



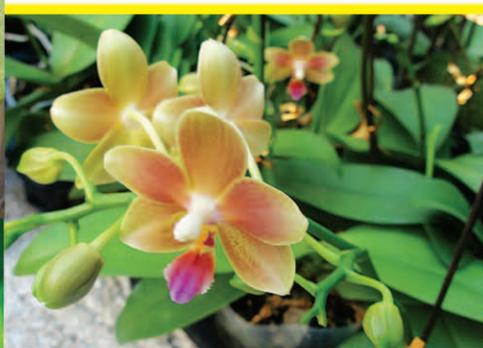
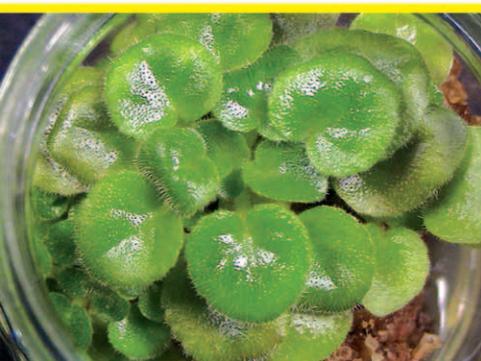
固原市农业学校

“国家中等职业教育改革发展示范学校建设计划”项目教材

植物组织培养技术

ZHIWU ZUZHI PEIYANG JISHU

郑艾琴◎主编



黄河出版传媒集团
阳光出版社



固原市农业学校

“国家中等职业教育改革发展示范学校建设计划”项目教材

植物组织培养技术

ZHIWU ZUZHI PEIYANG JISHU

郑艾琴◎ 主编



黄河出版传媒集团

阳光出版社

图书在版编目(CIP)数据

植物组织培养技术 / 郑艾琴主编. — 银川: 阳光出版社, 2013.7

ISBN 978-7-5525-0925-0

I. ①植… II. ①郑… III. ①植物组织—组织培养—中等专业学校—教材 IV. ①Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 172338 号

植物组织培养技术

郑艾琴 主编

责任编辑 王薇薇

封面设计 静 璇

责任印制 郭迅生

黄河出版传媒集团
阳光出版社 出版发行

地 址 银川市北京东路 139 号出版大厦(750001)

网 址 <http://www.yrpubm.com>

网上书店 <http://www.hh-book.com>

电子信箱 yangguang@yrpubm.com

邮购电话 0951-5044614

经 销 全国新华书店

印刷装订 宁夏捷诚彩色印务有限公司

印刷委托书号 (宁)0015926

开 本 787mm × 1092mm 1/16

印 张 10.25

字 数 230 千

版 次 2013 年 7 月第 1 版

印 次 2013 年 7 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5525-0925-0/Q·20

定 价 17.00 元

版权所有 翻印必究

《植物组织培养技术》编写人员

主 编 郑艾琴

副主编 殷建宝

编 委 郑艾琴 殷建宝 王晓娅 胡维宝



彩图绪-1 月季外植体培养



彩图绪-2 初代培养



彩图绪-3 继代培养



彩图 1-3 培养室



彩图 1-4 驯化移栽温室



彩图 3-1 外植体培养



彩图 3-3 培养材料的真菌污染



彩图 3-4 蝴蝶兰组培苗的褐变现象



图 4-1 无菌短枝型



图 4-2 丛生芽增殖型



图 4-3 器官发生型



图 4-4 原球茎发生型



图 4-7 月季外植体培养



图 4-8 组培苗的污染现象



图 4-9 河北杨叶片外植体的褐变



图 4-11 河北杨试管苗生根培养



图 4-13 蝴蝶兰组培苗出瓶移栽



图 4-14 蝴蝶兰组培苗容器移栽



图 4-15 茎段培养示意图



图 4-16 叶片外植体培养示意图



图 4-17 叶片培养直接产生不定芽



图 4-20 蝴蝶兰组培苗



图 5-2 马铃薯茎尖脱毒培养



图 9-1 玫瑰组培快繁



图 9-2 康乃馨组培苗



图 9-3 球根秋海棠试管苗



图 9-4 移栽成活的球根秋海棠组培苗



图 9-6 长寿花试管苗



图 9-6 长寿花试管苗



图 9-7 蝴蝶兰组培苗



图 9-9 盛开的仙客来组培苗



图 9-8 生长健壮的蝴蝶兰组培苗



图 9-11 盛开的菊花组培苗



图 9-12 盛开的菊花组培苗



图 9-13 盛开的非洲菊菊



图 9-14 生根移栽的北海道黄杨组培苗



图 9-15 河北杨继代增殖阶段

前 言

植物组织培养是现代生物技术的重要组成部分之一。目前,植物组织培养技术已渗透到生物学科各个领域,广泛应用于农业、林业、工业和生物医药,也成为现代农林业高新技术的重要标志之一,尤其在植物优良品种的快速繁殖、脱毒苗木生产、新品种培育、种质资源保存、药用植物工厂化生产等方面发挥着重大作用,产生了可观的经济效益和社会效益,成为生物科学中最具有活力的学科之一。随着经济社会的发展及植物组织培养技术的广泛应用,《植物组织培养技术》已成为高等农林院校及中等农业职业学校园林、园艺等专业开设的主干课程。

根据职业院校“工学结合,校企合作”及“项目化”课程的教学要求,使职业学校的学生能更好地掌握实用技能,本教材在编写上,力求实际应用,凸显基本知识及技能,同时,吸纳了国内外最新科研成果和企业先进生产实例,并结合编者长期从事植物组织培养教学及科研的实践经验,从植物组织培养技术岗位的要求出发,结合中职学生的特点和人才培养方向,以强化技术应用能力为主线,本着理论与实践结合、课堂与工厂化结合、做中学、做中教的原则,阐明植物组织培养的基本理论和技能。本教材分基础应用和技能训练两部分。基础应用部分主要介绍植物组织培养的基本概念、发展历史及应用,植物组织培养实验室设计与设备使用,植物组织培养的基本操作技术、基本培养方法、植物脱毒技术、种植资源保存、细胞培养等内容。技能训练部分选取了实用性较强的23个实训项目,为学生实训提供指导。

本教材编写过程中得到了固原市农业学校的大力支持,全体参编人员付出了辛勤的劳动,并参阅了大量的凝聚了许多专家学者的科研成果的学术著作、教材、科技书刊,也得到了许多园林花卉种苗企业技术专家的大力支持,在此我们一并表示衷心的感谢!

由于编者水平有限,书中难免有不足之处,恳请批评指正。

编 者

2013年3月20日

目 录

绪论	001
第一章 植物组织培养实验室设备和基本操作	007
第一节 植物组织培养实验室的设置和基本设备	007
第二节 基本操作	009
第三节 常用仪器、设备及用具	011
第二章 植物组织培养基本技术	015
第一节 培养基的基本成分	015
第二节 常用培养基的配方及其特点	018
第三节 培养基的配制	021
第三章 外植体培养	026
第一节 外植体的选择及消毒	026
第二节 外植体的接种和培养	030
第三节 外植体的褐变及玻璃化	035
第四章 植物组织培养快速繁殖技术	039
第一节 植物快速繁殖技术	039
第二节 营养器官培养快速繁殖技术	049
第三节 花卉组培快繁技术及产业化前景	051
第五章 无病毒苗的培养	056
第一节 无病毒苗培育的意义	056
第二节 脱毒方法	057
第三节 脱毒植株的鉴定	062
第四节 无病毒植株的利用	065
第六章 生殖器官培养	067
第一节 花药和花粉培养技术	067

第二节	胚胎培养与子房培养	073
第三节	植物离体授粉	079
第七章	细胞培养	082
第一节	单细胞培养	082
第二节	细胞悬浮培养	086
第八章	种质保存	090
第一节	种质资源保存的一般概念	090
第二节	低温保存	091
第三节	超低温保存	092
第九章	常见园林植物的快速繁殖技术	097
第一节	玫瑰组培快繁试验研究	097
第二节	康乃馨脱毒及组培快繁	099
第三节	球根秋海棠组培快繁技术	102
第四节	百合组培快繁技术	103
第五节	长寿花组培快繁技术	105
第六节	蝴蝶兰的组培快繁方法	106
第七节	仙客来的组培快繁技术研究	110
第八节	菊花的组培快繁技术	114
第九节	非洲菊的组织培养	115
第十节	北海道黄杨组培快繁	118
第十一节	河北杨组培快繁技术研究	121
技能与实训项目		124
实训项目一	植物组培实验室参观与设计	124
实训项目二	植物组织培养实验室的卫生与灭菌	125
实训项目三	组培玻璃器皿的选择和清洗	128
实训项目四	超净工作台的使用	129
实训项目五	MS 培养基大量元素母液的配制与保存	129
实训项目六	MS 培养基铁盐母液的配制	131
实训项目七	MS 培养基微量元素母液的配制	132
实训项目八	MS 培养基有机物质母液的制备	134
实训项目九	生长调节物质母液的配制与保存	135
实训项目十	MS 固体培养基的配制与灭菌	136
实训项目十一	植物组织培养无菌操作技术	138

实训项目十二	污染苗、玻璃苗、褐变苗的识别与观察	140
实训项目十三	月季外植体的选择及培养	140
实训项目十四	球根秋海棠的叶片培养	142
实训项目十五	康乃馨茎尖培养	143
实训项目十六	马铃薯的脱毒与快繁	144
实训项目十七	百合鳞茎培养	145
实训项目十八	大蒜叶片培养	147
实训项目十九	草莓花药培养	147
实训项目二十	苹果胚培养	149
实训项目二十一	细胞的悬浮培养	150
实训项目二十二	试管苗的驯化与移栽	150
实训项目二十三	河北杨的组培快繁技术	152
主要参考文献	154

绪 论

学习目标

1. 掌握植物组织的概念。
2. 了解植物组织培养的发展简史。
3. 掌握植物组织的类型、理论基础及在生产实践中的应用。

一、植物组织培养的一般概念

植物组织培养(plant tissue culture):是指将离体的植物器官(根、茎、叶、花、果实、种子等)、组织(花药、胚珠、表皮、胚乳等)、细胞(体细胞、生殖细胞等)及原生质体放在无菌和人工控制的环境条件下,利用适当的培养基进行培养,使其生长、分化,形成完整植株的技术。又称植物离体培养。

外植体(explants):植物组织培养中,第一次接种使用的各种材料,包括植物器官、组织和细胞。(见彩图绪-1)

愈伤组织(callus):外植体因受伤或在离体培养时,其未分化的细胞和已分化的细胞恢复分裂能力进行活跃的分裂增殖而形成的一种无特定结构和功能的组织。

植物组织培养技术已在科学研究和生产上开辟了令人振奋的多个新领域,成为举世瞩目的生物技术之一。已在快速繁殖、去除病毒、加速育种进程、次生代谢产物生产和种植资源的保存等方面取得了巨大的经济效益、社会效益和生态效益。

二、植物组织培养的发展简史

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。

1838~1839 年德国植物学家 Schleiden 和动物学家 Schwann 提出了细胞学说:一切生物都是由细胞构成的,细胞是生物体的基本功能单位,细胞只能由细胞分裂而来。在此学说的基础上,Haberlandt(1902 年)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。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, 所以试验失败, 培养的细胞虽然存活了几个月但没能分裂。自 Haberlandt 的实验之后直到 1934 年 White 培养番茄离体根尖的成功, 其间的 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 B₁、B₆ 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, 获得了曼陀罗属离体胚培养的成功。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(2,4-二氯苯氧乙酸) 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 和 Miller 等分离确定了 6-咪喃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。随后, 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。S.Guha 和 S.C.Maheshwari(1966 年, 1967 年), Rourgin 和 Nitsch(1967 年) 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 年代开始, 植物组织与细胞培养逐渐走向了工厂化和商品化阶段。

植物组织培养发展可概括为五个阶段:

1. 探索阶段(1902~1929 年)。
2. 组织培养方法和定义的建立阶段(1930~1939 年)。
3. 细胞全能性的证实阶段(1940~1959 年)。
4. 组织培养技术和理论迅速发展阶段(1960~1979 年)。

5. 组织培养技术的广泛应用阶段(1980~今)。

三、植物组织培养的类型

(一)按外植体的来源分

1. 器官培养

是指对植物体各种器官如根、茎、叶、花、果实及器官原基进行离体培养的方法。以用来培养的外植体器官的类型来分类。如:花药培养、根培养、茎段培养、叶片培养等。总之,用什么器官培养就叫什么培养。

2. 组织培养

是指对植物体各部位组织或已诱导的愈伤组织进行离体培养的方法。常用的组织培养材料有分生组织、形成层、表皮、皮层、薄壁细胞、髓部、木质部等。

3. 细胞培养

是指对植物的单个细胞或较小的细胞团进行离体培养的方法。常用的细胞培养材料有性细胞、叶肉细胞、根尖细胞、韧皮部细胞等。

4. 原生质体培养

是指将植物细胞的细胞壁通过机械、物理、化学的方法除去,对原生质体进行离体培养的方法。

5. 胚胎培养

是指对植物成熟或未成熟胚进行离体培养的方法。常用的胚胎培养材料有幼胚、成熟胚、胚乳、胚珠、子房。

(二)按培养过程分

1. 初代培养

将植物体上分离下来的外植体进行最初培养的过程。其目的是建立无菌培养物,诱导腋芽或顶芽萌发,或产生不定芽、愈伤组织、原球茎。通常是植物组织培养中比较困难的阶段,也称启动培养、诱导培养。(见彩图绪-2)

2. 继代培养

将初代培养诱导产生的培养物重新分割,转移到新鲜培养基上继续培养的过程。其目的是使培养物得到大量繁殖,也称为增殖培养。(见彩图绪-3)

3. 生根培养

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田间移栽后的成活率。(见彩图绪-4)

四、植物组织培养的理论基础——植物细胞的全能性

(一)细胞的全能性

植物组织培养的理论基础是植物细胞的全能性(totipotent),即每个植物细胞都具有该植物体全部遗传的信息,在一定条件下具有发育成完整植物体的潜在能力。

植物细胞全能性具有一定的差异: