

李浚明 编译

植物组织培养教程

[第2版]



中国农业大学出版社

植物组织培养教程

(第 2 版)

李 浚 明 编 译

中国农业大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

植物组织培养教程/李浚明编译. —2版. —北京:中国农业大学出版社,
2002.6
ISBN 7-81066-466-2/S·348

I. 植… II. 李… III. 植物-组织培养-教材 IV. Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 016685 号

责任编辑:孟 梅

封面设计:郑 川

出 版 中国农业大学出版社
发 行
经 销 新华书店
印 刷 北京鑫丰华彩印有限公司
版 次 2002 年 6 月第 2 版
印 次 2004 年 1 月第 4 次印刷
开 本 16 印张 21.5 千字 382
规 格 787×980
印 数 20 001~30 000
定 价 27.00 元

图书如有质量问题本社负责调换

社址 北京市海淀区圆明园西路 2 号 邮政编码 100094

电话 010-62892633 网址 www.cau.edu.cn/caup

内 容 简 介

本书是1992年首次问世,后来又数次重印的《植物组织培养教程》一书的第二版,它系统地反映了过去一个世纪国内外植物组织培养的研究成果,全面地展现了在新世纪里植物组织培养的发展和应用前景。全书内容包括了对植物细胞、组织、器官和原生质体等的培养,以及对体细胞遗传学的介绍,以期给读者一把入门钥匙,从而使读者可以一步步迈入这个在细胞全能性基础上建立起来的奇妙王国。本书可作为农林和生物类各专业大学生的基本教材,也可供研究生及具有中等以上文化程度的实际工作者参考。

封面图片:苜蓿(*Medicago sativa*)的体细胞胚胎发生过程。自左至右:体细胞胚诱导之前的苜蓿愈伤组织,经3周诱导之后的体细胞胚,6周之后的体细胞胚,9周之后由体细胞胚长成的小植株(据 Plant Genetics, Inc., 1985, 有改动)

第二版前言

去年末,出版社要求我把1992年出版、后又几经重印的那个“编译本”修订再版。有这个必要吗?我原以为,进入新世纪后,那个编译本早该寿终正寝、销声匿迹了。所以我当时没有给予肯定的答复。思索了几天,觉得,第一,出版社可能有出版社的道理;第二,那个编译本中的缺憾正好可借机弥补一下;第三,当时正值冬闲,田里也无活可干,于是就答应了下来。

增补修订,我的理解是:内容上,要与时俱进;形式上,要推陈出新。为了实现这两个目标,我当然自己首先要学习,于是每逢图书馆开馆(正值寒假,不是每天开馆),就去里面翻书。虽然我完全没有把握是否翻遍了所有新书(有些书可能借出去了,有些可能根本没有买),但无论如何我找到了不少好书(见参考书目),对这次修订帮助很大,中文的如孙敬三和桂耀林所编《植物细胞工程实验技术》等,英文的如Razdan的《植物组织培养导论》,Pierik的《高等植物离体培养》,以及Hall主编的《植物细胞培养方法》等。除了书之外,我还参阅了一些中英文的原始文献,包括论文和综述,以及一些研究生的学位论文,其中凡是引用了的我都在本书中注明了出处,但在参考文献中恕未能一一列出。请允许我向所有这些作者以及在这次修订中给了我各种形式帮助的朋友表示我的深深的谢意。

在大地回春的时刻,我终于完成了出版社的嘱托,交稿之后,又要回到田间去劳作了。限于我的水平,也限于我的时间,尽管我尽了很大努力,书中肯定还会有不妥之处,遗漏之处,甚至错误之处,我诚恳地期待着读者和专家们的批评指正,并预向你们致以衷心的感谢。

编译者

2002年3月5日

编译者的话

组织培养是植物生物技术的主要分支之一。20 世纪 80 年代,国内外出版了大量的有关书籍,只是其中多数都是学术会议文集,或是由不同作者分别撰写的综述汇编,适合作教材者为数极少,惟独两位印度学者 S. S. Bhojwani 和 M. K. Razdan 所著“Plant Tissue Culture: Theory and Practice”一书(Elsevier, 1983)则完全是出于教学需要编写的,内容全面,编排系统,既讲方法,又讲原理,因此在该书问世后不久,同样是出于教学需要,我们就将它全部译成了中文,遗憾的是当时没能找到出版的机会。

若干年过去了,在此期间植物组织培养的某些领域又有了重要进展,因此在此次出版之前,我们对原书的一些章节做了若干增补和删改,如第 1 章“绪论”是由编译者重新编写的,第 2 章和第 3 章则根据我国有关实验室的设备现状和实际工作需要做了少量变动,如删掉了对手套箱的介绍,增补了对一些化学药品溶剂的介绍等,第 6 章增加了“人工种子”1 节,第 7 章增加了我国近几年来发表的几种培养基配方等,第 9 章增加了体细胞遗传学内容,第 12 章关于禾谷类植物原生质体培养 1 节和第 13 章关于电融合及外源 DNA 摄入两节重写,资料增补到 1990 年。此外,对若干章的附录也做了一些删减或补充,如在第 12 章中增加了细胞筛孔径与“目”换算表及离心机转数与离心力的列线图。

在本书出版准备过程中,编译者得到了中国农业大学外国农业教材中心朱湄副主任的支持和帮助,得到了本实验室研究生张宏同志和助理实验师田慧琴同志的多方协助,在本书完稿之后,又承韩碧文教授在百忙中惠予审阅并提出宝贵的修改意见,编译者谨向他们致以由衷的谢意。

最后,编译者诚恳地期待着专家和读者对本编译本的疏漏之处的批评指正。

李浚明

1991 年 2 月

植物组织培养常用缩略语

ABA	abscisic acid	脱落酸
AC	activated charcol	活性炭
BA	6-benzyladenine	6-苄基腺嘌呤
BAP	6-benzylaminopurine	6-苄氨基嘌呤
CCC	chlorocholine chloride	氯化氯胆碱(矮壮素)
CH	casein hydrolysate	水解酪蛋白
CM	coconut milk	椰子汁
CPW	cell-protoplast washing (solution)	细胞-原生质体清洗液
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid	2,4-二氯苯氧乙酸
DMSO	dimethylsulfoxide	二甲基亚砷
EDTA	ethylenediaminetetraacetate	乙二胺四乙酸盐
FDA	fluorescein diacetate	荧光素双醋酸酯
GA ₃	gibberellic acid	赤霉素
IAA	indole-3-acetic acid	吲哚乙酸
IBA	indole-3-butyric acid	吲哚丁酸
<i>in vitro</i>		离体
<i>in vivo</i>		活体
2-iP	6-(γ,γ -dimethylallylamino)purine 或 2-isopentenyladenine	二甲基丙烯嘌呤
KT	kinetin	激动素
LH	lactalbumin hydrolysate	水解乳蛋白
LN	liquid nitrogen	液氮
lx	lux	勒克司(照度单位)
$\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$		微爱因斯坦/平方米秒 (光通密度单位)
ME	malt extract	麦芽浸出物
mol	mole	摩尔

NAA	α -naphthaleneacetic acid	萘乙酸
NOA	naphthoxyacetic acid	萘氧乙酸
PCV	packed cell volume	细胞密实体积
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
PG	phloroglucinol	间苯三酚
PVP	polyvinylpyrrolidone	聚乙烯吡咯烷酮
r/min	rotation per minute	每分钟转数
TDZ	thidiazuron	(一种细胞分裂素类物质)
TIBA	2,3,5-triiodobenzoic acid	三碘苯甲酸
UV	ultraviolet (light)	紫外光
V/V	volume/volume(concentration)	容积/容积(浓度)
W/V	weight/volume(concentration)	重量/容积(浓度)
YE	yeast extract	酵母浸提物
ZT	zeatin	玉米素

目 录

1 绪论	(1)
1.1 植物组织培养的一般概念	(1)
1.2 植物组织培养的发展简史	(3)
1.2.1 探索阶段(20 世纪初至 20 世纪 30 年代中)	(3)
1.2.2 奠基阶段(20 世纪 30 年代中至 50 年代末)	(4)
1.2.3 迅速发展阶段(20 世纪 60 年代至现在)	(6)
1.3 组织培养与农业的关系	(8)
2 实验室的基本设备和一般技术	(10)
2.1 引言	(10)
2.2 设备	(10)
2.2.1 培养基室	(10)
2.2.2 培养容器	(11)
2.2.3 培养室	(11)
2.3 技术	(12)
2.3.1 玻璃器皿和塑料器皿的清洗	(13)
2.3.2 灭菌	(13)
2.3.2.1 培养基	(13)
2.3.2.2 玻璃器皿、塑料器皿和器械	(15)
2.3.2.3 植物材料	(15)
2.3.2.4 接种区	(16)
附录 2.1 植物组织无菌培养的一般步骤	(17)
附录 2.2 组织培养工作所需的各种用具	(18)
3 培养基	(20)
3.1 引言	(20)
3.2 培养基成分	(22)

3.2.1 无机营养成分	(22)
3.2.2 有机营养成分	(24)
3.2.2.1 含氮物质	(24)
3.2.2.2 碳源	(25)
3.2.3 植物激素	(25)
3.2.3.1 生长素	(26)
3.2.3.2 细胞分裂素	(26)
3.2.3.3 赤霉素和脱落酸	(26)
3.2.4 其他成分	(27)
3.2.4.1 活性炭	(27)
3.2.4.2 硝酸银	(27)
3.2.4.3 抗生素	(28)
3.2.5 琼脂及其他固化剂	(28)
3.2.6 pH	(29)
3.3 培养基的选择	(29)
3.4 培养基的制备	(32)
附录 3.1 植物组织培养基常用化合物分子量	(34)
附录 3.2 原子量	(37)
附录 3.3 常用植物生长激素浓度单位换算表	(37)
4 细胞的全能性与器官发生	(39)
4.1 引言	(39)
4.2 愈伤组织形成的条件	(40)
4.3 愈伤组织形成的过程	(41)
4.3.1 诱导期	(41)
4.3.2 分裂期	(41)
4.3.3 形成期	(42)
4.4 愈伤组织增殖的方式	(42)
4.5 愈伤组织状态的调控	(43)
4.6 细胞分化	(45)
4.6.1 影响维管组织分化过程的因子	(45)
4.6.1.1 生长素	(45)
4.6.1.2 蔗糖	(47)

4.6.1.3 细胞分裂素和赤霉素	(47)
4.6.1.4 物理因子	(48)
4.6.2 细胞分裂对木质部分化的必要性	(48)
4.7 器官分化	(49)
4.7.1 影响茎芽分化的因素	(51)
4.7.1.1 化学因素	(51)
4.7.1.2 物理因素	(53)
4.7.2 茎芽分化的解剖学和细胞学	(53)
4.7.3 表皮细胞的全能性	(54)
4.7.4 冠瘿瘤细胞的全能性	(56)
附录 4.1 愈伤组织鲜重的测定方法	(57)
附录 4.2 愈伤组织干重的测定方法	(58)
5 体细胞胚胎发生	(59)
5.1 引言	(59)
5.2 体细胞胚胎发生的例证	(60)
5.3 体细胞胚胎发生的方式	(61)
5.4 影响体细胞胚胎发生的因子	(62)
5.4.1 生长调节物质	(62)
5.4.2 氮源	(64)
5.4.3 其他因子	(65)
5.5 体细胞胚胎发生的解剖学和细胞学	(66)
5.6 体细胞胚的成熟过程	(67)
5.7 体细胞胚与合子胚的比较	(67)
5.8 由单细胞到植株	(68)
5.9 长期培养物形态发生潜力的丧失	(69)
5.9.1 遗传说	(69)
5.9.2 生理说	(69)
5.9.3 竞争说	(69)
5.10 细胞全能性的实际应用	(70)
5.10.1 概说	(70)
5.10.2 人工种子	(71)
5.11 结束语	(73)

附录 5.1 诱导体细胞胚胎发生的实验程序	(74)
1. 胡萝卜	(74)
II. 柑橘属植物	(74)
6 细胞培养	(76)
6.1 引言	(76)
6.2 单细胞的分离	(76)
6.2.1 由完整的植物器官分离单细胞	(76)
6.2.1.1 机械法	(76)
6.2.1.2 酶解法	(77)
6.2.2 由培养组织中分离单细胞	(78)
6.3 悬浮培养	(78)
6.3.1 一般技术	(79)
6.3.1.1 分批培养	(79)
6.3.1.2 连续培养	(80)
6.3.1.3 由悬浮细胞再生植株	(81)
6.3.2 细胞悬浮培养的培养基	(82)
6.3.2.1 条件培养基	(82)
6.3.2.2 培养基的振荡	(83)
6.3.3 悬浮培养细胞的同步化	(83)
6.3.3.1 饥饿法	(84)
6.3.3.2 抑制法	(85)
6.3.4 悬浮培养中细胞生长的计量	(85)
6.3.4.1 细胞计数	(85)
6.3.4.2 细胞密实体积(PCV)	(85)
6.3.4.3 细胞鲜重	(85)
6.3.4.4 细胞干重	(85)
6.3.5 培养细胞活力的测定	(86)
6.3.5.1 相差显微术法	(86)
6.3.5.2 四唑盐还原法	(86)
6.3.5.3 荧光素双醋酸酯(FDA)法	(86)
6.3.5.4 伊凡蓝染色法	(86)
6.4 单细胞培养	(87)

6.4.1 单细胞培养方法	(88)
6.4.1.1 平板培养法	(88)
6.4.1.2 看护培养法	(89)
6.4.1.3 微室培养法	(90)
6.4.2 影响单细胞培养的因子	(91)
6.5 细胞培养的应用	(93)
6.5.1 突变体选择	(93)
6.5.2 天然化合物的生产和生物转化	(94)
6.5.2.1 细胞的大量培养	(94)
6.5.2.2 天然化合物的生产	(95)
6.5.2.3 生物转化	(96)
6.5.2.4 细胞固定化	(96)
6.5.3 诱导多倍性	(98)
附录 6.1 由篱天剑叶片分离叶肉细胞的机械方法	(98)
附录 6.2 酶解法分离烟草叶肉细胞的程序	(98)
附录 6.3 大麦悬浮培养和植株再生	(99)
I. 愈伤组织的诱导	(99)
II. 悬浮培养的建立	(99)
III. 植株再生	(100)
附录 6.4 细胞密实体积(PCV)的测定方法	(101)
7 单倍体的产生	(103)
7.1 引言	(103)
7.2 通过花药培养产生单倍体的潜在可能性	(103)
7.3 花药培养的一般程序	(105)
7.3.1 取材	(105)
7.3.2 预处理	(106)
7.3.3 消毒	(106)
7.3.4 接种	(106)
7.3.5 培养方式和培养条件	(106)
7.3.6 花粉植株的诱导	(107)
7.3.7 壮苗和移栽	(107)
7.3.8 单倍体植株的二倍化	(108)

7.4 影响雄核发育的因子	(110)
7.4.1 基因型	(110)
7.4.2 生理状态	(110)
7.4.3 花粉发育时期	(111)
7.4.4 药壁因子	(111)
7.4.5 培养基	(112)
7.4.5.1 基本培养基	(112)
7.4.5.2 碳源	(114)
7.4.5.3 植物激素	(114)
7.4.5.4 活性炭	(115)
7.5 雄核发育单倍体的个体发生过程	(115)
7.5.1 花粉单倍体的诱导	(115)
7.5.2 雄核发育早期过程的4种途径	(116)
7.5.3 雄核发育晚期过程的差异	(116)
7.6 禾谷类植物花药培养中白化苗的形成	(119)
7.7 离体花粉培养	(119)
7.8 通过远缘杂交产生单倍体	(122)
7.9 在高等植物中单倍性的意义	(123)
7.9.1 概述	(123)
7.9.2 单倍体在作物改良中应用的实例	(124)
7.10 结束语	(125)
附录 7.1 烟草花药培养实验程序	(126)
附录 7.2 小麦花药培养实验程序	(127)
附录 7.3 水稻花药培养实验程序	(128)
 8 三倍体的产生	 (129)
8.1 引言	(129)
8.2 胚乳培养历史的回顾	(129)
8.3 胚乳愈伤组织的建立	(132)
8.3.1 胚乳发育时期的影响	(132)
8.3.2 培养基与激素的影响	(133)
8.3.3 胚在胚乳培养中的作用	(134)
8.3.4 其他因素的影响	(134)

8.4 由胚乳愈伤组织再生植株	(135)
8.4.1 器官发生途径	(135)
8.4.2 胚胎发生途径	(137)
8.5 胚乳再生植株的染色体倍性变异	(137)
8.6 胚乳培养的应用	(138)
8.7 结束语	(138)
附录 8.1 由杜仲成熟干种子胚乳培养再生完整植株	(139)
9 离体授粉	(141)
9.1 引言	(141)
9.2 术语释义	(142)
9.3 离体授粉的方法	(143)
9.4 胚珠和子房培养	(144)
9.4.1 胚珠培养	(144)
9.4.2 子房培养	(147)
9.5 离体授粉中影响结实的因子	(148)
9.5.1 外植体	(148)
9.5.2 培养基	(149)
9.5.3 培养条件	(151)
9.5.4 基因型	(151)
9.6 离体授粉的应用	(151)
9.7 结束语	(152)
附录 9.1 通过离体柱头授粉获得节节麦与普通小麦的属间杂种	(153)
附录 9.2 通过离体胎座授粉获得栽培烟草和黄花烟草的种间 杂种	(154)
10 合子胚培养	(155)
10.1 引言	(155)
10.2 合子胚培养方法	(155)
10.2.1 植物材料	(159)
10.2.2 消毒方法	(160)
10.2.3 胚的剥离	(160)
10.2.4 胚乳看护培养	(161)

10.3	对培养基和培养条件的要求	(163)
10.3.1	无机盐	(165)
10.3.2	碳水化合物和培养基的渗透压	(166)
10.3.3	氨基酸和维生素	(166)
10.3.4	天然的植物浸提物	(168)
10.3.5	生长调节物质	(169)
10.3.6	培养基的 pH	(169)
10.3.7	培养条件	(169)
10.4	胚柄在胚培养中的作用	(169)
10.5	早熟萌发	(171)
10.6	胚分化不全的种子在培养中的形态发生	(173)
10.7	显微手术实验	(174)
10.8	寄生性被子植物胚和种子的培养	(177)
10.9	胚愈伤组织的形态发生潜力	(178)
10.10	通过“胚拯救”获得远缘杂种	(179)
10.10.1	杂种幼胚在人工培养基上培养	(180)
10.10.2	杂种幼胚的胚乳看护培养	(181)
10.10.3	杂种幼胚的愈伤组织培养	(181)
10.11	胚培养在植物改良中的其他应用	(184)
10.11.1	单倍体的产生	(184)
10.11.2	缩短育种周期	(184)
10.11.3	种子生活力的快速测定	(184)
10.11.4	稀有植物的繁殖	(184)
10.12	结束语	(185)
附录 10.1	小麦未成熟胚愈伤组织培养	(185)
附录 10.2	水稻成熟种子盾片愈伤组织培养	(186)
11	原生质体的分离和培养	(188)
11.1	引言	(188)
11.2	原生质体的分离	(189)
11.2.1	原生质体分离的方法	(189)
11.2.1.1	机械法	(189)
11.2.1.2	酶解法	(190)

11.2.2 影响原生质体产量和活力的因子	(191)
11.2.2.1 材料来源	(191)
11.2.2.2 前处理	(192)
11.2.2.3 酶处理	(193)
11.2.2.4 渗透剂	(194)
11.2.3 原生质体的净化	(195)
11.2.3.1 沉降法	(195)
11.2.3.2 漂浮法	(195)
11.2.3.3 界面法	(195)
11.2.4 原生质体活力的测定	(196)
11.3 原生质体培养	(196)
11.3.1 供体植物的选择	(196)
11.3.2 原生质体培养基	(197)
11.3.2.1 成分	(197)
11.3.2.2 渗透剂	(197)
11.3.3 培养条件	(198)
11.3.4 培养方法	(198)
11.3.4.1 固体培养——琼脂糖包埋	(198)
11.3.4.2 液体培养	(199)
11.3.4.3 双层培养	(199)
11.3.5 植板密度	(200)
11.3.6 低密度培养的对策	(200)
11.3.6.1 培养基	(200)
11.3.6.2 培养方法	(200)
11.3.7 细胞壁的形成	(202)
11.3.8 细胞分裂和愈伤组织的形成	(203)
11.3.9 植株再生	(204)
11.3.10 禾谷类植物原生质体培养	(204)
附录 11.1 用一步法制备烟草叶肉细胞原生质体	(206)
附录 11.2 细胞筛孔径(μm)与目换算表	(207)
附录 11.3 离心机转数与离心力的列线图	(208)
附录 11.4 用血球计数板计数原生质体的方法	(208)
1. 血球计数板的构造	(208)