

植物组织 培养概论

6 赵国凡 王兴理编著

大连工学院出版社

责任编辑 海 川
封面设计 邹本忠
责任校对 白 石

植物组织培养概论

赵国凡 王兴理 编著

大连工学院出版社出版发行（大连市凌水河）

辽宁省机械研究院印刷厂印刷

开本：787×1092 1/32 印张：11.5字数：258千字

1988年4月第1版 1988年4月第1次印刷

印数：1—1 000

ISBN 7-5611-0064-7

Q·2 定价：2.95元

前 言

近二十年来,植物组织和细胞培养的研究领域发展极为迅速。其中离体器官、组织和细胞培养(包括花药培养以及原生质体培养)技术,或者说植物细胞和组织培养领域里的最新成就已使它进入到实验生物学方面最有生气和最希望的研究领域。甚至可以讲,不仅仅是植物生理学、细胞生物学和遗传学方面,同时也在农业、森林、园艺、名贵药材和工业方面,当前都已将体外培养作为各种不同基础理论问题研究的一种重要工具。上述新技术的出现和发展,实际上已经能够用来研究过去无法解决的问题,同时已使在这一领域的开拓者的“梦”想开始成为现实。

近些年来,我国和许多发达国家一样,在植物组织和细胞培养的研究中,尤其在花药培养单倍体育种和马铃薯茎尖培养无病毒苗的生产上,已经做出了突破性的贡献。因为我国学者在世界领域中最先采用花药培养方法培育出小麦、小黑麦、小冰麦、玉米、辣椒、茄子、杨树、三叶橡胶、油茶等植物的单倍体花粉植株,同时也是最先采用此法培育出一批烟草、水稻和小麦等植物的新品种和新品系,从而使花药培养育种工作做出了重要贡献。经茎尖培养得到的去病毒马铃薯已扩大繁殖用于生产,大大提高马铃薯的产量。在原生质体培养和细胞杂交方面,利用自己诱变筛选的菌种制备纤维素酶,并从烟草、胡萝卜和犍牛牛等原生质体成功地培育出完整植株。采用胚培养技术克服远缘杂交的不亲和性以及利用组织培养方法培养胚乳获得三倍体或非整倍体植株上,也都取得

了可喜的成果。近年来在重要经济植物的快速繁殖方面发展迅速，不少花卉、果树和林木已能批量生产试管苗，为大规模工厂化创造了条件。

为了推动植物组织和细胞培养的研究和教学工作，特别是进一步促进这一新技术的广泛应用编写了这本书，以备参考。

作者的话

植物组织和细胞培养的研究发展非常迅速,已成为实验生物学、生物工程专业中最有生命力的新领域之一。

本书的绪论、第三、四、五、七、八、九、十、十一章由辽宁大学赵国凡执笔,第二、六章由沈阳农业大学王兴理执笔,第九及第十章分别由中国科学院植物研究所朱至清和胡志昂修改定稿。第十一章部分内容由毛德寿作了补充。

在编写过程中,我们重视植物组织和细胞培养中的基本概念和基础理论,努力反映这一领域中的新进展,同时注意贯彻少而精和理论联系实际的原则。初稿完成后,先后经中国科学院植物研究所副研究员孙敬三和朱至清先生审校并修改,绘图由邹本忠、照片由李桂亭同志负责,这里一并表示谢意。

由于我们水平有限,书中存在错误和不足之处实属难免,恳请专家和广大读者批评指正。

赵国凡

1986年国庆节

目 录

第一章 绪论	(1)
一、概念.....	(2)
二、植物细胞和组织培养的意义.....	(6)
三、植物组织和细胞培养的发展.....	(7)
四、细胞和组织培养技术理论基础和主要技术.....	(13)
第二章 实验室的基本设备和操作方法	(25)
第一节 实验室.....	(25)
一、无菌室.....	(26)
二、化学实验室.....	(28)
三、培养室.....	(28)
四、细胞学实验室.....	(29)
五、摄影室(或暗室).....	(29)
六、洗涤室.....	(29)
七、灭菌室.....	(30)
第二节 玻璃仪器及工具.....	(30)
一、玻璃器皿.....	(30)
二、用具和器械.....	(32)
三、仪器和设备.....	(35)
第三节 洗涤与消毒方法.....	(38)
一、洗涤方法.....	(38)
二、消毒.....	(40)
第四节 无菌操作.....	(43)

一、无菌室的使用规则·····	(43)
二、无菌室内的消毒·····	(43)
三、工作人员需要注意的问题·····	(44)
第五节 培养基的制备·····	(45)
第六节 恒温培养·····	(46)
第三章 植物愈伤组织的培养 ·····	(48)
第一节 植物材料的准备·····	(48)
第二节 培养基·····	(52)
第三节 培养技术·····	(59)
第四章 单细胞无性繁殖系 ·····	(65)
第一节 平板培养·····	(66)
第二节 微室培养·····	(69)
一、微室培养的用途·····	(69)
二、微室培养的方法·····	(70)
第三节 看护培养·····	(71)
第四节 单花粉培养·····	(72)
一、概念·····	(72)
二、意义·····	(72)
三、单花粉培养的方法·····	(73)
四、单花粉培养的历史与现状·····	(75)
第五章 植物细胞分化和形态建成 ·····	(81)
第一节 细胞分化和组织分化·····	(82)
第二节 器官形成·····	(90)
第三节 胚状体的形成·····	(110)
一、胚状体概念及其研究意义·····	(110)
二、胚状体形成及发生过程·····	(111)
三、影响胚状体发生的因素·····	(114)

第六章 植物的器官培养	(126)
第一节 离体根培养.....	(126)
一、离体根的培养方法.....	(127)
二、离体根的必需营养元素.....	(130)
三、培养条件.....	(134)
四、培养基的变化.....	(134)
第二节 茎尖培养.....	(137)
一、历史和现状.....	(137)
二、无病毒植株的获得.....	(139)
三、开花生理研究.....	(142)
第三节 叶培养.....	(148)
一、叶培养可用于叶形态建成研究.....	(148)
二、培养叶组织的脱分化及再分化.....	(151)
第四节 花与果实的离体培养.....	(158)
一、培养技术.....	(158)
二、用于花的“性别决定”研究.....	(159)
第七章 植物的胚胎培养	(162)
第一节 胚胎培养.....	(162)
第二节 离体胚培养.....	(163)
一、培养的离体胚的生长.....	(163)
二、胚胎的切段培养.....	(169)
三、植物胚胎培养的进展及其在实践中的应用.....	(171)
第三节 胚珠培养.....	(178)
第四节 子房培养.....	(180)
第八章 花药培养	(184)
第一节 研究方法.....	(190)
一、取材.....	(190)

二、预处理	(191)
三、表面消毒	(192)
四、接种	(192)
五、培养	(193)
第二节 培养基	(195)
一、基本培养基	(196)
二、分化培养基	(199)
第三节 花药培养及其自种上的潜力	(200)
一、单倍体植物在育种上的意义	(200)
二、单倍体植物的染色体加倍	(205)
第九章 原生质体培养与细胞杂交	(208)
第一节 原生质体分离	(209)
一、原生质体分离所用的酶	(209)
二、原生质体分离的程序	(211)
第二节 原生质体培养	(220)
一、培养基的组成	(220)
二、培养的密度	(221)
三、培养技术	(221)
四、原生质体活力的测定	(224)
五、原生质体的分裂与增殖	(225)
六、植株再生	(227)
第三节 原生质体融合与细胞杂交	(230)
一、发展简况	(231)
二、自发融合与诱导融合	(232)
三、诱导剂和诱导方法	(233)
四、植物原生质体的应用	(237)
第十章 遗传工程	(253)

第一节	遗传工程是生产和科学发展的产物·····	(253)
第二节	重组DNA的基本流程·····	(254)
第三节	植物遗传工程的历史和现状·····	(258)
第四节	植物遗传工程的展望·····	(264)
第十一章	植物的组织培养及其应用 ·····	(271)
第一节	植物细胞、组织培养在甘蔗改良中的作用(271)	
一、	历史与展望·····	(272)
二、	生物化学和生理学·····	(273)
三、	细胞学·····	(280)
四、	突变·····	(283)
五、	选择·····	(287)
六、	结论·····	(288)
第二节	组织培养法在观赏植物繁殖中的应用···	(289)
一、	前言·····	(289)
二、	在育种工作中的意义·····	(292)
三、	被选用的无性系的无病毒母株的产生和生产(294)	
四、	组织培养和观赏植物的发展·····	(295)
五、	培养物的建立·····	(299)
六、	培养基和材料·····	(300)
第三节	兰花工业中的组织培养·····	(322)
一、	组织培养技术和培养基·····	(323)
二、	种子和胚培养·····	(324)
三、	分生组织培养·····	(330)
第四节	木本植物的组织培养和快速繁殖·····	(334)
一、	杨树的组织培养·····	(334)
二、	柚木的茎尖培养·····	(339)
三、	松树的组织培养·····	(344)

第一章 绪论

早在十九世纪的上半叶，Schleiden和Schwann提出了细胞学说。细胞学说的发现对于辩证唯物主义的创立提出了有力的科学证据。马克思和恩格斯对细胞的发现曾给以极高的评价，并把它列为十九世纪自然科学上的三大发现之一。恩格斯在《路德维希·费尔巴哈和德国古典哲学的终结》一书中指出：“由于这一发现，我们不仅知道一切高等有机体都是按照一个共同规律发育和生长的，而且通过细胞的变异能力指出了使有机体能改变自己的物种从而能实现一个比个体发育更高的发育的道路。”细胞学说的发现，对于推动生物学的发展起了极其重要的作用。以细胞理论为依据，人们试图在人工条件下应用无菌培养的方法培养植物的一个离体器官，组织或细胞。并在人工控制的条件下，研究其愈伤组织的诱导及分化的规律，以及控制这些过程的各种因素。植物组织和细胞培养技术所以能够这样迅速发展起来，是经过较长期反复研究和不断实践的结果。

植物组织和细胞培养技术的迅猛发展，随之其应用价值也日益提高。在作物品种改良上，已明确显示出其特有的优点，例如利用胚胎培养技术能够克服杂种不育，利用胚珠或子房培养可以进行试管授粉，通过花药培养进行单倍体研究的成果，已经取得惊人的进展，我国在这一领域内的飞速发展已在世界范围内占据领先地位。通过对原生质体融合的研究，已经获得体细胞杂种植物。利用植物茎尖的培养，使感染病毒的植株重新获得无病毒植物以及保存有价值的材料成为可能。通过组织培养中的器官和胚胎培养的大量研究，在

实践上已经用于加速植物的无性繁殖。同时，利用组织和细胞培养技术尚能生产药物或其它有用的天然产物。

那么，是不是这些技术的广泛利用就没有什么固有的困难吗？就不存在什么局限性和经验性吗？大量事实表明：人们要想成功的进行这类研究，不仅存在相当大的固有的困难，而且需要一些必要的专门设备和熟练的操作技术。不仅要看到这类技术的实际利用价值，还要注意其局限性，只有这样才能了解这类技术在本职工作范围内实际应用价值及其局限性，以及很强的经验性。就是说，如果准备利用某种植物材料进行有效地工作，那么不仅要了解这些技术的理论基础、实验技术，还必须亲自参加实践，因为不仅不同的植物有机体有不同的特点，就是同一种植物的不同器官、组织或不同发育时期进行试验也可能出现不同的结果。所以，只有遵循一般的规律，又要注意特殊性，注意摸索操作程序、消毒方法、培养基的成分、适宜植物激素的选择及其培养条件等进行适当的变更，才有可能得到预期的效果。

本章主要讨论四个问题：

一、概念

所谓植物组织培养和细胞培养，是指在无菌和人工控制的营养（培养基）及环境条件（光照、温度）下，研究植物的细胞、组织和器官以及控制其生长发育的技术。“植物组织培养”这个词，一般通用于所有类型的植物无菌培养技术。由于培养材料的不同可将植物的无菌培养技术分为下面几个类型：①幼苗及较大植株的培养，即为“植物培养”；②从植物体的各种器官的外植体增殖而形成的愈伤组织的培养叫做“愈伤组织培养”（或狭义的“组织培养”）；③能够保持较好分散性的离体细胞或很小的细胞团的液体培养，

即为“悬浮培养”，④离体器官的培养，包括茎尖、根尖、叶片（包括叶原基）、花器官各部分原基或未成熟的花器官各部分以及未成熟果实的培养，称为“器官培养”，⑤未成熟或成熟的胚胎的离体培养，则为“胚胎培养”。有关无菌的植物培养的其它方面将在以后各章分别进行讨论。

一般在完整植物中，实际上没有任何一种正常组织能与培养的愈伤组织对应。通常采用“愈伤组织”这个词，主要是考虑到这种组织的起源似乎与细胞或组织分离时所受到的损伤刺激而增殖有关。并且认为这样所形成的组织可能与植物体在受伤时所形成的愈伤组织相同。当然，这种伤害刺激只是促进细胞增殖的因素之一，甚至在某些情况下似乎还不是主要原因。而脱离植株的外植体，已经不再受到原植株对其组织的控制，因此促进细胞增殖的决定因素可能是为“外植体”提供适宜的营养物质和植物激素。愈伤组织培养也常用“组织培养”这个术语代替，这是由于其外植体来源于母体植株的不同组织，而且从形态、细胞结构以及生理生化上彼此之间存在较大的差异，并且与新形成的创伤愈伤组织也有显著的不同。这类培养组织通常是由分裂的和不分裂的细胞所构成，而且在组织块内的处于不分裂状态的细胞又存在一种或数种有区别的细胞类型。所以出现一个普遍的概念上的混乱，是由于认为被培养的植物组织或细胞是均一的，未分化的。实际上并非如此，绝大多数植物组织中的细胞（包括愈伤组织）往往不是均一的、未分化的，无论在细胞的大小、形状、细胞质的含量、液泡化的状况、细胞壁的特征，一般呈现出显著的区别。与分生组织或胚胎组织细胞不同，在组织培养中的细胞尤其是愈伤组织的细胞，其显著特征不仅细胞大，高度液泡化、形状不同、而且细胞质只有

一薄层等，表明上述细胞的确已经是分化的，不过可能是没有结构的。但是，在愈伤组织里有些也具有由分生活动的细胞所构成的分生组织区（或层）。所以出现“未分化”的这一模糊概念，其部分原因可能是指培养的组织尚无器官分化的缘故。然而事实上愈伤组织内已存在不同程度的细胞和组织分化。

为了方便起见，有几个名词简单介绍如下：

“悬浮培养”一词是指在液体培养基中生长的条件下，能够保持良好分散性的细胞和小的细胞聚集体的培养。一般在这种培养中组织化水平较低。

“细胞培养”这个词，是指利用单个细胞（至少在开始培养时期，与其它细胞不存在物理上接触）进行液体或固体培养诱导其增殖及分化的各种试验。其研究目的是为了得到单细胞无性繁殖系。

“分生组织培养”（或“生长锥培养”）一词是指在人工培养基上培养茎端分生组织细胞。首先要明确分生组织的概念，真正的分生组织，例如茎尖分生组织的部位仅仅限于顶端圆锥区，其长度不超过0.1毫米。许多试验表明，通过组织培养技术进行植物的快速繁殖试验时往往并没有利用这么小的外植体，而应当利用较大的茎尖组织（即包括1—2个叶原基）。另外这样小的外植体的取得是相当困难的，不仅生长迟缓，成活率也极低。但是需要指出的，如果要想得到无病原体植株，则必需利用分生组织或者非常小的茎尖。假如使用较大茎尖很难除掉已经感染了母体植物的病原体。因此应当根据目的恰当的选择试验材料。

“外植体”（Explant）这个词是指能够发生一个培养无性系的器官或组织的切段移入新的培养基时，这种切段即为

“外植体”。例如，将北五味子的叶片或茎段在无菌条件下培养时，这样离体的叶片或茎段即为“外植体”。

“器官形成”(Organogenesis)这一术语一般是指组织培养物或悬浮培养物中芽、根、花等器官的分化与形成。或者在先形成的小根的基部迅速增殖的愈伤组织中形成芽；或者在不同部位分别形成芽和根之后，然后形成维管组织而将二者连成为一个轴，结果形成小植株。如果在培养过程中小植株的发生途径与正常的受精卵发育方式极为近似时，可采用“胚胎形成”(embryogenesis)这个术语。当在培养中进行这种受精卵的并不是正常的合子，而是体细胞或花药培养中是小孢子这样的单倍体细胞，其所形成的胚胎结构而做“胚状体”(embryoid)或称“不定胚”(adventitious embryo)。不过在正常的胚胎发育的各个时期所惯用的术语如“原胚”、“球形胚”、“心形胚”、“鱼雷形胚”等，一般也可用于组织培养中的类似情况。

“无性繁殖系”(Clone)这一术语，是指使用母体培养物反复进行继代培养时，通过同种外植体而获得越来越多的无性繁殖后代而言。如根无性系，组织无性系，悬浮培养物无性系等。但在这样的无性系的组织培养中，有时其局部的组织无论在结构，生长速度以及颜色方面都表现出明显的区别，如果继续进行选择培养，则从同一无性系可分离形成二个或多个不同的系列(Line)，上述系列即称为“无性系的变异体(Clonal Variant)。

“突变体”(mutant)一词，经过确证已发生遗传变异或新的培养物至少是通过应用一种有效的诱变处理而发生变异的情况下，即可称为“突变体”。为了与上述无性系相区别，由单细胞形成的无性系则称为“单细胞无性系”。如

果这种单细胞无性系是从同一组织分离出并呈现彼此不同时，叫做“单细胞变异体”。

“继代培养”一词，这里要明确“第一代培养”，是指由最初的外植体上切下的新增殖的组织，培养一代时间而称之为“第一代培养”。连续多代的培养，即称“继代培养”。而上述连续多代的培养又可称为“建成培养”或永久培养”有时“继代培养”又叫做“连续培养”，不过在习惯上“连续培养”一词多用于不断加入新的培养基，并连续收集培养物以保持平衡而进行长时期的不转移的悬浮培养。

二、植物细胞和组织培养的意义

概括起来，可分为理论和实践两个方面：

1. 理论方面 为了要深刻理解植物组织培养的目的和意义，则需要了解细胞学说的两个主要方面，其一，细胞是生物有机体的基本结构单位；其二，植物细胞是在生理上，发育上具有潜在全能性（totipotent）的功能单位。

在理论研究上，这一培养技术具有在自然条件下不能达到的无菌、离体，以及能够严格控制环境因素等优点，这种技术既能用于研究植物的各种细胞、组织和器官所需要的条件以及生理生化上的特点；又可用来研究在细胞水平上进行诱变，筛选等遗传操作；还可用于探讨寄主和寄生物之间各自的作用以及其相互关系等问题。如果一旦成功地建立了一个良好的系统，则能获得在恒定条件下进行试验而排除季节以及气候因素变化的干扰，为取得理想的成果创造了优越的条件。

2. 在实践应用上，通过近些年来国内外的许多试验表明，这种技术将逐渐成为植物育种、快速繁殖、某些药物及次生产物的工业化生产以及获得无病毒（包括其它病源）植

物的有效手段之一。可以预计，这一技术将在实现“四化”和不断提高人民生活方面发挥更大的作用。

三、植物组织和细胞培养的发展

几十年来，植物组织和细胞培养技术所以能够这样迅速发展，其理论基础是在著名的细胞学说的推动下发生和发展起来的。早在本世纪初叶，德国著名的植物学家Haberlandt依据细胞理论，首次提出了高等植物的器官和组织可以不断分割，直至单个细胞的观点。他试图证实这一论点，培养了高等植物的离体细胞，但在培养过程中尚未观察到细胞分裂。其后许多人进行了多年的试验，由于技术上的原因进展甚微。

但是，在胚胎培养和器官培养的领域里却取得了一些成果。在二十世纪初叶至三十年代期间，最先取得成果的是Hanning 他第一个在无机盐溶液及有机营养成分的培养基上培养了萝卜和辣根菜的胚取得了成功，观察到离体胚均能正常发育，同时发现有促进提早萌发成苗的事实。Laibach (1925) 以亚麻为试材，利用培养亚麻种间杂交时形成的杂种幼胚获得成功。稍晚一些时候，我国植物生理学创始人之一李继侗在本世纪三十年代即进行过银杏离体胚胎的培养，发现3毫米以上大小的胚能够正常生长，同时还观察到银杏胚乳提取物能有效地促进离体胚的生长，后者对于后人利用植物胚乳汁、幼小种子以及果实的提取物促进培养组织的生长具有重要的意义。Kotte 和Robbins (1922) 分别就培养离体根尖获得某些成功进行了报道。后来直到1934年，White 用番茄离体根成功的进行了培养试验，并建立了第一个活跃生长的无性繁殖系。还是这位作者用已感染烟草花叶病毒的番茄植株离体根进行了培养试验，发现根尖的不同部位含病