

(农业院校专用教材)

植物组织培养实用技术

PLANT TISSUE CULTURE PRECTICE TECHNIQUE

朱建华 彭士勇 编著

中国计量出版社

图书在版编目(CIP)数据

植物组织培养实用技术/朱建华编著. —北京:中国计量出版社, 2002.1

ISBN 7-5026-1574-1

I. 植… II. 朱… III. 植物-组织培养 IV. Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 081333 号

内 容 提 要

本书是根据农业院校专业人才的培养要求而编著的。书中系统、全面地介绍了植物组织培养应用原理、实验设备及培养条件、培养基、植物组织培养操作技术、植物器官的培养、植物无毒苗的培育、花药和花粉培养、原生质体培养、草花类组织培养、球根花卉组织培养、水果类组织培养和几种经济作物的组织培养等十三个方面的技术内容。本书具有科学、实用、针对性强的特点。

本书可作为农业院校实用生物技术专业教材,也可供农业专业人员学习参考。

中国计量出版社出版

北京和平里西街甲 2 号

邮政编码 100013

电话 (010) 64275360

北京市迪鑫印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

版权所有 不得翻印

*

850 mm × 1168 mm 32 开本 印张 7.875 字数 198 千字

2002 年 1 月第 1 版 2002 年 1 月第 1 次印刷

*

印数 1—2 500 定价:15.00 元

序

《植物组织培养实用技术》一书适逢我国正在兴起的“组培”热潮而编写出版。近几年来,国内外在以植物组织培养为主要技术支柱所开拓的植物生物工程研究领域有了飞速的发展。在优新珍稀品种的大规模快速繁殖,脱除病毒危害,农林园艺作物品种的改良,种质基因保存等项目上已经分别形成开发应用的几大流派,有的已领先构建起新的产业,创造出巨额财富。随着国家的改革开放,农业中小企业的兴起,植物组织培养产业已植根于农民之中。我国植物组织培养研究,在老一辈学者如罗士韦教授,崔徵教授等人的带领下,曾经做出不少世界一流的开创性工作。编著者在培养生物技术高等职业人才中集教学科研为一体,并亲自做了大量的实验,积累了丰富的经验。在此书编写过程中除参阅最新的中外文献资料外,还介绍了快速繁殖和生产无毒苗应用等方面的最新技术,同时还通过大量的具体实例,阐明植物组织培养的基本理论、基本技术和基本方法,在各类植物的培养中,力图反映出国内外的最新进展,以及与栽培技术的有机结合。

本书不论在指导实际操作上,还是在阐明植物组织培养理论上,都有一定的深度和广度。另外,通俗易懂,指导性强,针对性强,实用性强是本书的最大特点。本书编著者在国内刊物上也曾发表过许多论文,提出了许多有创意的学术观点,并曾几次主编或参编过有学术价值的书籍。本书的编写是编著者多年从事植物组织培养工作积累的结晶。

本书主要面向大中专院校师生,苗圃经营者、花卉爱好者、植物组织培养业内人员等。本人拜读书稿后受益匪浅,特写此序,并向相关读者推荐此书!

吴国兴

2001年10月

前 言

自从 1902 年德国植物学家 Haberlandt 利用被子植物的叶子,进行细胞培养一个世纪以来,尤其是最近 40 多年,植物组织培养不仅成为一门新学科和新技术,而且已发展成为一门新兴产业。

植物组织培养目前在农业生产上主要应用于作物种苗的快速繁殖、生产无毒苗及育种方面。它已从科研院校走到农业生产中,成为工厂化育苗的一种新型技术手段。

有关植物组织培养的原理与技术知识,国内外已出版了不少的书籍。但具有实践性强、应用性广、组培和栽培结合、包含经营策略等多方面内容的书籍还不多。本书是作者根据国内外最新资料及多年教学科研和生产实践经验编写而成,具有内容丰富、资料翔实,技术先进的特点。书中讲述了植物组织培养总论,也介绍了花卉、果树、蔬菜作物等方面的技术内容。

本书主要面向农业高等院校实用生物技术专业的师生。对于园艺专业及其他相关专业人员和组织培养的技术人员,都有很好的参考价值。

本书在编写出版过程中得到了辽宁熊岳农业职业技术学院专家和中国计量出版社领导的积极支持,在此谨表感谢。存在的不足之处,敬请批评指正。

编者

2001 年 10 月

目 录

第一章 绪论	(1)
第一节 植物组织培养的意义	(1)
第二节 植物组织培养的发展	(3)
第三节 植物组织培养与农业的关系	(5)
一、快速繁殖种苗	(5)
二、无病毒苗的培养	(6)
三、在育种上的应用	(6)
四、工厂化育苗	(7)
第二章 实验设备及培养条件	(11)
第一节 实验室	(11)
一、洗涤室	(11)
二、准备室	(12)
三、接种室	(13)
四、培养室	(14)
第二节 设备和器材	(15)
一、玻璃器皿	(15)
二、器械用具	(16)
第三节 培养条件	(17)
一、温度	(17)
二、光照	(18)
三、湿度	(18)
四、渗透压	(19)
五、pH 值	(19)

六、气体	(20)
第三章 培养基	(21)
第一节 培养基的种类和成分	(21)
一、培养基的种类	(21)
二、培养基的成分	(23)
第二节 培养基的制备	(31)
一、母液的配制和保存	(31)
二、培养基的配制	(33)
三、培养基的分装与灭菌	(34)
第三节 培养基的选择	(35)
一、单因子试验	(35)
二、多因子试验	(35)
三、逐步添加和逐步排除的试验方法	(36)
四、广谱实验法	(37)
第四章 操作技术	(39)
第一节 灭菌和接种	(39)
一、灭菌	(39)
二、无菌操作	(46)
三、接种	(47)
第二节 培养和驯化	(47)
一、培养	(47)
二、试管苗移栽驯化	(53)
第三节 试管苗增殖率的估算	(57)
第四节 快速繁殖工作的计划安排	(58)
第五章 植物组织培养的应用原理	(62)
第一节 细胞的全能性和植物的再生性	(62)
一、植物细胞的全能性	(62)
二、植物的再生作用	(63)
第二节 愈伤组织的形成和形态发生	(64)
一、愈伤组织的形成	(64)

二、愈伤组织的生长	(67)
三、愈伤组织的形态发生方式	(68)
四、愈伤组织形态发生的调控	(70)
第六章 植物器官的培养	(74)
第一节 营养器官的培养	(74)
一、离体根的培养	(74)
二、茎尖的培养	(75)
三、茎段的培养	(78)
四、离体叶的培养	(80)
第二节 生殖器官的培养	(81)
一、花器官和种子的培养	(81)
二、胚胎的培养	(82)
三、胚珠的培养	(85)
四、胚乳的培养	(85)
第七章 植物无病毒苗的培育	(88)
第一节 无病毒苗培育的意义	(88)
一、病毒在植物上的危害	(88)
二、无病毒苗培育的意义	(89)
第二节 热处理脱毒	(89)
一、热处理法的发现及应用	(89)
二、热处理方法	(90)
第三节 茎尖培养脱毒	(91)
一、茎尖培养脱毒原理	(91)
二、培养基	(91)
三、茎尖培养方法	(92)
四、影响微茎尖培养的因素	(93)
第四节 其他途径脱毒	(93)
一、愈伤组织培养脱毒	(93)
二、茎尖微体嫁接	(94)
三、化学疗法脱毒	(94)

第五节 病毒植物的鉴定	(94)
一、指示植物法	(94)
二、抗血清鉴定法	(95)
三、电子显微镜检查法	(96)
四、酶联免疫鉴定法	(96)
第六节 无病毒植物的利用	(97)
一、无病毒苗的保存繁殖	(97)
二、无病毒苗的利用	(97)
三、无病毒苗的效果	(97)
第七节 中型组织培养实验室所需物品投资核算	(98)
一、固定资金	(98)
二、流动资金	(99)
三、效益分析	(100)
第八章 花药和花粉的培养	(102)
第一节 花药的培养	(103)
一、花药材料的选择	(103)
二、培养基的选择	(103)
三、消毒接种培养	(104)
四、花药培养中的花粉发育过程	(105)
第二节 花粉的培养	(106)
一、花粉的分离	(106)
二、花粉的预处理	(106)
三、培养基成分	(107)
四、花粉培养方法	(107)
第九章 原生质体的培养	(109)
第一节 原生质体培养的意义	(109)
一、原生质体	(109)
二、原生质体培养的意义	(110)
第二节 原生质体的分离	(110)
一、植物材料	(111)

二、酶	(112)
三、原生质体的分离	(114)
四、影响原生质体分离的因素	(115)
五、原生质体的净化和活力测定	(116)
第三节 原生质体的培养	(117)
一、培养原生质体的方法	(117)
二、固液结合培养法	(119)
三、影响原生质体培养的因素	(120)
第四节 原生质体的融合	(124)
一、融合方式	(124)
二、融合过程	(125)
第十章 草本花卉的组织培养	(127)
第一节 菊花的组织培养	(127)
一、形态特性和生物学习性	(127)
二、菊花的组织培养快速繁殖	(128)
三、菊花花瓣的培养	(130)
第二节 非洲菊的组织培养	(132)
一、形态特性和生物学习性	(132)
二、自然繁殖与育苗	(133)
三、组织培养育苗	(134)
四、栽培管理	(135)
第三节 矮牵牛的组织培养	(137)
一、形态特性和生物学习性	(137)
二、栽培技术	(137)
三、组织培养育苗	(138)
第四节 香石竹的组织培养	(139)
一、形态特性和生物学习性	(139)
二、自然繁殖与育苗	(140)
三、组织培养育苗	(141)
四、栽培技术	(143)

五、病虫害的防治	(145)
六、切花及保鲜	(146)
第十一章 球根花卉的组织培养	(148)
第一节 百合的组织培养	(148)
一、形态特性和生物学习性	(148)
二、繁殖方法	(151)
三、百合的组织培养	(152)
四、打破休眠的方法	(155)
五、病虫害的防治	(156)
第二节 兰花的组织培养技术	(156)
一、培养部位	(157)
二、茎尖的选取、灭菌和接种	(157)
第三节 兰科植物主要属的培养	(159)
一、卡特兰属的培养	(159)
二、蝶兰属的培养	(161)
第四节 兰花种子的无菌发芽培养	(162)
一、培养意义	(162)
二、材料的准备和灭菌	(163)
三、培养基	(163)
四、接种培养	(164)
第十二章 水果作物的组织培养	(166)
第一节 草莓的组织培养	(166)
一、形态特性和生物学习性	(166)
二、栽培方法	(167)
三、草莓脱毒苗的培养	(168)
四、草莓无病毒苗的鉴定	(169)
五、草莓无病毒苗的繁殖和利用	(170)
第二节 苹果的组织培养	(171)
一、形态特性和生物学习性	(171)
二、苹果的花粉培养	(172)

三、苹果的茎尖培养	(173)
四、胚的培养	(174)
五、栽培管理	(174)
第三节 葡萄的组织培养	(177)
一、形态特性和生物学习性	(177)
二、葡萄的组织培养	(178)
三、葡萄无病毒苗的培养	(179)
四、葡萄花粉的培养	(182)
五、子房的培养	(183)
六、栽培管理	(184)
七、葡萄的冬季防寒	(187)
第四节 无花果的组织培养	(188)
一、形态特性和生物学习性	(188)
二、无花果的茎段培养	(189)
三、栽培技术	(190)
第十三章 几种经济作物的组织培养	(193)
第一节 马铃薯的组织培养	(193)
一、形态特性和生物学习性	(194)
二、栽培管理	(195)
三、马铃薯脱毒技术	(196)
四、马铃薯无病毒苗的鉴定	(199)
五、马铃薯无病毒株的繁殖和保存	(200)
第二节 番茄的组织培养	(201)
一、形态特性和生物学习性	(201)
二、栽培管理	(202)
三、组织培养	(203)
四、胚的培养	(203)
五、病虫害及其防治	(204)
第三节 桔梗的组织培养	(204)
一、形态特性和生物学习性	(204)

三、苹果的茎尖培养	(173)
四、胚的培养	(174)
五、栽培管理	(174)
第三节 葡萄的组织培养	(177)
一、形态特性和生物学习性	(177)
二、葡萄的组织培养	(178)
三、葡萄无病毒苗的培养	(179)
四、葡萄花粉的培养	(182)
五、子房的培养	(183)
六、栽培管理	(184)
七、葡萄的冬季防寒	(187)
第四节 无花果的组织培养	(188)
一、形态特性和生物学习性	(188)
二、无花果的茎段培养	(189)
三、栽培技术	(190)
第十三章 几种经济作物的组织培养	(193)
第一节 马铃薯的组织培养	(193)
一、形态特性和生物学习性	(194)
二、栽培管理	(195)
三、马铃薯脱毒技术	(196)
四、马铃薯无病毒苗的鉴定	(199)
五、马铃薯无病毒株的繁殖和保存	(200)
第二节 番茄的组织培养	(201)
一、形态特性和生物学习性	(201)
二、栽培管理	(202)
三、组织培养	(203)
四、胚的培养	(203)
五、病虫害及其防治	(204)
第三节 桔梗的组织培养	(204)
一、形态特性和生物学习性	(204)

第一章 绪 论

目的要求:

- (1)掌握组织培养的概念和类型;
- (2)掌握组织培养的特点;
- (3)一般掌握组织培养发展史;
- (4)初步掌握组织培养在农业实践上的应用。

第一节 植物组织培养的意义

高等植物的组织培养(tissue culture)技术是指分离一个或数个细胞或植物体的一部分在无菌条件下培养的技术。通常我们所说的广义的组织培养,是指通过无菌操作分离植物体的一部分(即外植体 explant),接种到培养基上,在人工控制的条件下进行培养,使其生成完整的植株。

组织培养按培养对象可分为植株培养、器官培养、组织培养、细胞培养和原生质体培养等:

(1)植株培养(plant culture)是对完整植株材料的培养,如幼苗及较大植株的培养。

(2)器官培养(organ culture)即离体器官的培养,根据作物和需要的不同,可以包括分离茎尖、茎段、根尖、叶片、叶原基、子叶、花瓣、雄蕊、雌蕊、胚珠、胚、子房、果实等外植体的培养。

(3)组织或愈伤组织培养(tissue or callus culture)为狭义的组织培养,是对植物体的各部分组织进行培养,如茎尖分生组织、形成层、木质部、韧皮部、表皮组织、胚乳组织和薄壁组织等等;或对由

植物器官培养产生的愈伤组织进行培养,二者均通过再分化诱导形成植株。

(4)细胞培养(cell culture)是对由愈伤组织等进行液体振荡培养所得到的能保持较好分散性的离体单细胞或花粉单细胞或很小的细胞团的培养。

(5)原生质体培养(proplast culture)是用酶及物理方法除去细胞壁的原生质体的培养。

组织培养是本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,使组织培养不仅从理论上为相关学科提出了可靠的实验证据,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如此之快,应用的范围如此之广泛,是由于具备以下几个特点:

①培养条件可以人为控制

组织培养采用的植物材料完全是在人为提供的培养基质和小气候环境条件下进行生长,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,便于稳定地进行周年培养生产。

②生长周期短,繁殖率高

植物组织培养是由于人为控制培养条件,根据不同植物不同部位的不同要求而提供不同的培养条件,因此生长较快。另外,植株也比较小,往往 20~30d 为一个周期。所以,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优质种苗或脱病毒种苗。

③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下,人为提供一定的温度、光照、湿度、营养、激素等条件,极利于高度集约化和高密度工厂化生产,也利于自动化控制生产。它是未来农业工厂化育苗的发展方向。它与盆栽、田间栽培等相比省去了中耕除草、浇水施

肥、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。

第二节 植物组织培养的发展

组织培养技术的蓬勃发展只是近 50 年的事,但它的整个历史可以追溯至 19 世纪末和上世纪初。

20 世纪初,在 Schleiden 和 Schwann 所发展起来的细胞学说的推动下,1902 年德国植物学家 Haberlandt 提出了高等植物的器官和组织为许多细胞组成的观点,以及植物细胞全能性的理论,即植物的体细胞,在适当的条件下,具有不断分裂和繁殖,发育成完整植株的潜在能力。他首次发表了植物离体细胞培养实验的报告。1912 年, Haberlandt 的学生 Kotte 和美国的 Robins 在根尖培养中获得了组织培养的成功。Kotte 采用了无机盐、葡萄糖、蛋白胨、天冬酰胺,及添加各种氨基酸的培养基。Robins 用含无机盐、葡萄糖或果糖的琼脂培养基,培养了长度为 1.45 ~ 3.75cm 的豌豆、玉米和棉花的茎尖,形成了一些缺绿的茎和根。

自 Haberlandt 的实验之后,直到 1934 年美国的 White 由番茄根建立了第一个活跃生长的无性繁殖系,并反复转移到新鲜培养基中继代培养,使根的离体培养实验获得了真正的成功,并在以后 28 年间培养了 1600 代。这之后,White 又以小麦根尖为材料,研究了光、温度、通气、pH 值、培养基组成等各种培养条件对生长的影响,并于 1937 年建立了第一个组织培养的综合培养基,其成分均为已知化合物,包括 3 种 B 族维生素,即吡哆醇、硫胺素和烟酸,该培养基后来被定名为 White 培养基。与此同时, Gautherer(1934) 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。同年,White 由烟草种间杂种的瘤组织, Nobecourt 由胡萝卜均建立了与上述类似的连续生长的组织培养物。因此, Gautherer, White 和 Nobecourt 一起被誉为组织培养

学科的奠基人。我们现在所用的培养方法和培养基,基本上都是由这三位科学家建立的。后来,White 于 1943 年发表了《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。

40 年代 Skoog 和崔徵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生长素(IAA)对芽形成的抑制作用,而能诱导形成芽,从而明确了腺嘌呤与生长素的比例是控制芽和根形成的主要条件之一。即这一比例高时,产生芽;这一比例低时,则形成根;相等则不分化。在寻找促进细胞分裂的物质过程中,Miller 等人于 1956 年发现了激动素。不久即知道激动素可以代替腺嘌呤促进发芽,并且效果可增加 3 万倍。结果上述控制器官分化的激素模式变为激动素与生长素的比例关系。这方面的成功发现,有力地推动了植物组织培养的发展。

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无病毒植株。1935~1945 年 Muir 把单细胞放在一张铺在愈伤组织上面的滤纸上培养,使细胞发生了分裂,即实施了看护接种技术,使单细胞培养获得初步成功。

1960 年,Cocking 等人用真菌纤维素酶分离植物原生质体获得成功。1971 年,Takebe 等在烟草上首次由原生质体获得了再生植株,这不仅在理论上证明了无壁的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。80 年代中期以来,对禾谷类作物的原生质体培养也相继告捷,在这方面中国学者做出了重要贡献。

1962 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。以后相继在烟草、水稻、小麦、玉米、番茄、辣椒、草莓、苹果等多种植物培养中获得成功,其数目达到 160 多种,其中烟草、水稻和小麦等的花药育种培养在中国取得了引人注目的成就。

1960 年,Morel 提出了一个离体无性繁殖兰花的方法,其繁殖系数极高。由于这一方法有很大的应用价值,很快被兰花生产者所采用,迅速建立起兰花工业。

1973 年 Carlson 等通过两个烟草物种之间原生质体融合,获得了第一个体细胞杂种, Cocking 等倡导的原生质体培养和体细胞杂交,研究得到了迅速发展,已经能使矮牵牛和烟草属的杂种细胞增殖分化生成杂种植株。

在整个植物组织培养发展的历史中,我国学者做出多方面的贡献,除了前述的崔徵的研究成效以外,还有 1993 年李继侗等关于玉米等植物离体根尖培养的研究工作,以及罗士韦关于幼胚和茎尖培养,李正理关于离体胚的研究培养、王伏雄等关于幼胚的研究培养工作。

第三节 植物组织培养与农业的关系

植物组织培养成为生物科学的一个广阔领域,除了在基础理论的研究上占有重要地位以外,还在农业生产中也得到越来越广泛的应用。

一、快速繁殖种苗(rapid propagation)

用组织培养的方法进行快速繁殖是生产上最有潜力的应用,包括花卉观赏植物、蔬菜、果树、大田作物及其他经济作物。快繁技术不受季节等条件的限制,生长周期短,而且能使不能或很难繁殖的植物进行增殖。

快速繁殖可用下列手段进行:通过茎尖、茎段、鳞茎盘等产生大量腋芽;通过根、叶等器官直接诱导产生不定芽;通过愈伤组织培养诱导产生不定芽。试管快速繁殖应用在下列生产或研究中:(1)繁殖杂交育种中得到的少量杂交种,以及保存自交系、不育系等。(2)繁殖脱毒培养得到的少量无病毒苗。(3)繁殖生产上急需的或种源较少的种苗。

由于组织培养周期短,增殖率高及能全年生产等特点,加上培养材料和试管苗的小型化,这就可使有限的空间培养出大量的植物,在短期内培养出大量的幼苗。组织培养突出的优点是“快”,通