



国家自然科学基金委员会

植物组织培养及其应用丛书

第一分册

植物组织培养实用技术

曹汝义 曹汝义 编著

高等教育出版社

内 容 提 要

本书是星火计划丛书《植物组织培养及其应用丛书》的第一分册,是一本总结性质的书。全书汇集了国内外近几十年来植物组织培养应用技术发展的理论原理和具体操作技术及其最新成就。书中深入浅出地叙述了植物组织培养的基础知识、简易实验室和生产设备、培养基的配制、培养材料的选择、初代培养和继代培养、试管苗的生根与扩繁等扩大繁殖、试管苗的脱毒技术、试管苗的移栽和试管苗工厂化生产等问题。其中又具体介绍了200多种植物的组织培养技术。

本书系统性强,说理透彻,培养操作技术交待得明确具体,是指导开展植物组织培养生产实践应用的一本好书,有助于我国试管苗工厂事业的发展。本书适合从事植物组织培养研究人员和生产人员应用,也适合作为职业教育的教材。

《植物组织培养及其应用丛书》书目

植物组织培养实用技术	袁文达、曹敦义 编著
康乃馨茎尖培养工厂化生产	张丕方 编著
柑桔茎尖嫩芽嫁接脱毒与无病毒苗繁育	万蜀刚 编著
无病毒良种草莓苗的培养及栽培管理	覃兰英、徐光贵 编著
香蕉栽培及试管苗工厂化生产技术	熊兆宽、伍灿林、许绪思 编著
芦荟组织培养及育种中的应用	周维燕 编著
葡萄组织培养及应用	曹敦义、齐与枢 编著
马铃薯茎尖脱毒与微型薯生产	王炳君、刘宗奥 编著

植物组织培养及其应用丛书

第一分册

植物组织培养实用技术

袁文达 曹敦义 编著

*

高等教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

北京二二〇七工厂印刷

*

开本787×1092 1/32 印张6.25 字数130 000

1989年10月第1版 1989年10月第1次印刷

印数0001—1130

ISBN7-04-002221-4/Q·133

定价1.70元



《植物组织培养及其应用丛书》序

现代生物技术发展极其迅速，真可谓“一日千里”，它在广大农村中大有用武之地。一棵优良果树一年之内，用试管快速繁殖法可繁殖几万株以上的苗木。柑桔、香蕉、葡萄、草莓、黑穗醋栗、荔枝、龙眼、猕猴桃、枇杷等现在都已经可以用这种方法繁殖。

花卉中的君子兰、香石竹、大花萱草、菊花、兰花等名贵种类，在试管中用组织培养繁殖，无需种子，后代不会变劣，速度极快，收到了显著的经济效益。

芦笋雄株产量高，雌株产量低。用试管快速繁殖法，可以只繁殖雄株，使单位面积产量大大提高。

甘蔗用试管快速繁殖法，节约了大批种蔗，且使良种快速得到推广。

马铃薯、大蒜、柑桔等许多长期无性繁殖的作物，由于感染并积累了病毒，产量降低，品质变劣。如取上部(0.2毫米左右)微小的茎尖进行试管培养，可能脱去病毒，获得无病毒的种苗。这一方法，马铃薯可增产50%，大蒜可增产一倍以上。

荔枝和龙眼中，名贵的“焦核种”，没有种子，繁殖困难，用试管快速繁殖法便大大加速了繁殖推广的速度。

以上是现代生物技术应用於农业生产的一些例证。实践已证明：用试管培养法繁殖的许多作物，不仅速度快，种质纯，而且还可以提高产量，改进品质，脱除病毒。

世界上至今已有上千种植物能够用试管繁殖法获得完整的植株。我国培养成功的已有一百多种植物。为了使这种新技术在我国广大农村推广应用，我们组织了在这方面有经验的专家编写了本丛书。不仅介绍一般的试管培养技术、脱毒技术和种苗工厂化生产程序，而且还将分别详细介绍葡萄、柑桔、草莓、马铃薯、香蕉、芦笋等作物的试管苗培养技术及工厂化生产程序。

我们谨以《植物组织培养及其应用丛书》献给农业、林业、果树、蔬菜、园林、花卉等许多领域的科技人员、专业户和个体户，相信这一现代生物技术一定能为提高作物产量，改进品质，绿化荒山，美化环境，增加收益，出口创汇等多方面作出重要的贡献。

陈正华

1988年4月

目 录

第一章 组织培养的基础知识	1
第一节 植物的细胞	1
第二节 组织培养及其应用价值	6
第三节 组织培养所需营养与环境条件	11
第四节 形态发生与再生植株	19
第二章 简易实验室和生产设备	24
第一节 简易实验室和小型工厂的设计	24
第二节 简易实验室的设置	26
第三节 常用仪器设备	31
第四节 必要的器皿	34
第三章 培养基的配制	38
第一节 培养基种类	38
第二节 培养基的配制方法	47
第三节 浓度的概念及浓度的换算	53
第四章 培养材料	57
第一节 培养材料种类的选择	57
第二节 培养材料预先的栽培管理	84
第三节 接种前的准备	85
第四节 材料的灭菌	87
第五节 材料的接种	90
第五章 材料的初次培养	93
第一节 初次培养的建立	93
第二节 污染的防止	94
第三节 防止外植体的褐变	96
第四节 培养反应的观察与统计	98
第六章 试管苗的增殖与继代培养	101

第一节	加快试管苗的繁殖速度	101
第二节	保持试管苗的继代培养	109
第七章	试管苗的生根、扦插和嫁接	113
第一节	试管内的生根	113
第二节	试管外的生根与扦插	118
第三节	试管内嫁接	120
第四节	试管外嫁接	125
第八章	试管苗的脱毒程序与技术	129
第一节	试管培养的脱毒作用	129
第二节	脱毒的方法	131
第三节	脱毒苗的鉴定	139
第四节	脱毒苗的防病毒感染	143
第五节	脱毒苗的应用效果	145
第九章	试管苗的移栽	146
第一节	试管苗移栽后易死亡的原因	146
第二节	试管苗的移栽方法	151
第三节	影响移栽成活率的因素	160
第十章	试管苗工厂化生产及其成本与效益	164
第一节	试管苗工厂化生产的工艺流程	165
第二节	试管苗生产的成本	173
第三节	降低成本提高经济效益的措施	180
第四节	试管生产的经营管理	190

第一章 组织培养的基础知识

第一节 植物的细胞

一、细胞的结构

细胞是生物体结构和生命活动的基本单位。所有的植物，无论是高等植物或低等植物，都是由细胞构成的，它们的生命活动也是以细胞为基础的。

植物细胞是由细胞壁和原生质体两部分组成，原生质体又分细胞膜、细胞质和细胞核三部分（图1-1）。细胞壁是由细胞质分泌的纤维素和果胶质等物质构成的，对植物细胞和植物体起保护和支架作用。细胞膜是细胞质外围的一层薄膜，简称质膜。细胞质是在细胞膜内环绕着细胞核的原生质，细胞质中包含着线粒体、质体、核糖体、内质网等各种细胞器和液泡等，线粒体含有多种氧化酶，可传递和贮存所产生的能量，是细胞氧化作用和呼吸作用的中心。质体中重要的是叶绿体，其主要功能是光合作用。核糖体在细胞质中数量很多，是合成蛋白质的主要场所。内质网主要是转运蛋白质合成的原料和最终合成的产物的通道。细胞核由核膜、核液、核仁和染色质四部分组成，它是遗传物质集聚的主要场所，对细胞的发育和性状的遗传起着主导的作用。

二、细胞的繁殖

植物的生长，主要是植物体内细胞的繁殖、增大和分化



图 1-1 植物细胞膜式图

1.细胞壁；2.胞间层；3.细胞膜；4.溶酶体；5.核糖体；6.内质网；7.叶绿体；8.液泡；9.高尔基体；10.线粒体；11.细胞核；12.核仁；13.染色质；14.核液；15.核膜；16.胞间连丝

的结果。细胞的繁殖是以分裂方式进行的。生命的延续，亲代和子代遗传物质的传递，都有赖于细胞分裂。细胞分裂是指细胞通过分裂增生子细胞的过程，它是植物进行繁殖和遗传的基础。细胞的分裂方式有有丝分裂、无丝分裂和减数分裂等。

有丝分裂又称间接分裂，是高等植物细胞分裂的主要方式，是生长的基础（图1-2）。它包括两个紧密相连的过程，先是细胞核分裂，即一个核分裂为两个；随后是细胞质分裂，即一个细胞分裂为两个，各含一个细胞核。在细胞分裂时，染色体同时复制，所产生的两个子细胞都有与亲代相同数目

的染色体。

无丝分裂又称直接分裂，在低等植物中较普遍，是细胞分裂过程中看不到纺锤丝的作用的一种细胞分裂方式。在进

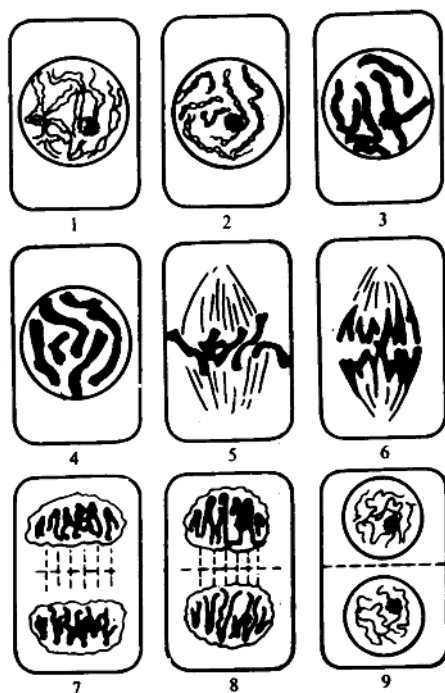


图 1-2 植物体细胞有丝分裂的模式图

1. 极早前期；2. 早前期；3. 中前期；4. 晚前期；5. 中期；
6. 后期；7. 早末期；8. 中末期；9. 晚末期

行分裂时，核仁先分裂，细胞核接着伸长，中部横缢，断裂成两个细胞核，接着细胞质也分裂，在两核间产生新的细胞壁，最后形成两个子细胞。

细胞的减数分裂与植物的有性繁殖有密切关系。它发生在花粉母细胞形成花粉粒和胚囊母细胞形成胚囊的时候。它是性母细胞成熟时，产生配子过程中所发生的一种特殊的有丝分裂。因为它子细胞染色体的数目(n)比母细胞染色体数目减半，故称为减数分裂。经过减数分裂后形成的精细胞和卵细胞的受精形成合子，又恢复体细胞的正常染色体数目($2n$)，从而保证了物种染色体数目的恒定性。

三、细胞的全能性

细胞的全能性是指植物体的每个细胞携带着一套完整的基因组，并具有发育成完整植株的能力。

细胞是生物有机体的基本结构单位，它在生理上、发育上具有潜在的全能性。植物从一个受精卵可发育为具有一定形态、结构和机能的植株。同样，植物的体细胞，也是从合子发育产生的，也具全能性。在一个完整的植株上某部分的体细胞只表现一定的形态，承担一定的功能，这是由于它们受到具体器官或组织所在环境的束缚，但其遗传潜力并没有丧失。一旦脱离原来所在的器官或组织，成为离体状态时，在一定的营养、激素和外界条件的作用下，就可能表现出全能性，而生长发育成完整的植株。此外，花药培养中雄核发育也可以产生单倍染色体的植株，这也是细胞全能性的表现。

几十年来已在上千种植物离体培养获得成功，几乎植物的各个器官进行离体培养，都能再生得到完整的植株。随着植物组织培养的发展，一定会在更多的植物上得到应用。

四、细胞的脱分化与再分化

1. 脱分化（去分化）

在组织培养中，受伤的材料周围细胞又可旺盛地进行分裂，产生愈伤组织，这种原已分化，并具有一定功能的体细胞（或性细胞），丧失了原有的形态和机能，又回复到没有分化的无组织的状态，这就是组织培养中的脱分化（去分化）过程。

不同种类的材料脱分化难易有差别。双子叶植物比单子叶植物及裸子植物容易，特别是与人类生活直接密切相关的禾本科植物脱分化较难。双子叶植物中的树木如挪威槭、葡萄、黑杨等较好培养，草本植物如菊芋、向日葵、万寿菊、等菊科植物，番茄、烟草、马铃薯、甜椒、莴苣等茄科植物，胡萝卜、芹菜等伞形科植物，豌豆、蚕豆、菜豆、草木樨等豆科植物容易脱分化。染色体的倍性也有区别，二倍体的种子植物，无论茎、叶、花序、花器等部位皆易产生脱分化，特别是形成层和薄壁细胞容易诱导愈伤组织。

2. 愈伤组织的特点

脱分化产生愈伤组织的重要因素是激素，特别是细胞分裂素与生长素共同使用时，能强烈地刺激愈伤组织的形成。最常用的生长素是吲哚乙酸（IAA）、萘乙酸（NAA）和2,4-D，浓度范围在0.01—10毫克/升。最常用的细胞分裂素是激动素和6-苄基氨基嘌呤，浓度范围在0.1—10毫克/升。在多数情况下，只单用2,4-D就可以成功地诱导愈伤组织。

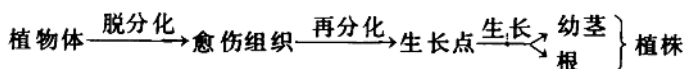
愈伤组织可定期（约一月一次）将它们切成小块，接种到新鲜培养基上继代培养* 以保持它们的活跃生长。不同植

* 继代培养是指在组织培养中当材料生长一段时间后，由于营养的枯竭，水分的散失，代谢产物的积累，必须将其转移到新鲜培养基上生长培养。

物来源的愈伤组织，在质地和物理性状上均有明显的差异。可呈黄、白、绿、红等不同颜色。一些愈伤组织由小而致密的细胞构成坚实的组织；另一些则由最小的细胞构成柔软组织。愈伤组织的细胞随外植体* 的来源和年龄及培养基的成分等而变化，细胞大而不规则。生长旺盛的愈伤组织含有许多类似薄壁组织的细胞和许多小的分生能力强的细胞，这种细胞可有从圆形到细长形等各种形状。愈伤组织在长期培养后出现明显的变化，主要发生在细胞核中，产生染色体数目的变异如产生多倍体和非整倍体或染色体的畸变等，这些变异的频率，往往随培养时间的增加而提高。

3. 再分化

在组织培养中形成的处于脱分化状态的愈伤组织，经继代培养后又可产生分化现象。这是原已分化状态的细胞，经脱分化培养后再次的分化，所以称为再分化。再分化中首先可见到的是细胞壁的变厚，假导管细胞的形成等明显的机能分化。



第二节 组织培养及其应用价值

一、组织培养的概念和特点

1. 组织培养的概念

* 外植体是指组织培养中植物离体培养的材料。

植物组织培养,是指通过无菌操作分离植物体的一部分,即外植体,将其接种到培养基上,在人工控制的条件下(包括营养、激素、温度、光照、湿度等)进行培养,使其产生完整植株的过程。

植物组织培养根据培养对象,可分为器官培养、组织培养、胚胎培养、细胞培养和原生质体培养等。根据培养的过程,将从植物体上分离下来的第一次培养,称为初代培养,以后培养体转移到新的培养基,则都称为继代培养。继代培养还可细分为“第二代培养”、“第三代培养”……。根据培养的方法可分为固体培养和液体培养,即将加琼脂的培养基称为固体培养基,不加琼脂的培养基则称为液体培养基。

2. 组织培养的特点

① 培养材料经济 由于植物细胞有全能性的特点,故悬浮细胞培养即可再生植株,这在研究上有重大的价值。在生产实践中,以茎尖、根、茎、叶、子叶、下胚轴、花芽、花瓣等作材料进行器官培养时,只需几毫米甚至不到一毫米大小的材料。由于取材少,培养效果好,对于新品种的推广和良种复壮更新,都有重大的实践应用意义。如非洲紫罗兰取一枚叶片培养,经三个月就可培养得到5 000株苗。

② 培养条件可以人为控制 植物组织培养中植物材料完全是在人为提供的培养基质及小气候环境条件下进行生长的,摆脱了大自然中四季、昼夜气候变化频繁,以及不时受灾害性气候影响的恶劣因素,利于植物生长,便于稳定地进行周年培养生产。

③ 生长周期短,繁殖率高 植物组织培养可人为控制培养条件,根据不同植物、不同离体部位的不同要求,提供

不同的培养条件。因此生长快，往往1—2个月就可完成一个生长周期。所以，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生产，总的来说还是成本低，利于生产应用，及时提供规格整齐一致的优质无病种苗。

④ 管理方便，利于自动化控制 植物组织培养是在一定场所，人为提供一定的温度、光照、湿度、营养、激素等条件，进行高度集约化，高密度的科学培养生产，可比盆栽、田间栽培繁殖省去了中耕除草、浇水施肥、病虫害防治等繁杂劳动，大大节省人力、物力及土地，可通过仪器仪表进行自动化控制，利于工厂化的大生产。

二、组织培养的发展

植物组织培养是本世纪内发展起来的，从哈伯莱特开始的科学预言，到初步的成功，以至随后大量的试验研究成果，技术的逐步完善，最后形成完整的体系。本世纪50年代前可以说是建立植物组织培养技术的时期。随着化学工业的迅速发展，生长调节物质的不断发现和作用机制的研究，使植物组织培养的技术更为提高。50年代为植物生理调控及实验形态学研究的活跃时期。1948年斯科克和崔激发现，在培养烟草茎段和髓的培养基上加上适当比例的腺嘌呤和生长素，可以控制植物的组织长芽或长根，也就是说当腺嘌呤/生长素的比例高时产生芽，比例低时形成根，从而确定了腺嘌呤/生长素的比例是控制芽和根形成的一个重要条件。1956年米勒等又发现，一种叫激动素的细胞分裂素，它促进芽的效果比腺嘌呤竟高出三万倍，从而由激动素取代了腺嘌呤。于是又建立了激动素/生长素比例的控制器官分化的激素模式。到目前为止，这种激素“控制论”的理论在植物组织培养的

研究应用中仍起着指导作用。

60年代是植物组织培养技术迅速发展的时期。1964年古哈和马哈胥瓦里成功地从毛叶曼陀罗花药培养中，由花粉诱导得到了单倍体植株。这促进了花药和花粉培养及单倍体育种工作的进行，相继在烟草、水稻、小麦、玉米、甜椒、草莓、苹果、橡胶等植物上得到成功。1960年科金等人用真菌的纤维素酶分离原生质体成功，促进了原生质体培养、原生质体融合及体细胞杂交等研究的开展。这些研究将细胞工程中的植物组织培养工作推向一个新的高峰。

70年代植物组织培养技术逐渐由小规模的基础研究，一跃而成为一种大规模批量工厂化生产的新方法，开始在农学、园艺、林业等生产领域得到广泛应用。

三、组织培养的应用价值

1. 种苗的快速繁殖

这是目前植物组织培养应用最重要的一个方面。特别是近几年我国园艺、林业及经济植物的生产发展迅速，优良种苗供应十分紧张，有的从国外引进，但数量极为有限，为此采用组织培养快速繁殖的方法，在短期内大批生产了草莓、香蕉、菠萝、葡萄、无籽西瓜、马铃薯、甘蔗、柑桔、苹果、山楂、猕猴桃、杨树、桉树、月季、非洲菊、菊花、香石竹、兰花等优良品种种苗，保证了生产发展的需要。

组织培养快速繁殖与常规繁殖相比，首先是其生产的种苗质量好，以茎尖等器官作培养材料，可以去除部分或大部病毒，并能在最适合的营养及环境条件下繁殖生长，故种苗的素质有保证，通俗地讲即其先天好，培育的为无菌苗，所以海关免检，而常规繁殖的种苗，由于杂菌多，往往难以通过

检疫关；其次是其繁殖速度快，数量大，由于不受季节的限制，在人工控制的条件下可周年繁殖生产，按理论值计算一株一年皆可繁殖上百万甚至更多的后代，在实践中一株一年繁殖几万株甚至更多株也是办得到的，这就为新品种的繁殖推广创造了有利条件。如唐菖蒲过去要将一个新品种繁殖到1 000株进行推广，需要10年的时间，现在通过组织培养快速繁殖只需3—5年就可以了。

2. 无病毒种苗的培养

对大部分无性繁殖的栽培植物来讲，要解决病毒的危害，需要采用综合的栽培防病措施，但根本的办法是要通过植物组织培养、茎尖培养等脱毒技术，培养出大批无病毒苗提供给生产需要，才能达到丰产、优质、高抗等目的，除此尚无别的更好的办法。为此应建立组织培养无病毒苗的繁殖体系，对于无病毒苗的培养、鉴定、繁殖、保存、利用等皆需要有一套科学的管理要求，将无病毒苗培育的工作纳入原种（原原种）生产的重要程序中。这已在草莓、柑桔、香蕉、马铃薯、大蒜、菊花、香石竹、唐菖蒲等许多栽培植物的常规生产中得到应用，而收到明显的成效。

3. 选择优良品系或品种

从混杂的群体中选择优良的植株，取茎尖等部位培养，短期内可繁殖得到大量整齐一致的无性系，这就是优良品系或品种，是育种上称为最简便最有效的选择育种的方法，结合采用组织培养的方法，使选择育种短期内即可取得成效。

组织培养为育种开辟了广阔的领域。花粉培养单倍体育种，可在短期内培育出纯系的新品种。通常异花授粉的作物要获得纯系需经过7—8个世代的自交，但就树木来说，从种

子发芽到开花结实一般需10年左右的时间，为获得纯系而进行自交，则要上百年的时间，而利用单倍体育种则可大大缩短时间，简化育种程序，提高选择效率，这在橡胶、苹果、柑桔等植物上已可见到一些结果。一般草本植物，杂交育种培育一个新品种要8—10年的时间，而采用单倍体技术只要2—3年就可以了，这在禾谷类植物和石刁柏（芦笋）、甜椒等蔬菜上都有成功的例子。

近年来为使新品种具有更大的价值，不少植物进行远缘杂交，但由于远缘杂种胚与胚乳不亲和，得不到充足的营养，影响杂种胚的发育，甚至产生败育现象，为此将杂种胚早期取出进行组织培养，就可顺利地得到远缘杂种。这在“白兰”、百合和早熟桃品种的培育上都已做出了成绩。

体细胞突变体筛选育种，则称为用微生物方法在细胞水平选育优良品种，更是不受时间和空间的限制。通常是取叶片等营养器官，诱导培养成愈伤组织，再经过液体振荡培养，成为悬浮单细胞，然后以各种抗性因素处理，可筛选得到各种合适的突变体，经培养选择可得到所需抗性类型的植物。目前已筛选出抗盐的水稻、抗病的芹菜等多种类型品种。此外还有体细胞杂交育种、体细胞诱变育种等多种途径。

第三节 组织培养所需营养与环境条件

一、无机营养

1. 大量元素

除碳（C）、氢（H）、氧（O）外，还有氮（N）、磷（P）、钾（K）、钙（Ca）、镁（Mg）和硫（S）等元素。