

第4章 植物的器官培养 (P95)

概念:

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。

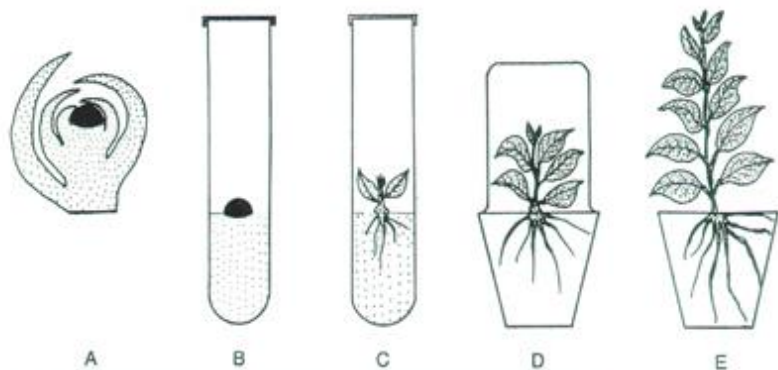
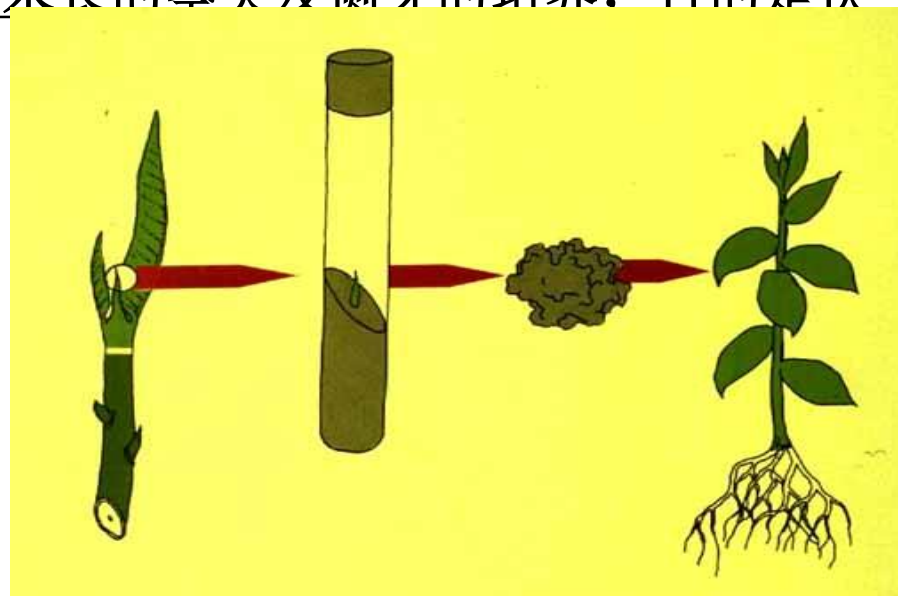


FIG. 8.3. Meristem-tip culture. (A) Apical meristem showing section to be excised. (B) Excised meristem tip cultured on agar medium. (C) Plantlet regenerated from excised meristem tip. (D) Plantlet transferred to sterile soil. (E) Virus-free plant growing in soil.



二、茎尖培养的作用

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：

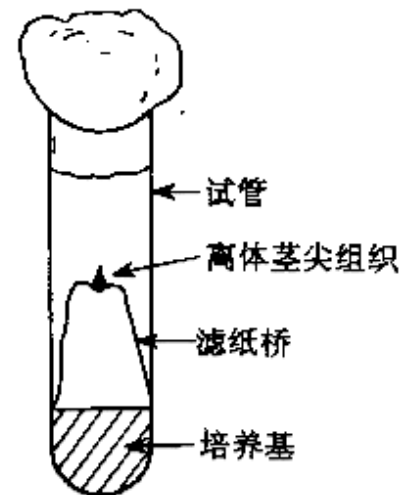
①固体培养法：试管培养

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 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。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。取比较长的新梢（如1cm以上）转入生根培养基，余下较短的新梢进行继代培养。

- 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。

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；

- 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**。

- 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。

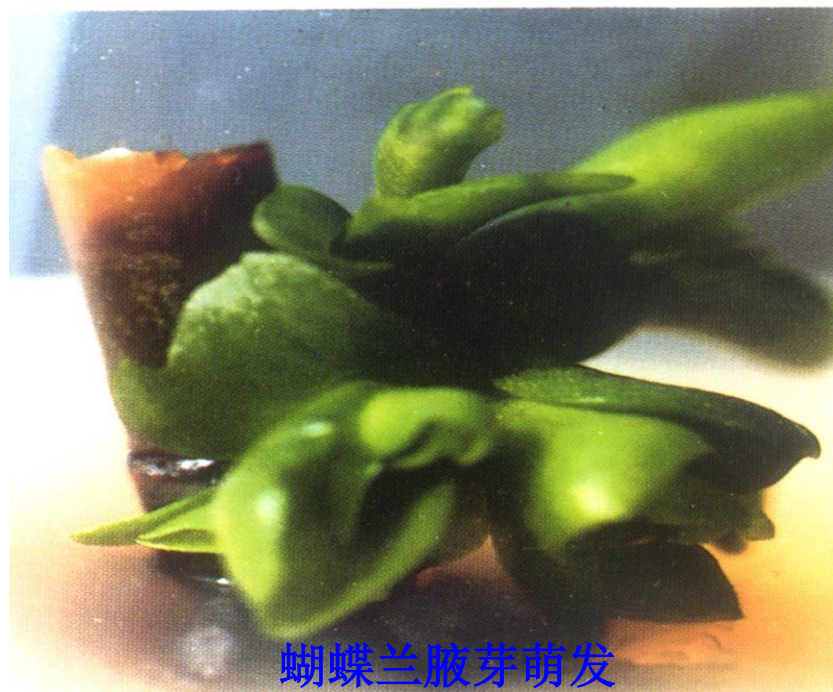
以后揭去拱棚的薄膜，并给予水分控制，少浇水或不浇水，促进小苗长得粗壮。

- **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。

§ 2 茎段培养(P101)



蝴蝶兰腋芽萌发

- **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；

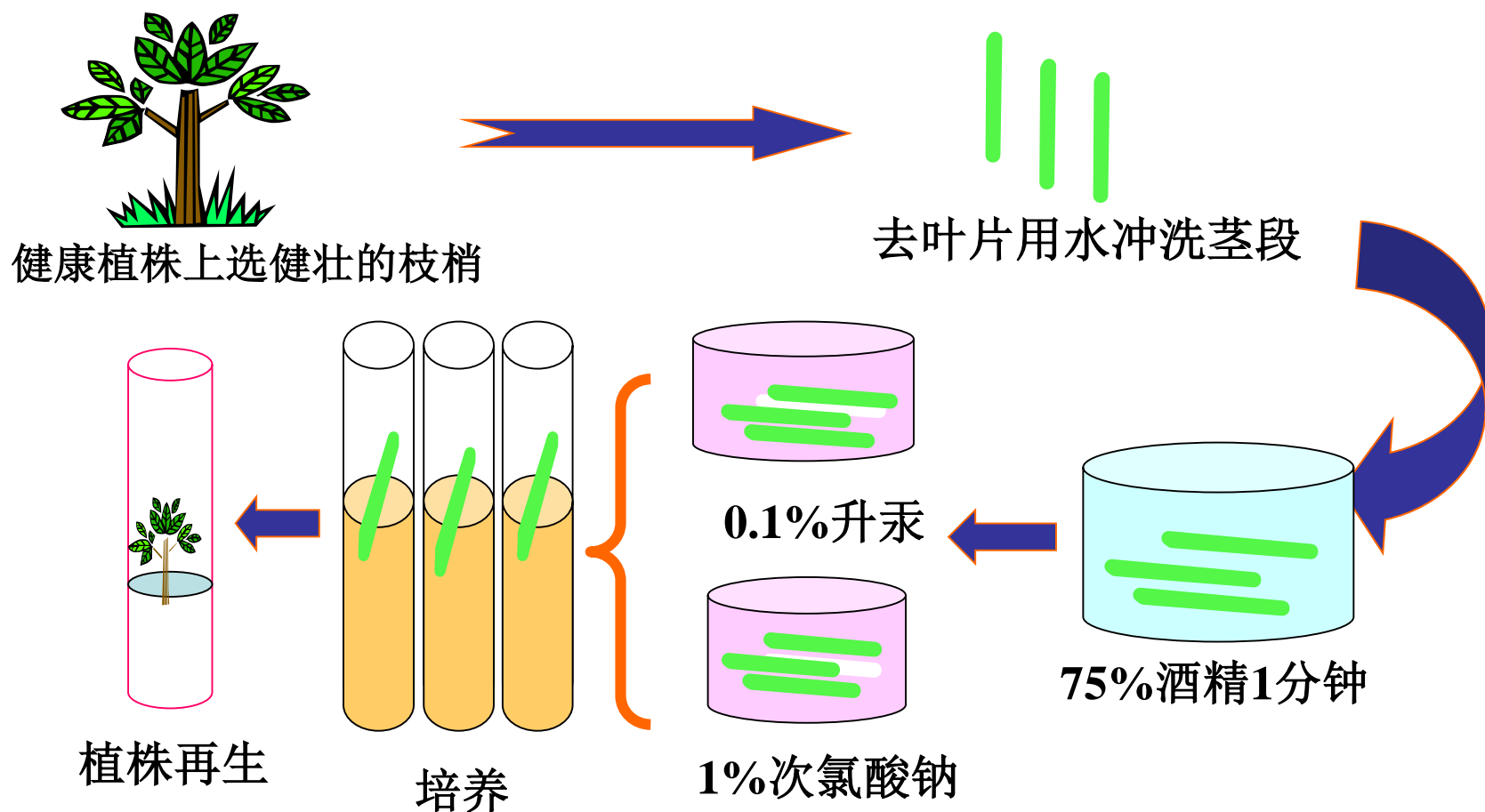
芽生芽方式增殖的苗木质量好，且无病，
性状均一。



(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。



3/12/2002



- 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**取芽，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，且对成功地移栽到盆钵中有良好作用。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

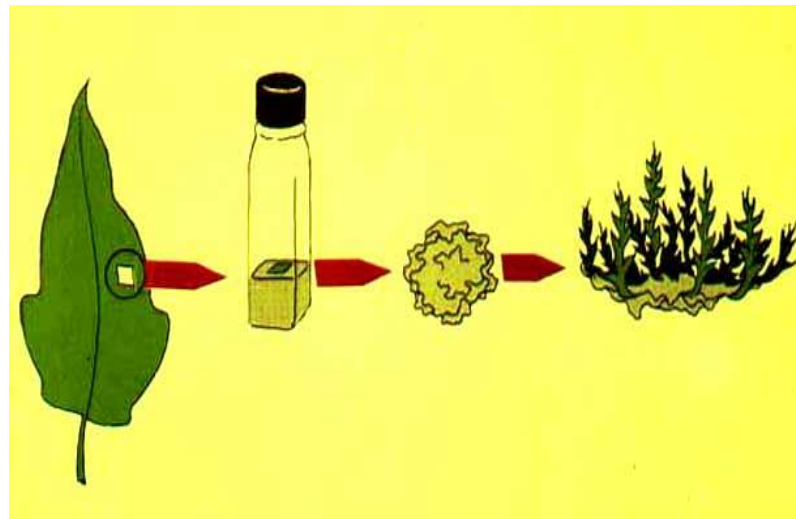
芽分化

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。



花烛叶片离体培养及植株再生

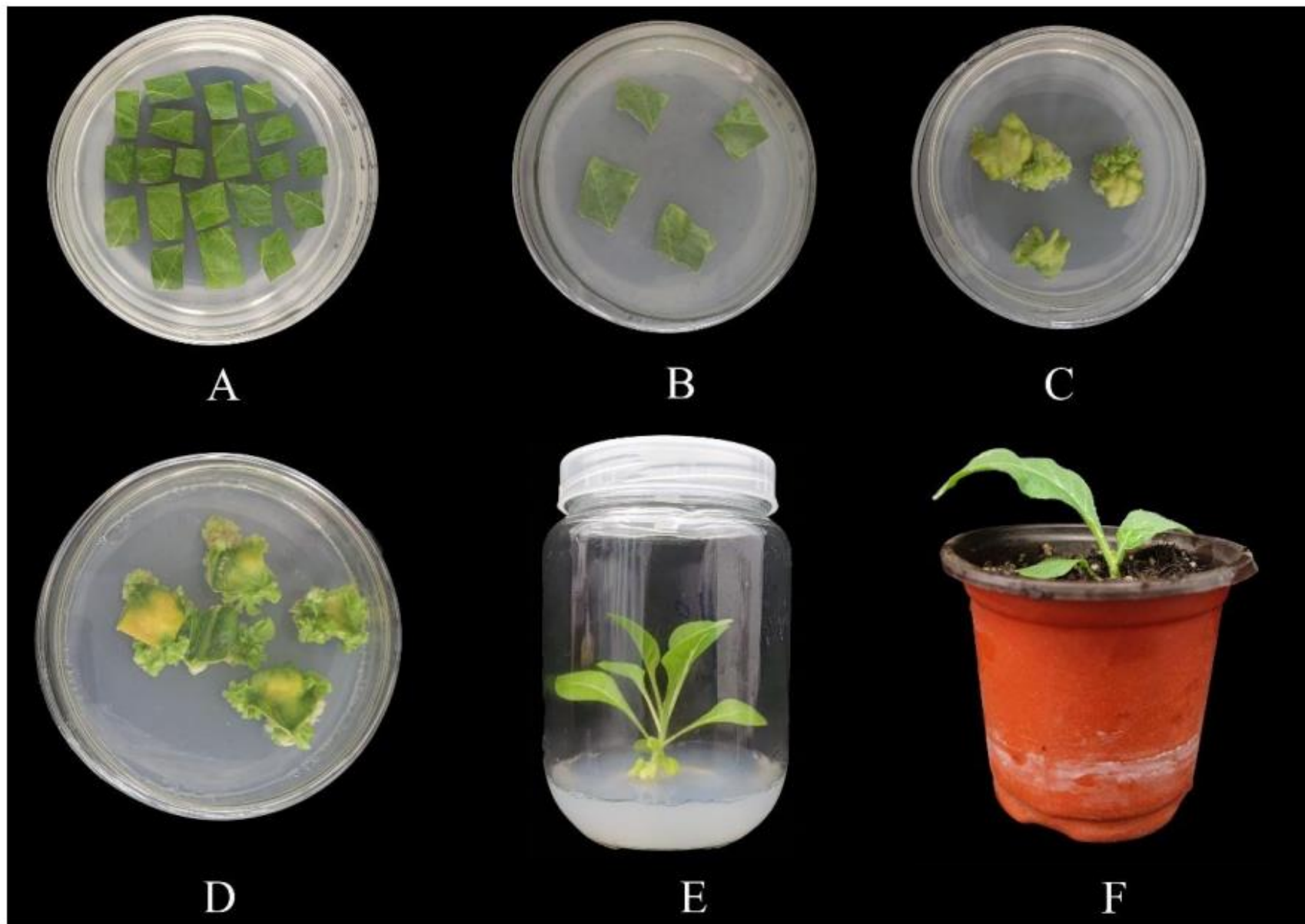
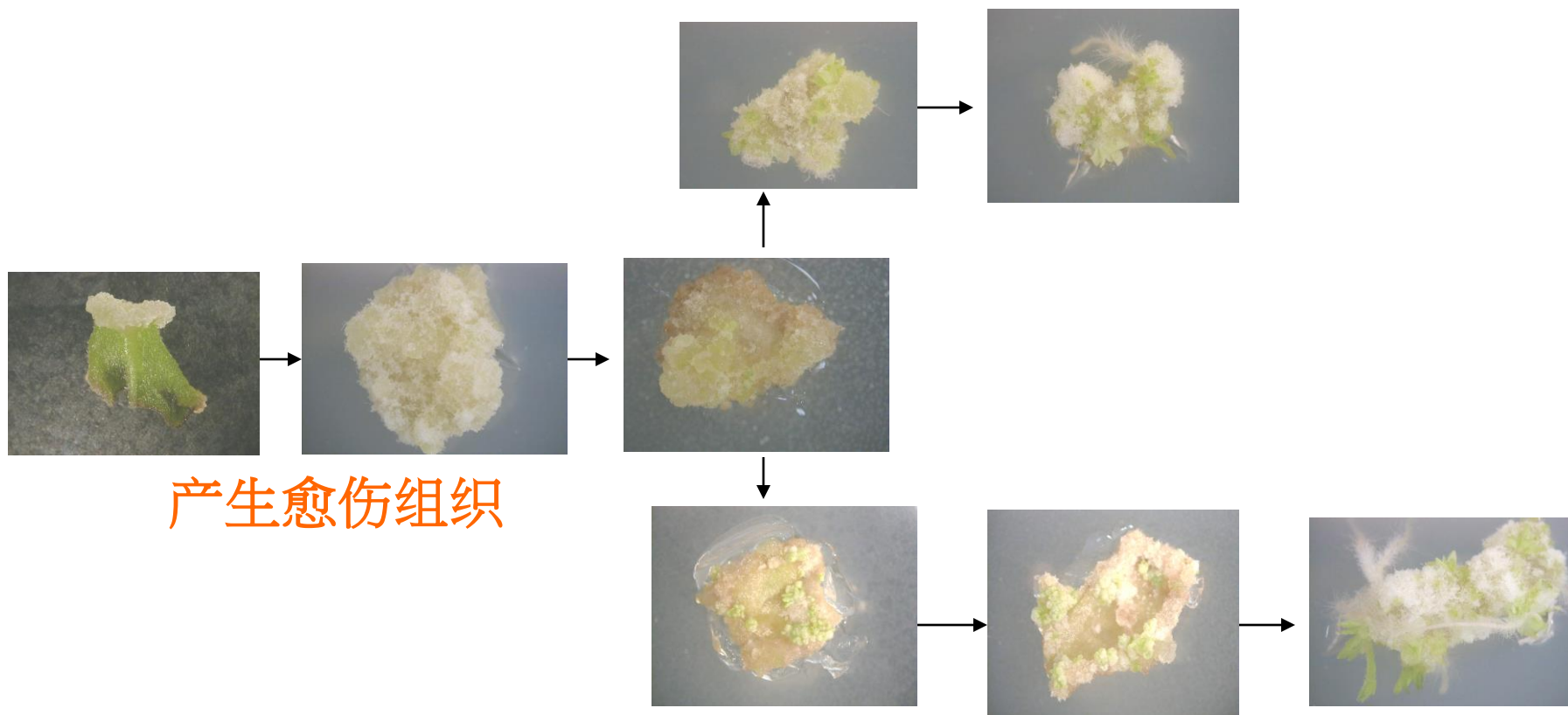


图4-1 通过农杆菌介导遗传转化红花烟草K326。(A) 叶盘法暗培48h；(B) 暗培48h后转移至筛选培养基；(C) 通过卡那霉素筛选诱导分化愈伤组织；(D) 诱导愈伤组织长芽；(E) 将愈伤组织转移至生根培养基中诱导芽长根；(F) 将通过叶盘法获得的植株移栽至培养基质中。

菊花叶片培养

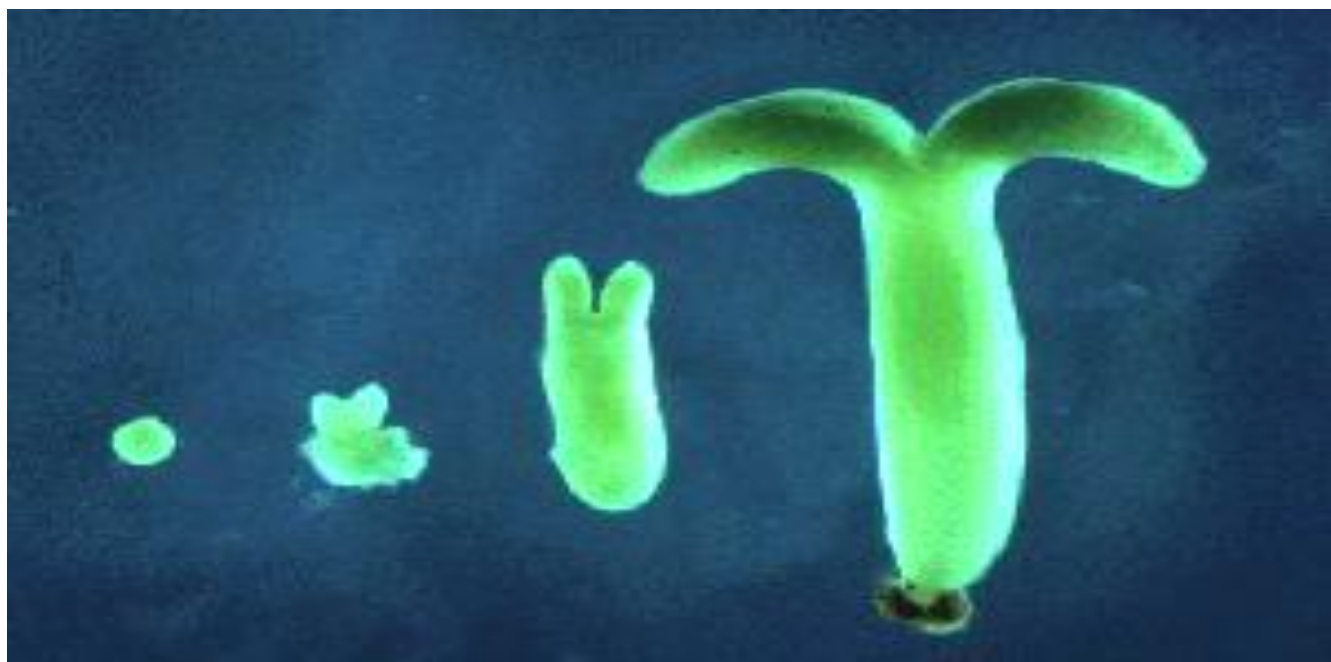
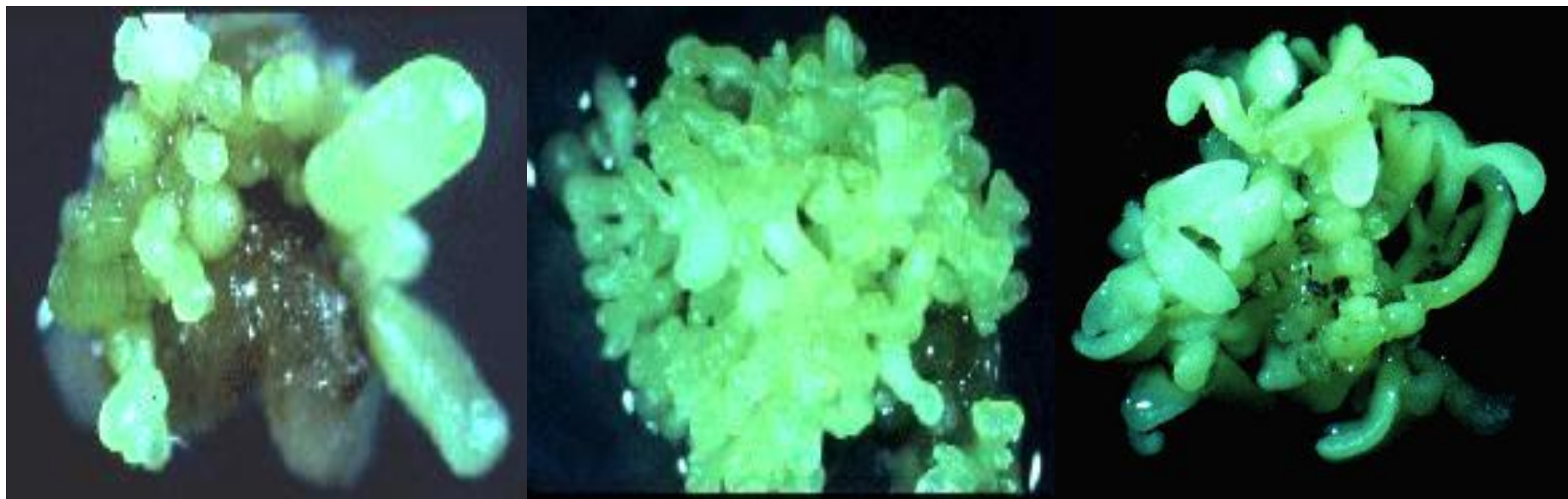
器官形成



胚状体



胚状体



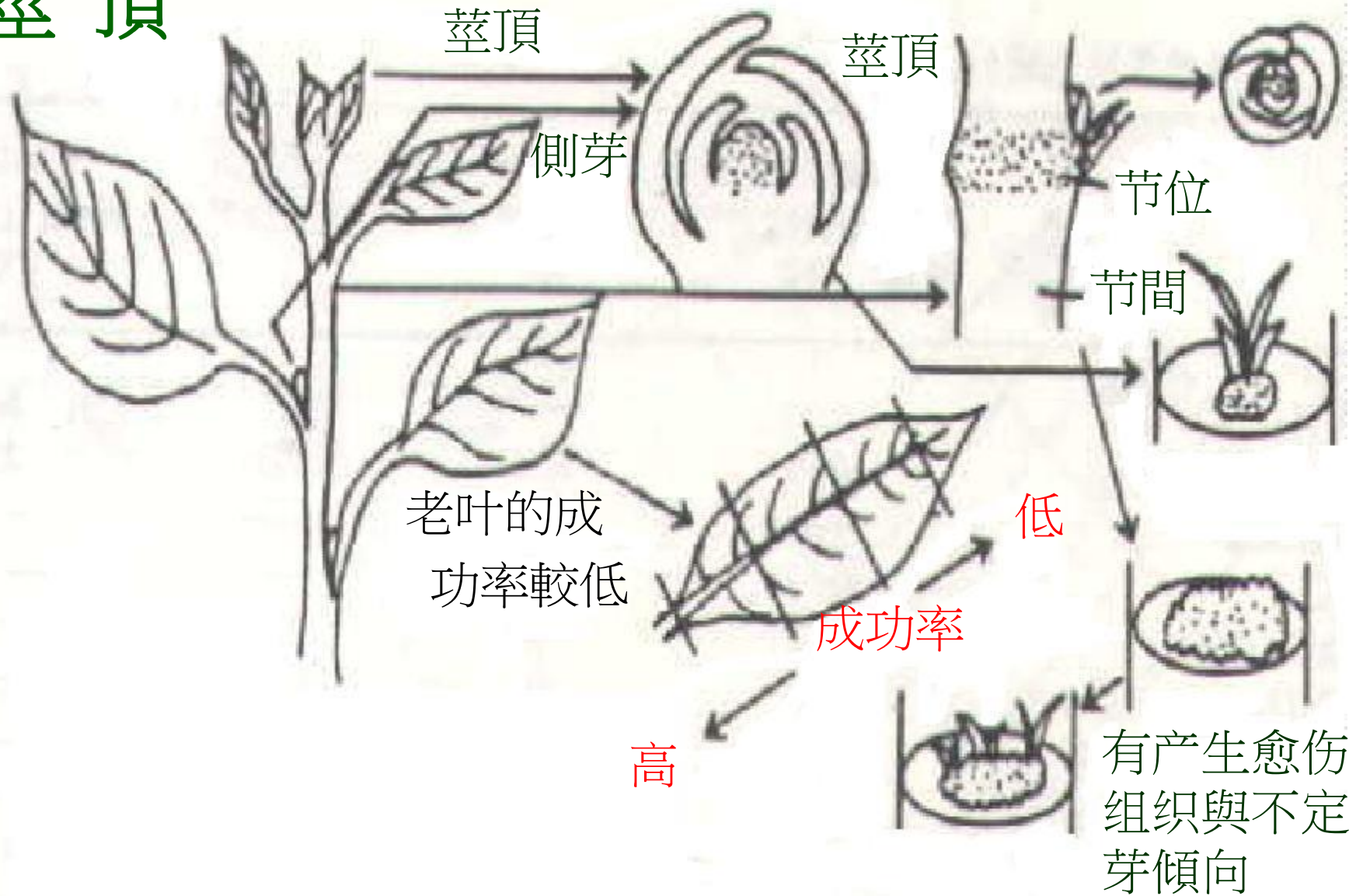
- 叶的培养比胚、茎尖和茎段培养难度大。

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

荠菜子叶：

	成苗率(%)
整个子叶	70.8
叶柄和部分子叶	12.5
叶柄	37.5

莖頂



§ 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、根细胞可再生成植株，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。

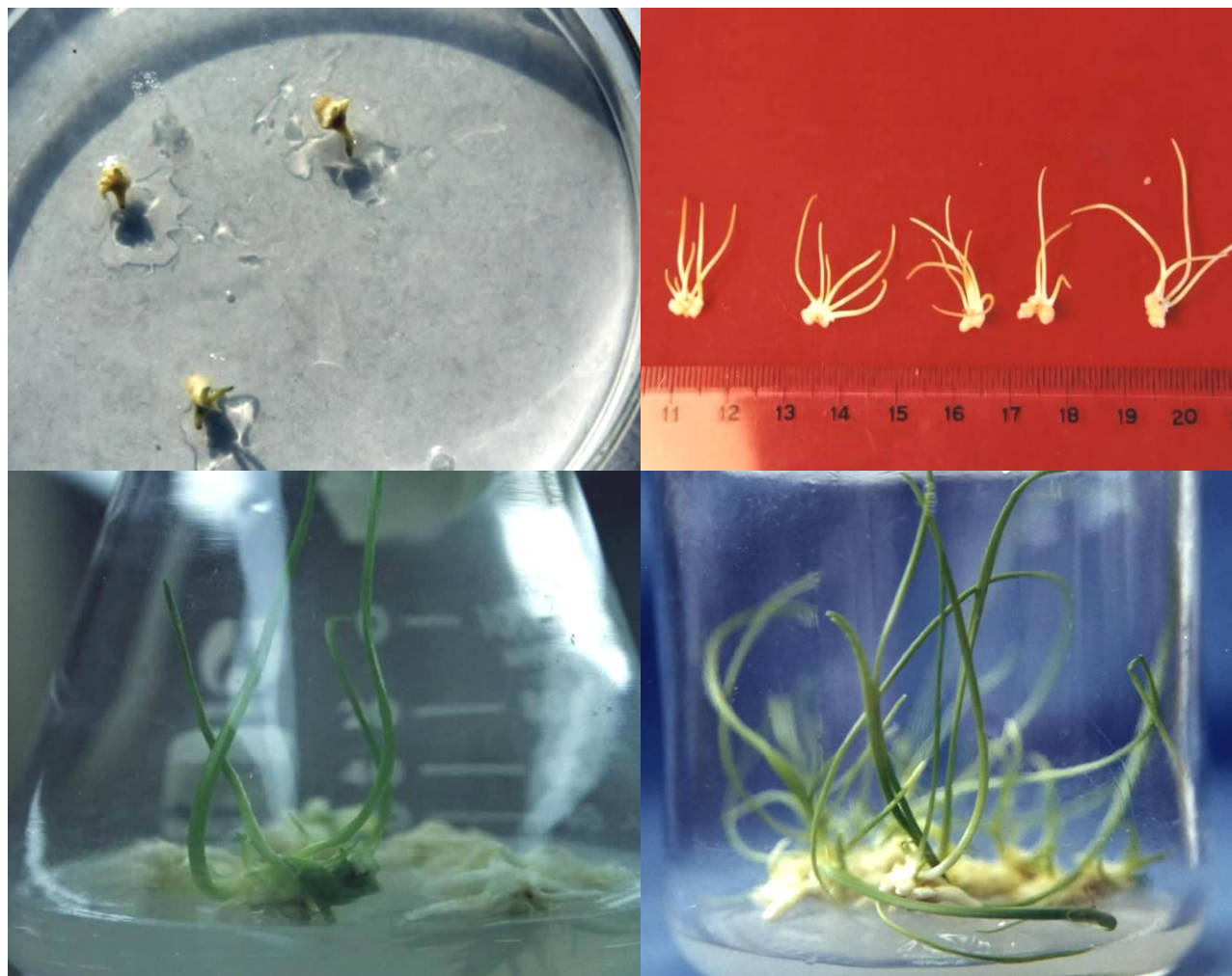
培养过程包括愈伤组织诱导、不定芽分化、无菌苗的增殖与生根等。

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℃**。

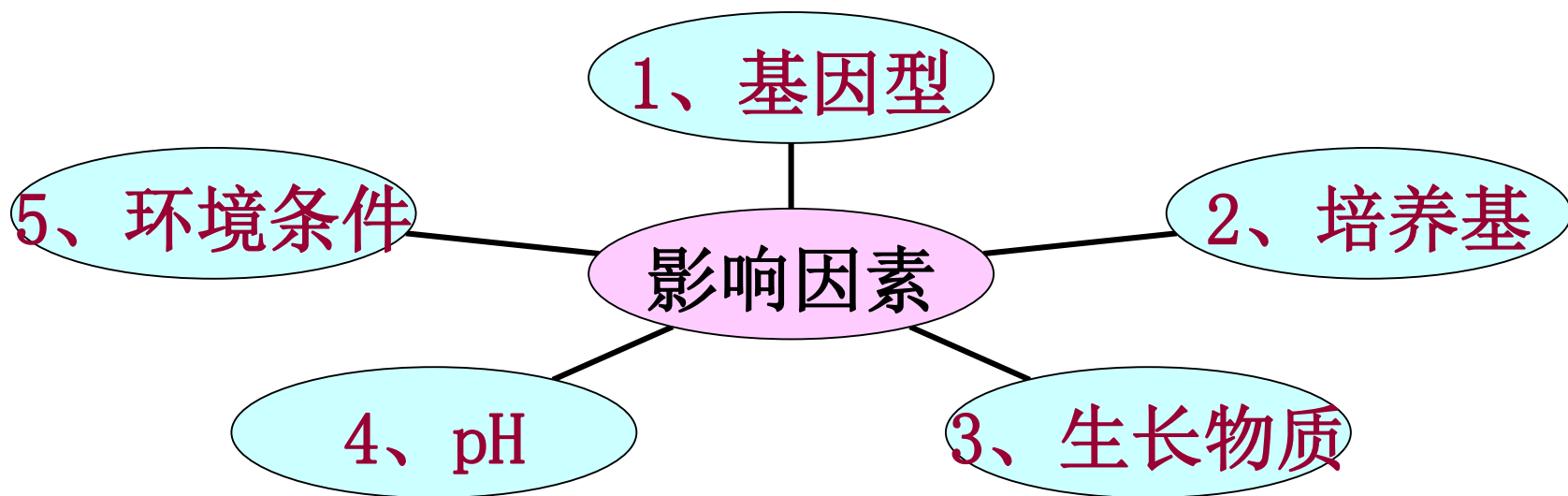


大蒜根尖培养及植株再生

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

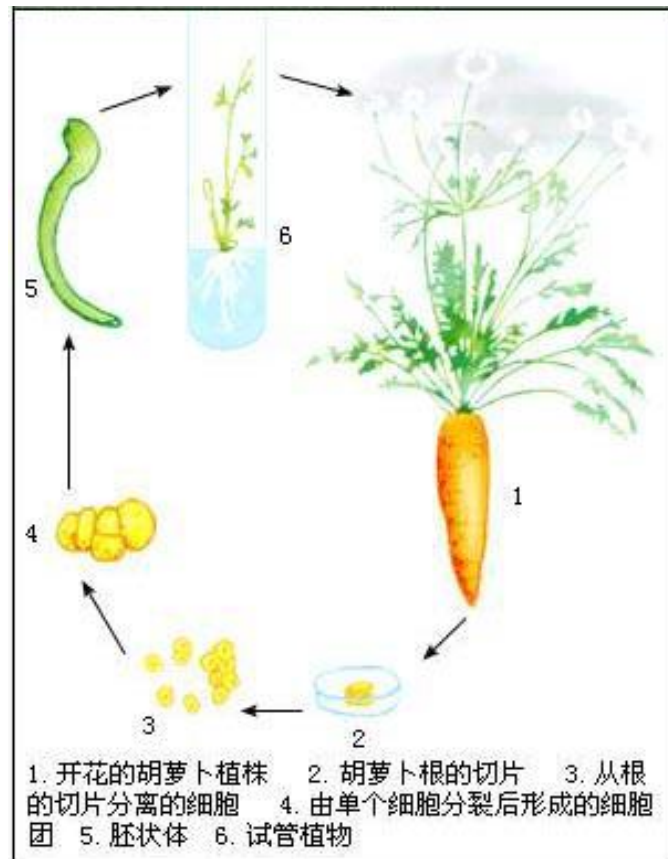
5、光照和温度 25-27℃

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 / L NAA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

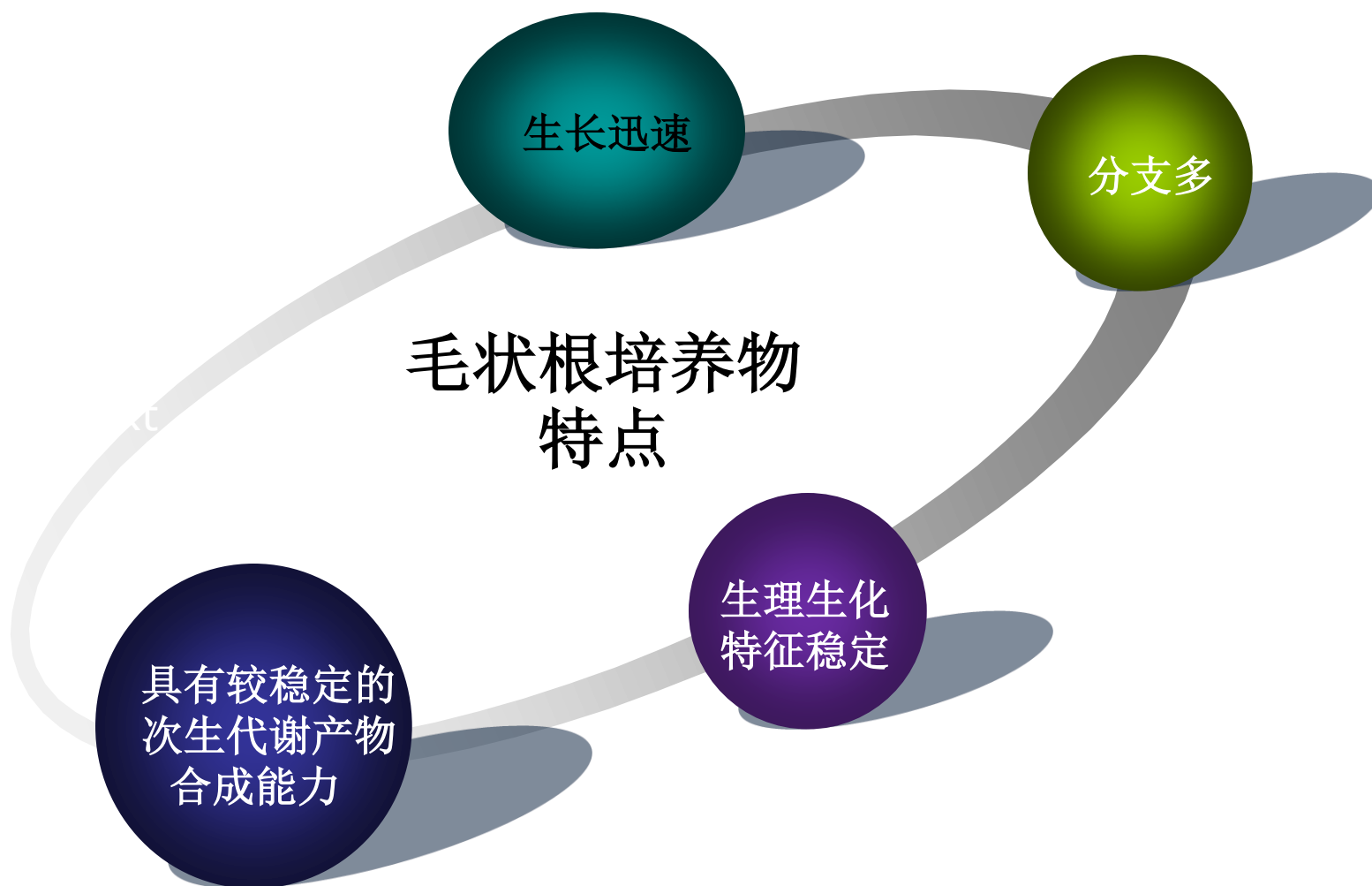
- **发根培养**，利用发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 感染植物的外植体使其产生毛状根，并对所产生的毛状根进行无菌培养的技术。
- 形态方面：Ri质粒诱导快速生长的、非定向性、高分支的毛状根的形成
- 代谢方面：Ri质粒转化根能合成与原植物相同或相似的次生代谢物，并且发根合成次生代谢物具有遗传稳定性。



毛根狀培養



毛状根培养物的特点



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

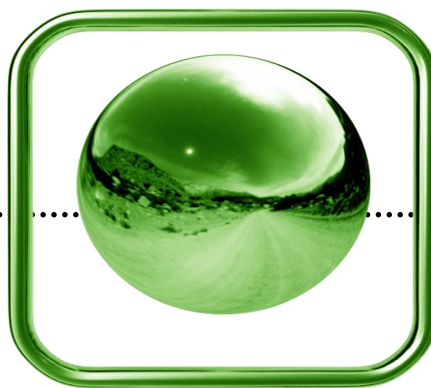
- 例：利用生物反应器培养植物毛状根生产青蒿素

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

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。

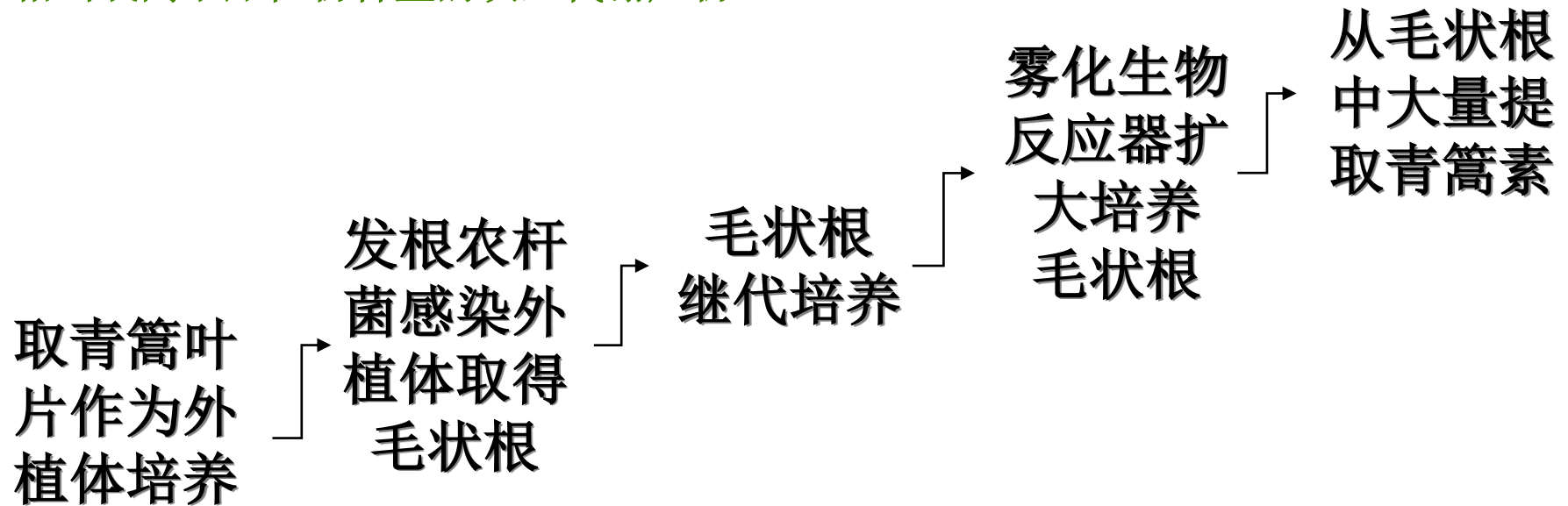
想要获得青蒿素



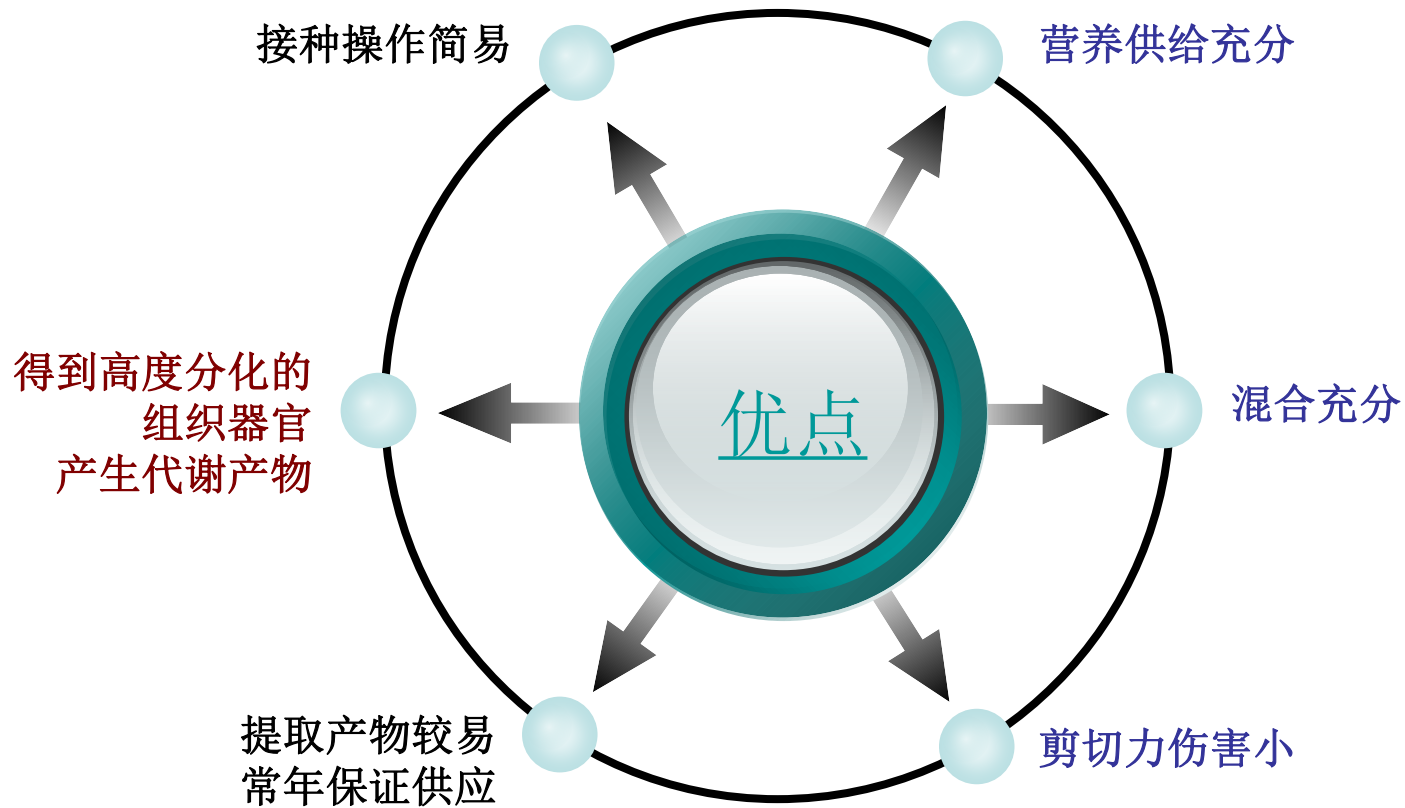
方法二：
植物细胞培养
取青蒿的愈伤组织进行培养，获得大量细胞群，再从细胞中提取青蒿素。

植物组织培养过程

毛状根具有生长迅速和遗传稳定以及能在无激素的培养基上生长的特点,它能够合成与原植物含量相当或高于原植物含量的次生代谢产物



植物组织培养用于 植物生长次生代谢产物的优点



优点分析

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。

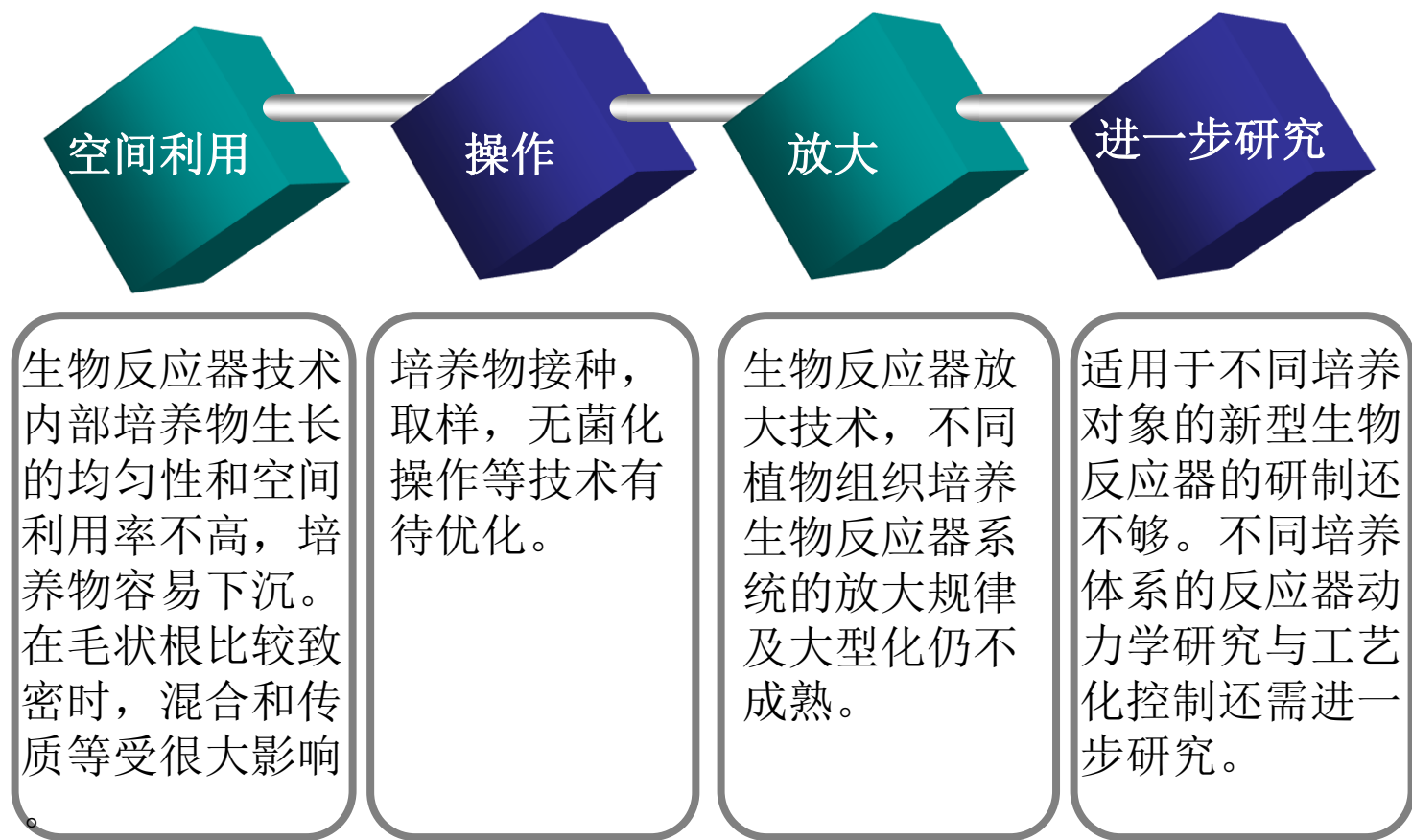
营养供给充分

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。

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

植物组织培养手段

共同点

植物细胞培养手段

可生产高度分化的细胞合成的次生代谢产物

具有比较稳定的次生代谢产物的合成能力

大规模生物反应器培养工艺尚不是很成熟

不受环境限制
快速高效
排除病虫害

对剪切力敏感
放大培养会造成
产量下降

次生代谢产物积聚与
细胞生长基本同步
有效监控全过程

通过改变培养条件和
细胞系筛选可以得到
高产量的代谢物

对产物相关积累的机制途径尚不很清楚, 很难维持最佳培养条件

- 我国在红豆杉发根诱导方面也取得了突破性的进展，1997年，黄遵锡等用发根农杆菌A4(ATCC3 1789)菌株从短叶红豆杉的芽外植体诱导出毛状根，并证明所选育出的红豆杉毛状根的优良株系的紫杉醇(抗癌)含量是愈伤组织的1.3～8.0倍，生物量平均增加约9倍

表1 已经报道建立毛状根培养体系的药用植物

药用植物	受体	菌株	培养条件	研究结果	文献
人参 <i>Panax ginseng</i> C. A. Me	根尖	15834	MS ₀ , B5, 6, 7 - V 及 White 筛选	培养在 MS ₀ 培养基的生长速度远远高于其他 3 种培养基, 6 周后其干重增加到 83.90 倍, 总皂苷含量达到 4.850%, Re + Rg 含量达到 0.3127%, 在 6, 7 - V 培养基中人参毛状根几乎没有生长	[3]
盾叶薯蓣 <i>Dioscorea zingiberensis</i> G. H. Wri	根	A4, R1601	1/2M 液体培养基, 28℃, 3500lux 弱光条件	建立毛状根快速繁殖技术, 转基因获得的毛状根其薯蓣皂甙元的含量分别是微块茎、愈伤组织和植物体合成量的 5.68 倍、6.12 倍、2.68 倍	[4]
北五味子 <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.)	嫩叶, 叶柄, 嫩茎	pRi1724 pRiA13 pRi15834	YEB 液体培养基中, 摇床上, 28℃, 180r/min 过夜培养	同一感染源浸染不同外植体筛选频率也不同, 诱导频率大小依次为嫩茎、叶柄、嫩叶	[5]
长春花 <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	叶片	A ₄ R ₁ 00	黑暗, (25 ± 1℃, MS 培养基)	毛状根中的总生物碱含量高于长春花的原植株和愈伤组织。	
高山红景天 <i>Rhodiola sachalinensis</i> A. Bor	叶片, 子叶, 叶节	R1601 ATCC15834A4	以 1/2Ms 液体, 散射光、20℃ 左右、PH 值 4.5 ~ 4.8	ATCC15843 浸染力最强, 当添加乙酰丁香酮和烟草浸出液时毛状根诱导率提高, 出根数增加, 生长较好, 子叶较子叶节易被感染。	[7]

药用植物	受体	菌株	培养条件	研究结果	文献
<i>Sonchus oleraceus</i> L. var. <i>officinalis</i>	根	15834	MS ₀ 培养基, 28℃, 3500lux 弱光, 150r/min 振荡培养	毛状根的生长速度远远高于其他 3 种培养基, 6 周后其干重增加到 83.90 倍, 总皂苷含量达到 4.850%, Re + Rg 含量达到 0.3127%, 在 6, 7 - V 培养基中人参毛状根几乎没有生长	[3]
<i>Adiantum species</i> L.	根	A4	1/2M 液体培养基, 28℃, 3500lux 弱光	建立毛状根快速繁殖技术, 转基因获得的毛状根其薯蓣皂甙元的含量分别是微块茎、愈伤组织和植物体合成量的 5.68 倍、6.12 倍、2.68 倍	[4]
<i>Rhodiola algosa</i> (Turcz.) G. Don	嫩叶, 叶柄, 嫩茎	pRi1724 pRiA13 pRi15834	YEB 液体培养基中, 摇床上, 28℃, 180r/min 过夜培养	同一感染源浸染不同外植体筛选频率也不同, 诱导频率大小依次为嫩茎、叶柄、嫩叶	[5]
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	叶片	A ₄ R ₁ 00	黑暗, (25 ± 1℃, MS 培养基)	毛状根中的总生物碱含量高于长春花的原植株和愈伤组织。	
<i>Rhodiola sachalinensis</i> A. Bor	叶片, 子叶, 叶节	R1601 ATCC15834A4	以 1/2Ms 液体, 散射光、20℃ 左右、PH 值 4.5 ~ 4.8	ATCC15843 浸染力最强, 当添加乙酰丁香酮和烟草浸出液时毛状根诱导率提高, 出根数增加, 生长较好, 子叶较子叶节易被感染。	[7]

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

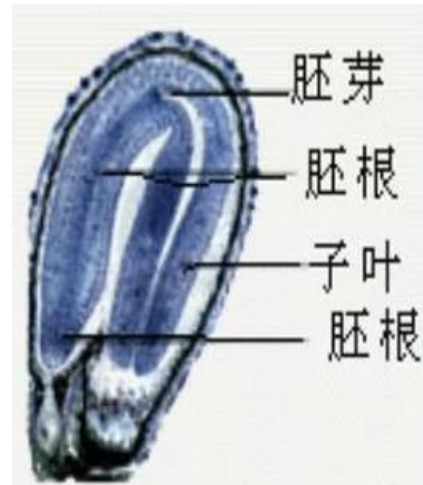
§ 5 植物的胚胎培养(P112)

一、植物的胚胎培养概念：

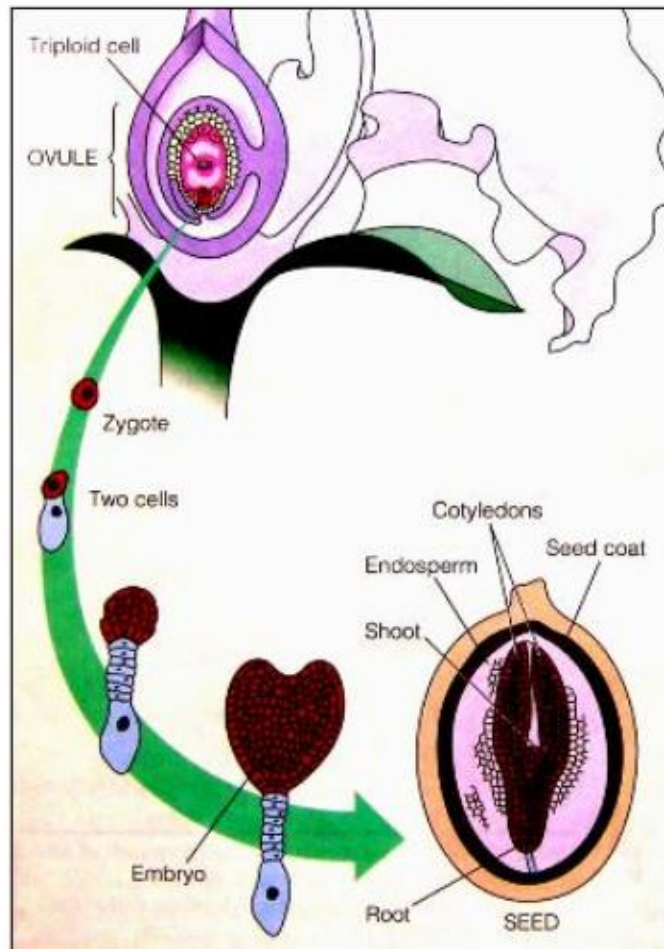
正常有性生殖过程中，精卵结合为合子，合子细胞经过多次分裂产生胚，胚的发育经过球形胚→心形胚→鱼雷形胚→子叶形胚等阶段，最后长成完整的植物，成熟胚具有胚芽，胚根、胚轴和子叶。

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。

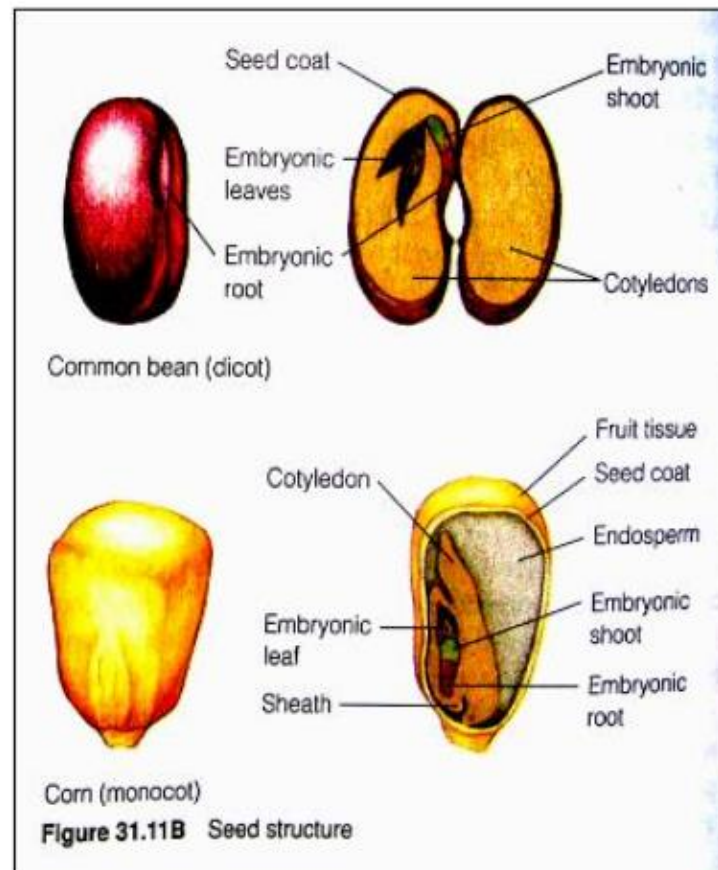
包括**幼胚**培养、**成熟胚**培养、**胚乳**培养、**胚珠**培养以及**子房**培养等。



胚的发育

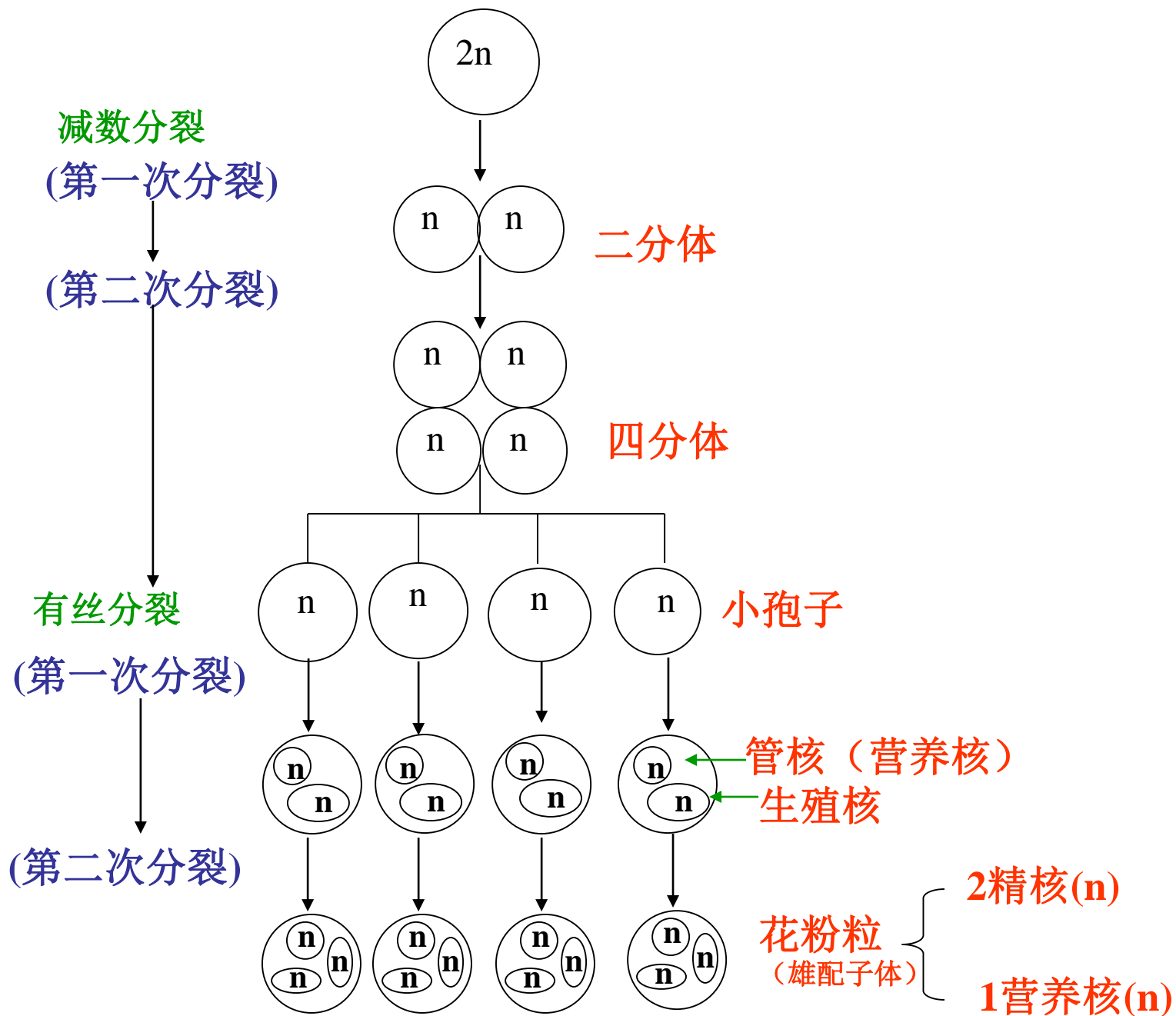


种子的结构

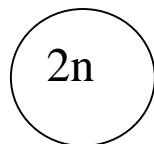


小孢子母细胞（花粉母细胞）

雄配子的形成

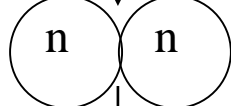


大孢子母细胞 (胚囊母细胞)



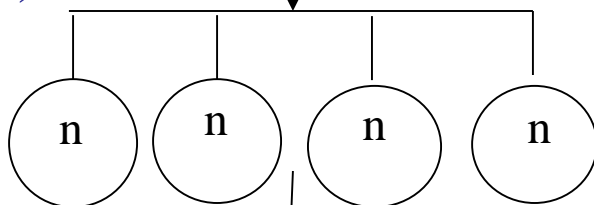
减数分裂

(第一次分裂)

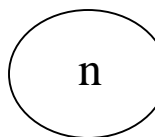


二分裂

(第二次分裂)



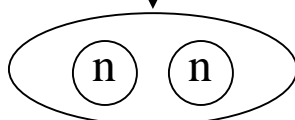
四分体



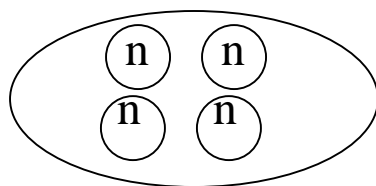
大孢子(其它三个退化)

有丝分裂

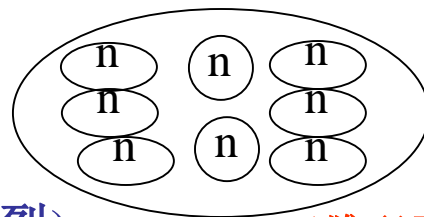
(第一次分裂)



(第二次分裂)



(第三次分裂)



胚囊

(雌配子体)

1卵细胞(n)

2极核(n)

2助细胞(n)

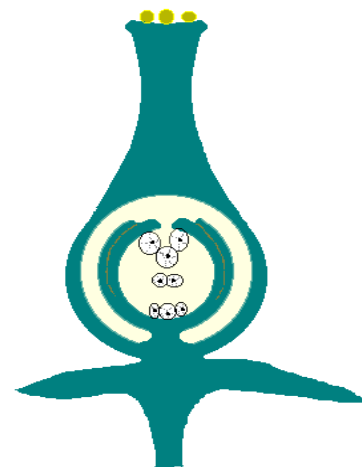
3反足细胞(n)

雌配子的形成

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）



- | 1904年的Haning最早成功地培养了萝卜和辣椒的胚，并萌发形成小苗
- | 30年代成功地把兰科植物的胚培养成小植株。
- | 40年代在苹果、桃、柑桔、梨、葡萄、山楂、马铃薯、甘蓝与大白菜的种间杂种的胚胎培养、胚乳培养及子房与胚珠培养均取得了不同程度的进展。

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天的蒴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 to 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℃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，F₁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。

荠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。

荠菜幼胚在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。赤霉素对荠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

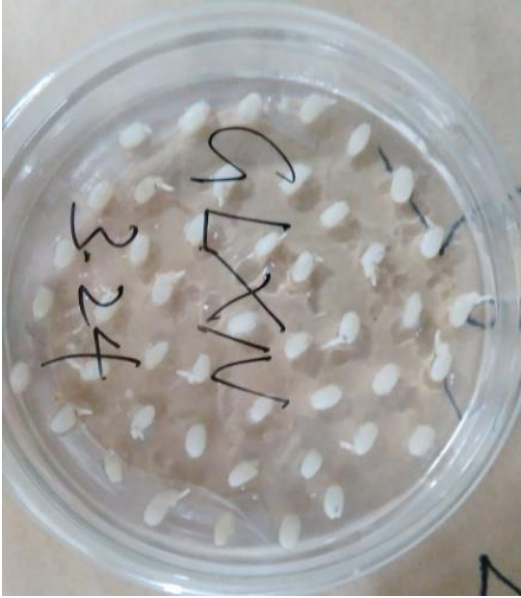
如以NaCl（0.2-0.4%）、甘露醇（1.125-5.5%）代替一部分蔗糖也同样影响胚胎生长。

(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

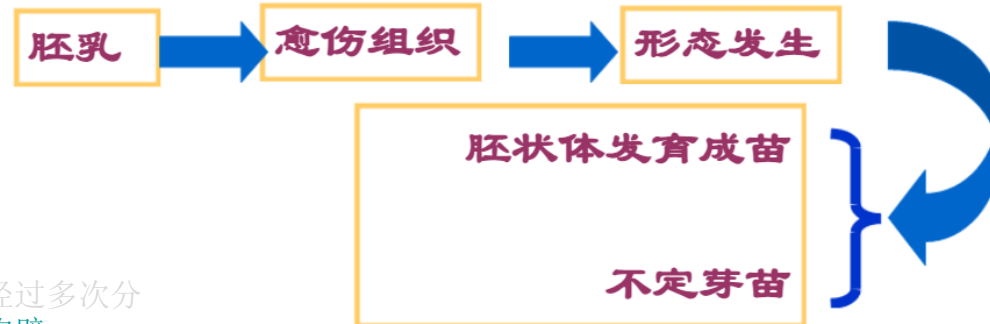
指处于细胞期的胚乳组织的离体培养。

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%

罗氏核实术：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。

紫杉醇是FDA批准的抗癌药物，已用于治疗多种癌症。紫杉醇属于红豆杉属二萜类化合物紫杉烷类化合物，已报道其结构超过500种。尽管紫杉醇在临床应用方面取得了成功，但由于紫杉醇的在红豆杉中的丰度较低，促使人们广泛研究可替代和可持续的生产方法。



- 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，经长根成植株，用于繁殖。

表2 植物生长调节剂对君子兰花瓣外植体愈伤组织诱导及分化的影响

Table 2 Effects of plant growth regulators on induction and differentiation of petals
explants in *Clivia miniata* Regei 'Youjiang'

培养基号 No. of media	浓度 Concentration (mg · L ⁻¹)				接种外植体数 Number of explants incubated	形成愈伤组织的外 植体数 Number of explants induced	诱导率 Rate of callus induction (%)	分化成苗的外植体数 Number of explants differentiated	分化率 Rate of differentiation (%)
	2,4-D	BA	NAA	IBA					
1		1.0	1.0	1.0	50	0	0.0	0	0.0
2		1.0	3.0	1.0	48	0	0.0	0	0.0
3	2.0	4.0	0.5		56	5	8.9	2	40.0
4	2.0	2.0	0.5		49	7	14.2	3	42.8
5	2.0	1.0	0.5		45	7	15.6	4	57.1

表 5 不同花蕾大小对君子兰花瓣外植体愈伤组织诱导和分化的影响

Table 5 Effects of size of flower buds on induction and differentiation of petal explants

of *Clivia miniata* Regei 'Youjiang'

花蕾长度 Length of flower buds (cm)	接种外植体数 Number of explants incubated	形成愈伤组织的外植体数 Number of explants induced	诱导率 Rate of callus induction (%)	分化成苗的外植体数 Number of explants differentiated	分化率 Rate of differentiation (%)
0.1 ~ 0.5	64	2	3.1	0	0.0
0.6 ~ 1.0	45	7	15.6	4	57.1
1.1 ~ 1.5	50	2	4.0	0	0.0
1.6 ~ 2.0	56	0	0.0	0	0.0

表3 蔗糖浓度对君子兰花器官外植体愈伤组织诱导及分化的影响

Table 3 Effects of concentration of sucrose on induction and differentiation of three floral organ explants
in *Clivia miniata* Regei 'Youjiang'

外植体 Explants	蔗糖浓度 Concentration of sucrose (%)	接种外植体数 Number of explants incubated	形成愈伤组织的外植 体数 Number of explants induced	诱导率 Rate of callus induction (%)	分化成苗的外植体数 Number of explants differentiated	分化率 Rate of differentiation (%)
花瓣 Petal	2	58	6	12.7	2	33.3
	3	45	7	15.6	4	57.1
	4	60	20	33.3	5	25.0
花丝 Filament	2	55	15	27.2	3	20.0
	3	50	7	14.0	3	42.8
	4	58	22	37.9	3	13.6
胚珠 Ovule	2	49	25	51.0	0	0.0
	3	48	20	41.7	3	15.0
	4	43	36	83.7	0	0.0

表 4 君子兰不同花器官外植体愈伤组织诱导及分化的比较

Table 4 The induction and differentiation of three floral organ explants in *Clivia miniata* Regei 'Youjiang'

外植体 Explants	接种外植体数 Number of explants incubated	形成愈伤组织的外植体数 Number of explants induced	诱导率 Rate of callus induction (%)	分化成苗的外植体数 Number of explants differentiated	分化率 Rate of differentiation (%)
花瓣 Petal	45	7	15.6	4	57.1
花丝 Filament	50	7	14.0	3	42.8
胚珠 Ovule	48	20	41.7	3	15.0

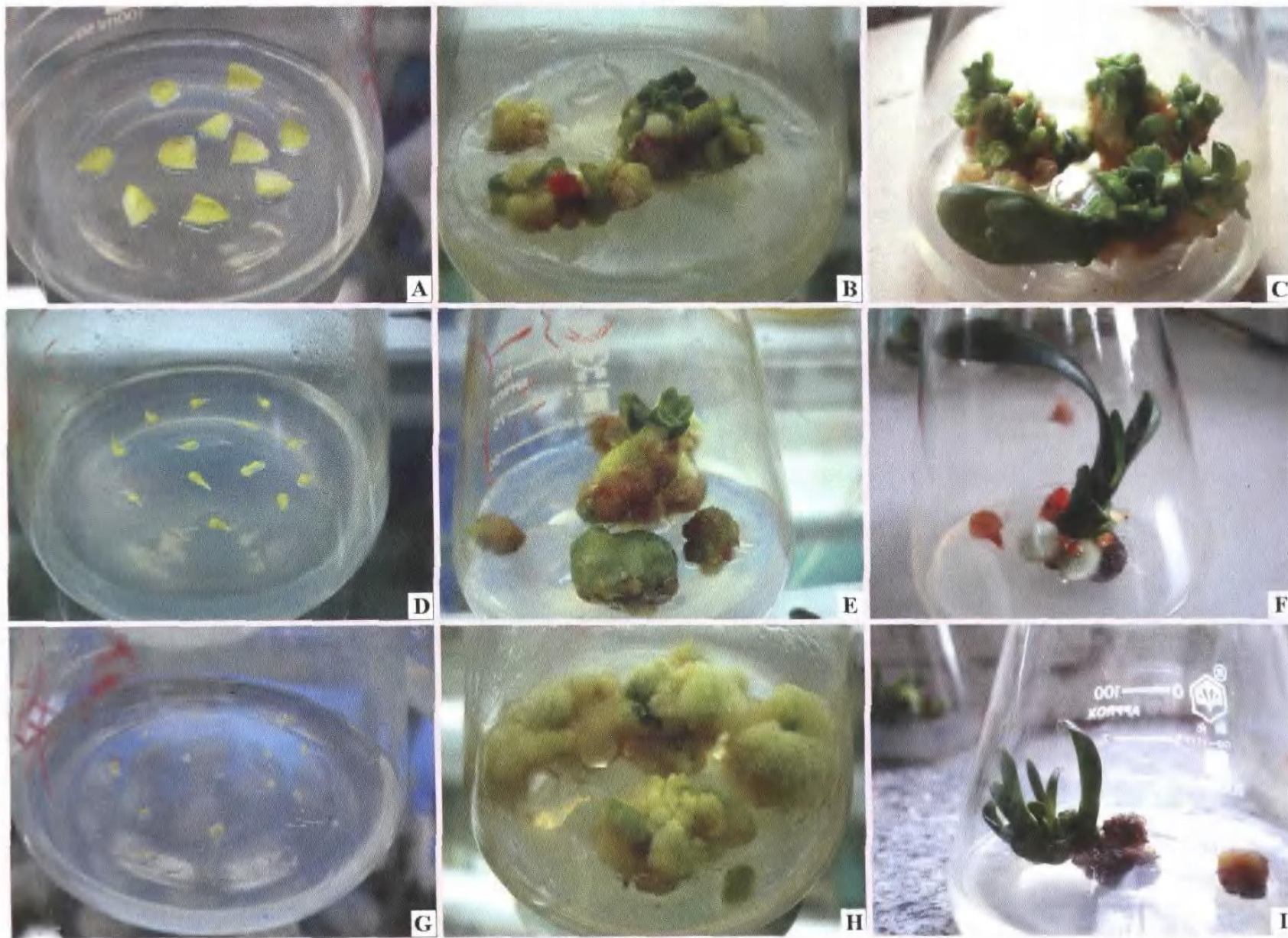


图1 君子兰花器官离体培养愈伤组织诱导与分化

- A. 刚接种的花瓣外植体；B. 28 周后花瓣外植体分化出的芽；C. 38 周后花瓣外植体芽的增殖；D. 刚接种的花丝外植体；
E. 29 周后花丝由愈伤组织分化出芽；F. 30 周后花丝外植体的再生苗；G. 刚接种的胚珠外植体；
H. 10 周后胚珠形成的愈伤组织；I. 32 周后胚珠外植体的再生苗。

本章小结:

- 1 植物培养 (方法, 作用)
 - 茎尖培养
 - 茎段培养
- 2 离体叶培养(方法, 作用)
- 3 根的培养(方法, 作用)
- 4 植物胚胎培养 (方法, 作用)
 - 幼胚培养
 - 成熟胚培养
 - 胚乳培养
 - 胚珠培养
 - 子房培养
- 5 生殖器官培养

比较胚胎培养和胚乳培养的作用，以及培养条件的差异？