

专题 3 植物的组织培养技术



利用植物的一块组织，甚至一个细胞，就能培养出完整的植株，靠的就是植物组织培养技术。运用这种技术，可以实现优良品种的快速繁殖，保持遗传性状的一致；可以培育出大量不含病毒的幼苗，提高作物的产量；可以实现花卉的连续生产，不受开花季节的限制……然而这一技术从设想到成熟，却经历了半个世纪。这项富有挑战性的工作，不仅会使你学到新的技术，还会带给你丰富的体验，宝贵的启迪。

课题 1 菊花的组织培养

课题背景

科学研究表明,当植物细胞脱离了原来所在植物体的器官或组织而处于离体状态时,在一定的营养物质、激素和其他外界条件的作用下,就可能表现出全能性,发育成完整的植株。科学家用植物组织培养的方法,已经把许多种植物的离体的组织或细胞,培养成了完整的植物体。在本课题中,我们将通过菊花组织培养的实验来学习这一技术。



基础知识

(一) 植物组织培养的基本过程

在植物的个体发育过程中,细胞在形态、结构和生理功能上都会出现稳定性的差异,形成这些差异的过程叫做细胞分化。已经分化了的细胞在结构和功能上都比较专一,要在离体条件下发育成完整的植株,并不容易。

离体的植物组织或细胞,在培养了一段时间以后,会通过细胞分裂,形成愈伤组织(图3-1)。愈伤组织的细胞排列疏松而无规则,是一种高度液泡化的呈无定形状态的薄壁细胞。由高度分化的植物组织或细胞产生愈伤组织的过程,称为植物细胞的脱分化,或者叫做去分化。脱分化产生的愈伤组织继续进行培养,又可以重新分化成根或芽等器官,这个过程叫做再分



图 3-1 植物组织培养的流程图

化。再分化形成的试管苗，移栽到地里，可以发育成完整的植物体。图 3-1 简要地归纳了植物组织培养的过程。在这个过程中，往往需要使用植物激素，人为地控制细胞的脱分化与再分化。

(二) 影响植物组织培养的因素

不同的植物组织，培养的难易程度差别很大。例如，烟草和胡萝卜的组织培养较为容易，而枸杞愈伤组织的芽诱导就比较难。因此，植物材料的选择直接关系到实验的成败。对于同一种植物材料，材料的年龄、保存时间的长短等也会影响实验结果。菊花的组织培养，一般选择未开花植株的茎上部新萌生的侧枝（图 3-2）。

离体的植物组织和细胞，对营养、环境等条件的要求相对特殊，需要配制适宜的培养基。常用的一种培养基是 MS 培养基，其主要成分包括：大量元素，如 N、P、K、Ca、Mg、S；微量元素，如 B、Mn、Cu、Zn、Fe、Mo、I、Co；有机物，如甘氨酸、烟酸、肌醇、维生素，以及蔗糖等。在配制好的 MS 培养基中，常常需要添加植物激素。

植物激素中生长素和细胞分裂素是启动细胞分裂、脱分化和再分化的关键性激素。在生长素存在的情况下，细胞分裂素的作用呈现加强的趋势。按照不同的顺序使用这两类激素，会得到不同的实验结果。

使用顺序	实验结果
先使用生长素，后使用细胞分裂素	有利于细胞分裂，但细胞不分化
先使用细胞分裂素，后使用生长素	细胞既分裂也分化
同时使用	分化频率提高

当同时使用这两类激素时，两者用量的比例影响植物细胞的发育方向（参见旁栏）。可见，植物激素的浓度、使用的先后顺序以及用量的比例等，都会影响实验结果。植物激素的应用要做到得心应手，还得靠大量实践。

除了上述因素外，pH、温度、光照等条件也很重要。不同的植物对各种条件的要求往往不同。进行菊花的组织培养，一般将 pH 控制在 5.8 左右，温度控制在 18~22℃，并且每日用日光灯照射 12 h。



图 3-2 未开花的菊花植株

你能说出各种营养物质的作用吗？同专题 2 中微生物培养基的配方相比，MS 培养基的配方有哪些明显的不同？

常用的植物激素有：生长素、细胞分裂素和赤霉素等。生长素类有：2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、吲哚乙酸(IAA)、萘乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA)等。细胞分裂素类有：激动素(KT)、6-苄基嘌呤(6-BA)、玉米素(ZT)等。赤霉素类有赤霉素(GA₃)等。

生长素用量比细胞分裂素用量，比值高时，有利于根的分化、抑制芽的形成；比值低时，有利于芽的分化、抑制根的形成。比值适中时，促进愈伤组织的形成。

实验操作

(一) 制备 MS 固体培养基

MS 培养基含有 20 多种营养成分, 实验室一般使用 4 ℃ 保存的配制好的培养基母液来制备。具体操作如下。

1. 配制各种母液 配制母液时, 无机物中大量元素浓缩 10 倍, 微量元素浓缩 100 倍 (MS 培养基的配方参见附录 3), 常温保存。激素类、维生素类以及用量较小的有机物一般可按 1 mg/mL 的质量浓度单独配制成母液。用母液配制培养基时, 需要根据各种母液的浓缩倍数, 计算用量。

2. 配制培养基 配制 1 L MS 培养基时, 先将称好的琼脂加入 800 mL 蒸馏水, 加热使琼脂熔化, 然后加入蔗糖 30 g, 取配制好的大量元素、微量元素、有机物和植物激素的母液, 依次加入, 加蒸馏水定容至 1 000 mL, 调节 pH, 最后分装到锥形瓶中, 每瓶分装 50 mL 或 100 mL。由于菊花茎段的组织培养比较容易, 因此不必添加植物激素。如果有兴趣, 你也可以试着添加一些激素。

3. 灭菌 将分装好的培养基连同其他器械一起进行高压蒸汽灭菌。

(二) 外植体消毒

选取菊花茎段时, 要取生长旺盛的嫩枝。菊花茎段用流水冲洗后可加少许洗衣粉, 用软刷轻轻刷洗, 刷洗后在流水下冲洗 20 min 左右。用无菌吸水纸吸干外植体表面的水分, 放入体积分数为 70% 的酒精中摇动 2~3 次, 持续 6~7 s, 立即将外植体取出, 在无菌水中清洗。取出后仍用无菌吸水纸吸干外植体表面水分, 放入质量分数为 0.1% 的氯化汞溶液中 1~2 min。取出后, 在无菌水中至少清洗 3 次, 漂净消毒液。

(三) 接种

接种前用体积分数为 70% 的酒精将工作台擦拭一遍。工作台消毒后, 首先点燃酒精灯。此后, 所有的接种操作都必须在酒精灯旁进行, 并且每次使用器械后, 都需要用火焰灼烧灭菌。

将装有培养基的锥形瓶整齐地排列在酒精灯左侧。将消过毒的菊花茎段在无菌培养皿中切成小段 (长约 0.5~1 cm)。左手持锥形瓶, 右手拉开捆扎锥形瓶的绳子, 并将封口膜攥于右手手心, 以避免封口膜接触瓶口的一面被污染。左手持瓶, 使瓶口旋转通过火焰; 右手用镊子夹取菊

⑦ 为了避免每次配制培养基时都要称量几十种成分, 可以将各种成分按比例配制成浓缩液, 即培养基母液, 使用时, 根据浓缩比例计算用量, 加水稀释。

⑧ 用于离体培养的植物器官或组织片段, 叫做外植体。

⑨ 对外植体进行表面消毒时, 既要考虑药剂的消毒效果, 又要考虑植物的耐受能力。

花茎段，插入培养基中（图3-3）。插入时应注意方向，不要倒插。每瓶接种6~8块外植体。接种后，将封口膜重新扎好。



图3-3 接种操作

（四）培养

接种后的锥形瓶最好放在无菌箱中培养，培养期间应定期消毒。培养温度控制在18~22℃，并且每日用日光灯光照12h。

（五）移栽

在移栽生根的菊花试管苗之前，应先打开培养瓶的封口膜，让试管苗在培养间生长几日。然后用流水清洗根部的培养基，将幼苗移植到消过毒的蛭石或珍珠岩等环境下生活一段时间，等幼苗长壮后再移栽到土壤中（图3-4）。

（六）栽培

将幼苗移栽后，每天观察并记录幼苗生长情况（图3-5），适时浇水、施肥，直至开花。

结果分析与评价

1. 接种3~4d后，观察外植体的生长情况，统计有多少外植体被污染，有多少能正常生长。分析外植体被污染的原因。

2. 你培养出愈伤组织了吗？从接种到长出愈伤组织经历了多少天？你培养出的愈伤组织进一步分化出根和芽了吗？

3. 两周后观察茎段的分化情况，填好结果记录表，并及时分析结果。

4. 幼苗移栽到露地后，能够正常生长吗？

你打算做几个重复组？你打算设置对照实验吗？



图3-4 幼苗的移栽



图3-5 移栽后的幼苗

① 以下配方可供你参考。

诱导菊花愈伤组织：

在MS培养基中加入BA和NAA，
质量浓度均为 0.5mg/L。

诱导菊花丛芽：

在MS培养基中加入BA和NAA，
质量浓度分别为 2~3 mg/L 和
0.02~0.3 mg/L。

诱导菊花生根：

MS培养基各成分用量减半，并
添加 NAA 或 IAA，质量浓度均
为 0.1 mg/L。

课题延伸

一般来说，容易进行无性繁殖的植物，也容易进行组织培养，如芦荟、豆瓣绿、秋海棠、月季等。你可以从中挑选一种你喜欢的植物，进行组织培养。

如果你对植物激素的作用感兴趣的话，可以在查阅资料的基础上，探究生长素与细胞分裂素的使用比例对植物组织培养的影响。例如，你可以设计一组对照实验，分别探究不加任何植物激素、生长素用量与细胞分裂素用量的比值为1、比值大于1以及比值小于1时，对实验结果的影响。



练习

1. 在植物组织培养的过程中，为什么要进行一系列的消毒、灭菌，并且要求无菌操作？

2. 在选取菊花茎段的时候，为什么要选取生长旺盛的嫩枝？

课题2 月季的花药培养

课题背景

1964年,印度科学家在培养毛叶曼陀罗的花药时,首次获得了由花药中的花粉粒发育而来的单倍体植株。这个实验说明生殖细胞和体细胞一样,在离体条件下也具有发育成完整植株的潜能。自20世纪60年代以来,花药培养的研究发展迅速。据记载,世界上已有250多种高等植物的花药培养获得成功,其中小麦、玉米、大豆、甘蔗和橡胶等近50种植物的花粉再生植株已由我国科技人员首先培育成功。

植物的花药培养在育种上有特殊的意义。育种工作者可以采用花药培养的方法,使花粉粒发育为单倍体植株,再经过人工诱导使染色体数目加倍,重新恢复到正常植株的染色体数目。这样的植株不仅能够正常生殖,而且每对染色体上的成对的基因都是纯合的,自交产生的后代不会产生性状分离。单倍体育种不仅缩短了育种周期,也为新品种的培育开辟了新途径。在本课题中,我们将尝试月季的花药培养。



基础知识

(一) 被子植物的花粉发育

被子植物的雄蕊通常包含花丝、花药两部分。花药为囊状结构,内部含有许多花粉。花粉是由花粉母细胞经过减数分裂而形成的,因此,花粉是单倍体的生殖细胞。被子植物花粉的发育要经历小孢子四分体时期、单核期和双核期等阶段(图3-6)。在小孢子四分体时期,4个单倍体

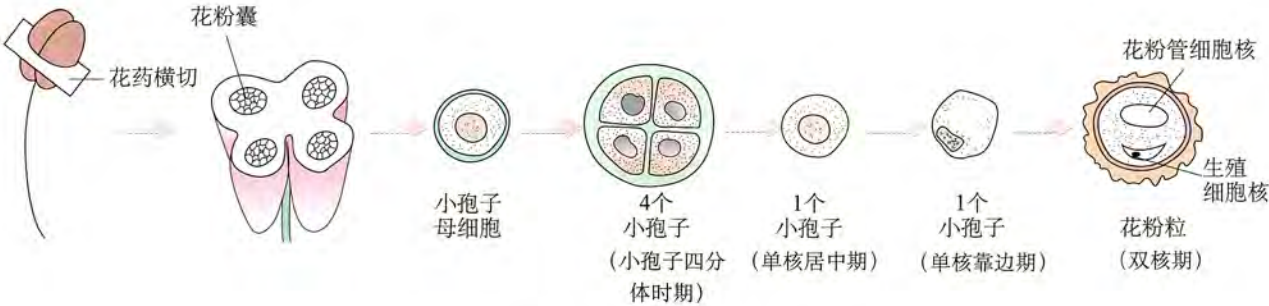


图3-6 被子植物花粉的发育过程

细胞连在一起，进入单核期时，四分体的4个单倍体细胞彼此分离，形成4个具有单细胞核的花粉粒。这时的细胞含浓厚的原生质，核位于细胞的中央（单核居中期）。随着细胞不断长大，细胞核由中央移向细胞一侧（单核靠边期），并分裂成1个生殖细胞核和1个花粉管细胞核，进而形成两个细胞，一个是生殖细胞，一个是营养细胞。生殖细胞将再分裂一次，形成两个精子。

(二) 产生花粉植株的两种途径

通过花药培养产生花粉植株（即单倍体植株）一般有两种途径（图3-7），一种是花粉通过胚状体阶段发育为植株，另一种是花粉在诱导培养基上先形成愈伤组织，再将其诱导分化成植株。这两种途径之间并没有绝对的界限，主要取决于培养基中激素的种类及其浓度配比。



图 3-7 花药培养产生花粉植株的两种途径

人们一直以为，植物细胞的离体培养只能通过分别诱导芽和根等器官再发育成植株。20世纪50年代末，科学家在胡萝卜根组织的单细胞悬浮培养液中发现，某些体细胞在形态上转变为与合子发育成的胚非常相似的结构，它的发育过程也与合子胚类似，胚芽、胚根、胚轴等结构完整，就像一颗种子。科学家将这种结构称做体细胞胚（somatic embryo）或胚状体（embryoid）。除了植物的体细胞外，由单倍体性细胞产生的花粉胚，也可发育成为单倍体植株。

(三) 影响花药培养的因素

诱导花粉植株能否成功及诱导成功率的高低，受多种因素影响，其中材料的选择与培养基的组成是主要的影响因素。

不同植物的诱导成功率很不相同。就同一种植物来说，亲本植株的生理状况对诱导成功率也有直接影响。花期早期时的花药比后期的更容易产生花粉植株。一般月季的花药培养时间选在五月初到五月中旬，即月季的初花期。选择合适的花粉发育时期也是提高诱导成功率的重要因素。这是因为并不是任何时期的花粉都可以经过培养产生愈伤

花期一般指在一个生长季内植株开花的时间段。比如某些种类的月季，从5月初一直到11月都连续开花。那么5月初就叫做该种月季的初花期或花期早期。花期早期的花蕾营养状态及生理状态会比较好，能提高花粉诱导成功率。

组织或胚状体，在花粉发育的过程中，只有某一个时期对离体刺激敏感。一般来说，在单核期，细胞核由中央移向细胞一侧的时期，花药培养成功率最高。选择单核期以前的花药接种，质地幼嫩，极易破碎；选择单核期以后的花药接种，花瓣已有些松动，又给材料的消毒带来困难。为了挑选到单核期的花药，通常选择完全未开放的花蕾（图3-8）。盛开的或略微开放的花（图3-9），都不宜选作实验材料。此外，亲本植株的生长条件、材料的低温预处理以及接种密度等对诱导成功率都有一定影响。

实验操作

（一）材料的选取

选择花药时，一般要通过镜检来确定其中的花粉是否处于适宜的发育期。确定花粉发育时期的最常用的方法有醋酸洋红法。但是，某些植物的花粉细胞核不易着色，需采用焙花青—铬矾法，这种方法能将花粉细胞核染成蓝黑色。

醋酸洋红法 将花药放在载玻片上，加一滴质量分数为1%的醋酸洋红，用镊柄将花药捣碎，盖上盖玻片后在显微镜下检查。醋酸洋红的配制方法是：将体积分数为45%的醋酸100 mL煮沸，缓缓加入1 g洋红，再加热回流（回流装置参见专题6课题2）8 h，冷却至50℃，过滤即可。

焙花青—铬矾法 花药应先在卡诺氏固定液中固定20 min，然后取出放在载玻片上，加焙花青—铬矾溶液染色，盖上盖玻片后在显微镜下检查。卡诺氏固定液的配制方法是：将无水酒精与冰醋酸按体积比为3:1的比例混匀。焙花青—铬矾溶液的配制方法是：将5 g铬钾矾 $[K_2SO_4Cr_2(SO_4)_3 \cdot 24H_2O]$ 加入90 mL蒸馏水中，溶解后加入0.1 g焙花青，混匀并加热至沸腾，煮沸5 min后冷却至室温，过滤，加蒸馏水定容至100 mL。

（二）材料的消毒

通常先将花蕾用体积分数为70%的酒精浸泡大约30 s，立即取出，在无菌水中清洗。取出后再用无菌吸水纸吸干花蕾表面的水分，放入质量分数为0.1%的氯化汞溶液中2~4 min（也可用质量分数为1%的次氯酸钙溶液或饱和漂白粉溶液），取出后再用无菌水冲洗3~5次。

（三）接种和培养

消毒后的花蕾，要在无菌条件下除去萼片和花瓣，并立即将花药接种到培养基上。在剥离花药时，要尽量不损

为什么花瓣松动会给材料的消毒带来困难？



图3-8 完全未开放的月季花蕾



图3-9 略微开放的月季花蕾

月季花药培养基配方

在1 000 mL MS培养基配方中添加

2,4-D	0.4 mg
KT	0.2 mg
IAA	4 mg

调节 pH 至 5.8。

② 诱导丛芽或胚状体的培养基配方

MS 培养基中添加 GA、IBA 和 BA, 质量浓度分别为 0.1 mg/L、0.5 mg/L 和 1 mg/L。

② 诱导生根的培养基配方

MS 培养基各成分用量减半, 添加 IAA, 质量浓度为 1.5 mg/L。

伤花药 (否则接种后容易从受伤部位产生愈伤组织), 同时还要彻底去除花丝, 因为与花丝相连的花药不利于愈伤组织或胚状体的形成。

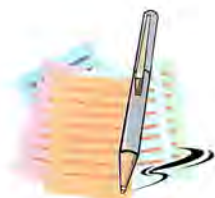
通常每瓶接种花药 7~10 个, 培养温度控制在 25 ℃ 左右, 不需要光照。幼小植株形成后才需要光照。

一般经过 20~30 d 培养后, 会发现花药开裂, 长出愈伤组织或形成胚状体。将愈伤组织及时转移到分化培养基上, 以便进一步分化出再生植株。如果花药开裂释放出胚状体, 则一个花药内就会产生大量幼小植株, 必须在花药开裂后尽快将幼小植株分开, 分别移植到新的培养基上, 否则这些植株将很难分开。

在花药培养中, 特别是通过愈伤组织形成的花粉植株, 染色体组的数目常常会发生变化。因此还需要对培养出来的植株作进一步的鉴定和筛选。

结果分析与评价

1. 你能够通过镜检找到处于适宜的发育期的花粉吗?
2. 你的花药培养出现了被污染的现象吗? 如果有, 请分析产生污染的原因。
3. 你接种的花药是否长出了花粉愈伤组织或胚状体?



练习

1. 紫色、不甜的玉米 (基因型为 AASuSu) 和白色、甜玉米 (基因型为 aasusu) 杂交 (Su 和 su 代表一对等位基因), 得到的 F_1 (AaSusu) 再进行自交, F_2 会有紫色甜玉米的表现型产生。如果运用常规育种方法, 应该如何筛选出纯合的紫色甜玉米?

如果利用花药培养的技术, 又应该怎样做呢?

2. 学完这个专题后, 你能说出植物组织培养技术与花药培养技术的异同吗? 你能举例说明组织培养技术在生产中的实际应用吗?