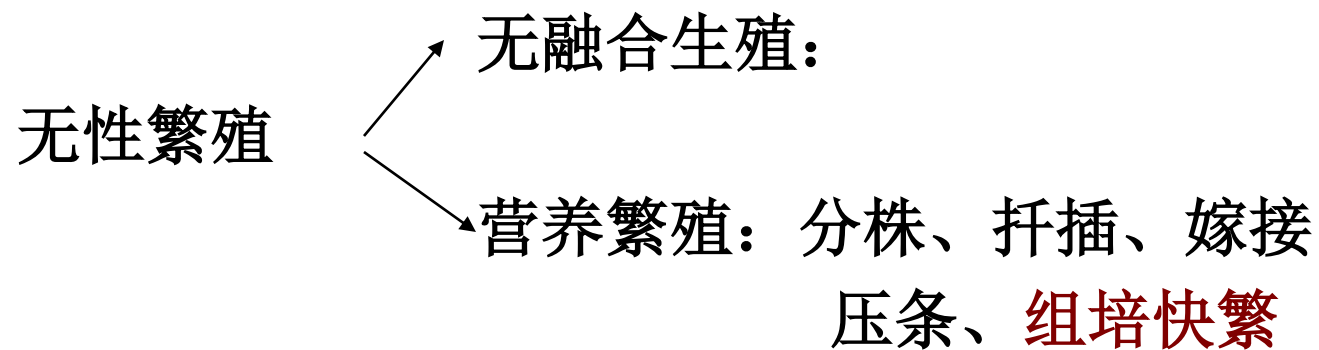


# 第5章 植物的快速繁殖和脱毒技术

# 第一节 植物的快速繁殖

# 一、离体快速无性繁殖



## 组培快繁：

用组织培养的方法，使植物的部分器官、组织在人工控制的适宜条件下，迅速扩大培养，并移植到温室或农田,繁殖出大量幼苗的繁殖方法。

即无菌条件下的营养繁殖，又称微繁。

用快速繁殖的方法，由同一外植物体反复继代培养得到越来越多的无性繁殖的后代称无性系 (clone)

最早是法国莫里尔（**Morel**）进行植物快繁，六十年代繁殖兰花，七十年代穆拉希格（**Murashige**）提出快繁分为外植体的建立、芽的增殖、生根和试管苗移栽三个阶段，每阶段需要不同的培养基成分和环境条件，草本园艺植物较易获得成功，七十年代琼斯（**Jones**）等人在苹果茎尖培养中发现一种酚类物质——根皮苷，对木本植物快繁是一个很大的促进，但限于桉树、杨树、麻栗树等少数树种，油棕、苹果、柑桔、桃树等（选择优良单株，用无性繁殖保持种性，解决育种周期长和杂交制种困难等问题）。

- **意义：**

- (1) 快速产生大量无菌苗（短时间、小空间），能够有效地保持优良品种的特性；**
- (2) 固定F1代杂种优势；**
- (3) 濒危物种繁殖途径；**
- (4) 安全保存种质资源（保护生物多样性）**
- (5) 节约耕地，提高农产品的商品率；便于运输。**

## 适用范围

- (1) 有性繁殖难以保持种性的异花授粉植物，油棕、猕猴桃；
- (2) 原种少、生产上又急需推广的植物；
- (3) 需脱毒的植物，马铃薯、兰花；
- (4) 无籽果实。

近年来，国外已有上百个具有一定规模的工厂生产花卉技术、年产值达数十亿美元，我国在非洲紫罗兰、月季、三倍体西瓜、文竹、甘蔗、香蕉等。



## 二、快速繁殖的特点

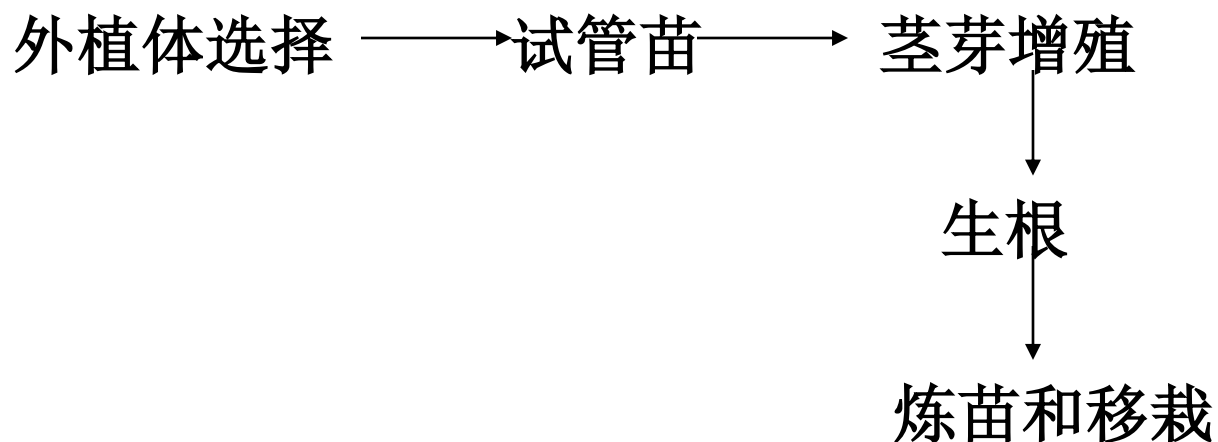
### （一）繁殖速度快，使用材料少，生产效率高

人工控制的条件下进行（营养、激素、培养条件），**不受季节影响，速度快、效率高**上百倍，对常规繁殖困难、需求量大的如桉树、每年长高4米（速生树种）叶片提取香精和甲醇，又是重要能源植物。

（二）生产集约化，**省时省工省空间**：30M<sup>2</sup>放一万多培养瓶，每瓶10苗，每批可生产10万株苗，操作管理方便，减少耕地，有利于植物工厂化生产。

**（三）生产脱毒植株：**植物病毒，除个别豆类外，大部分不经种子传染，也很少通过土壤传染，但随块茎块根，球根，鳞茎等营养繁殖传递到下一代，使品种退化，但其茎尖生长点不含病毒，用于组培可产生无毒苗，挽救感染病毒的植物，马铃薯、草莓、兰花、唐菖蒲等应用。

### 三、快繁的一般程序：



可分为四个阶段：无菌培养物的建立、芽的增殖、诱导生根和试管苗的移植。

## (一) 产生无性系的途径常有五种类型

(1) 原球茎途径(P231): 培养植物的组织形成原球茎, 原球茎在继代培养中不断分裂增殖, 进而形成小植株, 例如兰花的各部分离体组织都能诱导出原球茎, 切割培养, 能分化出许多小植株, 一年内可产生四百万个原球茎, 分化出大量试管苗。

(原球茎 protocorm: 是指由胚性细胞组成的呈圆球状的缩短的类似嫩茎的器官)



← 原球茎的增殖

原球茎发育成兰苗 →



**(2) 愈伤组织途径：**有数百种植物可经愈伤组织分化出小植株，可通过不定芽和胚状体形成小植株，如甘蔗茎尖或幼叶经愈伤途径**9**个半月可繁殖**15**亩地用的小植株。

**通过愈伤组织增殖：**易变异，应尽量避免，但对某些物种是唯一有效的增殖方式。

**(3) 胚状体途径：**组培中产生类似胚的结构，起源于非合子细胞经历合子相同的胚胎发育过程，该途径的繁殖系数更高，且很少变异，适合机械化生产，如胡萝卜体细胞培养。

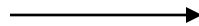
常使用胚、分生组织或生殖器官作为外植体。



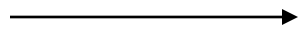
#### (4) 由器官外植体直接诱导不定芽，直接产生小植株

如无子西瓜、蕃茄、非洲紫萝兰，能保持原种特性，繁殖系数较高。

采用根、茎叶、花器官，易于产生不定芽的器官，非洲紫萝卜、蕃茄、秋海棠等用叶片，兰花和蕨类用茎尖，针叶树用子叶、下胚轴，单子叶植物如萱草、鸢尾、玉簪、小菖兰、菊花等，单子叶植物的鳞茎、鳞片，叶基部等。



不定芽增殖：百合、风信子、水仙、朱顶红、除虫菊等；



带鳞茎盘的鳞片

**(5) 无菌短枝培养：**有些植物具大量腋芽分生组织，在整体植株中由于顶端优势效应处于抑制状态，将发育成熟的腋芽连同短枝离体培养，促使腋芽萌发并诱导生根，可在短期内获大量小植株，以保存珍贵优良树种，花卉品种。

应从带有营养芽的部分得到外植体，茎尖，带芽茎切段，块茎、鳞茎、球茎（打破休眠——低温、高温、特殊光周期处理，芽已膨大但芽鳞片还未张开时，剥取茎尖）、顶芽及上部芽比侧芽及基部芽成功率高，木本植物中幼态较成年树易培养。

腋芽增殖：



# 植物快速繁殖的类型与方式

类型	方 式	特 点	事 例
器官型	腋芽萌发，以芽增殖芽，扩大繁殖系数	繁殖系数高, 遗传性较稳定是快速繁殖的主要方式	甘蔗、香蕉、香石竹、丝石竹等
器官发生型	通过脱分化形成愈伤组织，再分化出苗	可获得与母株相同的小植株，繁殖系数较低，可用于细胞分化的研究	烟草、油菜等
胚状体发生型	从愈伤组织或直接从子叶、下胚轴和花药培养中产生	首先证明植物细胞的全能性，繁殖系数高	甘蔗、胡萝卜、石刁柏等
原球茎型	由茎尖或腋芽产生原球茎, 放入培养基中发育成小植株	遗传性较稳定，原球茎可作为繁殖系母体	兰花
球茎芽型	叶柄表面产生圆球形小突起——球茎芽，一端出芽一端出根	遗传性较稳定，球茎芽可直接放入土中种植	观叶海棠
块茎型	叶片或叶柄上形成粒状芋块，进一步分化出芽和根	块茎芽可为繁殖系母体，不断切割繁殖移栽，成活率高	花叶芋
鳞茎型	鳞片近轴面或边缘直接形成带根的小鳞茎	在试管内形成小鳞茎需较长时间	百合、郁金香、贝母等
孢子型	用成熟或未成熟的孢子进行培养	孢子繁殖最困难的是表面消毒，萌发时间较长	地钱、狼尾蕨等
根茎型	蕨类具有横向的茎及直立的短根茎，为组织培养的最佳外植体	根状茎上产生蕨叶及根，繁殖速度较孢子型快	肾蕨、裂叶肾蕨、波士顿蕨等
微枝扦插型	带芽的小插条在试管内进行无菌扦插	为木本植物进行快速繁殖的主要方式	葡萄、杨树

## (二)培养基和培养条件

# 1 选用合适的培养基

(1)、基本培养基：**Ms**、**B5**、**White**等，因不同植物，不同外植体选用，最常用的是**Ms**，但其含氮量偏高，适当降低氮素水平能促进芽的生长和分化。

在整个培养过程各个阶段可使用同一培养基，但有时在第三阶段诱导根的形成时用盐浓度较低的基本培养基。

## (2)、激素的种类、用量和配比

不同植物和不同外植体内源激素种类和浓度不同，所需外源激素也会有差异，原

则上讲，**细胞分裂素**（**6BA**、**KT**、玉米素（**Zt**）、异戊烯基腺嘌呤（**2-IP**）

**有利于出芽**；**生长素类**（吲哚乙酸（**IAA**）、萘乙酸（**NAA**）、吲哚丁酸

（**IBA**）、**2,4-D**）**有利于生根**。在快繁中，**6BA**比**KT**效果好，生长素类物质虽不能促进芽的分化，但可提高外植体的诱导频率，需要它和细胞分裂素配合使用，细胞分裂素浓度大于生长素对芽的分化生长有利，反之有利根的分化生长，相当时能促进愈伤组织继续生长。

如山楂： $Ms + 6BA 1mg/l + IAA 0.5mg/l$

有利芽分化。

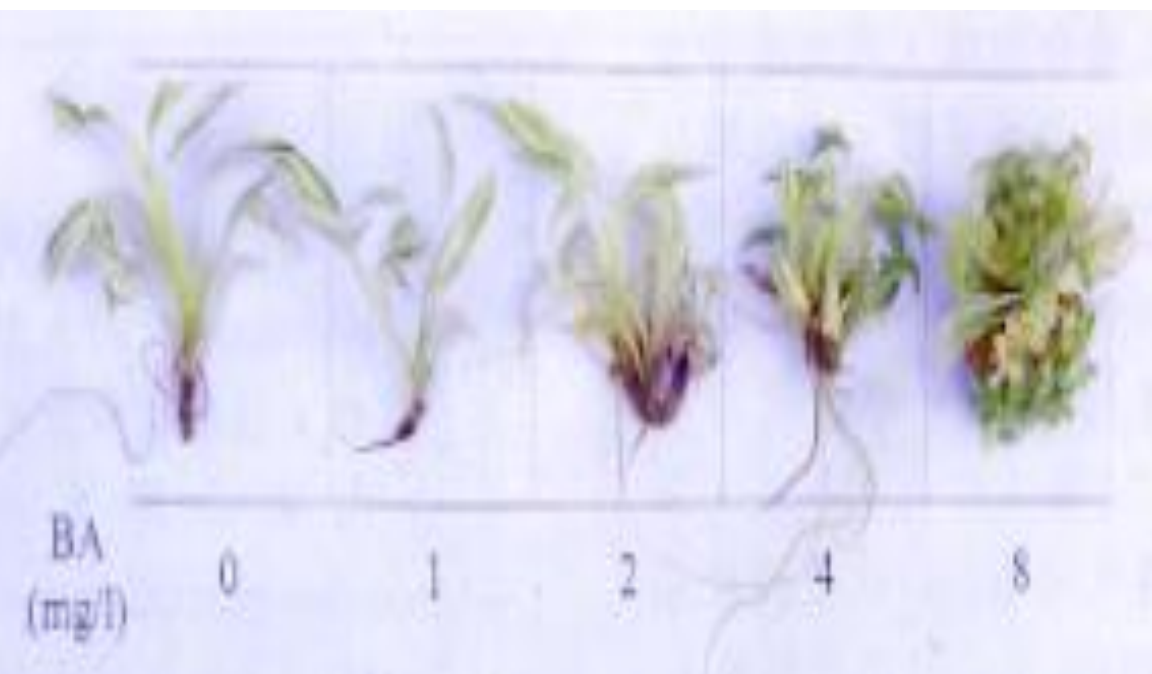
苧麻： $Ms + 6BA 2mg/l + IBA 1.5mg/l$

诱导出芽，

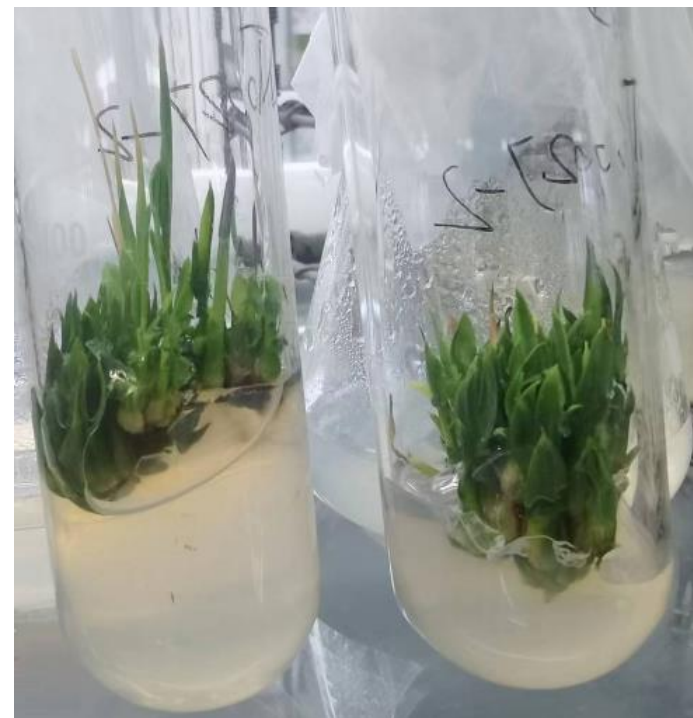
以  $\frac{2}{3} Ms + 6BA 0.5mg/l + IBA 1.5mg/l$

诱导生根，并促进芽的继续生长。





不同BA浓度对斑葉月桃增殖的影响



- (3)、活性炭：**可以吸附外植体分泌的酚类物质，及其它抑制器官分化、胚胎发生的代谢产物，提高芽的诱导频率，如苎麻加**0.3%**活性炭可使出芽诱导率从**54.2%**提高到**90.5%**。
- (4)、蔗糖： 2-3% 琼脂0.5%-0.8%左右。**

## 2 外植体及其消毒

### (1)、外植体的选择

适宜的外植体对培养物的脱分化和形态建成是极为重要的，作为快繁的外植体有鳞茎、球茎、茎段、茎尖、叶柄、叶片、上下胚轴、子叶、花瓣、花序、花器官、根茎、根尖，根据第二阶段芽的增殖采用的途径而定。

# 外植体

- 1) 取材基因型：应具备良好的遗传性状  
难 $\longleftrightarrow$ 易  
实用价值 $\downarrow$
- 2) 生理状态：健壮、健康（无病害）、  
生长势旺、生命力强；
- 3) 取材部位：茎尖（大茎尖、小茎尖）  
带芽茎、鳞茎、根、叶、  
花瓣、花序轴、胚等；
- 4) 对消毒剂耐受力：老>幼

总之，发育年龄幼小的实生苗比年龄老的易分化，

茎尖比侧芽易分化，萌动比休眠的芽易分化，

早春材料效果好，因含单宁和褐色物质少，带菌少，

易消毒，诱导易成功。

## **(2)、植物材料的消毒**

- 1) 70%酒精浸泡30-60秒（穿透力，杀菌力强，且驱赶茸毛间气泡）**
- 2) 消毒液：饱和漂白粉液10-20分钟，0.1-0.2%升汞5-10分，2%安替福民4-5分（嫩枝）5-10%安替福民（含有效氯5.25%的次氯酸钠溶液）因材料而异，（浓度和时间）。有茸毛材料在消毒液中加几滴吐温-80，2-10%次氯酸钠10~15'，9-10%次氯酸钠5~30'**
- 3) 无菌水冲洗3-5次**

### 3 芽的诱导与扩大繁殖

#### 1)、丛生嫩芽

接种后在**25℃**下，光强**2000lux**，每天**11**小时，相对湿度**75-85%**条件下培养**2-4**周，外植体出芽，再过两周长出许多丛生嫩芽，当嫩芽长到**1-2cm**时再分割成带有一个叶片的小段，转移到促芽生长的培养基上扩大繁殖，丛生芽也转入新的培养基继代，分割转移后的茎段培养**20**天后长出许多侧枝，**25**天左右再进行一次分割培养，多次循环，可得大量无根苗，诱导生根后可形成许多小植株。

## 2)、愈伤组织途径

另一种方法是将外植体接种在含高浓度生长素的固体培养基上，先诱导出愈伤组织，然后打碎成微小细胞团，接入液体培养基中振荡培养，诱导愈伤细胞分化出芽、胚状体或原球茎，可加快无性系繁殖速度，（但后代一致性较差）兰花和胡萝卜都已获成功。

## 4 根的诱导

试管苗是无根的，必须诱导生根后才能移栽（胚状体途径本身有胚根），促进生根的方法：



生根培养:

(1) 试管内生根:

**1/2MS+NAA0.1 .....**

(2) 试管外生根:

i、扦插生根;

ii、嫁接生根;

## 试管内生根：

1)、剪下无根苗转移到生根培养基中，适当加大生长素的浓度，不用或少用细胞分裂素，生长素浓度在0.1-10.0mg/l，用的多的有NAA，其次为IBA、IAA很少用,2,4-D浓度过高易引起愈伤组织化和抑制生根，基本培养基的大量元素减少一半或1/3、1/4,降低蔗糖浓度1.0-1.5%，以促进自养能力，若琼脂效果不佳时，可用液体培养加滤纸桥或加1%活性炭。



**2)、将无根苗浸泡在高浓度生长素的无菌水中（100mg/l）**

几小时到一天，再接种到**无激素**培养基中，一个星期后开始分化出根原基，对蔷薇科果树苹果、梨等可在培养基中加入适量根皮苷或根皮酚（间苯三酚）**150mg/l**。

- 试管外生根:

扦插生根

**嫁接:**嫁接到根系发达，抗逆力强、合适的砧木上，三倍体西瓜**25-30°C**,湿度饱和，嫁接到瓠子上，三天伤口长出愈伤，一周成活。

光照条件**3000-4000lex**，提高植株光合能力。

## 5 试管苗移栽

为提高成活率,逐步增加光强,降低温度,减少营养,炼苗**3-4**天。在试管苗长大并形成大量根时（根原基刚突起或几毫米时）洗去琼脂,栽入营养钵,移栽后保持湿度,散射光下,温度波动不大,待长出新叶（**2-4**周左右）,通风锻炼,然后定植大田。

## § 2、茎尖培养脱毒(P266)

# 一、无毒苗培育的意义

## 1、植物病毒的危害：

①一旦染毒，终生带毒；

②难用药剂控制；

③通过嫁接或虫媒传播，随着无性繁殖系数增大而传播加快；

④严重影响作物产量与产品质量；

（尤其是一些潜隐性病毒危害更大）

•

- 目前受病毒危害严重影响生产的有：
  - 大田作物：马铃薯、甘薯、甘蔗
  - 蔬菜：大蒜、葱、番茄
  - 果树：柑桔、苹果、草莓、香蕉、香蕉、枣
  - 花卉：各种菊花、香石竹、紫罗兰等

如：苹果锈果病、花叶病，香蕉束顶病，草莓斑驳病，马铃薯卷叶病，枣疯病。



2、防治策略：使用无毒种苗  
严格检疫  
清除传毒源  
防治传播虫媒

3、获得无病毒繁殖体的方法：

①引进无毒种苗；

②筛选无毒个体；

③脱毒（去毒）                      培育无毒苗

**无毒株：**指不带特定某种或几种病毒的植株，不存在完全无毒这一概念。

**病毒的交叉保护现象：**当植株已经被病毒感染之后，其它病毒对该植株的侵染就比较困难。

★ 可以利用此现象使植株获得抗毒性能，从而缓解一些高危害病毒的危害。

# 脱毒的概念及方法：

**脱毒：** 用人为的方法将植物体内的病毒去掉的一种方法。

**脱毒方法：**

- 1、热处理法
- 2、冷处理法
- 3、化学处理
- 4、愈伤组织培养脱毒
- 5、茎尖微体嫁接
- 6、珠心胚脱毒
- 7、茎尖培养法

## 二、微茎尖脱毒法

是使用最广泛的脱毒方法

脱毒效果好

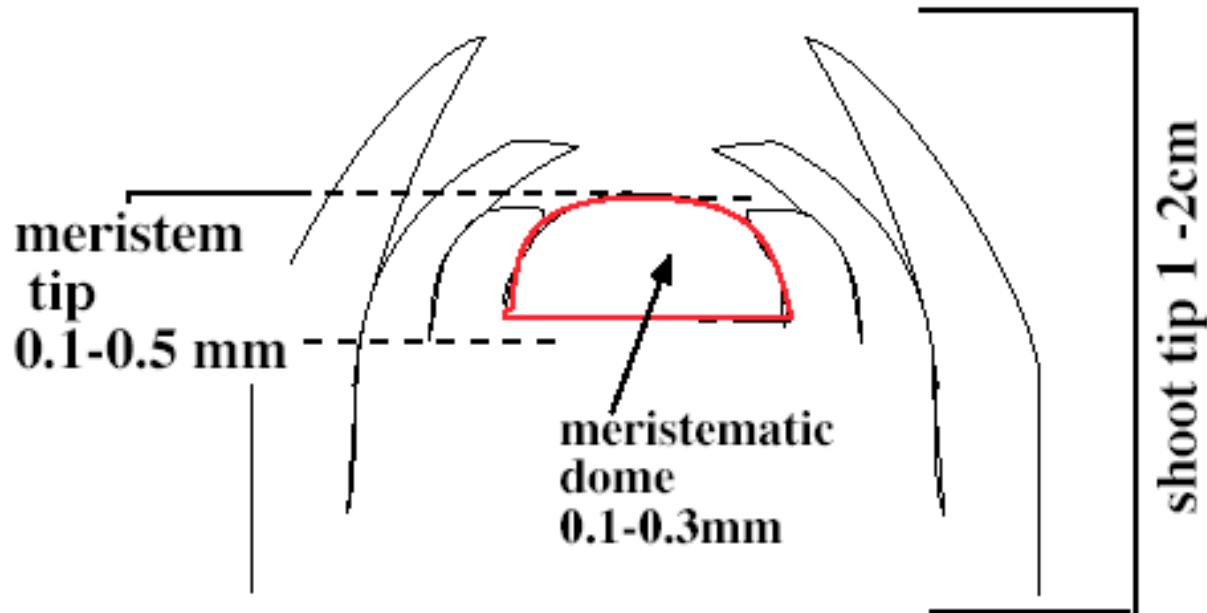
后代遗传稳定

1952 法 Morel 大丽花脱毒苗

脱毒—保持种性—快繁已是一个系统技术

## 基本原理

病毒在植物体内的分布具有不均匀性



- 1934年，White通过观察烟草根系，首先发现病毒在植物的不同区域分布是不均匀的，越靠近根尖区病毒越少，根冠区不含病毒。
- 1949年，Limasset和Cornnet提出了茎的分生组织区也应存在与根尖分生组织区同样的病毒分布特征。
- 1952年，Morel 和Martin首先利用马铃薯茎尖分生组织进行离体培养获得了无病毒苗，证实了这种理论。同时也获得了大丽花的无病毒苗。并建立了茎尖组织培养的繁殖体系。

## 理论假说:

**(1)能量竞争:** 病毒核酸和植物细胞分裂时**DNA**合成均需要消耗大量的能量，而分生组织细胞本身很活跃，其**DNA**合成是自我提供能量自我复制，而病毒核酸的合成要靠植物提供能量来自我复制，因而就得不到足够的能量，从而就抑制了病毒核酸的复制。

**(2)传导抑制** 病毒在植物体内的传播主要是通过维管束实现的，但在分生组织中，维管组织还不健全，从而抑制了病毒向分生组织的传导。

**(3)激素抑制** 在分生组织中，生长素和细胞分裂素水平均很高，因而阻滞了病毒的侵入或者抑制病毒的合成。



**(4)酶缺乏** 1969年, **Stace-Smith**提出, 可能病毒的合成需要的酶系统,在分生组织中缺乏或还没建立, 因而病毒无法在分生组织中复制。

**(5)抑制因子** 1976年, **Martin-Tanguy**等提出了抑制因子假说, 认为在分生组织中存在有某种抑制因子。

### 三、茎尖培养脱毒基本技术规程：

外植体选取—前处理钝化病毒—分生组织培养

|

形成茎、根

|

再生完整植株

|

病毒检测

|

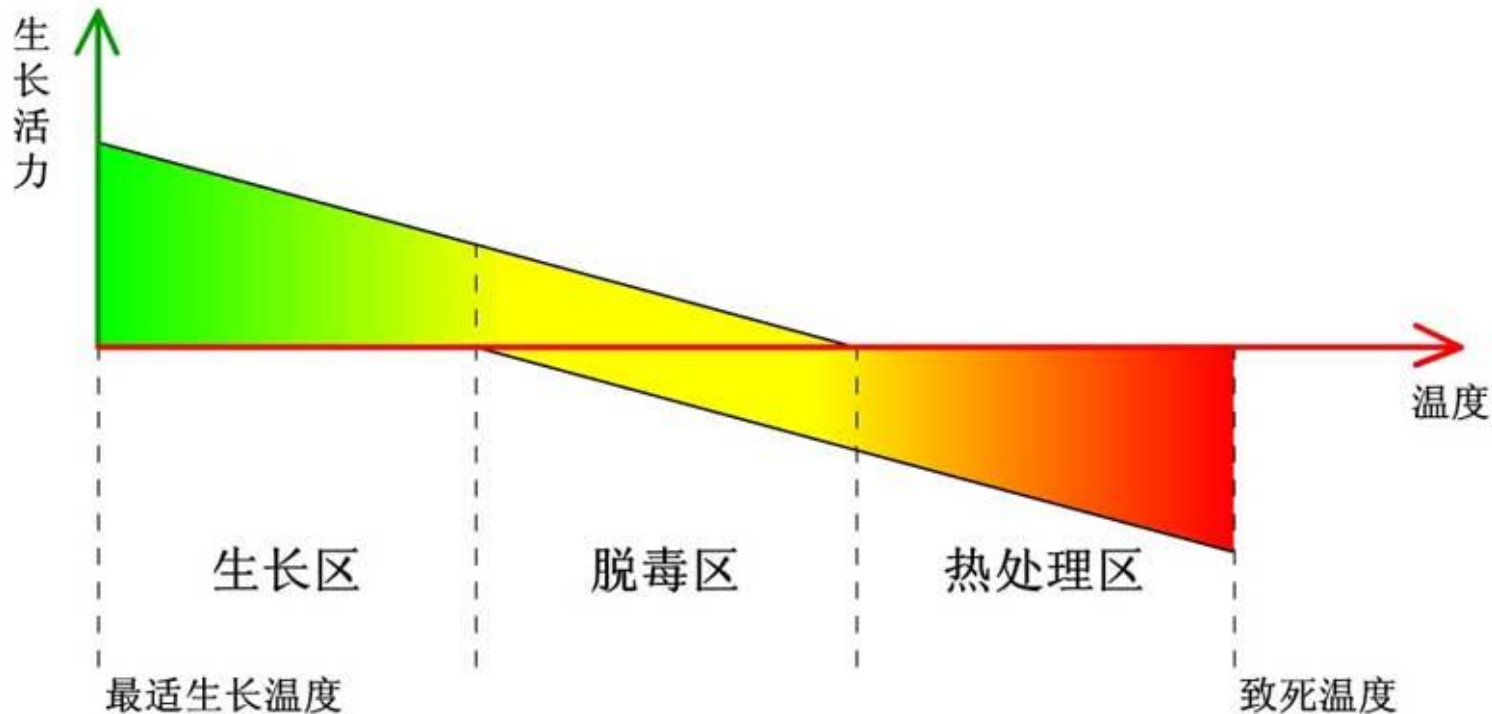
扩繁 — 进一步检测病毒 — 移栽—获得脱毒植株

# (1) 母体植株的选择和预处理

- 母体的选择
  - 欲脱毒材料的品种典型性
  - 植株健康程度

## (2) 预处理（与热处理结合效果更佳）

### 无损伤 脱毒区 热致死区



病毒DNA分子进入细胞后随植物细胞DNA一起复制。  
热处理并不能杀死病毒，只能钝化病毒活性，使病毒在植物体内增殖减缓或增殖停止，失去传染能力。

作为一种物理效应可以加速植物细胞的分裂，使植物细胞在与病毒繁殖的竞争中取胜。

### (3) 外植体消毒—茎尖剥离

- **茎尖培养**是切取茎的先端部分或茎尖分生组织部分，进行无菌培养。这是组织培养中用得最多的一个取材部位。

## 类型

**微茎尖培养**：对长度0.1-1mm左右，含1-2个叶原基的茎尖进行培养，目的是获得无病毒植株

**普通茎尖培养**：对几毫米至几十毫米长的茎尖及侧芽的培养，目的是快速繁殖。

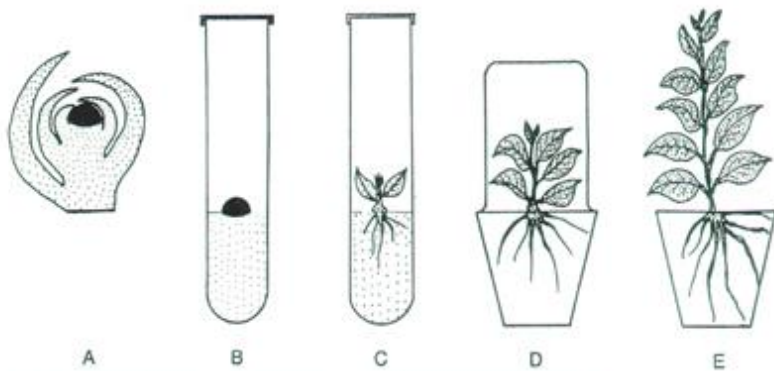
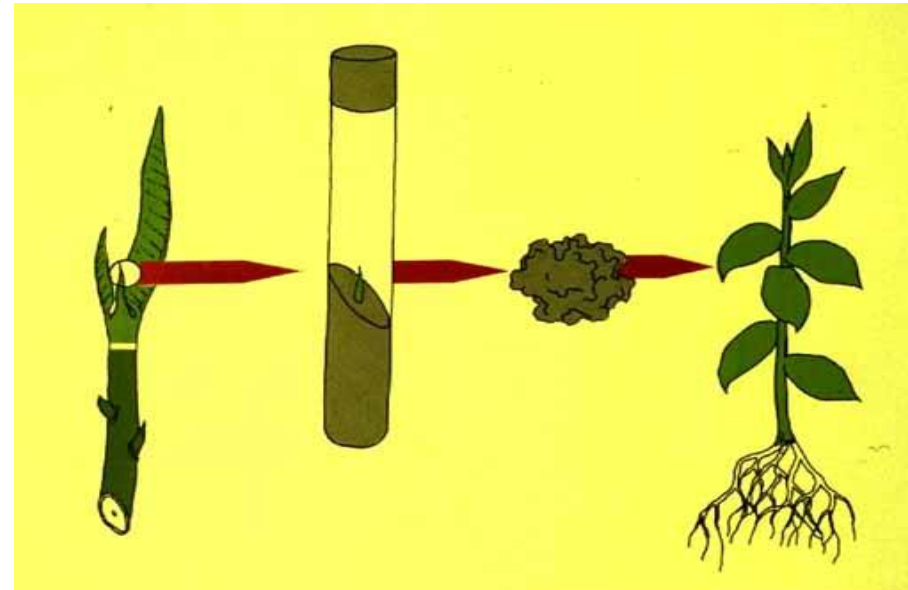
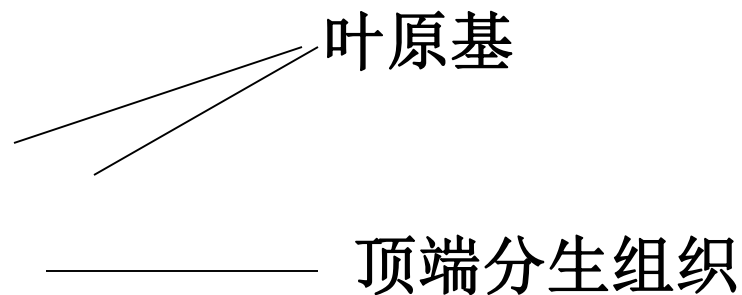
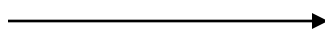
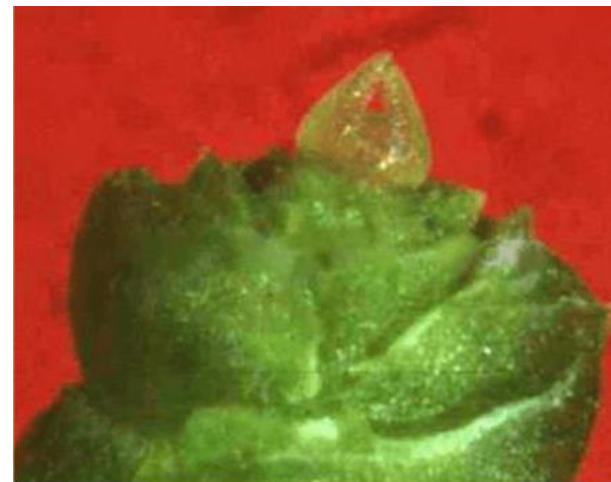
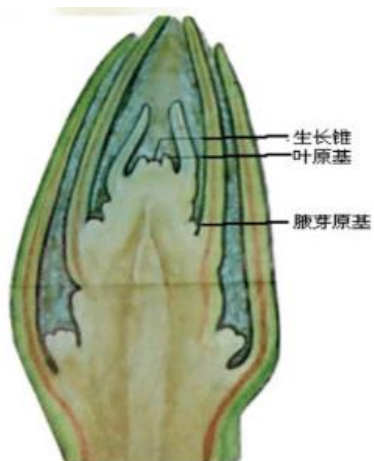


FIG. 8.3. Meristem-tip culture. (A) Apical meristem showing section to be excised. (B) Excised meristem tip cultured on agar medium. (C) Plantlet regenerated from excised meristem tip. (D) Plantlet transferred to sterile soil. (E) Virus-free plant growing in soil.



# 茎尖培养:



大茎尖

小茎尖

小茎尖: 顶端分生组织+叶原基 (1-2个), 大小为0.1mm-1mm

- ## 茎尖剥离方法

进行脱毒培养时，由于微小的茎尖组织很难靠肉眼操作，因而需要一台带有适当光源的简单的解剖镜(8~40X)。除了进行植物组织无菌培养一般工具外，还需要一套解剖刀。剥离茎尖时，应尽快接种，茎尖暴露的时间应当越短越好，以防茎尖变干。可在一个衬有无菌湿滤纸的培养皿内进行操作，有助于防止茎尖变干。

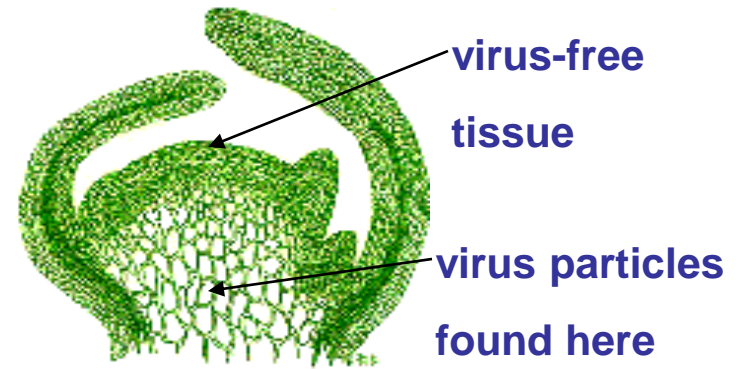


- 和其它器官的培养一样，在进行茎尖培养时，首要一步是获得表面不带病原菌的外植体。一般来说，茎尖分生组织由于有彼此重叠的叶原基的严密保护，只要仔细解剖，无须表面消毒就应当能得到无菌的外植体。有时消毒处理仅会增加培养物的污染率。选取茎尖前，可把供试植株种在无菌的盆土中，放在温室中进行栽培。浇水时要直接浇在土壤中而不要浇在叶片上。另外，最好还要给植株定期喷施内吸杀菌剂，可用多菌灵(0.1%)和抗生素（如0.1%链霉素）。对于某些田间种植的材料，可以切取插条插入Knop溶液中令其长大，由这些插条的腋芽长成的枝条，要比由田间植株上直接取来的枝条污染小得多。

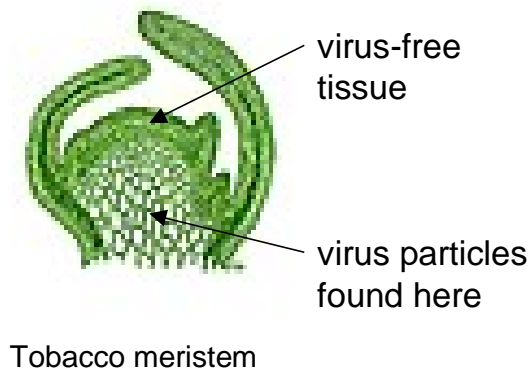
- 为了保险起见，在切取外植体之前一般仍须对茎芽进行**表面消毒**。叶片包被严紧的芽，如菊花，兰花，只须在**75%**酒精中浸蘸一下，而叶片包被松散的芽，如香石竹，蒜和马铃薯等，则要用**0.1%**次氯酸钠表面消毒**10**分钟。对于这些消毒方法，在工作中应灵活运用，如在大蒜茎尖培养时，可将小鳞茎在**75%**酒精中浸蘸一下，再用灯火烧掉酒精，然后解剖出无菌茎芽。

- 在剖取茎尖时，把茎芽置于解剖镜下，一手用细镊子将其按住，另一手用解剖针将叶片和叶原基剥掉，**解剖针要常常蘸入90%酒精，并用火焰灼烧以进行消毒**。但要注意解剖针的冷却，可蘸入无菌水进行冷却。当一个闪亮半圆球的顶端分生组织充分暴露出来之后，用解剖刀片将分生组织切下来，**为了提高成活率，可带1~2枚幼叶**，然后将其接到培养基上。接种时确保微茎尖不与其他物体接触，只用解剖针接种即可。

将接好的茎尖置于**22℃**左右的温度,每天**16**小时**2000~3000Lx**的光照条件下培养。由于在低温和短日照下，茎尖有可能进入休眠；所以**较高的温度和充足的日照时间必须保证**。微茎尖需数月培养才能成功。茎尖培养的继代培养和生根培养和一般器官的培养相同，这里不再叙述。



# Virus elimination



- why does the meristem have low/no virus titre?
  - virus spreads primarily through vascular system - this is not developed in the meristem
  - mitosis and chromosome replication compete with virus replication
  - high auxin in meristem inhibits virus replication
  - a virus “inactivating” system has greatest activity in meristem

☆ **大茎尖**较大，可能带病毒； **小茎尖**大小**0.1—1.0 mm**，一般无毒或特定无毒。

茎尖	{	大	脱毒效果差，成苗易
		小	脱毒效果好，成苗难

在满足培养材料成苗的前提下，茎尖越小越好。

☆ **顶端分生组织**培养（不带叶原基）

## (4) 培养基

一般以**White**、**Morel**和**MS**培养基作为基本培养基，尤其是提高钾盐和铵盐含量有利于茎尖的生长。**MS**培养基对某些植物的茎尖培养时，其中有些离子浓度过高应予以稀释。植物激

素的种类与浓度对茎尖生长和发育具有重要的作用。**在双子叶植物激素大概是在第2对最年幼的叶原基中合成，所以茎尖的圆锥组织生长激素不能自给，必须提供适当浓度的生长素(0.1~0.5mg/L)与细胞分裂素**，在生长素中应避免使用易促进愈伤组织化的**2,4-D**，宜换用稳定性较好的**NAA**或**IBA**，细胞分裂素可用**KT**或**BA**。**GA3**对某些植物茎尖培养是有用的。有时茎尖培养添加活性炭。

一般**MS**培养基适用于大多数双子叶植物,**B5**和**N6**适合大多数单子叶植物,马铃薯茎尖培养基以**MS+GA30.05mg/l+6-BA0.5-0.1mg/l+NAA0.1-0.2mg/l+2%蔗糖+0.9%琼脂**效果比较好

一般**MS**培养基适用于大多数双子叶植物,**B5**和**N6**适合大多数单子叶植物,马铃薯茎尖培养基以**MS+GA30.05mg/l+6-BA0.5-0.1mg/l+NAA0.1-0.2mg/l+2%蔗糖+0.9%琼脂**效果比较好

## 4 影响微茎尖培养的因素

### 1 ) 外植体大小

在最适培养条件下，外植体的大小决定茎尖的存活率，外植体越大，产生再生植株的机会也就越多，而外植体越小脱毒效果越好。除了外植体的大小之外，叶原基的存在与否也影响分生组织形成植株的能力，一般认为，**叶原基能向分生组织提供生长和分化所必需的生长素和细胞分裂素**。在含有必要的生长调节物质的培养基中，离体顶端分生组织能在组织重建过程中迅速形成双极性两端。



## 茎尖大小对马铃薯脱毒效果的影响

茎尖长 (mm)	叶原基数	小植株数	脱毒植株数	脱毒率 (%)
0.12	1	50	24	48
0.27	2	42	18	42.9
0.6	4	64	0	0

## 2) 培养条件

在茎尖培养中，**照光培养的效果通常比暗培养好**，如马铃薯茎尖培养时，当茎已长到1厘米高时光照强度增加到**4000Lx**。

### 3 ). 外植体的生理状态

茎尖最好要由活跃生长的芽上切取， 在香石竹和菊花中，培养顶芽茎尖比培养腋芽茎尖效果好。但在草莓中，二者没什么差别。

取芽的时间也很重要，一般选萌动期较好。否则采用某种适当的处理、打破休眠才能进行。

## § 3 其它途径脱毒

**脱毒：**用人为的方法将植物体内的病毒去掉的一种方法。

**脱毒方法：**

- 1、热处理法
- 2、冷处理法
- 3、化学处理
- 4、愈伤组织培养脱毒
- 5、茎尖微体嫁接
- 6、珠心胚脱毒

茎尖培养法

# 1. 热处理法的发现及应用

热处理又称温热疗法(theomtherapy)

**原理：**当植物组织处于高于正常温度的环境中时，组织内部的病毒受热之后部分或全部钝化，在高温下，不能生成或生成病毒很少，以致病毒含量不断降低，同时，热处理能刺激细胞分裂，使植物细胞在与病毒的生存竞争中占优势；这样持续一段时间，病毒自行消灭，从而达到脱毒的目的。

- **原理：**①病毒是蛋白质外壳包被的核酸分子，**热处理能使病毒在体内的增殖减缓或停止**，因而失去**侵染能力**  
②热处理能刺激细胞分裂，使植物细胞在与病毒的生存竞争中占优势；
- **材料：**①愈伤组织热处理；（不常用）  
②植株热处理；

## 方法:

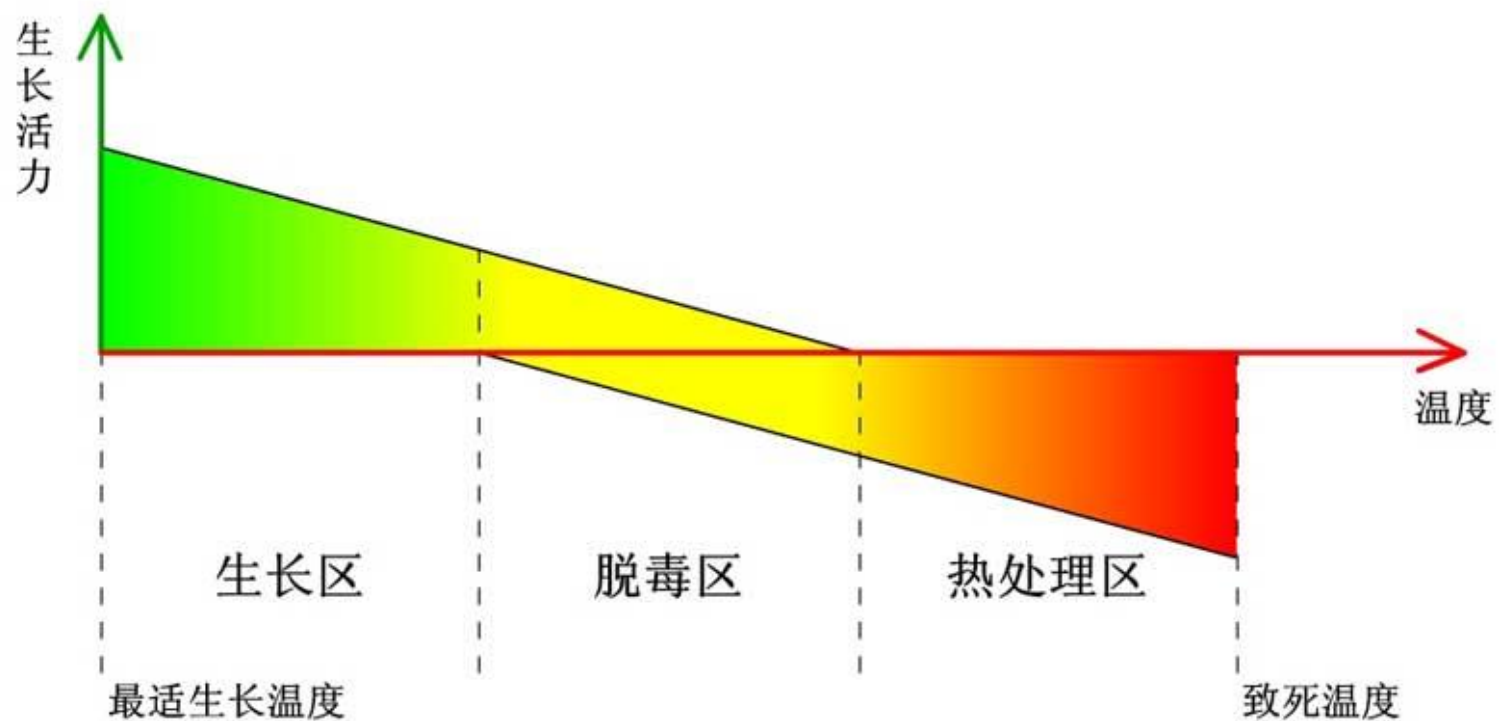
- (1)温汤浸渍处理 适用于休眠器官、剪下的接穗或种植的材料，在**50℃**左右的温水中浸渍**10min**至数小时，方法简便易行，但易使材料受伤。
- (2)热空气处理 热空气处理对活跃生长的茎尖效果较好，将生长的盆栽植株移入温热治疗室(箱)内，一般在**35—40℃**。处理时间因植物而异，短则几十分钟，长可达数月。



## 利用了病毒的热敏性

- i、并非所有病毒都有热敏性；
- ii、热处理影响存活率；

- 外植体的预处理



- 香石竹（康乃馨）在**38~40°C**条件下经两个月处理可除去全部病毒。



- 菊花在**35~38°C**的条件下处理**60**天可使病毒失活。
- 马铃薯在**37°C**条件下处理**10~20**天能除去卷叶病毒



- 柑橘—速衰病毒、黄化病毒需在**40°C/30°C**条件下处理**7~12**周。

鳞皮病毒需要在**40°C/30°C**条件下处理**8**周。

啉叶病毒需要在**50°C**条件下处理**3~22**小时。

亚洲青果病毒在**50°C**条件下处理**30~40**分钟。

## 2 低温处理

亦称冷疗法。菊花植株在5° C条件下分别处理4个月或7.5个月，没有菊花矮化病毒（CSV）的无病毒苗分别是67%和73%，而没有菊花褪绿斑驳病毒（CCMV）的无病毒苗分别是22%和49%，未经处理的茎尖则无脱毒效果。

无毒株率（%）	CK	5度 4个月	5度 7.5个月
矮化病	0	67	73
褪绿斑驳病	0	22	49

**3 化学处理**，又称化学疗法。一些化学药品如嘌呤和嘧啶；类似物、氨基酸、抗生素处理，可在某种程度上抑制植物体内或离体叶片内病毒的合成，但仍不能使病毒失活。近年发现三氮唑核苷（1—β—D—呋喃核糖—1，2，4—三氮唑）用于防治一系列动物DNA和RNA病毒，对植物也有效。将感染了马铃薯Y型病毒（PVY）、黄瓜花叶病（CMV)或烟草花叶病毒（TMV）的叶柄，培养在三氮唑核苷的MS培养基上，子代植株则除去病毒，而对照则无效，说明三氮唑核苷抑制病毒的增殖。

马铃薯，三氮唑

μmol/l	无毒株率（%）
0	0
20.5	1.9
41.0	12.5
205.0	100

(培养基中加抗病毒药物：10mg/l病毒唑，2-15mg/l孔雀绿，205μmol/l三氮唑有抑制作用。)

许多化学药品（包括嘌呤、嘧啶类似物、氨基酸、抗菌素等）对离体组织和原生质体具有脱毒效果。常用的药品有：**8-氮鸟嘌呤**、**2-硫脲嘧啶**、杀稻瘟抗菌素、放线菌素**D**、庆大霉素等。例如，将**100ug2-硫脲嘧啶**加入培养基可除去烟草愈伤组织中的**PVY**（马铃薯Y病毒）。

## 4 愈伤组织培养脱毒

通过植物的器官和组织的培养去分化诱导产生愈伤组织。然后从愈伤组织再分化产生芽，长成小植株，可以得到无病毒苗。感染烟草花叶病毒的愈伤组织经机械分离后，仅有**40%**的单个细胞含有病毒，即愈伤组织无病毒植株。

愈伤组织的某些细胞所以不带病毒，可能是由于：

- （1）．病毒再愈伤组织内的分布不均匀；
- （2）．病毒的复制速度赶不上植物细胞的增殖速度；
- （3）．有些细胞通过突变获得了抗病毒的抗性。

对病毒侵袭具有抗性的细胞可能与敏感的细胞共同存在于母体组织之中。

缺陷：植株遗传性不稳定，可能会产生变异植株，

并且一些作物的愈伤组织尚不能产生再生植株。

## 5 茎尖微体嫁接

木本植物茎尖培养难以生根成植株，将实生苗砧木在人工培养基上种植培育，再从成年无病树枝上切取0.4~1.0mm茎尖，在砧木上进行试管微体嫁接，以获得无病毒幼苗。这在桃、柑橘、苹果等果树上已获得成功，并且有的已在生产上应用。

把极小的茎尖作为接穗嫁接到实生砧木上（种子繁殖得到的幼苗），然后将嫁接后的砧木接种到新的培养基上培养。

微嫁接要求的剥离技术高，嫁接成活率与接穗大小呈正相关，而脱毒率与接穗大小呈负相关



## 6 珠心胚脱毒

珠心胚培养 原理：具有多胚性的种子（如柑桔）除了一个有性胚之外，其他的胚是来源于不含病毒的珠心细胞。通过培养珠心胚，可以得到除去病毒的新生系，然后嫁接繁殖成无病毒植株。

## § 4、 脱毒苗鉴定(P274)

检定工作贯穿无毒种苗繁育的整个过程中

①脱毒培养的植物是否确认为特定无毒；

②扩繁原种是否重新染毒；

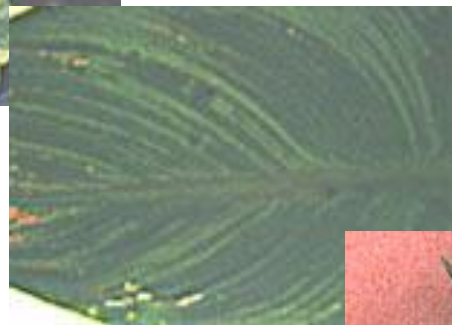
## 1)直接测定法

直接观测植株茎叶有无某种病毒引起的可见症状。

## 几种马铃薯病毒种类的症状

种 类	症 状	鉴定寄主
马铃薯X病毒， <b>PVX</b>	脉间花叶	千红日、曼陀罗、辣椒、番茄、心 叶烟
马铃薯S病毒， <b>PVS</b>	叶脉深陷粗缩	苋色藜、千日红、光曼陀罗、昆诺 阿藜（ <b>Chenopodium quinoa</b> ）
马铃薯Y病毒， <b>PVY</b>	随品种而异，有些轻微花叶或 粗缩，敏感品种反应为坏死	野生马铃薯、洋酸菜、曼陀罗
马铃薯卷叶病毒， <b>PLRV</b>	初浸染幼叶尖呈浅黄白色，有 些品种呈紫色或红色	洋酸菜

然而寄主植株感染病毒后需要较长的时间才出现症状，有的并不能使寄主植物出现可见的症状，因此需要更敏感的测定方法。



CMV病毒感染的植株叶片

**2)、鉴别寄主法（指示植物测定法）：** 受检株取叶片，加**10ml**磷酸缓冲液（**0.1mmol/L**磷酸钠**PH7.0**），研钵研碎，在指示植物叶片上撒少许**600**目金刚砂，将受检叶汁涂于其上，适当用力摩擦使叶片表面细胞受到感染，但不损伤叶片，**5**分钟后，用水轻轻冲去残汁，将接过种的植株置温室，**6-8**天或几周指示植物即可表现症状。

较常用的指示植物有苋色藜（**Chenopodium amaranticolor**）、昆诺阿藜(**C.quinoa**)、千日红(**Gomphrena globosa**)和各种烟草等。

## 几种马铃薯病毒种类的症状

种 类	症 状	鉴定寄主
马铃薯X病毒， <b>PVX</b>	脉间花叶	千红日、曼陀罗、辣椒、番茄、心叶烟
马铃薯S病毒， <b>PVS</b>	叶脉深陷粗缩	苋色藜、千日红、光曼陀罗、昆诺阿藜（ <b>Chenopodium quinoa</b> ）
马铃薯Y病毒， <b>PVY</b>	随品种而异，有些轻微花叶或粗缩，敏感品种反应为坏死	野生马铃薯、洋酸菜、曼陀罗
马铃薯卷叶病毒， <b>PLRV</b>	初浸染幼叶尖呈浅黄白色，有些品种呈紫色或红色	洋酸菜

然而寄主植株感染病毒后需要较长的时间才出现症状，有的并不能使寄主植物出现可见的症状，因此需要更敏感的测定方法。



指示植物



## 2、抗血清鉴定法

植物病毒是由蛋白质和核酸组成的核蛋白，因而是一种较好的抗原，给动物注射后会产生抗体，抗体存在于血清之中称**抗血清**。

由于不同病毒产生的抗血清都有特异性，用特定病毒的抗血清来鉴定该种病毒，具有高度专一性和特异性，几分钟至几小时即可完成，方法简便，所以成为植物病毒鉴定中最有用的方法之一。抗血清鉴定首先要进行抗原的制备，只有获得高纯度的抗原，才有可能获得高度纯净的抗血清。

**抗血清的鉴定法**主要根据**沉淀反映原理**，具体测定有试管沉淀、凝聚试验、免疫扩散、免疫电泳、荧光抗体技术和酶联免疫吸附试验等多种方法。

抗血清鉴定法要进行抗原的制备（包括病毒的繁殖，病叶研磨和粗汁液澄清等），抗血清的采收，分离等。血清可分装到小玻璃瓶中，贮存在**-15~-25℃**的冰冻条件下。**测定时，把稀释的抗血清与未知各植物病毒在小试管内仔细混合，这一反应导致形成可见的沉淀。然后根据沉淀反应来鉴定病毒。**

## 抗血清法（血清学方法）：

- （1）制备抗血清：将已知病毒注入兔子体内，兔血中会出现该病毒抗体，产生抗血清；
- （2）将1滴经过离心分离的植株汁液加入到不同的抗血清中，如某抗血清中出现沉淀，就证明该株带有该病毒，灵敏度高，结果迅速，是最好方法之一。

### 3、 电子显微镜检查法

直接观察到病毒微粒是否存在，病毒颗粒的大小、形态和结构。由于这些特征相当稳定，故对病毒鉴定是很重要的。

通常所用的技术包括投影法、背景染色法、表面复形的制备与扫描电镜法，以及超薄切片法。

人的眼睛不能观察小于**0.1**毫米的微粒，借助于普通光学显微镜也只能看到小至**200**微米的微粒，只有通过电子显微镜才能分辨**0.5**毫微米大小的病毒颗粒。采用电子显微镜可以直接观察病毒，检查出有无病毒存在，并可得知病毒颗粒的大小、形状和结构，借以鉴定病毒的种类。这是一种较为先进的方法，但需一定的设备和技术。

由于电子的穿透力很低，制品必须薄到**10~100**毫微米，通常制成厚**20**毫微米左右的薄片，置于铜载网上，才能在电子显微镜下观察到。近代发展使电镜结合血清学检测病毒，称为免疫吸附电镜**(ISEM)**•。新制备的电镜铜网用碳支持膜使漂浮膜到位，少量的稀释抗血清孵育**30**分钟，就可以把血清蛋白吸附在膜上，铜网漂浮在缓冲溶液中除去过量蛋白质，用滤纸吸干，加入一滴病毒悬浮液或感染组织的提取液，**1~2**小时后，以前吸附在铜网上的抗体陷入同源的病毒颗粒，在电镜下即可见到病毒的粒子。这一方法的优点是灵敏度高和能在植物粗提取液中定量测定病毒。

耗资高、快、准确

#### 4、 酶联免疫鉴定法(Enzyme linked immunity absorption assay ELISA)

酶联免疫法是指采用酶标记抗原或抗体的定量测定法。将抗原固定在支持物上，加入待检血清，然后加入酶(过氧化物酶或碱性磷酸酶)标记的抗体，再加入底物经酶催化，吸收波长发生变化，因而可用分光光度计鉴定。此法是现在灵敏度较高和常使用的方法。

## § 5、无病毒植物的利用

# 脱毒苗的保存与繁殖

- 脱毒苗的离体保存与繁殖
- 建立脱毒种苗生产繁殖网络体系
- 木本植物建立隔离的脱毒苗母本圃





## (一)、无病毒苗的保存繁殖

无病毒植株并不是有额外的抗病性，它们有可能很快又被重新感染。所以一旦培育得到无病毒苗，就应很好**隔离保存**。这些原原种或原种材料保管得好可以保存利用**5~10**年。

通常无病毒苗应种植在**隔虫网**内，使用**300**目，即网眼为**0.4~0.5mm**大小的网纱，可以防止蚜虫进入。

栽培用的**土壤也应进行消毒**，周围环境也要整洁，并及时喷施农药防治虫害，以保证植物材料在与病毒严密隔离的条件下栽培。有条件的地方可以到海岛或高冷山地种植保存，那里气候凉爽，虫害少，有利于无病毒材料的生长，繁殖。

另一种更便宜的方法，是把由茎尖得到的并已经过脱毒检验的植物通过**离体培养进行繁殖和保存**。

长期保存（室内）

方法：培养基中加生长延缓剂，**4**度保存，可一年

液氮：**-196度** 长期

## （二）、无病毒苗的利用

无病毒苗在生产中的利用也要防止病毒的再感染。

生产场所应隔离病毒感染途径，做好土壤消毒或防蚜等工作。在种植区及种植规模小的地方，要较长时间才会感染。而在种植时间长、轮作及种植规模大的产地则在短期内就可感染。一旦感染，影响产量质量的，就应重新采用无病毒苗，以保证生产的质量。

# 本章小结

- 1 植物的快速繁殖 组培快繁  
(方法、特点和意义)
- 2 植物无病毒苗的培育  
(方法、特点和意义)

- 升汞处理方法:

升汞 + **Na<sub>2</sub>S** ——— 絮状沉淀（至絮状沉淀不再产生为止）  
—— + **FeSO<sub>4</sub>**（中和过多的**Na<sub>2</sub>S**）

## 2、接种外植体的生长过程：

A 细胞分裂的启动；

B 细胞增殖；

C 组织和器官的形成。

## （二）影响外植体起始培养的因素：

### 1、影响外植体起始的因素

A 外植体的遗传基础及生理影响

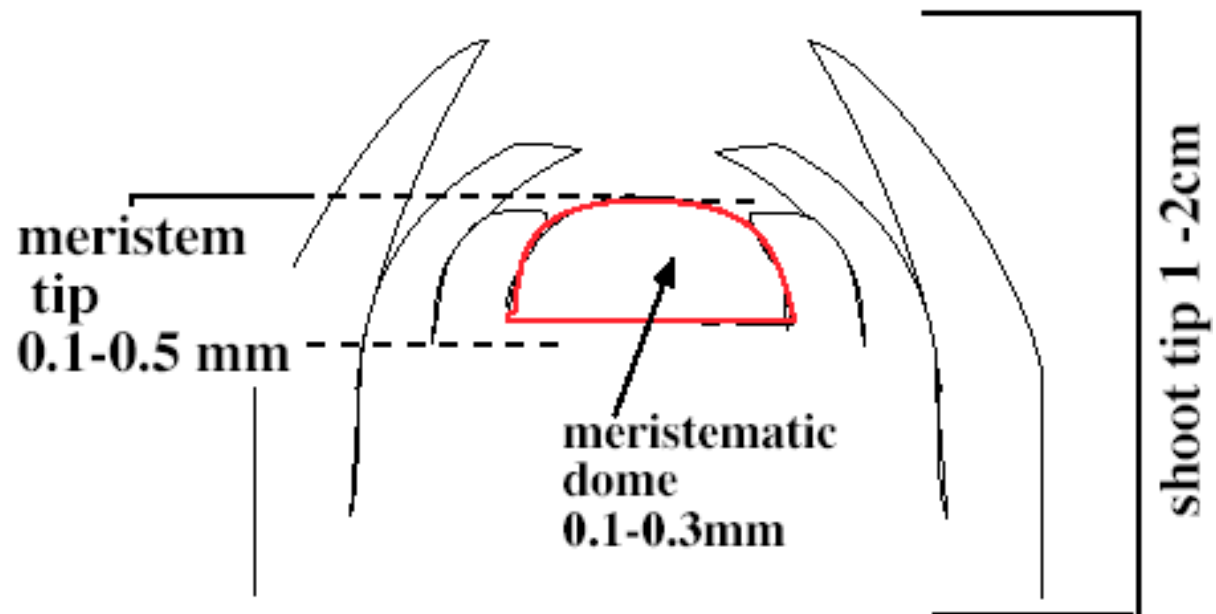
B 培养基组成成分：矿物盐类、微量有机成分、生长调节物质、碳源、琼脂、活性炭、酚类化合物、多胺等。

C 培养条件：光照、温度、湿度

## A 外植体

- (1) 外植体种类及基因型
- (2) 外植体供体植株和外植体的来源与生理状态
- (3) 外植体大小
- (4) 外植体的极性





## B、培养基

a 培养基类型:

b 碳 源的影响:

## C、植物生长调节物质

a 细胞分裂素和生长素类

b 赤霉素类

c 乙烯及其生物合成抑制剂

d 其他有机化合物

## 细胞分裂素和生长素：

表 3-6 250 种植物外植体诱导无根苗形成对植物激素的要求

植物种类 激素使用频率 植物激素	双子叶植物 (170 种)	单子叶植物 (62 种)	裸子植物 (18 种)
只用 BA	24% (42)	13% (11)	50% (9)
只用生长素	3.5% (6)	27% (17)	6% (1)
细胞分裂素+生长素	50% (85)	35% (22)	38% (7)
不加任何激素	5.2% (9)	20% (13)	0

a.部分植物单独使用细胞分裂素（CTK）可以形成 无根苗

b.部分植物无根苗的形成需要细胞分裂素和生长素配合使用。

c. 外源CTK与生长素必须维持适当比例以改变内源激素平衡，促进器官发生。

d. 不同细胞分裂素对分化的作用效果不同

e. 苯基脲衍生物具有较高的细胞分裂素活性  
(4PU、CPPU 、TDZ)

赤霉素类：

赤霉素与促进细胞伸长和开花反应，组织培养条件下只在少数植物上对芽的诱导有促进作用。如马铃薯、甜菜、樱桃等。

乙烯及其生物合成抑制剂：

具有促进和抑制两方面的影响，但抑制作用多于促进作用。因此在某些植物种类，乙烯抑制剂可以促进芽的形成。

AgNO<sub>3</sub> 、 CoCl<sub>2</sub>、 AVG

其他有机化合物：

腺嘌呤衍生物具有促进器官分化作用。

椰子汁等物质也具有促进分化的功能。

## 马铃薯茎尖培养技术

### (一) 聚材和消毒

顶芽（枝）或腋芽（枝）都可取用，生长季节在大田取材（丰富）但较难消毒。可选择品种性状典型的植株，收获薯块贮藏后播种在室内砂土中发芽，芽长4-5cm,叶片未充分展开时，切取2-3cm的茎端，剥去外面叶片，在自来水龙头下流水冲洗1小时左右，于无菌室中消毒。70%酒精中浸泡30'-60'，→5-10%漂白粉液（或5%次氯酸溶液）浸泡5-10分钟，无菌水冲洗2-3次备用。

1.2.1 把马铃薯发芽块茎放入 37℃ 恒温培养箱中，光照时间 12h/d, 照度 2000Lx, 处理 28d 左右，目的是打破种薯的休眠期后做茎尖剥离。



## （二）剥离与接种

在无菌室中，将消毒过的材料放在双筒解剖镜下（**40x**），用无菌解剖针一片片去除幼叶，使圆滑的生长点暴露出来，用解剖刀切下带有**1-2**个叶原基的茎尖。（**0.1-0.2mm**接种）。

分离出来的茎尖，立即接种在试管或三角瓶中，进行培养。

(1) 与病毒种类也有关，**PVX**病毒， **PVS**病毒，难、因离茎尖近

(2) **二种病毒同时感染时仅用茎尖脱毒很难**，所以感染了病毒的植株在切取茎尖进行培养之前，进行高温处理、低温处理或化学处理，可以提高脱毒效果。

**1)温汤浸渍处理：50度**，对外植体有一定伤害：适用于休眠器官、剪下的接穗或种植的材料，在**50℃**左右的温水中浸渍**10**分钟至数小时，方法简便易行，但易使材料受伤。

**2)热空气处理** 热空气处理对活跃生长的茎尖效果较好，将生长的盆栽植株移入温热治疗室（箱）内，一般在**35~40℃**。

处理时间因植物而异，短则几十分钟，长可达数月。

香石竹于**38℃**下处理**2**个月，其茎尖所含病毒即可被清除。

马铃薯在**35℃**下处理几个月才能获得无病毒苗。

草莓茎尖培养结合**36℃**处理**6**周，比仅用茎尖培养可更有效地清除轻型黄斑病毒。

亦可采用变温方法，如马铃薯每天**40℃**处理**4**小时可清除芽眼中马铃薯的叶片病毒，而且保持了芽眼的活力。

3) 低温处理：一般认为，植株在**6-8° C**条件下处理**4**个月效果较好。

### (3) 化学处理

马铃薯，三氮唑

umol/l	无毒株率 (%)
0	0
20.5	1.9
41.0	12.5
205.0	100

### (三) 培养基和激素

**基本培养基：**铵盐和钾盐浓度相对较高的培养基，有利于茎尖成活，可选用**Ms(1962)**、**White(1943)**、**Morel(1953)**、**Kassauis(1957)**

**附加成分：**激素的种类和浓度对茎尖生长和分化有重要作用，特别是生长素的作用更为突出。

**2,4-D、IAA、NAA**在低浓度时（**0.1 ppm**）有促进发根和生长发育的作用，浓度过大时，外植体易产生愈伤或变为畸形，**一般常用0.1-1 ppmNAA，如与0.5ppm的6BA、KT配合使用**，能提高诱导频率。

**细胞分裂素： 0.05-0.5 ppm**

培养前期，少量的**赤霉素（GA3， 0.25 ppm）**有利于茎尖转绿成活和伸长，但浓度过高或使用时间过长，使叶原基迅速伸长，生长点不生长而导致死亡。

琼脂用量降至**4g/L**，软的培养基有利茎尖成活。

#### (四) 培养:

将已接种外植体的试管置温度**23~25℃**,光照**2000-3000lx**,在光周期**10h/d**的培养室中培养**3~6**月成苗,期间需同样培养基转接**1-2**次。