

快速繁殖实现工厂化育苗（特点：繁殖快，性状稳定，整齐一致，无病虫害，周期短，周年生产。）

## 绪论

### §1 植物组织培养的一般概念

#### 一、概念

**植物组织培养(Plant Tissue Culture):**以植物体的一部分（外植体），在人工控制的环境下离体培养发育再生出完整植株或生产具有经济价值的其他产品的一门学科和技术（广义）。

【对分生组织、薄壁组织以及由植物组织或器官培养产生的愈伤组织进行培养，二者均通过再分化诱导形成植株。（狭义）】

**外植体(explant):**植物组织培养中，把由活植物体上切取下来以进行培养的那部分组织或器官。

#### 二、组织培养的类型：

**1.植株培养(plant culture):**是对完整植株材料的培养，如幼苗及较大植株的培养。

**2.器官培养(organ culture):**即离体器官的培养，根据作物和需要的不同，可以分离茎尖、茎段、根尖、叶片、叶原基、子叶、花瓣、雄蕊、雌蕊、胚珠、胚、子房、果实等外植体的培养。

**3.愈伤组织培养(callus culture):**是对植物体的各部分组织进行培养，诱导产生愈伤组织，对愈伤组织进行培养。【**愈伤组织**:(原指植物受伤后形成的一团薄壁细胞)从植物各种器官的外植体细胞增殖形成的一团无序生长的薄壁细胞（无特定结构和功能）（细胞排列疏松、无规则）。】

**4.细胞培养 (cell culture ):**以离体细胞或很小的细胞团（来自叶肉组织或愈伤组织离散后的细胞）作为原始培养材料进行培养。

**5.原生质体培养(proplast culture ):**用机械或酶、酸等处理法去除细胞壁，得到单纯的原生质体，然后把原生质体培养。

#### 三、特点

- 1.取材少，培养材料经济
- 2.培养条件可以人为控制
- 3.生长周期短，繁殖率高
- 4.管理方便，利于工厂化生产和自动化控制

组织培养不但是进行细胞学、遗传学、育种学、生物化学和药物学等学科研究的重要手段；而且在农学、园艺、林业和次生代谢产物工程和基因工程和基因组学等生产和研究领域得到广泛的应用。

### §2 植物组织培养的理论基础——植物细胞全能性

**植物细胞全能性(totipotency):**指植物的每个细胞，都具有该植物的全部遗传信息，在一定培养条件下具有发育成完整植株的潜在能力。

1902 年，德国植物学家 Gottlieb Haberlandt 提出，首次做了离体植物细胞的培养；

全能性的实验是 1958 年 Steward 等人以胡萝卜根组织为外植体的组培实验证实的

#### 二、植物细胞全能性的表达：

**1、细胞所处的发育状态和生理状态影响其全能性表达：**在生物体内，细胞并没有表现出全能性，而是分化成为不同的组织、器官，这是由于受基因选择性表达的调控，一般情况下，细胞进行定向的、不可逆转的分化，细胞中的基因会有选择地表达出各种蛋白质，从而构成生物体的不同组织和器官，因此其全能性不能表现出来。

- 不同植物、不同组织器官，不同细胞间表达难易程度不同，主要取决于细胞所处的发育状态和生理状态。
- 分化程度越高，全能性表达越难
- 植物细胞的全能性>动物细胞的全能性；受精卵>生殖细胞>体细胞；增殖细胞>不增殖细胞。
- 培养的植物细胞全能性的表达，在不同植物种类之间，甚至在同种植物的不同基因型之间都有很大的差别。

#### 2、植物细胞全能性表达的条件

- (1) 离体状态；
- (2) 一定的营养物质（无机盐、蔗糖、维生素、有机添加物）和植物激素（生长素和细胞分裂素）；
- (3) 其它外界条件（无菌条件，适宜的温度、pH 等）。

#### 3、植物细胞全能性表达的两个阶段：

**(1) 脱分化(dedifferentiation):**从分化状态（细胞分裂已停止）转变为具有分裂能力的分生状态细胞并形成未（脱）分化的愈伤组织的过程。

一个成熟或分化细胞转变为分生状态的过程。

#### **(2) 再分化(redifferentiation)：**

脱分化的组织和细胞在一定条件下可转变为各种不同细胞类型的分化细胞，形成新的具有特定结构和功能的组织或器官的过程。（再分化(redifferentiation),再生(regeneration)）

**分化(differentiation)**是指来自同一合子或遗传上同质的细胞转变成成为形态上、机能上化学组成上异质细胞的过程。即发育中的差异性生长就是分化。分化是一切生物(包括从微生物到高等动物、植物)所具有特性。

**再分化(redifferentiation):**是指脱分化形成的愈伤组织在适宜的培养条件下又分化为胚状体，或直接分化出根和芽等器官形成完整植株的过程。

**再生(regeneration):**是指植物体的离体部分具有恢复植物体其他部分的能力。

### §3 植物组织培养的发展简史

19 世纪 30 年代，德国植物学家施莱登(M.J.Schleiden, 1804—1881)和德国动物学家施旺(T.Schwann,1810—1882)创立了细胞学说，主要观点：细胞是生物体的基本结构单位，由它构成整个生物个体。

根据这一学说，如果给细胞提供和生物体内一样的条件，每个细胞都应该能够独立生活。

### 一、探索阶段：20 世纪初至 30 年代中 (P2)

1902 年 Haberlandt, 提出植物细胞全能性理论和高等植物的器官和组织可以不断分割直到单个细胞的观点,首次做了离体植物细胞的培养(未看到细胞分裂)

1904 年, Hanning 在含无机盐和蔗糖溶液及有机成分的培养基上成功地培养了萝卜和辣根菜的幼胚, 并使这些胚在离体条件下长到成熟。

1922 年, Robbins 进行豌豆、玉米和棉花的茎尖培养, 形成一些缺绿的叶和根。

1922 年, 美国的 Knudson 采用胚培养法获得兰花幼苗, 克服了兰花种子发芽困难的问题。

Laibach (1925、1929) 把由亚麻种间杂交不能成活的胚剥出, 在人工培养基上培养至成熟, 证明了胚培养在远缘杂交中应用的可能性。

### 二、奠基阶段 (30 年代中至 50 年代末) (P3)

30 年代中期, 组培领域二个重要的发现: 1、认识 B 族维生素对植物生长的重要意义; 2、发现了生长素是一种生长调节物质。

#### 培养技术建立

作为一门技术, 必须具有一定的程序性 (技术模式)。在这一阶段植物组织培养建立了 2 个与培养技术有关

重要模式: 培养基模式、激素调控模式

#### White

1934 年用蕃茄根建立了第一个活跃生长的无性系, 是一个离体根培养的成功实验, 使用的培养基包含无机盐、酵母浸出液和蔗糖。

1937 年用三种 B 族维生素 (吡酸醇 B6、硫胺素 B1 和烟酸 B5) 取代酵母溶出液获得成功, 建立了 White 培养基, 并发现吲哚乙酸 (IAA) 在控制植物生长上具有明显作用 (1934 年建立起的根培养物一直保存到 1968 年他逝世前不久)。

1939 年获得烟草种间杂种的瘤组织。

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。

#### Gautheret

1934 年, 在山毛柳和黑杨等的形成层组织培养中发现在含有葡萄糖、水解乳蛋白的 Knop (克诺普) 溶液中, 这些组织可增殖几个月, 但只有加入 B 族维生素和 IAA 后, 形成层组织才能显著增加, 揭示了 B 族维生素和生长素在组培中的重要意义, 1939 年连续培养胡萝卜根形成层获得首次成功。

#### Nobecourt

1939 由胡萝卜也建立了能连续生长的组织培养物——愈伤组织。

**White、Gautheret 和 Nobecourt 被誉为组织培养的奠基人, 现在所用的若干培养方法和培养基, 原则上都是这三位作者 1939 年建立方法的演变。**

#### 我国学者曾在该阶段做出许多方面的贡献:

- 1933 年我国李继侗等关于银杏离体胚的培养工作, 发现了 3mm 以上幼胚即可正常生长, 并证明银杏胚乳提取物能促进银杏幼胚生长。
- 1935-1942 年罗宗洛等关于玉米等植物离体根尖的培养工作, 罗士韦关于幼胚和茎尖培养的工作, 李正理关于离体胚培养中形态发生及离体茎尖的培养, 王伏雄关于幼胚培养等工作等都是组培领域里有价值的文献
- 1941 年 Overbeek (奥比克) 等用椰乳作为培养基的补加物, 使曼陀罗的心形期幼胚能离体培养至成熟, 使椰子汁在组织培养各领域都得到广泛应用。
- Skoog (1944) 和 Tsui 等 (1948) 发现腺嘌呤和腺苷能促进愈伤生长并可解除培养基中 IAA 对芽形成的抑制作用, 能诱导芽的形成, 确定了腺嘌呤与生长素的比例是控制芽和根生长的主要条件之一。
- 1951 年 Nitsch (里奇) 进行离体果实的培养, 促进了对幼果、子房、胚珠、种子、胚胎及花器的培养研究。
- 1952 年 Morel 和 Martin 通过茎尖分生组织离体培养可从病毒侵染的大丽花中获无毒植株。
- 1953-1954, Muir 用万寿菊和烟草愈伤组织移到液体培养基中振荡培养, 进行单细胞培养获得成功, 把单细胞置于铺在愈伤组织上面的滤纸上培养, 使细胞发生分裂, 创造“看护培养”技术。
- 1955 年, Miller 等由鲱鱼精子 DNA 中分离出激动素 (Kinetin),

1957 年, Skoog 和 Miller 提出有关植物激素控制器官形成的概念, 在烟草髓组织培养中, 根和茎的分化是生长素对细胞分裂素比率的函数。

**生长素 / 细胞分裂素** 高 根分化; 低 芽分化

1958 年 Wickson (魏克森) 和 Thimann (西伊曼) 应用外源细胞分裂素可促进在顶芽存在情况下处于休眠状态的腋芽的生长, 以及侧枝上的腋芽的生长, 转移到生根培养基上诱导生根, 广泛用于花卉、果树的快繁上。

1958-1959, Reinert 和 Steward 分别报道, 在胡萝卜愈伤组织的悬浮培养中成功地诱导出胚状体, 获再生植株。**(使细胞全能性理论得到第一次证实, 这是植物组培的第一次突破)。**

这一阶段中, 对培养条件和培养基的广泛研究, 特别是 B 族维生素, 生长素和细胞分裂素在组培中作用的研究, 实现了对离体细胞生长和分化的控制, 确立了组培的技术体系。

### 三、迅速发展阶段和应用阶段（20 世纪 60 年代及以后）

#### 1、基础研究成果显著

1962 Murashige & Skoog 在烟草 培养中筛选出卓有成效的 MS 培养基，至今仍被广泛使用。

1965 Vasil & Hildebrandt 由分离培养的烟草单细胞成功培育出完整再生植株。从细胞水平证实了植物细胞具有全能性。

#### 2、原生质体培养取得重大突破

1960 年，Cocking 等人用真菌纤维素酶分离植物原生质体获得成功。**这是植物组织培养的第二大突破。**

- 1971 年，Takebe 等用果胶酶、纤维素酶在烟草叶片中分离得到原生质体，获得了再生植株，证明了无壁的原生质体同样具有全能性，继烟草后许多物种都表现具有这种潜力，但禾谷类植物的突破较晚。
- 1972 年，Carlson 等通过两个烟草物种之间的原生质体融合，获得**第一个体细胞杂种**，（用高 pH - 高钙法）（粉兰与郎氏烟草）
- 1977 年高国楠用**聚乙二醇**（PEG）法诱导大豆—烟草融合，该法在促进细胞融合中得到广泛应用。后来在有性亲和及有性不亲和的亲本之间，不同作者又获得若干其它体细胞杂种。

种间杂种：有性亲和。

属间杂种：有性不亲和。蕃茄 - 马铃薯，拟南芥 - 油菜，胡萝卜 - 羊角芹，曼陀罗（洋金花） - 颠茄。

#### 3、花药培养取得显著成绩

1964 年。印度科学家 Guha 和 Maheshwari 在毛叶曼陀罗（南洋金花）中通过离体花药培养获得由小孢子发育形成的单倍体植株。1967 年 Bourgin 和 Nitsch 通过花培获完整烟草植株。以后相继在水稻、小麦、玉米等多种植物上获得成功。

由于单倍体在突变选择和加速杂合体纯化过程中的作用，在 70 年代得到迅速发展，达到 160 多个物种相继成功，烟草、水稻、小麦的花培在中国取得引人注目的成就。

#### 4、微繁技术的广泛应用

1960 年 G.Morel 采用兰花的茎尖培养，实现了去病毒和快速繁殖两个目的。这是经过茎尖—原球茎—小植株的方式而再生的。Morel 提出的这种离体无性繁殖方法，其繁殖系数极高，很快被兰花生产者所采用，迅速建立起兰花工业。植物离体微繁技术及脱毒技术得到了迅速发展，实现了产业化。

兰花已有 35 个属 150 余种用该法繁殖，其它观赏植物和经济作物（甘蔗、草莓等）也用微繁达到工厂化的生产规模，若干作物采用茎尖培养进行脱毒，产生经济效益。（马铃薯、草莓、百合）

本期除花药培养取得新的进展，并在烟草、水稻、小麦、玉米育成单倍体培养品种外，由于原生质体培养，细胞融合在多种作物的成功，为组织、细胞培养以及在农业生产实践上的应用开创新途径，是组织和细胞培养飞跃发展并开始走向大规模的应用阶段。

#### 5、组培为基础的基因转化技术的发展和运用

我国学者曾在整个组织培养发展的历史中做出许多方面的贡献：

- 1933 年我国李继侗等关于银杏离体胚的培养工作，发现了 3mm 以上幼胚即可正常生长，并证明银杏胚乳提取物能促进银杏幼胚生长。
- 1935-1942 年罗宗洛等关于玉米等植物离体根尖的培养工作，罗士韦关于幼胚和茎尖培养的工作，李正理关于离体胚培养中形态发生及离体茎尖的培养，王伏雄关于幼胚培养等工作等都是组培领域里有价值的文献
- 70 年代以来，尤其是在花药培养和原生质体培养方面，我国学者的工作受到世界各国同行的普遍重视和赞赏。朱至清研制的 N6 培养基获国家发明二等奖（朱至清、李向辉、陈英）。

### §3 植物组织培养在农业中的应用

#### 一、快速繁殖优良种苗

优质种苗的快速无性繁殖

- A.繁殖杂交育种中得到的少量杂交种，保存自交系、不育系等。
- B.繁殖脱毒培养得到的少量无病毒苗。
- C.繁殖生产上急需的或种源较少的种苗。
- D. 繁殖有性繁殖难以保持种性的异花授粉植物。

#### 二、在育种上的应用

##### 1、种苗脱毒

##### 2、植物细胞工程育种

##### （1）利用培养变异，筛选优良突变体

植物离体培养，能够明显提高突变率，并且会有各种各样的生理和形态突变，如株高、花色、植株形态、生育期、耐性等。可以从中选择优良突变体，培育新品种。

##### （2）幼胚拯救克服远缘杂交障碍

有些植物远缘杂交，能正常受精，但受精胚往往败育。这种情况下，可以将幼胚在败育前进行离体培养，使难度很大的远缘杂交取得成功，获得远缘杂种植株，从而育成一些罕见的新物种（子房、胚和胚珠培养，完成胚的试管发育和试管受精等）。

##### （3）利用细胞融合技术，克服远缘杂交不亲和性

野生种往往有许多优良性状，但大部分野生种与栽培种杂交不亲和，严重影响了野生种优良遗传基因的应用。利用细胞融合，可以克服这种杂交不亲和性，获得体细胞杂种，使野生种的利用成为可能。

##### （4）倍性育种，缩短育种年限

##### （5）基因工程育种

基因工程需进行 DNA 的转化，而基因转化后必须通过组织培养途径才能实现植株再生。

### 三、药物及其它天然产物的工厂化生产

利用细胞培养生产次生物质，如药物、色素、食品添加剂、酶、农药等。

有些极其昂贵的生物制品，如抗癌首选药物--紫杉醇等，可以用大规模培养植物细胞来直接生产。

### 紫杉醇、L-茶氨酸

### 四、生产人工种子

人工胚乳：C 源、蛋白质、矿质元素、抗生素、亲水剂、生长调节物质；

人工种皮：胶囊式结构 + 螯合物【海藻酸盐、Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>】

胚状体

**人工种子意义:**大规模工厂化生产种子；繁殖自交不亲和植物，珍贵物种或杂种；人工胚乳中加入生长调节剂或抗生素,增强种子的抗性和种苗的生长。

### 五、种质资源的超低温冷藏

随着地球不断开发、生态环境破坏，种植资源日趋枯竭，大量有用基因损失。利用组织培养法，低温保存（-196℃）或试管保存，为保存和抢救濒临灭绝的生物带来希望。

## 第一节 植物组织培养实验室设计和基本设备

### 一、实验室设计

洗涤室 化学实验室 灭菌室 无菌操作室（接种室） 培养室 细胞学实验室

原则：保证无菌操作，达到方便、防止污染的目的。

### 二、基本设备和用具

（一）清洗设备（二）消毒设备（三）无菌操作设备（四）培养基配制与贮存设备

（五）培养容器（六）培养室设备（七）其它设备、仪器

## 第二节 器皿的选择与清洗

### 一、玻璃器皿的选择

### 二、器皿的洗涤与消毒

## 第一章 植物组织培养的实验室与一般技术

### §1、植物组织培养实验室设计和基本设备

**植物组织培养的基本程序** 1.材料准备 2.培养基配制 3.无菌接种 4.培养 5.小苗移栽

### 一、实验室设计

**（一）无菌操作室（接种室）** 包括接种室和缓冲间二个部分

**缓冲间：**避免工作人员进出带菌，放工作服等;安装紫外灯。

**接种室：**

无菌操作设备：超净工作台，酒精灯、打孔器、注射器、细菌过滤器、接种针、环钩、剪刀、镊子、解剖刀等。

消毒药品：甲醇、酒精、生汞、漂白粉、新洁尔灭等。

要求： 无空气对流；墙壁地面平坦便于清扫、灭菌；定期药物熏蒸（甲醛+高锰酸钾）；安装紫外灯、空调。

（甲醛熏蒸：在接种前一天进行，按每立方米体积 2-6mL 甲醛，倒入烧杯中，取甲醛一半量的高锰酸钾倒入烧杯中，利用高锰酸钾的强氧化性而使甲醛挥发达到杀菌目的）（紫外线照射：接种前 1 小时进行，打开紫外灯照射 20-30 分钟，利用臭氧（O<sub>3</sub>）杀菌，停 15-20 分钟后开始接种）

### （二）化学实验室：

配制培养基 实验台、药品柜、冰箱、蒸馏水、重蒸馏水、无离子水（使水中不含或少含可溶性有机物、无机离子、保证培养基成分完全人为控制）、天平、酸度计、磁力搅拌器、离心机、烘箱、水浴锅等。

1、化学药品：大量元素、微量元素、激素等

2、配制用具：量筒、烧杯、容量瓶、移液管、试剂瓶等

3、培养器具：试管、三角瓶、培养皿等

4、仪器设备：酸度计、磁力搅拌器等

### （三）培养室

要求：满足外植体生长需要的光照、温度、湿度、气体交换，防止污染的目的（清洁）。

1、照明：日光灯（2-4 根日光灯（40 瓦））（或暗培养）、定时钟

2、恒温：空调，双层玻璃，隔热层（珍珠砂），（最高最低温度计，湿度计）

3、培养架、培养筐 4、摇床、转床（液体悬浮培养） 5、小型光照培养箱：培养特殊需要的材料 6、培养容器

（作物对红光和蓝紫光吸收能力最强，所以灯源以日光灯、高压汞灯、弧氙气灯为好。灯源强度：40 瓦的日光灯三根合在一起，离苗 45 厘米高处照射，光强为 3 千~3.5 千勒克斯，100 瓦的高压汞灯离苗 80 厘米处，光强为 0.8 千~1 千勒克斯

**（四）细胞学实验室：**对培养物进行细胞学观察 显微镜、解剖镜、倒置显微镜,相差显微镜。 照相机,照片冲洗放大设备。

**（五）灭菌室：**水、电、煤气等设备，地面墙壁防湿耐高温，高压灭菌锅。

**（六）洗涤室：**供水和排水良好;清洗设备。

## 二、基本设备和用具

**(一)清洗设备：**工作台、水池、磁盆、水桶、试管刷、肥皂粉、去污粉、洗液。洗瓶机

**(二)消毒设备** 高压灭菌锅,高压消毒箱, 高温消毒箱, 细菌过滤器, 紫外灯。消毒药品：甲醛、酒精、新洁尔灭、漂白粉等。

**(三)无菌操作设备** 超净工作台, 打孔器、注射器、酒精灯, 各种型号剪刀、镊子、解剖刀、接种针、环、钩。

**超净工作台：**鼓风机、滤板(孔 0.3 $\mu$ m)、操作台、照明灯、紫外灯。空气通过台下的细菌过滤装置, 以固定风速从台面上流出, 在操作人员和工作台之间形成风幕, 防止灰尘、微生物落入台面, 达到无菌操作, 27 $\pm$ 3m/分风速。

**操作：**紫外灯 20-30', 鼓风机 20', 固定风速工作。(喷 75%酒精于空间消毒, 接种前几分钟进行, 既可以杀菌又可降尘。)

## **(四) 培养基配制与贮存设备**

药品柜:各种化学药品：一般化学纯即可

冰箱:易变质的药品：维生素、氨基酸、核酸、激素等存放。

配制用具：不同容积的量筒 (5-1000ml), 烧杯 (10-2000ml), 移液管 (0.2、1、2、5、10ml), 容量瓶 (25、50、100、250、500、1000ml), 试剂瓶 (50-1000ml)、玻棒、橡皮吸球等。

**(五) 培养容器** 培养皿, 三角瓶 ( 50、100ml ), 试管, T 型管、L 型管等。封口膜、棉塞、锡箔纸, 聚丙烯塑料试管帽 (防止污染和水分散失, 不影响空气交换)

## **(六) 培养室设备**

- 照明：日光灯、碘钨灯、定时钟 (光暗周期), 培养架, 铁丝筐
- 恒温：空调、加热线, 最高最低温度计, 湿度计、培养箱
- 细胞悬浮培养：摇床、转床, 振荡培养 60-120 次/分, 转床 1-15 转/分。

## **(七) 其它设备、仪器**

- 电子天平： 0.01g, 0.001g, 0.0001g
- 显微镜：普通双筒显微镜：用于一般的细胞学观察；倒置显微镜：观察培养物；相差显微镜：观察细胞中透明物的细微结构。
- 酸度计：调 pH ( pH 试纸)
- 离心机：3-4 千/分, 分离单细胞和原生质体。
- 冰箱、烘箱、水浴锅、蒸馏水器等。

## 第二节 器皿的选择与清洗

一、玻璃器皿的选择 根据不同的目的选择适当的容器

二、器皿的洗涤与消毒

无菌:关键在于防止微生物污染, 除对外植体消毒外, 各种培养用具、器皿都必须彻底清洗与消毒。

## **(一) 器皿的洗涤**

### 1、玻璃器皿：

一般：自来水泡, 肥皂粉洗刷, 清水洗至不沾水珠, 用蒸馏水冲洗晾干备用。

新：一般带碱性, 首先浸泡于 1-2% 的盐酸或洗涤液中数小时, 最后用流水冲净；

污染物：带菌的先浸在肥皂粉溶液或 0.25% 新洁尔灭消毒液内 24h 或煮沸 0.5h, 再洗涤；带病原菌的先高压蒸汽灭菌, 然后将培养物倒去, 再进行洗涤先高压灭菌, 再同一般方法；玻璃器皿可采用湿热灭菌或干热灭菌

• 吸管和容量瓶：洗液浸泡数小时, 洗净后流水冲洗, 蒸馏水冲洗、晾干。

• 玻片放入水中煮沸, 洗净, 95%酒精浸泡, 用时取出擦干酒精。

• 各种玻璃器皿洗净后, 用牛皮纸包好放入高压锅(湿热灭菌)或用烘箱干热灭菌。

(碱性高锰酸钾洗液:取 4g 高锰酸钾溶于少量水后,加入 100ml 10% 的 NaOH 溶液混匀后装瓶备用.洗液呈紫红色.有强碱性和氧化性,能浸洗去各种油污.洗后若仪器壁上面有褐色二氧化锰,可用盐酸或稀硫酸或亚硫酸钠溶液洗去,可反复使用若干次,直至碱性及紫色消失为止)

### 2、金属器具

• 新买的要用沾有四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>) 的布擦去油脂, 火焰灭菌, 或用牛皮纸包后干热灭菌, 或高压灭菌 (灭菌后及时烤干), 无菌操作时剥去牛皮纸泡在 95%酒精瓶中, 接种时用酒精灯烧去酒精。

3、布制品：工作服, 口罩、帽子、袖套等, 洗净晾干, 用牛皮纸或布包好高压消毒。

4、其它：橡皮用具, 过滤器等, 洗净晾干, 用牛皮纸或布包好高压消毒。

## **(二) 器皿的消毒**

**灭菌：**是指用物理或化学方法将所有致病和非致病的微生物全部杀灭。

### •常用灭菌方法:

干热灭菌: 150 度, 40'; 120 度, 120 '

湿热灭菌:高压灭菌锅, 压力达 0.5kg/cm<sup>2</sup> 时放气, 压力达 1.1 kg /cm<sup>2</sup>, 121 度, 16-30'

射线灭菌:紫外灯

过滤灭菌:细菌过滤器 (孔径 0.45 $\mu$ m )

熏蒸灭菌:每立方米体积 2-8mL 甲醛 + 甲醛一半量的高锰酸钾

火烧灭菌：酒精灯

药剂灭菌：外植体

(甲醛熏蒸：在接种前一天进行, 按每立方米体积 2-6mL 甲醛, 倒入烧杯中, 取甲醛一半量的高锰酸钾倒入烧杯中, 利用高锰



酸钾的强氧化性而使甲醛挥发达到杀菌目的)

(紫外线照射: 接种前 1 小时进行, 打开紫外灯照射 20-30 分钟, 利用臭氧 (O<sub>3</sub>) 杀菌, 停 15-20 分钟后开始接种)

### S3、植物组织培养的培养基的成分和种类 (P17)

**培养基:** 供外植物生长、分化必须的各种营养物质所组成的培养基质

#### 一、培养基成分 (P17)

大多数包括五种成分: **无机营养物、碳源、维生素、植物激素和有机附加物**。是决定组织培养成败的关键因素之一。

##### (一) 无机营养物: 分大量元素和微量元素

无机营养成分: 就是植物所需的矿物质或无机元素, 对植物的生长、发育产生非常重要的作用。

1、大量元素(macroelement) (>0.5 mmol/L 或 > 100mg/L) C、H、O、N、P、K、S、Ca、Mg

2、微量元素 (microelement): (<0.5mmol/L 或 <100mg/L)

一般 10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup>mol/L, 多会出现蛋白质变性, 酶失活, 代谢障碍等毒害现象。铁 (Fe)、硼 (B)、锰 (Mn)、锌 (Zn)、钼 (Mo)、铜 (Cu)、钴 (Co)、碘 (I)。用量以毫摩尔浓度计算。

##### (二) 有机成分

1、**糖(sugar)** (碳源和能源): 标准碳源: 蔗糖、葡萄糖, 大多数植物细胞对蔗糖浓度要求范围 2-4%, 但不同种植物差异很大。

碳源: 碳骨架; 能源; 维持培养基渗透压

2、**维生素 (Vitamin)**: 能直接参加有机体生命活动的重要过程, 如酶的合成, 蛋白质、脂肪代谢。

维生素类化合物主要以辅酶的形式参与多项代谢活动。组培中很多组织自己也能合成维生素, 但加入一定量维生素培养物生长得更好。一般用量 0.1-1 mg/L

维生素种类很多, 以 B 族起最主要作用

- 加入盐酸硫胺素 (B1) 能促进体内物质转化, 活化氧化酶, 是不可缺少成份)

- 盐酸吡哆醇 (B6) 能转化含氮物质, 在培养基中加入一定量 B6 和烟酸 (维生素 B5) 有促进培养物生长的作用

维生素 C: 抗氧化, 防止褐变;

其它如叶酸 (VB<sub>9</sub>) 等对某些植物的外植体有促进生长效果 (叶酸不溶于水, 用稀氨水溶解再定容, 其余皆溶于水)

3、**肌醇 (inositol)**: 用量 50-100mg/L

可以形成果胶物质, 是细胞壁的构建物质; 可以形成植酸, 与阳离子结合或形成磷脂, 参与细胞膜的组成; 能帮助活性物质发挥作用, 提高植物激素、VB<sub>1</sub> 的活性; 改善细胞生长, 利于胚状体和芽的形成。

#### 4、氨基酸和有机附加物

(1) **氨基酸**: 氨基酸是蛋白质的组成成分, 也是一种有机氮源, 缓冲作用和调节培养物体内平衡, 对芽、根和胚状体的分化和生长有良好的促进作用。

常用的有甘氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、天门冬酰胺、赖氨酸等

甘氨酸: 促进根的生长

丝氨酸和谷氨酰胺促进花粉胚状体和不定芽的分化

半胱氨酸为抗氧化剂, 防止培养材料褐化, 延缓酚氧化

(2) **有机附加物**: 包括一些有机含氮化合物如水解蛋白类

(水解酪蛋白、水解乳蛋白, 椰乳、酵母提取物、果汁类), 一般并不是必不可少成分, 但如果发现无机营养对培养物生长不太适宜时, 可选择性添加某种有机附加物, 促进生长。

用量: 椰乳 100-200g/L, 水解酪蛋白 0.5-2g/L, 酵母提取物 0.5g/L, 番茄汁 5-10%

##### (三) 植物激素:

泛指植物体内合成, 并可从产生部位运输到其他部位发挥作用的、对生长发育有显著调节作用的微量有机物质(<1μmol/L)

常用有两大类: **生长素类和细胞分裂素类**

**植物生长调节剂**: 人工合成的, 具有植物激素生理活性的有机化合物。

包括植物生长促进剂、抑制剂和延缓剂

植物生长促进剂: 为人工合成的类似生长素、赤霉素、细胞分裂素类物质。能促进细胞分裂和伸长, 新器官的分化和形成, 防止果实脱落。包括: 生长素类 (IBA 促进生根)、赤霉素类、油菜素内酯等。

**植物生长抑制剂**: 主要抑制顶端分生组织中的细胞分裂, 造成顶端优势丧失, 使侧枝增加, 叶片缩小。它不能被赤霉素所逆转。这类物质有: 脱落酸、乙烯、茉莉酸甲酯等。

植物生长延缓剂: 抑制茎顶端下部区域的细胞分裂和伸长生长, 使生长速率减慢的化合物。导致植物体节间缩短, 诱导矮化、促进开花, 但对叶子大小、叶片数目、节的数目和顶端优势相对没有影响。生长延缓剂主要起阻止赤霉素生物合成的作用。这些物质包括: 多效唑、矮壮素、助壮素 (调节安) 等。

#### 1、生长素类 (auxin):

促进细胞伸长生长和细胞分裂, 诱导产生愈伤, 促进根的分化。配合细胞分裂素, 诱导不定芽分化, 侧芽萌发和生长。

植物体内普遍存在的天然生长素是吲哚乙酸 (IAA) 另外, 吲哚丁酸 (IBA)、萘乙酸 (NAA), 2, 4-二氯苯氧乙酸 (2, 4-D) 等 (一般溶于 95%酒精或 0.1mol/L NaOH 中)) 为类生长素。

2, 4-D 对诱导愈伤和细胞悬浮培养效果最好, 但对芽和根的分化常有抑制, 故分化时常用 NAA、IAA。(2, 4-D > NAA > IBA > IAA) (用量: 0.1-10mg/L)

#### 2、细胞分裂素类(cytokinin, ctk):

作用: 促进细胞分裂和器官分化, 诱导胚状体和不定芽的形成, 延迟组织的衰老并增强蛋白质的合成。并能提高其它激素的作

用。玉米素 (ZT)、激动素 (KT)、6-苄基腺嘌呤 (6-BA)、苯基噻二唑脲 (噻苯隆, Thidiazuron, TDZ) 等 (一般溶于 0.5-1mol/HCl 或稀 NaOH 中)。(TDZ> ZT> 6-BA> KT) (用量:0.1-10mg/L )

50 年代 Skoog 等发现, 培养材料分化芽和根, 是由激动素/生长素的不同比例决定的, 比值高有利于长芽, 比值低有利于长根 (在烟草髓组织培养中)。利用不同比值控制器官形成的模式, 已在许多植物中获得成功。

- 激动素/生长素的不同比例, 激素的绝对用量 ;
- 愈伤诱导时用 2, 4-D;
- 愈伤分化芽: 去掉 2, 4-D, 改用 NAA 和一定量细胞分裂素

#### 细胞分裂素 (cytokinin, c) /生长素 (auxin, a) 的不同比例决定培养效果

- $a/c > 1$  可诱导愈伤组织或使芽体形成根的分化。
- $a/c = 1$  可以形成愈伤组织及促进器官或不定芽的分化。
- $a/c < 1$  会促进愈伤组织形成芽体。
- ◆ 简而言之, cytokinin和auxin的比值增高时, 可促进芽的分化, 比值降低时则可促进根及愈伤组织的形成。

#### 列外

苜蓿在有 2, 4-D 和细胞分裂素的培养基中, 可以形成愈伤组织, 转入不加上两种激素的培养基中能分化, 但分化的情况与原来的激素比例有关。如果愈伤组织是在高细胞分裂素/生长素比例的培养基中形成的, 易于生根, 而在高生长素/细胞分裂素比例的培养基中形成的愈伤组织, 则易生芽。

**芽形成后生根:** 减少无机盐用量, 去除细胞分裂素, 加入少量生长素。

#### 3、其它激素: 脱落酸(ABA)、赤霉素(GA3)、多效唑(PP333)

**赤霉素类激素:** 能促进已形成的器官或胚状体生长, 在某些茎尖培养中常用不同浓度的 GA3(易溶于冷水, 溶于水后不稳定, 常用 95%酒精配成母液在冰箱保存)

**脱落酸 ABA:** 抑制蛋白质的合成, 抵消或抑制生长素、细胞分裂素的作用, 不常用, 但它对某些培养物芽的形成有促进作用, 如甘薯块根、柳杉下胚轴培养中芽的形成。

#### (四) 其他成分

**1、活性炭:** 可提高诱导频率, 在胡萝卜、洋葱等体细胞培养中加入活性炭能促进胚状体或器官形成

作用: 可能吸附培养物分泌的酚类物质或其它有害的代谢产物。

**2、琼脂:** 使用液体培养基静止培养, 组织将沉没缺氧而死亡, 用琼脂使之固化, 培养物置于培养基表面。

琼脂是海藻中得来的多糖类物质, 使用浓度 0.6-1%, 浓度高太硬, 营养物质难以扩散到培养物

当进行营养需要研究时, 不要用琼脂, 因含有杂质 Ca、Mg 和微量元素。可在液体培养基表面安放由无灰滤纸制成的纸桥, 在纸桥上进行愈伤组织培养。

**3、pH:** 影响营养的吸收、呼吸代谢、多胺代谢和 DNA 合成、生长调节物质进出细胞, 直接或间接地影响愈伤组织的形成及其形态建成, 灭菌前 pH 一般调至 5.0-6.0 之间, 提高 pH 可提高  $\text{NH}_4^+$  的利用, 降低 pH 可提高  $\text{NO}_3^-$  的利用, pH 还影响铁的吸收利用, 为防止 pH 变化引起铁的沉淀常在培养基中加入螯合形式存在的铁

#### 二 常用的培养基种类 MS, N6, B5, White, ER, NT, SH, HE, KM-80 等

##### §4、几种常用培养基的配方及其特点

**(一) MS (Murashige-skoog) 培养基** 它是 1962 年由 Murashige 和 Skoog 为培养烟草细胞而设计的。

##### 1、成分

成分	MS (毫克/升)
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
$\text{KNO}_3$	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28.7
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.3
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
KI	0.83
烟酸(Vpp)	0.5
盐酸吡多醇(V <sub>B6</sub> )	0.5
盐酸硫胺素(V <sub>B1</sub> )	0.1
肌醇	100
甘氨酸	2

2、特点: Ms 中营养物质含量丰富, 无机成分的含量较高, 其中硝酸盐、钾和铵的含量比其它培养基高。能满足很多培养物营养

和生理上的要求，一般不加干酪素、椰子汁等有机附加物。由于无机盐含量较高，在诱导培养物生根时将其大量元素减少一半（即 1/2Ms）效果较好。

**（二）N6 培养基** 是 1974 年朱至清等为水稻等禾谷类作物花药培养而设计的。

其特点是成分较简单，KNO<sub>3</sub> 和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 含量高。在国内已广泛应用于小麦、水稻及其他植物的花药培养和其他组织培养。

- 与 B5 相似，但不含钼、铜、钴盐。

<b>1. 无机物</b> KNO <sub>3</sub> 2800 mg/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 463mg / L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 400 mg/L MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 185 mg/L CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 165 mg/L Na <sub>2</sub> -EDTA 37.3 mg/L FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 27.8 mg/L MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 4.4 mg/L ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 1.5mg/L H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 1.6mg/L KI 0.8mg/L <b>2. 有机物</b> 维生素B <sub>1</sub> 1mg/L 维生素B <sub>6</sub> 0.5 mg/L 叶酸 1 mg/L 蔗糖 20 g / L pH 5.8	<b>1.无机物</b> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 150 mg/L KNO <sub>3</sub> 3000 mg/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 134mg / L MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 500 mg/L Na <sub>2</sub> -EDTA 37.3 mg/L FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 27.8 mg/L MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 10 mg/L ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 2mg/L H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 3mg/L Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.25 mg/L CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 0.025 mg/L CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 0.025 mg/L KI 10 mg/L <b>2.有机物</b> 维生素B <sub>1</sub> 10mg/L 维生素B <sub>6</sub> 1 mg/L 甘氨酸 2.0 mg/L 叶酸 0.5 mg/L 肌醇 100. 0mg / L 蔗糖 50 g / L pH 5.5	<b>1. 无机盐类</b> Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O 287mg/L KNO <sub>3</sub> 80mg/L KCl 65 mg/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 19.1 mg/L MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 738 mg/L Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·10H <sub>2</sub> O 453 mg/L MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O 6.6 mg/L H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 1.5 mg/L ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 2.7 mg/L KI 0.75 mg/L <b>2. 有机物</b> 甘氨酸 3.0 mg/L 烟酸 0.5 mg/L 维生素B <sub>6</sub> 0.1 mg/L 维生素B <sub>1</sub> 0.1 mg/L 柠檬酸 2.0 mg/L 蔗糖 20g/L pH 5.7
---	---	--

**（三）B5 培养基：** 是 1968 年由 Gamborg 等为培养大豆根细胞而设计的。

- 矿质含量低，特别铵盐含量较低，因铵对不少培养物的生长有抑制作用，某些植物的愈伤组织和细胞培养以 B5 效果好，常用于双子叶植物特别是木本植物。

**（四）White 培养基（1943,1963）**

是 1943 年由 White 为培养番茄根尖而设计的。1963 年又作了改良，称作 White 改良培养基，提高了 MgSO<sub>4</sub> 的浓度、增加了硼素。

早期组培采用、含有细胞生长所需营养成分，但无机盐和维生素低于其它培养基，氮、磷和钾的含量不足，磷和钾的含量最低，应加入氨基酸、酵母提取物，现有人加以改良用于花培和胚胎培养，也诱导试管苗生根，小苗继代时也常用。

其特点是无机盐含量较低，适于生根培养。更适合木本植物的组织培养。

**（五）ER 培养基（Eriksson）（1965）**

与 Ms 相似，但磷酸盐比 Ms 高一倍，微量元素比 Ms 低得多，适合于某些植物的细胞培养。

**（六）NT 培养基**

NT 培养基是 1970 年设计的适用于烟草等原生质体培养的培养基。S, P, Mg 含量高，微量元素含量高，适合原生质体培养。

**（七）SH 培养基（Schenk 和 Hidebrandt）（1972）**

与 B5 类似，矿物盐含量稍高，铵和磷酸盐是由同一化合物（磷酸铵、NH<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>）提供。

**（八）HE（Heller）培养基（1953）** 广泛用于欧洲，含盐量较低并缺少钼盐。

牛肉膏 0.3g  
蛋白胨 1g  
氯化钠 0.5g  
琼脂 2g  
自来水 100mL  
pH 7.0~7.2

**（九）KM-80 培养基：**

1974 年为原生质体培养而设计的。其特点是有机成分较复杂，它包括了所有的单糖和维生素，广泛用于原生质融合的培养。

**培养基的选择：**

为研制一种适合的培养基，先选用一个广泛采用的培养基，对这种培养基做某些定性和定量的小变动，有可能得到一种满足实验需要的新培养基。（无机营养成分：一般在现有培养基配方中选择。可以参考前人的经验，例如：MS 是广谱性培养基，N6 用于单子叶植物的培养。豆科多用 B5 培养基）

## §5、培养基的配制（配方参考 MS 培养基）

**一、药品的选择：**选定培养基及其成分后，化学药品应用等级较高的化学纯 CP（三级）及分析纯 AR（二级），以免杂质对培养物造成不利影响。药品的称量及定容要准确，不同化学药品的称量需使用不同的药匙，避免药品的交叉污染与混杂。

**二、母液的配制：**选定培养基后，按其规定成分配成固体或液体培养基，为配制方便，先要分种类配成浓缩的母液，正式配制时按规定用量稀释混合 方便准确

为了避免每次配制培养基都要对几十种化学药品进行称量，应该将培养基中的各种成分，按原量 10 倍、100 倍或 1000 倍称量，配成浓缩液，这种浓缩液叫做母液

**应注意以下几个方面：**

A. 药品称量应准确，尤其微量元素化合物应精确到 0.0001 克，大量元素可精确到 0.01 克。

B. 配制母液的浓度适当，一是长时间保存后易沉淀，二是浓度大，用量少，在配制培养基时易影响精确度。



C.母液贮藏不宜过长，一般几个月左右，要定期检查，如出现浑浊、沉淀及霉菌等现象，就不能使用。

D.母液应放在 2-4℃的冰箱中保存。

水：蒸馏水以上（不含或少含矿质离子）

药品：化学纯以上

**（一）大量元素：**按配方规定各加大 50-100 倍称取，分别溶解再混合定溶至 1000ml，制成浓缩 50-100 倍母液。

(氯化钙与磷酸二氢钾单独配母液，在溶解  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  时，蒸馏水需加热沸腾，除去水中的  $\text{CO}_2$ ，以防沉淀。另外， $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  放入沸水中易沸腾，操作时要防止其溢出)

**（二）铁盐：**用螯合剂，

先将硫酸亚铁 ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 和乙二胺四乙酸二钠 ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) 溶于约 800ml 蒸馏水中，然后煮沸约 5 分钟，至溶液为橙黄色时为止，冷却后再定容。

**（三）微量元素：**按规定用量扩大 100 倍，分别称取溶解，混合定容至 1000ml

**（四）维生素、氨基酸：**肌醇、菸酸、维生素、甘氨酸等分别扩大 100 倍称取，单独溶解，然后混合定容至 1000ml。

**（五）激素：**

分别配成 0.5-1mg/ml 母液，配制时按规定用量吸取。

1、生长素：2,4-D、NAA、IAA 等。先用 95%酒精溶解

2、细胞分裂素类：KT、6BA、ZT 等。1N NaOH 或 1N HCl 溶解

**配成的各类母液贮存冰箱中，低温下可保存几个月，出现浑浊或雾团就不要用。**

### 三、配制培养基

吸取各母液混合，加入 2-5%蔗糖，搅匀，用 HCl 或 NaOH 调 pH 值，定容，加入 0.5-1%的琼脂，加热使琼脂溶解后分装。（事先加水!!）

### 四、培养基消毒：

**1、高压灭菌：**达到灭菌要求的最低温度和最短时间。121℃，1.1kg/cm<sup>2</sup>，灭菌 15-20 分钟，温度过高或时间过长，会使维生素、激素被破坏，蔗糖分解变酸引起 pH 变化。

及时取出

**2、过滤灭菌：**对某些不耐高温的成分，不能用高压灭菌，可用细菌过滤器（孔径为 0.45μm 的细菌滤膜）除去细菌后再加入已高压灭菌培养基（ZT、GA3、ABA 等）。(不能去除病毒)（病毒的直径大小在 0.02-0.4μm 之间，细菌直径在 0.2-50μm 之间）

## 第二章 外植体选择和灭菌

一般来说，无论何种类型的细胞工程技术，起始阶段均涉及**外植体取材、灭菌、接种与培养等基本过程**。

### §1、外植体的选择和灭菌

#### 一、外植体的选择

##### （一）外植体的基因型

- 不同种类的植物
- 同一植物的不同器官

对诱导条件反应是不一致的，有的部位诱导分化的成功率高，有的部位却很难脱分化，或者再分化频率很低

a. 单子叶植物不易诱导器官发生。b. 木本植物较难诱导。c. 存在基因型差异（番茄 29%~63%）d. 开始生长季节取材容易诱导。

##### （二）外植体的部位

对于大多数植物来讲，茎尖是最好的部位，由于其形态已基本建成，生长速度快，遗传性稳定，也是获得无病毒苗的重要途径，但茎尖往往受到材料来源的限制，而采用茎段等其他组织可解决培养材料不足的困难。

**常用的外植体种类：**

- ①茎尖（园艺植物组织培养中应用最多，繁殖率高，不易发生遗传变异，但取材有限）
- ②茎段（采用嫩茎的切段促进腋芽萌发，取材容易）
- ③叶（幼嫩叶片组织通过愈伤组织或不定芽分化产生植株，取材容易，操作方便，但易发生变异）；
- ④花球和花蕾
- ⑤种子、根、块根、块茎、花瓣、胚等。

在选择植物外植体进行组织培养时，还要求考虑**待培养材料的来源是否有保证，是否容易成苗**；同时考虑到**该外植体，特别是经过脱分化产生的愈伤组织，是否会引起不良变异，丧失原品种的优良性状**。

##### （三）取材季节 以早春为好

- 不同植物的取材季节要求各有不同。对大多数植物而言，应在其生长开始的季节采样。
- 在生长末期或已进入休眠期时取样，则外植体可能对诱导反应迟钝或无反应，较难成活。
- 在母株生长旺盛的季节取材，不仅成活率高，而且增殖率也大。

##### （四）器官的生理状态和发育年龄

###### 1、幼年组织具有较高的形态发生能力

作为外植体的器官，其生理状态和发育年龄直接影响形态发生。一般情况下，幼年组织比老年组织具有较高的形态发生能力，生理年龄越老的组织或器官，越接近发育上的成熟，其再生能力逐渐减弱甚至完全失去再生能力。

## 2、外植体的来源

-生长在自然环境下的植物-有目的地培育在温室控制条件下生长的植物-无菌环境下已经过离体培养的植物  
自然环境中生长的植株，一般带有微生物，甚至与某些微生物具有寄生关系，使植株具有内生菌。取自这些植物的外植体，在培养过程中会有微生物滋生，从而影响培养效果。

多数情况下，应尽量**使用温室或人工气候室控制培养的植物材料作为外植体来源**，减少培养过程中的微生物感染概率。同时，生长在控制条件下的植物可以保持培养材料间的一致性，提高实验的可重复性，也便于培养技术的规范。

某些**多年生植物或特殊材料，必须取自自然生长的植物，就需要尽可能避免使用那些生长过于潮湿和不洁净环境中的植物**。对于培养过程中可能出现内生菌污染的材料，应尽量取生长旺盛期的生长点部位作为起始培养的材料。

## 3、供体植株的管理

取自室外的外植体材料，供体植株的管理十分重要，这与外植体培养时的污染率密切相关。植株管理中应注意：

- (1)避免昆虫危害 许多昆虫如蚜虫、螨类和飞虱是许多植物病虫害的传播媒介，会引起植物组织的潜在感染。
- (2)注意防病 尤其是真菌和细菌病害的侵染，取自感病植株的外植体，在培养中的污染率远远高于来自健康植株的外植体，必要时需使用化学药剂防治病害。
- (3)控制湿度 给供体植株浇水时应从根部给水，避免从上部浇水，以免上部形成易于病原侵染的湿度环境；尽可能降低温室湿度；取材前尽可能保持植株干爽。

## (五) 外植体大小

选取材料的大小一般在 0.5-1.0cm 之间。胚胎培养或脱毒在 0.5cm 以下。材料太大易污染，材料太小难于成活。

**外植体极性：**当外植体以形态学的基部接种于培养基上时，从远离基部的表面诱导出芽、苗数目较多。

## 二、外植体的灭菌

灭菌：是指用物理或化学方法将所有致病和非致病的微生物全部杀灭。

常用灭菌方法：

干热灭菌: 150 度, 40'; 120 度, 120 '

湿热灭菌: 高压灭菌锅, 压力达 0.5kg/cm<sup>2</sup> 时放气, 压力达 1.1 kg /cm<sup>2</sup>, 121 度, 16-30'

射线灭菌: 紫外灯

过滤灭菌: 细菌过滤器 (孔径 0.45μm )

熏蒸灭菌: 每立方米体积 2-8mL 甲醛 + 甲醛一半量的高锰酸钾

火烧灭菌: 酒精灯

药剂灭菌: 外植体

原则: 杀菌又不伤害活细胞。(选择消毒剂, 浓度、时间)

药剂: 能自动分解成低毒性或容易除去的药剂, 如次氯酸钠能分解成杀菌的氯气, 并易散失, 是常用的, 低浓度氯化汞效果好但难除; 多次无菌水冲洗, 用镊子翻动使药液均匀。

**不同外植体选用不同的灭菌方法主要是因为外植体的来源、种类、大小、结构以及对灭菌剂的耐受性等因素不同。**

1. 外植体来源: 外植体可能来自不同的环境 (如温室、野外), 携带的污染物种类和数量不同, 因此需要选择适合的灭菌方法。
  2. 外植体种类: 不同植物器官 (如茎尖、叶片、根等) 对外植体灭菌的敏感性不同。例如, 茎尖分生组织较为幼嫩, 对灭菌剂敏感, 因此需要温和的灭菌方法。
  3. 灭菌剂种类和浓度: 不同的灭菌剂 (如酒精、氯化汞、次氯酸钠等) 对外植体的伤害程度不同。选择合适的灭菌剂和浓度可以减少对细胞的损伤。
  4. 外植体大小和结构: 较大的外植体或结构复杂的外植体可能需要更长的灭菌时间, 或者采用分段灭菌的方法。
  5. 培养目标植物种类: 不同植物种类对灭菌的耐受性不同, 因此需要根据植物的特性选择适合的灭菌方法。
- 总之, 选择合适的灭菌方法可以有效去除外植体表面的污染物, 同时减少对细胞的伤害, 提高组织培养的成功率。

## 1、预处理

先对植物材料进行修剪整理, 去掉不需要部分, 将准备使用的植物材料 (外植体) 在流水中冲洗 20-60 分钟, 备用。如特别不洁的外植体, 可先用加有洗涤剂的水清洗 10-15 分钟, 再用流水冲洗干净。

## 2、表面灭菌

(1) 操作人员穿戴灭菌过的工作服、口罩。进入接种室前双手用洗涤剂清洗干净, 操作前再用 70%酒精或消毒剂擦洗双手。

(2) 操作期间双手和台面常用 70%酒精或消毒剂擦拭。超净工作台使用前必须用紫外灯照射杀菌, 然后开启风机。

(3) 接种用工具 (解剖刀、剪刀、镊子) 可放入 70-75%酒精中, 使用时需火焰灼烧灭菌, 冷却后使用。

(4) 外植体放入超净工作台内, 置 70-75%酒精中 5-60 秒。

【材料消毒前常用 70%酒精漂洗: 70%具较强穿透力和杀菌力, 湿润表面, 驱尽茸毛间气泡, 使药剂杀菌效果好。但时间太长会损伤材料】

## (5) 外植体消毒

- 幼穗、花蕾、花药: 饱和漂白粉上清液 10-20 分钟
- 茎段、茎尖: 0.1-0.2%升汞 5-10 分钟
- 成熟胚: 次氯酸钠 15-30 分 (活性氯 2.5%) (>= 5.2%)
- 厚种皮种子: 0.1-0.2%升汞 30 分-60 分, 水稻幼胚 (带壳) 次氯酸钠 90-120 分

•表面活性剂(TWEEN 20)，抽气、搅拌或超声振动，使消毒剂与材料充分接触。

### (三)污染原因和预防措施

**1、污染原因** 污染是指在组织培养过程中培养基和培养材料滋生杂菌，导致培养失败的现象。病原菌：细菌及真菌两大类。

(1)细菌污染特点-菌斑呈黏液状，接种后 1-2 天发现。

污染途径：外植体带菌、培养基及器皿灭菌不彻底、操作人员未遵守操作规程

(2)真菌污染的特点-污染部分长有不同颜色的霉菌，接种后 3-10 天发现。

污染途径：材料内部带菌、周围环境不清洁、超净工作台过滤装置失效、培养瓶的口径过大

### 2、污染的预防措施

(1)防止材料带菌的措施

-茎尖作外植体时，进行预培养（无糖）或暗培养。无糖营养液或自来水使枝条抽枝，以新抽嫩枝作外植体。

-晴天取材，下午取材，经日晒过可杀死部分细菌或真菌。

-接种时除去外部韧皮组织，只接内部的分生组织。

(2) 外植体的灭菌

-多次灭菌法，次氯酸钠-无菌水-次氯酸钠

-多种药液交替浸泡法，肥皂水-酒精-次氯酸钠-无菌水。

(3) 严格按照操作程序。

## §2、 外植体无菌接种和培养（P51）

污染来源：空气中微生物，接种工具、材料、工作人员带菌

### 一、接种室的消毒

新洁尔灭擦地板、墙壁:使用前 0.1%新洁尔灭擦地板、墙壁

甲醛熏蒸：在接种前一天进行，按每立方米体积 2-6mL 甲醛，倒入烧杯中，取甲醛一半量的高锰酸钾倒入烧杯中，利用高锰酸钾的强氧化性而使甲醛挥发达到杀菌目的)

(紫外线照射：接种前 1 小时进行，打开紫外灯照射 20-30 分钟，利用臭氧 (O<sub>3</sub>) 杀菌，停 15-20 分钟后开始接种) 酒精喷雾

### 二、外植体的接种—无菌接种

外植体的接种是把经过表面灭菌后的植物材料切碎或分离出器官、组织、细胞、转放到无菌培养基上的全部操作过程。

整个过程均需无菌操作。

烧瓶口，换滤纸，消毒剪刀，在酒精灯下方操作等。

(一) 工作人员：洗手，戴帽、口罩，70%酒精擦手。

(二) 无菌操作：烧瓶口，换滤纸，消毒剪刀，在酒精灯下方操作等。

(1) 借助接种用工具将材料切割分离。

(2) 将培养基放入超净工作台内，火焰灼烧培养瓶瓶口，然后打开培养瓶口，置培养瓶为斜角，避免灰尘落入器皿中。

(3) 迅速将切割分离下的所需组织、细胞、器官，放入培养基上，及时盖上瓶盖。(4) 工具用后应及时灭菌，避免交叉污染。

(5) 工作人员操作时禁止不必要的谈话。

### 三、外植体的培养

接种只是完成了离体培养的第一步，植物离体培养和栽培植物一样，生长过程中也受到各种环境因素的影响。培养条件是离体培养能否成功的关键。在培养基条件适宜的基础上，影响试管苗生长的主要因素有**光照、温度、湿度、氧气**。

#### 外植体的培养条件

**1、光照** 光照对植物生长发育有重要作用，是离体培养中非常重要的环境因素。光照强度、光质以及时间，对细胞的增殖、器官的分化都有很大影响。除特殊要求外，**一般都采用日光灯作光源，光照强度 1000-5000Lx，根据不同植物或器官需要，可以每天连续光照 12-16 小时。**

(作物对**红光和蓝紫光吸收能力最强**，所以灯源以**日光灯、高压汞灯、弧氙气灯为好**。灯源强度：40 瓦的日光灯三根合在一起，离苗 45 厘米高处照射，光强为 3 千~3.5 千勒克斯，100 瓦的高压汞灯离苗 80 厘米处，光强为 0.8 千~1 千勒克斯)

• 马铃薯连续光照，葡萄要求短日照。

• 光质也影响芽的再生，蓝光有利于器官发生，烟草实验，红光有利于根的发生

#### 2、温度

离体培养中对温度的控制比光照更为重要，大多数植物最适温度在 **23-32℃之间**。**培养室温度是 25±2℃**。低于 15℃时，培养的组织生长停顿，高于 35℃对生长也不利。因此，培养室应安装空调或其他的控温设备。

变温处理对有些植物器官发生有促进作用，如豌豆。

#### 3、湿度

培养瓶内相对湿度通常是 100%，而环境中的相对湿度会直接影响培养基的水分蒸发。因此，培养过程中，培养室一般要求**相对湿度保持在 70-80%**，相对湿度过低影响培养物生长和分化，应向室内喷洒水，以提高湿度；过高杂菌滋生，大量污染，应及时地通风除湿。

#### 4、氧气

离体培养的试管苗是需要氧气的，在固体培养或液体静置培养时，如果组织完全浸入培养基中，与氧气隔绝，就会停止生长。因此，**接种时要有部分组织与空气接触。振荡培养是解决通气的良好办法**。固体培养中，如瓶塞不透气，培养物也不能生长，要选

择通气性好的培养瓶盖，增加可利用的氧气，迅速除去释放出来的 CO<sub>2</sub>，有利于外植体外层细胞开始分裂。要注意保持培养容器内良好的通气性。维持适宜的氧气和二氧化碳浓度，防止有害气体的积累。

### §3、外植体的褐变及其防止措施（P56）

#### 一、褐变的原因

褐变是指外植体在培养过程中体内的多酚氧化酶被激活，使细胞内的酚类物质氧化成棕褐色的醌类物质，这种褐变物向外扩散致使培养基逐渐变成褐色，抑制其它酶的活性，影响外植体的分化，最后变褐死亡的现象。

(1) **基因型** 某些植物酚类物质含量较多。木本植物的外植体比较容易产生褐变现象，在成年树尤其严重。

(2) **外植体的生理状态**——幼年的材料培养含醌类物质较少。

(3) **培养基的成分**

-过高的无机盐浓度和肌醇-生长调节物质使用不当，BA 过多-分生能力强的材料，氧化受抑制，褐变也被抑制

-培养条件不适宜，温度过高或光照过强，褐变加速。

(4) **材料转移时间** 时间过长引起材料褐变。

#### 二、褐变的防止措施

**1 选择适宜的外植体** 一般来说，最好选择生长处于旺盛、酚类化合物含量较低的外植体，这样可以使褐变现象明显减轻。

**2 培养基成分** 培养基成分中的无机盐、蔗糖浓度、激素水平等对褐变的程度的影响尤为重要。另外，其 pH 值也与褐变程度有较大关系

(1) 适当的无机盐浓度 低浓度的无机盐可促进外植体的生长与分化，减轻外植体褐变的程度。

(2) 适当和适量的激素 王异星在荔枝的组织培养过程中，培养基中添加 1 mg/L BA+ 0.5mg/L 2,4-D 时，愈伤组织较坚硬，增殖缓慢，易产生褐变。培养基中添加 1mg/L BA+1mg/L 2,4-D 时，愈伤组织浅黄疏松，增殖也快。

(3) 培养基的 pH 值 在水稻体细胞培养中，pH 值为 4.5-5.0 时 MS 液体培养基可保持愈伤组织处于良好的生长状态，其表面呈黄白色，而 pH 值为 5.5-6.0 时，愈伤组织严重褐变。一般来说，酸性环境(pH 值为 4.5-5.0)不利于褐变过程的发生。

**3 培养条件** 如温度过高或光照过强，光照会提高多酚氧化酶（PPO）的活性，促进多酚类物质的氧化，从而加速被培养的组织褐变。高浓度 CO<sub>2</sub> 也会促进褐变，其原因是环境中的 CO<sub>2</sub> 向细胞内扩散，细胞内 CO<sub>2</sub>-增多，导致内膜系统瓦解，酚类物质与多酚氧化酶（PPO）相互接触，产生褐变。因此，初期培养要在黑暗或弱光下进行。

**4 连续转移。**不断地（每隔 1~2d）将培养物转移到新鲜的培养基上，以摆脱老培养基中褐色物质的不利影响。在使用液体培养基的情况下，这种方法相当有效。

**5 添加褐变抑制剂和吸附剂** 主要包括抗氧化剂和 PPO 抑制剂。

**6 加活性炭**

### §4、玻璃化现象及其预防措施

#### 玻璃化现象产生原因

玻璃化是在细胞生长过程中的环境产生变化，试管苗为了适应变化了的环境而呈玻璃状。植物在芽分化的时候 C、N 代谢和水分发生生理性异常，细胞体积增大快于干物质的生成，所以用水分填充细胞，表现出玻璃化。

#### 导致玻璃化的主要因素：

1. 材料差异，在不同的种类、品种间，组培苗的玻璃化程度有所差异。

2. 细胞分裂素浓度过高或细胞分裂素与生长素相对含量高，易引起玻璃化现象。

3. 培养基水势，培养基中离子种类，比例不适。

4. 环境温度、光照强度和通气性。温度过低或过高，光照时间、强度不足及培养容器中空气湿度过高，透气性较差所造成的通气不良，易造成组培苗含水量高，而发生玻璃化现象。湿度过高、光照不足。

5. 培养基的 C、N 比太低，琼脂浓度低等。

#### 预防措施

(1)控制无机营养成分，减少培养基中含氮化合物的用量（降低氮（铵态氮）和氯）。

(2)增加培养基中的溶质水平，以降低培养基的水势（提高蔗糖和琼脂浓度）。

(3)降低细胞分裂素和赤霉素浓度，增加生长素比例，可以考虑加入适量脱落酸。

(4) 增加光照，包括自然光照 1000-1800lx，控制光照时间 8-12h(光照强度和光照时数)。

(5) 适温生长，热击处理防止玻璃化发生。

(6) 增加容器通风，使用透气性好的封口膜，最好进行 CO<sub>2</sub> 施肥，这对减轻试管苗玻璃化的现象有明显的作用。

(7) 培养基中加入间苯三酚、根皮苷或多效唑、矮壮素。

(8) 降低培养温度，进行变温培养，有助于减轻试管苗玻璃化现象的发生。

(9) 培养瓶容量小，气体交换不良，玻璃化。

(10) 离子水平：植物种类不同，离子形态比例量要求不同。

## 第三章 愈伤组织培养

**愈伤组织培养定义:**指将外植体接种到培养基上，进行愈伤组织诱导、生长和分化的培养过程。

**愈伤组织(callus):**植物体的局部受到创伤刺激后，在伤口表面部位的细胞脱分化而而不断增值形成松散排列、无特定结构和功能的薄壁分生细胞群。

【愈伤组织培养已被广泛的用于植物突变体筛选、植物细胞转化以及无性快速繁殖等方面的研究。同时，未分化愈伤组织也是植



物细胞悬浮培养及原生质体分离和培养主要的材料来源和良好的遗传转化系统。】

第一节 愈伤组织的诱导和分化

一、愈伤组织的诱导 愈伤组织的关键主要是培养条件，其中激素的成分和浓度是最重要的因素。

脱分化：从分化状态（细胞分裂已停止）转变为具有分裂能力的分生状态细胞并形成未（脱）分化的愈伤组织的过程。

从外植体脱分化形成愈伤组织大致可分为三个时期：诱导期 分裂期 分化期

愈伤组织的形成过程

愈伤形成大致分为三个时期

1、启动脱分化时期：即诱导期(启动期)，诱导期是细胞正在准备分裂的时期。在诱导期，细胞的大小仍然和外植体时一样，因此外观上未见明显变化，但代谢活化了，细胞内一些大分子代谢动态已发生明显的改变，细胞正积极为下一步分裂进行准备。细胞质增加，出现活跃的原生质流动，贮藏物质淀粉等消失；细胞改变了原有的代谢方式，合成代谢加强，迅速进行蛋白质和核酸的合成，为细胞分裂做准备。

生长的诱导:植物的组织、细胞离体培养时，如果给予一定的条件，使已分化成熟（停止分裂）的细胞重新分裂，增殖生长。

影响愈伤组织诱导的因素

【脱分化难易因物种、器官及其生理状态而异，烟草、胡萝卜易，禾谷类难，花器官易，茎叶难，幼嫩组织易，成熟老组织难。】植物种类、生理状况；外部因素不同，诱导期不同；弱光下植株比强光下的植株外植体易于诱导分裂；二氧化碳抑制诱导分化生长调节剂诱导细胞开始分裂；损伤刺激能加速脱分化进行，有时还是某些材料能否脱分化的决定条件。

①光照：愈伤组织的诱导需弱光或不需光，在黑暗或散光条件下最好。分化、继代培养一般需光。此时光对器官的作用是一种诱导反应。

②温度：外植体接入诱导培养基后，一般采用25-28℃的恒温条件下培养。

③湿度：较大，以免引起培养基干缩。

一般双子叶比单子叶植物及裸子植物容易；

二倍体种子植物，无论茎、叶、花等皆易去分化，特别是形成层和薄壁细胞容易诱导愈伤组织。

菊芋 刚收获块茎 22hr 贮藏 5 个月 2 天

胡萝卜 几天

弱光下的植物比强光下的植物易诱导(离体培养前暗处理)

2、分裂期：已具一定功能和结构的分化和成熟的细胞 回复到具分裂能力的分生状态。细胞分裂标志着脱分化的完成。

外植体已分化的活细胞在外源激素的作用下，通过脱分化启动而进入分裂状态，并开始形成愈伤组织。

分生状态:细胞变小、细胞质稠密、液泡变小、核和核仁变大并趋向细胞中央

外植体切口边缘开始膨大，外层细胞通过一分为二的方式进行分裂，而中间的细胞不分裂。另外还有细胞数目增加，体积变小；细胞核和核仁增大到最大等。从而形成一团具有分生组织状态细胞的过程。这时组织细胞代谢十分活跃，发生了一系列生理生化及形态的变化。

愈伤组织的特征： 细胞分裂快，结构疏松，缺少有组织的结构，维持其不分化的状态，颜色浅而透明

小麦花粉分化和脱分化第一次有丝分裂的差异		
	分 化	脱分化
1、分裂前细胞核的位置	必定在萌发孔对面紧靠胞壁	在花粉粒中无确定的位置
2、分裂前、中的细胞质	除一部分靠胞壁外，大部分集中在核对着萌发孔的一侧	在核的周围分布比较均匀
3、纺锤体	纺锤体不对称，近壁端钝，游离端尖，后期向末端转化阶段，纺锤体轴向发生变化	分裂过程中纺锤体对称
4、新细胞壁	分裂后形成的细胞壁呈弧形，位于正对萌发孔	新细胞壁平直，与萌发孔没有特定的位置关系
5、子细胞	具特定的位置、形态和功能	两个子细胞不具特定的形态和功能

花粉分化的第一次有丝分裂是在有极性的状态下进行的分裂，而脱分化是在失去极性的状态下进行的分裂

陆文枢（1982）

在脱分化过程中，伴随着细胞形态结构的变化

脱分化后的愈伤组织其薄壁细胞是非匀质的:愈伤组织虽然未分化出其它特化组织（如维管束等），其薄壁细胞在组成上仍是有差异的

培养组织的生理生化特性也有变化，原有组织的一些特殊代谢产物（如生物碱或其它次生物质）减少，消失或代之以另外一些前体或结构不同的类似物

例如:甜菜根一般不形成淀粉，但离体培养时细胞中有相当多的淀粉形成。

启动后的细胞进行活跃细胞分裂。

- (1) 细胞的数目迅速增加（外层先开始旺盛分裂）。胡萝卜培养 7 天后，细胞数可增加 10 倍。
- (2) 每个细胞平均鲜重下降。这是由于细胞鲜重的增加不如细胞数目的增加快的缘故。



(3) 细胞形态改变：体积小，成多边形，质浓，液泡小或无，如同根尖和茎尖的分生组织细胞一样。细胞的核和核仁增大到最大。

(4) 细胞中 RNA 含量减少，而 DNA 含量保持不变。

(5) 随着细胞不断分裂和组织生长，组织的总干重、蛋白质和核酸含量大大增加，新细胞壁的合成极快。

细胞数目增加、体积变小、核和核仁变大、RNA 含量持续上升。从培养外植体的形态变化来看，表现为外层细胞迅速分裂。当细胞体积最小，细胞核和核仁最大，RNA 含量最高时，标志着细胞处于分裂高峰时期。

### 3、愈伤组织形成期：

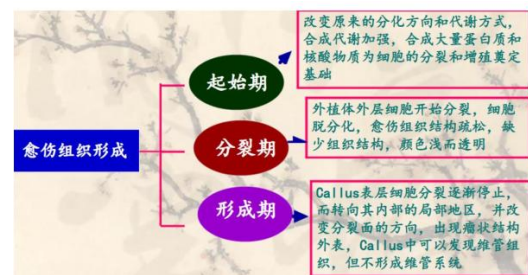
愈伤进一步发育，其周缘近表面部分细胞分裂较多，（垂周分裂）形成愈伤形成层，而愈伤深层细胞显著增大，细胞质变稀薄，液泡变大，核和核仁变小并移到细胞边缘，RNA 含量下降，在外植体切口处明显可见一团团有一定生长型式的愈伤组织。

三个发育时期各有其主要特征，但并不专一，有时会交叉混杂发生。

形成期是指外植体经过诱导期和分裂期后形成了无序结构的愈伤组织的时期。

外植体外层细胞发生分裂；

分裂期的愈伤组织的特征：细胞分裂快，结构疏松，缺少组织的结构，颜色浅而透明。



**愈伤组织内部的组织分化：**停止分裂的细胞发生生理生化代谢变化而形成不同形态和功能的细胞。分化期最明显特征：细胞体积不再减小，保持相对不变化。

进入分化期后，细胞的平均大小相对稳定，细胞分裂由原来分裂局限在组织外缘的垂周分裂转为组织内部较深层局部细胞的分裂，并改变分裂面的方向，出现瘤状结构的外表和内部分化，结果形成瘤状或片状的拟分生组织（meristemoid），称做分生组织结节。

成熟的愈伤组织，由薄壁细胞组成，但由于它们在发育上的可塑性，在培养过程中，其内部出现一些特化的细胞和有结构类型的组织（如石细胞、色素细胞、维管组织），尚有分生细胞团或分生结节。

分生组织结节可以成为愈伤组织的生长中心，或者进一步分化为维管组织结节——由分生组织结节外围的细胞作平周分裂成为形成层状细胞，并形成了部分维管组织如管胞、纤维细胞等，但不形成维管系统。由于此期细胞分裂已基本停止，细胞内发生生理代谢等的变化而开始形成一些不同形态和功能的细胞，因此有人又将此期称为分化期。

#### 分化期细胞特点：

- A 细胞分裂部位和方向发生改变：B 形成瘤状或片状的分生组织结节。或维管组织结节。
- C 细胞的体积相对稳定，不再减少。D 出现了各种类型的细胞：如管胞、纤维细胞、薄壁细胞、分生细胞、色素细胞等。
- E 生长旺盛的愈伤组织呈乳白色、白色或浅绿色，老化的多转化为黄色或褐色。

**二、愈伤组织的继代：**愈伤组织诱导并生长一段时期后，必须转移到新鲜培养基上培养，这个过程叫做继代培养（营养、水分的耗失和代谢产物积累的毒害）。

**合适时间：**愈伤生长即将达到顶峰以前，这时处于旺盛分裂时，继代后容易生长，继代间隔一般四周，继代后 3-7 天恢复生长，2-3 周内旺盛生长，达到顶峰后缓慢下来。

**大小：**直径 5-10mm，100mg±，太小难以恢复或生长缓慢。

**方法：**切割成小块转移到新鲜的相同成分培养基上，同时达到繁殖目的，淘汰褐化和坏死的愈伤组织。生长旺盛的愈伤组织一般呈奶黄色或白色、有光泽，也有淡绿色或绿色的；老化的愈伤组织多转变为黄色甚至褐色。

**良好的愈伤组织** ★高度胚性或再分化能力 ★容易松散 ★旺盛的繁殖能力 ★长期继代后不丧失胚性或再分化能力

#### 愈伤组织继代遗传稳定性

以往研究认为继代时间长再生能力减弱甚至丧失，但目前多数研究认为长期继代培养的愈伤组织仍有再生能力。

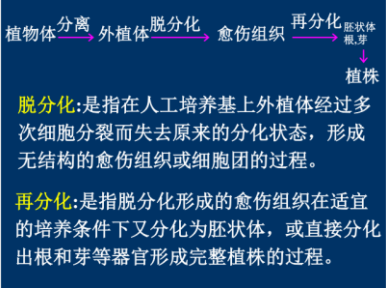
#### 注意

1. 愈伤组织遗传上的不稳定性因基因型、外植体、培养基成分和培养时间而异。
2. 相同基因型的同一种外植体在不同培养基上会产生不同的变异。
3. 培养基成分，特别是外源激素的成分与变异的产生密切相关。
4. 组织培养中涉及到的遗传变异主要是细胞核组成的改变，变异是不可逆的，这种遗传上的改变可以是染色体畸变，细胞核破碎，或者是由于细胞内复制引起的多倍性以及分子水平上的改变等形式。
5. 愈伤组织遗传上的不稳定性因基因型、外植体、培养基成分和培养时间而异。

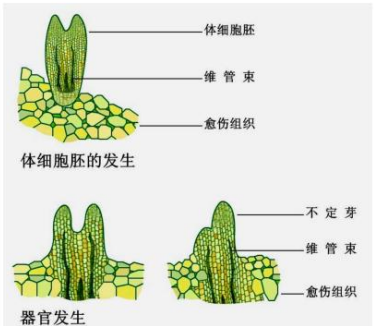
## §2 愈伤组织的形态建成（P83）

**一、愈伤组织的形态建成：**外植体细胞在适宜的培养条件下发生脱分化、再分化，产生芽和根，或者形成胚状体，发育成苗或完整植株。

**再分化(redifferentiation):** 是指脱分化形成的愈伤组织在适宜的培养条件下又分化为胚状体, 或直接分化出根和芽等器官形成完整植株的过程。



体细胞胚发生与器官发生



**愈伤组织的形态发生方式: 器官发生方式、胚状体方式**

**细胞再分化的类型**

**(一) 器官发生:**离体培养的组织、细胞在诱导条件下经分裂和增殖再分化形成根和芽。

**1、发生方式:**

- (1) **直接发生:** (具有初生分生能力的) 外植体直接分化成器官的过程。(由茎尖、腋芽、原球茎、块茎、鳞茎等器官发生)
- (2) **间接发生:** 外植体 (已分化的成熟组织) 经脱分化形成愈伤组织再分化形成器官的过程。

外植体—脱分化—愈伤组织(类分生组织)——器官原基——根、芽

**2、特征** (1) 单极性 (2) 器官的维管与愈伤 (外植体)相通

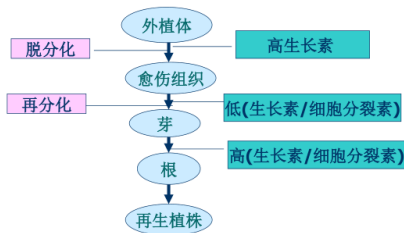
**3、器官发生顺序**

- (1) 先生根后生芽的方式 如颠茄的悬浮培养物, 还有根易分化芽难分化的如棉花、苦瓜及许多木本植物, 组培中最常见的再生器官类型是根的形成, 玉米、油菜、棉花、烟草、蜀葵等的愈伤很易形成根。
- (2) 先生芽后生根的方式 如小麦, 一般形成的芽其基部很易形成根, 而如先形成根, 则往往抑制芽的形成。(多见)
- (3) 在愈伤组织上独立生出芽和根的方式(少见)
- (4) 仅有根和芽的分别再生, 形成无芽的根或无根的苗

**其它器官发生方式:**

用组织培养进行花器官形成的研究, 用烟草的茎切段作培养物时, 可以直接分化形成花芽, 用油菜的花茎切段及花器官培养也可见到形成花芽, 把这种离体形成的花芽中的花药进行培养时, 可得花粉胚状体。在组织培养中, 还有变态器官形成, 如鳞茎、球茎、块茎等。

**不定芽方式 (adventitious bud)**



**(二) 体细胞胚胎发生(somatic embryogenesis):**离体培养的植物体细胞经诱导分化, 形成类似于有性合子胚胎发生的各个阶段而发育形成胚胎状结构, 最后产生新植株的过程。

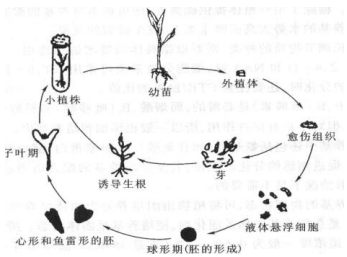
**胚状体 (embryoid):** 指在组织培养中, 由一个非合子细胞(体细胞), 经胚胎发生和胚胎发育过程 (经过原胚、球形胚、心形胚、鱼雷胚和子叶胚 5 个时期), 形成具有双极性的胚状结构。

在正常情况下, 精卵结合形成合子, 进行分裂发育成胚——**胚胎发生**。

组织和细胞离体培养形成在形态、结构和功能上类似有性胚的结构被称为**体细胞胚**。

**胚状体与合子胚的比较:**

	合子胚	胚状体
质量	萌发率高, 质量好	萌发率低, 质量差
来源	受精卵	体细胞
胚柄	有, 明显	即使有也不明显
形态	固定, 体积相对较小	复杂, 常有两个以上的子叶, 体积较大
变异率	低	高



### 1、发生方式：

**直接产生：**指外植体组织中原先就存在的胚性细胞在进入培养之后直接进入体细胞胚胎发生而形成胚状体，这种在培养前就存在的胚性细胞被称为前决定的胚性细胞（pre-embryonic determined Cells, PEDC）

如：下胚轴、子叶、幼花序的表皮细胞中的胚性细胞可直接产生胚状体。柑桔属的珠心组织、石龙芮的茎胚来自表皮细胞、向日葵下胚轴表皮细胞可培养获得胚状体

**间接产生：**通过对外植体中已分化细胞的发育方向的重决定过程诱导出胚性细胞，然后由这些诱导的胚性细胞（IEDC）发育成胚状体。要经历愈伤组织培养的中间阶段，是普遍的胚状体产生方式。如：槐树子叶、陆地棉（Gossypium hirsutum L）下胚轴

**有些植物既可以直接产生又可间接产生**

鸭茅：取决于外植体的部位、叶原基：间接产生、叶尖：直接产生

香雪兰：培养基中激素决定（幼叶）（mg/l） IAA(2)+IBA(3)：直接产生 IAA(2)+IBA(5)：间接产生

### 2、细胞胚性状态的获得、保持和表达

**（1）细胞胚性状态的获得：**胚胎发生的前提是胚性状态的获得。

有性胚胎发生：花芽分生组织是从已丧失胚胎发生能力的营养组织细胞分化而来，在花的发育过程中有些细胞重新获得胚性的趋势变成孢母细胞。

**体细胞胚胎发生：**在离体培养条件下，植物体其它已脱离胚性状态的细胞可重新获得这种状态。

例如：胡萝卜韧皮部细胞在有 2,4-D 时经脱分化产生愈伤组织，有的愈伤细胞可以分化获得胚性状态，在某种程度上象未受精的卵，它们的胚胎发育程序的表达受到 2,4-D 的阻碍，2,4-D 的去除如同受精一样启动胚胎发生。

**（2）细胞胚性状态的保持** 细胞获得胚性状态后就有一定的稳定性

如：胡萝卜的细胞品系在维持 10 年的分裂和继代后仍保持胚胎发生的潜力，只要去除 2,4-D 就可形成胚状体，

有些植物的表皮层细胞虽已分化，但仍保持胚性状态（石龙芮等），在一定条件下直接产生胚状体，但稳定性在不同物种及不同培养体系间差异极大，经反复继代保存以后，发生能力下降、丧失。

**（3）细胞胚性状态的表达**

从形态上看，从愈伤组织向球形胚过渡的标志是细胞的活跃分裂形成一团致密的没有表皮层的细胞团结构，可以明显的与疏松的愈伤组织区分开。在胡萝卜细胞培养中，能够分化成胚状体的细胞中，新壁的形成常与细胞的壁相垂直，使细胞团的生长显得有规律并继之由其表层细胞形成胚状体，它们细胞质浓、核大。

**在外观上，胚状体和不定芽均有光滑、圆形突起的形状。**

**（4）体细胞胚的起源**

胚状体的形成是来自单个的胚性细胞（单细胞起源）还是一团细胞（多细胞起源）是有争议的。

在胡萝卜、甘蔗、芹菜、玉米中跟踪观察认为是单细胞起源的，但在体细胞胚萌发长成的植株中，常能看到嵌合现象，这是支持多细胞起源的证据。

按照 Williams 和 Maheswaran (1986) 的观点，二者不矛盾：取决于胚性细胞被诱导时与它相邻的细胞状态，如果处于不同的生理和发育状态，这个胚性细胞单独发育成胚状体，如果周围细胞具相同的胚性发育趋向，这团细胞共同作用，形成一个球形胚结构，表现为多细胞起源的。

**3、特征：** 胚状体在组织学上具备以下和不定芽不同的三个特征：

- （1）. 最根本的特征是具有两极性，即在发育的早期阶段，从其方向相反的两端分化出茎端和根端，而不定芽或不定根都为单极性。
- （2）. 胚状体的维管组织与外植体的维管组织无解剖结构上的联系，而不定芽或不定根往往总是与愈伤组织的维管组织相联系。
- （3）. 胚状体维管组织的分布是独立的“Y”字形，而不定芽的维管组织无此现象。

**胚状体发生途径与器官发生途径形成植株的区别：**

- ①胚状体具有两极性，即有茎端和根端。
- ②胚状体的维管组织与外植体的维管组织无解剖结构上的联系。
- ③胚状体维管组织的分布是独立的“Y”字形。

**胚状体方式比不定芽方式有更多的优点：**胚状体产生的数量比不定芽多、胚状体可以制成人工种子，便于运输和保存、胚状体的有性后代遗传性更接近母体植株。

### 4、影响胚胎发生的因素

#### A、植物激素与胚胎发生的关系

**（1）生长素：**离体条件下体细胞胚的诱导和发育包括二个步骤

- 1) 增殖培养基（初级培养基）：含有一种生长素（常用 2,4-D 浓度 0.5-1mg/L）外植体形成愈伤组织，同时诱导出胚性细胞（或团），但不能发育成胚，不断继代增殖胚性细胞团的数量。
  - 2) 成胚培养基（次级分化培养基）：不含生长素或含量极低（0.01-0.1 mg/L），它们就发育成成熟的胚状体。
- 2,4-D 等生长素是诱导胚性细胞的必需成分，但它抑制胚性细胞发育分化成胚。

**（2）细胞分裂素**

- 1) 与生长素配合使用，提高诱导率，不同植物配比不同。在许多植物中，生长素和细胞分裂素结合使用提高诱导频率，如柑桔、

花椰菜、葡萄、咖啡、苜蓿、烟草、大蒜、蕃茄等，但不同物种所需的生长素/细胞分裂素配比不同。

2) 不同细胞分裂素的效应不同。(胡萝卜: ZT 好, KT、6BA 抑制)与不同生长素配合, 调节器官发生和胚胎形成。

**(3) 其它激素** ABA、GA3 在胡萝卜和柑桔属中会抑制胚胎发生

## **B、氮源**

(1) 还原 N (即  $\text{NH}_4^+$ ) 在初级培养中刺激胚性愈伤形成 (次级中可有可无)

(2) 和  $\text{NO}_3$  配合, pH 不下降 如:  $\text{KNO}_3$  浓度高, 不含还原 N, 可成胚, 但少

尽管高浓度的氧化态氮同样可以诱导体细胞胚胎发生, 但是其诱导率远远低于还原态氮和氧化态氮配合使用时的诱导率。

适当的  $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$  组合有助于大量成胚

(3) 其它有机氮源有用

刺激体细胞胚胎发生的作用 如酪蛋白 (CH)、谷氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸和椰乳、丝氨酸等。酵母提取液、麦芽、菜豆提取物、西瓜汁、蕃茄汁、丝瓜伤流液等也有促进作用。

## **C、培养基中的其它物质:**

胡萝卜:高浓度的钾 (20mmol/L) 是胚胎发生必需的;

培养基中溶介氧的含量应低于临界值 (1.5mg/L), 否则有利生根而不利成胚, 因低水平氧导致细胞内高水平的 ATP。

在培养基中加入活性炭可提高胚胎发生频率, 它能吸收大量的抑制性代谢产物——酚类物质, 促进细胞活性。

## **D、液体振荡培养使培养组织生长较快, 可控制形态发生过程, 加速再生植株形成, 并决定器官分化方向**

如: 菊苣根切段培养中, 液体的滤纸桥上形成叶芽, 琼脂上形成花芽, 形成花芽的外植体比例随琼脂浓度而增加可能是含氧梯度在调节器官分化中起了作用。

## **E、培养环境条件的影响**

(1) **光照:** 缺乏系统研究, 烟草在光、暗条件下都能正常形成根芽, 但对芽的发育有影响, 秋海棠带表皮的厚角组织培养在诱导成芽时有光有促进作用。

**光质:** 烟草愈伤在白光、兰光下有很多苗分化, 暗培养的芽不发育, 红光和远红光没有促进作用;红光处理矮牵牛可促进芽的形成, 但可为远红光逆转。

## **F、影响胚状体发生和发育的内部因素**

植物的基因型、外植体和愈伤组织的生理状态可以极大地影响离体分化能力和形态发生途径, 是决定是否进入胚胎发生的根本因素, 而各种外部因子包括激素的调节仅仅起一种诱发胚性状态表达的作用。

Thorpe (1980) 提出, 培养组织中分生组织细胞的脱分化程度决定了以后形态发生的方式, 完全的脱分化, 细胞可以发育成胚状体, 部分的脱分化, 它们可能进入器官发生途径, 形成根和芽的原基。

### **(1) 基因型**

1.不同植物间产生胚状体能力不同

矮牵牛、茄子、颠茄等茄科植物易产生胚状体, 而同一科的烟草则难形成, 烟草叶肉原生质体培养中, 二千个不同激素和浓度组合的处理, 只有二个组合产生胚状体。

2.同一物种不同品种间产生胚状体能力不同

如 Bhattacharya 和 Sen (1980) 用 11 个水稻品系的材料培养, 只有 1 个产生胚状体、Haydu 和 Vasil (1981) 用 21 个紫狼尾草材料培养有 19 个产生胚状体、茄子中易于器官发生的品种难于产生胚状体, 甘蔗、桉树和葡萄的杂种材料较易产生胚状体, 这些都是基因型的影响

### **(2) 外植体的来源和年龄**

少数植物如胡萝卜几乎所有器官都可诱导胚状体, 大多数植物只有处在一定发育时期的某些器官可产生胚状体,

如石龙芮的花芽只有在小孢子母细胞减数分裂前培养才能产生胚状体, 桑寄生最适培养时间是园球胚 (幼胚) 而澳洲火树的成熟胚也可产生胚状体; 常春藤只有成熟的茎才能产生胚状体, 幼茎只能产生芽; 大黍中发育完全未展开的幼叶可产生胚状体, 而未分化幼叶及已伸展的叶片则不行。营养器官中许多植物的下胚轴较易诱导胚状体, 有的植物的子叶、幼叶、叶柄、叶鞘和成熟叶片、嫩茎可产生胚状体,

许多植物的胚状体在发育过程中很容易再度产生新的胚状体。

如石龙芮、芹菜、人参、葡萄、苜蓿、桉树、甘蔗等都可由形成的胚状体及其长成的幼苗上产生大量次级和三级胚状体, 产生多个小植株。

### **(3) 培养时间和细胞倍性变化的影响**

短期培养的幼嫩愈伤最容易产生胚状体, 随培养时间延长、能力下降以至丧失,

如胡萝卜诱导后在基本培养基上 4-6 周开始形成胚状体, 16-20 周达高峰, 以后下降, 到 36 周停止, 如果 52 周时转移到诱导培养基成胚能力可恢复, 若延迟到 100 周才转移就不能恢复。柑桔的愈伤组织定期在有激素的培养其中重新诱导和继代培养, 成胚能力可保持 6 年。有些外植体或愈伤组织必须经过一段时间的培养才能诱导得胚状体, 如咖啡培养 70 天, 人参通过 6 个月, 檀香经过 5 次继代培养才能诱导出胚状体。

染色体数目的变化或倍性变化并不一定影响形态发生或胚状体发生的能力, 如从培养 20 年的烟草组织中得到非整倍体植株, 从单倍体油菜植株培养得到胚状体。

### **(4) 内源激素水平的变化**

培养细胞的内源激素水平对胚状体发生有更直接的影响,

对离体条件下体细胞胚胎发生, 一个最低限度的内源或外源生长素是必不可少的。

对甜橙驯化愈伤组织的研究中发现, 甜橙的珠心愈伤组织需要 IAA 和 KT 才能发生胚胎分化, 经过反复继代培养, 愈伤的成胚潜力逐渐下降, 大约 2 年以后, 其后代愈伤组织已具备自生激素的能力, 当培养基中有低于 0.001mg/L 的 IAA 也会抑制胚胎发生。



任何有碍细胞合成生长素的处理（如使用生长素合成抑制剂 2-羟基-5-硝基-苯酰溴或 7-氮-吲哚，或辐射分解生长素）都能显著改善胚胎分化情况，表明甜橙继代培养的愈伤组织成胚潜力的下降，是由于内源生长素水平太高，超过临界值所致。

综上所述，在分析和估量各种内外因子的作用时，应考虑到这些因子是通过某种相互影响和作用的方式对体细胞胚胎发生过程实现调节和控制的，而不是单独作用的。（内源生长素水平提高与胚性潜力丧失关系密切）

## 第 4 章 植物的器官培养

**植物的器官培养:**指植物某一器官的全部或部分或器官原基的离体培养(包括根、茎、叶、花、果实、种子等)，再生完整植株的技术 **目的:**研究器官的功能、分化、形态建成；快速繁殖；获得脱毒苗；种质保藏等

### §1 植物茎尖培养

#### 一、茎尖培养

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 0.1mm 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。

#### 二、茎尖培养的作用

##### 1.脱毒:

由于病毒的危害，严重影响了植物产品的质量和产量，日本数十年前由于草莓病毒病的猖獗，使品质退化,产量下降，几乎遭到灭顶之灾，我国的马铃薯因病毒病影响，使块茎变小，产量下降，北方高寒地区亩产 8000-1 万斤，低产田仅 1000-2000 斤，植物病毒种类超过 5 百多种，受害严重的有水稻、甘薯、马铃薯、油菜、大蒜、生姜、百合及康乃馨、菊花、兰花、郁金香等花卉。

**繁殖、基础理论研究。**

#### 三、茎尖培养步骤:

**1. 取材:**挑选杂菌污染少，生长不久的茎尖。木本植物可在取材前对茎尖喷几次灭菌药剂。以保证材料不带或少带菌。用于普通茎尖培养，可先从植物的茎、藤或匍匐枝上切取 2cm 以上的顶梢。

##### 2. 消毒

将采到的茎尖切成 0.5~1.0cm 长，并将大叶除去，休眠芽预先剥除鳞片。将茎尖置于流水冲洗 2~4 小时，再在 95%的酒精中处理 30 秒，然后在稀释 20 倍的次氯酸钠中浸 5~8 分钟，最后用无菌水冲洗数次。

##### 3. 接种

为了减少污染，可在接种前再剥掉一些叶片，使茎尖为 0.5cm 左右大小。这样取茎尖大小只能作为快速繁殖。

有些植物的茎尖由于多酚氧化酶的氧化作用而变褐。所以在接种时，不能用生锈的解剖刀，动作要敏捷，随切随接，减少伤口在空气中暴露的时间，也可配制 1~5%VC 液，将切下的茎尖材料浸入处理一下。

##### 4. 培养

培养的方法和程序

(1) 培养基:多数茎尖培养采用 MS 作为基本培养基或略加修改，或补加其它物质。常用的其它培养基有 White, Heller 等。培养基中生长素是必须的，如 2,4-D, IAA,NAA 等，它们能有效地促进芽的生长发育，但是浓度不能太高，一般用 0.1mg/L 左右，高于此浓度，往往产生畸变芽或形成愈伤组织。但要注意不同植物对生长素的反应不同。

##### (2) 培养方法:

①固体培养法:试管培养

②纸桥培养法

含义:用酒杯状的滤纸代替琼脂，使杯底朝上塞入试管中，与液体培养基接触，将离体茎尖置于滤纸上方进行培养。

优点:培养基是液体，营养物质能通过滤纸均衡而持久地供给外植体，有利于外植体的健康成长；

缺点:操作工艺复杂。

##### (3) 培养条件

接种到培养基上的茎尖，置于培养室中培养，每天照光 16 小时，照度 1500~3000lx 即可，温度通常在 25±2℃。并且应根据不同植物种类，或者随培养过程的不同，给予适当的昼夜温差等处理。由于生长点培养时间较长，琼脂培养基易于干燥，这可以通过定期转移和包口封严等加以解决。一般茎尖培养在 40 天左右可长成新梢，进行继代培养。

##### (4) 继代培养

茎尖长成的新梢，可切成若干小段，转入到增殖培养基中。

一个月左右，新梢又可切成小段，再转入新培养基，这样一代一代继续下去，便建立和维持了茎尖无性系。继代培养可用 MS 培养基。有时也可边进行继代培养边进行诱导生根。取比较长的小梢（如 1cm 以上）转入生根培养基，余下较短的小梢进行继代培养。

**茎尖在培养过程中会出现生长太慢、生长太快和生长正常等三种类型。**

**1.生长太慢:**接种后茎尖不增大，只是茎尖逐渐变绿，出现绿色小点，细胞逐渐老化而进入休眠状态，或者逐渐变褐死亡。

引起原因:生长素浓度太低，或是温度过低或过高

**2.生长太快型:**接种后茎尖迅速增大，在茎尖基部产生愈伤组织，并迅速增殖，而茎尖不伸长，久之茎尖也形成愈伤组织，从而丧失发育成苗的能力。引起原因:一是生长素浓度过高，引起细胞疯狂分裂而导致愈伤组织的形成。二是光照太弱或温度太高。

**3.生长正常型:**接种后茎尖基部稍增大并形成少量愈伤组织，茎尖颜色逐渐变绿，并逐渐伸长，叶原基发育成可见的小叶，进而形成小苗。



### （5）诱导生根

诱导生根多采用 1/2 MS 培养基，并加入一定的生长素类调节物质，如 NAA、IBA 等。也可将切下的新梢基部浸入 50 或 100ppm 的 IBA 溶液处理 4~8 小时，然后转移到无激素的生根培养基中。注意 较高浓度的生长素对生根有抑制作用。如果新梢周龄较大、木质化程度较高，则用 IBA 处理的时间应适当延长或其浓度提高。

**（6）移栽入土** 在生根培养一个月左右，多数新梢即可获得生长健壮而发达的根系。移植时可根据生根情况进行。若发现新梢基部生有较浓密的不定根，长度在 1cm 以内，就可移栽入土。

移栽时通过几天的炼苗过程——从试管中取出小植株，轻轻洗掉培养基，栽入塑料营养钵或育苗盘中，营养钵盛有经烧烤或高压灭菌的培养土（1 份腐殖土：1 份沙）中。

#### 栽后给予较高的空气湿度条件

首先营养钵的培养土要浇透水，所放置的床面也要浇湿，然后搭小拱棚，以减少水分的蒸腾，并且初期要常喷雾处理，保持拱棚薄膜上有水珠出现。当发现小苗有生长趋势，可逐渐减少湿度将拱棚两端打开通风，并且减少喷水次数。使小苗适应湿度较小的条件。以后揭去拱棚的薄膜，并给予水分控制，少浇水或不浇水，促进小苗长得粗壮。

温度管理上要掌握适宜的生根温度，**最适宜的温度是 16~20℃**。

**光照管理**上初期可用较弱的光照，在小拱棚上加盖遮阳网或报纸等，以防阳光灼伤小苗和增加蒸腾作用，后期可直接利用自然光照。

为了提高驯化效率，可用育苗盘进行驯化生根、孔径选择 2cm 左右即可。孔穴装入蛭石：珍珠岩：草炭土为 1:1:0.5 的基质。当小苗长至 5cm 高左右再移入塑料营养钵中。

## S2 茎段培养(P101)

**植物茎段培养**是指对植物的带有定芽或不定芽的外植体进行离体培养，再生完整植株的过程。

目的:快繁、探讨茎细胞的生理、育种上的筛选突变体

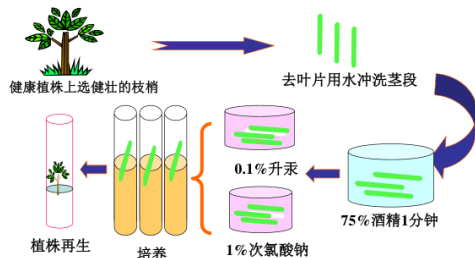
用于快速繁殖的优点：培养技术简单易行，繁殖速度较快；芽生芽方式增殖的苗木质量好，且无病，性状均一。

(茎尖取材有限，可采用带节或不带节的茎段进行培养)

**定芽**：芽在茎上生长有一定的位置。定芽又分：顶芽：生于茎枝顶端的芽称顶芽。腋芽：生于叶腋的芽称腋芽或侧芽。

**不定芽**：芽的生长无一定位置，不是从叶腋或枝顶发出，而是生在茎的节间、根、叶及其他部位上的芽，称不定芽。

### 图示茎段培养过程



### 一．材料的选择和处理

**取材**:生长健壮无病虫的幼嫩枝条或鳞茎盘，若是木本，取当年生嫩枝或一年生枝条,剪去叶片，剪成 3~4cm 的小段。

**处理**:在自来水中冲洗 1~3 小时，于无菌条件下用 75%酒精灭菌 30~60 秒，再用 0.1%升汞浸泡 3~8 分钟，或用饱和漂白粉浸泡 10~20 分钟，因材料老嫩和蜡质多少而定时间。最后用无菌水冲洗数次，以备接种。

#### • 取材时注意

- 1、茎的基部比顶部切段，侧芽比顶芽的成活率低，所以应优先利用顶部的外植体，茎上部的腋芽培养效果较好。
- 2、尽量在生长早期取材，在休眠期取外植体，成活率降低。如苹果在 3~6 月取材的成活率为 60%，7~11 月下降到 10%，12~2 月都在 10%以下。

### 二．培养

最常用的基本培养基为 MS 培养基，加入 3%蔗糖，用 0.7%的琼脂固化。

• 培养条件保持 25℃左右，给予充分的光照和光期。

• 经培养后茎段的切口特别是基部切口上会长出愈伤组织，呈现稍许增大，而芽开始长长，有时会出现丛生芽，从而得到无菌苗。

在茎段培养中，促进腋芽增殖用 6-BA 是最为有效的，依次为 Kt 和 Zt 等。生长素虽不能促进腋芽增殖，但可改善苗的生长。GA 对芽伸长有促进作用。

**继代扩繁是茎段培养的主要一步。**这可由二种途径解决:

• 一是促进腋芽的快速生长。不会产生变异，能保持品种优良特性。且方法简便，可在各种植物上使用。

• 二是诱导形成大量不定芽。会产生变异。继代增殖过程所用培养基和生长调节剂与初代培养相同。

• 将获得的材料转入增殖分化培养基中继代培养长成侧芽或不定芽（或胚状体）（一般 1 个月左右）。

• 试管苗的生根，对基本培养基的种类要求不严，如 MS、B5、White 等培养基，都可用于诱导生根，但是其含盐浓度要适当加以稀释。

• 生根培养的目的是使再生的大量试管苗形成根系，获得完整的植株。创造适于根的发生和生长的条件，主要是降低或除去细胞分裂素而加入生长素。由于在苗增殖时施用了较高浓度的细胞分裂素，其苗中保持着一定的量，因此在生根培养中不需要加细胞

分裂素。生长素的浓度，NAA 一般 0.1~1.0mg/L，IBA 和 IAA 可稍高

- **转入生根培养基中培养**，1 个月左右生根，发育成完整植株。
- 生根培养时**增强光照**有利于发根，且对成功地移栽到钵钵中有良好作用。故在生根培养时应增加光照时间和光照强度，但强光直接照射根部，会抑制根的生长，所以在生根培养时最好在培养基中加 0.3%活性炭，以促进生根。

### 三．移植

试管苗是在恒温、保湿、营养丰富、激素适当和无菌条件下生长的。植物的组织发育程度不佳，植株幼嫩，表皮角质层变薄，抵抗力减小减弱。移植是一个由异养转变为自养的过程。因此，在驯化时要进行炼苗。然后洗净琼脂，小心移栽，初期湿度要大，基质通气湿润，保湿保温，更要精心管理等。

## §3 离体叶培养(P104)

- **离体叶培养**包括叶原基、叶柄、叶鞘、叶片、子叶在内的叶组织的无菌培养。
- 叶是植物进行光合作用的自养器官，又是某些植物的繁殖器官，因此叶培养不仅可用于研究形态建成、光合作用、叶绿素形成等理论问题，而且也是繁殖稀有名贵品种的有效手段。在自然界，很多植物的叶具有强大的再生能力，能从叶片产生不定芽的植物，以羊齿植物最多，双子叶植物次之，单子叶植物最少。
- **再生成植株的方式有二种**：一种是直接诱导形成芽，另一种是先诱导形成愈伤组织，再经愈伤组织分化成植株。
- **培养过程主要包括**：愈伤组织诱导、芽分化、无菌苗增殖及生根等

### 一．材料选择及灭菌

取植物的**幼嫩叶片**冲洗干净，用 70%酒精漂洗约 10 秒，再在饱和漂白粉液中浸 3~15 分钟，或在 0.1%升汞中浸 3~5 分钟，用无菌水冲洗数次，再放在无菌的干滤纸上吸干水分，以供接种用。对一些粗糙或带茸毛的叶片要延长灭菌时间。

**二．接种** 把灭过菌的叶组织切成约 0.5cm 见方小块或薄片，接种在 MS 或其它培养基上（有时须用 1/2-1/5 MS）。

### 三．培养

**愈伤诱导**：培养基中附加 2,4-D 1-3.0mg/L+KT 1.0-2.0mg/L 叶接种后培养条件为每天 10~12 小时光照，光强 1500~3000Lx。培养约 2 周至 4 周，叶切块开始增厚肿大，进而形成愈伤组织。

**愈伤分化**：应转移到再分化培养基上进行分化培养。分化培养基的细胞分裂素含量为 2mg/L 左右，约 10 天左右，愈伤组织开始转绿出现绿色芽点，它将发育成无根苗。若再将苗移至含 NAA0.5~1mg/L 的生根培养基可诱导成根，从而发育形成完整植株。

【林惠端等 凤梨

冠芽基部叶切段，培养于含 2,4-D 2.0+KT 1.0 或 2,4-D 4.0+KT 2.0 的 MS 培养基中可诱导愈伤组织。愈伤组织转移到 1/2 MS(铁盐为 2 倍)+NAA 1.0+活性炭 0.5%+蔗糖 2%，可分化出根系发达的绿苗。将大苗移植，而带少量愈伤组织的小苗用于继代增殖，每 40~45d 继代一次，以 25~30 倍的几何级数增殖。】

【**长寿花**：幼嫩叶片 在 MS+2,4-D 2mg/L+6-BA0.2mg/L 的培养基中培养，有利于愈伤组织的形成  
MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.1mg/L 的培养基中培养利于愈伤组织的分化和芽的增殖  
1/2MS+IBA0.2mg/L 培养基利于生根。】

• **叶的培养比胚、茎尖和茎段培养难度大。**

首先要选用易培养成功的叶组织，如幼叶比成熟叶易培养，子叶比叶片易培养。其次要添加适当的生长素和细胞分裂素，保证利于叶组织的脱分化和再分化。叶片不同部位培养效果不同

## §4 根的培养(P99)

### 一、普通根培养

#### (一) 特点:

- 1、根系生长快，代谢强，变异小，加上无菌，不受微生物的干扰，并能根据研究需要，改变培养基的成分来研究其营养吸收、生长和代谢的变化。
- 2、根细胞可再生植株，不仅证明根细胞的全能性，而且也能产生无性繁殖系，用于生产实践。

#### (二) 根培养的意义:

1)研究器官的功能、形态建成；2)是进行根系生理代谢研究的最优良试验体系 3)快速繁殖(建立快速生长的根无性系，对药物生产有重要意义)4)获得脱毒苗 5)对根细胞培养物进行诱变处理，可筛选突变体，用于育种实践。

#### (三) 培养方法

植物根段培养：是指以植物的根切段为外植体进行离体培养，再生完整植株的过程。

培养过程包括愈伤组织诱导、不定芽分化、无菌苗的增殖与生根等。

**根无性繁殖系的建立：**

- 1、种子进行表面消毒，在无菌条件下萌发，
- 2、待根伸长后从根尖一端切取长 1.2 厘米的根尖，接种于培养基中。这些根的培养物生长甚快，几天后发育出侧根。
- 3、待侧根生长约 1 周后，即切取侧根的根尖进行扩大培养，它们又迅速生长并长出侧根，又可切下进行培养，如此反复，就可得到从单个根尖衍生而来的离体根的无性系。这种根可用来进行根系生理生化和代谢方面的实验研究。培养条件为暗光和 25-27℃。

**培养基** 多为无机离子浓度低的 White 培养基，其他培养基如 MS，B5 等也可采用，但必须将其浓度稀释到 2/3 或 1/2。

#### (四) 影响离体根生长的因素

- 1、基因型 不同植物的根对培养的反应不同，番茄、烟草、马铃薯、小麦可快速生长，继代培养无限生长。萝卜、豌豆需长时间且有限。木本植物很难生长。

- 2、营养条件 硝酸盐是最好氮源，蔗糖是最好碳源，铁、锰、硼、硫、维生素不能缺少。
- 3、激素 生长素对不同植物反应不同 4、pH 5、光照和温度 25-27℃

胡萝卜根：

• White培养基+0.01mg/l 2,4-D+0.15mg/l KT

——→ 愈伤组织 低浓度生长素培养基 根、芽

### 毛百合根为材料

• 在 MS+NAA0.5~1.0 毫克/升的培养基上，形成肿胀的粗根，将其切成小段，转到 MS+BA2+NAA0.2 的培养基上培养，便能分化出苗。

### 珙桐

WPM 培养基+ •30 mg / L CH 与 0 . 5 mg / LNAA 组合，愈伤组织生长率可高达 98%

•30 mg / L CH 与 0 . 75 mg / L NAA 组合，有芽点发生

•30 mg / L CH 与 1 mg / L NAA 组合，有不定根发生。

### 二、毛状根培养

发根培养，利用发根农杆菌 (Agrobacterium rhizogenes) 感染植物的外植体使其产生毛状根，并对所产生的毛状根进行无菌培养的技术。

形态方面：Ri 质粒诱导快速生长的、非定向性、高分支的毛状根的形成

代谢方面：Ri 质粒转化根能合成与原植物相同或相似的次生代谢物，并且发根合成次生代谢物具有遗传稳定性。

### 毛状根培养物的特点

生长迅速、分支多、生理生化特征稳定、具有较稳定的次生代谢产物合成能力

#### 1、生物反应器

生物反应器技术是植物组织或器官培养生产次生代谢产物走向工业化和产业化的关键

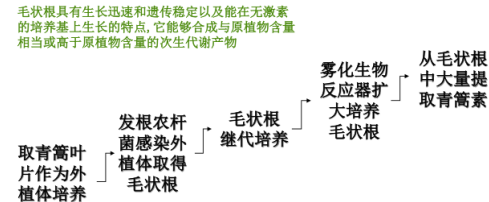
例：利用生物反应器培养植物毛状根生产青蒿素。青蒿素是中国学者在 20 世纪 70 年代初从青蒿中分离得到的抗疟疾有效单体，它是一种含有过氧桥结构的倍半萜内酯化合物，是目前世界上最有效的治疗脑型疟疾和抗氯喹恶性疟疾的药物，被 WHO 称为“治疗疟疾的最大希望”。

以生产青蒿素为例 想要获得青蒿素

方法一：植物组织培养 对从青蒿叶片诱导获得的毛状根进行培养以获得大量毛状根，从中提取青蒿素。

方法二：植物细胞培养取青蒿的愈伤组织进行培养，获得大量细胞群，再从细胞中提取青蒿素。

### 植物组织培养过程



### 植物组织培养用于植物生长次生代谢产物的优点

接种操作简易、混合充分、剪切力伤害小、营养供给充分、得到高度分化的组织器官产生代谢产物、提取产物较易常年保证供应

#### 优点分析

##### 1.剪切力伤害小

**雾化生物反应器培养：**雾化时，由超声产生的能量使培养物形成细小雾滴。沿设备均匀分布于反应器内，对培养物无损伤。避免了毛状根对剪切力敏感这一问题。

##### 2.营养供给充分

**雾化生物反应器培养：**雾化反应器可以保证反应器内充足的养料和对氧气的需要，加速毛状根的生长，产生大量根毛和分支。

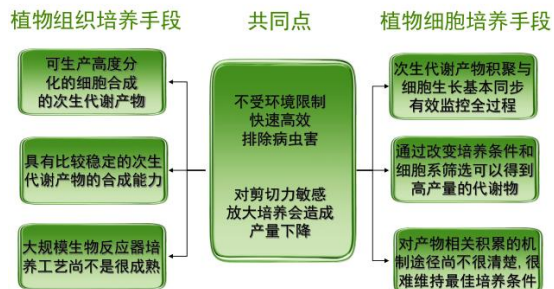
##### 3.混合充分

**流化床生物反应器培养：**接种的毛状根，由于筛网的隔离作用，有的附着在筛网上，有的在层间随气流混合而运动。混合和供氧充分，毛状根在各层的生长速度较一致。

### 缺点



### 两种技术手段优缺点对比



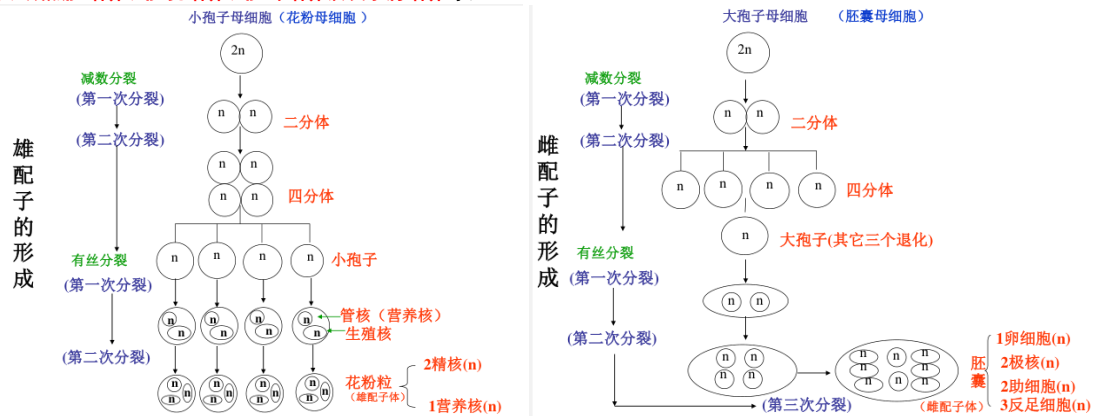
2、用发根体系鉴定植物对线虫的抗性 已成功应用在甜菜、大豆、西红柿和马铃薯、甘薯等植物上

## S5 植物的胚胎培养(P112)

### 一、植物的胚胎培养概念:

正常有性生殖过程中, 精卵结合为合子, 合子细胞经过多次分裂产生胚, 胚的发育经过球形胚→心形胚→鱼雷形胚→子叶形胚等阶段, 最后长成完整的植物, 成熟胚具有胚芽, 胚根、胚轴和子叶。

**植物胚胎培养**就是采用人工的方法将胚从种子中分离出来, 放在人工合成的培养基上培养, 使它发育成正常的植株。包括**幼胚培养**、**成熟胚培养**、**胚乳培养**、**胚珠培养**以及**子房培养**等。



### 植物的授粉与受精

1、**授粉**: 指成熟的花粉粒落到雌蕊柱头上的过程。(P27)

2、**受精**: 雌雄配子融合为一个合子称为受精。(P27)

3、**双受精**: 对于被子植物而言, 花粉粒落在柱头上、发芽, 形成花粉管, 进入胚中。

一个精核与卵细胞结合为合子, 将来发育为胚 ( $2n$ ); 一个精核与两个极核结合发育为胚乳( $3n$ ) 的过程。(P27)

### 二、胚胎培养的作用

(1) **克服远缘杂交后代杂种胚的不育**: 由于双亲不亲和得不到有活力的种子, 原因: ① 杂种胚乳发育异常而提前败育, 幼胚得不到营养而中途死亡, 如陆地棉×中棉的种间杂种, 如从授粉 30 天的朔果中取出幼胚离体培养, 可得到杂种植株; ② 胚和胚乳的不协调或胚乳对胚有毒害作用, 如大麦×黑麦, 通过离体胚培养可获杂种后代。

(2) **可使一些胚发育不完全的植物得到正常植株**: 兰花、天麻等植物授粉后胚发育慢或不完全。用幼胚培养能使胚正常发育成幼苗。

(3) **打破种子的休眠作用**: 种子休眠原因主要是胚乳或种皮中存在对胚生长有抑制作用, 离体胚胎培养可解除它们对胚的抑制作用, 提早萌发, 如鸢尾属植物种子休眠数月到数年才能发芽, 离体胚培养 2-3 月可长成幼苗, 使种子至开花的周期缩短到一年内。

(4) **克服核果类植物胚的后熟作用**, 缩短新品种的培育时间核果类植物早熟育种中, 果实越早熟, 胚发育越不好, 种子无生活力, 北京市农科所与植物所培育早熟桃品种京早 3 号中, 将杂交得到的桃放在  $2-5^{\circ}\text{C}$  下 60 天, 取出种子胚人工培养, 接种后 5-7 天萌发, 经 20-30 天形成 4-6cm 的幼苗, 1966 年第一次结果, 1972 年进入盛果期, 6/中、下旬成熟, 提早 20 天进入市场。

(5) **获单倍体植株**: 小麦×球茎大麦, 染色体排除,  $F_1$  胚培养, 得单倍体。

(6) **为基因工程提供具再生能力的细胞或愈伤**

(7) **研究胚乳对胚生长分化的影响**, 胚胎发生过程, 胚胎发育过程中营养条件, 激素等作用的理论问题。

### 三、离体胚培养技术

可分为两类: 幼胚和成熟胚培养, 成熟胚可在简单培养基上即能生长, 而未分化的幼胚完全是异养的, 要求的培养基复杂, 除基本培养基外还要加入微量元素及生长调节物质, 操作技术上更精细。

#### (1) 培养基

**A、基本培养基**: 常用的有 Tnkey(1934)、Randolph 和 Cox(1943)、Rijven(1952)、Rappaport(1954)、Rangaswamy(1961)、Norstog(1963)及 White 等, 前二种不含微量元素, 适用于成熟胚培养, 后四种适用于幼胚培养, 某些植物中, White 和 Ms 效果也很好。

**B、激素和其它生长物质** (维生素、氨基酸、酰胺类、天然有机物等) 幼胚培养时, 激素和生长辅助剂是必须的。芥菜和曼陀罗的幼胚培养中, 小于 1ppm 的 IAA 和 NAA, 对胚的生长有促进作用浓度超过 1ppm 则可使胚长出愈伤组织。

芥菜幼胚在 IAA (0.1ppm) +KT (0.001ppm) +腺嘌呤 (0.001ppm) 的培养基上可极大地促进胚的生长和分化, 但只单一地加其中任何一种则不行。赤霉素对芥菜心形胚的生长没有影响, 而对较大的鱼雷胚生长有促进作用。

向日葵幼胚,

低浓度 IAA (0.05-0.1ppm) 促进幼胚生长,

1ppm 时有 1/4 胚长愈伤组织,

5ppm 时约有 2/3 胚长愈伤组织,



10 ppm 时 100%长愈伤组织。

**C、培养基的 PH 值：**一般在 5.2-6.3 左右，不同植物不同，荠菜 5.4-7.5，大麦 4.9，蕃茄 6.5，水稻 5.8，曼陀罗 5.0-8.1

**D、蔗糖：**1、碳源；2、能源；3、渗透压调节剂，处于发育早期的幼胚，应提高蔗糖浓度，随胚的发育降低浓度，如浓度过高，则抑制生长。

如曼陀罗 幼胚小于 0.3mm 时蔗糖浓度 8%，胚越大浓度降低。如以 NaCl (0.2-0.4%)、甘露醇 (1.125-5.5%) 代替一部分蔗糖也同样影响胚胎生长。

### (2) 材料的表面消毒

将成熟或未成熟的种子，放在 70%酒精中浸泡数秒钟后，再用饱和漂白粉液或 0.1%升汞液消毒 5-15 分钟，无菌水冲洗 3-5 次，可用无菌操作技术剖开种子取出胚，接种于培养基上。由于幼胚太小，分离较为困难，不易培养成功，可采用胚珠培养到子叶原基开始形成时，再剥出幼胚继续培养成苗，提高成活率。

### (3) 培养条件

A、温度：一般用 25℃培养，但不同植物有不同。

B、光照：一般在弱光和黑暗中都能生长，接种后以黑暗培养更为合适，胚胎萌发时则需增强光照和照光时间，棉花胚的培养中发现增加光照可加速叶绿体的发育、刺激脂肪的合成，荠菜每天光照 12hr 比黑暗培养好，玉米胚前期黑暗，幼胚长出胚根后转到光照下培养，以 12hr 交替为好（对胚芽），对根有抑制，光强 2000lex。

C、相对湿度一般 75-85%之间

**四、植物胚乳培养** 指处于细胞期的胚乳组织的离体培养。

### 胚乳培养的作用

#### (一) 获得三倍体植株或单倍体植株.

被子植物的胚乳是双受精的产物，所以胚乳细胞是三倍性的，由此可培养出三倍体植株。已有近 40 种植物通过胚乳培养获得胚状体或愈伤，12 种植物获胚乳植株，枸杞和猕猴桃的试管苗已移栽大田，开花结实，并确认了胚乳细胞的全能性，将成为育种的一条新途径。

裸子植物胚乳(雌配子体)细胞是单倍性的，由此可培养出单倍体植株。如获成功，将为裸子植物单倍体育种提供一条新途径。

**(二) 胚乳植株大多数表现染色体倍性混乱**，可进一步探讨研究倍性混乱的原因和机理，对植物形态发生，细胞遗传、遗传育种起推动作用，产生不同类型的非整倍体和多倍体。

### 被子植物胚乳培养的染色体倍性变化

变异广泛 玉米可高达 210 条染色体 枸杞：三倍体 75.3% 其它：26.7%

**(三) 研究胚和胚乳的相关关系**，阐明在自然条件下的相互作用，对胚胎学研究起积极作用。

## 二、胚乳培养技术

### (一) 胚乳发育时期

未成熟胚乳：研究实践证明，植物种类不同，要求培养的胚乳发育时期不同，

百合、苹果、柚、黄瓜、黑麦草、大麦、黑麦、小黑麦、水稻、玉米、猕猴桃、早期胚乳（游离核时期）对培养没有反应，授粉后 7-14 天以内（禾本科更为明显）适宜培养，超过一定时期（小黑麦授粉后 21 天）就不能诱导产生愈伤。

成熟胚乳培养：蓖麻、巴豆、麻疯树、变叶木、荷叶芹等都是成熟胚乳培养获得成功，寄生的被子植物如檀香科，桑寄生科成熟胚乳培养获得成功。

### (二)胚在胚乳培养中的作用

对于胚的作用有几种不同看法：

1、博杰韦恩在巴豆和罗氏核实木的培养中必须有胚存在，需要胚生长过程中的代谢产物（胚因素）提供胚乳愈伤或胚状体形成的营养，并发现赤霉素可部分取代胚因素作用（胚乳在 2ppm 赤霉素中浸泡两小时后培养）。

2、小麦、水稻、苹果、大麦、马铃薯、猕猴桃、小黑麦的 IME 去掉胚不添加赤霉素也获得愈伤，除小麦外都获胚乳植株，说明不一定要胚的存在。

3、有胚存在可明显提高枸杞愈伤频率，带胚接种的愈伤频率高于不带胚的，可见胚有一定的促进作用。

### (三) 培养基：Ms, White

**1、激素及生长调节物质：**影响愈伤组织产生及器官分化。不同植物胚乳外植体的培养，要求不同的外源激素参加，并且生长素和细胞分裂素之间有一个恰当的比例。

**A. 愈伤形成因物种而易：**

### B、不定芽与胚状体的形成

少数直接形成不定芽、多数由愈伤分化不定芽或胚状体

需要激素，并要合适的比例。

枸杞：0.1mg/l NAA+0.5mg/l 的 BA 愈伤分化芽达 85.7%、罗氏核实木：2mg/l IAA+5mg/l KT+1000mg/l CH……80%

水稻愈伤：1.8mg/l IAA+0.4%酵母提取物 继代二次获芽

小黑麦：0.5mg/l IAA+1mg/l KT 分化芽、猕猴桃 MS+3mg/l ZT+0.2mg/lNAA+500mg/lCH 分化芽

MS+3mg/l ZT+0.5mg/l2,4-D+500mg/lCH 分化胚状体

2、蔗糖浓度：使用浓度 2-8%之间，蓖麻 2-4%，小黑麦 8%，枸杞 5%。在玉米胚乳培养中、蔗糖最好、其次是果糖和葡萄糖。

3、pH：不同植物不同，一般在 4.5-6.3 之间 玉米 6.1-7，蓖麻 5.0，小黑麦，罗氏核实木 5.6，枸杞和猕猴桃 5.8。

**(四) 培养条件** 光照：不同植物不同、玉米要暗培养、蓖麻 1500lex，连续光照、黑麦草对光照没有明显反应、

咖啡：12hr 光和 12hr 暗交替最好



一般植物 10-12hr/天光照，14-12hr/天暗培养

温度：一般在 24-28℃间，以 25℃为最适。

### 三、胚乳外植体的分化和形态建成

#### （一）愈伤组织的诱导

胚乳培养形成愈伤组织是一个较普遍现象，已研究的四十种植物中大部分都有一个愈伤的诱导与形成过程，在适宜的培养条件下，IME 和 ME 都可产生愈伤，但各有一个最适于诱导的时期，如百合是授粉后 9-10 天，玉米 8-11 天，黄瓜 7-10 天，苹果 30 天，猕猴桃 80 天。

#### （二）不定芽与胚状体的形成：

- （1）由胚乳直接分化芽：柏形外果和桑寄生科（白花寄生、怒江钝果寄生、楔叶钝果寄生）
- （2）绝大多数经愈伤组织再分化出胚状体或芽，进而形成植株：经胚状体的：巴豆、黑麦草、荷叶芹、柚、桃、檀香、猕猴桃等。 将获得的材料转入增殖分化培养基中继代培养长成侧芽或不定芽（胚状体）（一般 1 个月左右）。

## §5 生殖器官培养

### 一、花器官培养

花器官培养指整个花器及其组成部分如花托、花瓣、花丝、花柄、子房、花药等的无菌培养。（花药培养专门叙述）

花器官培养无论在理论研究和生产应用上都有重要价值

- 通过离体花芽培养可了解整体植物和内源激素在花芽性别决定中所起的作用。
- 可以了解花器各部分对果实和种子发育的作用，以及内、外源激素在果实、种子发育过程中的调控作用。
- 生产上可用于珍贵品种的扩大繁殖

#### • 培养方法：

1. 取材 从健壮植株上取未开放的花蕾(已经开花的不宜用，因为消毒困难)。先用 75%酒精消毒约 30 秒钟，再用饱和漂白粉浸 10~15 分钟，取出用无菌水冲洗数次。

#### 2. 接种培养

用整个花蕾培养时，只要把花梗插入培养基中。用花器的某个部分，则分别取下，切成小片，放入培养基中。常用的培养基有 MS、B5 等。

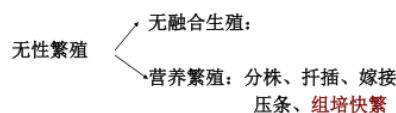
若要把花器官部分培育成小植株，要加入生长素和细胞分裂素，诱导形成愈伤组织或胚状体，再分化培养成植株。

如菊花的花瓣片接在含 6-BA 2mg/L、NAA 0.2 的 MS 培养基上，在 26℃1500Lx 光照，每天光照 10 小时，培养约 2 周，形成少量愈伤组织。再经 1 个月就分化出绿色芽点，再切割转接，可形成大量无根苗，经生根成植株，用于繁殖。

## 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。

**无性系 (clone)：**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

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：30M2 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，

(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。

```

graph LR
    A[外植体选择] --> B[试管苗]
    B --> C[茎芽增殖]
    C --> D[生根]
    D --> E[炼苗和移栽]
  
```

### (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)

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。

(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、非洲紫罗兰，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。

(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）、顶芽及上部芽比例芽及基部芽成功率高，木本植物中幼态较成年树易培养。

### 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。

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。

(4)、蔗糖：2-3% 琼脂 0.5%-0.8%左右。

### (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。

- 1) 取材基因型: 应具备良好的遗传性状  
难→易
- 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、  
带芽、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:  $1/2MS + NAA 0.1$  (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℃, 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 (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:** 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

**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

#### (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。

#### 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。

☆**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。

##### 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

##### 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。

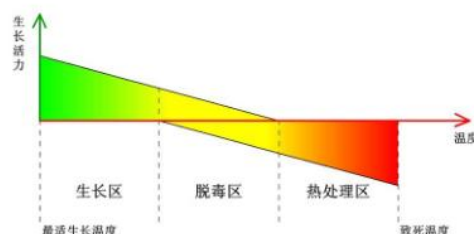
**(2)热空气处理** 热空气处理对活跃生长的茎尖效果较好，将生长的盆栽植株移入温热治疗室(箱)内，一般在 35—40℃。处理时间因植物而异，短则几十分钟，长可达数月。

**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



##### 2 低温处理

亦称冷疗法。菊花植株在 5℃ 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。

**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。

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组织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: 脱毒培养的植物是否确认为特定无毒; 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。

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莧色藜 (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， PVX	脉间花叶	千日红、曼陀罗、辣椒、番茄、心叶烟
马铃薯S病毒， PVS	叶脉深陷粗缩	莧色藜、千日红、光曼陀罗、昆诺阿藜 (Chenopodium quinoa)
马铃薯Y病毒， PVY	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， PLRV	初感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。

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 耗资高、快、准确

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

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。

#### 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。将抗原固定和支持物上，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。

#### S5、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。

#### • 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

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) 取材和消毒

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。

##### (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℃条件下处理 4 个月效果较好。

(3) 化学处理马铃薯，三氮唑

### (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 ppm NAA，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 (GA<sub>3</sub>, 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。

## 第 6 章 花药与花粉培养

### 第一节 花药与花粉培养的意义

• **花药培养：**是指将完整的花药接种到培养基上，诱导形成单倍体再生植株的方法；

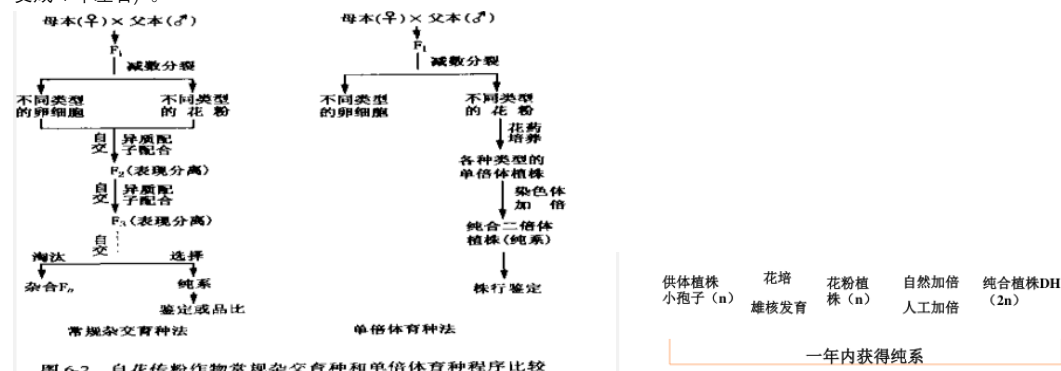
• **花粉培养：**则是指将处于一定发育阶段的花粉从花药中分离出来接种到培养基上，诱导形成单倍体再生植株的方法,也称为小孢子培养(microsporeculture)。

#### 两者的异同点

– 培养目的相同，均获得小孢子植株。– 花药培养属于器官培养；而花粉培养属于细胞培养。– 花粉培养没有药壁组织干扰；可计数小孢子产胚率；可观察雄核发育的全过程；单倍体产量高。但技术更复杂。

#### 花药与花粉培养的意义：

**1、克服杂种后代性状分离，缩短育种年限：**杂种 F<sub>1</sub> 花药培养，经过减数分裂，父母双方的染色体经过交换重组，育成花粉植株经染色体加倍，其后代性状经过重组不再分离、从中选择符合育种目标的重组品系是稳定纯合的，缩短育种年限（从 7-8 年变成 4 年左右）。



#### 2、提高了目标基因型的选择效率

例子 1：二倍体供体植株基因型为 AaBb，若要从后代中选择基因型为 AAbb 的纯合单株

常规方法：AAbb 出现的概率为 1/16，并且不能将 AAbb 与 Aabb、aAbb 区分开。

二倍体供体植株基因型为 AaBb，若要从后代中选择基因型为 AAbb 的纯合单株

单倍体方法：AAbb 出现的概率为 1/4。

**提高常规育种的效率**

**有利于隐性性状的选择**

**3、快速培养异花授粉植物自交系：**如玉米只要一年时间可获与多代自交效果相同的标准自交系，在果树林木多年生异花植物中通过花培获自交系，以利用杂种优势。利用纯系进行遗传研究，木本植物 9 科 11 属 20 种获花粉植株，杨树、橡胶、柑桔、葡萄、苹果、荔枝、龙眼、枸杞、茶树。木本植物：苹果自花不孕，很难获得完全纯合的无性系，通过花培已获得优良品种元帅，金冠、国光、赤阳、曙光等花粉植株，成为杂交育种亲本和纯系间的杂种优势。

#### 4、对单倍体植株的染色体配对行为的研究

1)进行染色体组型分析。

2)物种进化研究：可探索亲本染色体组的构成。分析单倍体植物减数分裂时，形成二价体的数目和形状，能确定染色体组内是否存在同源染色体。

**5、遗传分析** 单倍体植株中基因不受显隐性的影响，每一个基因的作用均能表现出来。能用来研究基因的性质及其作用。还可用于基因的剂量效应分析

**6、构建连锁图谱** 双单倍体 (DH) 群体是永久性群体，能有效地用于遗传图谱的构建

**7、用作基础遗传研究的各个领域：**花药、花粉培养在研究细胞分化、激素诱导原理、胚胎发生、植株再生等遗传学、细胞生物学的理论问题上也具有重要意义。Doy 等 (1973) 用拟南芥和蕃茄的花粉单倍体植株为受体，研究了大肠杆菌 3 个基因系统以病毒为载体的基因导入及随后的表达。

自然界中，单倍体频率 0.001-0.01%，难以研究利用

**植物单倍体培养方法：**花药培养、花粉培养• 胚珠或子房培养（未受精）

### 三、单倍体诱导途径

1) **花药培养：**直接将花药做为外植体，通过培养和诱导使得花药中的花粉改变发育途径形成单倍体植株。

2) **花粉培养：**也称作小孢子培养，是将花粉从花药中分离出来，成为分散或游离的状态，通过培养使得花粉启动脱分化，进而发育成单倍体植株。

3) **染色体消除法：**利用远缘杂交中杂合子亲本一方的染色体可以被自动排除，仅留下单一亲本的配子体染色体的特性，诱导单倍体植株。

4) **孤性生殖的诱导：**对未授粉雌蕊、子房、胚珠进行离体培养，诱发孤性生殖，产生单倍体植株。

### 四、植物花药/花粉培养历史

#### 第二节、花粉培养技术

##### 一、花粉的发育

•**花药的结构：**花药壁(2n)、药隔(2n)、花粉粒(n)

##### 花粉的发育

- (1) 花粉母细胞减数分裂形成四分体
- (2) 胼胝质解体，四个小孢子分开，形成壁，体积增大，各有一个大而圆的核处于细胞中央，随后液泡扩大，核被挤向一边——“单核靠边期”，核中 DNA 复制。
- (3) 不均等有丝分裂，形成一个较大的营养细胞和一个较小的生殖细胞——“双核期”，或变为——“三核期”成熟花粉粒。

##### 二、培养方法

**(一) 取材和预处理** 选择适合的花粉发育时期非常重要，花粉发育的三个时期：

1. 外植体的选择：供试材料的遗传背景、供试材料的生理状态、花粉的发育时期

• 用醋酸洋红压片镜检选择合适的花药；

• 掌握该期植株的外部形态特征，选择大致处于该期的花蕾如烟草单核靠边期：萼片与花冠等长，花冠略伸出

水稻叶枕距 5-10cm，颖片达最后大小，淡绿色，花丝已伸长，花药顶达颖壳 2/3，

小麦：剑叶上部明显膨大，叶鞘尚未张开，看不到幼穗

特征随品种栽培条件而有差异，每批材料需抽样镜检一下

• **取材时间：**上午 9 时—下午 4 时，雨水或露水未干以及高温烈日下不宜取材，接种时水稻取上部几个分枝的花药，小麦取中部小穗的花药。

2、**花药预处理：**大量试验结果表明，花药培养前给予一定的低温处理是十分必要的。

烟草、茄子 3~5℃ 72 小时、水稻 6~10℃ 7~10 天、柑橘 3℃ 5~10 天、马铃薯 4℃ 48 小时

##### (二) 灭菌与接种

• 花药被包裹在花蕾或幼穗中，处于无菌状态，表面消毒比较方便，水稻 70%酒精擦拭后，剥开苞叶取出幼穗浸泡在饱和漂白粉溶液中 10-20 分钟（或 0.1%升汞 7-10'）无菌水冲洗 3-5 次，用消毒纱布包起来备用。

##### 1. 花药接种

##### 2. 花粉接种

(1) 花粉的分离

1)自然散落法(漂浮培养散落小孢子收集法)将花药接种在预处理液或液体培养基上，待花粉自动散落后，收集培养。

2)挤压法:将花药放入加有 6%蔗糖溶液或液体培养基的小烧杯中，用注射器内管在壁上轻压花药挤出花粉。

3)机械游离

(1) 磁力搅拌法 用磁力搅拌器搅拌培养液中的花药，使花粉游离出来；



- (2) 超速旋切法 通过搅拌器中的高速旋转刀具破碎花蕾、穗子、花药,使小孢子游离出来(此法应用最广)。
- (2)花粉纯化 对上述方法获得的小孢子混合物进行分级过筛、梯度离心处理纯化小孢子
- (3) 过滤和清洗: 滤去药壁等残片将花粉混合液过滤(蕃茄 25μm, 烟草 40μm, 玉米 100μm)。收集滤液并离心, 200 转/分, 离心 1 分钟, 用吸管吸去含碎片的上清液, 加入新鲜 6%蔗糖液或培养基, 振荡后再离心, 重复 2 次, 最后一次用液体培养基。
- (4) 计数: 为保证花粉培养的起始密度, 用血球计数器测出 1ml 中所含花粉数目, 一般为 103-105 个/ml。
- (5) 用吸管吸 2.5ml 悬浮液放入直径 5cm 的培养皿中, 为使通气, 液体涂薄些较好, 花粉粒不没入培养基中太深, 在 25℃ 散射光 500lux 下培养。

### 三、培养基和培养条件(花药培养)

1、培养基: 合适的培养基是花药培养成功的关键, 花培常用的基本培养基有 Ms、Miller、N6、Nitsch H、Nitsch T、RM、White 等多种, 根据不同的培养目的和不同的外植体来源而加以选择使用。

- 诱导培养基: 基本培养基+生长素 (2,4-D, NAA, IAA) (1-5mg/L)
- 花药培养常用的激素有: 细胞分裂素类: BA— 6-benzyladenine、KT— kinetin, Zeatin、生长素类: NAA, IAA, 2,4-D
- 高浓度的 2,4-D 主要诱导花药形成愈伤组织, 而不能形成花粉胚状体, 从而增加了二倍体细胞发育的机会。
- 番茄花药培养对蔗糖浓度的诱导反应

蔗糖浓度 2% 3% 4% 6% 10% 13% 17%

诱导频率 5% 10% 12% 18% 25% 45% 8%

- 分化培养基: 常与诱导愈伤组织的基本培养基相同(无机盐含量, 高的有利于分化)但去掉 2,4-D, 改用低浓度的 IAA 或 NAA (0.5-1mg/L),

如: 烟草: 直接产生胚状体, 基本培养基用 Nitsch H, 不加或加低浓度的生长素 (IAA 0.1mg/L) 即可成苗。

水稻: 诱导培养基: 基本培养基 Miller 或 N6、合 5、SK3 附加 2,4-D (2-3 mg/L) (加 15%椰子汁更好),

分化培养基: Miller 或 N6 附加 KT (2mg/L) NAA、IAA 各 0.5mg/L 附加 15 椰子汁。

一次成苗: Ms+2,4-D 0.01mg/L+NAA 3mg/L+KT 4.5mg/L (2-5 株苗/1000 个总数)。

### 2、培养条件

(1) 温度: 培养室温度在 20-28℃ 范围, 不同来源外植体要求的最适温度不同

如小麦宜在 18-25℃, 小麦在 33℃ 条件下培养 3~5 天, 可提高成愈率和绿苗率

水稻 28-30℃, 水稻: 25℃ 培养 0.5% 花粉胚。处理: 35℃ 培养 24h→25℃ 培养 9% 花粉胚。温度超过 30℃, 白苗率高

烟草 25-30℃ 为宜, 曼陀罗低于 20℃ 不能形成花粉胚。

柑橘在 20℃ 以下, 完全不能形成胚状体, 且愈伤组织形成亦很少, 当将温度提高到 21~25℃ 时便会有胚状体形成, 而当温度提高到 26℃ 以上时又完全不能形成胚状体。

油菜若将接种后的花药在 30℃ 条件下培养 2~3 天, 可显著提高花粉胚的形成率

(2) 湿度: 相对湿度维持在 75-85% 间

(3) 光照: 愈伤诱导: 暗培养 分化: 2000LX 以上, 12-18 小时以上

### 四、花粉植株的诱导途径

#### 1 愈伤组织的诱导

对培养发生反应的花药, 在培养 3-8 周后, 药壁逐渐变褐, 由于愈伤组织或花粉植株的生长产生的压力, 药壁破裂, 长出愈伤或小植株。

- 水稻: 接种 3-4 周, 花药变褐, 药室纵裂, 长出乳白色淡黄色愈伤,

有二种类型:

① 花椰菜形, 表面湿润, 紧密, 生长缓慢, 易分化成苗。

② 不规则形状, 颜色白而透明, 结构疏松生长快, 不容易分化成苗

粳稻诱导率高达 15% 以上, 籼和籼粳交 F1, 诱导率低, 在 10%-5% 以下。

#### 2 分化

愈伤长到 2-3mm (绿豆大) 转移到分化培养基注意愈伤的极性, 原来向上的面仍向上, 移植后 30-40 天, 可分化出芽和根, 根芽的分化和愈伤的年龄有关, 小麦和水稻以愈伤出现 7-15 天分化频率最高, 出芽最快, 随愈伤年龄增大分化率降低。

#### 3 花粉植株的诱导途径

(1) 胚状体发育途径 小孢子经历胚发生的各个阶段, 最后子叶展开, 形成花粉植株。

(2) 愈伤组织发育途径 小孢子分裂数次形成愈伤, 再分化形成花粉植株。此途径产生的植株会出现变异且倍性复杂。

3 壮苗: • 新分化的幼苗细弱根系不发达, 将它们转移到 1/2Ms+多效唑+NAA 的培养基上再培养一次, 待根系长好即可移栽。

### (五) 移栽

#### 第三节 单倍体植株二倍化

• 花药和花粉培养得到单倍体植物, 经加倍就是可供育种上选择的纯系, 但在花粉植株中混杂有不良性状 (当代表现性状), 要对花培材料进行选择, 对培养规模、性状变异、染色体加倍等环节给予重视。

#### 一、倍性鉴定

##### 1、染色体直接计数法

通常取根尖、茎尖等分生组织区进行制片，直接计数染色体数目。

## 2、间接鉴定

- (1) 扫描细胞光度仪鉴定（流式细胞仪）主要测定叶片单个细胞中 DNA 的含量确定细胞的倍性。
- (2) 细胞形态学鉴定法 叶片保卫细胞大小、单位面积上的气孔数及保卫细胞中叶绿体的大小和数目与倍性具有高度的相关性。
- (3) 植株形态学鉴定法  
单倍体植株瘦弱，矮小，叶片、花、花药，气孔都小于二倍体，花药空瘪，不结实。
- (4) 检查花粉育性

**二、染色体加倍：**单倍体植株由于染色体不配对，不能形成有活力配子，必须经自然或人工加倍后。自然加倍频率较低（但水稻可达 50%-70%）

**（一）茎段培养：**将单倍体植株的茎段进行培养，诱导愈伤组织形成。由于单倍体愈伤组织在培养过程中会有一定频率的核内有丝分裂，从而形成二倍体细胞，分化出纯合的二倍体植株。

### （二）化学试剂诱变

有秋水仙素、Oryzalin、trifluralin、APM 等。

#### 1、秋水仙素诱导

常用秋水仙素处理，其作用在于诱导细胞发生核内有丝分裂，低浓度时阻止纺锤丝形成，高浓度时可破坏纺锤体，使核、质无法分裂，而染色体已复制，收到加倍效果，（但也会造成染色体和基因的不稳定）形成混倍现象。

##### （1）浸泡法

无菌条件下以一定浓度的秋水仙素浸泡再生小植株，再转移至新鲜培养基中培养。

##### （2）生长锥处理

秋水仙素水溶液直接涂抹生长点（顶芽或腋芽）。

##### （3）培养基处理

将单倍体植株和任何一部分作为外植体，种植在附加一定浓度秋水仙素的培养基中培养一段时间后，转入无秋水仙素的相同培养基中继续培养诱导胚状体。

#### 2、除草剂诱导（毒性小，引起植株的变异几率小）

##### 1)、烟草

- ① 1.5 份浓度 0.1-0.4%的秋水仙碱+1 份羊毛脂混合成糊状，涂在腋芽或生长点上，成功率 30-60%。
- ② 棉花蘸上 0.2-0.4%的秋水仙碱包在生长点或腋芽上，经常加药液保湿，24-48hr 除药棉，成功率 50%。
- ③ 0.2-0.4%的秋水仙碱液浸泡植株 24-48hr，37%

##### 2)、水稻

0.04-0.1%秋水仙碱液浸泡新生分蘖的基部。20-25℃下 1-4 天后洗净移入土中（自然加倍率 40-60%）

##### 3) 小麦

分蘖期在分蘖节纵刻一刀口，在 0.03-0.04%秋水仙液中，15℃ 4 天，洗净移植，40%。

## 第七章 细胞培养

### 细胞的基本知识

**1. 细胞及细胞学说的提出：**1665 年英国学者 Robert Hooke，用自制的显微镜观察软木的薄片，第一次发现植物的细胞结构，并首次借用拉丁文 Cella（小室）这个词称呼他们看到的类似于蜂巢的极小的封闭小室。

德国植物学家施莱登（1838，M. J Schleiden），动物学家施旺（1839，T. Schwann）提出动植物都是细胞的集合体。使细胞及其功能有了一个较为明确的定义，确立了“细胞学说”的基本原则。

**“细胞学说”主要内容是：**

- （1）细胞是有机体，动植物都是由细胞发育来的；
- （2）每个细胞都作为一个相对的独立单位，有自己的“生命”。
- （3）新的细胞可以通过老的细胞繁殖产生。

1858 年德国医生病理学家微耳赫（Virchow）指出细胞只能来自细胞，正如动物只能来自动物，植物只能来自植物一样。他还指出机体的一切病理表现都是基于细胞的损伤。

施旺、施莱登的细胞学说；

1859 年达尔文(Darwin)的进化论；

1866 年孟德尔（Mendel）的遗传学定律为现代生物学的三大基石；而细胞学说又是后二者的“基石”。

### 2. 细胞的基本概念

**（1）细胞是生命活动的基本单位：**一切机体均由细胞构成（病毒是非细胞形态的生命体）。细胞不仅是机体的基本形态结构单位，也是机体的基本功能单位，机体的生长、发育、繁殖和进化都是以细胞为基础。

**（2）细胞的基本共性：**构成细胞的基本化学因素有 O、C、H、N、P、S、Ca、K、Fe、Na、Cl、Mg 等，它们构成细胞功能与结构所需的许多无机化合物和各种生物分子。构成细胞结构的基本生物大分子是：核酸、蛋白质、脂肪和糖类。这些大分子一般以复合分子形成如核蛋白、脂蛋白、糖蛋白或糖脂等组成细胞的重要结构。

在亚显微结构水平上，细胞基本结构大体可以分成三种体系：

第一类:主要由脂蛋白构成的生物膜系统,如细胞膜、核膜及一系列重要细胞器如:线粒体、高尔基体、内质网、溶酶体和液泡等的封闭膜;

第二类:主要由核酸蛋白成分构成的颗粒与显微结构系统,如染色质与核仁基质,核蛋白体等;

第三类:由蛋白质构成的细胞骨架(主要是微丝与微管),中心体、纺锤体、纤毛、鞭毛等专门结构。

### (3) 细胞作为生命活动的基本单位的共同特点:

首先所有细胞表面均有一层脂蛋白成分的生物膜,即细胞膜,使细胞能与周围环境保持相对独立性;

其次,所有细胞都有两种核酸,即 DNA 和 RNA 作为遗传信息的复制和转录的物质基础;

第三作为蛋白质合成的“机器”-核蛋白,是一切细胞不可缺少的基本结构;

第四所有细胞都是以一定方式分裂 增殖。

第五,细胞具有多样性,形状、大小悬殊很大,结构复杂程度也很不一样。

### (4) 原核细胞与真核细胞:这两种细胞是根据进化程度与结构的

复杂程度来划分的。原核细胞(Prokaryotic cell)它没有典型的核结构,没有核膜,只有一个比较集中的核区,其中分布着环状 DNA 丝,细胞内缺少重要细胞器,但有时有核蛋白体及游离的质粒(Plasmid),原核细胞的繁殖以直接分裂(无丝分裂)为主, DNA 复制、RNA 转录与蛋白质合成同时连续进行。

•从进化角度真核细胞与原核细胞有两点区别,第一细胞膜系统的分化与演变不同。真核细胞以膜系统的分化为基础,分化成各种重要的细胞器;第二遗传信息与遗传装置的扩增与复杂化程度不一。真核细胞(Eukaryotic cell)进化程度高,结构相当复杂。

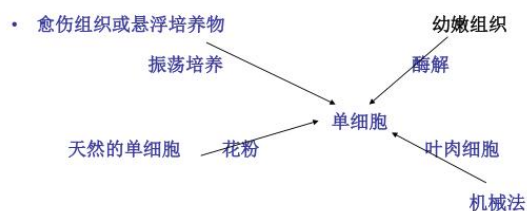
1902 年 Haberlandt 提出植物细胞全能性理论和高等植物的器官和组织可以不断分割直到单个细胞的观点

- 高等植物的组织和器官可以分割成单个细胞
- 小野芝麻和凤眼兰的栅栏细胞和虎眼万年青表皮细胞
- 首次进行离体细胞培养(未看到细胞分裂)

## §1、单细胞分离

悬浮培养不能对某一细胞进行定点观察和分析,也就不能进行定点选择。因此,在进行细胞株(种子细胞)选择和需要对细胞活动跟踪观察的情况下,必须进行真正意义上的单细胞培养。由于植物细胞的团聚性,单细胞培养比较困难。

### 一、单细胞的分离方法



### 二、从愈伤组织分离单细胞

#### 步骤:

- 1) 诱导产生愈伤组织;
- 2) 愈伤组织反复继代,使组织不断增殖,提高愈伤组织松散性;

#### 单细胞的制备方法:

要从高等植物的器官或组织中取得单细胞是非常困难的,目前从分散性较好的愈伤组织或悬浮培养物来制备单细胞(常用),也可以用纤维素酶和果胶酶解离植物的不同组织(幼嫩组织),或机械法直接制备单细胞,为了使培养出来的细胞团都来自单细胞,或多数来自单细胞,悬浮培养物要过滤除去大的细胞聚集体才能接种。

- 3) 将愈伤组织在液体培养基中培养,建立悬浮培养物

优点:细胞团成小细胞团或单细胞;在培养基中均匀分布;有空气交流。

## 第二节 单细胞培养

**单细胞培养方法:**看护培养法、微室培养法、固体平板培养法、液体浅层培养法

### 一、平板培养

将悬浮培养的细胞接种到一薄层固体培养基上进行培养称平板培养,它需要较低的细胞密度,接种的细胞要求均匀地散布在薄的培养基上

**含义:**将单个细胞与融化的琼脂培养基均匀混合后平铺一薄层在培养皿底上的培养法。

**用途:**分离单细胞无性系,研究其生理、生化、遗传上的差异而设计的一种单细胞培养技术。广泛应用于细胞、原生质体及融合产物的培养。

#### 特点:

**优点:**(1) 便于定点观察,(2) 每个细胞克隆(无性系)都来自单个细胞。

**缺点:**包埋在培养基中,空气、物质交换不畅,分裂频率低,生长较慢。

最理想的是接种较低密度的细胞能得到较高的植板率。(接种密度高,使相邻细胞团常混在一起,给分离单细胞无性系带来困难,但低于临界密度(104~106)时,细胞就不能分裂)。

## 平板培养的基本技术

1)、悬浮细胞密度的调制 平板培养要求最初细胞密度（即初始植板密度）为  $1 \times 10^3 - 100 \times 10^3$  个/ml。

(1)细胞计数 在培养前先要用血球计数板进行细胞计数，才可能知道一定体积的平板培养基中有多少个细胞。

(2)悬浮细胞密度的调制：计数过的悬浮液离心收集后，用新鲜的液体培养基稀释至规定密度，适宜的起始密度因植物种类不同而不同，平板培养要求最初细胞密度（即初始植板密度）为  $1 \times 10^3 - 100 \times 10^3$  个/ml。烟草细胞的适宜密度为  $0.5 - 1.0 \times 10^4$  个细胞/ml，低于此数，植板率显著下降。

初始植板密度：单细胞固体平板培养时，细胞悬浮液接种到琼脂培养基上最初细胞密度

### 2)培养基配制

制平板：细胞悬浮液与融化状态（35℃）条件培养基按一定比例均匀混合，倒成平板。

1.4%琼脂基本培养基+等量细胞培养液=0.7%琼脂条件培养基。

条件培养基：曾悬浮培养过一段时间组织或细胞的液体培养基。

3) 培养：25-26℃ 置暗处培养 21 天。低倍显微镜观察，记数单细胞或小细胞团，计算置板效率（也称植板率）

镜检：用倒置显微镜观察将单细胞做标记，已获得真正的单细胞系。

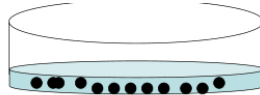
平板培养的效果一般用植板率来衡量。

植板效率（或植板率）：已形成细胞团的百分数（即每 100 个铺在平板上的细胞中有多少个能长出细胞团）。

平板培养中细胞密度和培养基成分是培养成功的关键，而细胞密度和培养基成分互相依赖（负相关）。

$$\text{植板率}\% = \frac{\text{每个平板上形成的细胞团数}}{\text{每个平板上接种的细胞总数}} \times 100\%$$

平板培养



单细胞的分离

悬浮细胞

过细胞筛得含单细胞的滤出液

加入等量融化的琼脂培养基(两者等量),最终琼脂浓度为0.6-0.7%

倒平板(1mm厚), 要求操作迅速, 防止凝固

用石蜡膜带封口,

用倒置显微镜观察, 标出细胞位置

培养(20天左右)

## 二、微室培养：Jones 等 1960 年设计的细胞学实验研究的技术

为了对活细胞进行连续观察，将它们培养在很少量的培养基中，这种培养技术叫微室培养。

• 这一方法也可用于原生质体培养观察细胞壁的再生和细胞分裂过程。

优点:在培养过程中可连续进行显微观察，将细胞的生长、分裂、细胞团形成的全过程都记录下来，操作简单，细胞不经染色和固定就可在显微镜下观察和摄影

缺点:培养基太少，水分和养分难以保持，pH 也容易变动，细胞经短期培养就不再生长。

具体做法如下：

(1) 将载玻片与盖玻片在酒精灯上烧灼消毒；选光学性能好的载玻片和盖玻片

(2) 按盖玻片大小，在载玻片上涂一圈四环素眼膏作为屏障；

(3) 取制备好的细胞悬浮液一小滴（约 3 微升）滴在载玻片上，放一小截毛细管作通气用，盖上盖玻片轻压一下，使密封并使细胞悬浮液的小滴与盖玻片接触，用石蜡-凡士林密封，成一个微室微室要小而薄；要求适当通气(毛细管)；要用条件培养基或滋养培养基悬浮

(4) 培养：26±1℃光照或黑暗条件下培养，观察摄影

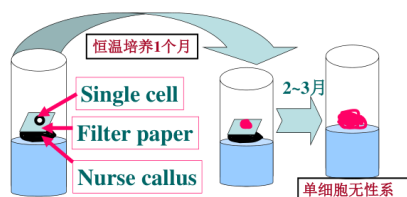
## 三、看护培养

1.概念: 通过一块愈伤组织（或花药）提供的物质滋养上面的细胞使之生长和增殖的方法。

是由 Muir 1954 年设计的。 看护培养图示：

用途：诱导形成单细胞系。

用一块活跃生长的愈伤组织来看护单个细胞，并使其生长和增殖。这个愈伤组织称为看护愈伤组织





## 2. 看护培养基本技术

该法优点是操作简便,但接种材料必须是真正的单细胞,因此用悬浮培养细胞作接种材料时,应先在显微镜下检查细胞密度,具体操作如下:

- (1) 在三角瓶内加入一定量培养基,取一块几毫米大小的愈伤放在培养基上。
- (2) 愈伤组织上盖一张灭过菌的滤纸,放置一夜,使滤纸充分吸收组织块渗出来的培养基成分。
- (3) 吸取单细胞液接种在滤纸上进行保温培养。
- (4) 培养一个月后,单细胞长成肉眼可见的细胞团,经过 2-3 个月,从滤纸上取出培养物,转放到新鲜培养基上继续培养。

## 3. 看护培养特点

优点: 1) 操作简便; 2) 通气性好; 3) 代谢产物易扩散, 易补充新鲜培养基, 易于收集培养物。

缺点: 不能在显微镜下直接观察细胞的生长过程。

## 三、影响单细胞培养的因子

1、条件培养基 2、细胞密度(>临界密度)3、生长激素 4、pH5、CO<sub>2</sub>

条件培养基: 曾悬浮培养过一段时间组织或细胞的液体培养基。

例: Sharp 用看护培养的方法培养蕃茄单花粉方法:

- (一) 制备每 0.5ml 液体培养基中含有 10 个细胞(花粉)的悬浮液。
- (二) 将从单个花粉获得的完整花药摆放在装有 Ms 基本培养基的三角瓶中,花药上盖一片滤纸盘。
- (三) 平板接种 10 个花粉细胞在滤纸盘上,在 25℃12hr 光照条件下培养,一个月后大量出现无性系,平板接种效率在 0~60% 之间。

## §3、植物细胞悬浮培养

**一、植物细胞悬浮培养概念:**指将离体的细胞和或小细胞团,悬浮在液体培养基中进行培养。

**悬浮培养优点:**

- 1、增加培养细胞与培养液的接触面,改善营养供应,能够提供大量较为均匀的细胞,为研究细胞的生长、分化创造方法和条件;
- 2、可带走培养物产生的有害代谢产物,避免有害代谢产物局部浓度过高等问题;
- 3、保证氧的充分供给:使悬浮培养细胞的生长条件比固体培养有很大的改善,细胞可不断增殖,形成高密度的细胞群体,适于大规模培养。

• **细胞和小细胞团来源:**

组织培养所产生的愈伤组织、花药中的花粉或其它幼嫩组织或器官

接种材料经过物理或化学方法离散后,在悬浮培养中能保持良好的分散状态。

## 二、细胞悬浮培养的意义

(一) **有利于细胞学的理论研究:**能提供大量的均匀植物细胞,为研究细胞的生长、分化、形态发生、代谢调节等一系列理论问题,创造了有利条件,特别是高等植物对研究叶绿体的结构与功能、遗传及调控机理有重要作用。

(二) **细胞悬浮培养系统的建立,**为遗传工程提供理想的材料和途径,通过叶肉细胞悬浮制备原生质体,是遗传工程的良好受体,为植物的转导,转化操作提供了理想途径;

(三) **在培养过程中经过脱分化、增殖和再分化,**产生多种多样的变异,可以在田间将优良的变异株选择出来育成新品种;也可在培养基中添加筛选剂,有目的地筛选所需要的突变体。

(四) **实现植物生产的工业化:**在液体悬浮培养中,细胞增殖的速度比愈伤组织要快得多,很适合于大规模培养,因此有可能使植物生产实现工厂化,大量提取对人类有用的次生物质,特别是那些材料名贵,天然资源少,人工引种驯化难度较大的经济价值高植物,更适用于进行工业化生产,提取药材、色素、调味品等。

早在 1956 年, Routier 和 Nickell 就提出工业化培养植物细胞以提取其天然产物的大胆设想。

Reinhard 等(1968)首先将这种设想转变成现实,生产出了哈尔碱(harmine)。

Kaul 等(1969)、Furuya 等(1972)和 Teuscher 等(1973)分别培养植物细胞获取了其中的薯蓣(yu 山药)皂苷、人参皂角苷和维斯纳精(visnagin)。

目前世界最大批量工业化培养细胞(烟草细胞)已达 2 万升(20 吨)。

我国在“八五”、“九五”和“863 计划”中连续拨款资助工业化培养红豆杉细胞生产抗肿瘤药物紫杉醇的研究,目前已达到 60mg/L 的世界先进水平。

## 紫杉醇简介

紫杉醇: 二萜类化合物

最早由太平洋红豆杉 Taxusbrevifolia 的树皮中分离

广泛用于治疗卵巢癌、乳腺癌、非小细胞肺癌等十几种癌症

目前主要来源于红豆杉属植物

- **红豆杉** 主要原料植物 国家一级保护野生植物，全球十大濒危物种之一
- 生长缓慢，分布有限 Taxol 含量低 树皮中 Taxol 含量0.00001-0.069% 3000 棵树=10 吨树皮=1kg Taxol=500 病人

## 药源问题解决办法

### — 生物方法

#### • 组织和细胞培养

#### • 微生物发酵

#### • 生物合成研究阶段

红豆杉生物合成途径基本明确  
10种相关酶基因被克隆表达

利用基因工程手段改造红豆杉提高紫杉醇产量

优点：1、摆脱自然因素，可长期稳定生长  
2、适应市场、方便调节  
3、成分简单，有利于分离纯化  
4、成本低、生长周期短  
5、为半合成提供原料  
6、有望工业化生产

缺点：1、产量低、不稳定  
2、工业化放大研究

- 植物细胞培养能生产一些微生物所不能合成的特有代谢产物，如生物碱类（尼古丁、阿托品、番茄碱等）、色素（叶绿素、类胡萝卜素、叶黄素等）、类黄酮和花色苷、苯酚、皂角苷、固醇类、菇类、某些抗生素和生长控制剂（赤霉素等）、调味品和香料等。

### 食品添加剂

**色素：**单冠毛菊的愈伤组织，可提取红色的花色素；葡萄细胞培养，可获得花色素和苷色素；甜菜和菠菜培养，可获得甜菜苷。

**芳香油、香精：**芳香油一般是在植物的特殊结构中合成的。据研究，黄菊、鸡冠紫苏等植物的培养细胞能合成芳香油，并可从愈伤组织中提取之。并且鸡冠紫苏的培养细胞能合成香精。

**调味剂：**甜菊的愈伤组织中可提取甜味剂；长春花的培养细胞能生产磷酸二酯。

**农药：**从除虫菊的愈伤组织中可提取除虫菊酯，除虫菊是一种特别有效的杀虫剂。虽然人工可以合成拟除虫菊酯，但昆虫会逐渐产生抗性，且污染环境。

## 三、细胞悬浮培养操作程序：

### （一）愈伤组织的诱导与继代培养

**1、选择合适的外植体材料：**从原则上讲植物的任何部分，都可以诱导产生愈伤组织和进行悬浮培养，但具体选择何种材料要根据研究目的和培养效果来决定。一般以幼嫩的组织或器官（如幼芽、幼胚、花序、幼叶、幼嫩实生苗）培养效果最好。

**2、材料的表面消毒：**用芽、叶、茎、块根作外植体，70%酒精浸泡 30-60 秒，→0.1%升汞液中消毒 10 分，无菌水冲洗 4-5 次，或饱和漂白粉泡 10-16 分，或 2%安替福氏液 4-5 分，无菌水 3-4 次。用种子萌发无菌实生苗作外植体：70%酒精浸 2 分→2-3%的次氯酸钠 15-20 分，无菌水冲洗后接入培养皿或三角瓶，25-28℃黑暗条件下萌发得实生苗。

### 3、培养基：

Ms、B5、SH 作基本培养基，

激素:单子叶植物加 2,4-D (0.5 ~ 2ppm)，双子叶植物加 2,4-D (2 ~ 10ppm)，激动素对愈伤形成有促进作用，与 2,4-D 等生长素类混合使用效果更好，

有机成分:甘氨酸、水解酪蛋白、肌醇、VB1 和 VB6 都能改善愈伤生长状况，某些植物外植体还需要椰子汁（酵母提取物等天然有机物）。

### 4、接种与培养

从无菌实生苗上切取 0.5cm 的茎段，接种于培养基上，每瓶（管）接 1-2 个茎，26 ~ 28℃黑暗或弱光下培养，3-4 周长出愈伤。

### 5、愈伤组织的继代：

目的:扩繁,有利于解离(生长分裂旺盛)

将小的愈伤转移到 Ms+2,4-D (1mg/L) + 蔗糖 3%+琼脂 0.6%的新鲜培养基上继代数次，使其维持愈伤的活跃生长，以便得到更多的悬浮培养材料。

愈伤的质地和性质有很大差异，有的坚硬，有的疏松易碎，疏松的愈伤由松散排列的细胞组成，且大量分生组织或瘤状物被大而未分化的细胞分开，一碰就可散开，而坚实的愈伤，由堆得很紧的细胞组成，很少分化，大部分是高度液泡化的细胞，含果胶和半纤维素较多，使细胞紧紧地粘在一起不易破碎，有研究指出，高浓度的酵母提取液可使豌豆愈伤疏松变脆，Blakely 和 Steward (1961) 研究认为，草冠毛菊坚实和疏松的愈伤之间可以相互转变，只要改变培养基中椰子汁和 NAA 的量，就可使它们相互转变。（增加生长素的浓度可促进疏松）

### 如何获得符合要求的愈伤组织？

- 1、选择适宜的外植体：胚、胚轴、子叶是最常用的外植体，特别是幼胚。
- 2、选择适宜的培养基：生长素浓度很重要 配合一定浓度的细胞分裂素；添加附加物。
- 3、愈伤组织要进行继代选择：选择疏松性好、细胞状态好的细胞不断继代培养。

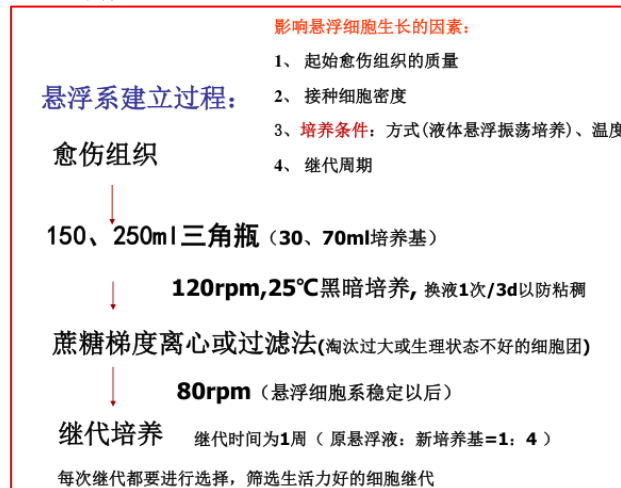
**要求：**松散性好，增殖快，再生能力强。其外观一般是鲜艳的乳白或淡黄色，呈细小颗粒状，松散易碎。

**悬浮培养**要求细胞呈较好的分散状态，所以要选择易于分散的细胞类型作培养材料，并试验和调整培养基成分，研究生长素、细

胞分裂素和其它附加物的种类和用量，筛选出适合松脆的愈伤生长的培养基，然后用机械振荡即能分离为分散良好的细胞液，而坚硬型的愈伤，细胞成团生长，不能形成分散的细胞悬浮液。

## （二）悬浮系建立过程：

- 1、振荡分离：取重约 500mg 较脆的愈伤接入液体培养基中，放在转床（110-120 转/分）上连续振荡使其能分散，从而得到细胞悬浮液。
- 2、过滤：将游离细胞悬浮液通过不锈钢细胞筛或尼龙网布，滤去愈伤碎片和较大的细胞团，再用液体培养基清洗数次后，得到的滤液流入离心管中。
- 3、离心收集：把装有滤液的离心管放在离心机上，以 1500 转/分的速度离心 5 分钟，倒去上清液，收集下沉的单细胞或较小的细胞团。
- 4、继代培养



## 成功的悬浮细胞培养体系必须满足 3 个条件：

- 1、悬浮培养物分散性良好，细胞团较小，一般在 30~50 个细胞以下，在实际培养中，很少有完全由单细胞组成的植物细胞悬浮系。
- 2、均一性好，细胞形状和细胞团大小大致相同，悬浮系外观为大小均一的小颗粒，培养基清澈透亮，细胞色泽呈鲜艳的乳白或淡黄色。
- 3、细胞生长迅速，悬浮细胞的生长量一般 2~3 天甚至更短时间便可增加 1 倍。

## 建立良好的悬浮培养体系：

**优良细胞系特征：**分散性好,细胞团较小,均一性好,细胞形状和细胞团的大小大致相同,生长迅速,2-3 天繁殖一代

**建立措施：**幼嫩外植体,挑选好的愈伤(疏松),培养基,继代时去除大的细胞团,悬浮培养液

## （三）细胞悬浮培养：

**1、测定细胞起始密度：**用无菌注射器针管吸取细胞液 1ml，取一滴在血球计数板上进行细胞计数，通常起始密度应为 0.5—2.5 ×10<sup>5</sup> 个细胞/毫升，在培养过程中增加到 1—4×10<sup>6</sup> 个细胞/毫升，许多细胞大约经过 18—25 天就能完成这一增殖过程。

### 细胞计数

• 培养的细胞在一般条件下要求有一定的密度才能生长良好，所以要进行细胞计数。计数结果以每毫升细胞数表示。细胞计数的原理和方法与血球细胞计数相同。

- 1、将血球计数板及盖片擦拭干净，并将盖片盖在计数板上。
- 2、将细胞悬液吸出少许，滴加在盖片边缘，使悬液充满盖片和计数板之间。
- 3、静置 3 分钟。
- 4、镜下观察，计算计数板四大格细胞总数，压线细胞只计左侧和上方的。然后按下式计算：

细胞数/ml = 4 大格细胞总数 / 4 × 10000

注意：镜下偶见由两个以上细胞组成的细胞团，应按单个细胞计算，若细胞团占 10% 以上，说明分散不好，需重新制备细胞悬液。

**2、测定活细胞数：**细胞悬浮液中既有活细胞也包括一部分死细胞，测定活细胞的方法：

- 任何培养瓶内生长的细胞都由死细胞和活细胞组成，从形态上区别死、活细胞是困难的。
- 由组织中分离细胞一般也要检查活力，以了解分离的过程对细胞是否有损伤作用。复苏后的细胞也要检查活力，了解冻存和复苏的效果。
- 总细胞中活细胞所占的百分比叫做细胞活力。

**(1) 伊凡蓝染色法：**在一滴细胞液中，加一滴 0.1% 酚藏红花液，再加一滴 0.5% 的伊凡蓝液，半分钟后镜检，死细胞染成红色，活细胞呈兰色，分别计算，算出活细胞百分率。

**(2) 台盼蓝法** 活细胞不被染色，死细胞染成蓝色

方法:

- 1、将细胞悬液以 0.5ml 加入试管中;
- 2、加入 0.5ml 0.4%台盼兰染液, 染色 2—3 分钟;
- 3、吸取少许悬液涂于载玻片上, 加上盖片;
- 4、镜下取几个任意视野分别计死细胞和活细胞数, 计细胞活力;

死细胞能被台盼兰染上色, 镜下可见深蓝色的细胞, 活细胞不被染色, 镜下呈无色透明状。活力测定可以和细胞计数合起来进行, 但要考虑到染液对原细胞悬液的加倍稀释作用。

### (3). 四唑盐 (MTT) 比色法

四唑盐 (MTT) 商品名为噻唑蓝; MTT 比色法的原理: 活细胞中脱氢酶能将四唑盐还原成不溶于水的蓝紫色产物 (formazan), 并沉淀在细胞中, 而死细胞没有这种功能。二甲亚砜 (DMSO) 能溶解沉积在细胞中蓝紫色结晶物, 溶液颜色深浅与所含的 formazan 量成正比。再用酶标仪测定 OD 值; MTT 法简单快速、准确, 广泛应用于新药筛选、细胞毒性试验、肿瘤放射敏感性实验等。

操作步骤:

- (1) 单细胞悬液接种于 96 孔培养板; 103-104 细胞/孔, 每孔培养基总量 200 微升 (96 孔培养板每孔容积 370 微升), 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养一段时间 (根据实验目的决定培养时间);
- (2) 加入 2 毫克 / 毫升的 MTT 液 (50 微升 / 孔); 继续培养 3 小时;
- (3) 吸出孔内培养液后, 加入 DMSO 液 (150 微升 / 孔), 将培养板置于微孔板振荡器上振荡 10 分钟, 使结晶物溶解;
- (4) 酶标仪检测各孔 OD 值 (检测波长 570 纳米)。记录结果, 绘制细胞生长曲线。

### (4)、显微镜观察

生长良好的细胞, 在显微镜下可观察到细胞透明度大, 折光性强, 轮廓不清。相差显微镜观察时可见细胞细微结构。若细胞生长状态不良, 可见细胞轮廓增强, 细胞折光性变弱, 细胞质中出现空泡、脂滴和其他颗粒状物质, 细胞之间空隙增大, 细胞形态不规则, 甚至失去原有细胞的特点, 有时细胞表面及周围出现丝絮状物。若细胞营养不良, 状况没有得到及时纠正, 进一步发展可见到部分细胞死亡, 崩解漂浮在培养液中。发现这种情况应及时处理, 只有生长良好的细胞才能进行传代培养和实验研究。

### 3、悬浮细胞培养的同步化

细胞同步化: 同一悬浮培养体系的所有细胞都同时通过细胞周期的某一特定时期。

植物细胞在悬浮培养中的游离性较差, 容易团聚进入不同程度的分化状态, 因此要达到完全同步化相当困难。

- ①分选法: 通过细胞体积大小分级, 直接将处于相同周期的细胞进行分选, 然后将同一状态的细胞继代培养于同一培养体系中。
- ②饥饿法: 在一个培养体系中, 如果细胞生长的基本成分丧失, 则导致细胞因饥饿而分裂受阻, 从而停留在某一分裂时期。
- ③抑制剂法: 通过一些 DNA 合成抑制剂处理细胞, 使细胞滞留在 DNA 合成前期, 当解除抑制后, 即可获得处于同一细胞周期—G<sub>1</sub> 期的同步化细胞。
- ④低温法: 冷处理也可提高培养体系中细胞同步化程度。

**4、悬浮培养:** 将离心收集的单细胞浓缩液稀释到起始密度所规定的范围(0.5-2.5×10<sup>5</sup> 个细胞/毫升), 转入新鲜液体培养基中进行悬浮培养, 25 度, 黑暗或弱光, 110—120 转 / 分, 18—25 天增加到 1—4×10<sup>6</sup> 个细胞/毫升。

**基本培养基:**

可仍用 B5 或 Ms, 不加琼脂

pH: 在悬浮培养期间, 培养基的 pH 常出现相当大的变动, 故应加入

EDTA (二乙胺四乙酸), 使铁和其它金属离子, 能够长期处于可利用状态, 或加入一些固态缓冲物如微溶的磷酸氢钙, 不溶的磷酸钙, 碳酸钙等, 以稳定培养液的 pH。

激素: 2 mg/L 2,4-D + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L。此外培养基中激素的多少常常会明显地影响细胞分散度, 生长素多的, 分散度较好, 少的则分散度差

有机附加物: 也有人认为在附加椰子汁或酵母提取液培养基上生长的胡萝卜细胞, 比不加这些物质的培养基上生长的细胞分散度要高一些。

蔗糖: 10—30 克 / 升, 浓度低有利于细胞分散

**(四) 细胞悬浮培养的类型 (方法):** 细胞悬浮培养是一种使培养物分离成单细胞并不断扩增的液体培养技术。

细胞悬浮培养归纳起来有三种基本方法: 成 (分) 批培养、半连续培养、连续培养。

#### 1. 成 (分) 批培养:

将接种的细胞分散悬浮于固定容积的培养基中进行培养, 整个培养系统是密封的, 只允许有气体和挥发性代谢产物与外界空气进行交换, 培养基固定不变。

一般用 100—250ml 三角瓶, 装 20—75ml 培养基, 为使细胞不断增殖, 必须进行继代 (取出悬浮液, 转移到新鲜培养基, 约稀释 5 倍)。

**成批培养特点** (1) 培养基体积固定; (2) 必须适当搅拌; (3) 培养过程中, 细胞生长, 其数目不断发生变化, 呈 S 型增长; (4) 生长一定时间后, 需要继代转移。

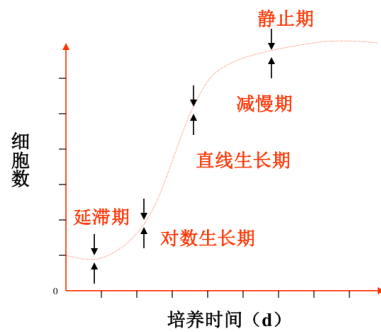


在成批培养中，随培养天数的增加，细胞增长的速度也不断改变，从开始培养起到停止生长的一段时间称为**培养细胞的生长周期**，大致成一条 S 曲线：开始细胞增长缓慢称为**延迟期**（滞后期,潜伏期）；接着是**对数生长期**：细胞数迅速增加，进入直线生长期：增长速率保持不变，经过 3-4 个细胞世代产物的积累，增长速度减慢，进入**减慢期**（营养消耗，有毒产物积累），最后进入静止期，增长完全停止。

**潜伏期**：此时细胞有生长活动，而无细胞分裂。细胞株潜伏期一般为 6~24 小时。

**对数生长期**：细胞数随时间变化成倍增长，活力最佳，最适合进行实验研究。

**停止期（平台期）**：细胞长满瓶壁后，细胞虽有活力但不再分裂 机制：接触抑制、密度依赖性



悬浮培养时细胞的生长曲线

细胞数量随着时间的变化曲线呈现 S 形。在细胞接种到培养基中最初的时间内细胞很少分裂，经历一个延迟期后进入对数生长期和细胞迅速增殖的直线生长期，接着是细胞增殖减慢的减慢期和停止生长的静止期。整个周期经历时间的长短植物种类和起培养细胞密度的不同而不同。

**培养周期的概念**：具有一定起始培养密度的单细胞，从开始培养到细胞数目和总重量增长停止这一过程，称为一个培养周期。

接种初期的细胞密度过低会使延迟期加长，悬浮细胞的起始密度一般在  $(0.5 \sim 2.5) \times 10^5$  个范围内调整。

一般继代培养可降低密度；若在短时间内获得大量细胞可提高接种密度。

在实际应用中，还需要确定一些参数：**最低起始密度、最大生长速率、每个培养周期所经历的天数等**。

这条 S 型曲线常因植物种类、培养细胞品系、再培养的频率、最初的接种密度、培养基的不同而变动（延迟期长短取决于继代时细胞的生长期和接种的胞数量，缩短继代时间（2-3 天）可使一直保持对数生长，静止期保存太长导致细胞死亡

- 成批培养中，细胞繁殖一代所需的最短时间：烟草 48h，蔷薇 36h，菜豆 24h，假挪威槭 40h。

- 继代应在细胞生长的 **停止期前进行**

- 成批（分）培养**：用于植株再生或理论研究，高等植物细胞培养中的生长和细胞分裂的生理生化研究工作，大多数是用成批培养法来进行的。

## （二）半连续培养

是成批培养的频繁继代再培养，即定期地将旧的培养液倒出一次，同时再加入一次新鲜培养基，使培养物稀释到培养初期的浓度范围，细胞又开始新的增殖，增殖速度与上代相同，如此反复继代，细胞生长量便可稳定增加，从而得到大量均一的培养细胞。

## （三）连续培养

在细胞培养过程中，不断加入新鲜培养基，培养液中的营养物质能够连续得到补充，培养物的容积一般是恒定的，连续培养又分为封闭式和开放式两种。

- 1、封闭式连续培养：在培养过程中取出细胞，由于细胞连续生长，密度会不断提高，同时新鲜培养基的注入量和陈旧培养液的排出量相等，使培养系统中的营养物质的含量总是超过细胞生长需要量，在排出的旧液中含有许多细胞，离心收集后仍放回原培养系统，以保证细胞数量的不断增加，直到氧气供应不能满足细胞进一步生长需要为止。

- 2、开放式连续培养：连续培养时，新鲜培养液的注入速度等于培养液的流出速度，培养细胞随着培养液一起流出，流出速度恒定，当处于稳定状态时，流出细胞的速率等于培养系统中新细胞增长的速率，二者达到动态平衡，速度控制方法：

- （1）常用化学衡定法：按固定速率加入对细胞生长起限制作用的营养物质(如 N, P, 糖)，使细胞增长速率和细胞密度能够维持稳定，此方法常用于次生物质的大量生产，以及细胞分化，器官再生的研究。

- （2）浓度衡定法：先选定一种细胞密度，当培养系统中的细胞数量的增加达到规定的临界值，培养物发生显著混浊时，注入新鲜培养基，而超过规定密度的细胞也随排出液一起流出，故能使细胞密度保持恒定，此法在研究细胞代谢调节中有特殊作用。(排出的细胞，不放回原培养系统)

## 连续培养的特点：

- （1）新鲜培养基的不断加入，保证了养分的充分供应；
- （2）可使细胞保持在增殖旺盛的对数生长期中；
- （3）适于大规模工业化生产

#### （四）愈伤组织的再形成

将细胞悬浮液(分化培养基)置于 110 转/分的转床上, 在 25-26℃, 光下振荡培养, 开始每隔 2-3 天倒出一部分旧的培养液, 补充同样成分的新鲜培养基, 以后每隔 4-5 天补充一次培养基, 连续振荡培养三周, 从第二周起就有细胞团出现, 到第三周新的愈伤组织大量形成。

#### （五）植株再生

当愈伤组织的直径长到 1.5-2.5mm 时, 转入去掉 2,4-D、或减少 2,4-D 用量的固体培养基中, 诱导芽和根或胚状体的分化, 培养到第六周时, 即可得到完整的再生植株。

## 第八章 种质保存

### 一、种质资源保存的一般概念

**种质:** 指亲代通过生殖细胞或体细胞传递给子代的遗传物质

**种质保存:** 利用天然或人工创造的适宜环境, 使个体中所含有的遗传物质保持其遗传完整性, 高活力, 能通过繁殖将遗传物质传递下去。

**种质保存: 原地保存和异地保存两种方式。**

**1. 原地保存:** 指在自然生态环境下, 就地保存, 自我繁殖种质。

这种方式不仅可以保存种质, 还可以保护不同的生态系统。如各类保护区的建立。世界第一个保护区是 1872 年美国建立的黄石公园。

**2. 异地保存:** 将种子、植物体保存于该植物原产地以外的地方, 主要形式有植物园、种质圃、种子库、组织培养物的试管保存(离体保存)等。

**种子保存**所占空间小并能保存多年, 且易于干燥和包装便于运输。但处于易受病虫害侵害; 遗传性状不稳定有些种子含水量高难于脱水保存。

**离体保存**是将单细胞、原生质体、愈伤组织、悬浮细胞、体细胞胚、试管苗等植物组织培养物储存在使其抑制生长或无生长条件下, 达到保存目的的方法。该法具有省时省力, 不受自然生态因素影响, 便于交流运输等优点。主要有低温保存和超低温保存两种方式

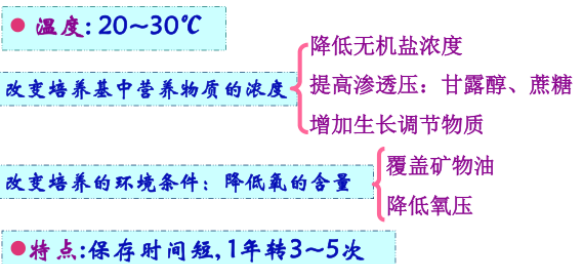
### 离体保存的意义:

可使一些无性繁殖作物种质资源低温长期保存, 避免资源的丢失。

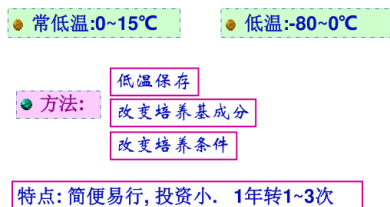
节省土地和劳力, 方法简单, 花费少并能在保存中脱毒。

一旦利用可快速繁殖; 也利于种质交换。

### 一、常温保存(离体)



### 二、常低温和低温保存



-80℃以下的低温称为超低温  
干冰温度(-70℃)称为极低温

一般 5~10℃适宜保存温带起源植物的试管苗 15~18℃可用于热带植物试管苗的保存。

适当缩短光照时间, 降低光照强度, 也能减缓材料的生长速度, 延长保存时间。但也要防止光照过弱使材料生长纤细, 形成弱苗。导致生长不能维持。

- 改变培养基成分, 在培养基中添加脱落酸、矮壮素和甘露醇等生长延缓剂和渗透剂。其中以对材料遗传稳定性影响小的甘露醇为最好, 培养基中加入较低含量的甘露醇可以明显提高材料的存活率。
- 低温保存的技术操作简单。以魔芋为例, 选取茎尖分生组织为外植体, 建立试管苗无性系; 选取生长健壮的、芽大小为

1.5cm 的材料移入保存培养基，于 25℃，光照度 1000lx，12h 条件下培养一周；转入 4℃黑暗中保存。材料每 6 个月继代培养一次，继代培养时，从形态、经济性状、生理生化等方面进行遗传稳定性鉴定。

### 三、超低温保存

超低温保存：也叫冷冻保存，指在-196℃的液氮超低温下使细胞代谢和生长处于基本停止的状态，在适宜条件下可繁殖，再生出新的植株，并保持原来的遗传特性。

超低温保存植物种质资源的程序包括培养材料的准备、预处理、冰冻及保存、化冻处理、细胞活力和变异的评价、植株再生等几个步骤。

#### 超低温保存的程序



#### 1、冷冻的方法：快速冷冻法、慢速冷冻法、分步冷冻法、干燥冷冻法

##### (1) 快速冷冻法

本法是将植物从 0℃或其他预处理温度直接投入液氮。其降温速度在每分钟 1000℃以上。在降温冷冻过程中，从-10℃到-140℃是植物体内冰晶形成和增长的危险温度区，在此以下冰晶不再增生。因此，快速冷冻成功的关键在于利用超速冷冻，使细胞内的水迅速越过冰晶生长的危险温度区。细胞内的水形成“玻璃化”状态。采用快速冷冻方法，要求细胞体积小，细胞质浓厚，含水量低，液泡化程度低的材料。如：高度脱水的种子、花粉、球茎或块根，茎尖分生组织等

##### (2) 慢速冷冻法

本法是以每分钟 0.1~10℃的降温速度（一般 1~2℃/min）使材料从 0℃降至-10℃左右，随即浸入液氮，或者降至-196℃。在此条件下可以使细胞内的水有充足的时间不断地转移到细胞外结冰，从而使细胞内的水分减少到最低限度，避免在细胞内结冰。本法适用于成熟的、含有大液泡和含水量高的细胞，对于保存在悬浮培养中的细胞特别有效。

##### (3) 分步冷冻法

此法是指植物的组织和细胞在放入液氮前，经过一个短时间的低温锻炼。可分为两步冷冻法和逐级冷冻法两种。

##### a. 两步冷冻法

此法实际是慢速冷冻法和快速冷冻法的结合。它的第一步是采用 0.5-4℃/min 的慢速降温使温度从 0℃降至-40℃；第二步是投入液氮迅速冷冻。植物材料在第一步冷冻后，必须停留一段时间，使材料充分脱水。材料悬浮培养细胞和愈伤组织的冷冻保存多使用此法。

##### b. 逐级冷冻法

此法是在程序降温仪或连续降温冷冻设备的条件下采用的一种冷冻保存方法，一般先制备不同等级温度的溶液。如-10℃、-15℃、-23℃、-35℃、-40℃等。植物材料经冷冻保护剂在 0℃处理后，逐级通过这些温度。在每一级别温度中停留一定时间（4-6min）然后浸入液氮。这种方法使细胞在解冻后呈现较高的活力。

##### (4) 干燥冷冻法

此法是将植物材料置于 27~29℃烘箱内，使其含水量由 72-77%降至 27-40%后，再浸入液氮，可以使植物材料免遭冻死。用真空干燥法使细胞脱水则效果更好。

### 2、解冻方法

#### (1) 快速解冻法

把冷冻材料直接投入 37~40℃的温水中。解冻速度为 500~700℃/min。化冻后转入水槽中保存。材料解冻时的再次结冰危险区域是-50 至-10℃。该法可能尽快过这一区域。

#### (2) 慢速解冻法

把冷冻材料先置于 0℃下，然后逐渐升至室温，让其慢慢解冻。适用于细胞含水量较低的物种或材料。如木本植物的冬芽等。解冻方法的选择不仅与材料特性有关，还与冷冻时采用的方法有关。快速冷冻的材料也应快速解冻。同时还要注意材料的避免机械损伤；一旦解冻，就应把试管转至 20℃水浴中，并尽快洗涤材料和再培养，以免热伤害。

### 3、重新培养

将解冻的材料，重新置于培养基上使其恢复生长。如加了防护剂，则应当先将材料洗涤几次。以去除防护剂的毒害作用。但此过程中也将一些冷冻过程中细胞渗漏出来的对于培养有利的物质去除了，因此有时不去除防护剂也可。

此外，在再培养早期，一般有一个生长停滞期。它的长短取决于细胞的损伤程度、保护剂的浓度，也与植物材料和基因型有关。

#### 4、提高冷冻后细胞或组织存活率的方法

- (1) 植物材料的性质
- (2) 冷冻前的预处理：悬浮培养或继代培养、预培养、低温锻炼、冷冻防护剂
- (3) 解冻方法：快速解冻法、慢速解冻法
- (4) 重新培养

#### (1) 植物材料的性质

冷冻前材料材料的性质，包括物种、基因型、抗寒性、年龄、形态结构和生理状态等，都会对冷冻效果产生很大影响。一般来说，小而细胞质浓厚的分生组织或细胞，比大而高度液泡化的细胞容易存活。因此，应当选用频繁继代的愈伤组织材料。胚状体也以幼龄的球形胚存活率最高，心形胚次之，子叶胚最低。而较大的组织材料则仅有分生细胞可能重新生长。

#### (2) 冷冻前的预处理

##### a. 悬浮培养或继代培养

在悬浮培养中，可采用饥饿法使细胞分裂处于同步。增加指数生长期的细胞，能有效在提高保存活率。

方法为：先使细胞在不含磷酸盐的培养基中饥饿 4 天。再转入正常培养基中进行同步化。另外，在培养基中加入细胞分裂抑制剂如 5-氨基尿嘧啶、羟基脲和胸腺嘧啶核苷等。使细胞滞留在 G1 期和 S 期的边界上，去除抑制剂后，细胞即达成同步化。

##### b. 预培养

冷冻前对材料进行短暂培养可以提高冷冻处理后的存活率。一般加入 5%二甲基亚砷 (DMSO) 预培养 48h。将细胞适度脱水，也可提高存活率。

##### c. 低温锻炼

将植物茎尖在冷冻之前，放在 4℃ 下处理 3 天。可提高存活率。

##### d. 冷冻防护剂

冷冻防护剂可以防止细胞的溶液效应的毒害。它具备以下作用：降低冰点，促进过冷却和玻璃态化的形成；提高溶液的黏滞性，阻止冰晶形成；DMSO 可以使膜物质分子重新分布，增加细胞膜的透性，在温度降低时，加速细胞内的水流往细胞外结冰；稳定细胞内的大分子正常结构，特别是膜结构，阻止低温对膜的伤害。甘油、糖、糖醇类也是冷冻防护剂。DMSO 应当在 30 ~ 60min 的一段时间内逐渐加入以免对细胞产生毒害作用。脯氨酸是植物体内天然的防护剂。

## 5、 冷冻保存后细胞和器官活力的检测

最基本的活力检测方法是再培养法。根据组织细胞的复活程度、存活率、生长速度、组织块的大小和重量的变化，以及分化产生植株的能力和遗传性状来表达。

存活率 = 重新生长细胞（或器官）数目/解冻的细胞（或器官）的数目 × 100%

在冷冻和化冻期间受过不同程度损伤的细胞或器官也可能再生出完整的植株。这是由于培养材料再生出了次级的分生组织的原故。

## 6、 冷冻保存的应用前景

- 1) 长期保存种质的遗传稳定性。
- 2) 长期保存去病毒的种质。
- 3) 保持稀有珍贵及濒危植物的种质资源。
- 4) 保持不稳定性培养物，如单倍体。
- 5) 保持培养细胞形态发生的能力。
- 6) 防止种质衰老。
- 7) 延长花粉寿命，解决不同开花期和异地植物杂交上的困难。
- 8) 冷冻解冻过程可筛选抗逆新品种。
- 9) 便于国际间的种质交换。