高等院校研究生实验技术系列试用教材

植物生理学研究技术

（供植物生产类专业研究生、教师及科研人员使用）

主　　编：孙　群　胡景江

副 主 编：王渭玲　曹翠玲

参编人员：龚月桦　魏永胜

林　岭　周春菊

慕自新

主　　审：梁宗锁

西北农林科技大学出版社

需要全本请访问 www.ertongbook.com

图书在版编目(CIP)数据

植物生理学研究技术/孙群,胡景江主编.—杨凌:西北农林科技大学出版社,2005

ISBN 7-81092-248-3

Ⅰ.**植**… Ⅱ.①**孙**… ②**胡**… Ⅲ.**植物生理学—研究** Ⅳ. Q945

中国版本图书馆 CIP **数据核字**(2005)**第** 155872 **号**

植物生理学研究技术

孙　群　胡景江　主编

出版发行　**西北农林科技大学出版社**

地　　址　**陕西杨凌杨武路** 3 **号**　　**邮　编**:712100

电　　话　**总编室**:029—87093105　　**发行部**:87093302

电子邮箱　press0809@163.com

印　　刷

版　　次　2006 **年** 8 **月第** 1 **版**

印　　次　2006 **年** 8 **月第** 1 **版**

开　　本　787 mm×1092 mm　1/16

印　　张

字　　数

ISBN 7-81092-248-3/Q・6

定价:**元**

本书如有印装质量问题,请与本社联系

前　言

《植物生理学研究技术》主要是为高等农林院校植物生产类专业的研究生以及其他有关专业的高年级大学生提供的专业基础课教材，也可以作为有关研究人员的实验参考书。在选材时，我们注重理论与实践的紧密结合，并主要侧重于一些实用性强的先进实验技术原理与操作技术训练相结合，为研究生进入科学研究阶段作准备。

本书分为基本理论和操作技术两大部分，其中理论部分包括植物组织培养、细胞各部分的分级分离、植物水分及逆境生理、光合、呼吸、植物次生物质代谢和植物激素研究技术等六个方面的内容。实验操作部分与理论部分内容相互对应形成专题实验，每个专题实验又分为若干个独立小实验。内容上力求涉及植物生理研究的主要领域，大部分实验内容来自于我校植物生理生化专业的研究生、教师和科研人员近年来在科学研究中所选用的实验方法，以及编者多年积累的实验工作经验，经整理、编写而成。也有一部分实验内容来自全国各个大专院校或科研院所提供的实验方法经精选后再重新整理编写而成的。因此，本书积累了多方面的科研实践经验，体现了植物生理学研究技术的特色。

本教材由孙群、胡景江主持拟定编写提纲，曹翠玲、王渭玲、魏永胜、龚月桦、林岭等任课教师共同编写完成。

在编写过程中受到西北农林科技大学生命科学学院植物生理教研组张继澍教授、梁宗锁教授、高俊凤教授和生物工程教研组徐虹博士等老师的热情帮助，李绍军同志协助整理资料和绘图，生物实验室李学俊、王翠云等参加了大部分实验的预作，为本书的编写付出了辛勤的劳动。编者在此一并表示衷心的感谢。

由于编者的理论水平和实践范围的局限性，加之时间仓促，错误和缺点在所难免，欢迎各位研究生和使用本书的读者提出宝贵意见。

编　者

2005 年 9 月

目　　录

第一部分　基本理论

概述 …… (3)
第 1 章　植物组织培养技术 …… (5)
1.1　植物组织培养的概念和分类 …… (5)
1.1.1　植物组织培养的基本概念 …… (5)
1.1.2　植物组织培养的分类 …… (5)
1.2　植物组织培养的基本原理 …… (7)
1.2.1　植物细胞的全能性及其表达 …… (7)
1.2.2　细胞的脱分化、再分化和植株再生 …… (7)
1.2.3　感受态和决定作用 …… (7)
1.2.4　极性及其在分化中的作用 …… (8)
1.2.5　植物激素在细胞分化中的作用 …… (8)
1.3　植物组织培养的基本操作技术 …… (9)
1.3.1　实验室的基本设备和用具 …… (9)
1.3.2　植物组织培养的一般操作程序 …… (9)
1.3.3　外植体材料的选择 …… (14)
1.3.4　材料的培养 …… (15)
1.3.5　愈伤组织的诱导及形态发生 …… (17)
1.3.6　植物器官的离体培养 …… (18)
1.3.7　植物细胞培养 …… (23)
1.3.8　原生质体培养 …… (25)
1.3.9　植物培养物的保存 …… (31)
1.4　植物组织培养技术的应用及展望 …… (33)
1.4.1　脱毒种苗生产及无性快速繁殖技术 …… (33)
1.4.2　植物育种及种质资源保存交换 …… (33)
1.4.3　次生代谢物的生产 …… (33)
1.4.4　植物的离体显微嫁接技术 …… (34)
1.4.5　植物细胞的固定化和人工种子技术 …… (34)
第 2 章　植物细胞各部分的分级分离 …… (36)
2.1　基本原理 …… (36)
2.1.1　差速离心技术 …… (36)

2.1.2 密度梯度离心技术 …… (37)
2.2 植物细胞各部分的分离程序 …… (38)
2.2.1 细胞的匀浆化 …… (38)
2.2.2 分离纯化程序 …… (38)
2.2.3 纯度鉴定 …… (39)
2.3 几种植物细胞组分的分离制备 …… (39)
2.3.1 原生质体的分离制备 …… (39)
2.3.2 植物线粒体的制备 …… (41)
2.3.3 植物叶绿体及其色素蛋白复合体的分离和制备 …… (43)
2.3.4 植物细胞质膜的分离 …… (45)
2.3.5 膜脂的提取分离技术 …… (47)
第 3 章 植物的水分及低温逆境生理研究技术 …… (50)
3.1 水分状况指标 …… (50)
3.1.1 水势 …… (50)
3.1.2 渗透势 …… (51)
3.1.3 压力势 …… (51)
3.1.4 含水量 …… (52)
3.1.5 形态指标 …… (53)
3.2 水分状况的测定 …… (53)
3.2.1 水势的测定 …… (53)
3.2.2 渗透势的测定 …… (56)
3.2.3 压力势的测定 …… (56)
3.2.4 相对含水量的测定 …… (56)
3.2.5 P-V 技术及其在植物水分状况研究中的应用 …… (57)
3.2.6 植物蒸腾作用的测定 …… (59)
3.3 植物抗旱性的鉴定 …… (61)
3.3.1 植物的抗旱性鉴定方法与指标 …… (62)
3.3.2 抗旱性评定的综合指标—综合评价 …… (67)
3.4 植物抗寒性的鉴定 …… (68)
3.4.1 低温处理 …… (68)
3.4.2 植物抗寒性鉴定的指标 …… (69)
第 4 章 光合与呼吸作用研究技术 …… (71)
4.1 光合作用的测定 …… (71)
4.1.1 CO_2 同化速率的测定 …… (72)
4.1.2 O_2 释放速率的测定——氧电极法测定叶片的光合速率 …… (77)
4.1.3 有机物积累量的测定 …… (78)

需要全本请访问 www.ertongbook.com

4.2 叶绿素荧光的测定与分析 …… (78)
4.2.1 测定方法提出的背景 …… (78)
4.2.2 叶绿素 a 荧光动力学原理 …… (79)
4.3 叶绿体光合磷酸化活力的测定 …… (81)
4.3.1 荧光素酶法 …… (81)
4.3.2 ^{32}P 标记法 …… (82)
4.4 Rubisco 的纯化与分析 …… (82)
4.4.1 Rubisco 的纯化方法 …… (82)
4.4.2 Rubisco 蛋白的定量 …… (83)
4.4.3 Rubisco 活性测定 …… (83)
4.5 呼吸作用的测定 …… (84)
4.5.1 呼吸速率的测定 …… (84)
4.5.2 呼吸途径的测定 …… (85)
第 5 章 植物激素研究技术 …… (87)
5.1 植物激素的提取、分离与纯化 …… (87)
5.1.1 提取程序 …… (87)
5.1.2 分离与纯化程序 …… (87)
5.1.3 纯度检验 …… (91)
5.2 植物激素的检测技术 …… (91)
5.2.1 生物鉴定法 …… (91)
5.2.2 仪器检测法 …… (92)
5.2.3 免疫分析技术 …… (92)
5.3 植物激素的免疫定位技术 …… (100)
5.3.1 植物激素免疫组织化学定位的基本原理 …… (100)
5.3.2 植物激素免疫组织化学定位中存在的问题 …… (101)
5.3.3 植物激素的固定和标记方法 …… (101)
第 6 章 植物次生代谢产物的研究技术 …… (104)
6.1 植物次生代谢的概念及次生代谢产物的主要类型 …… (104)
6.1.1 植物次生代谢的概念 …… (104)
6.1.2 次生代谢产物的主要类型 …… (105)
6.1.3 与抗病有关的植物次生代谢物 …… (107)
6.2 主要次生代谢物的合成途径 …… (108)
6.2.1 萜类化合物的合成 …… (108)
6.2.2 酚类化合物的合成 …… (108)
6.2.3 含氮有机化合物 …… (109)
6.2.4 由糖和糖的衍生物衍生而来的代谢物 …… (109)
6.2.5 由脂肪酸代谢中的乙酰(乙酰 CoA)至丙二酸(丙二酰 CoA) 聚合途径

而合成的代谢物 …… (109)
6.3 次生代谢物的提取分离测定方法 …… (110)
6.3.1 植物次生代谢产物的提取方法 …… (110)
6.3.2 次生代谢产物的分离与精制方法 …… (112)
6.3.3 植物有效成分的活性追踪分离方法 …… (117)
6.4 展望 …… (118)
6.4.1 农作物改良 …… (118)
6.4.2 药用植物的细胞工程与基因工程 …… (119)

第二部分 实验操作

专题实验一 植物激素对愈伤组织形成和根芽分化的影响 …… (123)
专题实验二 高等植物线粒体、叶绿体和原生质膜的分离制备 …… (127)
2.1 植物线粒体和叶绿体的分离制备 …… (127)
2.2 两相分配法分离植物细胞原生质膜 …… (131)
专题实验三 作物抗旱生理指标的测定 …… (134)
3.1 材料培养 …… (134)
3.2 离体叶片保水力测定 …… (135)
3.3 连续升温电导法测定细胞膜透性 …… (136)
3.4 植物组织含水量和相对含水量(RWC)的测定 …… (138)
3.5 压力室法测定植物组织水势(ψ_w) …… (139)
3.6 水饱和渗透势法测定叶片渗透调节能力 …… (140)
3.7 植物根系水力学导度(水导)的测定 …… (141)
专题实验四 光合与呼吸作用测定 …… (143)
4.1 植物净光合速率、蒸腾速率及其他相关参数测定 …… (143)
4.2 蒸腾速率与水分利用效率测定 …… (147)
4.3 叶绿素荧光动力学参数测定 …… (152)
4.4 氧电极法测定光合与呼吸速率 …… (154)
专题实验五 植物激素的提取、分离、纯化及检测 …… (157)
5.1 植物激素的提取、分离与纯化 …… (157)
5.2 固相抗体型 ELISA 分析植物组织中 ABA 含量 …… (159)
5.3 固相抗原型 ELISA 测定 IAA 含量 …… (163)
专题实验六 植物逆境与衰老生理指标测定 …… (165)
6.1 超氧化物歧化酶活性测定 …… (165)
6.2 植物组织中过氧化氢酶活性测定(紫外吸收法) …… (167)
6.3 植物组织中过氧化物酶(POD)活性的测定 …… (168)

6.4 还原性谷胱甘肽含量的测定 …… (170)
6.5 可溶性蛋白质含量的测定(考马斯亮蓝 G-250 染色法) …… (171)
6.6 钼蓝比色法测定植物组织中维生素 C 含量 …… (172)
6.7 植物超氧阴离子自由基含量的测定 …… (174)
6.8 丙二醛含量的测定 …… (176)
专题实验七 植物次生物质代谢研究 …… (178)
7.1 苯丙氨酸解氨酶活性测定 …… (178)
7.2 绿原酸的提取与定量测定 …… (179)
7.3 总黄酮含量的测定 …… (181)
7.4 茶多酚含量的测定 …… (182)
7.5 挥发油含量测定 …… (184)

附 录

附录 1 植物组织培养常用培养基配方(mg/L) …… (189)
附录 2 常用缓冲液 …… (190)
附录 3 几种渗透溶液的配制表 …… (195)
附录 4 容易变质及需要特殊方法保存的试剂 …… (196)
附录 5 各种冷却剂的组成及冷却效果表 …… (196)
附录 6 常用植物激素及生长调节剂配制保存方法 …… (197)
附录 7 标准剂量单位 …… (197)
附录 8 不同温度下 O_2 与 CO_2 的溶解度 …… (199)
附录 9 离心机转速与相对离心力的换算 …… (199)

第一部分　基 本 理 论

概 述

植物生理学是研究植物生命活动规律的一门科学，其主要任务是研究和揭示植物在各种环境条件下进行的生命活动和机制。任何一门学科的发展，都与其相应的研究技术的发展密切相关。植物生理学也同其他学科一样，由于 20 世纪以来，物理学、化学、工程与材料学、激光与微电子技术的迅速发展，为生命科学研究提供了一系列现代化研究技术，例如同位素技术、电子显微镜技术、X 光衍射技术、超速离心技术、色谱分析技术、电泳技术以及近年来发展起来的计算机图像处理技术、激光共聚焦显微技术、膜片钳技术、压力探针技术等，都成为人类探索生命奥秘的强大武器。同时，也为植物生理学的研究开拓了广阔的前景。尤其是 20 世纪 50 年代以来，分子生物学技术异军突起，以其强大的生命力迅速渗透到生命科学的各个领域。分子生物学的研究成果，使植物生理学对植物生命现象的认识更加深入。

正是由于科学的进步和研究技术的发展，植物生理学在微观、个体和宏观三个层次上都发生了巨大的变化，获得了许多重大的突破。例如在微观方面，通过对生物膜结构与功能的研究，提出并确定了膜的“流动镶嵌”模型，明确了以类脂为主要成分的双层膜上，镶嵌着各种功能蛋白及其作用，如电子传递、能量转换、离子吸收和信号传导等。

在光合作用研究中，利用同位素示踪技术，揭示了光和碳循环的历程以及 C_4 类型、景天酸代谢(CAM)和光呼吸；由于快速荧光光谱技术和激光技术的应用，推动了光合原初反应的研究进程；电子显微技术和 X-光衍射技术使人们对生物膜和生物大分子的空间结构有了更加深入地认识，弄清了光合膜上许多功能性色素蛋白复合体的三维立体结构，将结构与功能的研究推向了微观世界。

植物组织和细胞培养技术的成功运用，不但证明了“细胞的全能性”理论，而且为植物细胞和基因工程的发展创造了条件。

植物激素的研究技术从最初的生物鉴定法到高效液相色谱技术(HPLC)、气相色谱技术(GC)，气质联用技术(GC-MS)到酶联免疫吸附检测技术(ELISA)，其灵敏度已达到了 10^{-12} g。

压力室、膜片钳和压力探针技术以及相关技术的应用，使植物逆境生理研究也有了长足的进步。如：对逆境下生物膜的组成、结构和功能及其与抗逆性的关系研究；ABA 与气孔开闭以及与植物干旱信号的调控研究；活性氧清除系统与植物抗逆性研究；植物渗透调节与渗调蛋白的合成及功能等方面的研究使人们对植物生长机制有了更多地了解。总之，由于研究技术的迅速发展，植物生理学才能以更加迅猛的速度向前迈进。

曾经在一个时期内，许多植物生理学专家转向了分子生物学的研究，但是植物生理学作为一门独立的学科，有着其特殊的研究领域和范畴，分子生物学不可能替代植物生理学。这是因为，植物在自然界中的生存与繁衍是以个体为基本单位而出现的，植物各个器官的生命

活动必须在个体水平上进行整合，才能成为一个完整的主体。分子生物学的研究成就只能使人们对植物生理现象的认识更加深入，从过去的个体、器官、细胞、亚细胞和生化反应的水平向代谢过程的基因表达与调控的方面深入。因此，植物生理学的研究吸收融合现代生物化学和分子生物学的研究成就而更具有创新活力，尤其是植物器官间物质与信息传递的研究正成为新的研究热点。由此可见，植物生理学研究技术的发展将面临新的挑战。

在实际的科学研究工作中，当一个研究项目确定之后，接下来最重要的就是确定实验技术路线和选择实验方法。一个好的研究方法，不仅要具有先进性，而更重要的往往是它严格的科学性、可靠性和实用性。这种方法一定要能够反映和达到该项目的预期目的。用这种方法所得到的数据要能够最大限度地反映某项研究的真实性，而且还应具有可重复性，同时，有可操作性，要能够因地制宜，就地取材。用最简单易行的方法，得出可信度最高的实验结果，就是最好的方法。本教材的编写目的之一，就是为植物生理学专业的研究生、科研工作者和其他有关工作人员在设计实验方案、选择实验方法和分析检测时提供参考和指导。

需要全本请访问 www.ertongbook.com

第 1 章　植物组织培养技术

1.1　植物组织培养的概念和分类

1.1.1　植物组织培养的基本概念

植物组织培养(plant tissue culture)是指植物的离体器官、组织或细胞在人工控制的环境下培养发育再生成完整植株的技术。是生物技术的重要组成部分。用于离体培养进行无性繁殖的各种植物材料称为外植体(explant)。

植物组织培养可以在不受植物体其他部分干扰下研究被培养部分的生长和分化的规律,并可以利用各种条件来影响它们的生长和分化,以解决理论上和生产上的问题。因此组织培养技术有力地推动了植物生理学、生物化学、细胞学、遗传学、形态学以及农、林、医、药等各门学科的发展和相互渗透,促进了营养生理、细胞生理和代谢、生物合成、基因转移和基因重组的研究。当前,植物组织培养作为生物工程的一项重要技术,在基础理论研究和生产实践中发挥着巨大的作用。而且,由于它不受季节限制,成本低、材料易得、生长周期短、繁殖率高、培养条件可以自动化控制等优点,因而应用前景十分广阔。

1.1.2　植物组织培养的分类

1.1.2.1　根据外植体的种类及特性分类

根据外植体的种类,可将组织培养分为:器管培养、花粉和花药培养、组织培养、胚胎培养、细胞培养以及原生质体培养等(图 1-1)。

(1)器官培养　包括根、茎、叶、花器官及其原基的培养,其中茎尖培养具有快速繁殖和除去病毒的优点。

(2)花药和花粉培养　花药是花的雄性器官,花药培养属器官培养;花粉是单倍体细胞,花粉培养与单细胞培养相似。花药和花粉都可以在培养过程中诱导单倍体细胞系和单倍体植株。经染色体加倍成为纯合二倍体,这样可以缩短育种周期,获得纯系。

(3)组织培养　包括分生组织、形成层组织、愈伤组织和其他组织的培养。愈伤组织是最常见的培养形式,因为除了一部分器官,如茎尖分生组织、原球茎外,其他各种培养形式一般都需要经过愈伤组织培养与诱导后才能产生植株。

(4)胚胎培养　包括原胚和成熟胚培养、胚乳培养、胚珠和子房培养等,可用于研究胚胎发生以及影响胚胎生长的因素;用试管受精或幼胚培养可获得种间或属间远缘杂种,因此也

是研究生殖生理的有用方法;通过胚乳培养还可以获得三倍体。

(5)细胞培养　包括单细胞、多细胞和细胞遗传转化体的培养。细胞培养也称为细胞克隆(cell clone)技术,它通过培养游离的单细胞,可诱导再分化,用于取得单细胞无性系,进行突变体的选育。在细胞培养中常采用悬浮培养、细胞薄层培养,以及单细胞的看护培养、平板培养、微室培养等。

(6)原生质体培养　包括原生质体、原生质融合体和原生质体的遗传转化体的培养。将去壁后裸露的原生质体进行培养,它易于摄取外来遗传物质、细胞器以及病毒、细菌等,常用于体细胞杂交和转基因的研究。

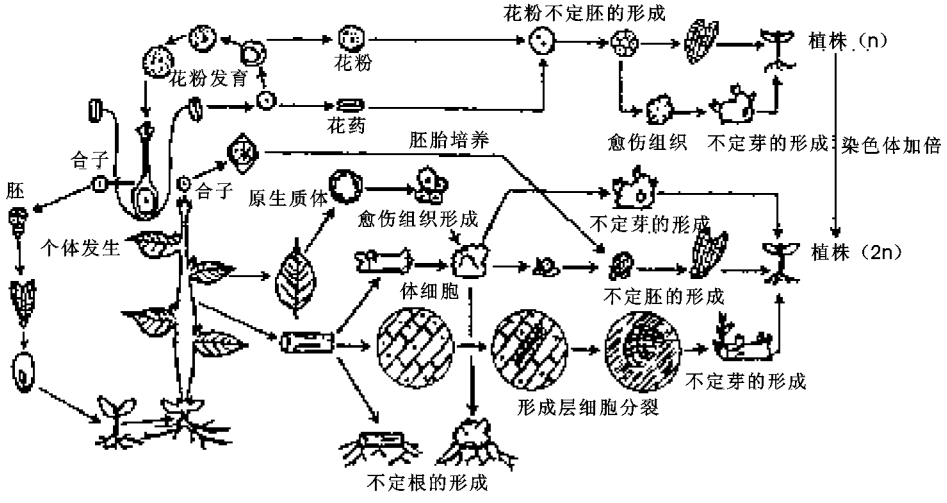


图 1-1　由高等植物的细胞、组织和器官培养成植株的过程(引自文献[6])

1.1.2.2　根据培养基种类及培养方式分类

(1)固体培养　即在各种营养物质与生长调节物质按比例配制的溶液中加入琼脂等固化剂,以支持植物材料吸收营养。其优点是植物材料的位置不会发生改变,通气良好,但生长周期长,生长速率较低。

(2)液体培养　即将植物材料悬浮在液体培养基中或通过支持物漂浮在培养基中的培养方式。其优点是植物材料吸取的营养物质均匀、充分,缺点是容易造成通气不良。液体培养又分为振荡培养(需用往复式摇床),旋转培养(需用水平式转床)和静止培养等方式,其中振荡培养又分为连续浸没培养和定期浸没培养等。另外,也可在液体培养基中放入滤纸,将外植体置于滤纸上进行培养,称为滤纸桥培养。可根据培养目的或材料种类选择不同的培养方式。

1.1.2.3　根据培养目的及培养物的作用分类

根据培养目的及培养物的作用又可分为:试管微繁殖、试管嫁接、试管受精、试管育种、诱导培养、继代培养、分化培养、增殖培养及生根培养等。

1.2　植物组织培养的基本原理

1.2.1　植物细胞的全能性及其表达

植物组织培养的理论基础是建立在细胞全能性的概念上。植物细胞的全能性(totipotancy)是指植物的每个生活细胞都具有该植物的全部遗传信息和在一定条件下发育成完整植株的潜在能力。根据细胞理论,细胞是生物有机体的基本遗传单位,特别是植物细胞是在生理上、发育上具有潜在性的全能单位。在一个完整植株上的某一部分只保持或表现一定形态、行使一定的功能,这是由于它受到其具体器官或组织所在的环境的束缚,但其遗传潜力并没有丧失。一旦脱离原来的器官和组织的影响,处于离体状态时,在一定的培养条件下,就可能表现出全能性并发育成完整的植株。

早在 1902 年,德国植物学家哈伯兰特(G. Haberlandt)就认为植物单细胞具有再生完整植株的潜在能力。经过科学家的不断努力,现在已经完全证实了植物细胞的全能性。尽管如此,植物细胞全能性表达的难易程度在不同植物上是不同的,甚至在同一植物,同一组织的不同细胞中都有很大差别。一般来说,受精卵、发育中的分生组织细胞、雌雄配子体及单倍体细胞较易表达。在绝大多数情况下,植物细胞全能性的表达要经过一个从分化状态到脱分化的愈伤组织(或悬浮细胞)的中间形式,然后进入再分化和再生的阶段,但也有从外植体直接发生脱分化和再分化过程而形成完整植株的。植物细胞全能性的表达一般要经历如下过程:

外植体→愈伤组织→生长点→根、芽的分化或细胞胚的发生→小植株

1.2.2　细胞的脱分化、再分化和植株再生

所谓脱分化(dedifferentiation),是已分化的组织或细胞在适当的培养条件下恢复细胞分裂活性,从已分化的状态转变为分生状态。愈伤组织即为典型的脱分化的组织。再分化(redifferentiation)是指脱分化的组织或细胞在一定的条件下可以转化为各种不同细胞类型的过程。在脱分化和再分化过程中,细胞全能性得以表达。其表达形式包括离体细胞的分化,器官、体细胞胚胎发生及植株再生。

再生作用(regeneration)是指与完整植物体分离的部分具有恢复植物其他部分的能力。当从植物体上分离出根、茎、叶等某一部分器官时,切口处往往会生长、分化产生新器官,长出不定根和不定芽。这是由于受伤组织产生了创伤激素(traumatin),促进了伤口周围细胞的分裂和生长,形成愈伤组织,愈伤组织凭借内部的激素和营养在一定环境条件下再生出新的器官。

1.2.3　感受态和决定作用

1.2.3.1　感受态(competence)

早期概念是指细胞或组织具有表达固有全能性或形态建成的能力。近期提出的感受态

概念相对比较专一，认为感受态实际上是一个接受某一发育信号或对某一发育信号响应的效应能力。因此可以将其看成一种在进行下一步特定形态建成过程中所必须的生理反应，是植物在细胞或分子水平上的一种准备状态。与植物的花熟状态相似，如“桃三李四杏五年，核桃白果公孙见”，这种现象也是果树在开花结果前的一种准备状态。

1.2.3.2 决定作用(determination)

这一概念来自动物胚胎发育生物学，是指胚胎的某一区域的组织或细胞只能向某一特定方向分化的发育状态。细胞一旦被决定，其发育途径就不可逆转或不可改变。后来，被一些植物学家引入到高等植物的细胞分化研究中，也是指植物器官发育所显示的决定作用。但是一般认为，植物的“决定作用”不像动物那样明显，例如蕨类植物的顶端分生组织，在本应形成叶原基的部位，可以通过早期改变培养条件使之发育成芽；但如果叶原基切下较晚，则最终发育形成叶。因此，植物组织和细胞在进行离体培养中与动物是有所不同的。即植物不易通过细胞分裂保持已有的分化状态，而通常是细胞迅速增殖并脱分化，形成愈伤组织，并在不同的条件下表现出不同的形态发生潜力。所以植物的决定作用和分化的稳定性是相对的，这也许是植物细胞全能性易于表达的一个原因。

1.2.4 极性及其在分化中的作用

所谓极性(polarity)是指植物器官、组织、细胞等形态学的两端在生理特性上的差异。由于极性的存在，使细胞发生不均等分裂的现象。有人认为极性产生的原因主要是 IAA 在茎中是极性运输，IAA 集中在形态学的下端，诱导生根，而 IAA 含量少的形态学上端则长出芽来。也有人认为是各种物理和化学的因素，如重力、压力、光以及包括植物激素在内的各种化学物质对细胞的不对称作用，引起原生质超显微结构和各种细胞器的分布不均匀而造成的。

1.2.5 植物激素在细胞分化中的作用

植物激素对分化的诱导方面最引人注意的就是对培养细胞的器官形成和胚胎分化的控制作用。在诱导或分化培养基中，可调幅度最大的生长调节物质主要是生长素和细胞分裂素。对于大多数植物来说，器官分化取决于内源生长素和 CTK 的平衡。但是有些外植体中的内源激素种类和浓度不同，为达到这种平衡，需要补加的激素种类和浓度也就各不相同。

一般认为，当 IAA/CTK 的比值高时，促进生根，比值低时促进长芽，二者比值相当时有利于愈伤组织的形成。

由于植物激素对于细胞中核酸和蛋白质的代谢、酶的诱导等过程有着深刻的影响，不少研究者相信激素在分化中的作用，可能是通过在转录或翻译水平上的调节作用而影响基因的表达。然而，至今对于植物激素在细胞分化中的作用了解依然是不够的。

1.3　植物组织培养的基本操作技术

1.3.1　实验室的基本设备和用具

1.3.1.1　实验室的设置

植物组织培养室需要无菌操作室和超净工作台；配制培养基的准备室；恒温培养室；检查培养情况的细胞学实验室等。另外，还可根据研究目的与实验条件建立化学分析实验室、组织切片室及暗室等。

(1)无菌操作室：进行植物组织和细胞培养操作的关键是实验室的无菌条件，这对以后的培养结果有极大的影响。其要求与一般的微生物无菌操作室相似。在卫生条件好的实验室可以用超净工作台来代替无菌操作室。从使用情况来看，超净工作台操作方便，效果良好。

(2)准备室：准备室主要用于培养基的配制和药品、试剂及各种实验用品的预先贮备，需要配备电冰箱、恒温水浴、药品橱柜和实验台等。

(3)恒温培养室：植物组织培养与动物和微生物培养室所不同的是，除需要恒温条件以外，还需要照明装置。在恒温培养室内可以放置培养架，摇床，转床以及各种培养装置。照明可采用几个 40 W 日光灯组，根据不同植物对光照的要求不同，安装不同数量的日光灯组，一般光照强度要求在 40～80 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 左右。恒温培养室的温度一般保持在 25 ℃±(1～2) ℃。

(4)细胞学实验室：主要用于观察培养结果和培养过程中植物组织或细胞所发生的各种变化，需要放置各种显微镜和解剖镜。

1.3.1.2　玻璃器皿与接种用具

(1)玻璃器皿：用于植物组织和细胞培养的玻璃器皿应选用碱性溶解度小的硬质玻璃制成，特别是进行长期培养时更应十分注意，否则容易发生不良影响。常用的玻璃器皿包括试管、三角瓶、培养皿、T 型管、圆形培养瓶、漏斗、量筒、细菌过滤器和滴定管等。

(2)接种用具：可选用医疗器械和微生物实验室的常用器具，如各种镊子、解剖刀、剪刀和接种针等。

除以上所提到的用品和仪器设备外，实验室常用的设备还有：烘箱、高压灭菌锅、离心机、自旋式培养架、悬浮培养器、控温加湿设备、摇床、转床、紫外灯及过滤装置等。

1.3.2　植物组织培养的一般操作程序

组织培养技术的基本程序一般包括洗涤和消毒、培养基的配制、植物材料的处理、外植体接种和在适宜条件下培养等几个方面。

1.3.2.1　洗涤和消毒

(1)洗涤方法：一般玻璃器皿用后需立即用清水浸泡，以免蛋白质类物质干后粘着于玻

璃壁上。新的或洗净后长期放置不用的玻璃器皿可采用两步洗涤法，即先用碱洗，再用酸洗的方法。碱洗，可用肥皂粉刷洗后并用清水洗净，然后再放入硫酸洗液中浸泡 1～2 h，用水冲洗干净后再用蒸馏水冲洗 2～3 次，烘干或晾干后备用。

(2)消毒灭菌方法：包括器具、无菌操作室的消毒灭菌，植物材料的灭菌以及无菌条件下接种等几个方面。

①无菌操作室的消毒灭菌：消毒灭菌措施主要有三类：

A. 定期用甲醛和高锰酸钾熏蒸，使用比例为 1 g 高锰酸钾加入 10 mL 甲醛；

B. 使用前用紫外灯照射 20 min；

C. 接种前用 70%酒精喷雾，使空气中的灰尘迅速沉降。地面和墙壁可用新洁尔灭擦洗，再用紫外灯照射 20 min 后使用。

工作人员必须在准备间换上消毒过的清洁实验服、口罩、帽子和拖鞋后方可进入无菌操作间。操作前双手应用肥皂水洗净，再用 70%酒精反复擦拭，这样可以得到较好的消毒效果。在接种过程中应尽量避免室内人员走动、说话和咳嗽。超净工作台的过滤膜要定期清洗，延长其使用寿命。

②器械的消毒灭菌：器械的消毒应视种类不同而有差异。玻璃仪器和金属器械可在干热条件下进行，最少需要在 160 ℃～180 ℃下烘干 3 h，也可在湿热 (121 ℃，1.1 kg/cm^2)条件下灭菌 20～30 min。塑料用具一般不能高温高压灭菌(耐高温塑料除外)，可直接用酒精擦洗灭菌。接种用的镊子、解剖刀、解剖针等一般浸泡在 70%酒精中消毒，使用前在酒精灯上烤干表面的酒精。

③外植体灭菌：用于接种的外植体，一般应选取无病虫、无伤口的新鲜材料，并选取植物组织内部无菌的材料如茎尖分生组织、花药幼穗、幼胚等。材料选好后，去掉不需要的部分，切成一定大小后在流水中冲洗干净。如果是带灰尘较多的材料，需要先用肥皂水洗净表面，然后选用适当的消毒剂进行材料表面灭菌。常用的消毒剂有升汞、酒精、双氧水、次氯酸钠等，也可加入少量的抗生素。通常将两种或两种以上的消毒剂混合使用，以取得最佳消毒效果。70%酒精比其他浓度的酒精有更强的杀菌力和穿透力，一般不单独使用。由于其湿润作用强，可排除掉材料上的空气，利于其他消毒剂的渗入，因此常用作表面消毒的第一步。使用时应严格掌握好处理时间，新鲜外植体一般不超过 30 s。而且灭菌时间和消毒剂的浓度应视外植体种类而定，幼嫩组织，表面蜡质层薄的材料使用浓度较低，灭菌时间也较短，灭菌后，要用无菌水反复冲洗，以防止残留药剂对材料造成的伤害。应尽量选用消毒后容易除去的药剂，并用无菌水反复冲洗数次，以去掉绝大部分的药剂，或选用能自动分解变成低毒物质的药剂。常用消毒剂及消毒顺序见表 1-1 和表 1-2。

灭菌后的材料应迅速切割成一定形状的小块，在无菌条件下接种于三角瓶、培养皿或其他培养器具中。值得注意的是，初次接种由于经验不足，技术不熟练，最好采用小容器，多数量，并尽量分散、互相隔离接种效果最好。

例如，现有 100 块外植体材料，将其接种到 100 支试管中，每管 1 块，2 周后发现污染率为 95%，可获得 5 块无菌材料；若将 200 块外植体接种到 100 支试管中，可能会出现以下 3 种情况：

A. 两块都污染；B. 1 块污染，1 块无菌；C. 两块均未污染。

需要全本请访问 www.ertongbook.com