



园艺植物 组织培养

李其江主编

上海科学技术出版社

园艺植物组织培养

裘文达 编著

WJ14/22

上海科学技术出版社

内 容 提 要

《园艺植物组织培养》是我国第一部专门介绍果树、蔬菜和花卉植物组织培养的专著。本书基础理论和实践应用并重。总论部分八章全面系统地叙述了植物组织培养的概念、历史、作用、原理、方法和基本技术及要求。各论部分十二章深入、详细地叙述了 20 种园艺植物的培养技术。为便于查阅应用，书后附有近 200 种园艺植物的培养表及近 200 种主要园艺植物病毒的中文英文名称对照。本书既适宜作大专院校和培训班教材，又是从事组织培养的技术工作者和研究人员很好的参考书。

封面设计 卜允台

园 艺 植 物 组 织 培 养

袁 文 达 编著

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路 450 号)

新华书店上海发行所发行 江苏泗阳印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 15.25 字数 362,000

1986 年 8 月第 1 版 1986 年 8 月第 1 次印刷

印数 1—6,300

统一书号: 16119·887 定价 2.85 元

前 言

植物组织培养技术在园艺生产上的应用，无论在花卉、蔬菜和果树作物上，也无无论在育种、快速繁殖、脱除病毒和保存种质等方面，都日益显示出越来越大的经济价值，在国内外皆得到极大的关注。特别是近二十年来，园艺植物组织培养，不仅成为一种新的技术、新的生产手段，而且逐渐发展成为一门新兴学科。

浙江农业大学园艺系在李曙轩教授的指导下，由作者于1982年在全国最早编写了《园艺植物组织培养学》的新教材，以在园艺系专业课的教学中，补充了生物工程的新内容，并以专题补充的形式进行了讲授。1984年又在教材的基础上补充了20种园艺植物的组织培养技术等材料，编写成此书。所以本书的编写出版，完全是李曙轩教授支持帮助的结果。

本书在编写中也曾得到中国科学院上海植生所、植物所、遗传所、华南植物所，中国农科院蔬菜所，北京农业大学，华南农业大学，上海园林研究所，北京海淀农科所，杭州大学，杭州园林文物管理局，杭州植物园等单位专家、教授的帮助，提供资料，给予指导，在此谨致谢意！由于材料、水平所限，遗漏和错误之处欢迎帮助指正。

裘文达

1984年仲夏于浙江农业大学

序 言

自从1902年德国植物学家 Haberlandt 利用被子植物的叶子,进行细胞培养,发表了他的未成功的但却是开创性的试验。八十多年来,尤其是最近二十几年来,经过各国植物学家的努力,包括我国的李继侗、罗宗洛、罗士韦、崔激等的工作,使植物器官及细胞的培养成为一项重要的生物学研究手段及有很大经济意义的农业技术。

近年来,我国植物学及农业科学工作者对于花药培养,遗传育种,药物成分的生产,无病毒苗的获得以及大量快速繁殖等方面都做了不少工作。目前,从一小块植物组织甚至单一细胞,能够培养成为一个完整的植株,这一技术已不是什么新奇的事情了。

有关植物组织培养的原理与技术的知识,国内外已出版了不少的书籍,但专门讨论园艺植物的还不很多。但据估计,组织培养的对象中有80%是园艺植物。利用组织培养技术来大量快速繁殖名贵花卉品种及无病毒苗的生产,在国外已成为商品化的事业。

浙江农业大学裘文达同志,从事园艺植物组织培养的研究及教学工作多年,积累了很多有关资料。现根据他收集的资料及自己的科研成果编写成这本《园艺植物组织培养》,内容丰富,插图精确。书中既包括了培养的原理及方法,又包括了果树、蔬菜、花卉三个方面的材料,是国内有关这方面不可多得的专著。

我相信,本书的出版,对于园艺科学及教育工作者、从事组织培养的技术干部以及大专院校的师生,都有很好的参考价值。

李曙轩

1984年7月于杭州

目 录

序言

前言

绪论.....(1)

总 论

第一章 植物组织培养在园艺上的应用.....(3)

第一节 植物组织培养的意义.....(3)

第二节 植物组织培养的发展.....(4)

第三节 植物组织培养在园艺上的应用.....(7)

第四节 植物组织培养的应用步骤.....(13)

第五节 植物组织培养的应用原理.....(14)

第二章 实验设备及培养条件.....(18)

第一节 实验室.....(18)

第二节 设备和器材.....(20)

第三节 培养条件.....(24)

第三章 培养基.....(30)

第一节 培养基的种类和成分.....(30)

第二节 培养基的制备.....(39)

第三节 生长调节物质的应用.....(41)

第四章 植物材料.....(46)

第一节 植物材料的栽培管理.....(46)

第二节 组织培养材料的确定选择.....(46)

第三节 植物材料的切取和消毒.....(50)

第四节 植物材料的生长和形态建成.....(54)

第五章 花药和花粉培养.....(62)

第一节 花药和花粉培养的概况和意义.....(62)

第二节 花药培养.....(64)

第三节 花粉培养.....(68)

第四节 单倍体育种.....(70)

△第六章 器官和组织培养.....(75)

第一节 茎尖培养.....(75)

第二节 器官培养.....(79)

第三节 胚胎培养.....(80)

第七章 原生质体培养.....(85)

第一节 原生质体培养的意义.....(85)

第二节	原生质体的分离	(87)
第三节	原生质体的培养	(90)
第四节	原生质体的融合	(92)
第八章	园艺植物无病毒苗的培育	(97)
第一节	无病毒苗培育的意义	(97)
第二节	热处理脱毒	(98)
第三节	茎尖培养脱毒	(100)
第四节	其它途径脱毒	(102)
第五节	无病毒植物的鉴定	(103)
第六节	无病毒植物的利用	(105)

各 论

第九章	兰科植物组织培养	(108)
第一节	培养概况	(108)
第二节	兰科植物组织培养技术	(109)
第三节	兰科植物主要属的培养	(113)
第四节	兰花种子的无菌发芽培养	(119)
第十章	菊花组织培养	(123)
第一节	快速繁殖	(123)
第二节	菊花花瓣培养	(126)
第三节	菊花无病毒苗的培育	(129)
第十一章	球根花卉组织培养	(133)
第一节	水仙组织培养	(134)
第二节	百合组织培养	(135)
第三节	唐菖蒲组织培养	(140)
第四节	郁金香组织培养	(141)
第十二章	杜鹃组织培养	(145)
第一节	培养概述	(145)
第二节	茎尖组织培养	(145)
第三节	花芽组织培养	(148)
第四节	快速繁殖程序	(149)
第十三章	芸苔属蔬菜组织培养	(151)
第一节	培养概述	(151)
第二节	大白菜组织培养	(151)
第三节	花椰菜组织培养	(155)
第四节	青花菜组织培养	(158)
第十四章	葱蒜类组织培养	(162)
第一节	大蒜无病毒苗的培育	(162)
第二节	洋葱组织培养	(164)
第三节	其它葱蒜类组织培养	(166)
第十五章	马铃薯组织培养	(169)

第一节	培养概况	(169)
第二节	马铃薯脱毒技术	(170)
第三节	马铃薯无病毒苗的鉴定	(172)
第四节	马铃薯无病毒株的利用	(176)
第十六章	草莓组织培养	(179)
第一节	草莓的快速繁殖	(179)
第二节	草莓无病毒苗的培育	(180)
第三节	茎尖培养脱毒技术	(182)
第四节	草莓无病毒苗的鉴定	(184)
第五节	草莓无病毒苗的繁殖和利用	(186)
第十七章	无子西瓜组织培养	(189)
第一节	培养概述	(189)
第二节	组织培养技术	(189)
第三节	生产应用技术	(191)
第十八章	柑橘组织培养	(195)
第一节	胚培养育种	(195)
第二节	柑橘无病毒苗培育	(197)
第三节	柑橘原生质体培养	(201)
④ 第十九章	苹果组织培养	(205)
第一节	苹果快速繁殖	(205)
第二节	苹果无病毒苗的培育	(210)
第三节	苹果花药培养	(211)
△ 第二十章	葡萄组织培养	(213)
第一节	葡萄快速繁殖	(213)
第二节	葡萄无病毒苗的培育	(214)
第三节	葡萄花粉和子房的培养	(217)
附表一	主要园艺植物组织培养技术	(221)
附表二	主要园艺植物病毒	(231)

绪 论

一、植物组织培养概述

植物组织培养是在本世纪发展起来的。从开始的科学预言，到初步的成功，以至随后大量的试验研究成果，技术的逐步完善，为新兴学科的问世奠定了基础。特别是外源激素——生长调节物质的应用，更使人们可以有目的有意识地控制培养材料的分化和生长。五十年代由于细胞分裂素物质的发现，才有可能使许多双子叶植物的器官分化得到控制，而2,4-D的应用更使一大批单子叶植物能再生植株，并在诱导体细胞胚中起着重要作用。二次大战后科学的飞跃，各门学科间的互相渗透、互相促进，使植物组织培养的技术更趋完美，逐渐由实验室小规模基础理论研究的手段，一跃而成为一种大规模批量工厂化生产的新方法，并在园艺植物的培养上得到广泛应用。我国从七十年代开始较大规模在许多领域和方面开展了植物组织培养的工作，八十年代开始则在园艺植物的培养生产上得到利用。

二、植物组织培养的特点

植物组织培养之所以发展那样迅速，应用的范围那样广泛，是由于其具备以下特点：

1. 培养条件可以人为控制

植物组织培养中植物材料完全是在人为提供的培养基质及小气候环境条件下进行生长的，摆脱了大自然中四季、昼夜变化频繁，还不时受灾害性气候影响的不利因素，且条件均一，对植物生长有利，便于稳定地进行周年培养生产。

2. 生长周期短，繁殖率高

植物组织培养由于可人为控制培养条件，根据不同植物不同离体部位的不同要求而提供不同的培养条件，因此其生长快，往往1~2个月即为一生长周期。所以虽然植物组织培养需一定的设备及能源消耗，但由于植物材料能按几何级数大量繁殖生产，故总的还是成本低廉，利于工厂化大生产，及时提供规格整齐一致的优质、无病毒园艺种苗。

3. 管理方便，利于自动化控制

植物组织培养是在一定的场所环境下，人为提供一定的温度、光照、湿度、营养、激素等条件，进行高度集约化的高密度科学培养生产，与盆栽、田间栽培等相比省去了中耕除草、浇水施肥、防治病虫害等一系列繁杂劳动，可以大大节省人力物力及田间种植所需要的土地，且利于进行自动化控制生产。

三、园艺植物组织培养学的研究对象及任务

园艺植物组织培养学是以园艺植物(果树、蔬菜和园林花卉、观赏植物)为研究对象。运用植物组织培养的理论作指导，研究园艺植物的组织培养技术，以现代新技术来提高果树、蔬菜和花卉等园艺生产的技术和水平。具体的要求是要采用植物组织培养的技术来进行快速大量繁殖，以促进良种繁育工作的开展；采用植物组织培养的技术进行育种，以不断创造更多更好的新品种；采用植物组织培养的技术来培育无病毒苗，以解决病毒危害，不少园艺植物严重退化的问题，来提高种性；采用植物组织培养的技术来保存种质材料以及开展园艺植物激素生理、营养代谢、光合作用和形态建成等基础理论方面的研究。

四、园艺植物组织培养学与其它学科的关系

园艺植物组织培养学是以细胞学、植物学、生物学、遗传学、物理学、化学、微生物学、植物生理学、植物解剖学、植物细胞和组织培养学、果树栽培学、蔬菜栽培学、花卉栽培学、果树育种学、蔬菜育种学和花卉育种学等等多门学科作为自己的理论基础和实践指导。

园艺植物组织培养学是多门学科、多种先进手段综合运用而产生的一门新技术、新学科。它的诞生必将推动我国园艺事业的进一步发展，并为我国——“世界园林之母”在当代重新获得更高的声誉而作出应有的贡献。

总 论

第一章 植物组织培养在园艺上的应用

第一节 植物组织培养的意义

一、概念

高等植物的组织培养(tissue culture), 1936年 White 提出了它的定义:“是分离一个或数个体细胞(somatic cell), 分离植物体的一部分在无菌试管(in vitro)的适当条件下培养的技术”。他积极提倡, 并在植物组织培养的研究上做了很多工作。

植物组织培养在几十年的发展中, 研究和应用的范围日趋扩大, 因此它所包含的内容也越来越广泛。通常我们称呼的广义的高等植物组织培养的概念, 是指通过无菌操作分离植物体的一部分, 即称外植体(explant), 接种到培养基, 在人工控制的条件下(包括营养、激素、温度、光照、湿度等)进行培养, 使其产生完整植株的过程。具体的则根据培养对象, 又可分为器官培养、组织培养、细胞培养和原生质体培养等等, 器官培养又可根据取材部位的不同而有不同种类的培养。

二、分类

植物组织培养中由于接种外植体的不同。可以分为以下五类:

1. 植株培养(plant culture)

是具备完整植株形态材料的培养, 如幼苗及较大植株的培养。

2. 胚胎培养(embryo culture)

把成熟或未成熟的胚从胚珠内分离出来, 培养在人工合成的培养基上, 使其发育成为正常的植株。

3. 器官培养(organ culture)

离体器官的培养, 根据作物和需要的不同, 可以分离茎尖、根尖、叶片、叶原基、子叶、花瓣、雄蕊、胚珠、子房、果实等作外植体培养, 使其发育成完整植株。

4. 组织或愈伤组织培养(tissue or callus culture)

为狭义的组织培养。是分离植物体的各部分组织来进行培养, 如茎尖分生组织、形成层、木质部、韧皮部、表皮组织、胚乳组织和薄壁组织等等, 或采用从植物器官培养产生的愈伤组织来培养, 通过分化诱导可形成植株。

5. 细胞或原生质体培养(悬浮培养)(suspension culture)

由愈伤组织等进行液体振荡培养所得到的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, 或是用酶及物理方法除去细胞壁的原生质体培养, 皆可通过培养, 分化产生植株。

此外根据培养的过程, 将从植物体上分离下来的第一次培养, 称为初代培养(primary culture) (第一代培养), 以后培养体转移到新的培养基, 则都称为继代培养(subculture) (也可细分为“第二代培养”、“第三代培养”……)。根据培养的需要, 将在加琼脂的培养基中培养称为固体培养, 不加琼脂的培养基中培养称为液体培养(liquid culture)。其它还有滋养培养(护士培养)(nurse culture)、微型培养室培养和深层培养等等。

三、意义

植物组织培养是二十世纪发展起来的一门新技术。特别是近二、三十年来由于组织培养基础理论研究的深入, 发展更为迅速, 应用范围也越来越大, 发表的文献浩如烟海, 几乎以植物为研究对象的各个分支学科都在广泛地进行组织培养。它所牵涉的学科有细胞学、细胞生物学、分子生物学、遗传学、育种学、生理学、生物化学、药理学以及农业、园艺、森林等等。植物组织培养可以说是掀开了细胞生物学的新的一章。

植物组织培养可严格控制培养的有关条件, 且根据现已掌握的培养技术, 几乎所有的植物离体部位皆可单独均匀一致的培养生长, 排除了许多不利因子的干扰, 大大提高了试验研究的准确性, 所以广泛用在细胞、组织的代谢生理及其它生化等方面的研究。通过植物组织培养, 从单细胞都可人为产生结构复杂而完整的植株, 所以作为生物学的一个根本问题——分化的研究, 植物组织培养也占着越来越重要的位置。此外, 它在细胞学、发生学、发育生理学等等生物分支学科上都有重要价值。

植物组织培养从六十年代开始, 它除了在基础理论的研究上有重要价值外, 在实际应用中也日益显示出它的巨大价值。在世界上的不少国家和地区, 它已从实验室的研究手段一跃而成为大规模成批量的一种工厂化生产方法, “无性繁殖系的快速繁殖的生产, 试管品种的商业化, 是目前植物组织和细胞培养在应用上的主流之一”(罗士韦, 1978)。在农学、园艺、森林、药物等应用学科上, 它得到广泛的利用。试管培养中个体的再生, 由于其繁殖周期短, 一些难以生长繁殖的种类也可迅速生长, 所以在园艺植物、农作物和森林植物的无性繁殖上得到大量的应用。在遗传育种上更有其独特的价值, 胚胎培养可以克服远缘杂交的障碍, 有利种属间杂交的进行。花药和花粉培养, 可用于单倍体育种, 得到纯合的二倍体。原生质体培养, 体细胞杂交的技术使人们有可能在更大范围内进行基因重组, 在育种上创造新的极为罕见的品种及种类。其它在优良种质材料的繁殖、保存及突变体的诱导、筛选等方面与常规育种相比, 无论在时间或空间上都要优越得多。当然常规育种始终是一种基本的育种方法, 但组织培养在某些方面的长处也确实是其不相及的。通过组织培养从感染病毒的植株得到无病毒植物, 这也是组织培养的一大优点, 并已在不少作物的实践生产中得到应用。

此外, 现在已开始进行从大量培养植物组织或细胞, 来生产药物或其它有价值的天然产物。

第二节 植物组织培养的发展

一、发展简史

1839年 Schwann 提出细胞学说时就指出: “……每一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……”。

植物组织培养是在二十世纪发展起来的。第一个年代, 动物的组织培养发展很快, 特别

是哺乳动物的组织培养迅速发展,这样使植物的组织培养也受到了影响。

1902年,德国著名的植物生理学家 Haberlandt 根据细胞理论,大胆地提出了高等植物的器官和组织可以不断分割,直至单个细胞的植物细胞全能性(totipotency)的理论,即植物的体细胞,在适当的条件下,具有不断分裂和繁殖,发展成完整植株的潜在能力。为了证实他的观点,他采用了细胞培养的方法,用了野芝麻和紫鸭跖草等各种植物,分离出叶的栅状组织、表皮、毛、刺等细胞来进行培养,限于当时的技术水平,培养没有成功,但却对植物组织培养的发展起了先导作用。Haberlandt 当时写道:“……我相信,我不是做一个不太大胆的预言,假如我指出这个可能,在这方面,人们可能成功地培养体细胞或人工胚……。”可是由于当时对细胞形态的认识都很贫乏,对细胞生理、生化的了解就更少,使他的尝试未能获得预期的效果。他当时能将细胞分离出来也算是一个技术上的开端。

植物组织培养最初的成功是 Haberlandt 的学生 Kotte 和美国的 Robbins 在 1922 年进行根尖培养中同时得到的。Kotte 采用了无机盐、葡萄糖、胨、天冬酰胺,加各种氨基酸的培养基。Robbins 用了含无机盐,加葡萄糖或果糖的琼脂培养基,培养了长度为 1.45~3.75 厘米的豌豆、玉米和棉花的茎尖,结果形成了一些缺绿的叶和根,在培养中分生组织只能进行有限的生长,当将根切断转移继代培养时,根的生长率就很低。

到三十年代,1934 年美国的 White 由番茄根建立了第一个活跃生长的无性繁殖系,有关离体根的培养试验才获得真正的成功。以后并反复转移到新鲜培养基中继代培养。根尖组织可不断生长。White 关于番茄根的培养,在以后二十八年间培养了 1,600 代。他以小麦根尖为材料,研究了光、温度、通气、pH、培养基组成等各种培养条件对生长的影响。White 并于 1937 年首先建立了组织培养的综合培养基,其成分均为已知化合物,在这方面,植物组织培养可说是超过动物组织培养,因动物组织培养一直离不开一些未知的天然物。法国伟大的细胞学家 Guillaumond 的学生 Gautheret¹¹ (1934) 进行了山毛柳、黑杨等形成层组织的培养,在含有 Knop 溶液、葡萄糖酵母提取液和水解酪蛋白的固体培养基,可不断增殖几个月。以后 White(1937)发现了 B 族维生素对离体根生长的重要作用,及 IAA 对植物生长作用的了解。Gautheret(1937、1938)在他的培养柳树形成层的培养基中加入这些物质,使生长大大增加。同时法国的 Nobecoort(1937、1938)培养胡萝卜根和马铃薯的块茎薄壁组织,细胞增殖获得成功。随后 Gautheret 用胡萝卜根的小外植体培养也得到成功。不久,White(1939)报道了烟草种间杂种 (*Nicotiana glauca* × *N. longsdorffi*) 幼茎切段原形成层组织的培养,继代培养也获得成功。在 White 和 Gautheret 工作中所确立的植物组织培养的基本方法,成为以后进行各种植物组织培养的基本技术。这个时期可以说是奠定了植物组织培养的基础。1943 年 White 发表了《植物组织培养手册》(*A Hand Book of Plant Tissue Culture*)的专著,使植物组织培养开始成为一门新兴的学科。

四十年代,Skog 和崔澈(1948)在烟草茎切段和髓培养以及器官形成的研究中,发现腺嘌呤或腺苷可以解除培养基中生长素(IAA)对芽形成的抑制作用,而诱导形成芽,从而确定了腺嘌呤/生长素的比例是控制芽和根形成的主要条件之一。这一比例高时,产生芽;这一比例低时,则形成根;相等则不分化。由于寻找促进细胞分裂的物质,1958 年 Miller 等发现了激动素。不久即知道激动素可以代替腺嘌呤促进成芽,并且效果约可增加 3 万倍。结果上述控制器官分化的激素模式变为激动素/生长素的比例关系。这方面的成功发现,无疑是对植物组织的促进,有力地推动了植物组织培养的发展。

五十年代至六十年代,由于植物组织培养技术的提高,生长调节物质的发现和作用机制的研究,使植物组织培养得到很大的发展。主要是器官形成和个体发生方面的成功。通过愈伤组织在液体培养基的振荡或旋转培养,分离得到单细胞群和由少数细胞形成的细胞团(Muir等,1954;Steward等,1955;Reinert,1956)。Reinert(1956)以此方法发现了单细胞的分裂,这种游离细胞不仅在液体培养中进行无规律的细胞分裂,而且以后朝着形成胚或构成一定形态的方向发展,转移到固体培养基可以发育成植株。1958年在美国工作的英国人Steward在试验中,从胡萝卜愈伤组织和细胞培养中,诱导分化产生了个体植株,给“全能性”理论以科学的论证,对植物组织培养工作以深远的影响。Nitsch(1951)对离体果实的培养,也促进了对果实、子房、胚珠及花器各部位的研究。印度的Guha和Maheshwari(1964~1966)成功地在毛叶曼陀罗花药培养中由花粉诱导得到了单倍体植株。这促进了花药和花粉培养的研究,以后相继在烟草、水稻、小麦、玉米、番茄、甜椒、草莓、苹果等多种植物上获得成功。

七十年代,由Cocking(1960)所倡导的原生质体培养和体细胞杂交的研究得到了迅速发展。有十多种植物从原生质体经再生分化长成植株,而且利用原生质体融合,已经能使烟草属和矮牵牛属的杂种细胞增殖分化长成杂种植株。

我国在植物组织培养方面工作的开展也是比较早的。1933年李继侗等进行了银杏胚胎的培养,发现3毫米以上大小的胚即可正常生长,并发现银杏胚乳提取物促进银杏离体胚的生长,这对以后这方面的利用有启发意义。1935~1942年罗宗洛等进行了玉米等离体根尖的培养。以后有崔激关于烟草组织培养中器官发生的研究。罗士韦关于幼胚、根尖、茎尖的愈合组织、肿瘤组织的培养及其生理研究。解放后这方面的工作也逐步得到进一步发展。有崔激等进行的组织培养中器官发生及愈伤组织培养的研究,罗士韦等进行的根尖、愈伤组织、植物肿瘤组织及药用植物组织培养及其生理的研究,李正理等进行的离体胚培养中形态发生及离体茎尖培养的研究,王伏雄等关于幼胚培养的研究。七十年代开始,我国花药花粉培养单倍体育种的工作,原生质体培养体细胞杂交的研究及组织培养试管苗快速繁殖的试验应用更是规模空前,涉及的单位、人员及研究的深度等等,是以往所无法比拟的。进入八十年代则不少试验成果逐步转入生产应用。

二、技术发展

在本世纪内发展起来的植物组织培养,在其发展的过程中,在技术上是经历了一个由简单到复杂、由低级到高级的逐步发展,完善提高的过程。其所以能迅速发展起来也是现代科学技术的应用和现代科学发展互相渗透,互相促进的结果,植物组织培养也可以说是现代多门学科综合的产物。现代的很多学科奠定了植物组织培养的理论基础。现代科学技术的发展又为植物组织培养提供了大量的实验手段。

1. 材料范围的逐步扩大

本世纪初Haberlandt培养体细胞的研究,由于当时这方面的知识缺乏,也无相应的技术,所以不能得到成功。以后进行器官方面的培养,在胚和根尖培养等方面逐步获得成功,再发展到组织和细胞培养,以及原生质体的培养。材料从低等的苔藓类直到各种高等植物的各个部分。

取材日益广泛,除低等植物外,裸子植物多采取自幼苗、芽、韧皮部细胞。草本植物则取自胚、胚轴、茎段、根等部分。被子植物取材则更为广泛,可采取胚、胚轴、子叶、幼苗、茎尖、

茎、根、贮藏根、叶等各部位。

在原生质体融合的研究中,除了用高等植物中不同种属的材料进行体细胞杂交外,还有企图用动物的细胞(人、鸡)与植物的原生质体(胡萝卜、酵母)进行诱导融合,这将为研究生物学中的一些基本问题提供新的途径。

2. 培养方法的逐步发展

植物组织培养方法上的发展,已从静止的固体培养发展到液体振荡或旋转培养,可以使培养中的组织或细胞的供氧情况得到改善,有利于大量培养和生理、生化研究的进行。此外,由于培养方式方法和培养条件的不同,还有悬浮培养、深层培养、滋养培养等等。在方法上正沿着从小量到大量,从试管到大罐,从手工操作到自动化,并要求同步培养(synchronous culture),生长均匀一致的方向发展。方法的逐步完善和改进将会对植物组织培养的研究产生积极的影响,也为植物组织培养在生产上的推广应用提供了方便,有利于工厂化生产的进行。

3. 培养基的逐步改进

植物组织培养中应用的培养基不下几十种,这些培养基是在植物组织培养的发展中,根据人们的认识和培养的需要,而不断改进产生的。培养基的配方基本上是以 P. feffer 配方为基础,加以改进,并加入一些活性物质而发展的。三十年代末期了解了维生素对植物离体器官培养的重要性,以后又逐渐认识到一些活性物质对组织和细胞生长及分化的作用,使培养基中的添加物不断丰富。这同时也凭借于对细胞、原生质体、原生质体融合体甚至细胞器的生长和分化机制的了解而逐步改进的。基本培养基包括无机盐类,大量元素及微量元素,碳源大多用蔗糖,有机养料如水解酪蛋白、氨基酸、酵母提取液、椰乳等,这在大多数的细胞和组织培养中不需要。维生素对生长也有促进作用。White 培养基在四十年代用得最多,现在还经常用。Murashige—Skoog 培养基,是为培养烟草细胞设计的,有较高的 NO_3^- 、K 和 NH_4^+ 浓度,目前应用较广。为进行试验研究,要控制条件因子,对培养基的要求较高,应采用较高纯度的药品和重蒸馏水;而在大量生产应用时,为降低成本则开始采用代用品,如自来水代替重蒸馏水,采用普通蔗糖代替分析纯蔗糖,采用马铃薯培养基等效果也很好。

4. 实验手段的逐步完备

植物组织培养所以能进入到细胞水平甚至细胞器等更高级的培养,这也与实验手段的不断完备是分不开的。很多先进的光学仪器可以保证显微操作的顺利进行;许多医疗器械、仪器设备,可以保证组织良好的无菌分离、培养和生长的进行。植物组织培养是在一定的条件下进行的。现代科学的发展,可以说是给它提供了一套较为完善的设备条件。由于实验手段的齐备,植物组织培养也才能在不长时间内取得突飞猛进的发展。

第三节 植物组织培养在园艺上的应用

植物组织培养成为生物科学的一个广阔领域,在基础理论的研究上占有重要地位,在实际应用上也表现出巨大的价值。尤其是在园艺植物上的应用更为广泛,这是由于园艺植物经济价值高,特别是随着社会经济和文化的发达,对它的要求就更高,所以虽然组织培养需较多的设备和投资,但还是在不少园艺植物的生产上得到推广应用。目前世界上绝大多数国家和地区在开展植物组织培养的研究和应用,建立了成百家专门的试管苗公司。

一、植物组织培养在快速繁殖上的应用

据 Murashige 在 1978 年第四届国际植物组织和细胞培养会议上的报告,用组织培养进行快速繁殖的植物已达 255 种(表 1-1),其中园艺植物为 186 种,约占 73%。所以这清

表 1-1 用组织培养繁殖的植物

(据 Murashige, 1978)

类 别	种 类	数 量	合 计	比例(%)
园 艺	花卉	55	186	73
	观叶和蕨类植物	44		
	肉质和风景植物	36		
	蔬菜植物	33		
	果树植物	18		
其 它	农作物	26	69	27
	森林植物	30		
	药用植物	13		

楚地说明在应用组织培养进行快速繁殖的植物中,园艺植物是占到主要的地位,园艺植物中则又以花卉和观赏植物为主,其次是蔬菜和果树植物。

罗士韦(1982)在第五届国际植物组织和细胞培养会议上所作的专题学术报告中,所提供的无性系快速繁殖的种类(表 1-2),约比 1978 年第四届会议时增加近 1 倍,总的情况看仍是园艺植物在总数中占绝对的优势。

表 1-2 无性系快速繁殖种类

(罗士韦, 1982)

类 别	数 量	研究报道者
兰 花	66 属	Hughes 1981, Wang, 1982
蕨类植物	9 科, 17 种	Hughes, 1981
观赏植物	51 科, 208 种	Yang, 1982
果树植物	28 科	Skirvin, 1981
农作物	46 种	Conger, 1981
森林植物	28 科, 99 种	Mott, 1981, Wang, H.Z. 1982
蔬菜植物	39 种	Bottino, 1981, Chow, 1982

园艺植物中的一些无性繁殖作物如果树、球茎和鳞茎类植物、菊花、马铃薯、草莓等等属于杂合型植物。这些植物如果用种子繁殖,它们的后代便会出现各种变异,不能保持原来品种的优良特性;由于采用无性繁殖,所以有的繁殖率就很低,且长期多代后,病害等等原因也使种性下降。因此组织培养的繁殖方法无论对加快繁殖和提高种性来讲都是十分适宜的。

最早成功地应用组织培养于快速繁殖的是法国的 Morel(1960)。他在试管内繁殖兰花(*Cymbidium*),在含细胞分裂素的培养基上,培养的顶端分生组织增大而形成原球茎,以后可以切开重复进行培养繁殖。Morel 的研究结果很快在兰花生产中被采用,而发展成为常规的兰花繁殖方法。由于兰花用种子繁殖慢,而且不能稳定地保持原来的品种特性,一般

的分株法繁殖率又极低,多年营养繁殖后病毒病也严重,采用组织培养的方法可以大大提高繁殖率,同时可得到无病毒植株。Wimber(1963)应用组织培养的方法,在兰花的快速繁殖中一年繁殖得到400万个原球茎。所以这种试管培养方法发展很快,目前已有66个属几百种兰花可以用组织培养来繁殖,几乎所有有经济价值的兰花都可以在试管中生长。在美国、欧洲及东南亚许多国家和地区用组织培养的方法来大量繁殖生产兰花,而成为闻名于世的“兰花工业(Orchid Industry)”。

通过组织培养进行繁殖有两条途径:一是通过器官发生(organogenesis),通常由培养的组织或细胞,产生愈伤组织(callus),再产生芽及生根。二是通过无性胚发生(somatic cell embryogenesis),即由培养的组织产生愈伤组织,通过悬浮培养,或直接产生大量胚状体(embryoid),再长成植株。通过胚状体培养可以得到大量的植株,大大提高繁殖率。

通过器官发生来大量繁殖又可包括三种方法:

1. 通过茎尖培养产生大量腋芽

植物茎尖部分是分生组织区,是产生植物组织地上部分的全能性区域,在每一叶的叶腋有腋芽分生组织。但是由于受顶端优势(apical dominance)的抑制,只有少数可长成侧枝,而调整培养基中细胞分裂素的浓度,可以促进腋芽的生长。在Boxus(1974)的唐菖蒲培养中,经6周培养,加BA 0.5毫克/升的只长主芽,加1毫克/升的只出1个侧芽,加2毫克/升的则出3个侧芽。在菊花“绿牡丹”的培养中,也可见到随着BA浓度的升高及NAA用量的减少,腋芽的萌发量就增加,芽的诱导率也得到提高。

兰花则采用很小的顶端分生组织(0.1~0.5毫米),带1~2个叶原基来进行培养。由于其不带病毒,所以兼有得到无病毒苗的优点。

花椰菜等则是采用多花分生组织培养。在花椰菜的花序组织上有大量顶端分生组织,其中只有1/10可发育为花,其余则不发育,通过组织培养大量带叶的芽便可分化,也同时可得到无病毒苗。

2. 通过器官培养直接诱导产生不定芽

在自然界中许多植物的器官,特别是根、茎的下部,某些叶片常常可以产生不定芽,成为园艺上的一种重要的扦插繁殖法。在组织培养中可以利用这些及其它诸如花茎、鳞片、花器等,器官的小块组织在培养基上培养直接诱导产生不定芽,这种方法的材料来源广,繁殖的数量很大。现在已经有番茄、芥蓝、芥菜、花椰菜、菊花、非洲紫罗兰、水仙等几十种草本园艺植物,可以用这种方法来进行繁殖。培养得到的小植株还可继代培养,再大量产生不定芽来扩大繁殖系数。

3. 通过愈伤组织培养再诱导产生不定芽

接种的组织或器官小块在培养基上生长,去分化形成愈伤组织。这是一种含有大量分裂和生长中增大的细胞,通常主要含有很大的液泡化细胞,其间常有少量分生细胞分布。为诱导愈伤组织生长,一般培养基中要采用较高的生长素浓度。愈伤组织生长到相当大时要切小并及时转移到新鲜培养基上。芥菜、甘蓝的下胚轴在一种培养基上,可以形成愈伤组织并再分化出苗来,大多数植物的愈伤组织需转移到低生长素含量,高细胞分裂素浓度的培养基,才会分化产生不定芽,而有的在不含生长素的培养基也可分化。

试管快速大量繁殖除可在商业生产上大量推广应用外,还可应用在下述情况:①得到