

目 录

前言	1
一、入门的向导	1
(一) 什么是植物组织培养	1
(二) 历史的回顾	2
(三) 先进的生物技术	4
(四) 生产上的应用	5
二、基本设备与操作技术	10
(一) 实验室的设置	10
(二) 玻璃器皿和仪器	14
(三) 基本技术操作	19
三、器官培养	31
(一) 茎尖培养	31
(二) 叶片培养	39
(三) 茎段培养	41
(四) 花器官培养	46
四、胚胎培养	52
(一) 离体胚培养	53
(二) 胚珠培养	57
(三) 胚乳培养	61
(四) 试管内受精	65
五、细胞培养	69
(一) 悬浮细胞培养	69
(二) 单细胞培养	72
(五) 植物原生质体培养和细胞融合	77

六、试管苗的形成途径	84
(一) 不定芽	84
(二) 胚状体	91
(三) 小鳞茎	95
(四) 原球茎	97
(五) 芽生芽	99
七、试管苗移栽	101
(一) 移栽前准备	101
(二) 移栽技术	102
(三) 移栽后养护管理	102
八、器官发生的调节与控制	106
(一) 植物激素的影响	106
(二) 培养基中化合物与物理性状的影响	113
(三) 培养中环境条件的作用	117
(四) 培养材料的生理状态和遗传特性的影响	121
九、植物组织培养在繁殖上的应用实例	127
(一) 康乃馨茎尖培养工厂化生产种苗	127
(二) 甜叶菊组织培养繁殖幼苗	131
(三) 海岸红杉茎段培养繁殖苗木	134
(四) 桉树试管无性繁殖优树	137
十、植物试管繁殖的应用和前景	143
(一) 试管繁殖的应用	143
(二) 植物试管繁殖的前景	148
附录	151
(一) 术语解释	151
(二) 培养基附录表	162
(三) 常用一些营养物质、激素的英汉对照及其分子量表	179
(四) 度量衡表(公制)	180
(五) 蒸气压力与蒸气温度关系表	181
(六) 缩写与符号简表	181
(七) 主要激素的 ppm 和 M 的互换计算表	183

一、入门的向导

自古以来，植物在土中生，庄稼在田里长。可是到了今天，人类不仅能够在试管里培育植物，而且能不用植物种子，却用植物体的一小块组织或它们的细胞，甚至一粒花粉来进行繁殖。这些奇迹是怎么出现的呢？下面就是我们要向大家介绍的知识内容。

（一）什么是植物组织培养

人类不用种子，却可在试管里直接培育出植物，这就是运用植物组织培养技术后创造出来的奇迹。所谓植物组织培养，就是指在无菌条件下，将离体的植物器官（如根、茎、叶、茎尖、花、果等）、组织（如形成层、表皮、皮层、髓部细胞、胚乳等）、细胞（如大孢子、小孢子及体细胞）以及原生质体，培养在人工控制的环境里，使其再生形成完整的植株。植物组织培养通常是指所有类型的植物无菌培养技术。它可以切取植物体各个部分来进行培养试验。植物体上被切取分离下来的部分称外植体。狭义的组织培养，是指植物各种器官的外植体增殖而形成的愈伤组织的培养。在植物的无菌培养技术中，由于人们切取植物外植体的来源不同，按照培养的对象又可将植物组织培养区分为如下几类：幼苗及较大的植株培养——“植物培养”；成熟的及未成熟的离体胚培养——“胚胎培养”；根尖、根段、茎尖、茎段、叶片、花器官各部分以及未成

熟的果实等培养——“器官培养”；从植物的各种器官外植体增殖而形成的愈伤组织——“愈伤组织培养”；能保持较好分散性的离体细胞或很小的细胞团的液体培养——“细胞培养”；用机械、酸处理或酶溶解等方法去除细胞壁，分离出原生质体进行培养——“原生质体培养”。

植物组织培养技术的发展，有力地推动了生物学科中有关领域的研究，其中有些研究成果并已在生产上发挥作用，产生了一定的经济效益，为植物工厂化生产迈开了可喜的一步。因此，目前世界各国都很重视植物组织培养这项技术，可以预料，它必将对发展生物科学显示出越来越重要的作用。

（二）历史的回顾

植物组织培养技术能够有今天这样的水平，自有它的历史发展过程。简要地回顾这段历史，对于我们进一步了解这项技术的理论和实际应用意义以及更好地开展今后工作是很必要的。

远在1839年，细胞学家施旺(Schwann)在他发表的细胞学说中，就曾这样说过：“每个细胞应该可以独立生活和发展，假如具有的条件正如它存在于有机体内一样。”1902年，德国著名植物学家哈伯兰特(Haberlandt)根据这个学说的理论，第一个大胆提出，要在实验室里的试管中人工培育植物。他预言离体细胞在生理上、发育上具有潜在的全能性。这一预言阐明了一个植物体内的所有的活细胞都可能发育成为独立的个体，可以增殖，具有分化成为完整植物的潜在能力。于是细胞全能性的概念，就成为植物组织培养的理论依据。这一伟大的科学预见，很快传遍了世界各地。成千上万的植物

研究者为哈伯兰特的大胆预言所折服，决心沿着哈伯兰特指引的方向去探索。

然而，植物组织培养从理论概念的形成到实践的成功，却经历了漫长而艰苦的岁月。哈伯兰特本人及以后的德国植物胚胎学家汉宁（Hanning）等人，都为了论证上述的观点，用植物的叶、茎、根、花的小块组织或它们的细胞，进行过离体的无菌培养试验，但由于受到当时水平和设备等条件的限制，虽经二十几年的不断摸索和试验，却进展很小，没有得到满意的结果和取得重大的突破。但这些前人的大量试验，为以后的发展打下了基础。

植物组织培养的真正建立和发展，从1937年开始才算有了突破。美国科学家怀特（White）首先建立了组织培养的综合培养基，其化学成分均为已知的化合物，还发现了B族维生素对培养离体根的生长具有重要意义，以及认识到吲哚乙酸（IAA）在植物生长中的控制作用。同时，怀特和法国植物学家高斯雷特（Gautheret）等人的研究，第一次成功地用烟草的茎段形成层细胞和胡萝卜根的小块组织，在人工培养的条件下，使细胞增殖和诱导出愈伤组织。但是他们没有诱导培养出器官来。试验虽然取得了可喜的进展，但是如何从试管中培养出芽、根的问题依然没有解决。

1948年，我国植物生理学家崔滋和美国科学家斯柯格（Shoog）合作，经过反复实验，终于解决了这个问题。他们利用植物激素处理培养的组织块，诱导培养获得了器官的分化。从此揭开了离体培养中的组织能发生器官的奥秘。

到了1958年，一个振奋人心消息传向世界各地，那就是美国植物学家斯蒂瓦特（Steward）等人，用液体悬浮培养法把胡萝卜的体细胞经胚状体的发育途径，终于得到了完整植株，

同时能开花、结实,使哈伯兰特在五十年前的预言——细胞的全能性——得到了证实。特别是六十年代初科金 (Cocking) 等人开始用真菌的纤维素酶分离植物原生质体获得成功,为近年来不断发展的原生质体融合技术、体细胞杂交等遗传工程的迅速发展创造了条件。

近二十年来,由于培养的植物细胞在一定条件下所表现的全能性规律,使组织培养技术在生产上的应用得到了重视与发展,已逐渐成为农业、林业、园艺等方面的重要研究手段。同时,它又进一步促进了有关基本理论的研究,诸如器官的形态发生、细胞组织的生长分化、代谢调节、遗传变异等基本理论,都越来越受到各国科学家的重视。由于分子生物学和遗传工程的发展也促使组织培养技术日趋完善。

从上述简单的历史回顾中,我们可以看出,植物组织培养研究工作大致经历了这样四个时期:1839—1902年为提出理论假设的萌芽时期;本世纪五十年代前是建立植物组织培养技术的初建时期;五十年代后为研究植物生理调控及实验形态学的活跃时期;六十年代后为植物组织培养开始在生产上应用,使植物生产走向工厂化的应用时期。当然,随着科学技术的不断发展,植物组织培养这门新技术将日益普及深入,成为人们培育新品种和提高粮食、蔬菜、果树、林木、园林花卉和其他经济植物产量和质量的新的手段。

(三) 先进的生物技术

在人类历史的长河中,曾出现过几次世界性的工业革命。目前人们又在迎接新的世界工业革命的到来,其中生命科学、遗传工程、生物技术的开发就都是这次工业革命的重要

内容，而植物组织培养技术也作为一项先进的生物技术引起了人们的重视。

近年来，由于分子生物学以及分子遗传学和细胞生物学的概念和方法直接与植物组织培养技术结合了起来，因而给植物科学的研究带来了完全崭新的面貌，并不断取得成果，无论在理论上还是在实践上都给我们以新的启示。

目前已经发展和建立的一套比较完整的植物组织培养技术，将有助于开展遗传工程的研究。利用植物组织培养的技术，可以把带有遗传信息的分子、特异的基因、片段、颗粒、细胞器以及整个细胞引入到完整的植株中，从而改造和创造出新的植物品种。

最近在利用植物组织培养技术上，开展了两个方面的工作。一是在细胞水平上，开展了细胞杂交、细胞器移植、变种筛选、病毒和微生物的吸收等工作。二是在分子水平上，开展了遗传信息、分子的吸收，通过不同基因载体（噬菌体、细菌质粒等）把不同来源的基因导入植物细胞、体外酶促基因重组等工作。细胞水平或分子水平上遗传特性的改变，可以经过适当的培养而反映到整株植物上。这对于培育植物新品种来说，是非常理想的手段。虽然目前离真正达到自由设计和改变遗传信息的要求，尚有很大一段距离，但我们确信，充分发挥植物组织培养技术的特点，使它在理论上和技术上日益完善，一定会引起遗传工程研究方面的突破，为人类作出新的贡献。

（四）生产上的应用

1. 繁育良种 植物组织培养技术在生产实践上具有多种用途。特别在育种上，为植物培育优良品种开辟了新的途

径。例如，通过植物花粉(小孢子)培养和未受精子房与胚珠的培养能诱导出愈伤组织，使它形成单倍体植株，然后经染色体加倍，恢复为二倍体，培育成新的品种，这就是通常所谓的单倍体育种。通过单倍体育种方法能获得纯系的新品种。我们知道农作物或园林花卉，总的说来是异花授粉的，要获得纯系品种较难。要取得植物的纯系，一般需经过 7~8 个世代的自交，才能获得遗传上稳定的性状。形成纯系后，子代不易产生性状分离。但是，就林木植物来说，它们从种子发芽，经过生长发育，达到能开花结实，一般要经历 20 年以上的时间，而为了获得稳定的纯系进行自交，更需要有 100 年以上的时间。即使能够进行自交，结实率往往也很低。但是如采用单倍体育种法育种，时间即可大大缩短，并且能够控制杂种分离，简化育种程序，提高选择效率。目前采用花粉培养试验成功的植物已达五十多种。由我国首创的真正通过单倍体育种法在大面积生产中取得应用的植物已有烟草、水稻、小麦等作物。

在育种工作中，试图通过一种植物和另一种亲缘关系比较远的植物杂交来培育优良品种，困难较大。因为杂交后得不到种子。但是如果利用植物组织培养技术，将胚珠离体培养，并使异体花粉在胚珠上萌发受精(试管受精)，就能克服受精过程中遇到的生理上和遗传上的种种障碍而获得杂种。例如，在国际上已获得甘蓝属种间杂交的杂种。

胚胎培养也是杂交育种中值得运用的一种方法。大家知道，远缘亲本相互杂交后获得的胚珠在处于未成熟状态时，就停止生长，这是由于杂交胚得不到充足胚乳提供营养等多种原因造成的。遇到这种情况时，可把胚取出，置于人工合成的培养基上，促使胚胎继续发育或使种胚发芽形成幼苗。我国

曾利用胚胎培养的方法克服了杂种中胚败育的现象，并用离体胚培养培育出早熟桃京早 3 号，使其成熟期提早 15~20 天。

在辐射育种或化学诱变中，也可运用组织培养技术。我们以往用放射线、化学物质等方法来进行诱发突变，但在生长点细胞群中能真正产生突变的只有极少数细胞，当这个细胞群分裂增殖时，常形成由变异细胞群和正常细胞组织的嵌合体，这种个体多数是不能利用的，而只有纯粹的突变细胞群才能形成变异个体。为了获得完全的突变体，常要作不定芽的反复切割，显得非常麻烦。当改用植物组织培养的方法后，即可作突变细胞培养，并由此产生小植株，既能求得变异性状一致，也可使试验步骤简化。

近十年中，国内外所进行的植物体细胞杂交研究也都采用了植物组织培养技术，经过原生质体分离、培养和融合等一系列操作试验，最后获得体细胞杂交植株，培育出新的优良品种。在国外用体细胞杂交方法已获得烟草和矮牵牛的杂种。我国开展这方面的研究工作虽然较迟，但也已从水稻、小麦、黑麦、大麦、玉米、豌豆、烟草、胡萝卜、油菜、蚕豆、矮牵牛等植物中分离出质量较好的原生质体；此外，也进行了不少的体细胞杂交，其中烟草、胡萝卜和矮牵牛的原生质体通过诱导培养，已分化成完整植株。这项工作的迅速发展，使它有可能成为培育新品种的又一途径，它将更广泛地组合各种基因型，从而创造出更符合人们需要的新品种。

2. 快速繁殖大量种苗 植物组织培养还可以作为名贵植物或园林植物的快速大量繁殖方法之一。例如，由芽变的优良果树枝条、名贵的花卉和优质的树种，可以在短期内用组织培养方法进行大量繁殖。世界上许多国家已用它来迅速

繁殖各种植物,使试管植物“商品化”,繁殖植物“工厂化”。兰花在通常的栽培条件下,一般要经过四至五年才能分根一次,尤其是名贵品种的兰花,更是繁殖速度慢、数量少。1960年,植物学家莫赖尔(Morel)运用植物组织培养方法繁殖兰花得到成功,并大大加速了繁殖速度。据报道,新加坡每年可从繁殖兰花中收入200万美元的外汇。在甘蔗、大豆、烟草、香蕉、咖啡等经济植物方面,也都广泛地应用植物组织培养技术来进行无性繁殖。比起常规的扦插、嫁接方法,它的速度要快几倍、十几倍,甚至几千倍。我国素有世界花园之称,花繁品茂,如能更好地推广这种新技术,必将创造出巨大的经济价值。

3. 获得去病毒植株 利用植物组织培养技术,还可通过对植物茎尖分生组织的诱导培养,得到去除病毒病的康健植株。这种方法已被不少国家用于生产。我国在这方面也取得了较令人满意的成果。如用去病毒的培养方法,以马铃薯为材料,得到了八个无病毒的种苗,用这种方法能去掉X、Y、A、M、S病毒及奥古巴花叶病毒。经过去病毒后培养出来的马铃薯植株,增产效果明显。未去病毒的10株马铃薯只产薯块0.8斤,而去病毒的可产8.9斤。

4. 植物产品工厂化生产 在植物组织培养技术的应用上,最吸引人的成就是研究了组织培养过程中次生代谢产物的合成。这在1982年于日本召开的第五届国际植物组织培养会议上得到了充分的反映。在提交大会讨论、宣读的论文中,有关这方面的论文占了相当大的比例。近年来,由于植物组织和细胞培养技术的发展以及单细胞培养的成功,使得植物细胞象微生物那样在大容积的发酵罐中进行发酵培养已成为可能。并大量生产了那些微生物所不能合成的产物:如药用植物中的有效成份(人参中的皂甙、皂甙元、油烷酸等,喜树

中的抗癌物质喜树碱)、香料植物中的精油成分,以及工业生产中需要的一些次生产物(生物碱、甾醇等)和初生产物(如细胞团、酶等)。一旦植物细胞的发酵罐培养能获得全面成功,那么就能使原来必须在药圃或大田中栽培的植物,都可由工厂进行生产了。这是一件多么有意义的事啊!

1968年,日本明治制药公司在古谷等人的指导下,用13万公升的培养罐开始进行人参培养细胞的工业化生产,从而使植物细胞发酵罐培养由试验阶段进入了生产阶段。此外,较有希望进行工业化生产的品种还有:用苦瓜培养细胞生产类胰岛素;用喜树茎段愈伤组织生产喜树碱;用莨菪培养细胞生产天仙子胺、L-莨菪碱和红古豆碱;用十蕊商陆培养细胞生产植物病毒抑制剂与抗菌素;用东莨菪培养细胞生产蛋白酶抑制剂;用油麻藤培养细胞生产左旋多巴等等。可以预见,今后将还会有更多种类的植物产品进入工业化生产的行列。

二、基本设备与操作技术

(一) 实验室的设置

开展植物组织培养需要有一些基本的设置。通常应有：配制培养基的化学实验室；进行接种操作的无菌室；培养接种后材料的培养室；进行观察和记录的细胞观察实验室以及天平室等。如条件许可，还应有摄影、冲晒等各种房间。各室面积的大小可根据实验的规模、种类、人力、物力和建筑的情况而定。

1. 化学实验室 配制培养基的实验室只需具有一般的化学实验室的条件就足够了，不需特殊的装置，其主要设备如下：

实验台——台面要能够耐酸、耐碱，其旁并有能放置各种器皿、用具的规格、大小不一的抽斗和橱。

试管晾干架——用来放置需晾干的玻璃器皿或其他器具。

快速干燥箱或烘箱——供玻璃器皿或其他用具干燥与干热消毒用。

家用冰箱——保存易分解、变质的药品、试剂和培养基的母液。

药品橱——放置常用的药品。

电炉——加热用，功率最好在1千瓦至2千瓦。

高压消毒锅——进行培养基、无菌水和其他器具的灭菌

消毒(此锅也可放置在走廊里或另一房间)。

转椅或高凳——供实验人员操作之用。

水斗——洗涤器具。

2. 接种室 它是进行组织培养无菌操作的场所。离体的植物器官,组织的消毒,接种培养,材料的继代转接都需要在无菌条件下进行。如无接种室,可用接种箱代替。人们大多在超净工作台上进行无菌操作(图1)。但为了减少污染,延长超净工作台的使用寿命,最好将超净台放置在干净,消毒的房间即无菌室内。该室的墙壁,地坪应便于洗刷,墙顶应安装紫外线杀菌灯,以便每次接种前照射杀菌。

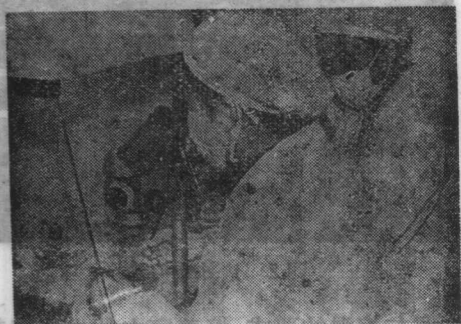


图1 超净台上茎尖剥制和接种

在无菌室的进口处,还应设置缓冲室。该室是工作人员进入无菌室前换上接种衣与帽子的地方。缓冲室与无菌室之间应安装滑门,使空气进出只限于入口处,切勿采用拉门。

3. 培养室 植物组织的培养比起微生物的培养需要较长的时间,同时还必须考虑“光”的影响。通常,一年四季的温度保持在最适宜一般植物生长的 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 范围内,为了满足这些条件,培养室内需要有以下设置(图2)。

空气调节器——供夏季降低室内温度之用，如还有制热的功能，在冬天可起到加温的作用。

加热器——补充冬季室内的升温。

控温仪——控制恒温。

培养架——放置培养器皿。其上装有作为辅助光照的日光灯。

自动计时器——自动控制光照时间(如有市售的音片定时器)。

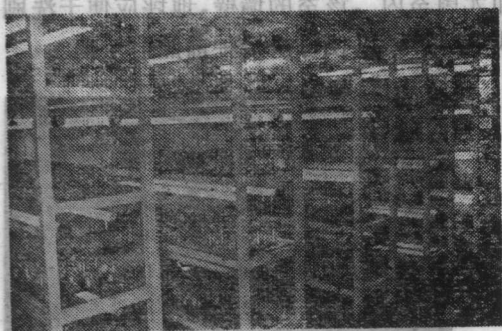


图2 培养室一角

由于光照与控温的要求，培养室内的电能消耗较大，为了节约能源，设计时可从以下两个方面着手：一是要求门、窗、墙的保温性能良好，以避免因室内温度受外界气温的影响而增加能源的消耗。一般说，窗需安双层的，墙最好也由双层砖砌成，中间并垫充一些保温材料，或使用保温性能好的空心砖；门应厚实，并能关闭紧密。另外房间的高度不宜过高，以2.5米左右为宜。二是为减少因辅助照明所消耗的电能，在进行培养室的布局时，应尽量利用自然光照，窗子的采光要好。

4. 细胞观察实验室 为了观察所培养的材料在各个时

期的变化，需要借助于体视显微镜(俗称解剖镜)、高倍显微镜、切片机、染色等设备进行细胞组织学实验。放置显微镜的台面应平整、稳固，木制的或水泥制的都可，室内要保持洁净。

5. 天平室 由于称量的需要，不仅要有一般的粗天平、扭力天平，而且要有精确度为万分之一的全自动或半自动电光天平。精密天平要求放置在高燥、清洁、遮光的房间内，以便延长天平的使用寿命和保证称重的精确性，天平也须安放在平稳的木制或水泥制的台面上，该室可小一些。

为了使用方便，在考虑以上各室的布局时，最好能将它们安排在同一层楼面上，并按照植物组织培养的程序，连续排列。先配制培养基的化学实验室，然后依次设置高压消毒、培

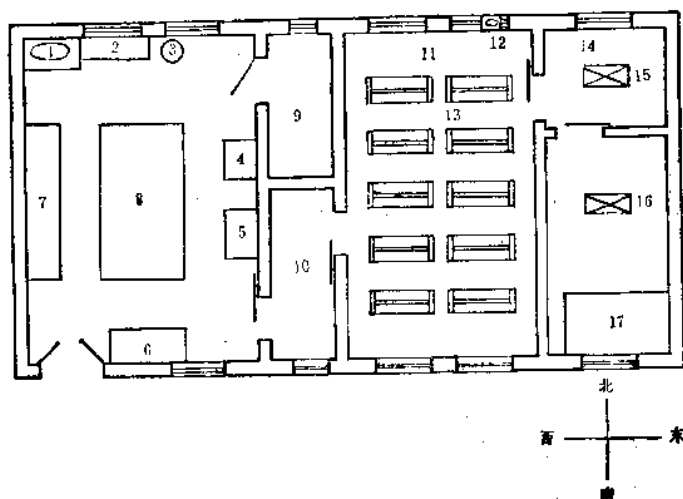


图3 组织培养实验室的设置

- 1 水斗 2. 晾干架 3. 污物桶 4. 烘箱 5. 冰箱 6~8. 工作台
9. 天平室 10. 缓冲室 11. 培养室 12. 空调 13. 培养架
14. 准备室 15~16. 紫外光灯 17. 接种台

养室和接种室。无菌接种室应与培养室相连，这样接种好的材料就可立即进入培养室培养，使各实验室有机地组合成一条流水线(图3)。

(二) 玻璃器皿和仪器

植物组织培养所需要的器皿和仪器，一般可从化学实验和微生物实验中选用，也可根据研究的目的而配置。下面举一些常用的、并在市场上有供应的器具。

1. 玻璃器皿 在植物组织培养中，培养基的配制和培养需用大量的玻璃器皿(图4)。这些器皿最好选用碱质溶解度小的优质硬玻璃，这样在需要长期培养时就可不受器皿的影响。目前国外有用聚乙烯制的容器来代替玻璃器皿。

(1) **三角烧瓶** 这是种适宜于培养基配制和培养材料作静置培养时用的器皿，容量较大。制备培养基时，需要有500、1000、2000、3000毫升等各种规格的三角烧瓶，而作为盛放培养基及培养材料时，为了使无菌操作进行方便，所用的三角烧瓶以大口的为好，通常用得最多的规格是50、100、150毫升的三角烧瓶。

(2) **试管** 试管在以少量的培养基进行多种试验或花药培养时经常使用，以口径大些，长度短些较为方便，常用的规格有20×150毫米和25×150毫米。

(3) **培养皿** 它不仅用于固体培养基上的平板培养，而且还用作无菌种子的发芽，也能在接种时用作材料分离的容器。常用的规格以直径为90、60、120毫米的较多。

(4) **T型试管** 一种用于旋转式液体培养中的试管。其试管形状呈“T”字型，本体横长，中间进出口管短，本部直径

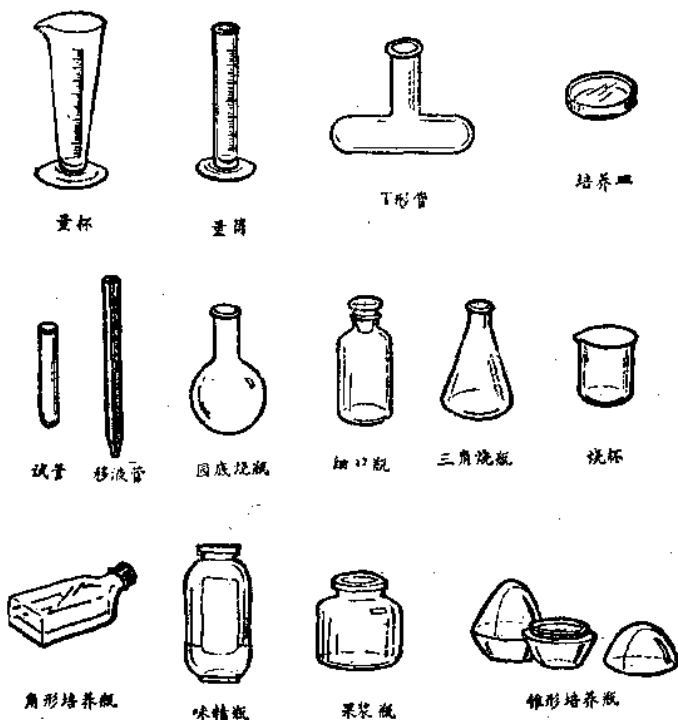


图4 组织培养中常用的玻璃器皿

比口部大。这样在旋转培养时，管内的溶液就不致因倾斜而泄出，同时使培养材料随着旋转角度的不同，时而浸在溶液中，时而离开溶液沾于管壁。

(5) 试剂瓶 是贮藏各种试剂与培养基母液的容器，通常市售的有棕色与白色两种。为了防止藻类的生长繁殖和避免某些药剂见光后氧化，有时也要使用棕色的瓶子。目前市上已有聚乙烯制品的瓶子，它在胚乳液和植物激素溶液需冷