

经济植物 组织培养 实用技术

江苏科学技术出版社

编委 朱鹿鸣 丁家宜 陆维忠
高山林 秦慧贞

经济植物组织培养实用技术

江苏省植物组织培养研究会编

出版：江苏科学技术出版社

发行：江苏省新华书店

印刷：南京红光印刷厂

开本787×1092毫米 1/32 印张8.875 插页2 字数188,000

1988年2月第1版 1988年2月第1次印刷

印数1—6,100册

ISBN 7-5345-0258-6

S·39 定价：2.20元

责任编辑 杨立生

序 言

植物细胞具有普遍的遗传全能性，这是它比动物细胞优越之处。自1958年Steward，首次用胡萝卜细胞悬浮培养再生植株成功，证实了Haberlandt1902年的预言，植物组织培养得到国际生物学界的高度重视，30年来，在植物类型、植株各种组织、器官、细胞、培养方式（固、液、原生质体、悬浮组织培养）、培养基成分和培养条件（光量和光质、温度高低、pH、渗透压等）都不断取得巨大进展，工作面愈来愈宽广，经济效益愈来愈高。最可贵的是这项研究工作得到生物科学各学科（生化、生理、病理、细胞、遗传、组织、育种）专家的通力协作攻关，加快了研究进展。

植物微繁殖又叫克隆繁殖，自1960年Morel首先报道兰科克隆繁殖成功以来，应用于增殖大量遗传性一致的拷贝，实现了生产高度异质性的果树、观赏植物和农艺上杂种材料植物原型的愿望。现已报道了200种以上植物微繁殖成功，包括观赏、果树、蔬菜、药用植物和林木等。国内甘蔗微繁殖已应用于生产，杂种水稻也正在研究中。此外还广泛应用于无病克隆的生产，尤其是去病毒植株、马铃薯、番茄脱毒系业已推广，在生产上作出了很大贡献。

为了进一步深入发展植物微繁殖的研究与应用，特邀请省内各类植物的科研学者，撰写《经济植物组织培养实用技术》一书。全书内容共有三部分。第一部分介绍了植物组织

培养的基础知识。第二部分介绍了植物组织培养实用技术。第三部分为国外组织培养文献编译，摘要编写了各类作物的最新培养技术。书末还附有培养基组成和配比以及常用专业名词解释，以便读者查考。

奚元龄

1986年9月

目 录

植物组织培养基础知识

植物组织培养的历史与现状.....	(1)
实验室设计和主要仪器设备及常用药品.....	(15)
培养基的组成和配制.....	(23)
组织培养材料的准备和培养方法.....	(34)
植物组织培养中的细胞分化和形态发生.....	(42)
植物激素及其在组织培养中的应用.....	(51)
无性系繁殖.....	(72)
植物的去病毒技术.....	(83)
种质贮存.....	(95)
组织培养在植物育种上的意义和应用.....	(98)

植物组织培养实用技术

人参组织和细胞培养.....	(107)
菊花的组织培养和控花技术.....	(113)
草莓的组织培养.....	(116)
葡萄的组织培养.....	(122)
桃芽离体培养技术.....	(127)
中华猕猴桃的组织培养.....	(131)
枇杷茎尖的组织培养.....	(136)
苹果茎尖的组织培养.....	(139)

石刁柏全雄化生产的组织培养.....	(124)
三倍体西瓜的组织培养.....	(145)
菊花的组织培养.....	(149)
小苍兰的组织培养.....	(154)
杜鹃的组织培养.....	(157)
康乃馨的组织培养.....	(162)
臭水仙的组织培养.....	(166)
花叶芋的组织培养.....	(169)
秋海棠的快速繁殖.....	(172)
名贵月季的快速繁殖.....	(176)
楸树的快速繁殖.....	(181)
桑树的胚珠培养.....	(185)
浙贝母的组织培养.....	(188)
百合的组织培养.....	(191)
几种兰科植物种子的无菌萌发.....	(194)

国外植物组织培养摘译

兰花的组织培养.....	(199)
花叶芋的组织培养.....	(202)
郁金香的组织培养.....	(205)
杜鹃的组织培养.....	(207)
球根秋海棠的组织培养.....	(210)
栀子的组织培养.....	(212)
山茶苗的组织培养.....	(214)
鹤望兰的组织培养.....	(217)
非洲紫罗兰嵌合体的组织培养.....	(219)
半夏的组织培养.....	(221)

几种蔬菜的组织培养.....	(223)
观赏植物的组织培养.....	(225)
林木的组织培养.....	(228)
针叶树的组织培养.....	(231)

附 录

常用培养基的无机、有机成分表.....	(237)
主要激素的pp m和M的互换计算表.....	(259)
常用组织培养术语解释.....	(260)

植物组织培养的历史与现状

植物组织培养是指用无菌方法，使植物体的离体器官、组织和细胞在人为提供的条件下生长和发育的培养技术的总称。根据培养对象的不同，通常又可分为：器官培养（包括根尖、茎尖、芽和花器、未成熟的果实等）；胚胎培养（成熟和未成熟的胚）；愈伤组织培养（各种外植体经生长诱导形成未分化、不定形的细胞团并能继代繁殖）；细胞培养（液体悬浮、分散的小细胞团或单细胞）；原生质体培养（脱壁后仍具有生活力的原生质体）等不同类别。

植物组织培养经80多年的历史，现已成长为比较完善的成熟的研究技术，被生物学的许多分枝学科如植物生理学、生物化学、遗传育种学、病理学等加以应用。并已在许多应用范围中建立了标准工作程序，为农业和工业广泛加以利用提供了可能。可以解决许多用传统方法无法解决的问题，为人类造福。众所周知，生物工程是当代新产业革命的象征之一。其中包括基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程四个主要内容。广义植物组织培养贯串着全部生物工程内容，并为其重要手段。因此，了解和掌握这一技术在理论与实践方面，将越来越显得重要。

一、植物组织培养的历史

象其他一切新事物一样，植物组织培养也有一个孕育、

诞生和成长的过程。我们大致可以把植物组织培养划分为以下四个阶段：

(1) 植物组织培养的假说和探索阶段(1902—1929年) “再生”是生物的基本特征之一，在农艺和园艺上很早就已经采用无性繁殖方法，进行植株的再生和繁殖。那么植物再生的最小极限是多大呢？上世纪有人用实验的方法证明，小于20毫米组织切块就不能再生为植株，而且切块必须具有维管束组织。这一试验不是在无菌条件下完成的，因此不能作为组织培养的开端。不久德国著名植物学家根据当时细胞学的发展，大胆地提出高等植物可以不断的分割繁殖，直至单个细胞的观点，他的这一观点为植物组织培养的诞生奠定了科学的基础。但是，由于当时生长素和维生素尚未发现，缺少必要的生理基础和选用高难度的单子叶植物叶肉细胞的缘故。Haberlandt以及他的合作者，经长时期探索未能成功。植物组织培养在这段时期内，除了少数胚培养有成效外，直到本世纪20年代未能有重大的突破。

(2) 植物组织培养方法与定义的建立阶段(1930—1939年) 由于植物生理学的发展，特别是温特1928年发现了生长素的作用之后，有力地推动了植物组织培养的发展。美国植物生理学家White和法国植物生理学家 Gautheret 在30年代初期分别作出了重要的贡献。White(1934)建立了不断生长的番茄根尖的无性繁殖系，同期 Gautheret 把树木形成层组织小块放入固体培养基上产生了愈伤组织。30年代末期White又发现B族维生素在培养离体根生长中的重要作用(1937)。White用烟草杂种和 Gautheret 用胡萝卜培养的研究再次揭示了植物离体组织在无菌条件下，人为供给营养可以增生为一团未分化并可继代培养的愈伤组织。

与此同时，我国植物生理学家李继侗和罗宗洛、罗士韦等人在植物组织培养研究上，亦做出了很大的贡献。李继侗先生（1933）发现3毫米以上大小的胚可以正常生长，并发现银杏胚乳提取物可以促进银杏离体胚的生长。这一发现对椰子汁等植物组织提取汁液，在植物组织培养上的应用以及植物激素的发现都有启发作用。罗宗洛和罗士韦先生在玉米根尖培养中发现幼桑叶提取物促进玉米离体根的生长。这与当时发现维生素等活性物质是植物组织培养中不可缺少成分的结论是不谋而合的。

综上所述，30年代，是植物组织培养定义和基本方法建立的关键时期。上述科学家在各自研究领域中都做出了较大的贡献。因此可以认为，植物组织培养技术是许多国家科学家共同研究探索而建立起来的。

（3）植物细胞全能性的证实阶段（1940—1959年）。40年代至50年代末，由于植物生理学和实验形态学的发展，促使植物组织培养进入非常活跃的时期。Ovebeek（1941）首次在培养基中附加椰子汁，使曼陀罗心形期幼胚离体培养成功。罗士韦（1946）在菟丝子茎尖培养时观察到花的形成，导致60年代以后用组织培养技术进行花芽诱导和试管受精的研究。美国威斯康辛大学 Skoog教授等（1948）发现腺嘌呤与生长素比例决定器官分化，即腺嘌呤/生长素的比值高时，产生芽，比例低时则形成根。这是最早有关化学物质控制器官分化的模式，对以后的研究，特别是细胞全能性的证实起了指导性的作用。其后Miller（1956）偶然间发现经过高压高温（120℃）处理的鲱鱼精子有促进成芽效应，从而发现6-呋喃氨基嘌呤的化学结构并命名为激动素（KT），其活性要比腺嘌呤高3万倍。把上述化学物质控制器官模式改

为激动素/生长素的比值决定器官分化。Muir (1953) 首次将烟草愈伤组织转移到液体培养中进行振荡培养, 获得单细胞和小细胞团的细胞悬浮液, 并提出“看护培养”预示了单细胞繁殖的可能性。美国康乃尔大学植物生理学教授 Steward (1958) 首次在胡萝卜细胞悬浮培养中成功地诱导出胚状体, 并发育成完整植株。从而使早年由 Haberlandt 提出并经 White 阐明的植物细胞全能性的假设得到了科学的证明。至今已有不同科、属的600多种高等植物组织和细胞培养都可以培养成完整植株。

从现代生物学知识可以这样理解植物细胞的全能性, 即离体的体细胞, 具有母体植株的所有遗传物质, 在适宜的条件下, 能按其母株的表型完整地加以表达。在形态建成上具有再生成完整植株的潜势, 在代谢上具有合成原植物体所含有的代谢产物的能力。这是现代研究和生产上广泛应用的主要理论根据。

(4) 植物组织培养的迅速发展阶段 (1960年以来)

自从植物细胞全能性被证实以来, 植物组织培养进入了一个突飞猛进的发展阶段。其特征主要有以下几方面:

1960年以来植物组织培养理论、实践、技术和方法不断发展完善, 逐步形成了独具特色的专业技术。国际上专门成立了植物组织培养协会, 参加协会人员来自有关植物学的各个学科, 每四年举行一次国际学术讨论会, 研究内容越来越深入、广泛, 其发展速度之快, 在生物学领域中是罕见的。

在实验技术上建立了较完整的实验程序, 并已成为一种精细的实验技术。在各类高校生物学科专业中相应开设了植物组织培养的课程、专题讲座和实验课, 它已经是一种比较普及的知识和技术。就培养基而言, 在怀特和高特里特两种

培养基的基础上，发展成两类培养基即低盐（怀特或如Nitsch等）和高盐（高特里特式，如MS、N₆等），并根据外植体对无机盐、有机物、激素等反应，不断取得改进，使可供培养成功的植物类型和基因型日益增多。

植物组织培养已经被广泛地应用于生物学的许多分枝学科，并已取得了成功。现以植物育种学为例，自印度学者Guha和Maheshwari成功地从毛叶曼陀罗花药培养中由花粉诱导形成单倍体植株以后，各国育种家纷纷开展了单倍体育种的研究，并取得显著的结果。60年代初英国学者Cocking创立了植物细胞酶法去壁和原生质体培养技术以来，现已形成一种专项技术，为体细胞融合和基因工程提供了可能性。近来在植物病理学、植物生理学、园艺学等各个领域应用组织培养技术也取得了显著的成就。

自从Steward1958年第一次证实培养细胞能够再生成植株以来，利用组织培养循环于克隆繁殖，扩展到许多植物种。由于能从同一组织、细胞和原生质体产生克隆变异体，从中发现体细胞的遗传变异性。Skirvin和Janick 1976年首先从园艺植物愈伤组织再生植株中发现变异体，称愈伤组织克隆变异，Shepard等1980年用马铃薯原生质体培养同样获得细胞变异体，称为原生质体克隆变异。Larkin和Seowcroft总结了这种遗传变异性的广泛性和重要性，提出体细胞克隆变异(somaclonal variation)的概念。E. Vans 1984年又增添了配子克隆变异，已被普遍采用。目前对体细胞遗传已观察到20多种植物的不同外植体和培养方法的再生植株，普遍出现体细胞遗传变异体，并经有性和无性繁殖后代性状观察，证明其遗传性和稳定性。鲍唯钊、王月芬等在百合鳞片培养中获得再生植株的叶形、叶长和叶宽的大小、色泽、叶

绿素含量、染色体等均出现变异。Shepard (1980) 进行马铃薯原生质体培养, 在再生植株中获得了抗旱、晚疫病的新品种。该品种保持了亲本马铃薯的优良农艺特性, 已成为美国目前推广品种。关于体细胞克隆变异的来源、性质和机理, 正处在积累资料, 深入研究分析之中, 它的发展必将成为遗传学中的一支新生力量。

二、植物组织培养的应用现状

植物组织培养研究和应用范围十分广泛, 在基础研究上用植物组织和细胞培养法可以进行植物细胞发育生理学、生物化学、细胞遗传学以及分子生物学等方面的研究。这些研究不仅发展和补充了当代生物学基础理论, 而且对植物组织培养理论和技术的日趋完善, 也是十分重要的。

在应用上, 植物组织培养已在无性繁殖、脱病毒、种质保存、有用物质生产等方面做出贡献。胚培养、单倍体培养、突变选择等技术已在育种中广泛应用。近些年来, 在植物组织培养基础上发展起来的植物细胞工程和基因工程等更加引人注目。现将涉及到实际应用的有关方面情况, 简要介绍如下:

1. 无性系繁殖

国内外一致认为无性系繁殖是植物组织培养应用的主流之一, 用植物组织培养进行无性繁殖, 具有用材料少, 速度快, 并不受自然条件的影响等特点。因此, 为了与传统的无性繁殖相区别常用“无性系快速繁殖”或“微型繁殖”加以称呼。其繁殖方式可分为: 短枝扦插和芽增殖, 圆球茎, 器官分化, 胚状体发生四种类型。它们的操作程序、繁殖速度和性状的稳定性以及工作的难易程度等有一定的差别, 其中芽

增殖已在草本和木本植物繁殖上大量应用，并已取得经济效益；原球茎在兰花工厂化生产中亦已广泛应用。胚状体发生近几年已摸索到它产生的条件，其应用也越来越多了。甚至有人想将胚状体做成类似种子的形状结构，即人工种子，以便用于机械化播种。器官分化主要是从外植体直接产生不定芽或根，一般不太主张从愈伤组织进行器官分化形成植株，这是因为其性状有可能发生变化。

2. 植株脱病毒

用无性系繁殖的植物往往带有母株材料患有的病毒病，如葡萄、菊花、草莓、马铃薯等。用化学方法防治和高温处理往往成效不稳定。作为组织培养的无性繁殖材料，最好是去病毒组织。否则有可能大量繁殖出带病毒的群体，给生产造成危害。

用植物组织培养方法，取一定大小的茎尖(分生组织)培养，可从已感染病毒的植株上获得去病毒(准确地说是除去有危害的病毒)植株。White 早在1943年就发现在生长点附近的病毒浓度很低甚至无病毒。一般情况下取茎尖越小脱病毒效果越好，但培养时困难越大。国际上目前已在兰花、马铃薯、菊花、百合、草莓等植物上取得了脱病毒效果。我国脱病毒植株(马铃薯、怀地黄等)已在生产上推广应用。

3. 种质保存

众所周知，农业生产是在现有种质基础上进行的。由于自然灾害和生物之间的竞争，以及人类活动对大自然影响，已有相当数量的植物物种在地球上消失或正在消失。有人估计400年前平均每三年消失一个植物种类，20世纪以来，平均每八个月消失一个。而且这种物种消失正在与日剧增。具有独特遗传性状的生物物种的绝迹是一种不可挽回的损失。

因此许多科学家呼吁保护种质，不少国家已建立了“种质库”。

无性繁殖的植物因无种子可存，其种质不易贮藏。传统的办法是在植物园内长期栽培保存，这种方法除需要耗费大片土地和较多劳力外，种质材料易受病原体及害虫侵袭，而采用组织培养方法，则可以解决上述问题。例如草莓无病毒苗在4~5℃条件贮藏六年而生长很少。同样条件下2m²培养室可保存800多个葡萄品种。而在田间则需用占地1公顷左右。此外，许多研究业已证明可在液态氮（-196℃）中保存愈伤组织胚状体、茎尖和植物芽等组织，经长期贮存后，并不失去再分化成植株的能力。

4. 植物育种

在当代的作物育种上，国内外已普遍地采用植物组织培养方法，大体上有以下四个方面。

（1）胚培养 在植物种间杂交或远缘杂交中，有时虽然受精是正常的，但由于胚的败育，很难得到种子。而采用胚的早期离体培养可以使胚正常发育并成功地培养出杂交后代，可以通过无性系繁殖获得数量较多的性状一致的群体。胚培养已在50多个科属中获得成功。如果在杂交中受精有困难，也可以把未受精的胚珠分离出来，在试管内用花粉受精，此法称“试管受精”，发育成的植株称为“试管植物”。这似乎与人类“体外受精”和“试管婴儿”技术相似。不同之处是“试管植物”是在无菌瓶皿中发育的，无需象动物与人体那样再接到母体上成长。

我国上海市农科院，西北农学院等通过幼胚培养已育成早熟桃品种，华南农学院获得栽培番茄×秘鲁番茄的杂种，江苏省农科院遗传所获得大麦×小麦、山羊草×小麦、野生

棉×栽培棉的杂种株系等。

此外，兰花的种子，因只有胚，而无胚乳等营养物质，在自然界只有与共生菌建立共生关系后才萌发成苗。用其种子进行无菌培养（也可称为胚培养），人为地供给营养可以获得大量植株。这项技术仍然是兰花育种和有性繁殖中行之有效的途径。

（2）单倍体育种 用花药或子房培养，改变其雄、雌性配子的发育方式，由配子体发育转变成孢子体发育，经细胞或营养细胞分裂发育成的植株，因只具有体细胞染色体数的一半，故叫单倍体。单倍体植株往往不能结实，在培养中用秋水仙素处理，可使染色体加倍，成为纯合二倍体植株。这种培养技术在育种的应用称为单倍体育种。单倍体育种具有高速、高效率、基因型一次纯合等优点。

石刁柏（俗称芦笋）是常用蔬菜。最近据报道它有抑制和治疗癌细胞的药用作用，因而得到人们的重视。它是雌雄异株植物，雄株（xy）产量比雌株（yy）高50%左右。法国学者用单倍体育种方法育成杂交的后代100%的均是雄株，大幅度地提高了石刁柏的产量。

（3）培养细胞染色体变化和基因突变 利用植物体细胞培养选择多倍体，国内外已有许多成功的先例，如四倍体水稻、药用植物枸杞、百合等四倍体植株已进入生产性试验鉴定。多倍体一般具有巨型性，即叶、茎、花、果等各部均比二倍体植株大，在生产应用上具有一定的前景。

另外，利用植物细胞培养进行人工诱变筛选具有抗性（如抗盐性、抗低温、抗除草剂、抗病等）特性的育种研究目前已受到普遍的重视，并取得了初步进展。

(4) 体细胞杂交和植物基因工程 自从有人创造了用果胶酶和纤维酶去壁技术以来,体细胞杂交受到了人们广泛的重视。经10多年的努力在体细胞融合技术上有了很大的发展,目前已获得40余个种间、属间、甚至科间的体细胞杂种,已获得种间、属间的杂种体细胞的愈伤组织,有些还进而分化成苗。中国科学院植物生理研究所、遗传研究所、植物研究所、中国农科院及一些高等院校研究室均开展这方面的研究工作,以期用体细胞杂交的方法来克服远缘有性杂交的不亲和性。近10多年来研究证明:除有性杂交亲和的种间原生质体融合能产生杂种细胞再生植株外,有性杂交不亲和的种间、属间也有取得融合杂种,如番茄薯等,这类事例不断出现。远缘融合杂种,往往在细胞分裂过程中,产生某一杂交染色体的部分或全部丢失,导致非整倍体或部分染色体重排的效果,这对遗传育种是非常有用的供试材料。这类问题值得深入研究。

近几年来,应用组织培养技术进行基因工程的研究越来越深入,取得了一定成效,用基因工程的方法,把目的基因切割下来并通过载体(如Ti基粒)使外来基因整合进植物的基因组是完全可能的,成功的例子有豌豆 RuBP 羧化酶小亚基及其转运肽、菜豆球蛋白G₁和玉米醇溶蛋白等。比利时学者M. Van Montagu (1984)成功地将细菌中的抗虫基因转移在烟草细胞中,并诱导成苗,在叶片中加以表达。我国上海、北京等地已成立植物分子生物学区研究室,正在开始这方面的研究。

5. 利用植物组织培养方法生产有用物质

用植物组织培养方法生产有用物质的研究,从培养橡胶愈伤组织开始。60年代初我国植物生理学家罗士韦提出药用植物用组织培养产生对人类治病的有效物质的展望,并进行