够大量繁殖,并顺利地生长、分化,长成完整的植株。

3. 生根培养

生根培养是指诱导无根组培苗产生根,形成完整植株的过程。其目的是提高组培苗移栽后的成活率。

(三)根据培养基态相划分

1. 固体培养

固体培养是指将培养物放在固体培养基上进行培养。固体培养基是在培养基中加入一定量的凝固剂(多为琼脂),使培养基在常温下固化,这是最常用的组织培养方法。

2. 液体培养

液体培养是将培养物放在液体培养基中进行培养。液体培养包括悬浮培养、振荡培养和纸桥培养等方法。

培养基中加入一定量的凝固剂,加热溶解后,分别装入培养用的容器中,冷却后即得到固体培养基。凡不加凝固剂的即液体培养基。琼脂是常用的凝固剂,适宜浓度为6~10g/L。固体培养基所需设备简单,使用方便,只需一般化学实验室的玻璃器皿和可供调控温度与光照的培养室。但使用固体培养基时,培养物固定在一个位置上,只有部分材料表面与培养基接触,不能充分利用培养容器中的养分,而且培养物生长过程中排出的有害物质的积累,会造成自我毒害,必须及时转移。液体培养基则需要转床、摇床之类的设备,通过振荡培养,给培养物提供良好的通气条件,有利于外植体的生长,避免了固体培养基的缺点。

二、植物组织培养的特点

植物组织培养是在人工控制的环境条件下,采用纯培养的方法离体培养植物的器官、组织、细胞和原生质体,既不受外界环境条件和其他生物的影响,也不受植物体其他部分的干扰。随着植物组织培养技术研究的发展,不仅从理论上为相关学科提出了可靠的试验证据,而且一跃成为一种大规模、批量工厂化生产种苗的新方法。该技术具有以下特点。

(一)培养材料经济,来源广泛

在植物组织培养中,植物的单个细胞、小块组织、根、茎、叶、花、果实和种子等各种器官

或完整植株都可以作为外植体,材料来源十分广泛,特别是取一些茎尖部位的材料,只需要几毫米甚至不到 1mm 长度。这些材料均来自遗传性一致的植株个体,培养获得的细胞、组织、器官或小植株等各种水平的无性系具有相同遗传背景,纯度高,将它们用于生物学研究,可极大地提高实验的精度。

(二)培养条件可人为控制,便于周年生产

组织培养采用的植物材料完全是在人为提供的培养基和小气候环境条件下进行生长,摆脱了大自然中四季、昼夜的变化以及灾害性气候的不利影响,且条件均一,对植物生长极为有利,便于稳定地进行周年培养生产。

(三)生长周期短,繁殖速度快

植物组织培养由于人为控制培养条件,根据不同植物不同部位的不同要求而提供不同的培养条件,因此生长较快。另外,植株也比较小,培养时间短,往往 20~30d 为一个周期。所以,虽然植物组织培养需要一定设备及能源消耗,但由于植物材料能按几何级数繁殖生产,总体来说成本低廉,且能及时提供规格一致的优质种苗或脱病毒种苗。一些濒危植物及珍稀材料,依靠常规的无性繁殖方法,需要几年或几十年才能繁殖出为数不多的苗木,而用植物组织培养方法可在 1~2 年内生产上百万株整齐一致的优质种苗。植物组织培养也能够解决有些植物产种子少或无的难题。

(四)管理方便,有利于自动化控制和工厂化生产

植物组织培养是在一定的场所和环境条件下,人为提供一定的温度、光照、湿度、营养、激素等条件进行培养。这种方式极利于高度集约化和高密度工厂化生产,也利于自动化控制生产。它是未来农业工厂化育苗的发展方向。它与盆栽、田间栽培等相比省去了中耕除草、浇水施肥、防治病虫害等一系列繁杂劳动,可以大大节省人力、物力及田间种植所需要的土地,有效提高了劳动生产率,有利于自动化控制和工厂化生产。

任务三 植物组织培养的发展及研究热点

植物组织培养的研究开始于 1902 年德国植物生理学家 Haberlandt,至今已经有 100 多年的历史,其发展过程经历了探索、奠基和迅速发展 3 个阶段。

一、探索阶段(20 世纪初至 30 年代中期)

18 世纪 30 年代,德国科学家 Schleiden 和 Schwann 认为细胞是一切植物及动物结构的基本组成单位,即细胞学说。1902 年,另一位德国植物生理学家 Haberlandt 提出细胞全能性学说,首次尝试对植物细胞进行体外培养并提出细胞培养的概念,毋庸置疑地成为“植物组织培养之父”。细胞全能性的提出为植物组织培养技术的产生奠定了理论基础,人们开始对植物组织培养的各个方面进行大量的探索研究。

1904 年,Hanning 在无机盐和蔗糖溶液中对萝卜和辣根菜的胚进行研究,结果发现离体胚可以充分发育成熟,并萌发形成小苗。1922 年,Haberlandt 的学生 Kotte 和美国的 Robins 分别报道离体培养根尖获得某些成功,这是有关根培养的最早试验。Laibach 将由亚麻种

间杂交形成的幼胚在人工培养基上培养成熟,从而证明了胚培养在植物远缘杂交中利用的可能性。1933年,我国学者李继桐和沈同培养银杏的离体胚时,将银杏胚乳提取物加入培养基,促进了胚的生长。

在 Haberlandt 试验后的约 30 年中,由于知识和技术的局限,对影响植物组织和细胞增殖及形态发生能力的因素尚未研究清楚,除了在胚和根的离体培养方面取得一些结果外,植物组织培养技术发展缓慢。

二、奠基阶段(20 世纪 30 年代末期至 50 年代中期)

直至 1934 年,美国植物生理学家 White 利用无机盐、蔗糖和酵母提取液组成的培养基成功实现番茄根尖离体培养,建立了第一个活跃生长的无性系。同年,法国植物学家 Gautheret 在山毛柳和黑杨等形成层组织的培养中发现了 B 族维生素的作用,又在 1939 年连续培养胡萝卜形成层获得成功。1937 年,White 又以小麦根尖为材料,研究了光照、温度、培养基组成等各种培养条件对根生长的影响,发现了 B 族维生素对离体根生长的作用,并用吡哆醇、硫胺素、烟酸 3 种 B 族维生素取代酵母提取液,建立了第一个由已知化合物组成的培养基,该培养基后来被定名为 White 培养基。在这个人工合成培养基上,他将 1934 年建立起来的根培养物一直保存到 1968 年他逝世前不久,共继代培养了 1600 多代。

与此同时,法国植物学家 Gautheret 在研究山毛柳和黑杨等植物的形成层组织培养试验中,提出了 B 族维生素和生长素对组织培养的重要意义,并于 1939 年在连续培养胡萝卜根形成层试验上获得首次成功。同年,法国植物病理学家 Nobécourt 利用胡萝卜根成功建立连续生长的组织培养物,一系列的成就标志着植物组织培养技术正式建立。同年,White 用烟草种间杂种的瘤组织,Nobécourt 用胡萝卜均建立了与上述类似的连续生长的组织培养物。1943 年,White 出版了专著《植物组织培养手册》(*A Handbook of Plant Tissue Culture*),使植物组织培养开始成为一门新兴的学科。White、Gautheret 和 Nobécourt 三位科学家被誉为植物组织培养学科的奠基人。

19 世纪五六十年代是新技术高速涌现、现有技术快速发展的时代,期间,植物组织培养技术也经历了从细胞、组织离体培养到完整植株再生的发展过程,不仅如此,其背后的生物学过程也受到越来越多的关注。从 1948 年开始,美国学者 Skoog 和我国学者崔激等人在烟草茎切段和髓培养以及器官形成的研究中发现,植物激素、磷酸盐等外源物质比例的平衡对于植物的组织培养及再生都有着极为重要的意义。

1952 年,Morel 和 Martil 首次通过茎尖分生组织的离体培养,从已受病毒侵染的大丽花中获得脱毒植株。1953 年,Muir 将万寿菊和烟草的愈伤组织转移到液体培养基中,放在摇床上振荡,获得由单细胞和细胞团组成的悬浮培养物,并成功继代培养。在寻找促进细胞分裂的物质过程中,Miller 等人于 1956 年发现了激动素。不久即知道激动素可以代替腺嘌呤促进发芽,并且效果可增加 3 万倍。随后,活力更高的细胞分裂素被发现并被应用于组织培养中,使得该技术如虎添翼,迅猛发展。这些发现,有力地推动了植物组织培养的发展。1957 年,Skoog 和 Miller 提出通过改变细胞分裂素与生长素的比例,调节植物的器官形成。1958 年,英国学者 Steward 等报道以胡萝卜根韧皮部细胞为材料培养,形成了体细胞胚,并使其发育成完整植株,也证实了 Haberlandt 的细胞全能性理论。

在这一发展阶段,通过对培养基成分和培养条件的广泛研究,特别是对 B 族维生素、生

长素和细胞分裂素作用的研究,确立了植物组织培养的技术体系,并首次用试验证实了细胞全能性,为以后的快速发展奠定了基础。

三、迅速发展阶段(20 世纪 60 年代至今)

20 世纪 60 年代以后,植物组织培养进入了迅速发展时期,研究工作更加深入,从大量物种诱导获得再生植株,形成了一套成熟的理论体系和技术方法,并开始大规模生产应用。

1960 年,Cocking 用真菌纤维素酶分离番茄原生质体获得成功,开创了植物原生质体培养和体细胞杂交的研究工作。同年,Kanta 在植物试管受精研究中首次获得成功,Morel 利用茎尖培养的方法,脱去兰花病毒,且繁殖系数极高。这一技术导致了欧洲、美洲和东南亚许多国家兰花产业的兴起。

1962 年,美国科学家 Murashige 和 Skoog 发表了适用于烟草愈伤组织快速生长且至今依然广泛使用的 MS 培养基,为植物组织培养技术的持续发展奠定了重要基础。1964 年,印度 Guha 等成功地由毛叶曼陀罗花药培养获得单倍体植株,这一发现掀起了采用单倍体育种技术来加快常规杂交育种速度的热潮。1965 年,Vimla Vasil 和 Hildebrandt 通过改善培养及再生条件,成功得到离体培养的烟草细胞再生出的完整植株,细胞全能性再次得到了证实。在组织培养这样一个对激素等人工环境动态依赖的过程被逐渐认识之后,对于这个动态过程所涉及的一系列宏观及微观的稳定性的研究也逐渐成为热点。

1969 年到 1973 年间,Heinz 和 Mee 报道了甘蔗组织培养再生植株中出现的各种形态学变异。1970 年,Carlson 通过离体培养筛选得到烟草生化突变体。同年,Power 首次成功实现原生质体融合。1971 年,Takebe 等首次由烟草原生质体获得了再生植株,这一成功促进了体细胞杂交技术的发展,同时也为外源基因的导入提供了理想的受体材料。1972 年,Carlson 等利用硝酸钠进行了两个烟草物种之间的原生质体融合,获得了第一个体细胞种间杂种植株。1974 年,Kao 等建立了原生质体的高 Ca^{2+} 、高 pH 值的 PEG 融合法,将植物体细胞杂交技术推向新阶段。

1978 年,Murashige 提出了“人工种子”的概念,之后的几年在世界各国掀起了“人工种子”的开发热潮。1968 年和 1978 年,Nishi 和 Henke 等分别报道了水稻再生植株中出现的如分蘖数、穗长、株高等表型变异,之后关于水稻组织培养诱导产生的表型变异以及小麦、燕麦、大麦、玉米、天竺葵、苜蓿等其他物种中经历组织培养过程进而产生表型变异的研究层出不穷。近二三十年,我国植物组织培养研究工作取得很大的成就,例如,从花药诱导出许多优良的水稻、小麦、烟草等品种,在花药培养和单倍体育种上,一直处于国际领先水平。应用组织培养快繁技术,繁殖了大量优良的甘蔗、香蕉、菠萝、杨树、桉树和花卉种苗,对农业、林业生产做出了较大的贡献。

任务四 植物组织培养的应用

植物组织培养已发展为生物科学的一个广阔领域,是生物技术的重要组成部分,其应用也越来越广泛,在植物快速繁殖、无病毒种苗生产、花药培养、单倍体育种、胚胎培养、细胞培养、植物次生代谢产物生产、植物细胞突变体筛选、原生质体培养、体细胞胚胎发生和人工种

子制作、组织细胞培养物超低温保存及种质库建立等方面都有很重要的作用。其主要应用于以下几个领域。

一、植物离体快速繁殖

植物离体快速繁殖是植物组织培养在生产上应用最广泛、产生较大经济效益的一项技术。其商业性应用始于 20 世纪 60 年代,法国的 Morel 用茎尖培养的方法大量繁殖兰花获得成功,从此揭开了植物快速繁殖技术研究和应用的序幕。美国兰花产业兴起于 20 世纪 70 年代。目前,世界上 80%~85% 的兰花是通过组织培养进行脱毒和快速繁殖的。在我国,同类的研究始于 20 世纪 70 年代。

通过离体快繁可在较短时期内迅速扩大植物的数量,在合适的条件下每年可繁殖出几百万乃至上百万倍的幼苗。如 1 个草莓芽 1 年可繁殖 1 亿个芽,1 个兰花原球茎 1 年可繁殖 400 万个原球茎,1 株葡萄 1 年可繁殖 3 万株。快繁技术加快了植物新品种的推广,以前靠常规方法推广一个新品种要几年甚至十多年,而现在快的只要 1~2 年就可在世界范围内应用和普及,对繁殖系数低的“名、优、新、奇、特”植物品种的推广更为重要。

全世界组培苗的年产量从 1985 年的 1.3 亿株猛增到 1991 年的 5.13 亿株,现在已超过 10 亿株。如美国的 Wyford 国际公司设有 4 个组培室,研究和培育出的新品种达 1000 余个,年产观赏花卉、蔬菜、果树及林木等组培苗 3000 万株;以色列 Benzur 公司年产观赏植物组培苗 800 万株;印度 Harrisons Malayalam 有限公司年产观赏植物组培苗 400 万株。

组培快繁技术不受季节等条件的限制,可周年生产,具有生长周期短、繁殖速度快、苗木整齐一致等优点。植物组培快繁技术在我国也得到了广泛的应用,到目前为止已报道有上千种植物的快速繁殖获得成功,培养的植物种类也由观赏植物逐渐发展到园艺植物、大田作物、经济植物和药用植物等,其中兰花、红掌、马蹄莲、甘薯、草莓、香蕉、甘蔗、桉树、非洲菊等经济植物已开始工厂化生产。

二、植物脱毒苗木培育

植物在生长过程中几乎都要遭受到病毒不同程度的危害,尤其是无性繁殖的植物,如感染病毒病后,代代相传,严重地影响了产量和品质,给生产带来严重的损失。如草莓、马铃薯、甘薯、葡萄、香蕉等植物感染病毒后会造成产量下降、品质变劣;兰花、菊花、百合、康乃馨等观赏植物受病毒危害后,会造成产花少、花小、花色暗淡,大大影响其观赏价值。

自 20 世纪 50 年代发现采用茎尖培养方法可除去植物体内的病毒以来,脱毒培养就成为解决病毒病危害的主要方法。由于植物生长点附近的病毒浓度很低甚至是无病毒,切取一定大小的茎尖分生组织进行培养,再生植株就可能脱除病毒,从而获得脱毒苗。脱毒苗恢复了原有优良种性,生长势明显增强,整齐一致。如脱毒后的马铃薯、甘薯、甘蔗、香蕉等植物可大幅度提高产量,改善品质,最高可增产 300%,平均增产也在 30% 以上;兰花、水仙、大丽花等观赏植物脱毒后植株生长势强,花朵变大,产花量上升,色泽鲜艳。目前利用组织培养脱除植物病毒的方法已广泛应用于花卉、果树、蔬菜等植物上,并建立了脱毒苗的繁殖系数。

三、植物新品种培育

植物组织培养技术为育种提供了更多的手段和方法,使育种工作在新的条件下更有效地开展。

(一)花药和花粉培养

通过花药或花粉培养可获得单倍体植株,不仅可以迅速获得纯的品系,更便于对隐性突变的分离,较常规育种大大地缩短了育种年限。到目前已有几百种植物的花药培养成功,一些作物已利用花粉单倍体育出了新品种并应用于大面积生产。印度科学家应用这种方法培育的水稻品系,比对照产量提高 15%~49%。韩国先后育成了 5 个优质、抗病、抗倒伏的水稻品种。我国自 20 世纪 70 年代开始该领域的研究,已经培育了 40 余种由花粉或花药发育成的单倍体植株,其中有 10 余种为我国首创。玉米获得了 100 多个纯合的自交系;橡胶获得了二倍体和三倍体植株。仅“九五”期间就育成高产、优质、抗逆、抗病的农作物新品种 44 个,种植面积超过 660 万 hm^2 。1974 年我国科学家用单倍体育成世界上第一个作物新品种——烟草“单育 1 号”,之后又育成水稻“中花 8 号”、小麦“京花 1 号”及大量花培新品系。

(二)胚培养

胚培养是组织培养中最早获得成功的技术。在远缘杂交中,杂交后形成的胚珠往往在未成熟状态下就停止生长,不能形成有生活力的种子,导致杂交不孕,这使得植物的远缘杂交常难以成功。采用胚的早期培养可以使杂交胚正常发育,产生远缘杂交后代,从而育成新品种。如苹果和梨杂交种、大白菜与甘蓝杂交种、栽培棉与野生棉的杂交种等,胚培养已在 50 多个科、属中获得成功。利用胚乳培养可获得三倍体植株,再经过染色体加倍获得六倍体,进而育成生长旺盛、果实大的多倍体植株。

(三)细胞融合

通过原生质体的融合,可部分克服有性杂交不亲和性,从而获得体细胞杂种,创造新物种或优良品种。自 1960 年英国学者 Cocking 首次利用纤维素酶从番茄幼苗的根分离原生质体获得成功以来,到 1990 年已有 100 种以上植物的原生质体能再生植株。我国获得了 30 余个品种的原生质体再生植株,其中包括难度较大的重要粮食作物和经济作物,如大豆、水稻、玉米、小麦、高粱、棉花等。在木本植物、药用植物、蔬菜和真菌原生质体培养方面的进展也十分迅速。国外已先后获得了种内及种间的体细胞杂种植株。植物原生质体培养还可应用于外源基因转移、无性系变异及突变体筛选等研究,因而越来越受到人们的重视。

(四)选择细胞突变体

离体培养的细胞处于不断的分裂状态,容易受到培养条件和外界物理、化学等因素的影响而发生变异,从中可以筛选出对人们有用的突变体,进而育成新品种。现已获得一批抗病虫、抗盐、高赖氨酸的突变体,有些已用于生产。植物细胞突变体的筛选最早始于 1959 年,Melchers 在金鱼草悬浮细胞培养中获得了温度突变体。1970 年,Carlson、Binding 和 Heimer 等分别分离出烟草营养缺陷型细胞、矮牵牛抗链霉素细胞系及烟草抗苏氨酸细胞系。迄今为止,已经在不少于 15 个科 45 个种的植物细胞培养中筛选出 100 个以上的植物细胞突变体或变异体,其中包括抗病细胞突变体、抗氨基酸及其类似物细胞突变体、抗逆境胁迫细胞突变体、抗除草剂细胞突变体及营养缺陷型细胞突变体、株高突变体的筛选。

(五)植物基因工程

植物基因工程是在分子水平上有针对性地定向重组遗传物质,改良植物性状,培育优质高产作物新品种的技术手段。它大大缩短了育种年限,提高了工作效率,为人类开辟了一条诱人的植物育种新途径。迄今为止,已获得转基因植物百余种。植物基因转化的受体除植物原生质体外,愈伤组织、悬浮细胞也都可以作为受体。几乎所有的基因工程研究最终都离不开植物组织培养技术和方法的应用,它是植物基因工程必不可少的技术手段。

四、植物次生代谢产物生产

利用植物组织或细胞的大规模培养,可以生产一些天然有机化合物,如蛋白质、糖类、脂肪、药物、香料、生物碱及其他生物活性物质等。这些次生代谢产物往往具有一些特定的功能,对人类有重要的影响和作用。目前次生代谢产物的生产主要集中在制药工业中一些价格高、产量低、需求量大的化合物上(如紫杉醇、长春碱、紫草宁等),其次是油料(如小豆蔻油、春黄菊油)、食品添加剂(如生姜、洋姜等)、色素、调味剂、饮料、树胶等。

五、植物种质资源的离体保存

种质资源是农业生产的基础,常规的植物种质资源保存方法耗资巨大,种质资源流失的情况也时有发生。通过抑制生长或超低温储存的方法离体保存植物种质,可节约大量的人力、物力和土地,还可挽救那些濒危物种。如一个 0.28m^3 的普通冰箱可存放 2000 支试管苗,而容纳相同数量的苹果植株则需要近 6hm^2 土地。离体保存可避免病虫害侵染和外界不利气候及其栽培因素的影响,不仅有利于种质资源材料的远距离交换,还可以防止种质的遗传变异和退化,可以长期保存无病毒的原种。

六、人工种子

人工种子是模拟天然种子的基本构造,利用人工种子包被植物组织培养中得到的体细胞胚。人工种子在自然条件下能够像天然种子一样正常生长,它可为某些珍稀物种、转基因植物、自交不亲和植物、远缘杂种的繁殖提供有效的手段。

1958 年,Reinert 在胡萝卜的组织培养中最先发现了体细胞胚胎(胚状体)。据不完全统计,能大量产生胚状体的植物有 43 科 92 属 100 多种。一些重要作物如水稻、小麦、玉米、珍珠谷等,也能通过离体培养产生胚状体。这些胚状体用褐藻酸钠等包埋,再加上人工种皮,就形成了人工种子。人工种子的优点是:繁殖快速,成苗率极高;不受气候影响,四季皆可工厂化生产。20 世纪 80 年代初,美、日、法等国家相继开展了人工种子的研究,我国也于“七五”期间开展了此项研究,并于 1987 年将其列入了国家“863”高技术研究发展计划。

植物组织培养技术作为生物科学的一项重要技术,已经渗透到生物科学的各个领域,它为研究植物细胞、组织分化以及器官形态建成规律提供了实验条件,促进了植物遗传、生理生化、病理学的深入研究。随着科学技术的发展,组织培养技术的应用范围将日趋广泛,将发挥越来越重要的作用。

知识小结

※植物组织培养的概念

植物组织培养简称组培,是指在无菌和人工控制的环境条件下,将植物的外植体(胚胎、器官、组织、细胞或原生质体)培养在人工培养基上,使其再生发育成完整植株的技术。由于培养的植物材料脱离了植物母体,所以又被称为植物离体培养。

※植物组织培养的类型

1. 根据培养材料分:植株培养、胚胎培养、器官培养、组织培养、细胞培养、原生质体培养。
2. 根据培养过程划分:初代培养、继代培养、生根培养。
3. 根据培养基态相划分:固体培养、液体培养。

※植物组织培养的特点

1. 培养材料经济,来源广泛。
2. 培养条件可人为控制,便于周年生产。
3. 生长周期短,繁殖速度快。
4. 管理方便,有利于自动化控制和工厂化生产。

※植物组织培养的基本原理

1. 植物细胞的全能性:植物体的每个具有完整细胞核的细胞,都拥有该物种的全部遗传信息,具有形成完整植株的潜在能力。
2. 细胞全能性的实现条件:细胞要与完整植株分离;给予适宜的培养条件;产生脱分化与再分化。
3. 细胞全能性的实现途径:脱分化、再分化、形态建成。

※植物组织培养的发展阶段

1. 探索阶段。
2. 奠基阶段。
3. 迅速发展阶段。

※植物组织培养的应用

1. 植物离体快速繁殖。
2. 植物脱毒苗木培育。
3. 植物新品种培育。
4. 植物次生代谢产物生产。
5. 植物种质资源的离体保存。
6. 制造人工种子。
7. 促进生物科学其他学科的发展。