

全国高职高专教育规划教材

植物组织培养

陈世昌 主编

卞勇 张智策 副主编



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

全国高职高专教育规划教材

植物组织培养

Zhiwu Zuzhi Peiyang

陈世昌 主编

卞勇 张智策 副主编



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

内容提要

本书是全国高职高专教育规划教材。

本书按照职业岗位群对知识、技能和素质的要求,以培养技术应用能力为核心,以植物组织培养技术应用为主线,按照植物组织培养的工作过程编写教材内容。

全书分十一个单元,主要内容有植物组织培养概述、基本条件、基本技术、器官培养技术、快繁技术、脱毒技术、主要经济植物脱毒与快繁技术、组培苗工厂化生产与经营,以及植物组织培养在植物育种、次生代谢产物生产、种质资源离体保存和人工种子中的应用等。

本书可作为高职高专院校、本科院校举办的职业技术学院、成人教育、五年制高职生物技术类、农业技术类、林业技术类等专业的教材,也可供从事植物组织培养的技术人员、研究人员和经营管理者参考。

图书在版编目(CIP)数据

植物组织培养 / 陈世昌主编. —北京: 高等教育出版社, 2011. 4

ISBN 978 - 7 - 04 - 031607 - 0

I. ①植… II. ①陈… III. ①植物 - 组织培养 - 高等学校: 技术学校 - 教材 IV. ①Q943. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 008350 号

策划编辑 张庆波 责任编辑 张晓晶 特约编辑 孙晓洁 封面设计 赵 阳
责任绘图 尹 莉 版式设计 余 杨 责任校对 殷 然 责任印制 刘思涵

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街 4 号
邮政编码 100120

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 国防工业出版社印刷厂

购书热线 010 - 58581118
咨询电话 400 - 810 - 0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

开 本 787 × 1092 1/16
印 张 15.75
字 数 370 000

版 次 2011 年 4 月第 1 版
印 次 2011 年 4 月第 1 次印刷
定 价 23.40 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 31607-00

植物组织培养是植物生物技术的重要组成部分和基本研究手段,已渗透到生物学科各个领域,广泛应用于农业、林业、工业和医药业,在植物脱毒快繁、植物育种、种质资源保存和药用植物工厂化生产等方面发挥了巨大的作用,产生了可观的经济效益和社会效益,在当代生物技术中非常有生命力。为适应社会对组织培养人才的需求,许多高校在生物技术类、农业技术类、林业技术类专业开设了该课程。

根据教育部《关于加强高职高专教育人才培养工作的意见》和《关于全面提高高等职业教育教学质量的若干意见》(教高[2006]16号)等文件精神,在教育部高等学校高职高专植物生产类专业教学指导委员会的指导下,高职高专院校部分从事植物组织培养教学的教师通过分析职业岗位群对知识、技能和素质的要求,以培养高素质技能型专门人才为目标,以强化组培快繁技术应用能力为主线,本着理论与实践相结合、科学性与实用性相结合的原则编写了这本教材。本教材的特点有:

1. 在内容选择上,注重实用性和针对性。根据目前高职高专院校学生的认知水平、学校教学条件和人才培养要求,重点突出植物脱毒快繁技术和组培育种技术。教材共分十一个单元,单元一至单元六为基本知识和基本操作技术,分别介绍了植物组织培养概述、基本条件、基本技术、器官培养技术、快繁技术和脱毒技术,单元七为脱毒与快繁技术综合技能训练,单元八介绍植物组培苗工厂化生产与经营,单元九是将胚培养、花药与花粉培养、原生质体培养、遗传转化等内容整合,通过实例介绍组织培养在植物育种中的应用。单元十、单元十一简要介绍了细胞培养在次生代谢产物生产和种质资源离体保存中的应用。

2. 在内容编排上,突出实践性。为使教学内容有利于进行项目化教学,实现理论实践一体化,除单元一、单元七、单元十一外,其余各单元按照理论知识和技能训练两大模块编排。理论知识部分通过具体的生产实例,将掌握基础知识、理解基本理论融为一体。每项技能训练都明确了训练目标,以图表形式直观地展示操作规程及操作技术要点,单元后设有技能考核建议和考核方案。单元七收编了多种有代表性经济植物的脱毒快繁技术,各院校可根据当地需求、季节和产学研等具体情况灵活选择和安排。

3. 在教材体例上,增强趣味性。为便于学生学习、理解和掌握,设置了“知识目标”、“想一想”、“测一测”等栏目,单元后的“学习回顾”、“思考与探究”帮助学生总结、巩固所学知识。“延伸阅读”可拓宽学生的视野,使学生了解组培生产中的新知识、新技术和新工艺。在提高学生学习兴趣的同时,使学习内容鲜活具体,不枯燥。

本教材编写分工如下:单元一、三、四和单元七第一、四节由河南农业职业学院陈世昌编写,单元二由河南农业职业学院李庆伟编写,单元五由信阳农业高等专科学校张燕编写,单元六和单元七第三节由江苏农林职业技术学院宋刚编写,单元八和单元七第二、五节由黑龙江生物科技职业学院张智策编写,单元九由黑龙江农业职业技术学院卞勇编写,单元十、十一由广西农业职业技术学院朱国兵编写。全书由陈世昌统稿、定稿。河南农业大学博士生导师

范国强教授审阅全稿。

在编写过程中,自始至终得到各参编院校的领导、学术同行及朋友们的大力支持和帮助,并广泛参阅和引用了众多专家、学者的著作和论文,在此一并致谢。

由于编者水平有限,书中难免存在不足之处,敬请同行和广大读者批评指正,以便今后修改完善。

编 者

2011年1月

目 录

单元一 植物组织培养概述	1	技能训练 3-5 无菌操作技术	55
第一节 植物组织培养的概念、类型及特点	1	【单元技能考核建议】	57
第二节 植物组织培养的基本原理	3	【学习回顾】	58
第三节 植物组织培养的发展	7	【思考与探究】	59
第四节 植物组织培养的应用	9	单元四 植物器官培养技术	60
【学习回顾】	12	第一节 根的培养	60
【思考与探究】	13	第二节 茎尖和茎段培养	63
单元二 植物组织培养的基本条件	14	第三节 叶的培养	65
第一节 植物组织培养实验室	14	第四节 花器和种子培养	67
第二节 植物组织培养的基本设备	17	技能训练 4-1 离体根培养技术	68
第三节 家庭组培室和组培工厂的设计	24	技能训练 4-2 茎段培养技术	70
技能训练 2-1 参观植物组织培养实验室	26	技能训练 4-3 叶片培养技术	71
技能训练 2-2 常用组培仪器设备的使	27	技能训练 4-4 花器培养技术	72
用	27	技能训练 4-5 种子培养技术	73
技能训练 2-3 器皿、用具的洗涤	28	【单元技能考核建议】	74
【单元技能考核建议】	29	【学习回顾】	75
【学习回顾】	30	【思考与探究】	75
【思考与探究】	30	单元五 植物组织培养快繁技术	76
单元三 植物组织培养的基本技术	31	第一节 植物组培快繁流程	76
第一节 培养基及其配制	31	第二节 植物组培快繁实验方案的设计与实施	83
第二节 外植体的选择与消毒	40	第三节 植物组培快繁过程中的异常现象及解决措施	87
第三节 灭菌消毒技术	41	第四节 植物无糖组培技术	94
第四节 接种与培养技术	45	技能训练 5-1 草莓的组培快繁技术	97
技能训练 3-1 配制 MS 培养基和植物生长调节剂母液	47	技能训练 5-2 组培苗的炼苗与移栽技术	97
技能训练 3-2 配制 MS 固体培养基	50	技能训练 5-3 设计一种植物的组培快繁方案	98
技能训练 3-3 灭菌技术	51	【单元技能考核建议】	99
技能训练 3-4 外植体的预处理与消毒技术	53	【学习回顾】	100
		【思考与探究】	100

单元六 植物脱毒技术	102	技能训练 8-4 蝴蝶兰原球茎培养	169
第一节 植物脱毒的意义	102	技能训练 8-5 植物组培苗生产计划的 制订及效益分析	170
第二节 植物脱毒方法	103	【单元技能考核建议】	171
第三节 脱毒苗的鉴定	109	【学习回顾】	172
第四节 脱毒苗的保存与繁殖	112	【思考与探究】	172
技能训练 6-1 植物茎尖剥离与 培养	114	单元九 植物组织培养与植物育种	173
技能训练 6-2 指示植物法鉴定 脱毒苗	115	第一节 胚培养与离体受精	173
技能训练 6-3 酶联免疫吸附法 鉴定病毒	116	第二节 花药、花粉培养与单倍 体育种	177
【单元技能考核建议】	118	第三节 体细胞无性系变异与 突变体筛选	186
【学习回顾】	119	第四节 原生质体培养与体细胞 杂交	188
【思考与探究】	119	第五节 植物遗传转化	197
单元七 综合技能训练——主要经济植物 脱毒与快繁技术	120	技能训练 9-1 胚培养技术	201
第一节 果树脱毒与快繁技术	120	技能训练 9-2 花粉分离与发育时期的 检测	202
第二节 蔬菜脱毒与快繁技术	128	技能训练 9-3 花药培养	203
第三节 花卉组培快繁技术	133	技能训练 9-4 原生质体的分离与 培养	204
第四节 树木组培快繁技术	145	【单元技能考核建议】	205
第五节 药用植物组培快繁技术	149	【学习回顾】	206
【单元技能考核建议】	153	【思考与探究】	207
【学习回顾】	154	单元十 植物细胞培养与次生代谢产物 生产	208
【思考与探究】	154	第一节 单细胞培养	208
单元八 植物组培苗工厂化生产与 经营	155	第二节 细胞悬浮培养	212
第一节 植物组培苗工厂化生产技术	155	第三节 次生代谢产物生产	219
第二节 生产计划的制订与实施	161	技能训练 10-1 单细胞分离与 培养	222
第三节 组培苗成本核算与提高效益的 措施	162	技能训练 10-2 细胞的悬浮培养	223
第四节 组培苗工厂化生产的管理 与经营	165	【单元技能考核建议】	224
技能训练 8-1 植物组培苗生产工厂 的设计	167	【学习回顾】	225
技能训练 8-2 甘薯组培苗的浅层 液体培养	168	【思考与探究】	225
技能训练 8-3 马铃薯微型薯生产	168	单元十一 植物种质资源离体保存与 人工种子	226
		第一节 植物种质资源离体保存	226

第二节 人工种子	231	附录 2 植物组织培养常用化学物质的 相对分子质量及浓度 换算表	236
【学习回顾】	234	主要参考文献	237
【思考与探究】	234		
附录	235		
附录 1 常见英文缩写与词义	235		

单元一 植物组织培养概述

知识目标

- 掌握植物组织培养的概念、类型、特点及应用
- 理解植物组织培养的基本原理和特点
- 了解植物组织培养的发展



第一节 植物组织培养的概念、类型及特点

一、植物组织培养的概念

植物组织培养(简称组培)是指在无菌和人工控制的环境条件下,将植物的胚胎、器官、组织、细胞或原生质体培养在人工培养基上,使其再生发育成完整植株的技术。由于培养的植物材料脱离了植物母体,所以又称植物离体培养。

无菌是指物体或局部环境中无活的微生物存在,这是进行组织培养的基本要求。在组织培养中,只有在植物材料、培养基、培养器皿均处于无菌条件下,并通过人工控制适宜的温度、光照、湿度、气体等条件,才能使植物材料在离体条件下正常生长和发育。组织培养中,用于培养的植物胚胎、器官、组织、细胞以及原生质体统称为外植体。

二、植物组织培养的类型

按照不同标准,可将植物组织培养分为不同类型。

1. 根据培养材料分

(1) 植株培养 植株培养是对完整植株材料的离体培养。常用的植株培养材料是采用无菌播种技术,诱导种子萌发产生的幼苗。

(2) 胚胎培养 胚胎培养是对植物胚胎的离体培养。常用的胚胎培养材料是从胚珠中分离出成熟胚或未成熟胚。

(3) 器官培养 器官培养是对植物体的各种器官及器官原基的离体培养。常用的器官培养材料有根尖、根段、茎尖、茎段、叶原基、叶片、子叶、叶柄、叶鞘、花瓣、子房和果实等。

(4) 组织培养 组织培养是对植物体的各部位组织或愈伤组织的离体培养。常用的组织培养材料有分生组织、形成层、表皮组织、薄壁组织和木质部等,这是狭义的组织培养。

(5) 细胞培养 细胞培养是对植物的单个细胞或较小的细胞团的离体培养。常用的细胞培养材料有性细胞、叶肉细胞、根尖细胞和韧皮部细胞等。

(6) 原生质体培养 原生质体培养是对除去细胞壁的原生质体的离体培养。

2. 根据培养基的物理状态分

(1) 固体培养 固体培养是将培养物放在固体培养基进行培养。固体培养基是在液体培养中添加一定量凝固剂(如琼脂),使培养基在常温下固化,这是组织培养最常用的培养方法。

(2) 液体培养 液体培养是将培养物放在液体培养基进行培养。液体培养包括悬浮静止培养、振荡培养和纸桥培养等方法。

3. 按培养过程分

(1) 初代培养 对外植体进行的第一次培养称为初代培养。其目的是建立无菌培养物,通常是诱导外植体产生愈伤组织、不定芽、原球茎,或直接诱导侧芽和顶芽萌发,这是植物组织培养中比较困难的阶段,也称为诱导培养。

(2) 继代培养 将培养一段时间后的外植体或产生的培养物转移到新鲜培养基中继续培养的过程称为继代培养。其目的是防止培养材料老化,或培养基养分耗尽而造成营养不良,以及代谢物过多积累而产生毒害的影响;使培养物能够得到大量繁殖,并顺利地生长、分化长成完整的植株。

另外,根据培养过程中是否需要光照,可分为光培养和暗培养。

三、植物组织培养的特点

植物组织培养是在人工控制的环境条件下,采用纯培养的方法离体培养植物的器官、组织、细胞和原生质体,既不受外界环境条件和其他生物的影响,也不受植物体其他部分的干扰,该技术具有以下特点:

1. 培养材料来源广泛,遗传性一致

在植物组织培养中,植物的单个细胞,小块组织,根、茎、叶、花、果实和种子各种器官,胚胎以及完整植株均可作为外植体,材料来源十分广泛,而且材料大小只需几毫米,有些甚至不到1 mm。这些材料均来自遗传性一致的植株个体,培养获得的细胞、组织、器官或小植株等各种水平的无性系具有相同遗传背景,纯度高,将它们用于生物学研究,可极大地提高实验的精度。

2. 培养条件可人为控制,材料可周年生长

植物组织培养中的培养材料完全是在人为提供的培养基和小气候环境下生长,摆脱了大自然中四季、昼夜气温变化及灾害性气候的不利影响,且生长条件均一。因此,培养材料可不受气候和季节的限制,实现周年生长。

3. 生长快,繁殖率高

植物组织培养可根据不同植物、不同外植体的不同要求提供不同的培养基和培养条件,营养和条件优越且一致。因而植物材料生长、分化快,往往1~2个月可完成一个生长周期,大大缩短了实验和生长周期,材料能以几何级数迅速繁殖。

4. 管理方便,利于自动化控制

组织培养是在无菌条件下进行的,不受自然界中病、虫、杂草等有害生物危害。生产微型化、精细化、高度集约化,重复性强,便于标准化管理和自动化控制,实现优质种苗的工厂化生产。与田间、栽培盆栽等相比,省去了中耕除草、施肥、灌溉、防治病虫害等一系列繁杂劳动,可大大节省人力、物力及土地,也有利于自动化控制和工厂化生产。

延伸阅读:无性繁殖与克隆

无性繁殖是指不经过雌、雄两性生殖细胞的结合,只由一个生物体产生后代的生殖方式。许多微生物、植物可进行无性繁殖,如细菌的裂殖、酵母菌的出芽生殖、真菌的无性孢子生殖、植物的压条或扦插等都属于无性繁殖。克隆是“clone”或“cloning”的音译,是指生物体通过体细胞进行繁殖,其本质是一种人工诱导的无性繁殖方式,植物组织培养技术也称为“植物克隆”。在自然条件下,高等动物是不能进行无性繁殖的,但通过人工操作即动物克隆技术可实现动物的无性繁殖,如克隆羊、克隆牛等。



第二节 植物组织培养的基本原理

一、植物细胞的全能性

细胞是生物体结构和功能的基本单位,高等植物体由无数形态、结构与功能不同的细胞构成。植物体分生组织中的细胞具有持续性或周期性分裂能力,成熟组织中的细胞失去分裂能力,而执行其他功能。植物组织培养不仅能使处于分生状态的细胞继续保持分裂能力,同时也可使成熟组织中的细胞恢复分裂能力。这是因为植物每一个具有完整细胞核的细胞都具有全能性,这是植物组织培养的理论基础。植物细胞全能性是指植物体的每个具有完整细胞核的细胞,都拥有该物种的全部遗传信息,具有形成完整植株的能力。

植物细胞全能性是一种潜在的能力。在自然状态下,由于细胞在植物体内所处位置及生理条件的不同,其细胞的分化受各方面的调控与限制,致使其所具有的遗传信息不能全部表达出来,只能形成某种特化细胞,构成植物体的一种组织或一种器官的一部分,表现出一定的形态及生理功能,但其全能性的潜力并没有丧失。

从理论上讲,任何一个生活的植物细胞,只要有完整的膜系统和生活的核,即使是已经高度成熟和分化的细胞,在适当的条件下,都具有向分生状态逆转的能力,从而表现出其全能性。但不同细胞全能性的表达难易程度有所不同,这主要取决于细胞所处的发育状态和生理状态。

细胞全能性的表达能力与细胞分化的程度呈负相关,从强到弱依次为:生长点细胞 > 形成层细胞 > 薄壁细胞 > 厚壁细胞(木质化细胞) > 特化细胞(筛管、导管细胞)。这是因为越老的细胞其基因表达受到越严格的制约,其丧失功能或不表现功能的基因也会越多。

二、植物细胞全能性的实现

关于细胞全能性的实现可以用图 1-1 来表示。图中有 3 个循环,其中 A 循环表示生命周期,包括孢子体和配子体的世代交替;B 循环表示细胞周期,包括核质的互作、DNA 复制、转录

想一想
动物细胞具有全能性吗?



RNA 并翻译为蛋白质,使全能性形成和保持;C 循环表示组织培养周期,组织或细胞脱离植株体,在无菌条件下,靠人工的营养及植物生长调节剂进行代谢。

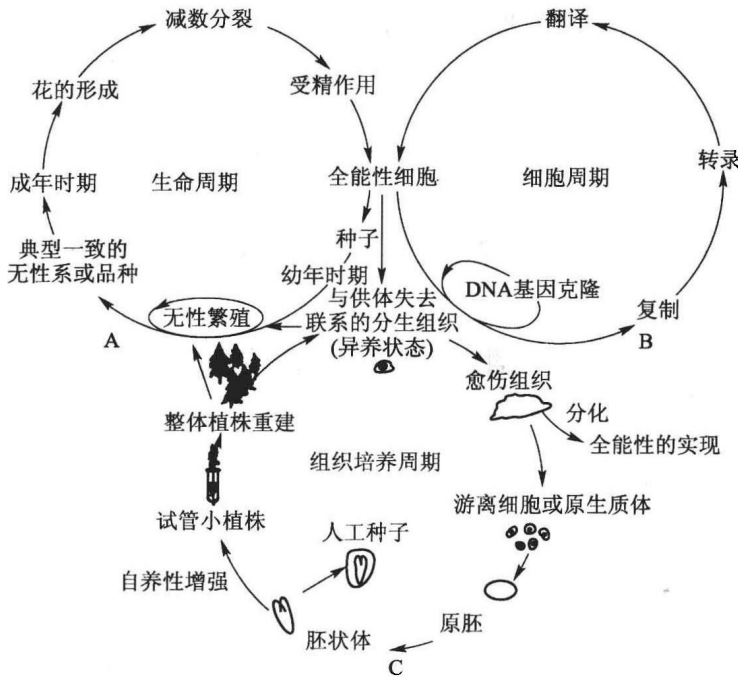


图 1-1 细胞全能性的实现与利用(利容千,等,2004)

要把植物细胞的全能性变为现实,必须要满足两个条件:一是细胞要与完整植株分离,二是给予适宜的培养条件。细胞脱离原来所在的器官或组织成为离体状态,不再受原植株的控制,在一定的营养、激素和外界条件的作用下,细胞的全能性才能得到充分表现。

成熟植物细胞在离体条件下,经过脱分化、细胞分裂、再分化 3 个阶段才能形成完整植株(图 1-2)。但在某些情况下,再分化可以直接发生在脱分化的分生细胞中,其间不需插入一个愈伤组织阶段,直接分化出芽或根,形成完整植株。

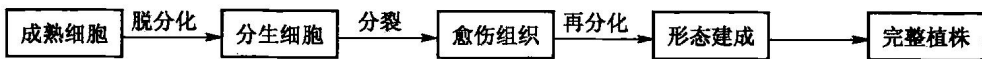


图 1-2 植物细胞脱分化和再分化示意

1. 细胞的分化、脱分化和再分化

(1) 细胞的分化 细胞的分化是指细胞的形态结构和功能发生永久性的适度变化的过程。植物成熟种子胚胎中的所有细胞几乎都保持着未分化的状态,具有旺盛的分裂能力,称为胚性细胞。这些胚性细胞之间无明显差异,其细胞质浓稠,细胞核较大。在适宜的条件下,种子开始萌发,胚性细胞不断分裂,数目迅速增加。随着时间的推移,细胞的发育方式发生不同变化,形态和功能也发生变化,有的形成根、茎、叶的细胞;有的仍保持分裂能力,形成分生组织;有的则失去分裂能力,形成成熟组织。细胞分化是组织分化和器官分化的基础,是离体培养再分化和植株再生得以实现的基础。

(2) 脱分化 脱分化是指已失去分裂能力的成熟细胞回复到分生状态,并进行分裂形成未

分化的细胞团即愈伤组织的过程。脱分化是在特定条件下(如体外培养基),处于分化成熟和分裂静止状态的细胞体内的溶酶体将失去功能的细胞组分降解,并产生新细胞组分,完成细胞器的重建。同时细胞内酶的种类与活性发生改变,细胞的代谢过程也发生改变,引起基因表达的改变,细胞的性质和状态发生扭转,恢复原有分裂能力,即细胞“返老还童”。如果条件合适,经过脱分化的细胞可以长期保持旺盛的分裂状态而不发生分化。

细胞脱分化的难易程度与植物种类和器官及其生理状况有很大关系。一般单子叶植物、裸子植物比双子叶植物难,成年细胞和组织比幼龄细胞和组织难,单倍体细胞比二倍体细胞难,茎、叶比花难。

(3) 再分化 再分化是指由已经过脱分化的细胞产生各种不同类型的分化细胞的过程。表现为由无结构和特定功能的细胞转变为具有一定结构、执行一定功能的组织和器官,从而构成一个完整的植物体或植物器官。

在脱分化和再分化过程中,细胞的全能性得以表达。组织培养的主要工作是设计和筛选培养基,探讨和建立合适的培养条件,促使植物组织和细胞完成脱分化和再分化。

2. 愈伤组织的形成

脱分化在植物组织形态上的表现是细胞增殖形成无分化的愈伤组织。愈伤组织是植物细胞经脱分化不断增殖,形成的一团不规则的、具有分生能力而无特定功能的薄壁组织。它可以在人工培养基上培养形成,也可在自然生长条件下,从机械损伤或微生物损伤、昆虫咬伤的伤口处产生。在人工培养基上,愈伤组织的形成是一个内、外环境因素相互作用的结果,可分为诱导期、分裂期和分化期。

(1) 诱导期 诱导期是细胞准备进行分裂的时期,又称启动期。在外源激素和其他刺激因素的作用下,外植体上已分化的活细胞内部发生一系列复杂的生理变化,如合成代谢加强,迅速合成蛋白质和核酸。但是细胞的大小仍然与外植体时的一样,没有多大改变。诱导期的长短因植物种类、外植体的生理状况及外部因素而异,如菊芋的诱导只需1d,胡萝卜则需数天。

(2) 分裂期 分裂期是细胞经过诱导后脱分化,不断分裂而形成愈伤组织的时期。在分裂期,细胞数目迅速增加,细胞的核和核仁增至最大,培养组织中蛋白质和核酸的含量大大增加。处于分裂期的愈伤组织的共同特征是:细胞分裂快,结构疏松,缺少有组织的结构,颜色浅而透明。如果在原培养基上长期培养,细胞可发生再分化,产生新的结构;如果将其及时转移到新鲜培养基上,愈伤组织则可继续进行细胞分裂,保持其不分化的状态。生长旺盛的愈伤组织有光泽,一般呈乳黄色、白色或绿色;而老化的愈伤组织多转为黄色甚至褐色。

(3) 分化期 分化期是停止分裂的细胞发生生理代谢变化而形成形态和功能各异的细胞的时期。此期细胞的体积不再减小,分裂部位和方向发生改变,形成分生组织瘤状结构和维管组织,出现薄壁细胞、分生细胞、导管、管胞、纤维细胞等各种类型的细胞。

尽管根据形态变化可将愈伤组织的诱导分为3个时期,但实际上各阶段的区分并不是十分严格,特别是分裂期和分化期,往往可以在同一组织块出现。

3. 植物的形态建成

愈伤组织中的细胞常以无规则方式发生分裂,在后期虽然也发生了细胞分化,形成了不同类

想一想

人和其他动物的细胞能脱分化和再分化吗?



型的细胞,但并无器官发生。植物组织培养就是创造一个适宜的培养条件,促使愈伤组织发生再分化形成完整植株。愈伤组织再分化形成完整植株有器官发生和体细胞胚发生两种不同的发育途径。

(1) 器官发生 器官发生即在诱导条件下,离体培养的组织、细胞经分裂和增殖再分化形成根和芽的过程。器官原基一般起始于一个细胞或一小团分化的细胞,经分裂后形成拟分生组织,然后进一步分化形成芽和根等器官原基。通过器官发生形成再生植株的方式有3种:①先形成芽,后在芽基部长根,大多数植物为这种情况。②先形成根,再从根的基部分化出芽,但芽的分化难度较大。③在愈伤组织不同部位分化形成芽和根,然后芽、根的维管组织连接起来形成完整植株。也有一些愈伤组织分化时仅形成根或芽,即无芽的根或无根的芽。

(2) 体细胞胚发生 通常我们将在自然条件下,由高等植物的雌雄配子结合而成的合子发育成的胚称为合子胚;而将在植物组织培养中,由高等植物的体细胞经诱导形成的胚称为体细胞胚或胚状体。

体细胞胚具有双极性,即苗端和根端,其发育过程与合子胚的过程极其相似。在适宜的条件下,体细胞胚可先后经过原胚、球形胚、心形胚、鱼雷形胚和子叶胚5个时期,然后发育成再生植株。图1-3为胡萝卜体细胞胚的形成和分化过程。

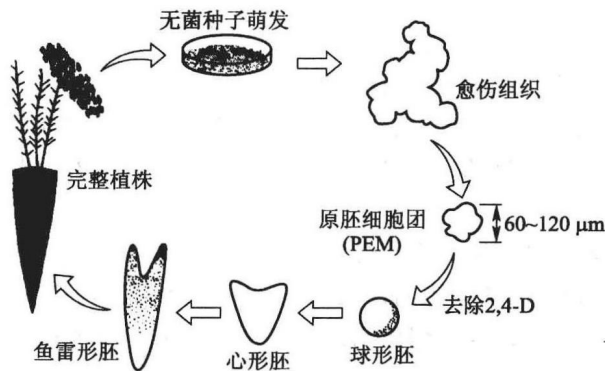


图1-3 胡萝卜体细胞胚的形成和分化过程示意图

由愈伤组织经器官发生和由胚状体发生再分化形成的再生植株常常容易混淆,表1-1列出了这两种再生植株的区别。

表1-1 器官发生再生植株与胚状体再生植株的区别

器官发生再生植株	胚状体再生植株
分化初期只有单极性,芽分化或根分化	分化初期具有两极性,有胚根和胚芽两极
不定芽和不定根与愈伤组织的维管组织相连	胚状体维管组织与外植体维管组织不相连
无胚胎形态,分生中心直接分化出器官	具有典型的胚胎形态发生过程
不定芽的苗无子叶	形成的幼苗具有子叶
先长芽后生根、先长根后形成芽或不同部位分化形成芽和根	根芽齐全,不经历诱导生根阶段

第三节 植物组织培养的发展

植物组织培养技术的研究始于1902年,从其诞生到现在,大体经历了探索、奠基和迅速发展3个阶段。

一、探索阶段

20世纪初至30年代初为植物组织培养理论探索和开创阶段,在这一阶段,细胞全能性的提出为植物组织培养技术的产生奠定了理论基础,人们开始对植物组织培养的各个方面进行大量的探索性研究。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,没有其他大的进展。该阶段的重大事件见表1-2。

表1-2 植物组织培养探索阶段的重大事件

年 份	事 件 内 容
1902年	Haberlandt 提出植物细胞全能性学说
1904年	Hanning 在无机盐和蔗糖溶液中培养离体萝卜和辣根的胚获得成功
1922年	Kotte 和 Robbins 离体培养根尖获得成功
1925年	Laibach 培养亚麻种间杂交幼胚获得成功
1933年	李继侗和沈同用加有银杏胚乳提取液的培养基成功培养银杏胚

延伸阅读:植物组织培养的开创者——Haberlandt

1902年德国植物生理学家 Haberlandt 提出高等植物的器官和组织可以不断分割,直至成单个细胞的观点。预言植物体细胞在适宜条件下,具有发育成完整植株的潜力,即植物细胞全能性的设想。为了证实这一观点,他在加入了蔗糖的 Knop 培养液中培养小野芝麻、凤眼兰的栅栏组织以及虎眼万年青属植物的表皮细胞。遗憾的是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、细胞壁的加厚,并没有观察到细胞分裂。然而他首次进行了离体细胞培养实验,对植物组织培养的发展起了先导作用,激励后人继续探索和追求。



二、奠基阶段

20世纪30年代中期至50年代末期为植物组织培养的奠基阶段,在这一阶段,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,实现了对离体细胞生长和分化的控制,从而确立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,为以后的快速发展奠定了基础。该阶段的重大事件见表 1-3。

表 1-3 植物组织培养奠基阶段的重大事件

年 份	事 件 内 容
1934 年	White 由番茄根建立了第一个活跃生长的无性繁殖系
1937 年	White 配制了第一个由已知化合物组成的综合培养基
1939 年	Gautherer 连续培养胡萝卜根形成层获得成功
1941 年	Overbeek 等用含椰子汁的培养基将曼陀罗的心形期幼胚培养成熟
1943 年	White 出版了《植物组织培养手册》
1948 年	Skoog 和崔澈发现腺嘌呤或腺苷可以解除 IAA 对芽形成的抑制
1952 年	Morel 和 Martin 首次通过茎尖培养获得大丽花的无病毒植株
1953 年	Tulecke 利用银杏花粉粒进行培养获得了单倍体愈伤组织
1954 年	Muir 进行单细胞培养获得初步成功
1956 年	Miller 等人发现激动素
1957 年	Skoog 和 Miller 提出植物激素控制器官形成的理论
1958 年	Steward 等以胡萝卜为材料,首次通过实验证实了植物细胞全能性

三、迅速发展阶段

当影响植物细胞分裂和器官形成的机制被揭示后,20 世纪 60 年代以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植物再生植株,形成了一套成熟的理论体系和技术方法,并开始大规模应用。该阶段的重大事件见表 1-4。

表 1-4 植物组织培养迅速发展阶段的重大事件

年 份	事 件 内 容
1960 年	Cocking 等人用真菌纤维素酶分离植物原生质体获得成功
1960 年	Kanta 在植物试管受精研究中获得成功
1960 年	Morel 利用茎尖培养获得脱毒兰花,形成了“兰花产业”
1962 年	Murashige 和 Skoog 发表了 MS 培养基的成分
1964 年	Guha 等在曼陀罗上由花粉诱导得到单倍体植株
1967 年	Bourgin 等通过花药培养获得了烟草的单倍体植物
1970 年	Power 等首次成功实现原生质体融合
1970 年	Carlson 通过离体培养筛选得到了烟草生化突变体
1971 年	Takebe 等首次由烟草原生质体获得了再生植株
1972 年	Carlson 等通过原生质体融合首次获得了烟草种间体细胞杂种
1974 年	Kao 等建立原生质体的高 Ca^{2+} 、高 pH 的 PEG 融合法
1978 年	Melchers 等将番茄与马铃薯进行体细胞杂交获得了第一个属间杂种
1978 年	Murashige 提出“人工种子”的概念

续表

年 份	事 件 内 容
1982 年	Zimmermann 开发了原生质体的电融合法
1983 年	Zambryski 等采用农杆菌介导法转化烟草,首次获得转基因植物
1984 年	Paskowski 等利用质粒转化烟草原生质体获得成功
1985 年	Horsch 等建立了农杆菌介导的叶盘法
1987 年	Sanford 发明了基因枪法用于单子叶植物的遗传转化
1983 至今	相继获得水稻、棉花、玉米、小麦、大麦和番茄等转基因植株

第四节 植物组织培养的应用

植物组织培养已发展为生物科学的一个广阔领域,是生物技术的重要组成部分,植物组织培养既是植物细胞工程和基因工程的技术基础,又是植物快速繁殖和脱毒重要技术,在农业、林业、工业、医药等行业中得到广泛的应用,创造了巨大的经济效益和社会效益。

一、快速繁殖植物种苗

快速繁殖技术是植物组织培养在生产上应用广泛、产生较大经济效益的一项技术,其商业性应用始于 20 世纪 70 年代美国兰花工业。通过离体快繁可在较短时期内迅速扩大植株的数量,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 10^8 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。快繁技术加快了植物新品种的推广,以前靠常规方法推广一个新品种要几年甚至十多年,而现在快的只要 1~2 年就可普及全世界。快速繁殖技术对繁殖系数低、不能用种子繁殖的“名、优、新、奇、特”植物品种的繁殖和推广更为重要。

全世界组培苗的年产量从 1985 年的 1.3 亿株猛增到 1991 年的 5.13 亿株,现在已超过 10 亿株。如美国的 Wyford 国际公司设有 4 个组培室,研究和培育出的新品种达 1 000 余个,年产观赏花卉、蔬菜、果树及林木等组培苗 3 000 万株;以色列的 Benzur 年产观赏组织组培苗 800 万株;印度 Harrisons Malayalam 有限公司年产观赏组织组培苗 400 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。其中兰花、安祖花、非洲菊、马蹄莲、马铃薯、草莓、甘薯、甘蔗、桉树和香蕉等经济植物已开始工厂化生产。

二、培养植物脱毒苗木

植物在生长过程中几乎都要遭受到病毒不同程度的危害,尤其是靠无性繁殖的植物,如蒙受病毒病后,代代相传,越染越重,严重地影响了产量和品质,给生产带来严重的损失。如草莓、马铃薯、甘薯、葡萄等植物感染病毒后会造成产量降低、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、花变小、色泽暗淡,大大影响其观赏价值。

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