



省级重点专业建设成果
高等职业教育农学院艺类“十三五”规划教材

植物组织培养

ZHIWU
ZUZHI PEIYANG

主 编◎李春龙 万 群 唐 敏
主 审◎韩春梅 张世鲜



西南交通大学出版社

省级重点专业建设成果
高等职业教育农学院艺类“十三五”规划教材

植物组织培养

主 编 李春龙 万 群 唐 敏

主 审 韩春梅 张世鲜

参 编 江成康（都江堰孙桥现代农业发展有限公司）

熊维全（成都农林科学院）

陈艳秋（成都农业科技职业学院）

姚 丽（成都农业科技职业学院）

西南交通大学出版社

· 成 都 ·

图书在版编目 (C I P) 数据

植物组织培养 / 李春龙, 万群, 唐敏主编. —成都:
西南交通大学出版社, 2016.7

高等职业教育农学院艺类“ 十三五” 规划教材
ISBN 978-7-5643-4766-6

I. ①植... II. ①李... ②万... ③唐... III. ①植物组
织 - 组织培养 - 高等职业教育 - 教材 IV. ①Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 147884 号

高等职业教育农学院艺类“ 十三五” 规划教材

植物组织培养

主编 李春龙 万群 唐敏

责任编辑 李伟
特邀编辑 张芬红
封面设计 何东琳设计工作室

出版发行 西南交通大学出版社
(四川省成都市二环路北一段 111 号
西南交通大学创新大厦 21 楼)
发行部电话 028-87600564 028-87600533
邮政编码 610031
网 址 <http://www.xnjdcbs.com>

印 刷	成都蓉军广告印务有限责任公司
成 品 尺 寸	185 mm× 260 mm
印 张	12
插 页	2
字 数	304 千
版 次	2016 年 7 月第 1 版
印 次	2016 年 7 月第 1 次
书 号	ISBN 978-7-5643-4766-6
定 价	32.00 元

课件咨询电话: 028-87600533

图书如有印装质量问题 本社负责退换

版权所有 盗版必究 举报电话: 028-87600562

前 言

植物组织培养是作物生产技术、园艺技术、园林技术、植物保护、种子生产与经营等专业的一门必修课。植物组织培养是现代生物技术的重要组成部分，是一门专业性、实践性很强的课程，技能训练课的重要性尤为突出。本课程对农业高职学生实践能力、创新能力和创业能力的培养，对产学研结合、为农业生产和地方经济建设服务具有重要的现实意义。

为适应现代高职教育教学的改革要求，大力推行工学结合，实现“教学做一体”，使学生切实掌握好植物组织培养这门技术，提高其实践操作能力和创业开发能力。编者对植物组织培养的教学内容进行了大胆改革，以理论“必需、够用”为原则（绝大多数理论知识以知识拓展的形式供学生自主学习用），重点突出实践和开发能力的培养，既符合当前职业岗位要求，又可满足未来的发展需求。本书除对植物组织培养的理论基础和基础知识作简明必要的介绍以外，重点阐述了植物组织培养各方面的实用技术，内容包括植物组织培养中常用设备和仪器的使用方法、植物组织培养的基本技术、植物脱毒技术、组培苗木的工厂化生产以及植物组织培养实例（主要包括农作物、蔬菜、花卉、水果作物、药用植物及园林绿化植物的组织培养实用技术）。为了培养学生的实践动手能力，本书专门安排了 10 个实验实训内容，使学生能得到系统的训练，掌握实际操作技术。同时，书中还吸收了近年来植物组织培养方面所取得的最新成果和先进经验。书中每个项目之后附有思考题，可供学生思考、复习和练习之用。

本书可供高职高专院校作物生产技术、园林技术、园艺技术等专业学生使用，也可供中等专业学校、大专函授学校、成人高校相关专业学生使用，同时也可作为植物组培技术的培训教材以及植物组培爱好者、生产者的自学用书。

参加本书编写工作的有：成都农业科技职业学院李春龙老师（负责项目一、项目五、项目六的编写）、成都农业科技职业学院万群老师（负责项目二中任务三和任务四、项目四的编写）、成都农业科技职业学院唐敏老师（负责项目二中任务一和任务二、项目三、项目七的编写）。全书由成都农业科技职业学院韩春梅教授和成都农业科技职业学院现代农业分院张世鲜院长主审。

在本书编写过程中，编者已将所参考的文献资料列入参考文献，在此对相关作者表示诚挚的谢意。本书的编写得到了西南交通大学出版社的大力支持和热情帮助，编者在此深表感谢。

由于编者水平有限、经验不足，书中不足之处在所难免，恳请专家和同行批评指正，并提出宝贵意见。

编 者

2016 年 3 月

目 录

项目一 课程导入	1
任务一 植物组织培养的基础理论和基本知识	1
任务二 植物组织培养在农业上的应用及植物组织培养新技术	5
项目二 无菌操作前的准备工作	13
任务一 植物组织培养实验室设计与组成	13
任务二 植物组织培养中常用设备和仪器	16
实验实训一 园区植物组织培养实验室的参观与设计	25
实验实训二 组培器皿和器械的洗涤、灭菌及环境的消毒	26
任务三 培养基的配制	29
实验实训三 MS 培养基母液的配制与保存	37
实验实训四 MS 固体培养基的配制、分装与保存	43
任务四 外植体的选取及处理	45
实验实训五 外植体的选取与处理	47
项目三 无菌操作（接种）技术	50
任务一 接 种	50
实验实训六 外植体的接种与培养	51
实验实训七 试管苗的转接	52
实验实训八 植物组织培养整体方案设计	53
项目四 无菌操作后的工作	55
任务一 植物组织培养试管苗环境条件的调控	55
任务二 试管苗培养中的常见问题及预防措施	56
实验实训九 组培过程中污染苗、褐变苗、玻璃化苗的识别	65
任务三 试管苗的驯化与移栽	65
任务四 试管苗的苗期管理	68

实验实训十 试管苗的驯化、移栽与管理	69
项目五 组培苗工厂化生产的经营与管理	71
任务一 商业化经营思想与措施	71
任务二 生产规模与生产计划的制订及工厂化生产的工艺流程	74
任务三 组培苗工厂化生产设施和设备	76
任务四 成本核算与效益分析	79
项目六 植物脱毒技术	82
任务一 植物脱毒的概念与意义	82
任务二 植物脱毒的原理与方法	85
任务三 脱毒苗的鉴定、保存与繁殖	88
项目七 植物组织培养实例	96
任务一 农作物的组织培养技术	96
任务二 果蔬类植物的组织培养技术	104
任务三 果树类植物的组织培养技术	113
任务四 药用植物的组织培养技术	126
任务五 花卉类植物的组织培养技术	141
任务六 园林绿化植物的组织培养技术	164
参 考 文 献	178
附 录	182
附录 1 常见缩写符号及中英文名称	182
附录 2 常用化合物的分子量及浓度换算表	184
附：植物组织培养彩图	187



项目一 课程导入

任务一 植物组织培养的基础理论和基本知识

一、植物组织培养的概念和类型

(一) 植物组织培养的概念

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、组织、细胞或原生质体, 培养在人工配制的培养基 (medium) 上, 人为控制适宜的培养条件, 使其生长、分化、增殖, 发育成完整植株或生产次生代谢物质的过程和技术。由于植物组织培养是在脱离植物母体条件下的试管内进行的, 所以也称为离体培养 (in vitro culture) 或试管培养 (test tube culture)。凡是用于离体培养的材料 (器官、组织、细胞、原生质体等) 统称为外植体 (explant)。

原生质体 (protoplast) 是细胞的主要组成部分, 指细胞壁以内各种结构的总称, 包括细胞膜、细胞质与细胞核。

(二) 植物组织培养的类型

植物组织培养有很多种分类方法, 根据不同分类的依据可以分为不同类型。其中, 比较常用的分类方法是根据培养材料将植物组织培养分为以下 6 个培养类型: 植株培养、胚胎培养、器官培养、组织培养、细胞培养和原生质体培养。

(1) 植株培养 (plant culture): 是对完整植株材料的无菌培养。植株培养一般多以种子为材料的无菌培养, 如春兰诱导种子萌发成苗。

(2) 胚胎培养 (embryo culture): 指从胚珠中分离出来的成熟或未成熟胚为外植体的离体无菌培养。

(3) 器官培养 (organ culture): 指以植物的根 (根尖、根段)、茎 (茎尖、茎段)、叶 (叶原基、叶片、叶柄)、花器 (花瓣、雄蕊)、果实、种子为外植体的离体无菌培养。

(4) 组织培养 (tissue culture): 指以分离出植物各部位的组织 (如分生组织、形成层、表皮、皮层、薄壁组织等) 或已诱导的愈伤组织为外植体的离体无菌培养, 也是狭义的组织培养。

(5) 细胞培养 (cell culture): 指对植物体的单个细胞或较小细胞团的离体无菌培养, 获得单细胞无性繁殖系。

(6) 原生质体培养 (protoplast culture): 指以除去细胞壁的原生质体为外植体的离体无菌培养。通过原生质体融合即体细胞杂交, 能够获得种间杂种或新品种。

根据培养基状态将植物组织培养分为 3 个培养类型: 固体培养 (在培养基内加入琼脂)、半固体培养和液体培养 (也叫悬浮培养)。液体培养又分为静止培养、振荡培养 (培养过程中, 将培养基和外植体放入振荡器中振荡而完成的培养过程, 主要应用于组织培养和细胞培养)、旋转培养 (培养过程中, 将培养基和外植体放入摇床旋转而完成的培养过程, 主要应用于器官脱分化培养) 和纸桥培养 (培养过程中, 在培养基中放入滤纸, 再将材料置于滤纸上而进

行的培养过程，主要应用于植物脱毒茎尖培养）4 种类型。

根据培养方法可将植物组织培养分为 4 个培养类型：平板培养（将制备好的单细胞悬液，按照一定的细胞密度，接种在 1 mm 左右的薄层固体培养基上进行培养）、微室培养（人工制造一个小室，将单细胞培养在小室中的少量培养基上，使其分裂增殖形成细胞团的方法）、悬浮培养（将单个游离细胞或小细胞团悬浮在液体培养基中进行增殖培养的方法）和单细胞培养（在离体条件下对植物单个细胞进行增殖培养的方法）。

根据培养过程可将植物组织培养分为 2 个培养类型：初代培养（Primary culture，将植物体上分离下来的外植体进行最初培养的过程）和继代培养（Subculture，由于营养物质的枯竭、水分的散失以及一些组织代谢产物的积累，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进行培养的过程称为继代培养，也称增殖培养，一般每隔 4~6 周进行一次继代培养）。

根据培养基的作用可将植物组织培养分为 3 个培养类型：诱导培养、增殖培养和生根培养。

根据培养目的可将植物组织培养分为 4 个培养类型：脱毒培养、微体快繁、试管育种和试管嫁接。

根据培养条件（培养过程是否需要光照）可将植物组织培养分为 2 个培养类型：光培养和暗培养。

二、植物组织培养的原理及过程

（一）植物组织培养的原理

植物组织培养的原理就是植物细胞具有全能性。细胞全能性（cell totipotency）是指植物的每一个细胞都携带有一套完整的基因组，并具有发育成为完整植株的潜在能力，细胞的这种特性叫作细胞全能性。

细胞具有这种潜能是因为每个细胞都包含了这个物种所特有的全套遗传物质，具有发育成为完整个体所必需的全部基因。

对于植物细胞来说，不仅受精卵具有全能性，体细胞也具有全能性。植物细胞表达全能性大小顺序为受精卵>生殖细胞>体细胞。

植物生长调节物质是植物组织培养中的关键性物质，其中应用最多的是生长素类（IAA，诱导愈伤组织形成、诱导生根）和细胞分裂素类（CTK，诱导生芽）。已有实验表明赤霉素（GA）类物质可以促进已分化芽的伸长生长，而脱落酸（ABA）和乙烯（ETH）在实际应用中极少。

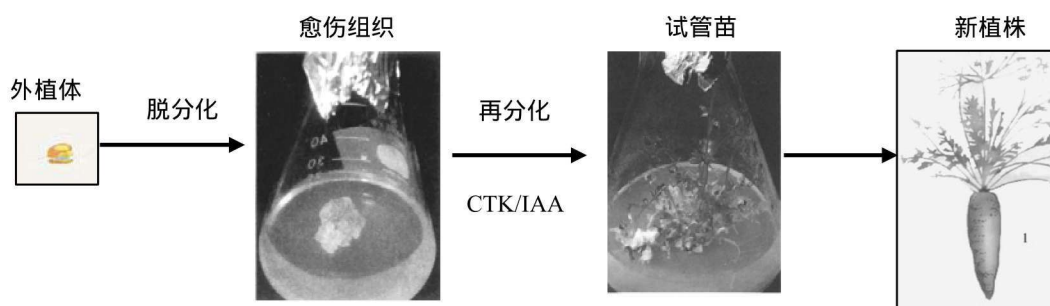
（二）植物组织培养的过程

植物组织培养的过程如图 1-1 所示。

图 1-1 完全展示了整个植物组织培养的过程，下面分别介绍组培过程中的几个关键性概念：

（1）脱分化（dedifferentiation）：又叫去分化，是指在一定条件下，已分化成熟细胞或静止细胞脱离原状态而恢复到分生状态的过程，即形成愈伤组织的过程。

（2）愈伤组织（callus）：指外植体在培养一段时间以后，通过细胞分裂，形成的一团无定形、高度液泡化、具有分生能力而无特定功能的薄壁组织，如图 1-2 所示。



要保证无菌环境下操作

图 1-1 植物组织培养过程图

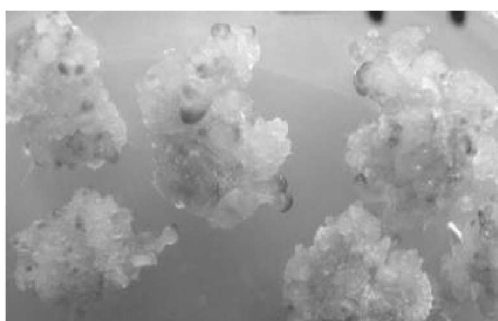


图 1-2 愈伤组织

(3) 再分化 (redifferentiation): 是指在一定的条件下, 植物的成熟细胞经历了脱分化形成愈伤组织后, 由愈伤组织再形成完整植株的过程。

(4) 试管苗 (test-tube plantlet): 是指外植体在试管容器中经无菌培养所得到的植物种苗, 如图 1-3 所示。



图 1-3 试管苗

三、植物组织培养的特点

植物组织培养是 20 世纪发展起来的一门新技术，由于科学技术的进步，尤其是外源激素的应用，使植物组织培养不仅从理论上为相关学科提供了可靠的实验证据，而且一跃成为一种大规模、批量工厂化生产种苗的新方法，并在生产上越来越得到广泛的应用。植物组织培养之所以发展迅速、应用广泛，是由于其具备以下几个特点。

（一）培养材料的来源广

由于植物细胞具有全能性，单个细胞、小块组织、茎尖或茎段等经过离体培养均可再生成完整的植株。在实际生产中，多以茎尖、茎段、根、叶片、子叶、下胚轴、花瓣、花药等器官或组织作为外植体，并且所需材料只需几毫米，甚至不到 1 mm。如果用细胞或原生质体培养时，所需材料更小。由于取材较少，培养效果较好，对于新品种的推广和良种复壮更新，尤其是对名、优、特、新、奇品种的保存、利用与开发，都有很高的应用价值和重要的实践意义。

（二）培养条件可以人为控制，可连续周年试验或生产

植物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（温度、光照、湿度等环境条件完全可人为控制）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，便于连续、稳定地进行周年试验或生产。

（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，可根据不同植物、不同器官、不同组织的不同要求而提供不同的培养条件，来满足其快速生长的要求，缩短培养周期。植株也比较小，一般 20~30 d 就完成一个繁殖周期，每一个繁殖周期可增殖几倍到几十倍，甚至上百倍，植物材料以几何级数增加。

植物组织培养在良种苗木及优质脱毒种苗的快速繁殖方面也是其他方法无可比拟的。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，故总体来说成本低廉，且能及时提供规格一致的良种苗木及优质脱毒种苗。一些珍稀繁殖材料往往以单株的形式存在，单单依靠常规无性繁殖方法，需要几年或几十年才能繁殖出为数不多的苗木，而用植物组织培养的方法可在 1~2 年内生产上百万株整齐一致的优质种苗。比如取非洲紫罗兰的 1 枚叶片进行培养，经 3 个月培养就可得到 5 000 株苗。

（四）管理方便，利于工厂化生产和自动化控制

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，进行高度集约化、高密度的科学培养生产，可比盆栽、田间栽培繁殖省去中耕除草、施肥浇水、病虫害防治等一系列繁杂的劳动，大大节省了人力、物力及田间种植所需要的土地，并可通过仪器仪表进行自动化控制，有利于工厂化生产。植物组织培养是未来农业工厂化育苗的发展方向。



任务二 植物组织培养在农业上的应用及植物组织培养新技术

一、植物组织培养在农业上的应用

植物组织培养在农业生产上主要应用于植物快繁、植物脱毒、新品种培育、植物种质资源保存及生产有用的次生代谢物等。

(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、经济效益较高的一项技术,主要应用于那些通过其他方式不易繁殖,或繁殖率较低的植物繁殖上。其商业性应用始于 20 世纪 70 年代美国兰花工业,80 年代已被认为是能够带来全球经济利益的产业。据报道,全球有 1 000 多家组培公司,美国有 100 多家兰花组培公司,年产值 5 000 万~6 000 万美元(1 美元 $\approx$ 6.48 元人民币)。例如,美国的 Wyford 国际公司设有 4 个组培室,每年培养的观赏花卉、蔬菜、果树及林木等组培苗有 3 000 万株,研究和培育的新品种有 1 000 多个;以色列的 Benzur 公司年产观赏植物组培苗 800 万株;印度的 Harrisons Malayalam 有限公司年产观赏植物组培苗 400 万株。

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万倍,乃至百万倍的幼苗。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。

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,包括观赏植物、蔬菜、果树、大田作物及其他经济作物。我国已有 300 多家科研单位和种苗工厂进入批量生产阶段。如海南、广东、福建的香蕉苗,云南、上海的鲜切花种苗,广西的甘蔗种苗,山东的草莓种苗,江苏、河北的速生杨种苗等。

(二) 脱毒苗的培育

植物脱毒往往是和植物快繁结合在一起应用的。植物在生长发育过程中几乎都要遭受到病毒不同程度的侵染,特别是靠无性繁殖的植物,感染病毒后会代代相传,越染越重,严重地影响了产量和品质,给生产带来巨大损失。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,造成产花少、花小、花色暗淡,大大影响了其观赏价值。解决这种问题的方法只有进行脱毒培养。如大蒜脱毒后叶面积增加 58%~96%,蒜头增产 32%~114%,蒜薹增产 66%~175%;甘薯脱毒后增产 17%~158%,并且大、中薯率提高;马铃薯脱毒后株高增加 63%~186%,增产 50%~90%;柑橘无病毒苗可提高产量 15%~45%,并且着色好、糖度高;草莓无病毒苗可提高产量 20%~60%。

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危害的主要方法。植物的脱毒原理是在植物体内病毒分布不均匀,在茎尖 0.1~1 mm 的部位含量较低或者不含有病毒,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。脱毒苗恢复了植物原有的优良种性，生长势明显增强，整齐一致，产量提高，品质得到改善。如大蒜脱毒后蒜头直径由 4.7 cm 增加到 7.2 cm；马铃薯脱毒后增产 50%~100%，近两年脱毒的种薯已在主产区普及，推广面积达 11.3 万公顷，而且在日本、荷兰、越南等国也已大面积应用；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，并且我国已建立了很多脱毒种苗生产基地，培养脱毒苗供应全国生产栽培，经济效益非常可观。

（三）植物新品种的培育

1. 花药和花粉培养（单倍体育种）

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。1964 年，印度的 Guba 和 Maheshwari 培养毛叶曼陀罗花药获得了第一株单倍体植株，从而促进了花药和花粉培养的研究，以后在烟草、水稻、小麦、玉米、番茄、甜椒、草莓、苹果等多种植物上获得成功。如 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”等新品系。

由于单倍体植株往往不能结实，在花药或花粉培养中用秋水仙素处理，可使染色体加倍获得同源二倍体的纯合系，其后代不会分离，可以直接用于选育杂种一代的亲本或性状纯合的常规品种。与常规育种方法相比，通过花药和花粉培养获得单倍体的单倍体育种方法，可以在短时间内得到作物的纯系，从而加快了育种进程。

2. 胚培养

胚培养是植物组织培养中最早获得成功的技术。在植物种间杂交或远缘杂交中，杂交不孕给远缘杂交带来了许多困难，采用胚的早期离体培养可以使胚正常发育并成功地培养出杂交后代，并通过无性系繁殖获得数量多、性状一致的群体，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。利用胚乳培养可以获得三倍体植株，再经过染色体加倍获得六倍体，进而育成植株生长旺盛、果实大的多倍体植株。

3. 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。目前，已获得 40 多个种间、属间甚至科间的体细胞杂种植株或愈伤组织，有些还进而分化成苗。

4. 选择细胞突变体

离体培养的细胞处于不断地分裂状态，容易受到培养条件和外界因素如射线、化学物质等的影响而发生变异，从中可以筛选出对人们有用的突变体，进而育成新品种。目前，用这种方法已筛选到抗病虫、抗寒、抗盐、抗除草剂毒性、高赖氨酸、高蛋白、矮秆高产的突变体，有些已用于生产。



5. 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，大大地缩短了育种年限，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的研究最终都离不开应用植物组织培养技术和方法，它是植物基因工程必不可少的技术手段。

（四）有用次生代谢物的生产

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，用单细胞培养产生的蛋白质，将给饲料和食品工业提供广阔的原料生产前途；用组织培养方法生产微生物以及人工不能合成的药物或有效成分，有些已投入生产。目前，已有 60 多种植物在培养组织中有效物质的含量高于原植物，如粗人参皂苷在愈伤组织中含量为 21.4%，在分化根中含量为 27.4%，而在天然人参根中的含量仅为 4.1%。

目前，利用植物组织培养生产的有用次生代谢产物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）种质资源的离体保存

种质资源是农业生产的基础，由于自然灾害、人为活动已造成相当数量的植物消失或正在消失，特别是具有独特遗传性状的物种。如果采用植物组织培养的方式，将种质资源的外植体放到无菌环境中进行培养，并置于低温或超低温条件下保存则可以达到长期保存的目的，可节约大量的人力、物力和土地，还可挽救濒危物种。如一个 0.28 m^3 的普通冰箱可存放 2 000 支试管苗，而容纳相同数量的苹果植株则需要近 6 hm^2 的土地。

离体保存的种质资源无菌、材料小、可长期保存，便于地区间和国际间进行交流、转移。如草莓茎尖在 4°C 黑暗条件下，培养物可以保持生活力达 6 年之久，期间只需每 3 个月加入些新鲜培养液。再如胡萝卜和烟草等植物的细胞悬浮物，在 $-196 \sim -20^\circ\text{C}$ 的低温下储藏数月，尚能恢复生长，再生成植株。

（六）人工种子

人工种子（artificial seed）是由美国生物学家 Murashige 提出来的，是指植物离体培养中产生的胚状体或不定芽，被包裹在含有养分和保护功能的人工胚乳和人工种皮中。人工种子技术是在组织培养的基础上发展起来的新兴生物技术，具有工厂化大规模制备和储藏、迅速推广、种子萌发率高等优点。目前，兰花、胡萝卜、小麦、杂交水稻等人工种子已进入开发阶段，可以实现工厂化、自动化生产。

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的繁殖以及转基因植物、自交不亲和植物、远缘杂种的繁殖提供有效的手段。

（七）观赏组培

观赏组培是指在透明的塑料瓶中培养长势慢、可观叶或观根的植物，有些是可以开花的植物，如“手指玫瑰”，如图 1-4 所示，并将培养瓶做成各种个性十足的流行款式，使培养基着上各种鲜艳的颜色，更具有观赏价值，可作为室内装饰或手机、钥匙等的装饰物。



图 1-4 手指玫瑰

二、植物组织培养新技术

（一）植物开放式组培技术

植物开放式组织培养，简称开放组培，是在使用抗菌剂的条件下，使植物组织培养脱离严格无菌的操作环境，不需高压灭菌和超净工作台，利用塑料杯代替组培瓶，在自然开放的有菌环境中进行的植物组织培养。崔刚等采用中医理论，从多种植物中提取具有杀菌、抗菌作用的活性物质，成功研制出了具有广谱性杀菌能力的抗菌剂，并且通过开放组培方法成功建立了葡萄外植体的开放式培养。采用开放式组培技术，在培养基中添加抑菌剂，克服了非灭菌条件下魔芋组织培养污染的问题，有效地简化了实验步骤，降低了生产成本。开放组培技术突破了人工光源培养的限制，实现了大规模利用自然光进行植物培养的目标。

（二）无糖组培技术（光独立培养法）

植物组织培养过程中，小植株生长方式是以植物体靠培养基中的糖以人工光照进行异养和自养生长。由于传统的组培技术中使用的是含糖培养基，杂菌很容易侵入培养容器中繁殖，造成培养基的污染。为了防止杂菌侵入，通常将培养容器密闭，这样既造成植物生长缓慢，又容易出现形态和生理异常，同时增加了费用。20 世纪 80 年代末，日本千叶大学古在丰树教授（见图 1-5）发明了一种全新的植物组培技术——无糖组培技术，又叫光自养微繁殖技术。

该技术是植物组织培养的一种新概念，是环境控制技术和生物技术的有机结合。其特点在于：将大田温室环境控制的原理引入到常规组织培养中，通过改变碳源的供给途径，用 CO_2 气体代替培养基中的糖作为组培苗生长的碳源，采用人工环境控制的手段，提供适宜不同种类组培苗生长的光、温、水、气、营养等条件，促进植株的光合作用，从而促进植物的生长



图 1-5 古在丰树教授

发育，使之由异养型转变为自养型，从而达到快速繁殖优质种苗的目的。由于该培养基主要采用多孔无机物质，如蛭石、珍珠岩和砂等作为培养基，因此不易引起微生物的污染。无糖培养技术的优点在于可大量生产遗传一致、生理一致、发育正常、无病毒的组培苗，并且缩短驯化时间，降低生产成本。目前，无糖组培技术已经成功应用于半夏、草莓、花椰菜的培养中，并且取得了很好的实验效果。但是，无糖培养法对环境要求较高，若无糖组培环境不能被控制并达不到一定的精度，就会严重影响组培苗的质量和经济效益。随着理论研究的不断深入及

相关配套技术的不断完善，无糖组培技术必将成为今后组培生产的一种重要手段。

（三）新型光源在组培上的应用

目前，应用在植物组织培养上的新型光源主要有 LED、CCFL、SILHOS。

LED (light emitting diode) 即发光二极管，被誉为 21 世纪的新型光源，具有效率高、寿命长、不易破损等优点。LED 波长正好与植物光合成和光形态建成的光谱范围相吻合，光能有效利用率可达 80%~90%，并能对不同光质和发光强度实现单独控制。因此，在植物组织培养中采用 LED 提供照明，能够调控组培植物的生长发育和形态建成，缩短培养周期。LED 在植物组培中的应用研究主要集中在日本和美国。日本的研究处于国际领先地位，不但开发了专门应用于植物组织培养的 LED 发光系统，而且与其他环境调控因子相结合，取得了一些重要的基础数据。中国一些科研机构也开始了这方面的研究，并自主开发了一些 LED 光源系统，用于植物组织培养。

CCFL (cold cathode fluorescent lamp) 即冷阴极荧光灯管，是由日本的田中道男等自行设计和开发的新型光源，具有直径小、寿命长、热量低、红蓝光比例可控、耗电量低等优点。CCFL 可作为植物组培苗的光源，运用此光源为文心兰试管苗提供光照条件，结果表明其地上部干、鲜重和试管苗的高度都有显著提高。随着进一步改进，CCFL 照明系统将成为植物组织培养中的主要光源。

SILHOS 是田中道男等自行设计和开发的另一种新型光源，这是一种间接照明系统，其侧部发出均匀一致的光线，光线进入反射空间经反射薄膜反射后均匀分布。此新型光源具有如下特点：只需要 1 只荧光灯就能提供均匀的照明，它通过一个独特的曲面反射镜使光线均匀分布；避免在照明过程中产生热量，冷空气从一侧输送管进入后带走灯管所产生的热量，然后从另一侧管道将热量输送出去，可调整和控制由照明设备引起的环境温度变化；SILHOS 光源通过直立输送管道可以减少培养架不同培养层之间的温度差异。田中道男等利用 SILHOS 作为生菜组培光源，获得了高质量的组培苗。

新型光源克服了高压钠灯、金属卤化物灯和荧光灯寿命短、发热量大以及发光率不理想等缺点。它的应用将为组培苗的生长提供更加适宜的光照条件，有利于试管苗的生长，并且能延长光源的使用寿命，降低生产成本，还对试管苗栽培成活率有促进作用。随着相关技术的成熟和制造成本的降低，它将成为未来组织培养的应用光源。

【知识拓展】

三、植物组织培养的发展史

(一) 探索阶段 (20 世纪初至 30 年代中期)

根据德国植物学家 Schleiden 和德国动物学家 Schwann 的细胞学说 (cell theory) (细胞学说的两条最重要的基本原理: 地球上的生物都是由细胞构成的; 所有的生活细胞在结构上都是类似的), 1902 年, 德国植物生理学家 Haberlandt



图 1-6 德国植物生理学家 Haberlandt

(见图 1-6) 提出了细胞全能性理论, 认为在适当的条件下, 离体的植物细胞具有不断分裂和繁殖, 并发育成完整植株的潜在能力。为了证实这一观点, 他在 Knop 培养液中离体培养野芝麻、凤眼兰的栅栏组织和虎眼万年青属植物的表皮细胞。由于选择的实验材料高度分化和培养基过于简单, 他只观察到细胞的生长, 并没有观察到细胞分裂。但这一理论对植物组织培养的发展起到了先导作用, 激励后人继续探索 and 追求。

1904 年, Hanning 在无机盐和蔗糖溶液中对萝卜和辣根菜的胚进行培养, 结果发现离体胚可以充分发育成熟, 并提前萌发形成小苗。1922 年, Haberlandt 的学生 Kotte 和美国的 Robins 在含无机盐、葡萄糖、多种氨基酸和琼脂的培养基上, 培养豌豆、玉米和棉花的茎尖和根尖, 发现离体培养的组织可进行有限生长, 形成了缺绿的叶和根, 但未发现培养细胞有形态发生能力。

在 Haberlandt 实验之后的 30 多年中, 人们对植物组织培养的各个方面进行了大量的探索性研究, 但由于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了一些结果外, 其他方面的研究没有大的进展。

(二) 奠基阶段 (20 世纪 30 年代末期至 50 年代末期)

直到 1934 年, 美国植物生理学家 White (见图 1-7) 利用无机盐、蔗糖和酵母提取液组成的培养基进行番茄根离体培养, 建立了第一个活跃生长的无性繁殖系, 使根的离体培养实验获得了真正的成功, 并在以后 28 年间反复转移到新鲜培养基中继代培养了 1 600 代。

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综合培养基, 该培养基后来被定名为 White 培养基。

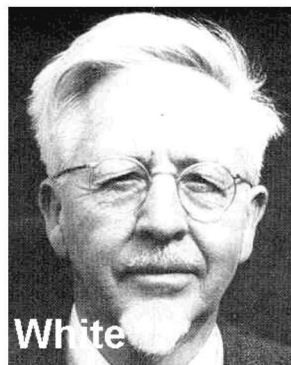


图 1-7 美国植物生理学家 White

与此同时, 法国的 Gautherer 在研究山毛柳和黑杨等形成层的组织培养实验中, 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 年连续培养胡萝卜根形成层获得首次成功。Nobecourt 也由胡萝卜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《植物组织培养手册》专著，使植物组织培养开始成为一门新兴的学科。White、Gautherer 和 Nobecourt 3 位科学家被誉为植物组织培养学科的奠基人。

1948 年，美国学者 Skoog 和我国学者崔澌在烟草茎切段和髓培养以及器官形成的研究中发现，腺嘌呤或腺苷可以解除培养基中 IAA 对芽形成的抑制作用，能诱导形成芽，从而认识到腺嘌呤和生长素的比例是控制芽形成的重要因素。

1952 年，Morel 和 Martin 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首次获得脱毒植株。1953 年至 1954 年，Muir 利用振荡培养和机械方法获得了万寿菊和烟草的单细胞，并实施了看护培养，使单细胞培养获得初步成功。1957 年，Skoog 和 Miller 提出植物生长调节剂控制器官形成的概念，指出通过控制培养基中生长素和细胞分裂素的比例来控制器官的分化。1958 年，英国学者 Steward 等以胡萝卜为材料，通过体细胞胚胎发生途径培养获得了完整的植株，首次得到了人工体细胞胚，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，并首次用实验证实了细胞全能性，为植物组织培养以后的迅速发展奠定了基础。

（三）迅速发展阶段（20 世纪 60 年代至今）

当影响植物细胞分裂和器官形成的机理被揭示后，植物组织培养进入了迅速发展阶段，研究工作更加深入，从大量的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工作。1960 年，Morel 利用茎尖培养兰花，该方法繁殖系数极高，并能脱去植物病毒，其后开创了兰花快速繁殖工作，并形成了“兰花产业”。

1962 年，Murashige 和 Skoog 发表了适用于烟草愈伤组织快速生长的改良培养基，也就是现在广泛使用的 MS 培养基。1964 年，印度 Guha 等人成功地在毛叶曼陀罗花药培养中，由花粉诱导得到单倍体植株，从而促进了花药和花粉培养的研究。

1971 年，Takebe 等在烟草上首次由原生质体获得了再生植株，这不仅证实了原生质体同样具有全能性，而且在实践上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 等人建立了原生质体的高钙高 pH 的聚乙二醇（PEG）诱导细胞融合法，把植物体细胞杂交技术推向新阶段。

随着分子遗传学和植物基因工程的迅速发展，以植物组织培养为基础的植物基因转化技术得到了广泛应用，并取得了丰硕成果。自 1983 年 Zambryski 等采用根癌农杆菌介导转化烟草，获得了首例转基因植物以来，利用该技术在水稻、玉米、小麦、大麦等主要农作物上取得了突破进展。迄今为止，通过农杆菌介导将外源基因导入植物已育成了一批抗病、抗虫、抗除草剂、抗逆境及优质的转基因植物，其中有的开始在生产上大面积推广使用。转基因技术的发展和應用表明组织培养技术的研究已开始深入到细胞和分子水平。