

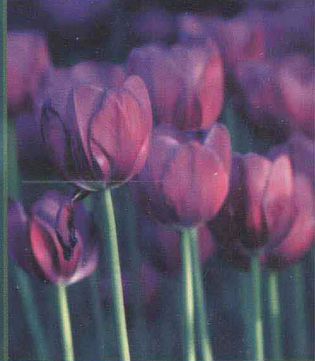


QIUGENLEI HUAHUI
ZUZHI PEIYANG JISHU

球根类花卉

组织培养技术

主编 梁艳 副主编 徐洪国 赵艳



黑龙江科学技术出版社

球根类花卉组织培养技术

主 编 梁 艳

副主编 徐洪国 赵 艳

黑龙江科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

球根类花卉组织培养技术 / 梁艳主编. -- 哈尔滨:

黑龙江科学技术出版社, 2011.8

ISBN 978-7-5388-6798-5

I. ①球… II. ①梁… III. ①球根花卉—组织培养

IV. ①S682:203

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 175508 号

责任编辑 刘佳琪

封面设计 刘 洋

球根类花卉组织培养技术

QIUGENLEI HUAHUI ZUZHI PEIYANG JISHU

主编 梁 艳 副主编 徐洪国 赵 艳

出 版 黑龙江科学技术出版社

(150001 哈尔滨市南岗区建设街 41 号)

电话 (0451) 53642106 电传 53642143 (发行部)

印 刷 哈尔滨天兴速达印务有限责任公司

发 行 全国新华书店

开 本 787×1092 1/16

印 张 12.75

字 数 260 000

版 次 2011 年 8 月第 1 版 · 2011 年 8 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5388-6798-5/ S·804

定 价 39.80 元

前 言

随着花卉产业的快速发展，人们生活水平的迅速提高，城市绿化用花卉植物及盆花、鲜切花需求量急剧增多，为满足当前市场需求，世界范围内许多花卉植物已实现了组织培养的工厂化生产，同时也为社会和企业带来了极高的经济效益。

为推动植物组织培养技术更快、更好地应用于球根类花卉组织培养实践，鉴于植物组织培养技术的不断发展及其在花卉上，尤其是在球根类花卉快速繁殖、脱毒（脱毒苗或脱毒种球）、种质资源的保存、突变诱发、新品种的培育、细胞工程和基因工程、工厂化生产等方面的大量应用，编者根据多年从事组织培养的科研、教学实践的经验，结合国内外研究进展，总结近年来的科学研究成果撰写了本书。本书总论部分包括组织培养概述、植物组织培养方法和组织培养的基本技术；各论部分重点介绍百合、唐菖蒲、郁金香、水仙、仙客来、朱顶红、马蹄莲等重要球根类花卉的组织培养技术。本书体系合理、条理清晰、内容丰富、图文并茂、生动具体、实践性强，可作为从事球根类花卉组织培养及相关专业的科研人员和学生的参考书。

其中绪论及总论部分由齐齐哈尔大学生命科学与农林学院梁艳编写（约 10 万字），各论部分第一、二、三、四、五章由齐齐哈尔大学生命科学与农林学院徐洪国（约 8.2 万字）编写，第六、七、八、九、十章及附录、参考文献由齐齐哈尔大学生命科学与农林学院赵艳（约 7.8 万字）编写。

鉴于时间仓促，编者水平有限，编写过程中难免有疏漏之处，恳请广大读者批评指正。

编 者

2011 年 5 月

目 录

绪 论	- 1 -
第 1 篇 总 论	- 3 -
第 1 章 植物组织培养的概述	- 3 -
1.1 植物组织培养的相关理论概念	- 3 -
1.2 植物组织培养的分类	- 5 -
1.3 植物组织培养的发展	- 9 -
1.4 研究应用与展望	- 12 -
第 2 章 植物组织培养基本技术	- 17 -
2.1 实验室设计	- 17 -
2.2 器皿及用具	- 21 -
2.3 组织培养基本操作技术	- 23 -
第 3 章 植物组织培养方法	- 47 -
3.1 愈伤组织培养	- 48 -
3.2 器官培养	- 48 -
3.3 植物离体快繁（微繁）	- 69 -
3.4 植物脱毒培养	- 75 -
第 4 章 球根类花卉概述	- 80 -
4.1 球根类花卉概念	- 80 -
4.2 球根类花卉的分类	- 80 -
4.3 球根类花卉的园林应用	- 82 -
4.4 球根类花卉的生态习性	- 83 -
4.5 球根类花卉的繁殖栽培	- 84 -
4.6 生物技术在球根类花卉的应用	- 84 -
第 2 篇 各 论	- 87 -
第 1 章 百 合	- 87 -
1.1 百合概述	- 87 -
1.2 百合的组织培养	- 91 -
第 2 章 唐 菖 蒲	- 102 -
2.1 唐菖蒲概述	- 102 -
2.2 唐菖蒲的组织培养	- 106 -
第 3 章 水 仙	- 113 -

3.1 水仙概述.....	- 113 -
3.2 水仙的组织培养.....	- 118 -
第4章 郁金香.....	- 126 -
4.1 郁金香概述.....	- 126 -
4.2 郁金香的组织培养.....	- 131 -
第5章 风信子.....	- 137 -
5.1 风信子概述.....	- 137 -
5.2 风信子的组织培养.....	- 141 -
第6章 石蒜.....	- 147 -
6.1 石蒜概述.....	- 147 -
6.2 石蒜的组织培养.....	- 150 -
第7章 朱顶红.....	- 154 -
7.1 朱顶红概述.....	- 154 -
7.2 朱顶红的组织培养.....	- 157 -
第8章 马蹄莲.....	- 161 -
8.1 马蹄莲概述.....	- 161 -
8.2 马蹄莲的组织培养.....	- 163 -
第9章 仙客来.....	- 170 -
9.1 仙客来概述.....	- 170 -
9.2 仙客来的组织培养.....	- 173 -
第10章 大花美人蕉.....	- 179 -
10.1 大花美人蕉概述.....	- 179 -
10.2 大花美人蕉的组织培养.....	- 182 -
附 录.....	- 183 -
附录1 组织培养常用试剂稀释方法.....	- 183 -
附录2 常用植物生长激素浓度单位换算表.....	- 184 -
附录3 植物组织培养常用英文缩略词.....	- 185 -
附录4 常用培养基成分表.....	- 186 -
参考文献.....	- 188 -

绪 论

球根类花卉 (Flower bulbs) 是指植株地下部分的茎或根变态、膨大并贮藏大量养分的多年生草本植物。根据地下贮藏器官的形态与功能可分为: 鳞茎、球茎、块茎、根状茎、块根, 大多数的球根类花卉都属单子叶植物, 少数属双子叶植物。

大多数球根类花卉的生产国并不是球根类花卉的原产地, 这些国家主要靠引种驯化和繁育新品种进行商品化生产, 在世界范围内种植的球根类花卉中, 种植面积较大的种属有: 唐菖蒲属 (*Gladiolus*)、风信子属 (*Hyacinthus*)、鸢尾属 (*Iris*)、百合属 (*Lilium*)、水仙属 (*Narcissus*)、郁金香属 (*Tulipa*)、秋海棠属 (*Begonia*)、仙客来属 (*Cyclamen*)、马蹄莲属 (*Zantedeschia*)、石蒜属 (*Lycoris*)、大丽花属 (*Dahlia*)、香雪兰属 (*Freesia*) 等。

由于球根类花卉种类丰富、适应性强、栽培容易、管理简便, 加之球根种源交流便利, 在切花、盆花生产及园林应用中球根类花卉都占有重要地位, 目前世界范围广泛应用的主流花卉或受欢迎的新种类花卉都属球根类作物, 如百合、郁金香、唐菖蒲、风信子、马蹄莲、大花朱顶红等。

球根类花卉以其较高的经济效益和独特的生产、经营方式而吸引越来越多的部门涉足这类花卉的生产, 传统生产方面, 球根类花卉主要采用无性繁殖方法繁殖, 长期采用无性繁殖虽能保持原有品种的优良性状, 但随着繁殖代数的增加, 病毒在植株体内积累, 使得花叶的产量和品质下降, 进而影响了商品的质量, 因此球根类花卉的脱毒培养的研究应用具有重要意义。此外由于球根类花卉采用种子繁殖、分球繁殖等其他营养繁殖方式的繁殖率低一直成为球根类花卉繁殖的难题, 而组织培养技术可以在短时间内得到大量的种球及试管苗, 从而实现球根类花卉的快速繁殖, 并且该项技术不受季节限制, 可实现周年生产, 为市场提供大量的试管苗或试管鳞茎。

球根类花卉的市场前景广阔, 但能够规模化生产并形成产品的种类少, 主要是进行组培快繁的难度大, 集中反映在一些较名贵的种类, 如郁金香、水仙等增殖率低, 难以实现大规模的生产。此外, 一些能够产业化组培生产的种类, 如百合、马蹄莲等过度移栽, 小球的培养和种球处理等方面还存在一定的技术问题。对于球根类花卉彻底的脱除病毒的方法目前主要通过茎尖分生组织培养恢复品种特性, 从而提高球根类花卉的产量和质量。

此外, 组织培养技术在球根类花卉的快繁、脱毒、种质资源的保存、转基因、体细胞无性系变异的筛选、器官培养、原生质体的培养、单倍体培养等多方面均可应用。例如: 快速繁殖技术是球根类花卉应用的最广泛的技术之一, 其具有繁殖速度快、周

期短、可周年进行等优点。目前国际上许多球根类花卉均采用试管快繁的方式育苗，如兰花的繁殖现已形成兰花产业，并将形成规范化的组培快繁体系。

组织培养技术可为球根类花卉育种提供新的手段，使得育种工作进展更为迅速，组织培养与细胞培养及诱变结合，取得良好的效果，体细胞杂交、胚培养、花粉花药培养等都需运用组织培养技术得以实现，例如百合、鸢尾的体细胞胚的杂交，花药、花粉培养获得单倍体植株，突变体的筛选等。

第1篇 总论

第1章 植物组织培养的概述

1.1 植物组织培养的相关理论概念

1.1.1 植物组织培养

植物组织培养是现代植物生物技术和农业生产上应用非常广泛的技术，越来越受到人们的重视，并为社会创造出很大的经济效益。

狭义概念：利用植物外植体在固体培养基上培养从而获得愈伤组织或完整植株的方法，称为植物组织培养，也称为离体培养或外植体培养。植物组织培养根据外植体来源和培养对象的不同，又分为植株培养、胚胎培养、器官培养、组织培养、原生质体培养等多种类型。

广义概念：在无菌条件下，将离体的植物器官（如根尖、茎尖、叶、花、未成熟的果实、种子等）、组织（如形成层、花药组织、胚乳、皮层等）、细胞（如体细胞、生殖细胞等）、胚胎（如成熟和未成熟的胚）、原生质体（如脱壁后仍具有生活力的原生质体）等培养在人工配制的培养基上，给予适宜的培养条件，诱发产生愈伤组织，或潜伏芽，或完整的植株等，统称为植物组织培养。

1.1.2 植物组织培养的理论基础

1.1.2.1 植物细胞全能性

植物细胞全能性（Totipotency）是组织培养的理论基础，指的是植物体的每个细胞都含有该植物全部的遗传信息，在适宜的条件下，植物体的任何一个细胞都可以发育成一个新个体而具有形成完整植株的能力。

从理论上讲，只要是一个活的细胞，都有再生出一个完整植株的潜力，实际情况并非如此简单，在自然状态下，由于细胞在植物体内所处位置及生理条件的不同，其分化受到各方面的调控，致使其所具有的遗传信息不能全部表达出来，所以只能形成某种特化细胞，构成植物体的一种组织或一个器官的一部分。由此可以说明条件是十分重要的、关键的，只要外界条件合适（温度、湿度、光照、光强、pH等），选择培养基类型和添加糖原、外源激素的种类及浓度适宜，同时满足植物体的生理条件、细

胞的情况适宜的条件下，细胞潜在的遗传能力就会表现出来。植物组织和细胞培养技术就是以细胞全能性作为理论依据，用人为的方法创造出一个适于生长的理想条件，从而使细胞的全能性得以发挥，用于农业和植物类生产和实践中。

1.1.2.2 细胞分化、脱分化与再分化

(1) 细胞分化 (Differentiation)

细胞分化是指由于细胞的分工导致的细胞结构和功能的改变或发育方式改变的过程，即细胞功能特化的过程。在植物个体发育过程中，细胞分化是“前导”，细胞的分化导致形态的发生，从而形成不同的器官，不同的器官执行不同的功能，分化主要是由细胞内的基因决定的，也就是说分化是基因在时间和空间两个层面的顺次表达的结果。

高等植物中，细胞分化的结果是形成具有根端和茎端的胚胎（种子），根端和茎端分生细胞不断分裂和分化导致种子萌发，接着经过一系列的形态发生过程，建成具有不同功能的器官（根茎叶花果种子），从而完成植物的个体发育周期。

(2) 细胞脱分化 (Gedifferentiation)

细胞脱分化是指一个成熟的细胞回复到分生状态或胚性细胞状态的现象，即失去已分化细胞的典型特征。

正常情况下，植物已经分化的细胞不会再恢复分裂能力重新开始细胞分裂，直到植物体死亡，然而在植物组织培养中，一个已经分化的、功能转移的细胞表现全能性，首先要经过一个脱分化的过程，改变细胞原来的结构、功能而回复到无结构的分生组织状态或胚性细胞，然后细胞再分化，经过形态建成，最后产生完整的植株。

(3) 细胞再分化 (Ridifferentiation)

细胞再分化是指脱分化的分生细胞重新恢复细胞分化能力，沿着正常的发育途径，形成具有特定结构和功能的细胞。

细胞再分化常通过两条途径实现，一种为胚胎的发生，另一种是直接分化器官，再生成植株，其中大部分植物是通过器官发生途径再生植株的，即脱分化的细胞在适宜的条件下分化成不同的细胞、组织甚至完整的植株。

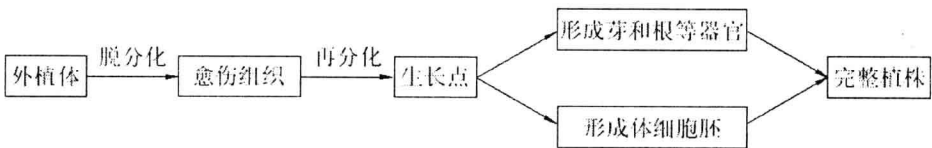


图 1-1 植物细胞全能性及其实现过程示意图

在脱分化和再分化过程中，细胞的全能性得以表达，当然，不同植物、不同组织器官、不同细胞间全能性的表达难易程度会有所不同，这主要取决于细胞所处的发育状态和生理状态，组织培养的主要工作就是设计和筛选适宜的培养条件，探讨和建立适宜的培养条件，促使植物细胞组织完成脱分化和再分化。

1.1.2.3 外植体

外植体指的是在无菌条件下植物组织培养中的各种接种材料，即离体培养于人工培养基上的、用于达到某种培养目的的原始植物材料。现在常用的植物组织培养的外植体材料包括植物体的各种器官、组织、细胞和原生质体等。

1.1.2.4 培养基

培养基指的是根据植物营养原理和植物组织离体培养的要求，人工配制的营养基质。常用的培养基有固体培养基、液体培养基、固液培养基等，例如 MS 培养基、B₅ 培养基等均为植物组织培养中常用的固体培养基。培养基中通常含有大量无机元素、微量无机元素、维生素、氨基酸、糖类、植物生长调节物质、琼脂等固化物、椰汁等天然提取的营养物等，但不同的培养基类型中各种物质的种类和浓度有差异，现在在组织培养实验研究中的也有一些是在原有培养基配方的基础上，根据培养材料及诱导目的不同而设计出改良优化的培养基也取得了较好的效果。

1.2 植物组织培养的分类

由于植物组织培养所采取的培养基、培养材料、培养方法和培养目标的不同，因而可以把植物组织培养划分为各种不同的类型。

1.2.1 按外植体不同分类

植物组织培养从广义上来说包括植物的一个器官、一颗种子、一个胚胎、一粒花粉、一个细胞，还包括去了细胞壁的原生质体的离体无菌培养，统称为植物组织培养。因此拥有几种不同水平的培养技术，即整体的、器官的、组织的、细胞的和原生质体的培养技术。植物组织培养可分为以下几种类型：植株的培养、植物胚胎的培养、植物器官的培养、植物组织的培养、植物细胞的培养、植物原生质体的培养。

1.2.1.1 植株的培养 (Plant culture)

植株的培养是指以完整植株形态的材料（如幼苗和较大的植株）为外植体的无菌培养。该种培养方式因其培养材料较大容易污染，诱导成活率低，在实际应用中较少采用。

1.2.1.2 植物胚胎的培养 (Embryo culture)

植物胚胎的培养指的是以从胚珠中分离出来的成熟或未成熟胚为外植体的离体无菌培养。植物胚胎的培养具体包括幼胚培养、成熟胚培养、胚珠培养、子房培养、胚乳培养和试管受精等。植物胚胎培养主要应用在克服远缘杂交不育性，用于杂交育种培育新的优异杂种植物，打破种子休眠，提早结实，缩短育种的年限，促进种子萌发，快速繁殖获得大量植株及获得单倍体和三倍体的植株等方面。目前在植物组织培养研究中该种方法的实际应用意义较大，并且可以与遗传育种学、生物技术、分子生物学等多项学科技术相融合，可结合理论与生产实践进行深入的研究。

成熟胚培养一般不必附加成分复杂的维生素和氨基酸，也不需要加入高浓度的蔗糖等高渗物质，培养基及生长调节物质的选配与其他外植体相同。有些植物成熟胚在正常的无激素培养基上可萌发成苗。

幼胚培养发育成单株所要求的营养和激素条件十分严格。越早期的胚，培养难度越大，要求的基本培养基成分越复杂。心形胚以前的胚胎可试用胚珠培养以克服技术上的困难。已分化的或成熟胚培养只需大量无机盐成分和蔗糖即可，而尚未分化的幼胚培养除需要通常的无机盐成分外，还需要提供有机成分（维生素、氨基酸和蔗糖等）和植物激素。幼胚培养可发育成正常单株，用于挽救中途败育的杂种胚，克服植物杂交或自交不育性；或在果树早熟性育种中克服核果类胚的后熟作用合子胚（幼胚或成熟胚）是再生能力很强的外植体，可经器官发生或体细胞胚胎发生再生植株。针叶树可用胚进行微繁殖，胚性愈伤组织又是产生悬浮培养细胞、分离原生质体，以及进行遗传转化和体外选择的良好材料。

1.2.1.3 植物器官的培养（Organ culture）

植物器官的培养指的是以植物的根、茎、叶、花、地下茎、鳞茎或鳞片等器官作为外植体的离体无菌培养，如根的根尖和切段，茎的茎尖和切段，叶原茎、叶片、子叶；花器的花瓣、雄蕊（花药、花丝）、胚珠、子房、果实等离体无菌培养。研究表明，不同的植物器官作为外植体进行离体培养对于不同植物差异较大，而且诱导效果和培养的条件也明显不同。

一般而言，茎段（茎节）、芽、茎尖或茎尖分生组织培养可用来进行体外无性快繁（或微繁殖）、体外种质保存，茎尖或茎尖分生组织培养还可结合热处理脱除病毒；叶片、节间茎段、变态茎植物营养器官（如鳞片、块茎等）、花序（茎、梗）、花瓣、花丝、花托等母体器官的培养既可用来进行微繁殖，也可作为转基因的良好受体。培养程序包括材料选择和采集、外植体的表面消毒、接种和初代培养（启动培养、无菌培养的建立）、继代增殖培养、生根培养、炼苗移栽等。花药培养可用来获得单倍体植株，单倍体自然或人工加倍，可使基因迅速纯合，缩短育种周期。单倍体加倍技术有利于进行倍性操作。单倍体用于突变体的选择，还可排除显隐性基因干扰。

种子也可作为外植体进行培养，将种子无菌播种在营养培养基上萌发形成无菌实生苗，可提供无菌外植体，尤其适用于表面消毒困难的植物；种子培养可将兰花等无或少胚乳种子无菌萌发成苗，并可形成原球茎，种子和胚轴培养还可诱导形成胚性愈伤组织或丛生芽。种子作外植体易获得数量较多的外植体，耐消毒，且操作简单，最主要的是种子培养不受季节影响，但不同种子培养产生的后代可能在基因型和表现型上存在较大差异，这对利用种子及实生苗进行微繁殖有一定影响。

1.2.1.4 植物组织的培养（Tissue culture）

植物组织的培养指以分离出植物各部位的组织（如分生组织、形成层、木质部、韧皮部、表皮、皮层组织、薄壁组织、胚乳组织等）或将已诱导的愈伤组织为外植体的离体无菌培养，即狭义的组织培养。

如分生组织仅指最幼龄叶原基以上的凸起部分，直径约 100 μ m，长度约 250 μ m。

实际中单纯采用分生组织培养常由于外植体太小而难以成活，因此茎尖分生组织常是指带 1~2 个幼叶原基的顶端分生组织，研究表明，茎尖的培养可以达到脱毒的目的，在球根类花卉中大量应用，并可从根本上脱除百合、唐菖蒲等的病毒病。

1.2.1.5 植物细胞的培养 (Cell culture)

细胞培养指从活体组织上分离的、分散性好的单个游离细胞如花粉、小孢子或微细胞团的作为外植体进行离体的无菌培养。细胞培养包括利用生物反应器进行的，旨在促进细胞生长和生物合成的大量培养系统和利用单细胞克隆技术促进细胞生长、分化直至形成完整植株的单细胞培养。

单细胞可采用机械方法和酶解的方法从完整的植物器官上分离，更常用的方法是对结构松脆的愈伤组织进行振荡培养，利用温和的机械压力使愈伤组织崩解分散成小的细胞团及单细胞。细胞培养主要采用液体悬浮培养方式，其步骤分为：外植体表面消毒与接种、愈伤组织诱导与继代培养、诱导与选择结构松脆性愈伤组织、液体振荡培养分离单细胞、悬浮液过滤、离心收集单细胞、细胞悬浮培养（摇床振荡培养或转床旋转培养）、细胞团和微愈伤组织形成、转接到固体培养基上进行愈伤组织培养和植株再生。细胞悬浮培养液中除包括单细胞外，还有各种形态的细胞及小的细胞团块和微愈伤组织。而单细胞培养方式可分为平板培养、液体浅层培养、看护培养或哺育培养、微室培养等。

对培养的单细胞进行生理生化研究比从整株植物研究有不可比拟的优势，因而十分有利于对细胞代谢、各种物质对细胞的作用及细胞反应、细胞分裂、细胞分化发育、细胞相互作用及其分子机理的研究。单细胞培养有利于进行体外诱变、体外选择、遗传转化等，用于作物品种改良。

1.2.1.6 植物原生质体的培养 (Protoplast culture)

原生质体包括对去掉细胞壁的细胞原生质体的培养及杂种细胞原生质体的培养。原生质体培养程序包括原生质体的制备、原生质体的培养、细胞壁的再生、细胞分裂、细胞团及愈伤组织形成、愈伤组织分化和植株再生。原生质培养包括对去掉细胞壁的细胞原生质体培养及杂种细胞原生质体的培养。

原生质体培养的主要用途是进行原生质体融合或体细胞杂交及制造细胞质杂种，从而实现远缘遗传重组，创造新的遗传型，或转移抗逆性状，改良作物品质。由于植物原生质体去除了细胞壁，原生质体之间可以进行融合而产生杂种细胞，这突破了常规有性杂交育种的限制。此外，原生质体在外源 DNA 导入和遗传操作、变异体选择等方面具有优势。原生质体还可用来进行游离核、细胞器和微生物等的移植和摄入，不同类型细胞和细胞器的分离，细胞质遗传和种间细胞器互作研究，质膜功能和结构研究，细胞水平上对抗逆性及其生理现象研究和植物病毒的相互作用研究等。目前采用原生质体培养技术进行花卉的遗传转化及相关实验研究已取得了成功。

1.2.2 按植物的培养过程分类

植物的组织培养技术按照培养的过程大致可以分为初代培养、继代培养和生根培养几种方式。

1.2.2.1 初代培养

初代培养指的是将植物体上分离下来的外植体进行最初几代培养的过程。其目的是建立无菌培养物，诱导腋芽或顶芽萌发，或产生不定芽、愈伤组织、原球茎。通常是植物组织培养中比较困难的阶段，也称为启动培养。

1.2.2.2 继代培养

继代培养指的是将初代培养诱导产生的培养物重新分割，转移到新鲜培养基上继续培养的过程。其目的是使培养物得到大量繁殖，也称为增殖培养。

1.2.2.3 生根培养

生根培养即在组织培养中诱导无根组培苗产生根，形成完整植株的过程。其目的是提高组培苗田间移栽后的成活率。

1.2.3 按培养基的物理状态分类

植物的组织培养根据培养基中是否加入凝固剂可将植物组织培养分为固体培养、液体培养和半固体培养。

1.2.3.1 固体培养

固体培养一般指的是在液体培养基中加入凝固剂再接种培养物的培养方法。实验用的凝固剂有琼脂、明胶和硅胶，一般植物的组织培养以琼脂最为合适，常用量为0.5%~2.5%。

1.2.3.2 液体培养

液体培养是不加凝固剂的液体培养基中直接接种培养物的培养方法。液体培养根据培养液的量的不同可分为液体悬浮培养和液体浅层培养；液体培养根据培养瓶的放置不同可分为液体静置培养、液体旋转培养和液体振荡培养。

1.2.3.3 半固体培养

半固体培养基也称为固—液培养基在液体培养基中加入少量凝固剂即为半固体培养基，例如琼脂只需加入0.2%~0.7%，常用作细菌动力检查和菌种保存、噬菌体制剂的制备等，植物组织培养中应用较少。

1.2.4 按植物的培养结果分类

1.2.4.1 愈伤组织培养

愈伤组织培养指的是从叶片、茎段、花器官、根茎、地下鳞茎等外植体上直接诱

导出愈伤组织的培养，愈伤组织可作为植物组织培养的原材料和进一步培养的材料。

1.2.4.2 胚状体培养

胚状体培养是指从外植体上直接或间接诱导出胚状体的培养，胚状体可作为人工种子胚的来源，也是快速繁殖植物的主要途径。

1.2.4.3 再生植株培养

再生植株培养是指从外植体上通过各种途径直接或间接诱导出再生植株的培养，再生植株的获得是组织培养的主要目的。

1.2.5 按植物的培养手段分类

植物组织培养常根据植物培养手段不同，可将植物组织培养分为四种类型，即试管嫁接、试管受精、试管加倍、试管育种。

如试管嫁接指的是在无菌条件下，试管嫁接是组织培养与微型嫁接方法相结合而获得试管再生苗的一项新技术。由于嫁接在实验室进行，条件易于控制，可以四季操作，已在各种园艺经济作物的病理学、生理学、种质保存等实验研究中得到广泛应用。在果树作物中柑橘、苹果已有用茎尖微型嫁接技术获得无毒苗的报道。而对于植物组织培养中试管受精、试管加倍、试管育种等培养手段也在一些植物研究中有相关报道，但一般都未能在实际生产中得到应用。

1.3 植物组织培养的发展

1.3.1 起始阶段

植物组织培养发展的起始阶段指的是从 20 世纪初至 20 世纪 30 年代。这一阶段，在植物组织培养方面建立了植物组织培养的综合培养基，包括加入无机盐、有机糖、生长物质，为后来的培养基的研究发展奠定了基础，此外，培养材料扩大到已分化完全的器官和组织，建立了植物组织培养的基本方法，但由于最终并没有发育为完整的植株，因此成为植物组织培养的起始阶段。

20 世纪初，在 Schleid 和 Schwan 创立的“细胞学说”理论的推动下，1902 年德国植物生理学家 Haberlandt 提出高等植物组织和器官可以不断分割，直至分成单个细胞，而单个细胞在适宜条件下具有发育成完整的新个体的能力，即植物细胞具有全能性。为证实自己的观点，他对高等植物的叶肉细胞、雄蕊细胞、气孔的保卫细胞等材料进行离体无菌培养，由于当时实验材料的性质、离体培养的条件、植物的化学成分等方面研究较少，离体培养只观察到了细胞的生长和细胞壁的加厚，而没有看到细胞的分裂和增殖。然而，作为植物组织培养的先驱者，他所提出的细胞全能性的设想为植物组织培养的产生和发展奠定了理论基础，并且指导了后来的植物离体培养的实验研究。

在植物细胞全能性理论观点的影响下，人们尝试将植物的器官、组织、细胞从母

体植株上取下，放在体外的人工设计的无菌环境中使其生长，从而了解植物生长发育的规律。1904 年，Hanning 以萝卜和辣根菜的幼胚为培养材料，并在培养基中添加无机盐和有机物，结果发现离体胚可充分发育成熟并可提早萌发形成小苗，即世界上首次胚培养成功的例子。后来，Brow（1906 年）和 Laibach（1925 年）相继进行了胚为材料的离体培养研究，发现胚具增殖和杂种幼胚可诱导发育成杂种植株的现象，从而证明了植物在远缘杂交中应用的可能性。此外，利用离体根尖培养获得了成功，1922 年，Haberlandt 的学生 Kotte 和 Robbins 分别获得了根尖离体培养实验的成功。1922 年美国的 Knudson 采用胚培养法获得兰花幼苗，解决了兰花种子发芽困难的问题。1926 年植物生理学家 F.W.Went 首先发现了可以促进子叶鞘生长的物质，1930 年证实这种物质是生长素类的吲哚乙酸（IAA）。

1.3.2 奠基阶段

植物组织培养奠基阶段指的是从 20 世纪 30 年代中至 50 年代末。植物组织培养技术得到逐步的发展和完善，形成两个重要模式——培养基模式和激素调控模式，这一理论的提出使得植物组织培养技术具有一定的程序性。

1934 年，美国人 White 通过对番茄根的离体培养实验获得了真正的成功，形成了第一个正常生长的无性系，从而使得非胚器官培养获得了首次的成功，1937 年，他在试验中还发现了 B 族维生素在根的离体培养中有重要的作用。与此同时，Cautheret 于 1934 年在山毛榉和黑杨等植物的形成层组织培养过程中发现只有在培养基中加入 B 族维生素和 IAA（吲哚乙酸）后，形成层组织的生长才能显著增加，1939 年他通过连续培养胡萝卜形成层获得首次成功。1939 年，Nobecourt 用胡萝卜组织建立了类似的形成层的连续组织培养物。鉴于 White、Cautheret、Nobecourt 三人对于组织培养技术的建立和形成的巨大贡献，三人被称为植物组织培养奠基人，随后的培养方法和培养基配方形成和优化均是在三位奠基人的方法和培养基基础上演变和发展起来的。

在三位奠基人有关组织培养技术理论提出后，1944 年，美国人 Skoog 用烟草愈伤组织研究器官发生时，发现生长素对根有促进作用，并且对芽的形成有抑制作用。Skoog（1948 年）和 Tsuhuii（1951 年）等对烟草髓部及茎段进行培养，观察到腺嘌呤/生长素的比例可以调控芽与根的分化，该项研究标志着植物组织培养进入一个全面发展的新时期。这一发现为促进植物组织培养和形态发生和人为调控提供了调控模式，结合激动素（KT）/6-苄基腺嘌呤（BA）、玉米素（ZT）等腺嘌呤衍生物或其他类似物的研究，发现并建立了激动素和生长素的比例控制芽和根分化的模式。

此外，1941 年，Overbeck 等首次将椰汁加入培养基中，发现椰汁可促进曼陀罗胚的发育，从而使得椰汁在后来的组织培养的研究中被研究者广泛的应用于器官发生的研究中，现在椰汁作为营养物质仍然在大多数植物的组织培养中采用，效果很好。1952 年，Morel 和 Martin 通过茎尖分生组织的离体培养，在已受病毒侵染的大丽花中获得无病毒植株，该项技术标志着采用茎尖组织培养技术可脱除植株体内的病毒，从而解决植物长期遭受病毒病困扰的难题。1962 年，Murashige 和 Skoog 在培养烟草细胞试

验中设计应用了 MS 培养基, 现在已广泛应用于细胞、组织、器官的组织培养中, 而 LS 和 WS 培养基是在 MS 培养基基础上演化而来的, B₅ 培养基是在 1968 年由 Camborg 等培养大豆根细胞而设计应用的, 现在广泛应用在双子叶植物、木本植物的组织培养。White 培养基是由 White 在 1943 年为培养番茄根尖而设计应用的。上述的植物组织培养基基本培养基成分的提出为后来植物组织培养技术发展起到了很大的作用, 尤其对于这些实验研究过程中培养基模式的基本建立, 确定了植物在组织培养过程中需要的营养元素种类和浓度的大小, 初步提出组培培养基中营养元素主要包括无机营养物、有机营养物、植物生长刺激物质(琼脂、活性炭等)、附加物、天然添加物。

伴随培养基模式和激素调控模式的建立, 细胞悬浮培养、微室培养、平板培养技术相继建立, 有关器官形成和个体发生的研究迅速发展, 植物离体培养技术方法基本成熟, 但这一时期植物的离体培养技术并没有直接应用到生产, 而只是停留在实验研究阶段。

1.3.3 蓬勃发展阶段

20 世纪 60 年代至今, 近几十年植物组织培养得到了迅速的发展, 并广泛应用于生物学和农业科学, 在生产上发挥了很大作用。随着植物组织培养技术的不断完善, 以及对离体培养中细胞的生长、分化规律的逐步认识, 植物组织培养的蓬勃发展阶段主要的贡献为在植物组织培养研究中确定明确的目标, 并尝试将这项技术应用于生产实践中。

1960 年, 英国学者 Cocking 用酶法分离原生质体成功, 开创了植物原生质体培养和体细胞杂交技术的先河, 利用酶法分离原生质体被认为是植物组织培养发展史上的第二次突破。1960 年, Mor 开展兰花的茎尖培养的实验研究, 得到了脱除病毒的兰花植株, 并探索了快速繁殖兰花的技术, 取得了一定的成功。其后国际上相继建立了兰花工业, 随后在“兰花工业”高效益的刺激下, 植物离体微繁技术和脱毒技术得到了迅速发展, 实现了试管苗产业化, 取得了巨大的经济效益和社会效益。1964 年, 印度学者 Guha 和 Maheshwari 成功地将曼陀罗花药培养成花粉单倍体植株, 从而促进了植物花药单倍体育种技术的发展。1973 年最早报道矮牵牛叶肉原生质体再生植株。同年 Deber 和 Nitsch 通过番茄小孢子的离体培养而获得单倍体植株, 及在 1974 年 Greshoff 从葡萄花药培养中, 得到单倍体愈伤组织, 1975 年 Rosati 从草蓼花药培养中, 获得小孢子发育的植株, 这些研究为园艺植物孢子培养、花药培养等的研究奠定了基础并且提供了技术上的支持。这一时期的园艺植物组织培养研究中蔬菜方面主要集中于茄科和十字花科蔬菜, 而对于花卉方面的研究可见花卉植物的细胞融合的报道, 主要集中在生殖细胞之间或生殖细胞与体细胞之间进行原生质体融合技术的探索, 如石蒜生殖细胞与其花瓣原生质体融合; 庸香百合花粉原生质体与生殖细胞原生质的融合, 并取得了成功。1979 年陈振光等人从四季橘的花药培养中诱导得出花粉植株。随后在许多果树、蔬菜和花卉植物花药培养中, 获得花粉单倍体植株, 据不完全统计已有 200 多种植物的花药或花粉培养获得再生植株。随后在 1981 年由 Larkin 和 Scocrooft 提出了