

S718.42

13.8

Tissue Culture in Forestry
J. M. Bonga D. J. Durzan
(editors)

Martinus Nijhoff/
Dr W. Junk
publishers 1982

根据荷兰马丁那斯尼霍夫/琼克出版商1982年版本译出

树木组织培养

[美]J. M. Bonga D. J. Durzan 主编

阙国宁 郭达初 李金田 译

中国林业出版社出版(北京西城区刘海胡同七号)

新华书店北京发行所发行 农业印刷厂印刷

850×1168毫米32开本 10.5印张 243千字
1988年2月第1版 1988年2月第1次印刷

印数 1—2,500册 定价: 2.70元

ISBN 7-5038-0002-X/S·0003

目 录

译者的话

第一章 导言	1
第二章 组织培养技术	4
一、引言	4
二、实验室筹建	5
(一) 一般的布局	5
(二) 组织切割及转移的设备	6
(三) 玻璃器皿的洗涤	6
(四) 玻璃器皿与化学药品的贮藏设备	7
(五) 水提纯的方法	8
(六) 玻璃器皿与培养基的灭菌	10
(七) 摇动装置和发酵罐	14
(八) 培养设备	15
三、培养基的制备	17
(一) 一些培养基成分的作用	17
(二) 培养器皿与封闭物	20
(三) 培养基的贮藏	21
四、培养体的制备	22
(一) 植物材料的因素	22
(二) 培养体的采集与贮藏	23
(三) 表面消毒	24
(四) 组织的切割和转移	25
(五) 培养前的处理	27
(六) 培养环境	27
(七) 移植到土壤	28

五、讨论	29
第三章 林业中的细胞与组织培养	30
一、引言	30
二、生产周期	33
三、遗传资源	38
(一) 能源树种与薪材树种	39
(二) 多种用途的树种	39
(三) 热带豆科植物	40
(四) 纤维与制浆树种	41
四、繁殖系统	41
(一) 种子园	42
(二) 试管营养繁殖	47
五、商业用途的细胞	50
(一) 新杂种的创造	50
(二) 细胞与酶的生物化学转化作用	52
六、抑制因素	55
七、展望	57
第四章 裸子植物的试管繁殖	59
一、引言	59
二、裸子植物愈伤组织及悬浮培养的器官发生	60
三、器官与器官片段培养的形态发生	64
(一) 腋芽的形成	65
(二) 不定芽的形成	68
(三) 胚胎发生	77
(四) 嫩芽的形成	77
(五) 根的形成	81
四、成熟植株外植体上的再生与复壮	88
五、繁殖体在土壤中的成长	88
六、结论	89
第五章 双子叶树木的营养繁殖	95
一、引言	95
二、常规营养繁殖法在生产性林业中的应用	95

(一) 过去的实践与效用	95
(二) 改良的途径及其应用	97
(三) 使用常规或改良繁殖方法的经济考虑	99
三、通过组织和器官培养进行营养繁殖	100
(一) 木本双子叶植物器官发生研究史概述	100
(二) 培养类型及其在大规模商业性生产中的应用	103
四、经济方面的考虑	119
五、应用组织培养方法繁殖树木所面临的问题	122
(一) 树木的固有困难	122
(二) 小植株的移栽和锻炼问题	123
(三) 生产成本	126
六、今后的展望	127
(一) 茎尖培养的应用	127
(二) 胚胎发生的潜力	127
第六章 桉树的营养繁殖	129
一、桉树属 (<i>Eucalyptus</i>)	129
二、营养繁殖的方法	131
(一) 空中压条法	131
(二) 嫁接	132
(三) 枝插	133
三、组织培养	135
四、器官培养	137
(一) 节的培养	138
(二) 发展器官培养技术中所面临的问题	139
(三) 影响在节上产生根的因素	145
五、生产中的器官培养的应用	150
(一) 耐寒植株的选择	151
(二) 试管培养无性系的介绍	153
(三) 试管培养中嫩芽的增殖	153
(四) 嫩梢的伸长	154
(五) 嫩梢的生根	156
(六) 植株移植入土	156

六、结论	157
第七章 棕榈的营养繁殖	161
一、引言	161
二、棕榈的价值及发展中的问题	162
(一) 营养的来源	162
(二) 观赏的用途	163
(三) 目前棕榈的培养和繁殖方法	164
三、组织培养中待解决的问题——当前研究状况	168
(一) 椰子	168
(二) 海枣	170
(三) 油棕	171
四、棕榈植物组织培养中存在的问题	174
(一) 取得外植体的组织	174
(二) 组织变褐	175
(三) 成年组织的再生	176
(四) 组织消毒	176
(五) 再生频率	178
(六) 离体培养的生长率	177
(七) 组织保存	177
五、今后的研究与展望	178
(一) 器官发生——胚胎发生	178
(二) 花序逆转	179
(三) 育种计划	179
(四) 病害研究	179
第八章 植物病理学与组织培养的结合	181
一、引言	181
二、病原分类	182
(一) 病毒	182
(二) 细菌	185
(三) 线虫	186
(四) 昆虫	188
(五) 真菌	189

三、讨论	195
第九章 生长调节物质的作用	197
一、引言	197
二、生长素	198
(一) 背景情况	198
(二) 吲哚乙酸 (IAA)	199
(三) 吲哚丁酸 (IBA)	201
(四) 萘乙酸 (NAA)	202
(五) 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D)	202
(六) 其他生长素	205
三、细胞分裂素	206
(一) 背景情况	206
(二) 激动素 (KT)	207
(三) 6-苄基氨基嘌呤 (BAP)	208
(四) 其他细胞分裂素	210
四、赤霉素	212
(一) 背景情况	212
(二) 赤霉素的作用	212
五、其他生长调节物质	213
六、结论	214
第十章 树木的氮代谢和营养繁殖	218
一、引言	218
二、氮代谢的重要性	218
(一) 树木体内氮化合物自然存在的范围	219
(二) 基因表达和图示	225
(三) 组织化系统和非组织化系统的代谢变化	227
(四) 氮和营养	229
(五) 中间氮代谢的有关问题	232
三、生长和发育中的氮代谢	235
(一) 培养苗的因素	235
(二) 愈伤组织的形成	237
(三) 细胞悬浮培养	239

(四) 形态发生	244
四、前景	256
第十一章 碳水化合物的利用与代谢	258
一、引言	258
二、营养方面	259
三、碳水化合物的吸收	260
四、碳水化合物的代谢	262
(一) 蔗糖的降解	263
(二) 其它碳源的代谢	264
(三) 己糖的迁移与代谢	265
(四) 细胞壁的生物起源	273
(五) 碳架的利用	279
五、渗透作用	280
六、结束语	286
第十二章 离体培养技术在林木遗传改变中的应用	288
一、引言	288
二、试管选择	288
(一) 自然变异	289
(二) 变异的诱导	290
(三) 选种方法	290
(四) 植株的再生	291
(五) 应用	292
三、体细胞杂交	293
(一) 原生质体技术	293
(二) 嫁接杂交	297
四、遗传转化作用	298
(一) 原理	298
(二) 步骤	298
五、结论	301
第十三章 营养繁殖与幼态、成熟和复壮的相关	302
一、引言	302
二、幼态-成熟度	304

(一) 定义	304
(二) 分生组织的决定	307
(三) 幼态区带	309
(四) 无性系的老化	310
(五) 遗传稳定性	311
(六) 成熟的机制	312
(七) 幼态保持的机制	313
(八) 遗传稳定性的机制	315
(九) 复壮的机制	316
(十) 有性的复壮作用	317
三、组织培养繁殖的意义	318
(一) 外植体的选择	319
(二) 减少细胞器的物理与化学方法	320
四、提要与讨论	322

第一章 导 言

近几十年来，组织培养已迅速发展成为生物学和医学的重要研究手段之一。目前其技术已日臻完善。在诸如农业、园艺和药材制造等的一些领域中，组织培养适应大规模生产上的使用已成为可能。但林木组织培养在生产上的应用，仍处于初期阶段，然而已迈出了坚实的一步，发展前景是十分可观的。

“组织培养”这个术语，主要是在该方法只限于培养组织块那时提出的。但几年以后，这个术语的含义就有所改变，因为目前组织培养不仅培养组织块而且还包括培养游离细胞、原生质体、器官和胚胎。

从试验观点来看，试管培养方法（切取有机体组织离体培养）较之活体内培养方法（组织留在有机体内）有许多优点，例如（1），在活的植物体内，各组织的功能都强烈地受到该植株其余部分所施加的相关作用的影响。而通过试管离体培养，方能确定某些相关作用的性质。（2）所分离的植株部分，能自由地表达通常在活体内受压抑的潜在特性，最明显的例子是器官发生和胚胎发生。（3）所有试管培养试验都是在无菌条件下进行的，因而组织和细胞不会受到微生物的破坏。况且，如果许多化学药品不受微生物的代谢和降解，则可长期使用。（4）培养的物理环境一般比较容易控制，大部分培养体都在很小的容器中培养，这很适合于温度、光照易于控制的小型培养室。（5）试管培养方法比大部分其他培养方法更易于受到遗传机理的影响。例如，更易于诱

导突变体，以及可以非常有效地进行大规模的筛选（主要在细胞水平上）。(6) 可以在细胞水平上而不是在较为复杂的高级的组织水平上进行代谢研究。(7) 对于控制幼稚与成熟，生长与发育的各种因子，用试管培养法研究也比其他方法容易。

在林业生产中，应用组织培养的潜力是相当大的，在今后数十年里，它将在下列几方面得到应用：生产无病的无性系；大量无性繁殖所选择的基因型；用液态氮保存基因库和突变体的选择。更后的应用还可能包括体细胞杂交、外来基因信息的引进（遗传工程）以及药物和一些重要的化合物的生产。本书（特别是第三至八章）将详细地讨论近年来的实用情况。

由于林木组织培养目前大部分仍处于试验阶段，要适应大规模生产上的应用，就必须进行更深入的研究。所以，对新近主要研究范围以及可能决定今后发展方向的理论及概念问题，在九至十章进行评论。

本书并非仅仅论述森林树种，果树，观赏树木，有时包括非木本植物在内，其组织培养中所遇到的问题，往往与大多数森林树种所遇到的问题相似，前者所发展的技术，略加修改后，常为后者所应用。所以，如果草本植物和非森林树种组织培养的资料对林木组织培养有价值，也将予以讨论。同样，在探讨和阐明生理控制机制、代谢作用和遗传规律时，经常必须参考林木之外的有机体的研究，因为林木方面的文献根本没有提供这方面所需的资料。然而，以前人们总想尽量少用树木以外有机体的参考文献，而优先使用树种方面有关的文献。

林木组织培养已落在许多农作物组织培养的后面，其主要原因是：(1) 树木的生命周期长。(2) 要是人们想利用成年树木的材料而不是种胚或幼苗，那么温室材料是难以利用的，这就必须采用生长在野外的树木作外植体。由于立地条件的不同和每

年气候的影响，因而，可以预料各外植体具有很大的生理差异。

(3) 基于育种上的问题，树木的遗传变异一般大于农作物，这又导致了试验结果多变，难以预测。(4) 现时所采用的各种处理方法，通常对成年树木组织的形态发生不起作用。结果对许多树种来说，进行试管培养营养繁殖仍然是不可能或者很困难的。

(5) 特别是那些生长在野外的树木，其组织经常出现内生的微生物的污染，要消除这种污染，通常是很困难或办不到的，而且一般污染率都很高。

显然，问题仍然很多，正因为如此，在林业研究和生产中组织培养的常规应用一直是落后的。但是，正如本书各章节所讨论的那样，林木组织培养这个领域正取得迅速进展，可以预料，在今后的十多年里，这方面有些问题，将会有新的解决办法。

第二章 组织培养技术

J. M. Bonga

一、引言

植物组织培养，是把离体的组织小块或器官，在营养基上进行无菌培养的一种方法，用控制培养基成分及其它环境因素的办法，使培养体定向地生长与发育。

组织培养常常受未知因素变化的影响，因此一次试验所取得的结果往往在以后的实验中不能重现，或者一个实验室能顺利地复制而另一个实验室则不成功。也可能开头小规模试验是成功的，当转入高效、低成本的大规模生产时，又出现一些新问题。所以此类新程序的建立，也许要稍微改变一下制备培养基的方法，使用不同类型的培养管和较大的培养箱等等，每一步骤都可能导致意想不到的变化而造成严重的后果。

文献中所介绍的许多组织培养技术，为适应局部的情况虽然可以作少量的更改，但绝大部分是普遍适用的。例如，位于温暖湿润地的实验室或灰尘含量高或气流通畅的建筑物里，其预防污染的措施必须比其他的实验室要求得更严格。

近几十年来，组织培养工作有逐步要求更高级设备的趋势，在某些情况下确也缩短了整个过程，譬如几十年前的药物称重，麻烦且浪费时间，而用现代天平，既简便又迅速。然而设备的精密与自动化，毕竟不能代替经验与技巧，一些好的成果常常是在

简单而价廉的设备中取得的。

对于拥有大量营业额的组织培养企业，其过程比小规模实验室的研究要求更高。在生产操作上，要求实行更加严格的程序，需清除环境中所有微生物孢子的污染源，因为培养物的感染将意味着资金的耗损。

自从植物组织培养技术发展（主要是 White 和 Gautheret）以来，许多基本技术都没有什么改变。其步骤与方法的细致描述对于林木组织培养者依然是很有价值的，因为他们最初的许多工作大都是林木组织培养，尤其是采用形成层作外植体的培养方法。

木本植物组织培养方法，除少数例外，与其他植物相似。由于几位作者对植物组织培养技术已作了详尽的描述，所以本章只局限于更普遍的一些问题，特别是着重在一般文献中尚未详细讨论的问题和在最普遍最简单的操作过程中可能遇到的一些困难。至于林木组织培养的特殊方面，如原生质体和单倍体细胞的培养，可参阅本书后面的章节。

二、实验室筹建

（一）一般的布局

组织培养实验室即使有现代化的装备而技术上作了一些改进，但主要仍是按 White 的经典著作《动物与植物细胞培养》所描述的方法建立的。当然如果人们想参考更为新近的资料，有关现代树木繁殖实验室和温室布局的文献，也已出版。

按理组织培养室应该有一个或更多供组织块的切割和转移的无菌室、培养基的制备间、冲洗间、药物与玻璃器皿的贮藏室、

贮藏大量植物材料和培养基的冷库、具有控制温度与照明的培养室或小培养箱。然而空间与经费通常不允许筹建这类实验室。事实上，要是没有上述这些优越的条件，一个实验室找几个技术人员和研究生，要培养大量不受污染的培养物是不难的。因此简单的工作条件常常不是妨碍出成果的因素，这当然仅适用于常规的实验室和简易的林木组织培养。对于那些特殊的研究，尤其是在DNA重组和尖端试验方面，都将需要更复杂的，价钱昂贵的设备和严格的操作规程。

(二) 组织切割及转移的设备

如果组织培养单位处于一个有较高含量的微生物孢子的建筑物中，或是一个大商业企业的组成部分，就需要一个适当的无菌室，使空气通过过滤系统后除去尘埃和孢子进入这些小房间。室内一般没有窗户，四周要光滑而易于冲洗，不使用时经常要用紫外光灭菌，无菌室也有几个缺点：占据空间、建造昂贵，最重要的是许多使用者害怕定期地限制在这样一个局限的，带着口罩的和无窗户的环境中。因此许多实验室用层流罩(laminar-flow-hoods)代替灭菌室，它对于大多数操作者是适用的。至于小范围内的工作，常常使用没有层流空气装置的箱子也是可以的。

为了保持实验室最低限度的微生物孢子和尘埃的污染，沾有培养基或培养物的培养皿，烧杯和试管应该封闭高压消毒，尽快弄干净。如果培养物污染率一直很高，把微生物和小虫的来源，如盆栽植物和其他接种材料都要从实验室中除去。

(三) 玻璃器皿的洗涤

目前大多数的实验室都用强力喷射热水洗涤剂的自动洗盘机清洗玻璃器皿，然后用自来水、蒸馏水或无离子水漂洗以去除洗

涤剂。对于难洗刷的玻璃器皿，有人建议用电灰化的办法清洗。对于敏感的细胞悬浮培养物，玻璃器皿或许要用铬酸-硫酸混合剂清洗，但这个过程需要有严格的安全措施。

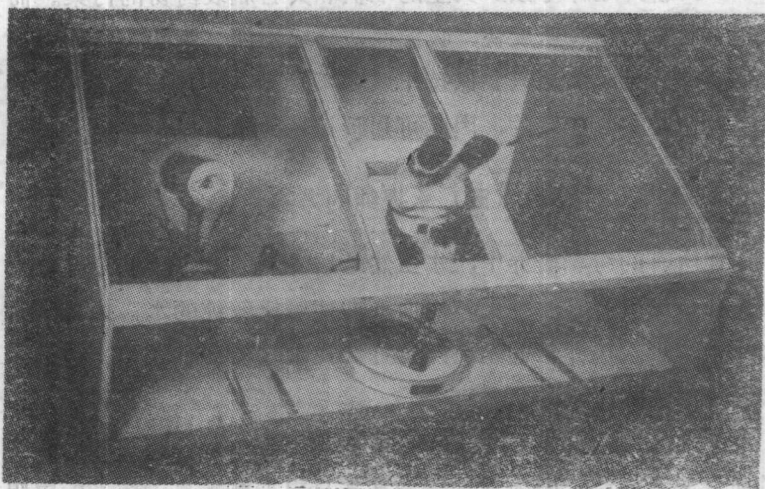


图1 用于组织切割和转移的一种接种箱。接种箱大小是 $90 \times 60 \times 45$ 厘米，由木料和嵌有单斜面玻璃制成的。双筒解剖镜的二个目镜从玻璃板近箱正面开口处的一方格孔 (15×15 厘米) 中露出，其周围至方格边沿用小塑料片封住，但不影响镜筒上下移动调焦。消毒仪器的酒精灯和电炉以及玻璃器皿置于铝保护板(h)和通气孔(v)下的角落里保。护板用于防止玻璃受热而碎裂。接种箱内的内表面不时用70%酒精清洗很容易消毒。接种箱应放在实验室不通风的工作台上较好。为避免箱内大量的气流，接种箱大小不要超过上述规格，也就是说它仅适用于小规模的工作范围

(四) 玻璃器皿与化学药品的贮藏设备

保存玻璃器皿与化学药品的贮藏室，要有足够的搁板和放置易燃药物的钢橱以及存放热变药品的冰箱。干净的玻璃器皿应该

用这样的方式贮藏，即其内外表面要保持无灰尘与脏物。这不难办到，只要把玻璃器皿保存于塑料袋或其它容器中，或者在瓶口覆盖一片铝箔。购买与保存化学药品时，数量最好不要太多，以便不断更新。这样可减少灰尘的堆积和其它瓶装药物的污染。而且化学药品的周转速度快，吸湿性药物变潮而分解的可能性就减少。大部分化学药品只要保持干燥和不受光（尤其是紫外光），其化学性质是相当稳定的，因此可用暗棕色的玻璃瓶保存。

（五）水提纯的方法

在所有的组织培养中，水虽然是培养基的最重要成分，但人们往往很少关心它的纯度。然而，即使是比较纯的水，由于用量大，其携带入培养基的杂质，也许比由玻璃器皿、器械、琼脂和营养化学药物带进的更多。

“纯水”的提法有点夸张，诸如“三重蒸馏”“超纯的”等等名词会使人误解。因为这种提法常常只根据测定离子浓度的电阻大小，并不表明可存在于水中非离子的许多杂质。而且，即使制得优质水，如果收集的方法不当或贮藏的时间稍长，都会很快变质。

大部分自来水都含有无机物、淤泥、油类、金属氧化物、管道腐蚀物、有机物、微生物和溶于水中的气体除去水中这类杂质，最常用的有蒸馏、离子交换和逆向渗透等方法，有时只用其中一种，更普遍的是几种方法结合使用。

1. 蒸馏法 蒸馏法已传统地成了水提纯的主要方法，尤其在用水量不大的地方，通常还是喜欢用此法生产优质水。正确的蒸馏，是一项技术复杂的过程。不合理的蒸馏结构或不正确的蒸馏操作，都会使许多杂质随着弥雾或通过水膜的流动而转移到接收管里，因蒸馏作用，某些沸点接近于 100°C 的挥发性物质也同样会被带入蒸馏水中。蒸馏并不消除所有的无机物，只是最有效地