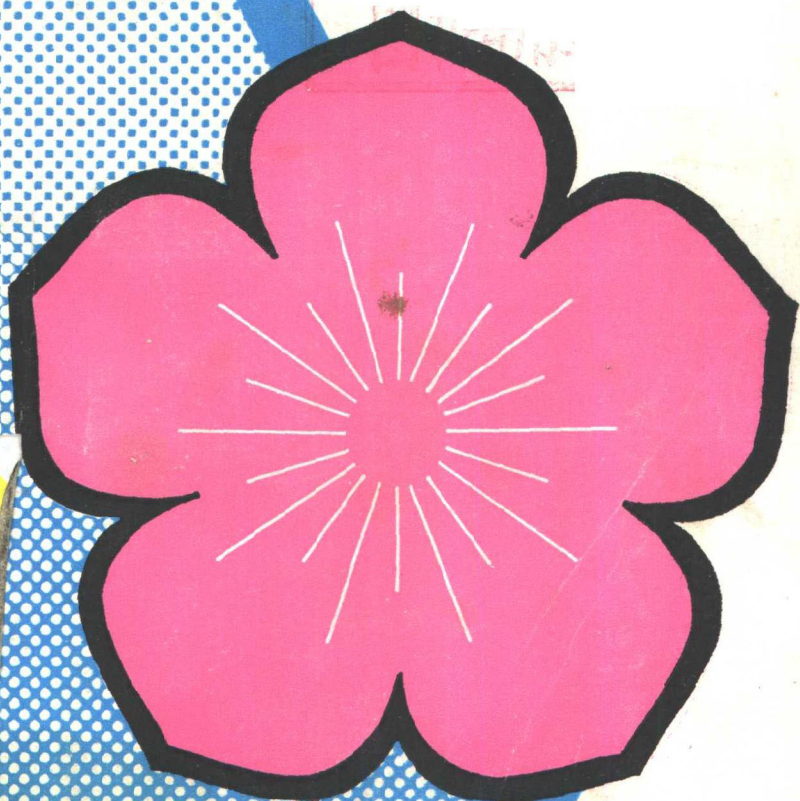


花卉试管繁殖

杨乃博 编著



花卉试管繁殖

杨乃博 编著

上海科学技术出版社

花卉试管繁殖

杨乃博 编著

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路 450 号)

新华书店上海发行所发行 江苏深水印刷厂印刷

开本 787×1092 毫米 1/32 印张 6 字数 127,000

1987 年 2 月第 1 版 1987 年 2 月第 1 次印刷

印数: 1—3,500

统一书号: 16119·929 定价: 1.15 元

前 言

花卉的试管繁殖，是一种用组织培养方法快速无性繁殖花卉的新技术。利用花卉的一托、一叶、一茎、一芽、一花、一果、一球体等细微之物，可以培育出大量完整植株。例如，菊花、秋海棠、月季花、杜鹃花、萱草、唐菖蒲、兰花等，采用这一技术，一年内通过一托、一叶、一芽的培养，可取得 $10^3 \sim 10^6$ 个体。该技术还可用来挽救因罹病毒病而退化的优良品种，使之复壮，恢复种性；挽救濒临绝种的自然花卉资源；快速繁殖 F_1 代，便于育种、制种；繁殖三倍体及多倍体花卉等等。

试管繁殖也可用于林木、果树、蔬菜、经济作物、药用植物以及粮食作物与牧草的快速无性繁殖，用来加速育种、引种与良种的推广进程，简化制种程序，以及获得抗病突变体等。因此，该技术颇受多方重视，国际上至少有一百家公司从事这方面的研究。国内约有一千个科研与生产单位，从事这一技术的开发与应用。

随着乡镇城市工业的迅速发展，人民物质生活与文化水平的不断提高，园林花卉愈来愈成为人民生活的一种需要。城镇环境的绿化，公园、住宅区的美化，工厂厂区空气的净化，家庭室内外的装饰点缀，庆功授奖、喜庆节日的会场布置，均需使用大量的观叶、观花、观果植物；访亲问友，祝贺新婚时，鲜

花常作为吉祥、幸福的象征，把它当作礼物馈赠，也需要大量切花供应。以上所述，这都是近年来发展花卉生产受到普遍重视的原因。

随着人民生活水平的提高，观赏水平也逐渐提高，对于花卉的形姿、色泽、大小、香味、美观奇突等质量上的要求也就更加高。许多研究单位为适应这一需要，进行了花卉自然资源的开发，积极引进国外优良品种，广泛开展花卉育种，并把试管繁殖法作为崭新的有力工具，加以引进与应用。

然而，国内还没有一本系统地介绍花卉试管繁殖的书籍可供参考，因此，着手编写这本小册子，希望能对促进我国花卉生产的发展有些用处。

在编写这本书的过程中，参阅了近年来国内外新颖资料，编入了近一百种花卉的试管繁殖方法，同时也编入了自己多年研究的心得与成果。本书既是一本通俗易懂的入门书，也是一本反映了新技术的书籍，可供从事植物组织培养工作者、大专院校师生、中学师生与花卉种植者等参考。

限于水平，错误之处在所难免，欢迎批评指正，以利再版时改进。

编 者

1985年5月

目 录

第一章 概 论	(1)
一、什么叫做花卉的试管繁殖.....	(1)
二、用试管繁殖法繁殖的商品花卉种类.....	(1)
三、试管繁殖在花卉生产上的用途.....	(2)
四、试管繁殖的途径与类型.....	(3)
五、试管繁殖的程序.....	(5)
六、试管繁殖年增殖率的计算法.....	(14)
七、试管苗的遗传稳定性与变异性.....	(14)
八、试管苗遗传稳定性的保持方法.....	(18)
九、试管繁殖的局限性.....	(18)
第二章 实验室的基本设备与操作	(20)
一、实验室设备与用具.....	(20)
二、洗涤、消毒以及无菌操作.....	(28)
三、培养基及其配制.....	(35)
四、培养条件.....	(59)
第三章 兰花的试管繁殖	(62)
一、种子发芽.....	(62)
二、兰花的茎尖培养.....	(65)
三、几种兰花属的茎尖培养及其试管繁殖.....	(71)

(一) 卡德兰	(71)
(二) 蝶兰属	(73)
(三) 建兰属	(74)
(四) 拖鞋兰	(76)
(五) 万带兰	(76)
(六) <i>Ascofinetia</i>	(78)
(七) <i>Epidndrum radicanra</i>	(80)
(八) 齿瓣兰与飞燕兰	(80)
(九) <i>Epipronitis vit</i> (建兰属之一)	(81)
(十) 虾脊兰	(82)
(十一) 白蝶花	(83)
(十二) 石斛兰	(85)

四、兰花的花梗腋芽、叶、根培养..... (87)

(一) 蝶兰的花梗腋芽再生植株	(87)
(二) 其他兰花的花梗腋芽培养	(88)
(三) 卡德兰的叶组织培养	(90)
(四) 蝶兰叶组织再生个体	(91)
(五) 蝶兰的根组织培养	(92)

第四章 鳞茎、球根类的试管繁殖..... (93)

一、百合类..... (93)

(一) 胚培养	(93)
(二) 百合生长点培养	(96)
(三) 百合的器官发生与试管繁殖	(98)

二、其他百合科植物的器官发生与试管繁殖..... (101)

(一) 风信子	(101)
(二) 好望角虎眼万年青	(102)
(三) 硕葱	(104)
(四) 郁金香	(104)

(五) 萱草	(105)
三、鸢尾科	(107)
(一) 唐菖蒲的试管繁殖	(107)
(二) 鸢尾	(110)
(三) 苍兰	(111)
四、石蒜科	(112)
(一) 水仙	(112)
(二) 朱顶兰	(114)
(三) 垂笑君子兰	(115)
(四) 紫条六出花	(115)
五、天南星科	(116)
(一) 铁树	(116)
(二) 哥伦比亚安祖花	(116)
(三) 其他天南星科植物	(118)
六、仙客来	(118)
第五章 草花类	(119)
一、菊花	(119)
(一) 茎尖培养去除病毒	(119)
(二) 菊花的叶、茎、花托、花瓣培养与植株再生	(124)
二、其他菊科花卉	(128)
(一) 大丽菊	(128)
(二) 非洲菊	(131)
(三) 荷兰菊	(132)
(四) <i>Aster ergcoides</i>	(133)
(五) <i>Stokosia laevis</i> Greene	(134)
(六) <i>Gymnaster savatierii</i>	(135)
(七) 除虫菊	(136)

三、麝香石竹的无病毒苗培养及其试管繁殖·····	(136)
(一) 茎尖培养去除病毒·····	(136)
(二) 康乃馨的器官发生与试管繁殖·····	(140)
(三) 康乃馨茎尖的固体培养及其增殖·····	(142)
四、其他石竹科花卉的试管繁殖·····	(143)
(一) 霞草·····	(143)
(二) 曼金氏丝石竹·····	(144)
(三) 中国石竹的试管繁殖·····	(144)
五、天竺葵·····	(145)
六、蝶瓣天竺葵·····	(146)
七、秋海棠属·····	(148)
八、矮牵牛·····	(149)
九、非洲紫罗兰·····	(151)
十、龙胆·····	(152)
十一、大岩桐和好望角苣苔·····	(153)
第六章 木本花卉·····	(154)
一、月季花等蔷薇科观赏植物的试管繁殖·····	(154)
(一) 月季花·····	(154)
(二) 玫瑰·····	(156)
(三) 毛樱桃等 12 种蔷薇科植物的茎尖培养·····	(157)
二、杜鹃花·····	(158)
三、牡丹·····	(166)
四、山麻杆·····	(168)
五、泡桐·····	(169)
六、叶子花·····	(169)
七、瑞香·····	(170)
八、其他·····	(171)

第一章 概 论

一、什么叫做花卉的试管繁殖

园林花卉是指具有观赏价值的观花、观叶、观果植物。它有木本,也有草本。既可栽植于园林中供大家观赏,也可以盆景、盆花、切花等形式供室内外装缀。通常,园林花卉可通过种子、扦插、嫁接、分根分株等方式繁殖。近年来,由于科学的发展,使得某些园林花卉可用组织培养方法进行无性快速繁殖,即园林花卉的试管繁殖。所繁殖的苗称试管苗,以此与种子苗、扦插苗相区别。

二、用试管繁殖法繁殖的商品花卉种类

据不完全统计,已报道的园林花卉试管苗约有 67 个科, 370 余个种。其中,兰科约占 150 个种,由种子无菌萌发的苗占大部分,由茎顶生长点培养继而行试管繁殖的种只占 20 余个种。商业上已用试管繁殖方式增殖的花卉有建兰(惠兰)、卡德来兰、蝶兰、石斛兰、*miltonia*、香石竹、月季、西洋杜鹃、铁线莲、菊花、非洲菊、凤仙花、百枝莲、球根海棠、蟆叶秋

海棠、垂叶榕、印度橡树、天竺葵、百合、风信子、水仙、唐菖蒲、鸢尾、萱草、安祖花、喜芋林、海芋、绿罗、艳波罗、紫条六出花、苔藓类等 30 余种。应用的种与品种正在逐年增多。

三、试管繁殖在花卉生产上的用途

1. 提高增殖率。例如，兰花一年分株只增加 1~2 倍，试管繁殖一年可增殖 10^6 个。

2. 保存和繁殖去病原菌(病毒、线虫、细菌、真菌)达到复壮良种，提高花卉的品质与产量(例如，菊花、香石竹)。

3. 加速引种与良种的推广进程，使一个新的栽培种能在短期内适应生产需要(例如，萱草与观果植物)。

4. 打破优良品种的垄断状况。

5. 在自然条件下可繁殖无法用种子繁殖与维持的三倍体、多倍体与杂种 F_1 代。如杂种羽衣甘蓝、多倍体萱草等。

6. 使原来不能进行无性繁殖的植物，成为能进行无性繁殖的植物。例如，棕榈，其花芽在细胞激动素的作用下，变成营养芽进行繁殖。

7. 把突变枝条或花朵作为种保存下来。例如，1975 年，重松通过培养菊花的突变花朵的花托与花瓣，取得菊花新品种。

8. 可意外地在培养中取得突变体、多倍体与具有观赏价值的株型。如蕨类植物 (Murashige, 1978)。

9. 通过胚培养，取得在自然条件下易败育的杂种胚的愈伤组织与胚，然后进行大量繁殖。例如远缘杂交的百合。

10. 有利于地区间、国际间的种质交流。

由于试管繁殖有如此众多的好处，国际上至少有 100 家

公司从事这方面的研究；国内从事植物、遗传育种、园艺、农艺、林业的科研工作者与生产者，也先后积极开展这方面的工作，并相继取得不少可喜的进展。

四、试管繁殖的途径与类型

1. 一步成苗法

外植体在同一培养基上经部分脱分化后，再分化出不定芽或不定胚。例如，金鱼草茎段在 $MS + BA_2$ 培养基上，分化出不定芽，偶尔也能见到不定胚的分化；枸杞叶片在 $MS + NAA_1$ 培养基上，分化出不定芽。

2. 二步成苗法

外植体在脱分化培养基上形成愈伤组织，然后把继代增殖后的愈伤组织移植于分化培养基上，分化出不定芽或不定胚。例如，枸杞叶片在 $MS + 2,4-D_1 + BA_{0.1}$ 培养基上，脱分化成愈伤组织。继代增殖后的愈伤组织，在 $MS + NAA_1$ 上能分化出不定芽；又如矮牵牛叶片在 $MS + 2,4-D_{1-2}$ 的培养基上，能完全脱分化成愈伤组织，经较长时期的培养或移至低浓度的 2,4-D 培养基，或无生长素的培养基上便会产生不定胚与子叶苗。

3. 原球茎(体)型

当兰花茎尖或生长点，长期培养在 $MS + NAA_1 + KT_{0.1}$ 的固体培养基上，便会形成原球茎。原球茎经切割后，再次培养在同样培养基上又会形成许多原球茎。

4. 根茎型

把春兰 (*Cym. virescen*) 茎尖培养在 $MS + NAA_1 +$

KT_{0.1}的培养基中,经25℃恒温培养,日照16小时,约有60%茎尖培养物形成根茎。

5. 侧芽增殖型

在细胞激动素的作用下,解除了顶芽对侧芽生长的抑制,从而产生大量侧芽增殖。例如,麝香石竹茎尖,在MS+NAA_{0.2}+BA₂或MS+BA₂的培养基上,侧芽便会大量增殖。同时,芽的基部在接触培养基处产生少量愈伤组织而形成不定芽。

6. 鳞茎型

麝香百合的鳞片或幼叶,在MS+NAA₁培养基上能直接分化出鳞茎。随着培养时间的延长,在鳞片周围产生的愈伤组织置于MS+NAA₁的培养基上继代培养时,会不断地产生愈伤组织并分化出鳞茎。

7. 从团块与结节组织中不断分化出芽

波罗幼叶在MS+NAA_{0.2}+BA₂的培养基上,经脱分化产生团块组织或结节状组织,并不断地在该组织中分化出芽,将这种具有分化芽能力的团块组织,移植于同样培养基上,便继续产生团块组织与不定芽。当将它们移植于MS无生长素的培养基中,则团块组织与不定芽皆转变成有根的苗。

8. 分生组织的切割增殖

唐菖蒲的分生组织经切割成4~5块后,培养于MS+NAA₁+BA_{0.2}的培养基上,数周后,便成为4~5个芽。

9. 微型扦插

将留兰香茎的切段扦插于MS+BA₂的培养基上,数周后从叶腋内伸出侧芽,两旁侧芽经一个月后,总共可形成10个侧芽,经切段后再培养,又可继续增殖。

10. 芽培养

倒挂金钟的芽,经灭菌后,培养在不含生长素的White培养基中二周后生根,一个月后成苗。并可用微型扦插法继代增殖。

五、试管繁殖的程序

(一) 起始阶段

1. 病毒的去除与鉴定

(1) 去病毒方法 至今已知的去病毒方法有如下几种:
①通过0.2~1mm大小的生长点的培养,可使兰花、菊花、麝香百合等许多植物去除病毒;②使用热、X射线、紫外线等处理植物母株,使其病毒失活,然而进行茎尖培养,可取得无病毒植株。例如菊花、康乃馨在37~40℃下培养2~8个月后,便可去除病毒;③浅野等指出,麝香百合通过花丝培养得到的鳞茎是去病毒的;④ABO, EL-NiL等(1970)指出,从天竺葵花药培养得到的植株是无病毒病症状的;⑤通过未成熟胚培养去除病毒;⑥通过愈伤组织的多次继代培养去除病毒。例如天竺葵、唐菖蒲、烟草;⑦用2,4-D,硫尿嘧啶、8-氮鸟嘌呤、碱性孔雀绿等抗核酸代谢物进行化学治疗,以达到去除病毒的作用,但此法不成熟。

(2) 鉴定有无病毒 所得植株是否去除病毒,尚须将小植物或愈伤组织的匀浆接种到指示植物上,或将小植物的茎尖嫁接到指示植物上,观察其是否有病症。例如,菊花的花叶病毒指示植物是烟草,菊花矮化病毒的指示植物是菊花,如果

无病症则表明已去除病毒,可以大量繁殖。此外,尚可用免疫法、及电子显微镜进行检查。

2. 培养方法

(1) 材料灭菌 以茎为例,从健康植株上剪取茎段,去除不需要的叶片或根,将茎段切成2~3cm长,用肥皂水或0.1%吐温40水溶液洗涤材料。然后在自来水下冲洗,将洗净的茎段浸没于7%漂白粉清液中,灭菌15~30分钟,或是浸没在稀释10倍的安替福民(5.56%次氯酸钠溶液)中灭菌5~20分钟,适当搅动,使材料与灭菌剂充分接触,再经在超净工作台上用无菌水洗3次。切除茎段二端的漂白处,剩下中间的茎段可作试验材料。如果是生长点培养,所取材料是茎端或腋芽,则需在解剖镜下,用解剖刀或解剖针剥取生长点,最后接种在培养基上。

一些难于灭菌的材料,例如某些植物的种子、球茎、树枝,可先用0.1%氯化汞(HgCl_2)溶液灭菌3~10分钟后,用自来水冲洗数小时,然后剥去种皮或用解剖刀削去球茎表面层,再用漂白粉清液灭菌法消毒一次,即可。

(2) 外植体的选择 有些花卉植物,它们的各部位组织的植物细胞全能性较易表达。例如菊花的叶、茎、生长点、花萼、花瓣、花托均能分化出芽,因此比较容易取得成功。但为了取得无病毒植株,还应选择生长点或花托作为外植体较妥。另一些植物并非所有的部位均能分化出芽,因此,外植体选择得是否适当,决定着试验的成败。通常最广泛而有效的外植体是茎尖、生长点、形成层与节间分生组织。此外,还有叶、鳞茎、根茎、茎段、花、子房、珠心、子叶、下胚轴等。亲族关系对于外植体的选择有一定的参考价值。对于木本植物,选择幼

嫩的小苗或从根部萌发出的枝条较之成年与老年的枝条分化芽的能力强。由于鳞茎类植物易显示出季节反应,因此,需以冷处理打破其休眠,促使其分化,通常它们的花茎和花器具有很大的分化潜力。外植体的大小直接影响着成活率、生长速度以及繁殖率,通常大一些的外植体易于产生器官发生,但也增加了再生植株在遗传上表现不一致的机会,因为植物中常存在着 $2n$ 、 $4n$ 、 $8n$ 的细胞。

(3) 培养基 目前有许多培养基如 MS, White (1943), Heller (1953), Nitsch (1969), Vacine 和 Went (1949), White (1963), Morel (1956), 农事试培养基, N_0 培养基, Knudson C (1946) 等均可作为基本培养基。通常 White (1943) 适用于长根; Nitsch (1969) 适用于花器、花药、花丝培养; Morel (1956)、农事试培养基适用于生长点培养; Heller 是一种早期较好的培养基,适用于愈伤组织的培养,近年来仅用于花药、兰花与菊花的茎尖培养;补加了 3% 香蕉的 Knudson C (1946) 是兰花种子萌发的最佳培养基; Vacin 和 Went、Morel、White (1963)、Knudson C、MS 也适用于兰花茎尖培养与继代增殖; N_0 适用于单子叶禾谷类植物的培养。我们在试验中,选择 MS 作为基本培养基,并补加 500mg/l LH, 取得了 60 余种植物的外植体分化芽或不定胚的成功,因此认为 MS 是一种适应范围较宽的培养基。通常为了取得分化成功,需酌情补加适量的生长素和细胞激动素类物质。Murashige 指出,附加 0.3mg/l 2,4-D 和 0.1mg/l KT 可有效地使许多外植体产生愈伤组织;当提供 1mg/l KT 和 0.3mg/l IAA 时,能用于草本植物的茎尖培养,建立无病毒株系。我们常采用 MS + 2,4-D₁ + BA_{0.1} 引起许多植物的外植体形成愈伤组织,采用

MS + NAA_{0.2} + BA₁ 培养基能引起许多植物的外植体分化出不定芽。

Murashige 曾指出, 崔徵和 Skoog 关于细胞内细胞激素与生长素的平衡决定着器官发生方向, KT/生长素的比例大, 有利于芽的发生; 生长素/KT 比例大, 有利于根的发生的原理, 基本上适用于双子叶、单子叶被子植物, 也适用于羊齿植物、裸子植物。据实验观察, 在培养基中添加 BA 或 KT 时, 有利于双子叶植物外植体发生不定芽(例如, 菊花、金鱼草、留兰香), 特别是生长素 NAA 有利于单子叶植物外植体或愈伤组织发生不定芽。在含生长素培养基中补加 KT、BA 类物质有利于单子叶植物愈伤组织化(例如, 麝香百合、水仙、风信子、唐菖蒲、郁金香等)。对风信子和波罗来说, 在单加 1mg/l NAA 或单加 1mg/l BA 的培养基上, 外植体均能分化出芽, 只是在前一培养基中芽分化得较少较大; 而在后一培养基中芽较小, 较多。据一些资料指出, 在单加 0.1~1mg/l 2,4-D 的 MS 培养基中, 属于双子叶植物的矮牵牛叶片能分化出不定胚, 在加有 0.2mg/l NAA + 2mg/l BA 的培养基上, 矮牵牛叶片分化出粗壮的芽。因此, 2,4-D 有利于不定胚的产生。培养基中添加 1g/l 丙氨酸有利于胡萝卜下胚轴不定胚的发生, 早期认为 NH₄ 离子有利于不定胚的发生, 因此在培养基中添加 0.3~1g/l 水解乳蛋白或水解酪蛋白, 或是适量酪氨酸均有利于不定胚或不定芽的发生。添加 80mg/l 腺嘌呤也有利于不定芽的发生。文献中指出, KT 和 GA₃ 抑制不定胚的发生, 但从我们的试验中可看到例外的情况, 例如杜鹃种子愈伤组织在 MS₀、MS + BA₁ + (GA₃)₁ 或 MS + (GA₃)₂ 中继代培养, 均能产生大量不定胚。又金桔种子幼苗的根在