

● 崔德才 徐培文 主 编
● 李红双 杨崇良 副主编

植物组织培养 与工厂化育苗



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心



植物组织培养与工厂化育苗

崔德才 徐培文 主 编
李红双 杨崇良 副主编

化 学 工 业 出 版 社

现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

植物组织培养与工厂化育苗 / 崔德才, 徐培文主编.
北京: 化学工业出版社, 2003.4
ISBN 7-5025-4231-0

I. 植… II. ①崔…②徐… III. ①植物-组织培
养②工厂化育苗 IV. ①Q943.1②S35

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 016043 号

植物组织培养与工厂化育苗

崔德才 徐培文 主 编

李红双 杨崇良 副主编

责任编辑: 周 旭 孟 嘉

责任校对: 郑 捷

封面设计: 蒋艳君

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京市管庄永胜印刷厂印刷

三河市前程装订厂装订

开本 850 毫米×1168 毫米 1/32 印张 11½ 字数 301 千字

2003 年 5 月第 1 版 2003 年 5 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-4231-0/Q·53

定 价: 28.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

21 世纪是生命科学的世纪。植物组织培养技术的研究与应用是生命科学的主要组成部分之一，从建立之日起就在生命科学、特别是植物科学的研究与应用中发挥了极其重要的作用。如果从德国植物生理学家 Haberlandt 于 1902 年提出设想算起，植物组织培养已走过了整整 100 年的历程，这对一个人来说可算作长寿的一生，但对一门科学来说或许还很年轻、很不成熟、不完善。因此，它可以算作一门既“古老”（姑且算作古老吧）又年轻的科学。说它古老是因为已有 100 年的历史；说它年轻，是因为现在还有许多问题没有解决，人们对组织培养的认识还只能算是初步的。为了更进一步地认识组织培养的规律，更好地发挥它的作用，我们在认真读书籍和汲取他人经验的基础上，将我们多年来从事这项工作的经验和教训加以整理，编写了这本书。主要目的有两个：一是对自己的工作进行一次总结整理；二是希望通过这本书让更多的人了解植物组织培养的基本理论、思维原则，掌握培养技术。我们的体会是在很多情况下思维原则比实验技术更重要，所以有许多从事植物组织培养的权威人士说：植物组织培养既是一门技术，更是一门艺术。我们的理解就是技术是一种比较固定、比较系统的方法与路线，艺术则更能体现人的价值与个性。在决定编写这本书的开始，我们就商定试图将这一思想贯串在书中，因此在介绍原理与方法时不是做机械的陈述，而是把如何思考与分析某个问题给以提示，使大家在学习掌握技术的同时学会思维的方法。我们期望这种认识会得到大多数读者的认同，在阅读本书、理解和掌握植物组织培养的理论与方法的同时，更侧重于思考如何去发挥个人的主观能动性，去创造性地运用这些知识，大胆探索，大胆创新，在学习与应用中发展植物组织培养的理论与技术。事实上，很多人已经进行了大胆创新，

比如有人已在简化消毒程序、实行开放式培养方面做了大胆的尝试，如果开放式培养能够获得成功与推广，那么植物组织培养将会变得更普及、更实用，将创造出更大的经济价值。

希望这本书的出版能起到抛砖引玉的作用，因为我们深知虽然自己从事了多年的植物组织培养工作，但经验和教训都是极为有限的，与这门科学相比，与其他人相比，我们的知识是微不足道的。另外，在编写过程中虽然尽力翻阅收集资料，仍然只能是挂一漏万，甚至是捡了芝麻，丢了西瓜；即使是捡起的也未必能准确地表述出原义，抑或理解错误。总之，虽然木已成舟，但缺点和错误在所难免，我们诚恳地期待着专家和读者对本书提出宝贵的意见。

为了能充分发挥各自的专长，我们采取分工负责、积极合作的方法，由崔德才（山东农业大学）执笔第一篇和各论中的部分章节并作全书通稿，徐培文（山东省农科院）执笔第二篇，李红双（山东农业大学）执笔各论部分，杨崇良（山东省农科院）执笔植物脱毒部分，但每一章节都是四个人共同合作的结果。在本书的编写过程中得到阎艳春教授的热情指导与帮助，崔繁、崔娴、韩琳娜、刘斌等做了大量的文献收集和图片整理工作，没有他们的参与，这本书也很难如期完成。值此出版之际，谨向所有为此书提供帮助和支持的人表示最真诚的感谢！愿以此书的出版勉作我们的回报。

作者

目 录

第一篇 植物组织培养的基础理论

第一章 植物组织培养概述	1
一、植物组织培养发展历程的简单回顾	2
二、植物组织培养的应用前景	6
三、植物组织培养有关的基本概念与基础理论	8
第二章 植物组织培养所需的基本设备与条件	11
一、化学药品室	11
二、配制培养基的实验室	14
三、灭菌室	15
四、接种室	16
五、无菌培养室	18
六、培养物的检测与观察记录室	19
七、基本仪器设备与用品	20
第三章 植物组织培养常用培养基成分及培养基配制	22
一、无机营养成分	23
二、有机营养成分	25
三、碳水化合物	26
四、植物生长调节物质	27
五、琼脂或其他支持物	30
六、其他添加物	32
七、培养基的选择	35
八、培养基的配制	37
第四章 无菌操作技术与设备	42
一、干热灭菌	42

二、湿热灭菌	43
三、微波灭菌	44
四、微过滤灭菌	44
五、化学药物灭菌	45
六、抗生素灭菌	48
七、无菌操作中其他应注意的问题	49
第五章 再生植株的获得	51
一、愈伤组织	51
二、愈伤组织的获得	52
三、再生植株的获得	56
四、种质材料的继代	71
第六章 植物遗传转化技术	72
一、根癌农杆菌的特性及其转基因机理	73
二、载体	76
三、农杆菌介导的基因转化操作程序	80
四、PCR 技术	86
五、PCR 相关技术	93
第七章 植物组织培养与快速繁殖	98
一、植物组织培养快繁的意义和过程	98
(一) 植物组织培养快繁的意义	98
(二) 植物组织培养快繁的过程	99
二、植物组织培养快繁的关键技术环节	102
(一) 植物基因型、生理状态和部位	102
(二) 外植体的大小	103
(三) 培养基	104
三、快繁苗的健康状况和遗传稳定性鉴定	108
(一) 病毒病鉴定方法	108
(二) 遗传稳定性鉴定	108
四、植物快繁技术	111
(一) 植物茎尖组织培养脱毒快繁	111

(二) 胚状体诱导、快繁·····	111
(三) 侧芽原基诱导及快繁·····	112
(四) 不定芽诱导和快繁·····	113
(五) 脱毒苗木的速繁·····	115
(六) 愈伤组织诱导和分化·····	116
(七) 利用人工种子快繁·····	116
五、几种园艺、经济作物的快繁技术规程·····	117
(一) 马铃薯·····	117
(二) 大蒜·····	117
(三) 石刁柏·····	119
(四) 甘蓝·····	119
(五) 结球莴苣(生菜)·····	120
(六) 花椰菜·····	121
(七) 生姜·····	121
(八) 草莓·····	122
(九) 香石竹·····	122
(十) 月季·····	123
(十一) 白鹤芋·····	124
(十二) 火鹤花·····	124
(十三) 文心兰·····	125

第二篇 植物组织培养技术的实际应用

第八章 植物脱毒技术·····	126
一、危害植物的病毒种类·····	126
二、植物感染病毒病后表现的主要症状·····	127
三、植物感染病毒病后对其生长和经济性状的影响·····	129
四、病毒传染途径·····	130
五、病毒病的诊断与检测方法·····	131
六、血清学检测方法与操作规程·····	133
七、植物脱毒的意义及应用前景·····	136

(一) 脱毒的重要性	136
(二) 脱毒的经济意义	137
八、植物快繁脱毒技术的历史及发展	139
九、植物脱毒技术	140
(一) 通过热处理消除病毒技术	140
(二) 植物茎尖组织培养脱毒技术	141
(三) 茎尖培养结合热处理脱毒	145
(四) 茎尖培养结合病毒钝化剂处理脱毒	145
十、几种植物的病毒病、脱毒操作规程与检测标准	145
(一) 马铃薯	145
(二) 大蒜	150
(三) 生姜	158
(四) 草莓	164
(五) 香石竹	172
(六) 大枣	175
(七) 脱毒梨的病毒检测标准	175
(八) 脱毒苹果的病毒检测标准	175
(九) 脱毒兰花种苗病毒检测规程	176
十一、脱毒操作与繁殖注意事项	178
第九章 植物组培苗的工厂化生产	180
一、设施、设备	180
(一) 组织培养、离体快繁用设施和设备	180
(二) 保护栽培设施	184
(三) 试管苗移栽设施、设备	194
二、工厂化生产的技术	197
(一) 品种选育和母株培育	197
(二) 离体快繁组培基本苗	197
(三) 组培苗的移栽驯化	197
(四) 苗木传送和运输	207
(五) 苗木质量检测	209

第十章 组织培养快繁技术结合诱变育种	210
一、应用植物组织培养技术与诱变相结合进行育种的意义和 研究进展.....	210
二、植物组织培养与诱变相结合技术.....	212
三、用钴 60 γ 射线照射组培芽进行诱变育种的实例	214
(一) 大蒜.....	214
(二) 香蕉.....	217
(三) 菊花.....	218
第十一章 植物种质资源离体保存	220
一、低温保存.....	220
二、超低温保存.....	222
三、植物离体保存的主要步骤.....	225
四、几种主要经济作物的离体保存技术.....	226
(一) 大蒜.....	226
(二) 铁皮石斛.....	229
(三) 马铃薯.....	230
(四) 甘薯.....	231
(五) 百合.....	232
(六) 生姜.....	233
(七) 猕猴桃.....	234
五、问题与展望.....	235

第三篇 各 论

第十二章 药用与保健用植物的组织培养与工厂化生产	237
一、利用红豆杉愈伤组织与细胞培养生产紫杉醇.....	237
(一) 实验材料.....	238
(二) 培养程序.....	238
(三) 紫杉醇含量的检测.....	240
二、人参细胞悬浮培养与工厂化生产.....	241
(一) 培养材料的选择.....	242

(二) 培养基的选择·····	242
(三) 接种及愈伤组织诱导·····	244
三、紫草的组织培养与工厂化生产·····	246
(一) 材料的选择·····	247
(二) 组织与细胞培养程序·····	247
四、银杏的组织培养与工厂化生产·····	249
(一) 取材与处理·····	250
(二) 愈伤组织诱导及细胞悬浮培养·····	250
五、桔梗的组织培养·····	252
(一) 材料及处理·····	252
(二) 培养程序·····	253
六、仙人掌的组织培养与工厂化育苗·····	255
(一) 取材与消毒·····	255
(二) 接种与诱导·····	256
(三) 继代与扩繁·····	257
(四) 壮苗培养·····	257
(五) 生根与移栽·····	257
七、木立芦荟的组织培养·····	258
(一) 取材与消毒·····	259
(二) 接种与诱导芽的直接再生·····	259
(三) 芽的继代与扩繁·····	260
(四) 生根与移栽·····	261
八、半夏的组织培养·····	262
(一) 取材与消毒处理·····	262
(二) 通过愈伤组织再生不定芽·····	262
(三) 诱导生根与移栽·····	263
九、地黄的组织培养·····	264
(一) 取材与处理·····	265
(二) 接种与诱导芽的增殖·····	265
(三) 地黄的脱毒技术及病毒检测·····	267

十、大青叶的组织培养	267
(一) 取材与处理	267
(二) 接种与诱导芽增殖	268
(三) 生根与移栽	269
十一、浙贝母的组织培养	269
(一) 配制诱导愈伤组织再生培养基	270
(二) 取材、消毒与培养	270
(三) 愈伤组织的诱导与保存	271
(四) 从愈伤组织诱导产生鳞茎和再生植株	272
(五) 壮苗、生根与移栽	273
十二、龙胆的组织培养	275
(一) 实验材料	275
(二) 培养程序	275
十三、罗汉果的组织培养	279
(一) 取材和处理	279
(二) 叶片培养诱导再生植株	280
十四、甜叶菊的组织培养	282
(一) 种子的消毒与萌发培养	282
(二) 无菌种苗的茎尖和叶片培养	282
十五、枸杞的组织培养	284
(一) 取材与消毒	285
(二) 茎段与叶片培养	286
第十三章 果树、园林及观赏植物的组织培养	289
一、宫崎富士苹果的叶片培养诱导植株再生	289
(一) 实验材料的选择及意义	289
(二) 幼叶的获取与培养	289
二、中国樱桃培养诱导植株再生	291
(一) 实验材料及处理	291
(二) 芽的培养与增殖	291
三、杏的组织培养	293

(一) 实验材料的选取与处理·····	294
(二) 诱导芽增殖的培养程序·····	295
四、葡萄的组织培养·····	297
(一) 实验材料的选择与催芽处理·····	298
(二) 芽的培养与诱导再生·····	298
五、核桃的组织培养·····	300
(一) 种子萌发与实验材料选择·····	301
(二) 建立高频再生体系·····	301
(三) 防止核桃氧化褐变的措施·····	304
六、悬铃木叶片培养诱导再生植株·····	305
(一) 实验材料及处理·····	305
(二) 培养程序·····	305
七、毛白杨组织培养与工厂化育苗·····	307
(一) 实验材料及处理·····	308
(二) 培养程序·····	308
(三) 工厂化育苗·····	310
八、桉树的组织培养·····	311
(一) 配制诱导愈伤组织培养基·····	313
(二) 取材、消毒与接种·····	314
(三) 胚状体的诱导与萌发·····	315
(四) 移栽或继代培养·····	316
九、泡桐的组织培养·····	317
(一) 实验材料的准备·····	318
(二) 诱导芽的再生培养程序·····	319
十、黄柏的组织培养·····	321
(一) 实验材料·····	322
(二) 材料的培养与诱导再生·····	322
十一、雪松的组织培养·····	324
(一) 实验材料及处理·····	324
(二) 接种与培养·····	325

十二、兰花的组织培养	327
(一) 取材和处理	328
(二) 接种与培养	328
(三) 关于兰花合子胚培养问题	331
(四) 兰花组织培养的关键问题	331
十三、鸢尾的组织培养	332
(一) 材料及处理	333
(二) 分化培养基的配制与接种培养	334
十四、杜鹃花的组织培养	335
(一) 取材与处理	336
(二) 配制培养基与接种幼芽	337
(三) 诱导生根与移栽	338
(四) 栽培与管理	338
十五、红掌的组织培养	339
(一) 取材和处理	340
(二) 接种与培养	340
附录	343
一、常用英文缩略语	343
二、常用植物生长激素浓度单位换算表	344
三、蒸汽压力与蒸汽温度对应表	345
主要参考书	346

第一篇 植物组织培养的基础理论

第一章 植物组织培养概述

植物组织培养作为现代植物生物技术研究和在农业生产上推广应用的一项十分有用的技术，越来越受到人们的重视，也发挥着越来越大的作用，创造出了很大的经济效益。通过组织培养条件下快速繁殖的方法，已建立了众多的工厂化育苗基地，如兰花的工厂化生产就是把植物组织和细胞培养与温室育苗相结合的结果。为了满足社会不同层次人员对植物组织培养理论和实验技术的需要，作者将利用这本书从基础理论、基本技术与原理、基本方法和实际应用等几个方面对植物组织培养进行比较系统的论述。

从分类学的角度讲，植物有高等植物和低等植物之分。所谓高等植物是指有根、茎、叶，有花、果实和种子的植物，它包括裸子植物和被子植物两大类。松树、柏树和银杏树等，在一生当中只产生种子，不能形成果实，也就是说种子没有果实包着，所以叫裸子植物，裸子植物多数为木本植物。平时所说的或看到的松球、白果（银杏果），只是在外形上像果实，但在结构上与苹果、桃子、大枣、核桃是不相同的。苹果、桃子、大枣、核桃，还有水稻、小麦、玉米、花生、大豆、棉花等，在一生中不仅产生种子，而且还能形成果实，种子被果实包裹着，所以叫被子植物。在人们日常生活中所见到的绝大部分的农作物、油料作物、蔬菜、水果、花卉、中草药等植物都属于被子植物。平常所说的植物组织培养主要是指用被子植物来进行的培养，但现在裸子植物的培养也渐渐开展起来。本书中主要介绍被子植物的情况，对裸子植物的组培情况只选一二个代表加以介绍。

正如大家所熟悉的，被子植物的每一个完整的植物体都包括根、茎、叶、花、果实和种子几个部分，每一个部分就叫做植物体的一个器官，如同动物的心、肺、眼、耳和四肢一样；根、茎、叶主要与植物的营养生长有关，所以叫营养器官；花、果实和种子主要与植物的生殖有关，所以又叫生殖器官。每一个器官又由若干种组织组成，如一片叶子就由表皮、叶肉、叶脉几大部分组成，每一大部分就叫一种组织。每一种组织又由许多个在结构和功能上相似的细胞构成，如叶肉是由许多叶肉细胞构成的，同一种植物的每个叶肉细胞的结构与功能都十分相似，都含有叶绿体，都能进行光合作用。不同种植物的叶肉细胞形状有可能不同，但都含有叶绿体，叶绿体的结构相同，都能进行光合作用——就是说叶肉细胞的功能相同。简言之，许多个结构和功能相同的细胞构成组织，几种不同的组织组成器官，几个不同的器官构成一个完整的植物体。

人们平时所说的植物组织培养是一个比较广义的概念，它不仅是指用植物的一种组织所进行的培养，而且把一个器官、一粒种子、一个胚胎、一粒花粉和一个细胞的培养也笼统地称为组织（细胞）培养，因为严格意义上的单个细胞培养是不存在的。在本书中所指的植物组织培养也是一个广义的概念，既包括单一种细胞或组织的培养，也包括一个器官的培养。为了使大家对植物组织培养的理论与技术有一个比较系统的了解，本章将分以下几个问题进行叙述：植物组织培养发展历程的简单回顾；植物组织培养的应用前景；植物组织培养有关的基本概念与基础理论。

一、植物组织培养发展历程的简单回顾

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。最初的问题仍然是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 Trécul 利用离体的茎段和根段进行培养获得了愈伤组织，愈伤组织是指一种没有器官分化但能进行活跃分裂的细胞团，但这还不能证明细胞具有全能性，因为由愈伤组织没能再生出完整植物体。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。所谓全能性细胞就是指具有完整的膜系统和细胞核的生活细胞，在适宜的条件下可通过细胞分裂与分化，再生出一个完整植株。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机体内微环境和周围环境的反应。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了十分重要的作用。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，使之脱离开原有的环境，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，科学工作者们便萌生出了植物组织培养的念头。

Haberlandt (1902) 首次提出细胞培养的概念，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 Reicher 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。他认为，植物细胞分裂受两类激素调节：一类是韧皮激素（leptohormone），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 的实验之后，