

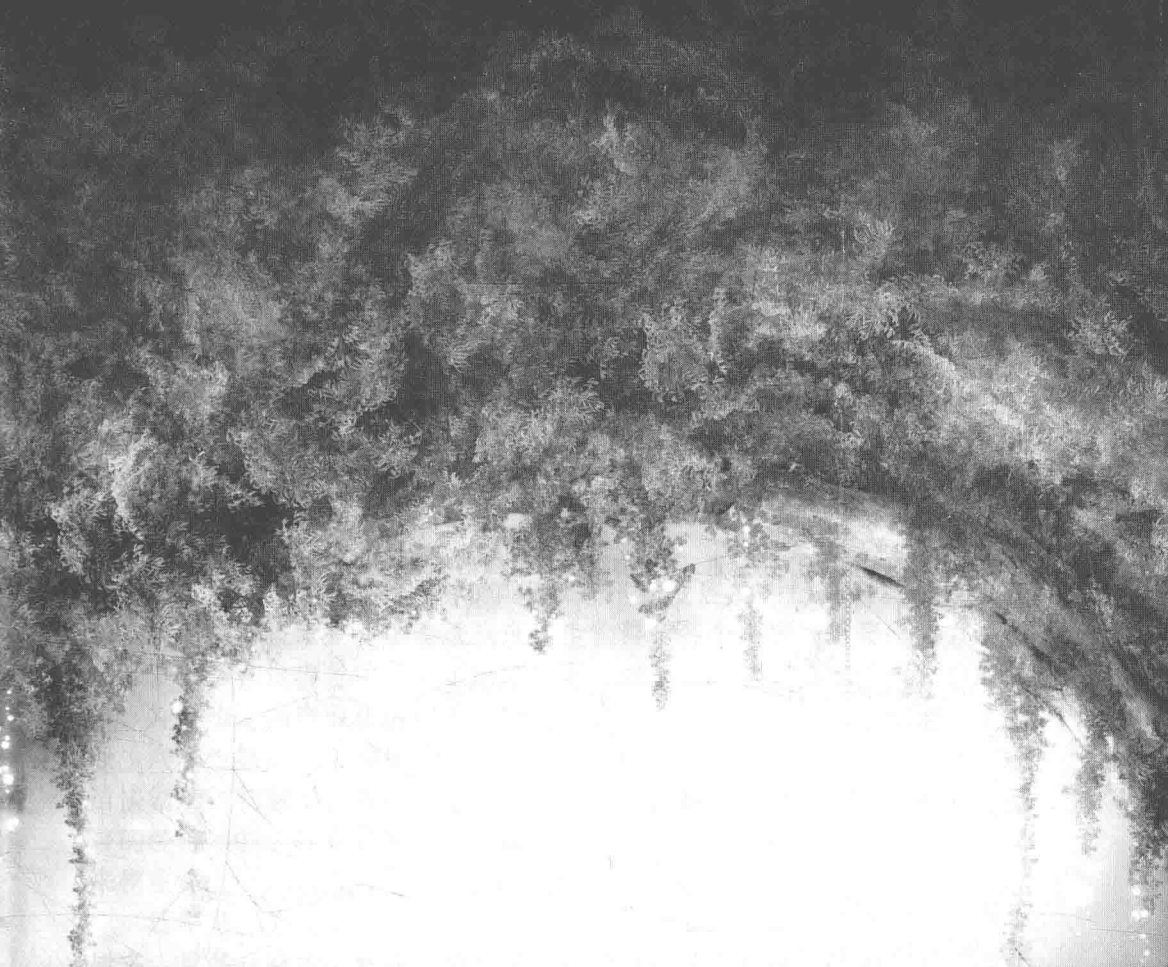
XIANDAI ZHIWU ZUZHI PEIYANG YUANLI JI YINGYONG JISHU

现代植物组织培养原理 及应用技术

王玉珍◎著



中国原子能出版社



XIANDAI ZHIWU ZUZHI PEIYANG YUANLI JI YINGYONG JISHU

现代植物组织培养原理 及应用技术

王玉珍◎著



中国原子能出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

现代植物组织培养原理及应用技术 / 王玉珍著. --
北京 : 中国原子能出版社, 2017.8
ISBN 978-7-5022-8283-7

I. ①现… II. ①王… III. ①植物组织 - 组织培养
IV. ①Q943.1

中国版本图书馆CIP数据核字 (2017) 第178972号

现代植物组织培养原理及应用技术

出版发行 中国原子能出版社 (北京市海淀区阜成路43号 100048)

责任编辑 王 朋

责任印刷 潘玉玲

印 刷 三河市天润建兴印务有限公司

经 销 全国新华书店

开 本 787毫米*1092毫米 1/16

印 张 13.75

字 数 237千字

版 次 2018 年 1 月第 1 版

印 次 2018 年 1 月第 1 次印刷

标准书号 ISBN 978-7-5022-8283-7

定 价 45.00元

网址: <http://www.aep.com.cn>

E-mail: atomep123@126.com

发行电话: 010-68452845

版权所有 翻印必究



前言

现代生物技术是20世纪70年代以来迅猛发展的一门高新科学技术。植物组织培养技术是一项渗透到现代生物科学各个领域的重要研究方法和技术手段，在世界各国得到了迅猛发展，成为植物生物技术的重要组成部分，并逐步走向产业化应用的发展道路；同时，该技术也加速和推动了农业生产和生物制药等领域的技术创新。目前，植物组织培养技术在植物种苗快繁、植物脱毒、育种、生物制药等领域已得到广泛的应用，并取得显著的经济效益。随着我国生物、农业科技的发展，植物组织培养技术已越来越重要。

近年来，关于植物组织培养方面的书籍较多，尤其以理论方面介绍的居多，且各具特色。然而，植物组培快繁是应用性较强的一项技术，因此《植物组织培养原理及应用技术》对常规的组培理论部分进行了一定的精炼，并与组培案例相结合，使读者既能够较好地了解植物组织培养的理论和操作相关流程，又能较好地从本书案例中得到一定的借鉴，有利于读者在今后的组培研究与生产中，不断提升自身的业务水平。本书的撰写是在广泛调查研究、参阅大量文献资料的基础上，运用最新的科研成果，结合我国植物组培快繁技术的实际，进行分析、归纳和消化吸收而形成的。本书的主要内容包括组织培养常见概念、发展历史、原理、操作技术（组织培养、细胞培养、原生质体培养、突变体筛选等）以及一些常见植物组织培养快繁技术应用案例，以期适应组织技术的发展。所阐述的内容具有较强的科学性、先进性、实用性和可操作性，对提高组培快繁技术水平、加快组培快繁技术的推广应用，将会起到重要作用。

植物组织培养是一门应用性很强的技术，在实际操作过程中，更多的是需要能够针对不同的问题提出有针对性的解决方法，包括新配方的研发、组培生产工艺的改进，从而用较低的成本生产出品质较佳的组培苗。因此，建议读者可以多阅读普通遗传学、植物生理学、植物学等方面的书籍，以增加相关理论知识的积累，同时多关注组培方面的最新技术、成



果，真正做到对植物组织培养技术的运筹帷幄。

由于作者水平有限，书中不妥之处在所难免，敬请读者批评指正。

作 者

2017年7月

目 录

第一章 植物组织培养基础理论阐释	1
第一节 植物组织培养的基本内涵	2
第二节 植物组织培养的生理依据	21
第三节 植物组织培养在农业生产中的应用	23
第二章 植物组织培养的原理分析	29
第一节 植物细胞分化	30
第二节 植物体细胞胚胎发生	31
第三节 影响植物离体形态发生的因素	53
第三章 植物组织器官培养技术	89
第一节 植物组织器官离体培养的途径与方法	90
第二节 愈伤组织的诱导分化技术及其应用	102
第四章 植物花药和花粉培养技术	111
第一节 花粉培养技术	112
第二节 花药培养方法	114
第三节 花药和花粉培养的应用研究	117
第五章 植物胚胎培养技术与人工种子	119
第一节 植物胚胎培养技术及应用	120
第二节 植物离体授粉的方法	138
第三节 人工种子技术	142
第六章 植物原生质体培养及细胞融合	147
第一节 原生质体的分离与纯化	148
第二节 原生质体培养技术	157
第三节 原生质体融合	164



第七章 植物组织培养快繁技术及应用实例.....	171
第一节 种子和体细胞两种不同的选择.....	172
第二节 体外培养的快繁.....	174
第三节 植物组培快繁方法.....	181
第四节 植物组培快繁中出现的问题与解决途径.....	193
第五节 植物组织培养快繁应用案例.....	200
参考文献.....	210



第一章

植物组织培养基础理论阐释





植物组织培养是20世纪初以植物生理学为基础发展起来的一门重要的生物技术。它的建立和发展，对植物科学各个领域的发展均有很大的促进作用，并在科学研究和生产应用上开辟了令人振奋的多个新领域。

第一节 植物组织培养的基本内涵

一、植物组织培养的概念界定

植物组织培养又称植物离体培养，是指：“在无菌和人工控制条件下，利用合适的培养基，对植物的器官、组织、细胞或原生质体进行培养，使其按照人们的意愿生长、增殖或再生完整植株的一门生物技术”（图1-1）。^[1]

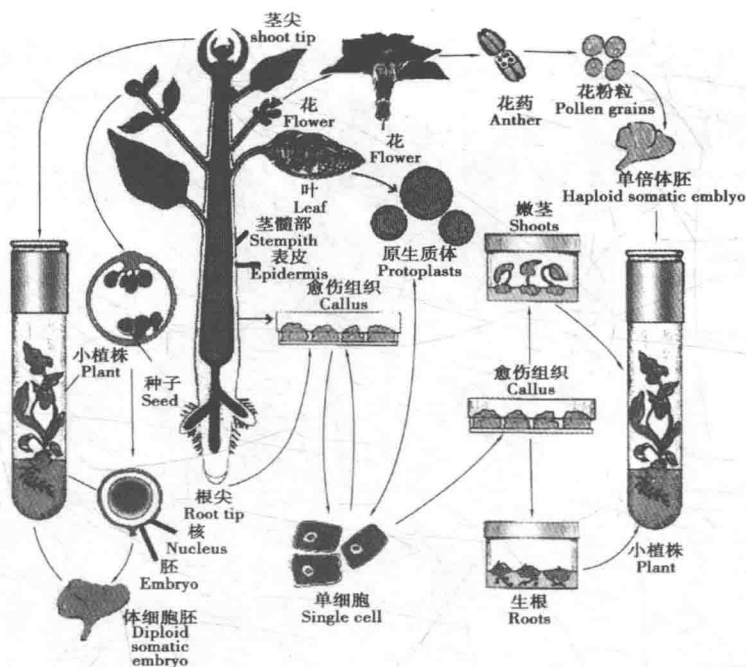


图1-1 植物组织培养过程示意图

[1] 秦静远. 植物组织培养技术 [M]. 重庆: 重庆大学出版社, 2014.

二、植物组织培养的类型分析

(一) 器官培养

一般情况下,已分化的植物器官在体外培养中不会有损其完整性(integrity)。有两类培养方法:

①定型器官(determinate organs),指遗传注定特有其大小和形状的器官,如叶、花、果实。

②未定型器官(indeterminate organs),它们的生长可能不受限制。如根或非花梗的茎枝 过去曾认为根或茎顶端内的分生组织不受某种特殊发育方式的限制,而现在则认为,像一些定型器官的原基(primordia),如叶、顶端分生组织,已是遗传性编码地(inherently programmed)(也就是定型的)将成为根或茎枝。不定型和定型器官两者的最终发育方式常在很早的发育阶段就被确定,如茎尖分生组织上的突起,早在几次细胞分裂后即致编码确定发育成侧芽还是长成叶片。

1. 定型器官的培养

所有器官都是从一组分生组织细胞长出来的。理论上,一个未定型器官的分生组织可以同一方式连续、无限地生长,这与定型器官的原基(primordia)情况显然不同。定型的已接受如何分化的指令,因此它的细胞进一步分裂的能力是有限的。

如一个定型器官的原基被切下并转接到培养基上,有时它会继续生长直至成熟。体外(in vitro)培养所得器官比原初在容器外生长的(in vivo)母株发育的较小,除此之外其他方面是正常的。当定型器官长到最大限度时,其生长即停止,此时做继代培养其生长也不会延续。

有些器官人们已培养过,知道它们的生长潜能是有限的,包括:

- ①叶片;
- ②果实;
- ③雄蕊;
- ④子房(ovaries)和胚珠(ovules,可发育长成胚);
- ⑤几种双子叶植物的花芽:
 - a. *Cucumis sativus* (黄瓜);
 - b. *Nicotiana tabacum* (普通烟);
 - c. *Aquilegiaformosa* (金黄耬斗菜,耬斗菜属毛茛科);
 - d. *Cleome ibgridella* (醉蝶花属,白花菜科);
 - e. *Nicotiana offinis* (烟草属,茄科)。



直到最近,一些体外培养实例才获得完全而又正常的发育,这很可能是由于使用了亚适量组成成分培养基(media of sub.optimum composition)。利用培养基组分不同所做实验,Berghoef 和 Bruinsma (1979a) 获得福哥秋海棠(*Begonia franconis*)芽的正常发育,使人们能研究生长物质、营养因子对花发育和性器官出现的影响。同样的,Angri sh 和 Nanda (1982a, b) 以同样方法培养柳属植物(*Salix*)休眠芽,研究芽的位置和休眠期的累进影响(progressive influence),对分生组织定型成为柔荑花序(catkins)和可育的花(fertile flowers)方面所起的效应。还有几种植物的花在体外培养过程中授粉,并产生成熟果。

培养已经有遗传性安排产生定型器官的分生组织是不能繁殖植物的,但如果发育进展得不是很远,把花芽分生组织在体外培养中诱导返回成营养性分生组织(vegetative meristem)也是不少见的。有些植物从一个大花序上的花分生组织可以产生营养性茎枝,这的确给植物快繁又提供了一种便捷的方法。

2. 培养未定型器官

(1) 分生组织和茎枝培养

茎枝生长点可采用一种方法使它们能继续进行不间断的、有结构的生长。如能长成一个有组织结构能生根的茎枝,则对植物扩繁很有实用价值。有两种重要的可用方法:

①分生组织培养也就是茎顶尖的培养。此技术可使植物脱毒——不受病毒侵染,可从茎尖也可从侧芽处切取外植体。这种外植体是很小的茎顶尖(apex)(0.2~1.0mm长),仅包含顶部分生组织和1~2个叶原基。

②茎枝培养或茎尖(tip)培养也就是较大的茎尖培养。其长度从5~10mm,像未切割的芽那样大。此法是扩繁植物非常成功的方法之一。

如图1-2所示了上述两种培养方法所用外植体,在典型双子叶植物茎尖部分的相对大小和位置。节培养(node culture)不过是茎枝培养内容很相似的改编版而已。

假若分生组织的、茎枝的和节的三种培养方法获得成功,它们都能最后长出小茎枝。这些小茎枝的处理方法有多种:可去生根产生小植株,称“plantlets”;也可诱导腋芽生长形成一丛茎枝(俗称团块,即相对单株而言)。丛枝可以分开,再培养扩繁植物;也可将生长中的单株再培养;在上述培养阶段单株或丛枝团块可能会生根。应当在生根阶段或生根阶段前夕将这些生根的茎枝在无菌条件下移出来炼苗使它们正常生长。

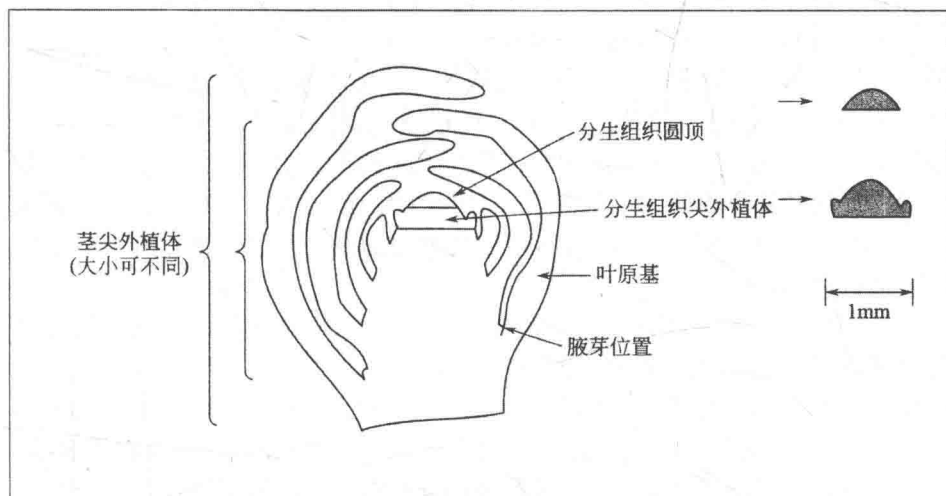


图1-2 芽的图解切片，表示各组织器官相对大小和位置

(2) 胚的培养

接合子 (zygotic) 也就是种子胚常用做植物组培外植体是很有利的，如用它来启动愈伤培养。不过胚的培养是要从种子中将胚一个个分离出来并在体外培养使“发芽”，每个外植体产生一个植株。用胚培养得到种苗比从种子要快很多，因种子有较长休眠期；尤其当所用种子是种间杂交的，其基因型使胚或种子活力低而不能产生种苗。在植物进化过程中会产生天然不容性 (natural incompatibility) 从而限制有性杂交，已知有两类不孕性 (infertility)：

①前接合子不容性 (pre-zygotic incompatibility) 即接合子形成之前就有的不容性，可阻止花粉萌发和/或花粉管的生长，因此接合子永远不会形成；

②后接合子不容性 (post-zygotic incompatibility) 接合子虽然形成但不被胚乳 (endosperm) 所接受，胚得不到足够营养最终瓦解或发育不全。

前接合子不容性有时在实验室条件下还可以克服，可用体外授粉也称体外授精技术 (in vitro pollination, 或 in vitro fertilisation)。此法由 Kanta 等 (1962) 开发。有关这方面的综述文罩有：Ranga Swamy (1977)、Zenkteler (1980) 和 Yeung 等 (1981)；有关胚培养方面的综述有：Raghavan (1967, 1977a, 1980)、Torrey (1973)、Norstog (1979)。

胚培养已成功地应用于很多植物属来克服后接合子不容性而得到想要的杂交种的种苗 (hybrid seedling)。例如，Sharma 等 (1980) 想把野生茄



属植物 (wild *Solanum* species) 的抗虫基因转至茄子 (aubergine), 也就是用胚培养得到一些杂种植物 (*Solanum melongena* × *S. khasianum*, 茄 × 喀西茄), 这种情况下所做的胚培养, 更确切、更恰当地应称为胚的拯救 (embryo rescue)。但这种方法的成功率一般是相当低的, 尤其是所得新杂种是远缘杂交的 (remote crosses), 有时仍然是不育的。如果之后它的扩繁是无性的, 则这种缺点也就无关紧要了。有些树和无核小果 (soft fruits, 如草莓等) 以及鸢尾属 (*Iris*) 植物的不容性品种间的杂交种就是用培养相当成熟的胚所获得的。

在取胚前, 果实或种子表面应消毒灭菌。假若在切取、转接至培养基上全过程是严格的无菌操作, 则胚本身无需再消毒。为易于切取胚, 可先将种子在水中泡至种皮软化, 如软化需几小时以上则建议该种子需再次消毒。从小种子中切取胚可能需用解剖显微镜, 切取时不使胚受伤是很重要的。

授粉后几天的不成熟胚 (pro-embryos) 的培养最终所得种苗比例远远大于较成熟胚的培养, 这是由于不容性机制 (incompatibility mechanism) 还来不及 (时间太短) 起作用。遗憾的是, 切取很小的胚需要高技巧且费时。受损而不能在体外培养中生长也是常有的事。Hu和Sussex (1986) 体外培养大豆的不成熟胚得到最佳结果, 正是由于所分割出的胚是带着完整胚柄的 (suspensors intact)。一般情况是切割下的胚提早发育成种苗, 也就是它们在长成像正常种子中那样大小之前就发育成种苗了。

有一种替代胚培养的方法是有些植物可切取授粉子房 (pollinated ovaries) 和不成熟的胚珠 (ovules) 来培养。胚珠培养有时又称 “in ovule embryo culture”, 这样培养比培养年幼胚更易成功。一般地说, 不成熟胚需复杂的培养基才能生长, 而胚珠里边的胚无需复杂培养基, 并且也较容易切取, 同时对培养的物理条件也相当地不敏感。如图1-3所示, 表明了胚和胚珠培养的区别。

烟草属 (*Nicotiana*) 种间杂交种的胚珠培养所得种苗在长出几片真叶后全部死掉, 因此Iwai等 (1985) 用不成熟种苗叶片为外植体产生了愈伤培养。愈伤再生出的茎枝大部分也在早期死掉, 只有一个最终长成了植株, 之后发现该植株却是一株不育的杂交种。Kato和Tokumasu (1983) 从天竺葵属的杂种愈伤再生出植株, 而愈伤却直接来自不能长成种苗的球状或心状的合子胚 (zygotic embryos)。兰花 (orchid) 种子既没有功能性的储存器官也缺少真正的种皮, 因此从中切割出胚是不可能的。其实目前为商业目的, 兰花种子总是先在体外培养条件下发芽, 然后从绿莢中取出不成熟种子, 并且很容易生长。

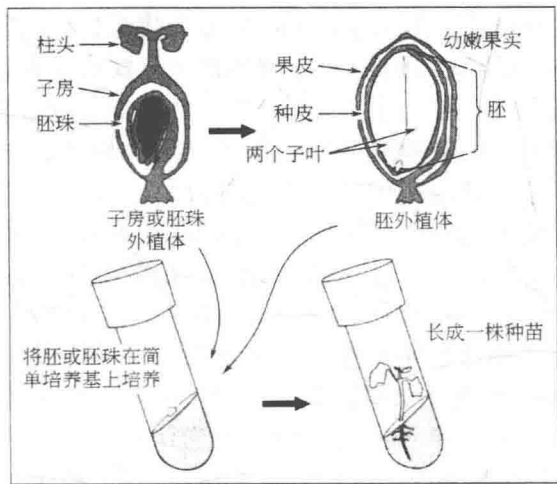


图1-3 胚和胚珠的培养

曾为胚培养特意研发出很多培养基，有些已是现在常用培养基的先驱者。通常，成熟胚仅需要无机盐同时补以蔗糖，但未成熟胚则需附加维生素、氨基酸、生长调节剂，有时还需椰乳或其他胚乳提取物。

Raghavan (1977b) 赞成用甘露醇，这样可取代胚珠液 (ovular sap) 所施加给未成熟胚的高渗透压。从体外培养胚得到的种苗也像其他组培所得小植株一样移植到容器外来炼苗。

(3) 分离根的培养

很多植物可从初生根或侧根根尖开始建立根的培养。最适外植体是带有初生根或侧根分生组织的一小段根。这些外植体可从表面消毒的种子，并在无菌条件下萌发后的小种苗上得到。如很小的根分生组织生长在合适培养基上会继续正常生长，但只会产生包含初生根和侧根根系如图1-4所示，不会形成有结构的茎枝芽 (shoot buds)。

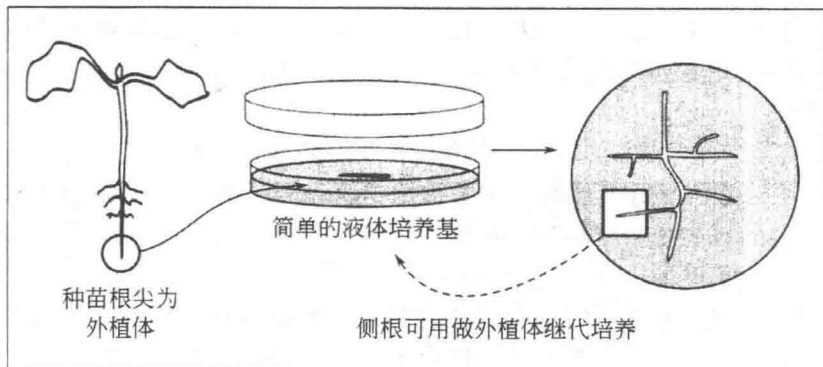


图1-4 根的培养方法



发现根能在没有茎枝组织条件下生长是近代组培科学首批重要进展之一。根的培养一开始就吸引了研究工作者的大量注意，而且很多不同的植物种的根培养都获得了成功。

一般按根培养的难易程度把植物分成三类：①三叶草（clover）、曼陀罗（Datura）、番茄和柑橘的分离根可长期生长（Said和Murashige, 1979），有些似可无限地长。只要进行常规继代即可。②很多木本植物种的根分离后根本不能培养成功。③豌豆、亚麻和小麦根能长期培养，但最终还是生长逐渐衰退，或得不到足够侧根作继代培养的外植体。

分离根培养不能维持生长是由于培养过程中诱导出分生组织的休眠或“衰老”，此现象又与根在体外培养生长时间的长短有关。将休眠的分生组织转至新鲜培养基上并不能促其再生长，这可能是由于在根尖积累了天然存在的生长素类的生长物质（naturally occurring auxinic growth substances）。因此，如添加抗生长素或细胞分裂素类的生长调节剂常能促进根培养的生长，但如在培养基中添加生长素或赤霉素会造成更快地停止生长。转接根尖无法维持根培养的培养物，有时将它新生的侧根分生组织作继代外植体却能继续根培养。

分离根通常是用相当简单的培养基如White培养基（1954），含2%蔗糖。用液体培养基生长的比在固体培养基上生长得好且快。这可能是由于从固体培养基根不太容易获得盐分，氧摄取也受限制。根能接受硝态/铵态混合氮源（mixed nitrogen/ammonium source），但一般在单纯铵态氮源上不能生长。各种植物种，甚至品种和品系的根培养基所需生长调节剂，特别是生长素（auxin）是不同的。

分离根的培养已被很多目的不同的研究者所用，特别有价值的是研究线虫的侵染。该方法能在无菌条件下培养这种寄生物。根培养也被利用使有益的菌根真菌（mycorrhizal fungi）生长，以及研究豆科植物与固氮细菌Rhizobium结瘤过程。为了研究固氮作用，对一些标准技术散了各种特别的修饰，使根可在无硝酸盐培养基上生长（Raggio等，1957; Torrey, 1963）。

与某些其他的组培不同，根培养表现出高度遗传稳定性。因此，有建议认为根培养为储存某些植物种的种质（germplasm）提供了便利方法。对某些合适的植物种，根培养为植物快繁提供了一种很方便的外植体来源，不过这是有条件的，只有当茎枝可从根上再生时它才是有用的。有几种途径可使用这种方法，不过这些途径也只对少数植物属起作用，因这些植物天然就有从整个根系或切割分离的根上产生吸根（suckers，即从根上长出茎枝）或新茎枝的能力。具体有以下三种途径：

①直接形成不定枝 (adventitious shoots); ②间接从根愈伤长出茎枝或胚; ③根尖分生组织转化为茎枝分生组织从而长出多个茎枝。

有些植物种切割分离的根较容易形成不定枝, 园艺家常用扦插根 (root cuttings) 的方法来扩繁植物。尽管已知很多植物的根体外培养时, 从根上可直接形成再生枝, 但并未广泛用于快繁。把肉质根 (fleshy root) 的一段作原初外植体非常可能形成新茎枝。切下的根段是有极性的, 不定枝永远在近极端 (proximal end) 发生, 而新根从远极端生出 (distal end)。假若能诱导茎枝直接从分离的根培养物上形成, 则此法在快繁上是很有用的。遗憾的是, 在它们从分离根上直接产生茎枝的能力方面有高度遗传特异性。常常是在培养基中添加细胞分裂素后可诱发茎枝, 成功的实例有:

Seeliger (1956), 培养刺槐 (*Robinia pseudoacacia*) 的根, 从中得到茎枝芽; Torrey (1958), 使旋花属植物 (*Convolvulus*) 根培养物上长出茎枝芽; Zelcer等 (1983), 从烟草属 (*Nicotiana*) 三种植物根上直接诱导出茎枝。茄 (*Solanum melongena*) 上也可以。但普通烟 (*N. tabacum*) 和 *N. petunoides* 的茎枝只能从根的愈伤上形成。Mudge等 (1986), 这是最令人乐观的报告。认为从木莓 (或山莓, raspberry) 根培养物可诱发茎枝的技术可为体外扩繁此植物提供既便利又节省劳力的方法。

有些植物种的再生可以从根的愈伤组织长出, 如番茄、苘蓝 (*Isatis tinctoria*, 苘蓝属, 十字花科)、颠茄 (*Atropa belladonna*, 颠茄属, 茄科)。

从某些兰花 (orchids) 根尖所形成的愈伤上有胚的发生 (embryogenesis) 并最终形成类原球茎体 (protocorm-like bodies), 这些兰花是: *Catasetum trulla* *Catasetum* (龙须兰属); 树兰 (*Epidendrum obrienianum*, 树兰属); 小金蝶兰 (*Oncidium vanicosum*, 文心兰属)。

改变根分生组织已被定型的性质, 不形成根却产生茎枝, 这是很稀罕的事件, 却在体外培养的香果兰 (*Vanilla planifolia*, 香果兰属) 上发生了。其根尖分生组织的静止区 (quiescent centre) 被改变为茎枝分生组织, 结果是被培养的根本长出小植株或多个小枝条 (Philip和Nainar, 1986)。Ballade (1971) 将豆瓣菜 (*Nasturtium officinale*, 豆瓣菜属, 十字花科) 单节上的初生根作外植体, 并放一块结晶的激动素在每个外植体上, 同时转至含0.05%葡萄糖的培养基上, 结果竟产生出茎枝分生组织。

(二) 无组织结构细胞的培养

1. 愈伤的培养

愈伤是植物细胞以无组织结构的方式繁殖的一团相互粘连又无定形的组织 (amorphous tissue)。它常常是由昆虫、微生物或逆境 (stress) 所引



起的创伤在完整植物的体内或表面诱发的。将完整植物一小块（外植体）放在无菌条件下的可供给营养的培养基上就能启动愈伤的形成。在内源生长调节剂或将外源生长调节剂加至培养基中时，原本处于静止状态的细胞代谢受刺激开始活跃的细胞分裂。在此过程，整个植物体内一直在进行的细胞分化和特异化会逆转使外植体产生新组织，这种组织正是由分生组织和非特异化细胞型所组成。

在脱分化过程中，休眠细胞中的典型储存物质逐步消失。组织中形成新分生组织，它们产生出未分化的薄壁细胞，这些细胞没有任何结构特征是它们所来源的器官或组织所具有。虽然愈伤保持呈无结构状态，但随着生长不断进展，某些特异化的各类细胞又会形成。这种分化的出现，器官的形成似乎是随机的，不过可能与形成各种器官如根、茎和胚的形态发中心（centre of morphogenesis）相关。通常说植物再生就是指从无结构组织的培养物——即从头开始（denovo）——产生植株的过程。

虽然大多数试验都是用高等植物组织进行的，但愈伤培养物也能从裸子植物（gymnosperms）、蕨类植物（fern）、藓苔植物（mosses）和菌藻植物（thallophytes）建立。整株植物的很多部位都有很好的在体外培养中增殖的潜能，但经常会发现从某些器官建立愈伤培养物更容易一些。年幼的分生组织是最好、最合适的，但植物较老部分的分生组织和形成层（cambium）

也能产生愈伤。对双子叶植物（dicotyledonous species）选择什么组织来起始愈伤培养是最重要的。单子叶植物（monocotyledons）组织产生愈伤的能力差别最显著，如大多数谷物的愈伤的生长只能从结合子胚、发芽中的种子、种子的胚乳或种苗的中胚轴（mesocotyl）和极幼嫩叶片或叶鞘得到，至今未能从成熟叶组织得到过。甘蔗的愈伤培养只能从幼嫩叶或叶基部组织起始，从成熟或半成熟叶片是得不到的。

同一个器官内，关系密切的组织其愈伤启动能力也可能是不同的。例如 *Hordeum distichum*（两棱大麦，也是粮食作物）从其正在发育的种子中取出早期分化的胚来培养，愈伤即从具有分生组织的中胚轴增生而不是从与之紧密相邻小盾片（scutellum）和胚根鞘（coleorhiza）的细胞生出。

从原初外植体上形成的愈伤叫原初愈伤（primary callus）。从原初（或原生）愈伤切出小块组织长出的叫次生愈伤（secondary callus）。继代培养常常可延续多年，但保留时间越长的愈伤其细胞遭受遗传变异的危险性也越大。

愈伤组织并非只有单一种类。不同品系的愈伤（strain of callus）在外形、颜色、紧密程度方面（compaction）是不一样的，而且来自同一单个外