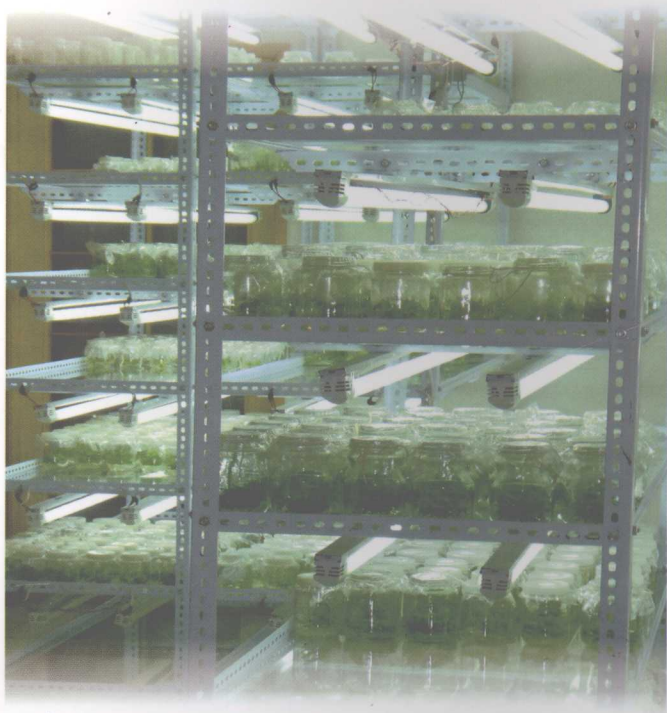


高 等 学 校 教 材

李胜 李唯 主编

植物组织培养 原理与技术

Theory and Technology of Plant Tissue Culture



化学工业出版社

植物组织培养既是植物遗传工程的基础和关键环节之一,也是一种实用性极强的高新技术。本教材系统、全面地介绍了植物组织培养的基本概念、基本原理、基本操作技术以及研究方法等,贯穿全书的一条主线是基本原理与应用实践的紧密结合,每一章都从基本原理-实践结合-研究进展出发,突出了实用性。

本书由绪论和另外六章组成。绪论介绍了植物组织培养的概念、目的、发展历史及目前的研究动向等。其余章节分别从植物组织培养的理论基础和特点出发,介绍了植物细胞全能性的概念和离体条件下植物细胞分化再生的机理,以及离体培养中的遗传、变异及调控。其次又重点介绍了植物不同部分的组织和器官培养、与植物组织培养理论原理和实践密切结合的次生代谢物的生产及其相联系的细胞培养。另外也重点讲述了在植物组织培养原理的基础上,利用植物细胞工程技术手段和基因工程的手段在体细胞杂交和转基因研究过程中取得的成就,以及在代谢调控和遗传改良方面的进展等。

本书适用于生物科学类、植物生产类、草业科学类、森林资源类、环境生态学等各专业不同层次学生作为教材使用,也适用于相关行业科研人员作为参考书使用。

图书在版编目(CIP)数据

植物组织培养原理与技术/李胜,李唯主编. —北京:化学工业出版社, 2007.10

高等学校教材

ISBN 978-7-122-01233-3

I. 植… II. ①李…②李… III. 植物-组织培养-高等学校-教材
IV. Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 151826 号

责任编辑:梁静丽 李植峰

文字编辑:张春娥

责任校对:陶燕华

装帧设计:史利平

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 装:北京云浩印刷有限责任公司

787mm×1092mm 1/16 印张16½ 字数406千字 2008年1月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价: 29.00 元

版权所有 违者必究

编写人员

主 编 李 胜 (甘肃农业大学)

李 唯 (甘肃农业大学)

副主编 杨 宁 (西北师范大学)

杨德龙 (甘肃农业大学)

编写人员名单 (按汉语拼音排序)

李 胜 (甘肃农业大学)

李 唯 (甘肃农业大学)

王雅梅 (甘肃农业大学)

吴 兵 (甘肃农业大学)

武国凡 (西北师范大学)

杨 宁 (西北师范大学)

杨德龙 (甘肃农业大学)

前 言

植物组织培养问世已 100 多年。近 40 多年来,其发展非常迅猛,成为当代生物科学中最有生命力的学科之一,相继在农业、林业、工业和医药业等行业建立了一批企业,产生了巨大的经济效益和社会效益。同时,植物组织培养也是现代生物技术和现代农业技术的重要组成部分。

目前,我国从事植物组织培养的人员的数量和实验室总面积均居世界第一。近年来,我国的试管繁殖技术已进入成熟阶段,并诞生了数百个植物组织培养企业。尽管如此,随着全球经济一体化以及我国加入 WTO,我国的植物组织培养技术必须与国际接轨,才能体现其时代的特点与要求。

我们在多年从事本科生与研究生教学以及多年的系统理论研究的基础上,组织这方面的专家与学者,立足于植物组织培养的理论基础,结合植物组织培养与其他相关学科的交叉应用与研究,综合提出了植物组织培养原理与技术的编写任务。目的是为本科生与研究生的植物组织培养教学提供更为适用的教材,为生物技术专业自考本科和高职高专类相关课程提供教学参考资料,也为从事这方面研究的专家学者提供一定的参考。

本书概述了植物组织培养的发展历史,每一发展阶段研究形成新的理论与原理;列举了成熟的组培技术在目前农业及相关产业中的应用实例;介绍了植物细胞培养及植株再生技术在农作物品种选育、次生代谢产物生产和基因转化中的应用原理等。本书共分七章,编写分工如下:第一章 绪论(李胜);第二章 植物组织培养原理及特点(李胜);第三章 离体培养中的遗传和变异(王雅梅);第四章 植物组织器官培养(杨德龙,李胜,李唯);第五章 植物细胞培养及次生代谢物的生产(吴兵,李胜);第六章 植物体细胞杂交(杨宁,李胜);第七章 植物基因遗传转化及其转基因受体系统(武国凡,李胜)。

本书在编写过程中得到了有关研究单位和大专院校专家的支持,特别是化学工业出版社的大力支持,在此一并致谢。

因水平有限,时间仓促,本书不妥之处在所难免,敬请批评指正。

李 胜

2007 年 7 月于兰州

目 录

第一章 绪论	1
一、植物组织培养的定义和目的	1
二、植物组织培养发展简史	1
三、植物组织培养的研究动向	4
四、植物离体快繁的意义	6
五、我国规模化、企业化组织培养的特点和问题	6
参考文献	7
第二章 植物组织培养原理及特点	8
第一节 培养基的组成和配制	8
一、培养基的营养成分	8
二、培养基的种类	11
三、培养基母液的配制	12
四、培养基的配制	13
第二节 植物组织培养的原理	14
一、植物细胞的全能性	14
二、决定作用与形态发生感受态	16
三、植物离体分化再生途径	19
第三节 植物试管苗的生根	19
一、植物试管苗的生根机理	20
二、培养基成分及 pH 对试管苗生根的影响	22
三、培养微环境对试管苗生根的影响	28
四、外植体类型与生根的关系	29
第四节 植物试管苗玻璃化现象及其防治	31
一、试管苗玻璃化现象发生的普遍性	31
二、玻璃化苗的形态解剖学特征	32
三、玻璃苗的生理生化特点	33
四、玻璃化苗发生的因素	34
五、玻璃化苗发生的机理	36
六、玻璃化苗的综合防治	37
第五节 植物病毒的脱除和鉴定	38
一、病毒的危害	38
二、脱病毒的方法	39
三、无病毒植物的鉴定	45
第六节 植物试管苗的移栽	48
一、试管苗移栽后易于死亡的原因	48

二、提高试管苗移栽成活率的技术和措施	52
第七节 植物组织培养的特点	54
参考文献	55
第三章 离体培养中的遗传和变异	59
第一节 概述	59
一、植物细胞全能性	59
二、植物体细胞无性系变异	59
第二节 体细胞无性系变异的细胞学和分子遗传学基础	63
一、体细胞无性系变异的细胞学基础	63
二、体细胞无性系变异的分子遗传学基础	66
第三节 体细胞无性系变异的诱导与选择	70
一、体细胞无性系变异的诱导	70
二、体细胞无性系筛选的方法	74
三、体细胞无性系变异的检测	79
四、突变体筛选的利弊	81
参考文献	83
第四章 植物组织器官培养	85
第一节 植物组织器官离体培养的途径与方法	85
一、植物组织器官离体培养的途径	85
二、植物组织器官离体培养的方法	86
第二节 愈伤组织的诱导分化技术及其应用	87
一、愈伤组织的形成和增殖	88
二、影响愈伤组织培养的因素	90
三、愈伤组织的再分化	95
四、愈伤组织诱导分化的应用	103
五、操作实例	104
第三节 花药培养技术及其应用	105
一、花药培养的程序	105
二、花药植株的诱导和发育途径	106
三、影响花药培养的因素	106
四、游离小孢子（花粉）培养	116
五、花粉植株的遗传鉴定与染色体加倍	117
六、花药培养的应用	119
七、操作实例	120
第四节 胚乳培养技术及其应用	121
一、胚乳培养的程序	121
二、胚乳愈伤组织的诱导和建立	122
三、影响胚乳培养的因素	122
四、胚乳植株的再生方式	125
五、胚乳培养中的组织学和细胞学特点	127

六、胚乳培养的应用	129
七、操作实例	130
第五节 胚培养技术及其应用	130
一、胚培养的种类	131
二、胚培养的主要技术	132
三、影响胚培养的因素	133
四、早熟萌发	139
五、胚培养的成苗途径	140
六、胚培养的应用	142
七、操作实例	144
第六节 离体无性快繁技术及其应用	144
一、离体无性快繁优点	144
二、离体无性快繁的途径和方法	145
三、离体无性繁殖的操作程序	147
四、茎尖培养和芽培养	148
五、离体无性快繁中应注意的问题	150
六、操作实例	153
参考文献	154
第五章 植物细胞培养及次生代谢物的生产	166
第一节 植物细胞培养	166
一、植物细胞培养技术发展历史及其现状	166
二、植物细胞培养类型	166
三、植物细胞培养过程中的重要影响因素及其调控	171
四、植物细胞培养存在的问题及对策	174
第二节 植物细胞培养生产次生代谢物	174
一、植物细胞次生代谢产物的多样性及其应用意义	175
二、植物细胞大规模培养系统生产	177
三、植物细胞培养生产次生代谢物的流程	178
四、植物细胞培养生产次生代谢物的关键环节	179
五、植物细胞培养生产次生代谢物的影响因素	180
六、提高植物细胞培养生产次生代谢物产量的方法	183
七、利用植物细胞培养生产次生代谢物实例	185
参考文献	187
第六章 植物体细胞杂交	189
第一节 体细胞杂交概述	189
一、植物体细胞杂交的历史与现状	189
二、植物体细胞杂交的重要性和局限性	189
三、体细胞杂交的步骤	192
第二节 原生质体的融合	192
一、原生质体的融合类型	192

二、原生质体的融合方法	192
三、化学诱导融合的机制	195
第三节 杂种细胞的选择和体细胞杂种鉴定	196
一、体细胞融合产物的类型	196
二、融合产物的细胞学特征	198
三、杂种细胞的选择系统	198
四、体细胞杂种的鉴定	203
五、体细胞杂种的遗传特性	208
第四节 细胞质杂种	208
第五节 体细胞杂交技术的应用	209
一、体细胞杂交创造新的遗传变异	209
二、体细胞杂交进行抗病、抗虫和抗逆育种	210
三、体细胞杂交用于细胞质雄性不育性状的研究	210
四、体细胞杂交用于定向转移胞质基因控制性状及核质互作的研究	211
五、操作实例	211
参考文献	213
第七章 植物基因遗传转化及其转基因受体系统	215
第一节 植物基因遗传转化概述	215
一、植物基因工程概述	215
二、植物基因转化的方法	217
三、农杆菌介导的植物基因转化	220
第二节 植物转基因受体系统的条件	228
一、高效稳定的再生能力	229
二、稳定的遗传特性	230
三、稳定的外植体来源	230
四、对选择压力敏感	231
五、对农杆菌侵染的敏感性	232
第三节 植物转基因受体系统的类型及其特性	232
一、愈伤组织再生系统	232
二、直接分化再生系统	233
三、原生质体再生系统	234
四、胚状体再生系统	234
五、生殖细胞受体系统	235
第四节 植物转基因受体系统的建立	236
一、高频再生系统的建立	236
二、最佳培养基的选择	238
三、抗生素敏感性试验	239
四、农杆菌的敏感性试验及菌种的选择	240
第五节 植物转基因受体系统常见问题和解决办法	240
一、试管苗的玻璃化现象	240

二、褐变.....	240
三、白化苗的产生.....	245
四、试管苗的移栽成活率.....	245
参考文献.....	245
附录 植物组织培养常用培养基	248

第一章 绪 论

一、植物组织培养的定义和目的

植物组织培养 (plant tissue culture) 是指在无菌条件下, 将离体的植物器官 (根、茎、叶、花、果实、种子等)、组织 (如形成层、花药组织、胚乳、皮层等)、细胞 (体细胞和生殖细胞) 以及原生质体培养在人工配制的培养基上, 并给予适当的培养条件, 使其长成完整的植株的过程。用于培养的植物体或一部分器官、组织、细胞、细胞器叫做外植体 (ex-plant), 并且可在人工控制条件下, 使其按照人们意愿去分化或产生所需的部分或产物, 为人类造福。

二、植物组织培养发展简史

(一) 国际植物组织培养发展简史

1. 萌芽阶段 (20 世纪初至 30 年代中)

在 Schleiden 和 Schwann 创立的细胞学说基础上, 1902 年, 德国植物生理学家 Haberlandt 提出, 人们可以培养植物的体细胞成为人工胚。当时他培养了小野芝麻、凤眼兰的叶肉组织、万年青属植物的表皮细胞等, 但限于技术和水平, 培养未能成功。但这对植物组织培养的发展起了先导作用, 在技术上也是一个良好开端。

1922 年, Haberlandt 的学生 Kötte 和美国的 Robbins 采用无机盐、葡萄糖和各种氨基酸培养豌豆和玉米的茎尖, 结果形成缺绿的叶和根, 能进行有限生长。

1925 年, Laibach 将亚麻种间杂交不能成活的胚取出培养, 使其成熟, 继而萌发。

2. 奠基阶段 (20 世纪 30 年代末到 50 年代中)

1934 年, 美国植物生理学家 White 培养番茄的根, 建立了活跃生长的无性繁殖系, 并能进行继代培养, 在以后的 28 年间转接培养 1600 代仍能生长。他利用根系培养物, 研究了光照、温度、pH 和培养基的组成对根生长的影响。1937 年, 他发现了 B 族维生素对离体根生长有重要作用, 并首先配制成综合培养基。同年, 法国的 Cautheret 和 Nobecourt 培养块根和树木形成层使其生长。White、Cautheret 和 Nobecourt 确立的植物组织培养的基本方法成为以后各种植物组织培养的技术基础。1941 年, Van Overbeek 等在基本培养基上附加椰乳 (CM), 使曼陀罗的心形胚离体培养能成熟。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, 使植物组织培养开始成为一门新兴学科。

1948 年, Skoog 和我国学者崔激在烟草茎切段和髓培养以及器官形成研究中, 发现嘌呤或腺苷可以解除吲哚乙酸 (IAA) 对芽形成的抑制, 并诱导成芽, 从而确定嘌呤/IAA 的比例是控制根和芽形成的条件。1955 年, Miller 等发现了激动素, 比嘌呤活力高 3 万倍, 细胞分裂素与生长素的比值成为控制器官发育的模式, 促进了植物组织培养的发展。

3. 蓬勃发展阶段 (20 世纪 50 年代末至今)

近几十年来, 植物组织培养得到了迅速的发展, 并广泛应用于生物学和农业科学, 在生

产上发挥了重要作用。

1958年,英国学者 Steward 在美国将胡萝卜髓细胞培养成为一个完整的植株。这是人类第一次实现了人工培养体细胞胚, Haberlandt 的愿望因此得以实现,也证明了植物细胞的全能性。这是植物组织培养的第一大突破,它对植物组织和细胞培养产生了重大而深远的影响。

1960年,英国学者 Cocking 用酶法分离原生质体成功,开创了植物原生质体培养和体细胞杂交的研究。这是植物组织培养的第二大突破。

同年, Morel 培养兰花的茎尖,使其可以脱除病毒并能快速繁殖兰花。其后国际上相继建立了兰花工业。在“兰花工业”高效益的刺激下,植物离体微繁技术和脱毒技术得到了迅速发展,实现了试管苗产业化,取得了巨大的经济效益和社会效益。

1964年,印度学者 Guha 和 Maheshwari 成功地从曼陀罗花药培养中获得了花粉单倍体植株,从而促进了植物花药单倍体育种技术的发展。这是植物组织培养的第三大突破。

由以上可知,植物组织培养(简称组培)自1958年以来得到了迅速发展,并在现代科学技术中得到了实际应用,这也是现代科学相互渗透、相互促进和发展的结果。20世纪60年代初,世界上只有十多个国家的少数实验室从事植物组织培养;70年代,规模迅速扩大,到90年代已基本遍及世界各国。不论是发达国家还是发展中国家,几乎所有的大学、研究机构、农林单位都有人从事这方面的研究和应用(罗士韦,许智宏,1978)。据 Kee-Youep Paek 等报道,韩国1993年有组织培养实验室和商业性组织培养室192个,总面积 $1.4 \times 10^5 \text{ m}^2$,每年生产试管苗2000万株,并且仅在1991年发表有关此方面的文章就超过1000篇。

也正是由于20世纪60年代植物组织培养的迅速发展,于1973年在英国成立了国际植物组织培养协会(IAPTC),至今已召开过十多次国际会议,论文和人数一期比一期增加。有关的专著或丛书也出版较多。如印度学者 Bajaj 主编的《农业生物技术》丛书(Biotechnology in Agriculture and Forestry)已出版30多卷。《植物细胞培养手册》(Handbook of Plant Cell Culture)也已出版6卷。国际专业杂志《植物细胞、组织和器官培养》(*Plant Cell, Tissue and Organ Culture*)也已出版70多卷。国际植物组织培养协会办的《植物组织培养和生物技术》(*Plant Tissue Culture and Biotechnology*)杂志也发行了15卷60期。日本学者 T. Kozai 等系统研究了植物微繁殖中的环境因素及其调控,1994年出版了“Collected Papers on Environmental Control in Micropropagation”专集(上下册)。George 主编的“Plant Propagation by Tissue Culture”1995年已再版发行,仅参考文献就引用了4100余篇。Roberta H. Smith 编著的“Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments”第2版于2000年由 Academic Press 出版。联合国粮农组织每年都在德国汉诺威大学举办为期3个月的国际植物组织培养技术培训班,给世界各国培养专门的技术人才。

(二) 我国植物组织培养发展简史

1931年,李继侗培养银杏的胚;1935~1942年,罗宗洛进行了玉米根尖离体培养。其后,罗士韦进行了植物幼胚、根尖、茎尖和愈伤组织的培养。20世纪70年代以来,我国开展植物花药培养单倍体育种。特别是在1978年全国科学技术大会召开以后,我国在植物组织培养方面进行了大量研究,取得了一系列举世瞩目的成就,不少研究成果已走在世界前列。我国植物组织培养技术普及程度及技术水平均居世界领先地位(周永春,1990),在植物组织培养和应用方面已有多项成果获得国家和省、部、委、厅局级科技成果奖。科技界第

一个万元户就是从事植物组织培养的专业人员——“京花一号”小麦育成者胡道芬；北京植物所朱至清创制的 N_6 培养基获国家发明二等奖；“六五”到“十一五”期间，生物技术都被列入国家或省部级重点攻关项目，部分省市还列生物技术专项，而其中的植物组织培养是生物技术的重要组成部分，贡献较大。

20 世纪 70 年代以来，我国学者结合自己的工作和国内外进展出版了不少专译著，见表 1-1。

表 1-1 中国自 1978 年以来出版的植物组织培养的部分专译著

书 名	作 者	年 份
植物单倍体育种技术资料集	中科院植物所编译	1973
植物组织和细胞培养	上海植物生理研究所细胞室编译	1978
植物组织培养及其在生物技术上的应用	夏镇澳等译	1983
植物组织培养	桂耀林等	1985
园艺植物组织培养	裘文达	1986
木本植物组织培养及其应用	陈正华	1986
药用植物组织培养	谢启昆	1986
植物生物技术	陈维伦、陶国清等	1987
果树组织培养	陈振光	1987
经济植物组织培养	罗士韦、许智宏	1988
植物组织培养手册	颜昌敬	1989
植物组织培养及其应用丛书	陈正华	1990
植物细胞工程与育种	胡含、王恒之	1990
植物生物技术与作物改良	孙敬三、陈维伦	1990
植物组织培养技术	曹孜义、齐玉枢	1990
农作物组织培养	颜昌敬	1992
植物细胞培养手册	奚元龄等	1992
观赏植物组织培养	谭文澄	1992
植物组织培养技术教程	李凌明	1992
果树瓜类生物工程育种	傅润民	1994
高等植物离体培养的形态建成及其调控	黄学林、李菽菊	1995
实用植物组织培养技术教程	曹孜义、刘国民	1996
园艺植物离体培养学	陈振光	1997
果树花卉无毒苗快繁技术	曹孜义	1998
植物组织培养技术	李宝平、茹文明	2000
花卉组织培养	韦三立	2001
林果花菜组织培养快速育苗技术	李云	2001
热带亚热带植物微繁殖	郑成木、刘进平	2001
现代植物组织培养技术	曹孜义、李胜等	2003

为使我国植物组织培养技术企业化和持续发展，2000 年 12 月 4~6 日，曹孜义发起并在兰州主持召开了“全国植物组织培养效益与前景高级学术研讨会”（以下简称兰州组培会），目前已举办了 5 期。2001 年 10 月，我国农业生物技术学会在江西井冈山市召开了植物组织培养与脱毒快繁技术学术研讨会，会议出版论文集《植物组织培养与脱毒快繁技术》（朱德蔚，2001）。2005 年，上海开发了“大规模花卉试管苗生产计算机管理软件”，标志着我国植物组织培养已全面走向产业化。为提高我国植物组织培养技术人才和管理人才的水平，2001 年春季，国家人事部还委托重庆市人事局和重庆大学在重庆举办了全国专业技术人员植物组织培养及产业化高研班（见重庆市人事局和重庆大学文件，渝人办〔2000〕63 号）。我国《植物生理学通讯》杂志开辟有植物组织培养简报专栏，每期均有近 10 篇文章发

表。现今我国综合大学、师范院校生物系、农林院校有关专业都开设植物组织培养课程，以培养这方面的专门技术人才。

2000年12月4日，上海植物生理研究所李文安研究员在兰州植物组织培养效益与前景研讨会上提出，我国的植物组织培养研究工作可分为以下几个时期：

- ① 快速繁殖技术研究和技術准备时期（在新中国成立之前到1970年）。
- ② 植物快速繁殖的起始期，或称“试管苗”时期（1970~1980年）。
- ③ 植物快速繁殖开始“工厂化生产”时期（1980~1990年）。
- ④ 快速繁殖进入成熟阶段（1990年至今），又称快速繁殖的工厂化生产时期。

进入20世纪90年代，我国主要大城市均出现了各种种苗公司。这些种苗公司常处在不稳定状态，大部分经营较好者能持续兴旺，也有少数部分种苗公司关闭，当然也有新的公司出现。这些现象说明以生物技术进行种苗生产是可行的，但又不是十分容易的，除了有经营管理、生产技术方面的问题外，还有规模生产和市场销路等限制因素。但我国是世界上从事植物组织培养人数最多、实验室面积最大的国家（陈维伦，1990），有理由相信今后在这方面一定会取得更大的成绩。

三、植物组织培养的研究动向

1. 规模化、企业化的脱毒及离体快繁

这是目前植物组织培养应用最多、最广泛和最有成效的一个方面，主要进行植物茎尖培养脱除病毒。对于脱毒苗、新育成品种、新引进品种、稀缺良种、优良单株、濒危植物和基因工程植株等可通过离体快速繁殖，同时可不受地区、气候的影响，比常规方法快数万倍到数百万倍，可及时提供大量优质种苗。有人计算过，一个苹果茎尖一年可繁殖一千亿个小苗，一支试管的优良树种可供数万公顷的土地造林。

世界上已建成许多年产百万苗木的工厂和数十万苗木的商业性实验室及组培工厂。试管苗已出现在国际市场上并产业化。一个新育成品种问世后，两年即可在生产上广泛应用。例如，马铃薯茎尖脱毒、无毒种苗和微型脱毒种薯已在马铃薯生产国广泛应用，从根本上解决了马铃薯的种性退化问题。现今，观赏植物、园艺作物、经济林木中的无性繁殖作物等，部分或大部分用离体快繁提供苗木。规模化、企业化的脱毒及快繁已向综合化和多样化发展，并与计算机、信息网络和自动化技术以及新材料结合，不只是进行植物的脱毒及离体快繁，而且通过信息网络及时了解市场的需求，加强销售网络的建设，做好产前产后服务，以使组培产业化持续健康发展。

2. 分子水平上的育种

分子水平上的育种即把有实用价值的基因如抗病虫、抗病毒、高品质、雄性不育、花色基因以及贮存基因等分别导入植物，创造新的植物品种，又叫转基因植物。近年来，转基因植物育种工作有了很大进展。1983年，第一例转基因植物培养成功，10年后开始商品化；到1996年，世界上估计有千种以上转基因植物商品；到1999年，全球转基因植物种植面积增加44%，达3970万公顷。据联合国粮农组织预测，21世纪全球90%以上农作物品种将通过生物技术育成的。据估计，全球转基因植物产品的市场销售额从1996年的不足5亿美元，增加到2000年的70亿~100亿美元，由此可见其发展前景广阔。

转基因工程是目前国际竞争最激烈的生命科学领域之一，在基因组平台上已有2种植物的基因组全序列进入数据库，为植物基因工程技术奠定了基础。但转基因技术必须建立在植物细胞和组织培养再生基础上。当前转基因技术的一大难题是植物原生质体培养技术还不完

善。有学者认为,植物转基因最终解决问题要依赖植物原生质培养技术的发展。

3. 细胞水平上的育种

细胞水平上的育种主要包括花药培养、胚培养和体细胞无性系以及原生质体培养和细胞杂交。

自1964年Guha和Maheshwari首次从植物花药培养出花粉植株以来,目前世界上已有960多种植物成功地获得了花粉植株。通过花药培养可加速后代纯合,缩短育种进程,简化选育程序。现已育成一大批高产优质品种并在生产中得到应用。仅我国在水稻上选育的品种就达60多个,小麦20多个,推广面积已达2684万亩^①,增产创收约5亿元(朱至清,1998)。华中农业大学吴江生等通过油菜小孢子培养,选育出优质、高产、抗(耐)病新品种华双3号,于2001年荣获国家科技进步二等奖;北京市海淀区植物组织培养技术实验室李春玲等进行的甜(辣)椒花药培养单倍体育种技术的研究与应用也获国家二等奖。同时花药培养技术和材料不仅有很大的实用价值,而且也是分子标记和基因图谱的理想材料。

通过体细胞无性系变异、突变体选育,也已培育出有利用价值的特殊品种或材料(赵成章,1990)。用胚培养技术可拯救杂种胚,已获得一些有用的材料或品系,取得了明显效果。河北农科院王海波通过冬小麦幼胚培养,一年可繁育五代,加快了冬小麦育种进程。

自Cocking用酶法脱除植物细胞壁以来,至今已有49个科、146个属、320多种高等植物原生质体培养再生植株,对于实现远缘细胞杂交和外源基因导入奠定了基础。1972年,Carlson首先报道了属间体细胞杂交成功,到目前已有数十种属间体细胞杂种和几例科间体细胞杂交成功的报道。目前,原生质体培养和细胞杂交的培养技术已进入程序化和系统化研究,体细胞融合技术、微细胞技术杂交以及配子与配子、配子与体细胞杂交、尤以禾谷类作物叶肉原生质体培养等都有较大进展。但细胞杂交尚无实际应用价值,有待继续努力。

4. 次生代谢产物的生产

培养植物细胞像培养微生物那样,可大量生产微生物所不能合成的产物,如药用植物中的有效成分、香料植物中的香精,以及工业生产中需要的一些次生产物和初生产物,其中有的已投入工业化生产。自1976年第一次国际药用植物会议在联邦德国召开以来,药用植物组织培养发展迅速,利用药用植物产生的药用成分已有数百种,即利用药用植物的愈伤组织、冠瘿组织和毛状根进行液体、固体以及发酵罐大规模培养,如利用红豆杉、人参、长春花等毛状根的大规模培养来生产紫杉醇、人参苷和长春碱已基本产业化。

5. 植物种质资源的保存和交换

植物资源及其保存有两大难题,一是遗传资源日趋枯竭,造成有益基因的丧失;二是常规田间保存耗资巨大,且往往达不到万无一失的目的。利用植物组织和细胞低温保存种质,可大大节约人力、物力和土地,同时也便于种质交换和转移,防治病虫害的人为传播。植物种质资源的保存可用低温、超低温以及干燥冷冻保存法进行。20多年来,植物组织培养技术对于收集、繁殖和保存作物种质资源起到了重要作用。

6. 植物细胞和组织培养技术在遗传、生理、生化、病理和环保研究中的应用

植物组织培养常作为一种模式工具在植物学中广泛应用,促进了遗传、细胞、生理、生化、病理和环保等学科的发展。如培养的植物材料随时可取,既不受季节影响又无菌,十分方便。单倍体或纯合二倍体植物是研究细胞遗传的极好材料;植物组织和细胞培养材料因其

① 1亩 = $\frac{1}{15}$ 公顷 (hm²) = 666.67平方米 (m²)。

结构均匀,是研究植物生理细胞矿物质营养、有机营养、物质合成、植物激素和光合呼吸等过程的理想材料;植物组织和细胞培养常用来进行抗病性鉴定和筛选;Dixon 等认为悬浮细胞是研究植物与微生物相互作用的有效系统;Poonawala 等曾将组培芦苇用于工业废水处理。

植物细胞和组织培养技术是生物技术的重要组成部分。植物的基因工程、遗传转化都必须反映到“整株”的水平才能被利用,故这些研究也必须与植物细胞和组织培养相结合才能体现出其潜在的价值。

四、植物离体快繁的意义

植物离体快繁又叫微型繁殖(micropropagation)或试管繁殖,它是把植物材料放在试管内,给予人工培养基以及合适的培养条件,来高速增殖,属离体无性繁殖。它的特点是“快速繁殖”,每年可以千百万倍的速度繁殖其后代,比常规繁殖方法快万倍到数十万倍。其实际应用有以下几个方面。

- ① 良种快繁:新育成的、新引进的、新发现的稀缺良种的快繁;
- ② 脱毒苗的大量快繁;
- ③ 特殊育种材料快繁;
- ④ 制种材料的快速繁殖;
- ⑤ 基因工程植株的快繁;
- ⑥ 自然和人工诱发有用突变体的快繁;
- ⑦ 离体保存种质的快繁;
- ⑧ 濒危植物的离体快繁。

五、我国规模化、企业化组织培养的特点和问题

1. 人员多、单位多,但企业化的少

我国从事植物组织培养的人数和实验室面积居世界第一。把植物组织培养技术分为上游的研究阶段、开始走向应用的中游阶段以及企业化开发的下游阶段三个阶段,由此可以看出,我国植物组织培养技术的现状是:从事上游研究阶段的人数最多,而从事中游阶段的人数不多,企业化的下游则更少。我国台湾的生物技术产业化开始与大陆同步,但其进程比大陆要快,其经验值得借鉴。

2. 研究的范围广,但低水平重复多

我国是世界人口最多的国家,也是资源较丰富的国家,植物组织培养在多个方面和多种植物上都在开展研究和应用,其研究范围和内容相当广泛。虽然其中某些研究居世界领先水平,如花药培养和单倍体育种技术及其应用,但独立创新的不多,有自主产权的原创性技术更少,低水平的研究重复多。据广东湛江市农业生物技术研究中心李宝荣报道,仅湛江市这一地区从事香蕉苗组培生产的就有 30 多家。

3. 劳动力充足、成本低,但劳动者素质有待提高

植物组织培养产业是一个技术和劳动密集型产业,植物组织形态结构复杂,许多技术操作无法机械化,故要用大量人工。发达国家在进行组培苗生产时,一般利用发展中国家的廉价劳动力来组织试管苗生产,或进口试管苗。浙江大学徐礼根报道,印度近年来发挥其低廉的劳动力成本,生产出低成本的试管苗大量出口,组培试管苗生产发展很快、效益显著。而我国劳动力资源充足,应当充分利用。据广东湛江市农业生物技术研究中心李宝荣报道,国外组培香蕉瓶苗每株售价:美国为 0.3~0.4 美元,澳大利亚 1.2 美元,马来西亚为 0.7 美

元,而国内仅为 0.05 美元。目前,我国仅上海、北京和广东等地有少而不稳的试管苗出口,今后应当加强这一优势的利用与开发,并根据组培技术的操作特点提高劳动者的整体素质。

4. 设施落后,现代化程度不高

我国从事植物组织培养的人数和实验室虽多,但因实力不够、投入不多,故设施落后,现代化程度较低。随着我国加入 WTO,国际化竞争日趋激烈,大力提高我国植物组织培养的现代化程度势在必行。

5. 基础研究多,但应用开发研究少

我国在植物组织培养的理论和技术方面做了大量工作,对于植物组培技术的开发起了很大的推动作用,但对企业化生产中的一些问题,如大量污染、玻璃化苗、生根问题和移栽问题等,研究还不够深入。今后需加强前瞻性研究和技术储备。

6. 信息不灵通、营销手段落后

当今世界经济已步入全球化、信息化、网络化时代。目前世界上的农业及相关网站有 2000 多个,而我国还很少;了解、交流信息的渠道不很方便。有关专家分析,我国的信息技术在农业上的应用大约比国外落后 20 年,因此对国内外需求了解不及时,营销方案不到位,难以适应市场。

7. 单打一多、综合应用的少

绝大多数从事植物组织培养研究和生产的单位和个人仅是将该技术用于所从事的研究领域的脱分化、分化和再生,或进行种苗(种薯、种球)的大量快繁,而根据市场综合应用植物组织培养技术进行生产经营的较少。综合应用较好的企业如北京锦绣大地农业有限公司,他们用植物组织培养技术繁殖花卉稀缺品种,同时开展蔬菜制种和观光休闲,取得了良好的效益;又如内蒙古铃田生物技术有限责任公司把马铃薯育种、脱毒、繁殖、淀粉加工、产品出口和示范推广等结合,年生产微型薯 3000 万粒,原原种 48 万公斤,成效显著。

(李 胜)

参 考 文 献

- [1] 曹孜义,齐玉枢主编.植物组织培养技术.北京:高等教育出版社,1990:1-8.
- [2] 曹孜义,刘国民主编.实用植物组织培养技术教程.兰州:甘肃科学技术出版社,1999:142-146.
- [3] 郑成木,刘进平主编.热带亚热带植物微繁殖.长沙:湖南科学技术出版社,2001:25-31.
- [4] 黄学林,李筱菊.高等植物离体培养的形态建成及其调控.北京:科学出版社,1995:127-149.
- [5] 朱德蔚主编.植物组织培养与脱毒快繁技术.北京:中国科学技术出版社,2001:4-10.
- [6] 曹孜义主编.现代植物组织培养技术.兰州:甘肃科学技术出版社,2003.17-50.
- [7] 李胜.葡萄试管苗离体生根机理研究[D].兰州:甘肃农业大学,2003.
- [8] 罗士韦,许智宏.经济植物组织培养.北京:科学出版社,1987:8-15.

第二章

植物组织培养原理及特点

第一节 培养基的组成和配制

培养基是植物组织培养的物质基础，也是植物组织培养能否获得成功的重要因素之一。植物组织培养成功与否，一方面取决于培养材料本身的性质，另一方面也取决于培养基的种类和成分，所以植物组织培养的发展与培养基的改进是分不开的。不同的植物材料对培养基的要求不同，因而必须根据不同的植物材料以及不同的培养目的选择合适的培养基，并按照不同的培养阶段加入适当的添加物。作为主要碳源的蔗糖、支撑物琼脂的浓度及培养基的pH都会影响外植体和培养材料的生长和发育。培养基中含有各种有机物，很容易受到微生物的污染，因此培养基配制完成后一定要及时进行灭菌处理。

一、培养基的营养成分

新陈代谢是生命存在和形态建成的基础，要使培养物生存并进而分化为完整植株，可靠的营养基础是必不可少的。

培养物的营养方式与完整植株有根本的不同，完整植株具有根、茎、叶等器官，这些器官构造不同、功能各异，它们既各司其职，又协同合作，通过新陈代谢从环境中吸收营养，以自养方式建造自身。而培养物仅仅是从完整植株上切离下来的细胞、组织和器官等，组织结构层次低，且往往较单一，因而缺乏完整植株那样的自养机能，一般不直接利用环境中的光和CO₂合成碳水化合物，也不与土壤直接接触吸收水分和无机物，而是仅仅与培养基接触，以异养方式直接从培养基中吸收其生长发育所需要的各种营养。这些营养包括碳水化合物、无机氮和有机氮、其他矿质营养和维生素等。因此，制备各种不同的培养基配比，都是为了适合不同类型培养物的营养需要。下面分别介绍培养物对各种物质的营养要求以及各种物质的生理作用。由于培养物不像完整植株那样具有自我营养平衡的能力，所以在配制培养基时，还要考虑离子平衡和物质平衡问题，离子失衡或某些物质过量都可能导致培养物生长不良或死亡。

培养基是外植体生长的营养物质，通常有两个组成部分。一是基本培养基，包括大量元素和微量元素（无机盐类）、维生素、氨基酸和无菌水等。迄今为止，基本培养基已有几百种，但常用的仅一二十种，如MS、改良MS、White、Nitsch、N₆、B₅等基本培养基。二是附加物质，即在基本培养基的基础上，根据实验要求，附加一些物质。如添加各种植物生长调节物质[6-苄基氨基嘌呤(6-BA)、玉米素(ZT)、激动素(KT)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、萘乙酸(NAA)、吲哚乙酸(IAA)、吲哚丁酸(IBA)、赤霉素(GA₃)等]以及其他的复杂有机附加物，包括有些成分尚不完全清楚的天然提取物，如椰乳、香蕉汁、番茄汁和酵母提取物等。

1. 无机盐