

中学生课外读物

现代科学技术丛书



植物组织培养

钱迎倩 孙敬三 编著



人民教育出版社

中学生课外读物

现代科学技术丛书

植物组织培养

钱迎倩 孙敬三 编著

人民教育出版社

内 容 提 要

本书介绍了植物组织和细胞培养的基本概念, 操作要领以及它在工业、农业、医药生产中的应用前景。

内容包括: 植物组织和细胞培养的基本概念, 培养基的制备和无菌操作, 植物的快速繁殖, 花药培养和单倍体育种, 胚胎培养, 试管受精, 胚乳培养, 茎尖培养和无毒苗的生产, 原生质体培养, 体细胞杂交, 植物细胞的大量培养, 细胞突变体筛选和无性系变异, 以及超低温种质保存等。

本书内容丰富, 取材新颖, 深入浅出, 实用性强。可以作为中学生、中小学教师以及对生物学感兴趣的社会各界人士, 了解植物细胞工程及其应用的入门读物, 也可作为有关专业工作者的参考书。

中学生课外读物

现代科学技术丛书

植 物 组 织 培 养

钱迎倩 孙敬三 编著

*

人民教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

北京市房山县印刷厂印装

*

开本 787×1092 1/32 印张 3.75 字数 78,000

1986年7月第1版 1987年4月第1次印刷

印数 1—4,000

书号 7012·01092 定价 0.50 元

目 录

一	返老还童——植物细胞的“全能性”	1
二	离体组织的温床——培养基	4
三	消毒灭菌和无菌操作	17
四	“孙悟空的分身法”——快速繁殖	23
五	“公鸡下蛋”——花药培养	32
六	远缘结亲——胚胎培养	43
七	试管受精	49
八	无子瓜果特别甜——胚乳培养	53
九	无病毒植物——茎尖培养	58
十	无壁细胞用途广——原生质体培养	67
十一	创造新种的新手段——体细胞杂交	77
十二	高等植物的微生物化——细胞悬浮培养和次生 代谢物的生产	89
十三	“沙里淘金”——细胞突变体筛选与体细胞无性系 变异	99
十四	种质资源的“保险柜”——低温和超低温种质 保存	108

一、返老还童——植物细胞的“全能性”

一切生物,除了那些最低等的噬菌体和病毒以外,都是由细胞构成的。各类生物(动物、植物、微生物)细胞的基本结构和功能都是相似的。然而,近二十年来的科学发展,证明植物细胞和动物细胞之间除了有共同特点之外,还存在着一个很大的差别,这就是植物细胞具有“全能性”。所谓“全能性”,就是指植物体的任何一个细胞,都包含着发育成完整植株的全部遗传信息,在离体培养情况下,这种信息可以表达,产生出完整植株。也就是说植物体的任何一个细胞,不论它们来自根、茎、叶等营养器官,还是来自子房和花药等生殖器官;也不论这些细胞是属于幼嫩的未分化的分生组织,如根尖、茎尖,还是属于已分化的成熟组织,如韧皮部的薄壁细胞、叶子的表皮细胞等,只要放在合适的人工培养基上,经过一系列的脱分化和再分化过程,都能长成一个具有根、茎、叶的完整植株。动物细胞和组织的离体培养工作,已有多年的历史,工作已做得相当深入,但是从未发现过一个已分化的动物细胞经离体培养可以再生成一完整的小动物。例如,小白鼠的神经细胞,无论经过多长时间的离体培养,总是长成神经细胞,决不会分化出其他组织的细胞,更不会分化出一个完整的小白鼠。因此,动物学家甚是羡慕植物学家所研究的对象具有的这种十分宝贵的“返老还童”的特性。

（一）植物细胞的正常分化

经有性生殖传种接代的植物体，追溯其起源都是由雌雄配子融合后的受精卵发育来的。受精卵在不断分裂的同时，逐渐长出胚芽、胚根，形成一个幼小的植物体。这一过程称为胚胎发生，也叫胚胎分化。因此“分化”一词可以这样来下定义，即形态和功能上特化细胞的出现。例如，经胚胎分化产生的根、茎、叶、花、果实，不仅在细胞结构上千差万别，而且在功能上都是专一特化的。

（二）植物细胞的脱分化

将高度特化的植物体的一部分，例如根、茎、叶、花等，从植物体上切下来，放在适当的人工培养基上进行离体培养，这些离体器官或组织（统称外植体）就会进行细胞分裂，形成新的组织。但是，这些新生成的组织和原来用来接种的器官或组织完全不同，它们没有根、茎、叶、花等的独特结构，细胞的排列疏松而无规则，是一种高度液泡化的呈无定形状态的薄壁细胞，我们称其为“愈伤组织”。而由高度分化的植物器官或组织产生愈伤组织的过程，就称为植物细胞的“脱分化”。

（三）植物细胞的再分化

将脱分化形成的愈伤组织转移到适当的人工培养基上继续培养，这些无定形的愈伤组织又会重新分化出具有根、茎、叶的完整植株。这种从愈伤组织再生出小植株的过程被称为“再分化”。由愈伤组织再分化出完整植株可以有两种不同的方式：一种是由愈伤组织细胞分化出胚状体，即通过类似正常体内胚胎发生的途径，形成小植株；另一种是由愈伤组织直接

分化出芽,然后在芽的下边再分化出根,形成完整植株。前者称为胚胎发生途径,后者称为器官发生途径。

在离体培养的情况下,植物细胞所具有的上述脱分化和再分化特性,就构成了植物细胞的“全能性”。图 1.1 表示了植物细胞脱分化和再分化的简单过程。

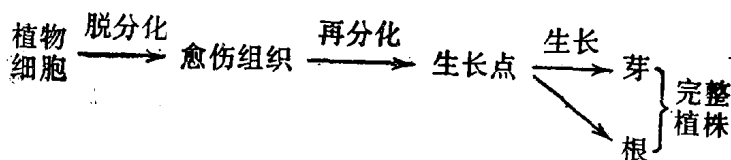


图 1.1 植物细胞脱分化和再分化图解

(四) 全能性和植物生物技术

植物生物技术(又称植物生物工程)是利用生物学研究的最新成就,按照人类的意愿有目的地改良植物的一种新的技术,它是当前世界新技术革命的一个重要组成部分。在植物生物技术所包含的各个分支中,组织培养技术是主要的研究手段。例如,植物的快速繁殖、花药培养和单倍体育种、细胞突变体筛选、原生质体培养和体细胞杂交、超低温种质保存等都是在植物细胞和组织培养技术,特别是植物细胞“全能性”理论建立之后,才发展和完善起来的。因此可以说,植物细胞具有“全能性”这一特点,是植物生物技术这一植物科学中的前沿阵地赖以存在的基础,没有植物细胞的“全能性”,也就不会有今天的植物生物技术。

二、离体组织的温床——培养基

植物体的组织和细胞，依靠根部吸收的水分和无机盐类以及叶子进行光合作用制造的碳水化合物来维持其正常的生命活动。植物体内发达而完善的输导组织保证了这些无机和有机物质在体内的转送和运输。一旦植物的组织由整体植株上被切下，进行离体培养时，就完全失去了上述这些提供营养和担负运输的系统，离体组织也就失去了生活的基础。为了维持离体组织和细胞的正常代谢活动，并促使其进一步生长和发育，必须人工配制一种营养成分齐全的培养基。在这种人工合成的培养基上，组织和细胞不但不会因脱离母株植物而死亡，还会使在母株上不能表达的“全能性”充分表达出来。

（一）营养齐全的成分

人工合成的培养基中，包含有植物生长和发育所需要的全部营养成分，包括无机元素（分为大量元素和微量元素），碳源，维生素，有机氮和生长调节物质等五大类。虽然不同植物材料对上述物质的需求是不完全相同的（例如生长调节物质），但是对基本营养元素的要求有共同特点。

1. 无机元素 培养基中的无机元素可分为大量元素和微量元素，它们在培养基中的含量虽然相差悬殊，但都是离体组织生长和发育必不可少的基本的营养成分。

（1）大量元素 培养基中的大量元素有氮(N)、磷(P)、

钾(K)、钙(Ca)、硫(S)、镁(Mg)等,其中氮又有硝态氮(NO_3^-)和铵态氮(NH_4^+)之分。实验证明,这两种状态的氮对离体组织都是需要的,但是两者应保持适当的比例。氮是蛋白质的重要组成成分,对离体组织的营养最为重要。此外,磷、钾和其他大量元素对植物细胞的生命活动也起着十分重要的作用,没有它们,离体细胞和组织就不能进行正常的生长。

(2) 微量元素 离体组织和细胞的生长发育不仅需要大量元素,还需要微量元素。培养基中的微量元素有铁(Fe)、铜(Cu)、锌(Zn)、锰(Mn)、钼(Mo)、硼(B)、碘(I)、钴(Co)、氯(Cl)、钠(Na)等。植物对这些元素的需要量极微,但是非常必要,没有它们便生长不良。其中铁、铜、锌、锰和钼被结合在细胞的蛋白质中,起着电子载体和催化的重要作用。虽然碘在动物的生长发育中是必要的,但是植物并不必需碘,然而,很多常用培养基中仍然加有微量的碘,至少碘的存在对离体组织的生长没有不利的影响。

2. 蔗糖 培养基中都必需加入一定浓度的糖,一般多用蔗糖,有时也可用葡萄糖和果糖。糖不但是离体组织赖以生长的碳源,还可使培养基维持一定的渗透压(一般在1.5—4.1大气压之间)。大多数培养基的蔗糖浓度在1—3%范围之内。

3. 维生素 离体培养的组织中,虽然也能合成一些维生素,但是数量较少。如在培养基中添加维生素,则能明显地促进离体组织的生长。培养基中的维生素主要是B族维生素,如维生素 B_1 (盐酸硫胺素)、维生素 B_6 (盐酸吡哆醇)、维生素 B_9 (叶酸)。此外,还有维生素PP(烟酸)、维生素H(生物

素)和肌-肌醇(环己六醇)等。

4. 有机氮 培养基中的有机氮主要是氨基酸和酰胺类,如甘氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺等。但是,用有机氮作为培养基中的唯一氮源时,离体组织生长不良,只有在含有无机氮的情况下,氨基酸类物质才有较好的效果。

5. 生长调节物质(植物激素) 组织培养中常用的生长调节物质中,最重要的是生长素类和细胞分裂素类两种类型,此外,有时也用赤霉素。生长素类包括吲哚乙酸(IAA)、萘乙酸(NAA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、吲哚丁酸(IBA);细胞分裂素类包括激动素(KT)、6-苄氨基嘌呤(6-BA)、玉米素(ZT)。其中有些是植物体内天然存在的,如吲哚乙酸、玉米素等,也有完全是人工合成的,如萘乙酸、2,4-D、吲哚丁酸。培养基中的植物激素用量虽少,但是威力巨大,它们犹如生化反应中的酶和催化剂,在植物细胞的脱分化和再分化中起着培养基中的其他成分所不能代替的作用。

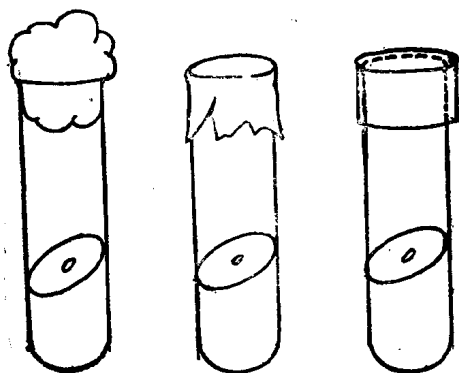
为了使离体组织生长得更好,需经常在培养基中加入一些植物的天然物质,其中用得最多的是椰乳。椰乳是椰子果实的液体胚乳,它除含有各种营养物质外,尚有一定数量的植物激素,是一种很理想的培养基附加成分。但是,椰乳不好保存,北方地区也难以买到。因此,很多人用其他天然化合物代替椰乳,也收到了一定的效果。这些天然化合物是水解酪蛋白、水解乳蛋白、酵母提取物等。

培养基一般是半固体状的,这是因为在培养基中加入了一定数量的琼脂(洋菜)。如果用液体培养基,则可以省去洋菜,但是培养基中的其他成分不变。

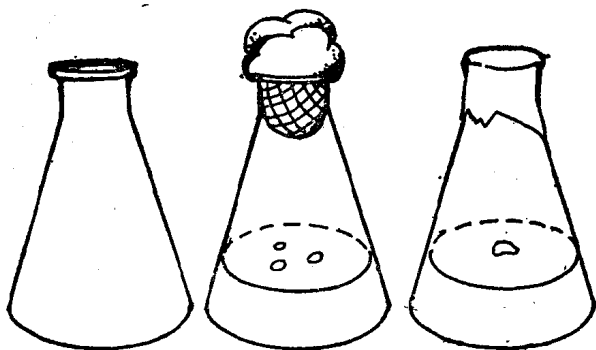
(二) 培养基的配制

不同植物的离体培养物要求不同的培养基。目前常用的培养基有十几种,但是使用最广泛的要算 Murashige 和 Skoog 在 1962 年研制成的培养基——MS 培养基。这种培养基不论对双子叶植物还是单子叶植物,不论对草本植物还是木本植物都有良好的效果。MS 培养基中无机盐的浓度较高,如果培养物不需要这样高的无机盐,则可将 MS 培养基中的大量元素减半,甚至只用其原有量的四分之一,其培养基中的离子平衡仍不受影响,培养效果也很理想。

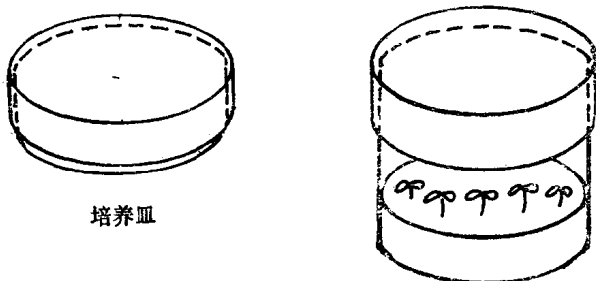
为了工作和贮藏的方便,一般都将培养基中的成分分为大量元素、微量元素、铁盐等,并把它们分别配成母液保存,大量元素一般配成所需浓度的 10 倍,微量元素配成所需浓度的 1000 倍,铁盐配成所需浓度的 200 倍。其他成分如维生素类、氨基酸类,植物激素类则分别按所需浓度配成 500—1000 倍的母液单独贮存。蔗糖、洋菜、天然化合物等则临时称量。配制大量元素和微量元素母液时,要防止沉淀发生,方法是各个元素分别溶解后再混合在一起。植物激素有些难溶于水,可用少量的 0.5—1.0N(当量浓度)的 NaOH(或 KOH) 或乙醇溶解,有的也可用 HCl 溶解后再用水稀释。配母液都要用蒸馏水,最好是重蒸馏水。配好的母液要在 4°C 冰箱中贮存。配制培养基时按需要将各类物质的母液混合,加入一定量的蒸馏水,然后加入琼脂和蔗糖,定容到所需体积。用 NaOH 或 HCl 调整 pH,多数培养基都保持微酸性,pH 在 5.6—6.8 之间。然后加热使琼脂充分溶化,分装在培养用的容器中。组织培养用的培养容器各式各样,可根据培养物的特性选用,但



试管



三角瓶



培养皿

图 2.1 常用的几种培养器皿: 试管、三角瓶、培养皿

是用得最多的是试管、三角瓶和培养皿(图 2.1)。培养基分装后用棉塞或铝箔封口,有时也用不锈钢盖或塑料盖封口(图 2.1)。培养基分装和封口后即可进行高压蒸汽灭菌。灭菌时压力和时间要求比较严格,压力高、时间长杀菌效果好,但是对培养基中的成分(特别是有机物质)破坏严重,反之压力低,时间短虽可使培养基成分保持完好,但是灭菌不彻底,有使培养物全军覆灭的危险。图 2.2 表示了培养基的配制和灭菌程序。

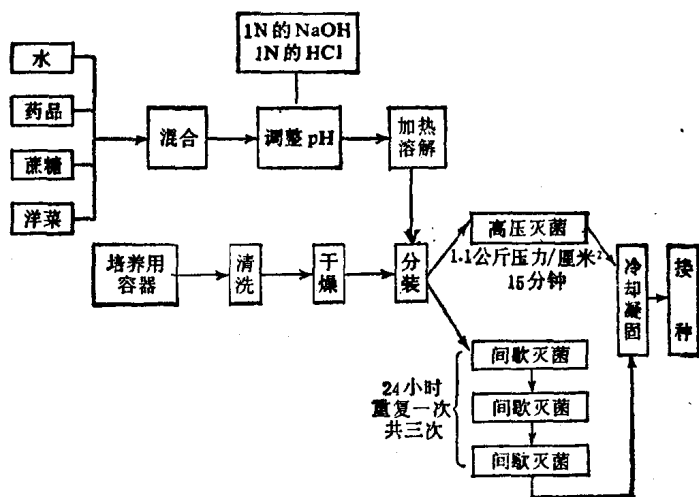


图 2.2 培养基的配制和灭菌程序图

(三) 常用培养基配方(单位:毫克/升)

1. MS 培养基

NH_4NO_3 (硝酸铵)	1650
KNO_3 (硝酸钾)	1900
KH_2PO_4 (磷酸二氢钾)	170

MgSO₄·7H₂O(硫酸镁) 370

CaCl₂·2H₂O(氯化钙) 440

铁盐: 5.57 克的 FeSO₄·7H₂O (硫酸亚铁) 和 7.45 克的 Na₂-EDTA(乙二胺四乙酸二钠)溶于 1 升水中的溶液, 5 毫升/升

MnSO₄·4H₂O(硫酸锰) 22.3

ZnSO₄·7H₂O(硫酸锌) 8.6

H₃BO₃(硼酸) 6.2

KI(碘化钾) 0.83

NaMoO₄·2H₂O(钼酸钠) 0.25

CuSO₄·5H₂O(硫酸铜) 0.025

CoCl₂·6H₂O(氯化钴) 0.025

甘氨酸 2

盐酸硫胺素 0.4

盐酸吡哆素 0.5

烟酸 0.5

肌-肌醇 100

蔗糖 30000

琼脂 10000

pH 5.8

2. LS 培养基

成分基本同 MS, 唯去掉甘氨酸、盐酸吡哆素、烟酸。

3. RM-1964 培养基

成分基本同 MS, 唯改 NH₄NO₃ 为 4950, KH₂PO₄ 为 510。

4. 米勒培养基

KNO_3 (硝酸钾)	1000
NH_4NO_3 (硝酸铵)	1000
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (硝酸钙)	347
KH_2PO_4 (磷酸二氢钾)	300
KCl (氯化钾)	65
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (硫酸镁)	35
Na-Fe-EDTA (乙二胺四乙酸二钠)	32
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (硫酸锰)	4.4
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (硫酸锌)	1.5
H_3BO_3 (硼酸)	1.6
KI (碘化钾)	0.8
甘氨酸	2
盐酸硫胺素	0.1
盐酸吡哆素	0.1
烟酸	0.5
蔗糖	30000
琼脂	10000
pH	6.0

5. 培养基 H

KNO_3 (硝酸钾)	950
NH_4NO_3 (硝酸铵)	720
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (硫酸镁)	185
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (氯化钙)	166
KH_2PO_4 (磷酸二氢钾)	68

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (硫酸锰)	25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (硫酸锌)	10
H_3BO_3 (硼酸)	10
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (钼酸钠)	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (硫酸铜)	0.025
Na-EDTA^* (乙二胺四乙酸二钠)	37.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^*$ (硫酸亚铁)	27.8
肌-肌醇	100
烟酸	5
甘氨酸	2
盐酸硫胺素	0.5
盐酸吡哆素	0.5
叶酸	0.5
生物素	0.05
蔗糖	20000
琼脂	8000
pH	5.5

6. 培养基 T

KNO_3 (硝酸钾)	1900
NH_4NO_3 (硝酸铵)	1650
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (氯化钙)	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (硫酸镁)	370

* 7.45 克 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 和 5.57 克 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于一升水中, 配每升培养基时取此液 5 毫升。

KH_2PO_4 (磷酸二氢钾)	170
铁盐: 同培养基 H	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (硫酸锰)	25
H_3BO_3 (硼酸)	10
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (钼酸钠)	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (硫酸铜)	0.025
蔗糖	10000
琼脂	8000
pH	6.0

7. 改良怀特培养基

KNO_3 (硝酸钾)	80
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (硝酸钙)	300
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (硫酸镁)	720
Na_2SO_4 (硫酸钠)	200
KCl (氯化钾)	65
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (磷酸二氢钠)	16.5
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (硫酸铁)	2.5
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (硫酸锰)	7
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (硫酸锌)	3
H_3BO_3 (硼酸)	1.5
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (硫酸铜)	0.001
MoO_3 (氧化钼)	0.0001
甘氨酸	3
盐酸硫胺素	0.1
盐酸吡哆素	0.1