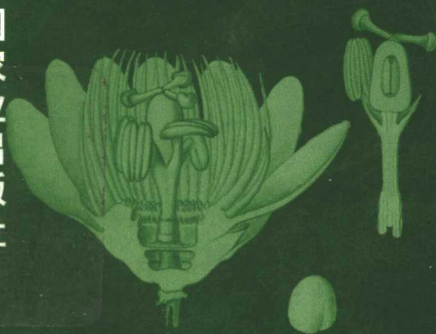
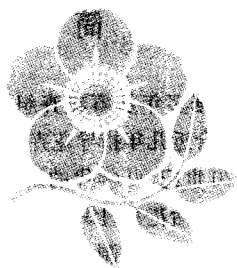


刘青林 马祎 郑玉梅 编著

花卉组织 培养

中国农业出版社





花卉组织培养

刘青林 马 祎 郑玉梅 编著

中国农业出版社

内 容 简 介

本书是作者根据多年从事花卉组织培养有关的科研、教学实践，结合近几年指导花卉组培企业生产的经验，并参照国内 20 世纪 90 年代的研究报道编著而成。分为三部分：总论包括花卉组织培养概述、植物组织培养实验室、培养基成分与配制、无菌操作与培养条件、组培苗发生途径、花卉快速繁殖、花卉无毒苗的培育、花卉组织培养的应用、花卉组织培养的研究方法、花卉组织培养的商业化；各论重点介绍了菊花、香石竹、兰花、非洲菊、补血草、百合、郁金香、马蹄莲、大叶花烛、凤梨、蕨类、月季、梅花、杜鹃花共 14 类重要花卉的组织培养技术；附录不仅收录了 32 种基本培养基的配方，还简要介绍了我国 20 世纪 90 年代研究报道的 200 多种花卉组织培养的简要技术。书后还收录有 200 多篇花卉组织培养的参考文献。不仅可以作为花卉组培快繁企业生产人员的技术指南，也是花卉组培科研工作者的重要参考书，对于花卉组培爱好者而言，也是一本较好的普及读本。

目 录



1 花卉组织培养概述	1
1.1 植物组织培养的概念	1
1.2 植物组织培养的发展历史	2
1.3 花卉组织培养的应用	5
1.4 植物组织培养的发展前景	6
2 植物组织培养实验室	9
2.1 实验室分区	10
2.2 植物组培室的设计	12
2.3 组培室仪器设备	15
3 培养基成分与配制	20
3.1 无机物质	20
3.2 有机物质	22
3.3 植物生长调节物质	25
3.4 不同类型培养基的配制	28
4 无菌操作与培养条件	30
4.1 培养基灭菌与环境消毒	30
4.2 外植体采集与消毒	34

4.3 植物离体生长的环境条件	36
5 组培苗发生途径	41
5.1 不定芽途径	41
5.2 器官型途径(直接再生)	43
5.3 器官发生型途径(愈伤组织再生)	43
5.4 胚状体途径	45
5.5 原球茎途径	47
6 花卉快速繁殖	48
6.1 快速繁殖的程序	48
6.2 快速繁殖的问题	54
7 花卉无病毒苗的培育	57
7.1 无毒苗的种类	57
7.2 脱毒方法	58
7.3 病毒检测与无毒苗生产	61
8 花卉组织培养的应用	64
8.1 种质资源的离体保存	64
8.2 试管受精与胚培养	65
8.3 原生质体培养与体细胞杂交	66
8.4 花粉培养与单倍体育种	67
8.5 基因工程	68
8.6 体细胞无性系变异	69
8.7 良种快速繁育	70
9 花卉组织培养的研究方法	71
9.1 影响组织培养的因素	71
9.2 技术路线	72
9.3 试验设计	74
9.4 数据采集与结果分析	76
10 花卉组织培养的商业化	77
10.1 成本概算与控制	77

10.2 存在问题	82
10.3 经营管理	85



11 菊花组织培养	89
11.1 外植体采集与消毒	90
11.2 组培苗发生途径	90
11.3 芽体诱导与增殖培养	91
11.4 愈伤组织诱导和分化培养	92
11.5 生根培养与移栽	93
11.6 研究进展	94
12 香石竹组织培养	96
12.1 外植体的采集与消毒	96
12.2 无毒茎尖的培养及其检测	97
12.3 培养阶段及其培养基	98
12.4 存在问题	102
13 兰花组织培养	104
13.1 外植体及其发生途径概述	105
13.2 建兰组织培养	108
13.3 墨兰组织培养	111
13.4 蝴蝶兰组织培养	115
13.5 大花蕙兰组织培养	118
13.6 卡特兰组织培养	121
13.7 石斛兰组织培养	123
13.8 兰花生物技术研究展望	128
14 非洲菊组织培养	131
14.1 外植体与发生途径	131

14.2	启动培养	132
14.3	芽体分化与增殖培养	133
14.4	生根培养与驯化移栽	133
14.5	存在问题	134
15	补血草组织培养	136
15.1	外植体的采集与消毒	136
15.2	启动与增殖培养	136
15.3	生根培养与驯化移栽	137
15.4	存在问题	138
16	百合组织培养	139
16.1	外植体及其发生途径	139
16.2	各种外植体的启动培养	140
16.3	继代、生根培养与驯化移栽	142
16.4	存在问题	143
17	郁金香组织培养	144
17.1	外植体的采集与消毒	144
17.2	愈伤组织的诱导	145
17.3	小鳞茎的分化	146
17.4	小鳞茎生根与移栽	146
17.5	存在问题	147
18	马蹄莲组织培养	148
18.1	外植体与发生途径	148
18.2	芽丛和块茎的诱导	149
18.3	愈伤组织的增殖和分化	150
18.4	生根与移栽	151
18.5	存在问题	152
19	大叶花烛组织培养	153
19.1	外植体与发生途径	153
19.2	愈伤组织诱导与分化	154

19.3	不定芽的诱导与增殖	155
19.4	生根培养与驯化移栽	156
19.5	存在问题	157
20	凤梨组织培养	158
20.1	外植体的采集与消毒	158
20.2	芽体诱导培养	159
20.3	芽体增殖培养	160
20.4	生根培养与移栽	160
20.5	存在问题	161
21	蕨类组织培养	163
21.1	外植体与发生途径	163
21.2	孢子萌发	164
21.3	GGB 的诱导与生长	165
21.4	生根培养与驯化移栽	166
21.5	存在问题	167
22	月季组织培养	168
22.1	外植体的采集与消毒	168
22.2	快速繁殖	169
22.3	月季再生途径	170
22.4	不同类型或品种月季组培快繁技术	171
22.5	存在问题	172
23	梅花组织培养	174
23.1	外植体的采集与消毒	174
23.2	腋芽培养与快速繁殖	175
23.3	胚培养与愈伤组织培养	177
23.4	存在问题	178
24	杜鹃花组织培养	179
24.1	外植体的采集与消毒	179
24.2	启动培养	180

24.3 增殖与壮苗培养	180
24.4 生根培养与移栽	181
24.5 存在问题	181
附录 A 培养基一览表	182
附录 B 花卉组织培养技术一览表	199
参考文献	247



1 花卉组织培养概述

1.1 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 (根、茎、叶、花、果实等)、组织 (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, 给予适当的培养条件, 使其长成完整植株的过程。由于培养的是脱离植物母体的培养物, 在试管内培养, 所以也叫离体培养 (in vitro culture)。Gamborg 曾根据所培养的植物材料不同, 把组织培养分为五种类型, 即器官培养 (胚、花药、子房、根和茎的培养等)、分生组织培养、愈伤组织培养、悬浮细胞培养和原生质体培养。其中愈伤组织培养是一种最常见的培养形式。所谓愈伤组织, 原是指植物在受伤之后于伤口表面形成的一团薄壁细胞; 在组织培养中, 则指在人工培养基上由外植体长出来的一团无序生长的薄壁细胞。愈伤组织培养之所以是一种最常见的培养形式, 是因为除茎尖分生组织培养的一部分器官培养以外, 其他几种培养形式最终也都要经历愈伤组织才能产生再生

植株。此外，愈伤组织还常常是悬浮培养的细胞和原生质体的来源。

在组织培养中，我们把由活体上切取下来进行培养的那部分组织或器官叫做外植体。外植体通常都是多细胞的，并且组成它们的细胞常常包括各种不同的类型。因此，一个外植体所形成的愈伤组织也是异质性的，其中不同的细胞形成完整植株的能力不同。一个成熟的植物细胞能够再分化而形成完整的植株，是因为这些细胞具有全能性。所谓全能性，是指任何具有完整的细胞核的植物细胞，都拥有形成一个完整植株所必需的全部遗传信息。

1.2 植物组织培养的发展历史

1.2.1 萌芽阶段

从 20 世纪初至 30 年代中，是植物组织培养的萌芽阶段。20 世纪初，在 Schleiden 和 Schwann 创立的细胞学基础上，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。限于当时的技术和水平，培养未能成功。现在看来主要有两点原因：第一，他所选用的实验材料是高度分化了的细胞；第二，所用的培养基过于简单，特别是培养基中没有包含诱导成熟细胞分裂所必需的激素，这是因为激素在当时还未发现。但它对植物组织培养发展起了先导作用，在技术上也是一个良好的开端。1922 年 Haberlandt 的学生 Kotte 和美国的 Robbin，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，能进行有限的生长。1925 年，Laibach 将亚麻种间杂交不能成活的胚取出培养，使杂交胚成熟，继而萌发。

1.2.2 奠基阶段

从 20 世纪 30 年代末到 50 年代中是植物组织培养技术的奠基阶段。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 1 600 代仍能生长。利用根系培养物，研究了光、温、pH、培养基组成对根生长的影响。1937 年他们首先配制成综合培养基，发现了 B 族维生素对离体根生长的重要性。同年，法国的 Gautheret、Nobecourt 培养块根和树木形成层，使其生长。White、Gautheret 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 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技术成熟。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技术。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，从而确定嘌呤与 IAA 的比例是根和芽形成的控制条件。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。

1.2.3 蓬勃发展阶段

从 20 世纪 50 年代末至今，是植物组织培养技术的蓬勃发展阶段。1958 年英国人 Steward 在美国将胡萝卜髓细胞培养成为一个完整植株，这是人类第一次获得了人工体细胞胚，也证明了植物细胞的全能性。这是植物组织培养的第一个突破，它对植物组织和细胞培养产生了深远的影响。1960 年英国人 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工作，这是植物组织培养的第二个突破。1972 年，Carlson 等通过两个烟草植物之间原生质体的融合，获得了第一个体细胞杂种。在这方面，高国楠等建立的通过 PEG

处理促进细胞融合的方法得到了广泛的应用。1960 年 Morel 培养兰花的茎尖,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。目前,用这种方法繁殖的兰花至少已有 35 个属 150 余种。1964 年 Guha 和 Maheshwari 报道,在南洋金花中通过离体花药培养,由小孢子直接发育成胚。1967 年 Bourgin 和 Nitsch 通过花药培养,获得了完整的烟草植株。由于单倍体在突变选择和加速杂合体纯合化过程中的重要作用,花药培养在 20 世纪 70 年代得到了迅速发展。

1.2.4 中国植物组织培养技术的发展

我国植物组织培养研究工作开展也较早,许多学者曾经做出过多方面的贡献。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,罗士伟进行了植物幼胚、根尖、茎尖和愈伤组织的培养,李正理等关于离体胚培养中形态发生及离体茎尖培养的工作,王伏雄等关于幼胚培养的工作等,这些都是组织培养各有关领域里的有价值的文献。20 世纪 70 年代以来我国开展植物花药培养单倍体育种,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;80 年代,我国的植物组织研究工作达到了一个高峰,尤其在花药培养和原生质体培养方面,我国学者的工作已经受到世界各地同行的普遍重视和赞赏;90 年代,植物组织培养技术在生产中得到了广泛的应用,有不少果树和花卉名优品种快繁进入了大规模的工厂化育苗阶段,形成了较为完善的工艺流程,组培苗以其特有的优点越来越受到人们的青睐,尤其是观赏植物的快繁发展迅速。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,相信今后在这方面一定会取得更大的成绩。

1.3 花卉组织培养的应用

1.3.1 离体快速繁殖

植物组织培养可以人为地控制培养条件,根据不同植物、不同离体部位的要求提供不同的培养条件,因此生长快、生长周期短,往往1~2个月就可以完成一个生长周期。采用组织培养每年的增殖率可达数百万倍,这样就可以一次性获得大量基因型相同、规格整齐一致的优质无性系苗木。虽然需要一定的设备及能源消耗,但由于植物材料能按几何级数大量繁殖,总的来说生产成本还是较低,有利于生产应用。

1.3.2 脱毒培养

采用扦插、分株等营养繁殖的各种作物,都有可能感染1种或数种病毒或类病毒。长期的无性繁殖使病毒积累,危害加重,品质下降。在茎尖培养中,利用茎尖培养可获得脱毒苗,以脱毒苗作为繁殖材料可获得大量无毒苗,以满足生产的需要。花卉脱毒苗,植株生长势强,花朵变大,色泽鲜艳,抗逆性提高,产花量上升。果树脱毒苗生长快,进入结果期早,可大幅度提高果品产量和品质。

在应用组织培养方法以获得无病原菌植物时,所用的外植体可以是茎尖,也可以是茎的顶端分生组织。在这里,顶端分生组织是指茎的最幼龄叶原基上方的一部分,最大直径约为100微米,最长长度约为250微米。茎尖则是由顶端分生组织及其下方的1~3个幼叶原基一起构成的。虽然通过顶端分生组织培养消除病毒的机会较高,但在大多数已发表的文献中,无病毒植物都是通过100~1000微米长的茎尖外植体得到的。在感染病毒的植株体内病毒分布并不均等。在生长点病毒含量最低;在分生区内无维管束,病毒扩散慢;加之植物细胞不断分裂增生,所以病毒含量少,在茎尖生长点几乎检测不出病

毒。只要获得少量去病毒苗，就可扩大繁殖。

1.3.3 珍稀花卉的繁殖和保存

目前，全世界面临着环境污染和热带森林资源的破坏，平均每天有种植物从地球上消失。传统的繁殖方法，如扦插、嫁接等，由于植物生存环境的改变而难以成活或成活率极低；而组织培养可以提供适宜的温度、湿度、光照和植物所需的激素及碳水化合物，利用植物的一个芽或是某个器官即可繁殖出新生植株，并进行大量繁殖。

植物组织培养也为引种提供了便利。常规的引种是将整个植株引入或是利用播种繁殖方法，这样在引种过程中会造成植株的损伤，而且对有些植物来说播种繁殖的萌芽率或出苗率很低，达不到引种的目的。利用组织培养可以将培养后的瓶苗直接引入，而且携带方便，不会造成损伤，也不需要特定的贮藏条件。

利用组织培养还可以进行种质资源的保存。传统上，种质是以种子的形式保存的，但随着时间的延长其生活力下降，并会受到病虫害的侵扰。加之种子又是杂合个体，在繁殖中会因为性状分离而导致遗传的不稳定。于是种质资源的离体保存便成了又一研究的焦点，其基本目的是将外植体在无菌环境中进行离体保存，以备将来之需。可将这些外植体在各种生长抑制条件下，使其缓慢生长或无生长，以达到长期保存的目的。常用的抑制方法有低温保存、低压保存、生长抑制剂处理、饥饿法、矿物油覆盖法。离体保存的种质资源便于国际、省际、人际的交流、交换、购买等。

1.4 植物组织培养的发展前景

目前我国共有较大型的植物组培快繁企业 50 多家，主要繁殖花卉、果树和经济树木的良种苗木。但年生产能力多在

100 万株以下,且 90% 以上的企业实际处于亏损状态。其中的主要问题有两个:一是生产规模太小,二是生产成本太高。这两个问题是相互联系的。只有通过扩大规模,降低成本,才能充分发挥这种高新技术在现代植物生产和农业产业化中的重要作用。植物组织培养技术的发展主要体现在以下三个方面:

1.4.1 组培容器的大型化

目前大量使用的是玻璃或耐高温塑料制成的三角瓶、罐头瓶,最大体积不超过 500 毫升。通过模拟植物在微生态条件下的气体交换、营养吸收、形态建成,计算植物微群落生长的最佳空间形状与大小,依此改进容器形态,扩大体积,增加单位培养面积中组培苗的数量。同时改良封口材料,以达到优质(通气隔菌)、方便、耐久的目的。

1.4.2 组培技术的简单化

这里主要是指免转接一步成苗。培养基的配制与组培材料的转接是植物组培快繁的两大主要日常工作,而实际上植物的正常生长只需水分、矿质营养、空气等,并不需要经常移植。经常移植还会对植物的生活力造成一定程度的影响。在培养基成分分析与植物营养分析的基础上,可通过培养容器中水分、矿质、激素和气体的交换与调整,实现免转接一步成苗。这其中包括组培苗根原基的诱导与瓶外生根。

1.4.3 组培环境的自然化

除培养基原料和人工费之外,目前组培快繁企业的最大支出是能源费。某些地方实行的自然光照培养,虽然减少了照明用电,但却极大地增加了夏季降温和冬季加温的能源费。二者相比,得不偿失。通过对光、温、气(含真菌、水汽)的综合调控,可达到恒温、恒光、恒湿、无菌的低成本运行。

就组织培养在植物生产中的应用研究来看,如果说 20 世纪 80 年代初、中期是我国植物组织培养的研究工作的高潮,那么到了 90 年代末期,我国植物组织培养已经迎来了第二个

高潮，即组织培养技术应用的高潮。随着我国农村产业结构的调整，植物组织培养技术作为最具应用价值的农业高新技术，受到了广泛的重视。各级政府、国有企业和私有企业都在应用组培技术从事花卉、果树或经济林木的脱毒、快繁。组织培养从研究到生产，必须经过中间试验阶段，而这往往成为限制组培产业化的瓶颈。因此，生产单位必须加强与科研单位的协作，科研单位也要与生产实践相结合，共同推动我国组培产业化的进展。