

植物组织培养

桂耀林 马 诚 编著



生物学基础知识丛书

科学出版社

植物组织培养

桂耀林 马 诚 编著

科 学 出 版 社

1 9 8 5

内 容 简 介

植物组织培养作为生物工程研究中的一项重要技术手段，近年来发展十分迅猛。本书编著者结合科研工作收集了大量的文献资料，用通畅的文字着重介绍了植物组织培养的基础知识、理论和方法，及其在理论研究上和实际应用上的意义，并适当地反映了这项技术的研究进展。这是一本科普读物，适于中等文化程度的植物学工作者、中学和大专院校生物、农、林专业的师生以及广大植物爱好者参考。

植 物 组 织 培 养

桂耀林 马 诚 编著

责任编辑 王龙华

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1985年10月第 一 版 开本：787×1092 1/32

1985年10月第一次印刷 印张：5 5/8

印数：0001—7,100 字数：124,000

统一书号：13031·2939

本社书号：4121·13—10

定价：1.05元

序

勤劳勇敢的祖国各族人民，正怀着热切的心情和必胜的信念，团结在中国共产党的周围，为加速实现四个现代化而进行新的长征。在这个极不平凡的历史新时期，大力提高整个中华民族的科学文化水平具有重大的现实意义和深远的历史意义，是当前全党和全国人民的紧迫任务。为此，科学出版社组织编辑了各种自然科学基础学科的普及丛书，《生物学基础知识丛书》就是其中之一。

生物学是研究生命的科学。这一门规模宏伟、内容丰富的自然科学，近二三十年来得到了蓬勃的发展，使得它的地位越来越突出。生物学的许多新成就已经或正在引起农业、医疗卫生、工业和国防建设发生巨大的变革。由于生物学与其它一些科学互相结合、互相渗透和互相促进，衍生出许多新的分支学科，并已深入到分子和量子水平，探讨生命现象的内在规律，证明生命活动的物质性。因而，不难预料，生物学将成为认识自然、改造世界、推动国民经济和人类健康事业的强大武器，将为整个人类社会的进步作出更大的贡献。

我相信，《生物学基础知识丛书》的出版将有利于生物科学知识的进一步普及和提高，将使更多同志掌握和利用生物科学，从而在自己工作中作出更大的贡献，也将有利于培育富有创造性的新一代生物学家。衷心希望这套丛书为加速实现祖国四个现代化增添应有的力量。

贝 时 璋

《生物学基础知识丛书》

植物学编委

主任编委	汪振儒		
副主任编委	吴相钰	高信曾	
编委	(按姓氏笔划排列)		
	王文采	刘金鉴	朱家桢
	张述祖	陈阜东	陈绍煜
	郑慧莹	胡昌序	祝廷成
	顾巧英	桂耀林	
责任编辑	高信曾		

354669

目 录

一	绪论	1
	(一) 为什么要进行植物的组织培养	1
	(二) 植物组织培养研究的发展	2
	(三) 组织培养中常用的术语	9
二	实验室的设备和操作技术	12
	(一) 实验室的设备	12
	(二) 培养基和培养基的配制	19
	(三) 实验材料的选择和消毒	31
	(四) 接种与培养	35
	(五) 培养条件	40
	(六) 植物细胞组织学的鉴定技术	43
三	愈伤组织培养	53
	(一) 愈伤组织的诱导	53
	(二) 愈伤组织发生的形态学和细胞学	57
	(三) 影响愈伤组织细胞分化的因素	61
	(四) 愈伤组织培养中的形态发生	64
四	器官培养	79
	(一) 离体根的培养	79
	(二) 茎尖培养	85
	(三) 叶的培养	91
五	胚胎培养	95
	(一) 胚胎培养的应用前景	95
	(二) 离体胚培养	97
	(三) 胚珠和子房培养	108
	(四) 试管受精	114
	(五) 胚乳培养	116

六	花药培养	127
	(一) 花药培养与单倍体育种	127
	(二) 怎样培养和获得花粉植株	130
	(三) 单倍体植株的移栽和加倍	139
七	细胞培养	144
	(一) 细胞悬浮培养	144
	(二) 单细胞的生长	147
八	植物原生质体的分离和培养	152
	(一) 分离原生质体	152
	(二) 原生质体的培养	154
	(三) 原生质体和病毒感染	157
	(四) 植物原生质体融合和体细胞杂交	158
	(五) 植物和动物细胞融合	162
	(六) 杂种细胞的鉴定、筛选和分离	162
	(七) 原生质体摄取细胞和细胞器	164
	(八) 植物细胞的遗传操作	166
	编后记	171

一 绪 论

(一)为什么要进行植物的组织培养

植物组织培养，在广义上讲是指在人工的操纵下，把植物的一个器官、一种组织或单个细胞从植物体取出后放在玻璃容器里并在供给适当营养物质的条件下，使它们得以继续生存或发展的一种培养方法。我们知道，植物体内的各种组织或细胞，在正常情况下是受各组织或细胞之间的相互作用和影响而彼此制约的。因此，要用原体植物来探讨器官是如何发生的？影响器官发生或形态建成的机理及其生理变化等等问题就较为困难。对于从事理论研究来说，组织培养这一手段却在相当程度上克服了上述困难。一方面，因为组织培养所用的材料是离体的，减少了植物体其他部份的干扰，同时，它又是在预知的控制条件之下，影响组织或细胞活动的因素相对较为简单，这样，人们就可有意识地去选择或设置一些能引起某种生理生化变化的因素进行处理，以便探索离体培养下组织或细胞的发展变化规律及研究植物器官或组织形态建成的机理。这些由组织培养方法所带来的优点，正可以作为利用原体植物进行研究时的一种理想的补充。

近二十年来，利用植物组织培养的方法不但在探求植物学的基本理论问题上已成为一个重要的手段，而且在应用上也逐渐表现出了它的具大潜力。根据不同的研究目的，这门技术已开创和发展了各种研究方法。如通过生长在琼脂上或液体悬浮培养液中的无一定组织结构的细胞块(愈伤组织)研究生物合成和生长的各种变化；用根、茎、叶的切段或愈伤组织的培养物研究分化，形态发生和植株再生的途径；用茎

尖培养方法来快速繁殖植物和产生无病毒品系；利用胚培养和试管受精等克服杂种不育或远缘杂交不亲和性以及通过花药和花粉的培养培育单倍体植株等等。最近，这门技术还发展到可以利用原生质体的分离与培养而进行细胞融合和体细胞杂交等新的领域。由于在离体培养条件下植物细胞所具有的那种能重新形成新个体的“全能性”，从而使这一技术在遗传育种、保持优良种质、加速植物的无性繁殖及培育和保持无病毒品系等的应用中，取得了越来越多的成功。

随着农业、林业、园艺等学科发展的需要，目前，应用植物组织培养来从事各种研究的人已越来越多，涉及的问题也越来越广。可以预料，在进一步应用此技术于理论研究及实际应用方面，它将为我国社会主义建设发挥更大作用，做出更多的贡献。

(二)植物组织培养研究的发展

远在1902年，德国植物学家哈伯兰德 (G.Haberlandt) 就曾预言，植物细胞具有全能性，每个细胞都像胚胎细胞那样，可以经过在体外培养成为一棵完整的植株。他也曾尝试用培养植物叶片细胞来证明他的设想，结果没能成功，但他所提出的科学假说却一直指引着许多植物学者去攀登新的高峰。

1937年前后，法国科学家高特里特 (R. T. Gautieret) 和诺比考特 (Nobecourt) 几乎同时培养胡萝卜根的小块组织，并使细胞增殖获得成功。美国科学家怀特 (White) 用烟草的茎段形成层为材料还成功地进行了组织培养和继代培养，他们的工作为植物组织和细胞培养技术的发展奠定了基础。

但是，仅仅是细胞的增殖还是不够的，要怎样才能有效地从离体组织或器官中诱导植株再生呢？这个问题直到1948年才由斯科克（F. Skoog）和崔激做了较好地解答。他们发现，在培养烟草茎段和髓的培养基上加上适当比例的腺嘌呤和生长素可以控制植物的组织长苗或长根，也就是说当腺嘌呤/生长素的比例高时产生芽，比例低时形成根。从而确定了腺嘌呤/生长素的比例是控制芽和根形成的一个重要条件。1956年米勒（C. O. Miller）等又发现，一种叫激动素的细胞分裂素，它促使成芽的效果比腺嘌呤竟高出三万倍，从而激动素取代了腺嘌呤。于是又建立了激动素/生长素比例的控制器官分化的激素模式。到目前为止，这种激素“控制论”的理论在植物组织培养研究中仍起着指导作用。

斯图尔德（F. C. Steward, 1958）的胡萝卜研究工作，为组织培养这一领域打开了新的局面，他用液体的悬浮培养法把胡萝卜的体细胞经胚状体途径培养成了植株，并且开花结实（图1-1）。这项重大的突破，不但证实了哈伯兰德的“细胞全能性”的设想，而且也为组织培养中研究器官建成和胚胎发生开创了一个新的领域。

从五十年代以来，组织培养技术日新月异，由静止的固体培养发展到液体培养，其中又分悬浮培养、微室培养、看护培养、平板培养等等。特别是六十年代初科金（E. C. Cocking）等人用真菌的纤维素酶分离植物原生质体成功，它为近年来新发展的原生质体融合细胞杂交工作的迅速开展创造了条件。组织和细胞培养的研究，不但促进了对植物激素的研究工作，并且带动了形态、细胞、生理、生化、遗传育种、林业、医药等一系列学科的进展。

在农业、林业及园艺等方面，组织和细胞培养技术已经用来培育作物新品种，复壮特殊的无病毒无性系，以及快速繁

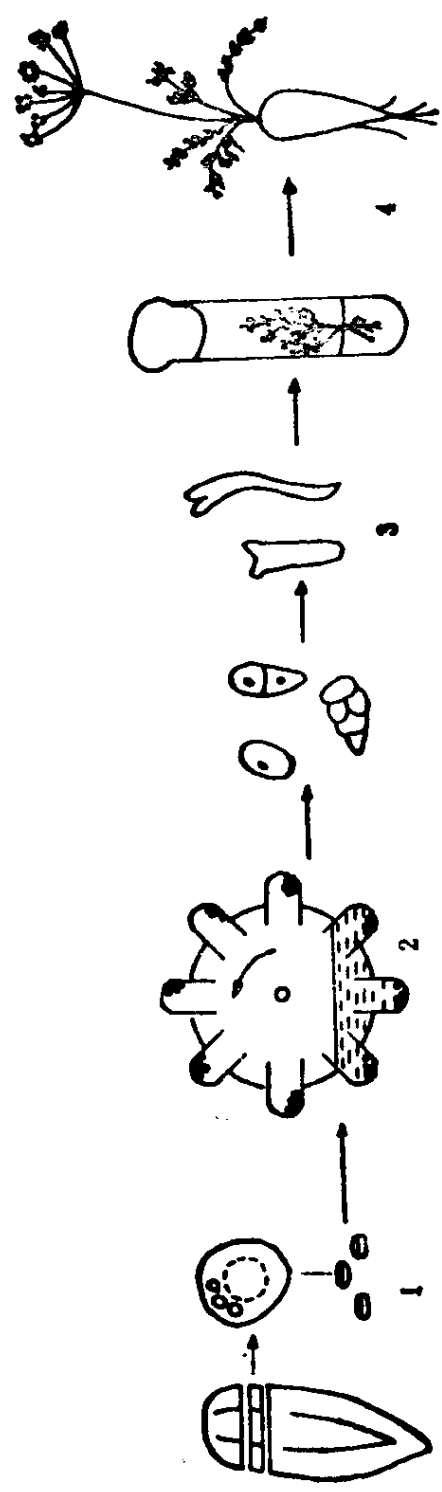


图 1-1 图解示从胡萝卜细胞培养产生胚状体和小植株开花结实的过程

1. 用打孔器从胡萝卜块根上取得圆盘状外植体 2. 外植体置于 25°C 下进行转动

培养 3. 由外植体分离出的细胞增殖并发育为胚状体 4. 胚状体移于琼脂培

养基上并长成植株和开花结籽

殖植物的无性系等。下面就几个方面的内容来概述一下组织培养研究的情况：

在木本植物方面，用组织培养法一般经愈伤组织再分化长出无根小苗，再转换培养基诱导生根就能长出完整植株。目前获得再生植株的木本植物已有二十余种，其中裸子植物有松、红杉、榧树、麻黄、苏铁、泽米、云杉、侧柏、铁杉等；被子植物有桉树、榆、槐、杨、桦木、泡桐、苹果、山楂、柑



图 1-2 猕猴桃茎段培养中的植株再生

1. 愈伤组织上出现芽点
2. 从愈伤组织上先分化出叶片
3. 茎伸长后的猕猴桃小苗

桔、猕猴桃（图 1-2）、油橄榄等；单子叶植物有油棕等。桉树在澳大利亚用幼芽培养的方法每年可繁殖出40万株树苗。柑桔，自1968年伦甘（T. S. Rangan）首创用珠心组织诱

导胚胎发生以来，目前已有几十个栽培品种可进行无性繁殖，用化学诱变化还可产生新的变种。杨树和猕猴桃也可用叶片、茎尖、茎段等培养得到大量完整植株，有希望不久可用于生产。其他，如用茎尖培养获得柑桔的无病植株；用胚乳培养以诱导柑桔、苹果、猕猴桃、桃等果树产生三倍体苗也正在探索。

在花卉及草本植物方面，用无性繁殖系快速繁殖植株，使植物的生产工厂化和试管品种商品化，是目前植物组织和细胞培养在应用上的新动向。

法国的莫里尔 (G. Morel) 利用茎尖的生长锥培养出兰花的无病毒苗。它的效率比用兰花根部分出的小植株进行栽种要高出成千上万倍。而且培养出的苗具有提纯复壮的意义。现在，法、美、日、泰、新加坡等国都有这种“兰花工业”，用这种方法繁殖的兰花已有35个属 150 余种。还有不少国家正在推广马铃薯、甘蔗、菠萝、香蕉、兰花的“试管品种”。我国素有世界花园之称，名贵花卉品类繁多，如果能更好地推广这种新技术，必将创造巨大的经济效益。

茎尖培养可以除去马铃薯的病毒，不少国家已用于生产，我国也获得了 8 个无病毒种苗并已推广 10 万株 (植物所，1977)。用这个方法能去掉 X、Y、A、M、S 病毒及奥古巴花叶病，增产效果也很明显，据一次实验统计未去病毒的 10 株马铃薯只产薯块 0.8 斤，去病毒的可达 8.9 斤。

甘蔗、烟草、菠萝、香蕉、咖啡、草莓等经济作物都可用这种方法扩大无性系繁殖和选育良种。

在作物育种上，用花药培养和原生质体培养及细胞杂交法可以改良植物品种。离体花药培养的单倍体育种法能比常规方法短得多的时间里得到作物的纯系。我国在水稻、小麦、玉米、小黑麦、小冰草、烟草、茄子、辣椒、油菜、橡胶、

杨树等约20多种作物中已得到单倍体植株，其中有多种是我国首先诱导成功的。此外，我国还用这个方法培育了烟草、水稻、小麦的新品种，有的已大面积用于生产。

原生质体培养和体细胞杂交是植物学的一个新的分枝。目前已用烟草、胡萝卜、矮牵牛等十种植物的原生质体培养得到再生植株，在烟草属及矮牵牛属中还得到了体细胞种间杂种和马铃薯、番茄的体细胞属间杂种。细胞杂交的研究，的确是一个前景诱人的课题，有些人在设想将一些亲缘关系较远的豆科植物和水稻、小麦、棉花等非豆科植物的细胞融合在一起，创造出完美的新品种——具固氮能力的“水稻豆”、“小麦豆”等等。

在工业上，植物组织和细胞培养可用来生产药物或其他的天然产物，如具有特殊价值的次生产物：甾类化合物、类萜、生物碱和酚等。在培养方法上也将逐渐由试管转向用发酵罐进行悬浮培养或深层培养等大型工业化的方向发展。

总之，组织和细胞培养是一项有很大潜力的新兴学科，是“绿色革命”的一个重要方面。但是，要想使这门技术在植物学基本理论问题的研究及实际应用（特别是植物繁殖等）方面普遍采用，目前仍存在不少障碍。在理论方面，器官分化的机理仍是一个难题，如在细胞分化中，是什么因素调控一个细胞走上特殊的分化途径？是什么力量在操纵着从未分化的组织团块发生出有组织结构并再分化出植株？以往关于激动素/生长素控制器官分化的理论虽然已在不少植物的组织培养中得到证实，但对激素刺激作用在分子水平上的作用机制并不了解，对激素如何促使细胞向特化细胞群发展及通过有秩序的细胞排列而变为具根或具芽的顶端分生组织的作用机理缺少了解。显然，深入探讨和认识器官形态建成以前的细胞变化及对那些特性有调节作用的细胞内的生化变化是极

为必要的，这样，会更有利于使植物组织和细胞培养技术的潜力得到充分发挥。

在组织培养过程中，如何获得一个稳定的增殖细胞群，这是另一个重要问题。所谓“稳定”是指遗传稳定性、染色体数目的稳定性及在生理特性上如生长速度的稳定性和生物合成能力等等。在组织培养过程中，快速增殖的细胞群是很容易发生变化的，最常见的如出现各种倍性染色体数目、器官发生能力减退或丧失及失去生物合成能力等等，这些变化表明了外植体的遗传表达能力在丧失，它们使组织培养技术的应用受到很大的限制。因此，除了研究这些生理状态变化的作用机理及与植物形态发生的关系之外，我们还应更好地了解基因表达的生化调控机理，以便设计出更好的培养方法以减少或甚至避免培养物发生不为人们希望的变化，从而建立一个稳定的适于研究、实验和繁殖的细胞体系。

至于应用，首要的问题之一是建立成功的培养。目前，我们已可从苔藓植物，蕨类植物，裸子植物和被子植物的根、茎、叶和生殖器官的高体材料中，在某些刺激因素的作用下，几乎均可增殖而产生无结构的愈伤组织并在适当成分的无菌营养培养基上进行继代培养。但从愈伤组织诱导器官发生并不都那么成功，特别是木本植物，目前难度仍然很大。另外，对于有价值的经济植物来说，要想进行快速繁殖以用于实际，还必须达到：（1）具有较高的增殖系数，（2）由外植体再生成植株的时间短，（3）移苗时具有较高的成活率等，以使适于经济植物无性繁殖系的工业化和商品化的要求。否则效率低、成本高仍难达到真正的实用的目的。

当然，作为一种大有发展前途的新技术，组织培养中存在的问题只是一些前进中的问题，只要大家不断地努力探索，可以预料，在不久的将来，这门技术对于扩大无性繁殖

系，贮存和运输植物种质，用花药培养、细胞杂交培育新的作物品种等方面将会有更多的突破。

(三) 组织培养中常用的术语

在植物组织培养的研究中，有些术语缺少明确的概念，以致常常引起混乱。为了更好地识别研究中的对象，我们选择了文献中一些认为是较合适的术语进行了综合，以便使用。

胚胎培养 成熟的或未成熟的胚的离体培养。

器官培养 这是一个较为广泛的概念，包括来自于根尖、茎尖、叶原基、花器官的各部分原基或成熟的花器官的各部分以及未成熟果实的培养。

茎尖培养 为较小的仅带几个叶原基或少量幼叶的茎端部分的培养。通常用 1—10 毫米大小的茎尖外植体来加速植物的无性系繁殖。在采用“茎尖培养”这一名词的同时，也有人不恰当的与“分生组织培养”或“生长点培养”这些术语混同起来。由于真正的顶端分生组织或生长点只是茎尖中很小的一部分，在茎尖中其高度也不超过 0.1 毫米，故这样的外植体是很难取得的，即使取得，培养的成活率很低且生长十分缓慢。所以在概念上要把茎尖培养与生长点培养分开。

悬浮培养 主要是指在液体培养基中，由保持良好分散状态的单个细胞和小的细胞集聚体的培养。由于它们的状况还没有达到形成一个组织的水平，故有时也称之为细胞培养。细胞培养这一术语也适用于指进行单个细胞（至少在开始培养时与别的细胞没有物理上的接触）生长的各种试验。目前，除了原生质体的悬浮培养外，似乎还没有一种理想的完全由单个细胞组成的悬浮培养。

细胞的全能性 在离体培养下，植物的体细胞或性细胞被诱导发生器官分化和再生为具有与母体植株相同遗传信息的植株的能力。

外植体 一般指用于发生一个培养无性系的植物或器官的切段。当进行继代培养，将培养组织切开移入新的培养基时，这样的一种切段（或分割的部分）也可称之为外植体。

愈伤组织 从植物各种器官的外植体增殖而形成的一种无特定结构和功能的细胞团。

继代培养 由最初的外植体上切下新增殖的组织，继续转入新的培养基上培养。按照类似的方式，外植体可以经过连续多代的培养。

无性繁殖系 由同一个外植体反复进行继代培养后所得一系列的无性繁殖后代即无性繁殖系。在细胞培养中，由单细胞形成的无性系则可称之为“单细胞无性系”。

器官发生 在组织培养或悬浮培养中，由培养物形成芽或形成根的现象。

胚状体（或不定胚） 为培养过程中由外植体或愈伤组织产生的与正常受精卵发育方式类似的胚胎结构现象。根据其发育阶段不同也可采用正常合子胚胚胎发育各时期中的常用术语，如原胚、球形胚、心形胚、鱼雷形胚等来描述。

维管结节 在愈伤组织培养中，在愈伤组织内出现的一种由维管组织细胞所组成的细胞团。

分化 导致细胞或组织形成不同结构并引起功能或潜在发育方式改变的一种过程。

脱分化 已分化的细胞在一定因素作用下重新恢复分裂机能并改变原来的发展方向而沿着一条新的途径发育的过程。在脱分化过程中，细胞失去其原有的结构和功能而形成