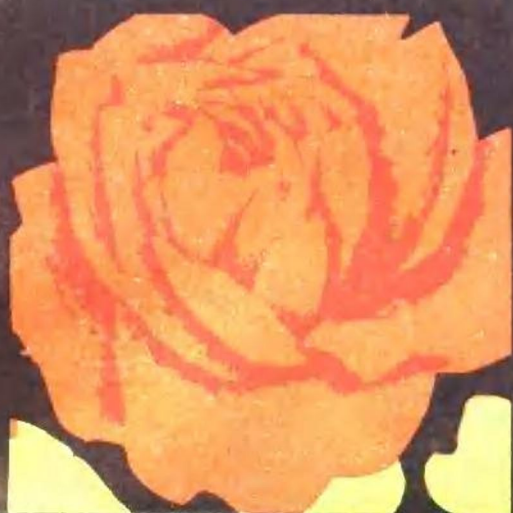




园艺植物组织培养



杨增海编著



农业出版社

园艺植物组织培养

杨增海 编著

* * *

责任编辑 张本云 边依林

农业出版社出版 (北京朝内大街130号)

新华书店北京发行所发行 农业出版社印刷厂印刷

850×1168毫米32开本 12.5印张 341千字

1987年2月第1版 1987年2月北京第1次印刷

印数 1—4,700册

统一书号 16144·3158 定价 2.60元

内 容 提 要

本书根据科研、教学成果并参考国内外有关资料编写而成，着重论述园艺植物组织培养的基本理论、方法和应用，指出了当前存在问题和未来的发展前景。

本书共分八章，第一章论述园艺植物组织培养的原理与概况；第二章论述组织培养实验室的设施；第三章论述园艺植物组织培养的条件；第四章论述器官培养；第五章论述胚胎培养；第六章论述花药和花粉培养；第七章论述原生质体培养与诱变育种；第八章论述试管受精和试管微体嫁接技术。

本书主要供从事果树、蔬菜和观赏园艺工作的大专院校师生、植物组织培养工作者及有关科技人员参考。

序

早在三十年代初期，我国已故的罗宗洛教授和李继侗教授已经进行了植物组织培养的研究工作。罗宗洛教授研究了离体根尖培养的适宜条件，李继侗教授对银杏的胚进行了组织培养研究。

从三十年代以后，我国的组织培养研究工作一度中断。五十年代以来，罗士韦教授、崔激教授、李正理教授和王伏雄教授等，对组织培养研究做了大量工作，成绩显著。在最近的十多年，我国有关的园艺科研单位和高等农林院校迅速开展了园艺植物组织培养的研究，例如中国农业科学院果树研究所，郑州果树研究所，柑桔研究所，蔬菜研究所，中国科学院植物研究所，北京市农业科学院林业科学研究所，上海市农业科学院园艺研究所，上海植物园，华南植物研究所，广西植物研究所，浙江省农业科学院园艺研究所，江苏省农业科学院园艺研究所以及北京大学生物系，浙江农业大学园艺系，山东农业大学园艺系，北京农业大学园艺系，福建农学院，华中农学院，西北农学院等都进行了深入研究，取得了不少成果，其中有些已应用于生产，这是值得我们庆贺的。

组织培养研究工作的不断深入进展，必然有利于推动生物科学和农业生产的向前发展，从而为社会主义农业现代化服务，为人类造福。

目前，世界各国都重视和深入开展组织培养的研究工作，并已经进行了有关多种专业的大协作。我们相信，我国的园艺植物组织培养的科研工作，今后也一定会出现大协作，一定会更密切地面向生产，出现更多、更好的新成就，一定会取得更多、更大的突破。

杨增海同志是西北农学院园艺系的一位年轻教师，已经取得硕士学位。他多年从事于组织培养的研究工作，在导师路广明教授的

指导下，做出了优异成绩。最近，他用自己进行植物组织培养的科研成果和体会，并收集和参考了大量的国内外有关资料，编写成了《园艺植物组织培养》一书，内容丰富，文笔通顺，既有基本理论，又有应用技术，确是一本通俗易懂的科技读物。本书出版后，将对进一步促进我国园艺植物组织培养的研究工作有一定意义。

我希望中青年同志要超过老同志。只有这样，我们的科学技术水平才能不断提高，不断向前发展，这是一条必然规律。

孙云蔚

一九八四年“五一”国际劳动节

写于西北农学院

前 言

自从1902年 Haberlandt 根据细胞学说,提出了植物细胞“全能性”问题的设想以来,至今已经八十多年了。基于细胞“全能性”学说基础上的植物组织培养技术,正在不断改进、发展和完善。园艺植物组织培养的进展更是令人瞩目。二十世纪后半叶,随着分子生物学与细胞生物学的崛起,离体培养的植物细胞已成为在细胞水平上分析研究的理想材料。在优良品种和无性系的快速繁殖与工厂化生产、无病毒苗木的培育、种质资源的保存、新品种的选育、远缘杂交不亲和性障碍的克服、单倍体、三倍体及其它多倍体、非整倍体的获得以及植物细胞遗传工程等方面,植物组织培养正在发挥着越来越大的作用。正因为如此,它已广泛应用于植物科学的各个分支如植物学、植物生理学、遗传学、育种学、栽培学、胚胎学、解剖学、病理学等等。

近二十年来,植物组织培养进入了飞跃发展阶段,采用组织培养方法进行科研工作所阐明的问題、积累的资料的数量是十分可观的,并且有些已经在生产上推广应用。为此,本书参考了1984年以前的文献资料共四百余篇,并根据作者的实践和体会,试图阐明植物组织培养的基本理论,总结近年来果树、蔬菜和观赏园艺植物组织培养的方法和技术,并反映国内外园艺植物组织培养的最近进展,以期对我国正在蓬勃发展的植物组织培养起些作用。当然,由于作者水平有限,书中的缺点和错误在所难免,请广大读者批评指正,并诚恳地希望全国有关单位和同志,能对本书提出修改意见,使其在此基础上不断充实、提高和完善。

本书在编著中,蒙西北农学院园艺系孙云蔚教授撰写序文,略

广明教授审阅全书，园艺系主任贺普超副教授及不少老师和同志提供意见和有关资料，在此一并敬致谢意。

杨增海

一九八四年五月

写于西北农学院

目 录

第一章 园艺植物组织培养的原理与概况	1
一、植物组织培养概念	1
二、植物组织培养的生理依据	4
三、园艺植物组织培养的意义和作用	7
四、园艺植物组织培养的发展历史与展望	13
第二章 组织培养实验室的设施	23
一、实验室设计	23
(一) 无菌操作室	23
(二) 培养室	25
(三) 化学实验室	26
(四) 细胞学实验室	27
(五) 摄影室	27
(六) 灭菌室	27
二、仪器、设备和用具	27
(一) 玻璃器皿	27
(二) 仪器与设备	30
(三) 用具和器械	31
三、水	33
四、环境控制	34
(一) 培养箱和培养柜	34
(二) 培养室的环境控制	35
(三) 低温系统	35
五、液体培养及其设备	35
第三章 园艺植物组织培养的条件	39
一、培养基	39
(一) 培养基成分	39

(二) 培养基种类	42
(三) 培养基制备	42
二、仪器和植物材料的灭菌	47
(一) 仪器的消毒	47
(二) 植物材料的消毒和灭菌	48
(三) 无菌操作	52
三、影响外植体生长发育的环境因素	53
第四章 器官培养	60
一、茎尖培养	60
(一) 茎尖培养的含义	61
(二) 试验的设计	62
(三) 茎尖培养的方法和程序	62
(四) 茎尖分生组织培养	68
1. 病毒危害及分布情况	68
2. 热处理茎尖分生组织培养	69
3. 草莓无病毒苗的培养	70
4. 树莓热处理茎尖培养	72
5. 无花果茎尖培养	73
6. 马铃薯无病毒苗的培养	74
7. 百合无病毒苗的培养	76
8. 兰花无病毒苗的培养	77
(五) 普通茎尖培养	78
1. 苹果茎尖培养	79
2. 桃茎尖培养	82
3. 香蕉茎尖培养	85
4. 大白菜和甘蓝的侧芽培养	86
5. 结球莴苣顶芽培养	87
6. 石刁柏茎尖培养	87
7. 甜菊的茎尖培养	88
8. 菊花的侧芽培养	88
9. 无籽西瓜的茎尖培养	90
二、茎(鳞茎、花茎)培养	94
1. 猕猴桃茎段培养	94

2. 甘蓝花茎培养	97
3. 水仙鳞茎培养	99
4. 百合鳞茎、茎段培养	102
三、离体根培养	104
(一) 离体根的培养方法	105
1. 一般方法	105
2. 结瘤实验的特殊方法	105
(二) 几种园艺植物的离体根培养	105
1. 番茄离体根的培养	106
2. 胡萝卜肉质根的培养	109
3. 柑桔与金桔的根培养	111
四、离体叶培养	113
(一) 叶培养	113
1. 研究形态建成的叶培养	113
2. 叶细胞培养	115
(二) 几种园艺植物的叶培养	116
1. 石榴叶片培养	116
2. 猕猴桃子叶培养	116
3. 大蒜叶片培养	117
4. 番茄叶培养	119
5. 倒挂金钟叶培养	120
6. 唐菖蒲叶片培养	120
7. 黄花菜叶培养	121
五、花和果实的离体培养	121
(一) 离体花培养	122
1. 花椰菜的花球组织培养	122
2. 茎椰菜花培养	123
3. 菊花花瓣和花托培养	125
4. 黄花菜雄蕊培养	126
(二) 花的“性别决定”研究	127
(三) 果实培养	127
1. 用于果实发育的研究	127
2. 由果实再生植株	128

第五章 胚胎培养	130
一、离体胚培养	131
(一) 胚胎培养的作用	131
(二) 胚胎培养的两种类型	133
(三) 胚胎培养的营养需要	138
(四) 胚培养的环境条件	146
(五) 胚胎培养技术的应用	147
1. 桃胚培养	147
2. 柑桔胚培养	153
3. 梨的胚培养	155
4. 萝卜与大白菜属间杂种胚培养	157
5. 大白菜胚培养	160
6. 百合远缘杂种胚培养	161
二、胚乳培养	164
(一) 胚乳培养的基本原理	165
(二) 几种园艺植物的胚乳培养	168
1. 苹果胚乳培养	168
2. 桃胚乳培养	170
3. 猕猴桃胚乳培养	171
4. 马铃薯胚乳培养	173
(三) 胚乳培养的染色体倍性	174
三、胚珠培养和子房培养	175
(一) 胚珠培养	175
(二) 子房培养	178
四、胚的所属部分培养	183
1. 油橄榄下胚轴培养	183
2. 黄瓜下胚轴培养	184
第六章 花药和花粉培养	186
一、概况	186
(一) 花粉培养	188
(二) 花药培养	189
二、果树作物的花药培养	192
1. 柑桔的花药培养	192

2. 草莓的花药培养	198
3. 苹果的花药培养	201
4. 葡萄的花药培养	203
5. 荔枝花药培养	206
6. 西瓜花药培养	207
三、蔬菜作物的花药和花粉培养	209
1. 白菜花药培养	209
2. 甘蓝花药与花粉培养	213
3. 辣椒花药培养	215
4. 番茄花药与花粉培养	223
5. 茄子花药与花粉培养	226
6. 马铃薯花药培养	229
四、观赏植物花药和花粉培养	230
1. 四季海棠花药培养	230
2. 芍药花粉培养	233
3. 天竺葵花药培养	234
五、花药和花粉培养的评价与展望	234
第七章 原生质体培养与诱变育种	240
一、概况	240
(一) 原生质体培养	240
(二) 诱变育种	243
二、原生质体分离	244
(一) 植物材料	244
(二) 酶	246
(三) 原生质体的分离	249
(四) 原生质体的净化和活力测定	249
三、原生质体培养	252
(一) 培养原生质体的方法	252
(二) 培养条件	254
四、原生质体培养技术的应用	256
1. 柑桔 (甜橙, <i>Citrus sinensis</i>) 的原生质体培养	256
2. 黄瓜叶肉原生质体培养	259
3. 油菜叶肉原生质体培养	261

4. 马铃薯叶肉细胞原生质体培养	263
5. 胡萝卜悬浮培养细胞原生质体培养	265
五、原生质体融合	267
(一) 融合的方式和方法	267
(二) 融合过程	268
(三) 几种园艺植物的原生质体融合	270
1. 马铃薯和番茄原生质体融合	270
2. 胡萝卜原生质体融合	271
3. 芸薹属根和叶片原生质体融合	272
4. 矮牵牛和拟矮牵牛叶原生质体融合	272
六、组织培养与诱变育种	274
(一) 辐射诱变	275
1. 培养细胞的辐射诱变	275
2. 柑桔茎尖的人工诱变	278
3. 苹果种胚的人工诱变	280
(二) 化学诱变	282
第八章 试管受精与试管微体嫁接	285
一、试管内受精	285
(一) 园艺植物试管受精的发展概况	285
(二) 影响试管受精效果的因素	290
(三) 试管受精技术在园艺植物育种上的应用	292
二、试管微体嫁接	296
(一) 概况	296
(二) 试管微体嫁接的意义和作用	297
(三) 几种果树作物的试管微体嫁接	300
1. 苹果茎尖的微体嫁接	300
2. 柑桔的茎尖微体嫁接	302
3. 桃的试管微体嫁接	304
附录一 园艺植物组织培养的进展	307
附录二 常用培养基的配方	330
附录三 缩写字	363
附录四 酒精稀释表	364
主要参考文献	365

第一章 园艺植物组织培养的原理与概况

近年来，植物组织培养作为一种新兴技术和科研手段，正在植物科学的各个领域蓬勃发展。无论是植物的器官、组织和细胞的培养，还是原生质体的分离、融合和培养均取得了显著的成效。通过对各种植物材料的无菌培养，研究了愈伤组织诱导、器官分化和在离体培养条件下培养材料（外植体）的生长发育规律，以及影响这些过程的各种因素。胚胎培养不仅用来克服有性杂交、尤其是远缘杂交不育，而且可以解决某些早熟植物如早熟桃、早熟葡萄等由于果实发育时间短、种胚发育不完全而播种不能萌发的问题；茎尖培养被广泛用来快速繁殖优良品种和新品种，茎尖分生组织培养用来生产无病毒苗木；胚乳培养可以培育三倍体及多倍体植株；花粉和花药培养获得的单倍体植株，可以作为单倍体育种材料；试管受精及试管微芽嫁接技术也进一步得到发展。所有这些，均引起了人们的极大重视。此外，人们还试图应用细胞融合技术创造新的物种；利用组织培养技术建立园艺植物基因库；在生物合成及次生物质生产方面的研究也越来越多。

果树、蔬菜和观赏园艺植物的组织培养发展更快，据不完全统计，在不同形式的组织培养中，果树已有 28 种、蔬菜已有 39 种、观赏植物已有 51 科 208 种获得成功。园艺植物组织培养的前景无限广阔，今后这方面的研究工作必将取得更大进展。

一、植物组织培养概念

严格地讲，“植物组织培养”是指将植物的离体生活组织部分（如苹果、梨、桃的茎尖，甘蓝的胚胎、胚轴，葡萄的花药，百合

的鳞茎等) 在适宜的人工培养基和无菌条件下, 进行培养使其增殖 (产生愈伤组织), 并逐步分化出器官 (芽和根) 和形成小植株的方法。从广义上来讲, “植物组织培养” 一词, 包括器官、组织、细胞以及原生质体等多种离体生活部分的培养。通常用于组织培养的离体材料称为外植体。植物各类组织培养操作技术可以统称为植物组织培养技术。

植物组织培养包括了所有的植物无菌培养技术。根据培养基及其培养方式, 可以将植物组织培养区分为固体培养 (琼脂培养) 和液体培养, 后者又可分为振荡培养、旋转培养、静止培养等。液体培养基中放入滤纸, 再将外植体置于滤纸上进行的培养称为纸桥培养 (图 1—1)。根据培养材料的来源及特性, 可以将植物组织培养区分为以下几类。

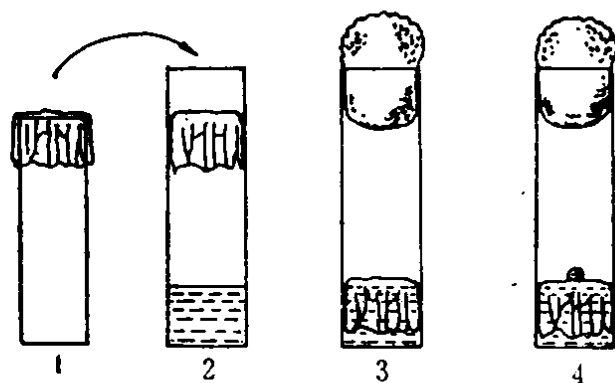


图 1—1 纸桥培养

1. 在细试管上制成纸桥 2. 将纸桥放入试管 3. 灭菌 4. 接种

(1) 植物培养 幼苗及较大的完整植株的培养。

(2) 胚胎培养 成熟及未成熟的胚胎的离体培养, 包括合子胚、珠心胚、子房、胚乳及试管受精等。

(3) 器官培养 构成植物体的各种器官的离体培养, 包括根、茎、叶、花、果实等。例如茎尖培养可以快速繁殖良种, 加速新品种的推广; 根培养不仅可以获得再生植株, 而且还可以研究不定芽和不定根的形态发生规律。

(4) 愈伤组织培养 植物离体部分通过培养增殖而形成的愈伤组织的培养。在愈伤组织培养过程中, 外植体一般要经历 “脱分化” 和 “再分化” 两个阶段。

(5) 组织培养 构成植物体的各种组织的离体培养, 如分生组织、输导组织、薄壁组织等离体组织的培养。如茎尖分生组织 (meristem tip) 培养。茎尖显微嫁接及热处理可以培养无病毒

苗。愈伤组织培养常用“组织培养”代替，实际上因二者含义不同，彼此应当区分开来。

(6) 细胞培养 能保持较好分散性的离体细胞或很小的细胞团的液体培养，即悬浮培养。如通过单细胞培养或通过花粉粒的悬浮培养，或用看护培养、微室培养、平板培养（图 1—2）等方法可获得单细胞无性繁殖系。

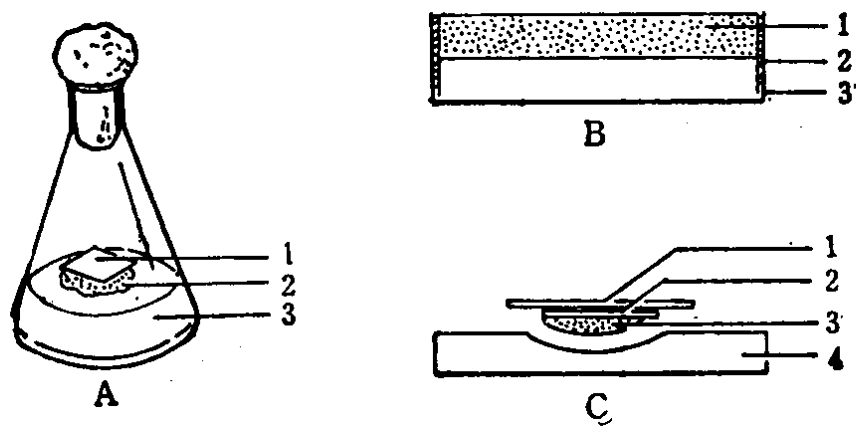


图 1—2 单细胞培养的三种方法

- A. 看护培养 1. 滤纸, 上面接种单细胞 2. 看护用的愈伤组织 3. 培养基
B. 平板培养 1. 培养基和分散的单细胞 2. 石蜡封口 3. 培养皿盖
C. 微室培养 1. 大盖玻片 2. 小盖玻片 3. 悬滴 4. 凹穴载玻片

看护培养 是用一块愈伤组织来看护单细胞使之生长和增殖的方法。在一个三角瓶中加入一定量的固体培养基，培养基上放一块几毫米大的愈伤组织，将一张已预先灭菌的滤纸放在组织块上，经过 12 小时后，滤纸已充分吸收了从组织块渗上来的培养基成分，此时即可将单细胞置于滤纸上培养。

平板培养 是将悬浮培养的细胞接种到一薄层固体培养基上进行培养。当含有 0.6% 琼脂的培养基冷却到 35℃ 时（尚未固化），将悬浮液接种进去，充分混合，倒入 9cm 的培养皿中，每个培养皿加入 10ml 混合液，培养皿中培养基凝固后用石蜡密封，再进行培养。

微室培养 是将细胞培养在很少量的培养基中，其优点是便于在培养过程中连续进行显微观察。具体做法是，在一块小盖玻片上

放一滴琼脂培养基，培养基的中央放一小块亲本愈伤组织作为看护，培养基的四周放一圈单细胞。将小盖玻片粘在一块大盖玻片上，然后翻过来放在一块凹穴载玻片上，再用石蜡-凡士林的混合物密封。

(7) 原生质体培养

去掉细胞壁后所获得的细胞原生质体的培养。原生质体不仅具有活细胞的性质，而且可以融合形成杂种细胞（即体细胞杂交），由于去掉了细胞壁，所以获得了易于摄取外来的遗传物质、细胞器以及病毒、细菌等微生物等特性。

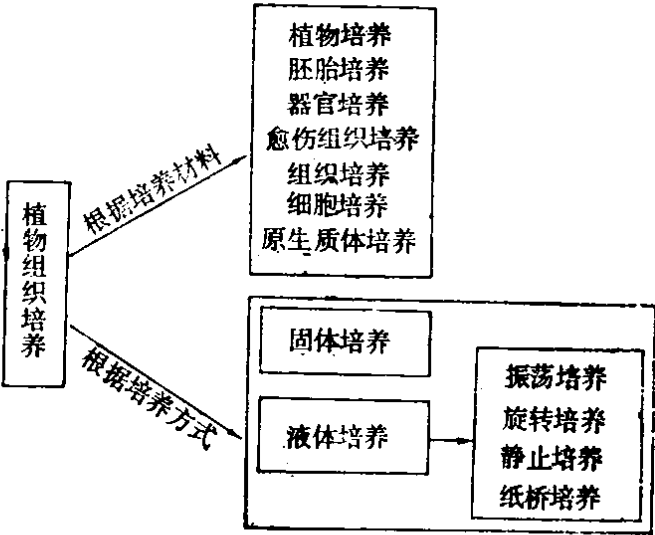


图 1—3 植物组织培养类别

植物组织培养的主要类别见图 1—3。

二、植物组织培养的生理依据

(一) 植物细胞全能性学说

(1) 植物细胞全能性 (totipotent) 一切植物，无论是高等植物还是低等植物，都是由细胞构成的，细胞是构成植物体的基本单位。马克思和恩格斯曾对细胞的发现给予极高的评价，把它列为十九世纪自然科学上的三大发现之一。

细胞的功能是什么呢？原来，植物的新陈代谢、生理生化活动，都是在细胞中进行的。无论是光合作用，呼吸作用，营养、水分的吸收、运输，有机物质的合成、分解，还是植物体的生长运动，哪一样也离不开细胞。俗话说：“种瓜得瓜，种豆得豆”，这种子代与亲代相似的遗传现象的基质——遗传基因就存在于细胞之中。

在细胞学的基础上，便产生了植物细胞全能性学说，即植物的幼龄体细胞，含有全套遗传基因，具有形成完整植株的能力。