

现代育苗技术丛书

林果花菜 组织培养 快速育苗技术

李云 主编



中国林业出版社

现代育苗技术丛书

林果花菜组织 培养快速育苗技术

李 云 主 编

中国林业出版社

主 编：李 云

参编者：孙浩元 任建武 王艳青

周金星 王树芝

图书在版编目 (CIP) 数据

林果花菜组织培养快速育苗技术/李云主编. — 北京：中国林业出版社，
2001.6

(现代育苗技术丛书)

ISBN 7-5038-2785-8

I. 林… II. 李… III. 植物-组织培养-育苗-技术 IV. S33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2001) 第 022646 号

ML66/13

出版：中国林业出版社 (100009 北京市西城区刘海胡同 7 号)

E-mail: cfphz@public.bta.net.cn 电话：66184477

发行：新华书店北京发行所

印刷：三河市艺苑印刷厂

版次：2001 年 6 月第 1 版

印次：2001 年 6 月第 1 次

开本：850mm×1168mm 1/32

印张：7.875

字数：200 千字

印数：1~4000 册

定价：12.00 元

前言

植物组织培养是指在无菌条件下，将离体的植物器官、组织、细胞以及原生质体，培养在人工控制的环境里使其再生形成完整的植株。也就是将植物体的一部分（外植体）放在无菌的容器中，供给它们充足的营养物质，置于适宜的环境中，使它们得以生存和形成完整植株的一种方法。植物的快速繁殖是采用生物工程中的植物组织和细胞培养技术，在一定的时间内从一个茎尖或外植体繁殖出比常规繁殖多几百倍，甚至千万倍与母体遗传性状相同而健康的小植株，其标准可达到大田生产种苗的要求。植物组织培养技术因其环境因子可人工控制，繁殖周期短，速度快，效率高，可周年生产，节省材料，保持原有的优良性状等优势，在植物优良品种的快速繁殖推广方面取得了巨大成功，世界各地的种苗机构对不少植物进行了工厂化育苗，取得了良好的经济效益。植物的快速繁殖不仅可用于常规无性繁殖的植物，而且可用于常规方法难以无性繁殖的植物，例如有性杂交不亲和与不育基因型植物的繁殖，转基因植物的快速繁殖，以及繁殖大批遗传性状一致的亲本供大规模杂交制种，大量繁殖果树种苗及优良砧木，尤其在抢救与繁殖珍、稀、濒危植物等方面效果更佳。在植物组织培养中，利用微茎尖培养可脱除植物所带病毒，获得无毒苗。以无毒苗作为繁殖材料，可繁殖大量无毒苗，以满足生产需要。果树无毒苗生长快、抗性强、结果

早、果品产量和品质均得到大幅度提高。花卉无毒苗，植株生长势强，花朵变大，色泽鲜艳，抗逆性提高，产花量上升。农作物无毒苗提高产量和品质，如马铃薯脱毒苗已被广大农民所接受，成为农民致富的典范。

目前农林生产上存在着许多问题。在林木生产上的主要问题是种苗繁殖水平低，与集约化、规模化、专业化的现实需求相距甚远，从而造成林木主干低且弯曲，生长缓慢，林分生产力不高，因此，生产上急需大量的优良苗木，另外，许多濒危珍奇树种的繁殖，利用常规繁殖方法很难实现。在农作物、果树、蔬菜生产上由于多种植物病毒的存在造成大面积减产，品质下降，给农民造成巨大的经济损失。

如何使农民掌握组织培养技术，并主动应用于农林生产中，有可能产生更大的经济效益。为使这门技术能够为更多致力于种苗产业化的专业和非专业人员所领会、掌握和运用，编者主要依据各自的研究结果、实践方法、商业化生产体会，并广泛参阅文献资料，编著了本书。内容侧重于林木、果树、花卉、蔬菜脱除病毒和试管快速繁殖方面的应用，力图通过一些实例，阐明植物组织培养的基本理论、基本技术和基本方法。

本书本着理论与实践相结合、科学性与实用性相结合的原则，以林木、果树、花卉和蔬菜良种为主，利用植物组织培养技术进行良种植物的脱除病毒和快速繁殖。介绍了植物组织培养的发展简史、基本原理、发展概况；指出了基本方法、设备要求及基本操作技能；突出了培养基的配制、增殖培养、生根培养及移栽等实用技术；在各论中介绍了林木、果树、花卉和蔬菜良种的繁殖和脱毒技术。本书不仅可作为院校、科研单位、生产单位和育苗工作者的参考书，还特别适合果农、花农、菜农和林业工作者快速培育和繁殖脱毒壮苗，发展育苗产业，提高经济效益。

本书编者虽然力求既在基本方法和理论上有简明的阐述，又能为读者铺设通向实际应用的桥梁；既反映编者的研究所得，又能博采众长，着力反映世界各国的主要最新成果。但由于植物组织培养是一门新学科，发展日新月异，限于编者水平，难免还有缺点和不足，诚望广大读者斧正，以便进一步修改和补充。

本书在编写过程中得到李文安研究员、曹孜义教授的支持和帮助，在此深表感谢。此外，还引用了大量文献中的研究成果、数据，在此谨向文献作者们致以忠心的谢意。

作 者

2001 年 3 月

目 录

前言

第一章 概述 (1)

第一节 植物组织培养育苗的理论基础及 实践意义 (1)

第二节 植物组织培养及其育苗研究的发 展过程 (8)

第三节 我国植物组织培养育苗的发展过 程 (12)

第四节 植物组织培养技术的应用和发展 趋势 (19)

第五节 植物组织培养的意义 (27)

第二章 实验室、设备要求和育苗工厂设计 (30)

第一节 植物组织培养室的基本结构 ... (30)

第二节 组织培养常用仪器设备及要求 (35)

第三节 植物组织培养育苗工厂(车间) 的设计 (44)

第三章 培养基的配制及灭菌 (59)

第一节 培养基的营养及成分 (59)

第二节 培养基的主要种类及成分 (66)

第三节 培养基母液的配制 (69)

第四节 培养基的配制 (74)

第五节 MS培养基成本计算 (79)

第四章 基本操作技术	(83)
第一节 器皿、工具的洗涤	(83)
第二节 基本灭菌技术	(85)
第三节 无菌操作技术	(98)
第四节 污染的原因和预防措施	(101)
第五节 茎尖培养脱除病毒技术和病毒的检测	(103)
第五章 试管苗的繁殖	(111)
第一节 试管苗繁殖的一般程序	(111)
第二节 无菌体系的建立与启动培养	(113)
第三节 外植体的生长与分化	(121)
第四节 试管苗的增殖与继代培养	(125)
第五节 试管苗的生根	(136)
第六节 植物组织培养育苗实践	(140)
第六章 试管苗移栽及管理	(148)
第一节 试管苗炼苗	(148)
第二节 试管苗移栽技术	(152)
第三节 提高移栽成活率的辅助措施	(159)
第四节 试管苗移栽实例	(161)
第七章 主要林果、花卉、蔬菜组培育苗技术	(168)
第一节 主要造林树种	(168)
第二节 经济树种	(175)
第三节 花卉	(204)
第四节 农作物及蔬菜	(219)
参考文献	(238)
附录	(240)

第一章 概 述

第一节 植物组织培养育苗的理论基础及实践意义

(一) 植物组织培养的概念

植物的快速繁殖是采用生物工程技术中的植物组织和细胞培养技术，在一定的时间内从一个外植体（用于植物组织培养的离体组织、器官或细胞，称为外植体。外植体包括茎尖、根、茎、叶、花器官以及它们形成的体细胞胚等材料）繁殖出比常规繁殖多几百倍，甚至千万倍与母体遗传性状相同而健康的小植株，其标准可达到大田生产种苗的要求。因此，快速繁殖是当前生物工程应用中应用最广泛，又最有效的技术和方法，在园艺、农林、药用植物生产等方面得到广泛的应用。

植物的快速繁殖不仅可用于常规无性繁殖的植物，而且可用于常规方法难以无性繁殖的植物，例如有性杂交不亲和与不育基因型植物的繁殖，转基因植物的快速繁殖，以及繁殖大批遗传性状一致的亲本供大规模杂交制种，大量繁殖果树种苗及优良砧木，尤其在抢救与繁殖珍、稀、濒危植物等方面效果更佳。

植物的快速繁殖是从植物组织培养技术研究的基础上发展起来并用于工厂化生产的技术。全部生产过程均在人工控制条件下进行。须有一级种苗或优良的株系为繁殖母本，掌握各种苗木生产过程中的最佳培养基配方与最佳外植体，以

及最为理想的培养条件。如用茎尖生产无病毒植株，须有完善的脱病毒方法及检验病毒的技术，以及保证快速繁殖种苗的遗传稳定性的程序。

苗木繁殖方法包括有性繁殖和无性繁殖两种。有性繁殖方法需要大量种子进行播种育苗，并且繁殖后代有性状分离现象，表现良莠不齐，因此，在育苗工作中，人们更普遍接受无性繁殖方法。无性繁殖方法包括常规无性繁殖方法和植物组织培养快速繁殖方法。常规无性繁殖方法一般包括嫁接、扦插、分株、压条等，但在实际工作中也有许多问题，如需要较多繁殖材料，所繁殖苗木有位置效应，只能在生长季节繁殖等。嫁接方法有砧木与接穗亲合性问题；扦插方法有年龄效应问题；分株和压条方法繁殖速度慢、规模小等。由于常规无性繁殖方法有上述诸多问题，而采用植物组织培养方法进行苗木的快速繁殖可以克服上述不足。

植物组织培养是指在无菌条件下，将离体的植物器官（如根、茎、叶、花、果、茎尖等）、组织（如形成层、表皮、皮层、髓部细胞、胚乳等）、细胞（如大孢子、小孢子及体细胞）以及原生质体，培养在人工控制的环境里使其再生形成完整的植株。也就是将植物体的一部分（外植体）放在无菌的容器中，供给它们充足的营养物质，置于适宜的环境中，使它们得以生存和形成完整植株的一种方法。

根据培养材料的不同，可将植物组织培养分为植株培养、胚胎培养、器官培养、组织或愈伤组织培养、细胞或原生质体培养 5 类；根据培养目的来分有试管嫁接、试管受精、试管加倍、试管育种等；根据培养方法又有平板培养、微室培养、悬浮培养、单细胞培养等；根据培养过程，又可分为初代培养和继代培养，即将从植物体上分离下来的第一次培养称为初代培养或第一代培养，以后将培养物转移到新的培养基上进行培养称为继代培养，也可细分为第二代培

养、第三代培养等；根据培养基类型，又分为固体培养和液体培养，即将植物材料接种在加有凝固剂（如琼脂）的培养基中进行培养的方法称为固体培养，将植物材料置于不加凝固剂的培养基中进行培养的过程称为液体培养（图 1-1）。

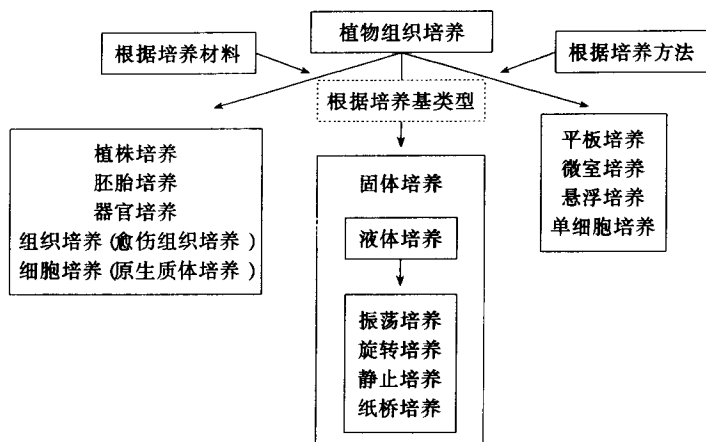


图 1-1 植物组织培养类别示意图

植物组织培养必须在无菌的条件下进行，这是因为植物组织培养所用的培养基含有丰富的营养物质，这些营养物质既有利于苗木的生长，又适合于微生物的繁殖，并且微生物的繁殖速度要远远高于苗木的生长速度，这样就会导致苗木还未长起来，培养基的营养就全部被各种杂菌利用了，另外，各种杂菌在与培养材料争营养的同时，对苗木的生长是有害的，如侵染离体材料，使培养材料感病，并且杂菌分泌物和排泄物对苗木生长不利。

（二）植物组织培养的优点

植物组织培养快速育苗之所以发展迅速和应用广泛，是因为其具备以下优点：

1. 可人为控制培养条件

植物组织培养中的植物材料完全是在人为提供的培养基及小气候环境下生长的,几乎没有外界不利因素的影响,且条件均一,摆脱了大自然中四季、昼夜气温频繁变化及灾害性气候等不利因素的影响,有利于植物生长。由于植物组织培养不受气候和季节的限制,因此,在进行苗木繁殖时便于稳定地进行周年生产。

2. 生长周期短、繁殖速度快

植物组织培养虽然需要一定的设备及能源消耗,但由于植物组织培养可人为控制培养条件,生长快,生长周期短,往往十几天到几十天可完成一个繁殖周期,每一繁殖周期可繁殖几倍到几十倍,甚至上百倍,植物材料能按几何级数大量繁殖,故总的来说还是成本低廉,利于工厂化大生产,可快速繁殖规格整齐一致的优质苗木,尤其在良种苗木及优质无毒种苗的快速繁殖方面是其他方法无可比拟的。

3. 管理方便,利于自动化

植物组织培养是在一定的场所环境下,人为提供一定的温度、光照、湿度、营养、激素等条件进行高度集约化的科学生产方式,与盆栽、田间栽培等方法相比省去了中耕除草、浇水施肥和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,便于实现流水线作业,且利于进行自动化控制生产和管理,实现农林业苗木的工厂化生产。

4. 培养材料经济

由于植物细胞具有全能性,故单个细胞、小块组织、茎尖或茎段等外植体经培养均可获得再生植株。在生产实践中以茎尖、根、叶、子叶、下胚轴、花丝、花瓣等材料进行培养时,只需要几毫米甚至不到1mm大小的材料就可获得一株苗木;在细胞及原生质体培养时,所需材料更少。由于取

材少，培养效果好，对于新品种的快速繁殖和良种复壮更新都有很大的应用价值。特别是良种苗木，有的是经过几十年培育出来的，有的是濒危植物，这些珍稀繁殖材料往往以单株的形式存在，均面临保存、利用和开发繁殖的问题，而单靠常规无性繁殖方法，需要几年或几十年才能繁殖为数不多的苗木，而用植物组织培养方法可在 1~2 年内生产上百万株苗木。

5. 培育无毒苗

采用扦插、嫁接、分株及埋条等营养器官繁殖的苗木，都有可能携带一种甚至多种病毒或类病毒，对苗木的生长及产品质量和产量都会产生不良影响。在植物组织培养中，利用微茎尖培养可脱除植物所带病毒，获得无毒苗，以此作为繁殖材料，可繁殖大量无毒苗木，以满足生产需要。果树无毒苗生长快、抗性强、结果早、果品产量和品质均得到大幅度提高。花卉无毒苗，植株生长势强，花朵变大，色泽鲜艳，抗逆性提高，产花量上升。农作物无毒苗，产量和品质提高，如马铃薯脱毒苗已被广大农民所接受，成为农民致富的典范。

（三）植物组织培养育苗的理论基础

1. 细胞学说

1667 年 Hooke 发现细胞；1756 年 Duhamel 发现了愈伤组织的形成。Schleiden 于 1838 年提出植物细胞学说，Schwann 在 1839 年提出细胞学说也适用于动物，在此基础上创立了生物细胞学说，认为细胞是生物体的基本结构单位，由它构成整个生物个体，同时生物细胞又是在生理上、发育上具有潜在全能性的功能单位。正如 Schwann 所说：“如果具有与有机体内一样的条件，每个细胞应该可以独立生存和发展”，这一论点成为进行植物组织培养研究的基础。

2. 植物细胞全能性学说

不论高等植物还是低等植物都是由细胞构成的，细胞是构成植物体的基本单位，而且植物的特性是由遗传基因所控制的。俗话说“种瓜得瓜，种豆得豆”，就是遗传基因作用的结果。植物细胞全能性是德国植物学家 Haberlandt 于 1902 年提出假说，认为组成植物体的每个细胞都是由细胞分裂产生的，任何一个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。由于体细胞具有全能性，所以单个体细胞在合适的条件下就能像合子一样发育成完整的生物个体。

但是处在完整植物体中不同部位的细胞由于受到完整植株对它们的调控作用，使其某些基因受到控制或遏制而只能使另一些基因发挥作用，所以完整植株中不同部位的细胞只表现出一定的形态及生理功能。当植物的器官或组织与完整植物分离后，就不再受到原植株的控制，如果供给合适的营养和生长调节物质，就能使其在离体条件下受到有效刺激而促进细胞分裂、细胞增殖、产生愈伤组织，并分化出器官，最终形成完整植株（图 1-2）。

3. 细胞全能性的实现（全能性的表达）

细胞全能性与细胞全能性表达具有不同含义，全能性细胞只有在适当条件下才能表达出全能性来。全能性表达的难易程度在各种植物，甚至在同一植物，同一组织的不同细胞之间也有很大差别。在多数情况下，植物细胞全能性的表达要经过一个从分化状态到脱分化的愈伤组织（或悬浮细胞）的中间形式，然后进入再分化和再生阶段。但也有的植物在培养过程中直接发生脱分化和再分化，而不需经历愈伤组织的中间形式。一般一个成熟细胞要表现它的全能性，必须经历脱分化和再分化两个过程。所谓脱分化是指已分化的组织（细胞分裂已停止）在适当的培养条件下恢复细胞分裂活性，

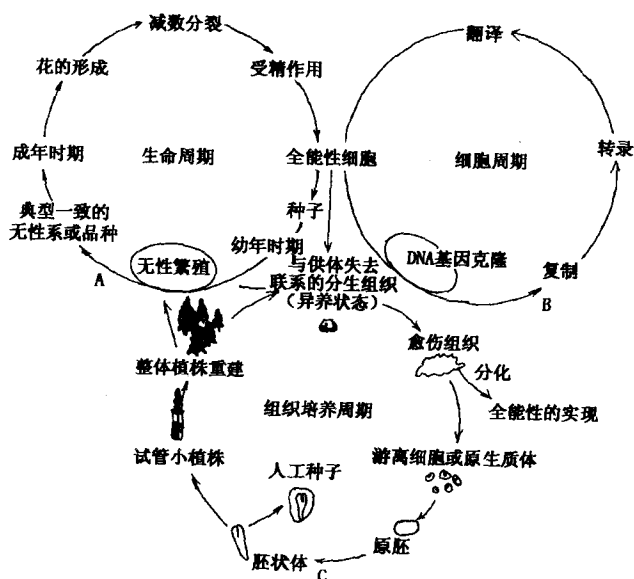


图 1-2 细胞全能性的实现与利用

从已分化的成熟状态转变为分生状态，也就是由有结构和功能的组织转化为无结构和特定功能的细胞团。愈伤组织即为典型的脱分化组织。脱分化的组织或细胞在一定条件下可转变为各种不同的细胞类型，表现为由无结构和特定功能的细胞团转变为有结构和特定功能的组织和器官，这一过程称为再分化。

细胞的孤立 (isolation) 也是诱发全能性表达的重要因素。因为处于整体植株中的细胞接受其周围细胞所产生的种种影响，妨碍其全能性的表达，而一旦切断胞间连丝，就为全能性表达创造了条件。这是因为在整体植物中，某些细胞的发育取决于其周围组织发出的一组信号。如果终止这些信号，而给予其他某种信号，有可能转变其发育方向，乃至表

达全能性。由于全能性仅是一种能力，它的表达还需要一定的信号与条件，所以全能性细胞不一定都能进行全能性的表达。因此，全能性只是一种可能性，实现这种可能性需要满足：①离体，使这些细胞从植物体其余部分的抑制影响下解脱出来；②植物细胞全能性的实现，除供给植物生长所必需的营养物质和环境条件外，植物生长调节物质也是必备的关键物质；③实现全能性一般要经历脱分化和再分化过程。植物组织的脱分化和再分化均离不开生长调节物质的促进作用。

4. 细胞全能性的实现途径

①直接诱导腋生芽 一般从含有腋芽的茎段外植体上，可直接诱导出腋生芽，这也是最常用的途径之一，可保持原品种的原有特性，特别适合于苗木的快速繁殖。

②直接诱导不定芽 从不含腋芽的器官，如叶片上诱导出的芽是不定芽，其特点是出芽数量多，但有变异的可能。

③诱导愈伤组织 然后从愈伤组织上诱导不定芽或胚状体，特别是诱导胚状体可以快速出苗或制造人工种子（也叫超级种子），由于胚状体结构完整，育苗速度快，数量多，被越来越多的应用，也有变异的风险。然而，采用适当的激素种类和浓度处理，可降低变异频率。

第二节 植物组织培养及其育苗研究的发展过程

（一）探索时期

早在 1838 年，德国植物学家 Schleiden 发表了《植物发生论》论文；1839 年，德国动物学家 Schwann 出版了《关于动植物的结构和生长一致的研究》的专著。这两位科学家论著的发表，创立了细胞学说。

在此基础上，德国植物学家 Haberlandt 于 1902 年提出，对高等植物的组织和器官可以进行不断地分割，直到单个细

胞，单个细胞还能形成一个完整新个体的植物细胞全能性理论，即植物的体细胞，在适当的条件下，具有不断分裂和繁殖，并发展成完整植株的潜在能力。为了验证自己的观点，他曾对高等植物的保卫细胞、叶肉细胞、髓细胞等进行了植物组织离体培养。但是，由于当时对这些植物的化学成分、材料的性质、离体培养所需的其他条件研究甚少，致使在离体培养中没有看到细胞的分裂。

1904 年，Hanning 通过对萝卜和辣根胚的培养，发现离体胚可以充分发育并且能提前形成小苗。据此，Brow 于 1906 年在人工合成培养基上进行无菌外植体的培养，发现各种胚在培养基上有增殖生长的反应。1922 年，Haberlandt 的学生 Kotte 和美国的 Robbins 分别报道了根尖离体培养并获得成功。同年，Robbins 把玉米、棉花等植物的茎尖放在由多种无机元素和糖组成的人工培养基上培养，形成了缺绿的叶和根。1925 年，Laibach 对亚麻的种间杂种胚进行了培养，成功地获得杂种植株。1926 年，Harlan 报道了有关大麦幼胚的培养。

在这一时期，一些植物的幼胚培养获得了成功，离体器官的培养也有了一定的发展，但同真正进行植物组织培养育苗相比，这还只是万里长征的第一步，属于探索时期。

（二）建立阶段

20 世纪 30 年代开始，植物组织培养技术得到了逐步发展和完善。1933 年，我国学者李继侗在进行银杏的离体培养时，证明了大小约 3mm 的幼胚能正常生长。这一发现对植物组织培养的发展和用植物自身的提取物促进培养物的生长具有重要的意义。1934 年，美国 White 通过对番茄离体根的培养，形成了第一个可以正常生长的无性系，从而使非胚器官的培养首先获得了成功。White 在他的实验中还发现，IAA（吲哚乙酸）和 B 族维生素在植物组织培养中具有