

# 植物快速繁殖技术

山东农业大学生命科学学院

- **1. 植物离体繁殖**

- 植物离体培养可在短期内获得大量遗传性一致的再生植株，均匀一致，质量好。
- 常用于脱毒及优良品种的繁殖与生产。

- **2. 微繁**

- 传统繁殖技术与组培相结合形成的人工快速离体繁殖技术。
- 广泛用于农业生产，经济效益大，涉及植物种类多，技术成熟并程序化，繁殖速度突破自然繁殖界限，实现工厂化育苗。

植物离体繁殖(propagation in vitro)又称植物快速繁殖, 或微繁(micropropagation), 或快繁, 即营养体繁殖(vegetative propagation)。



- **微繁特点** (与传统营养繁殖相比):

- **①繁殖效率高**

不受季节和灾害性气候的影响，可周年繁殖，生长速度快(以几何级数增殖)。

- **②培养条件可控性强**

培养材料完全是在人工环境条件下生长，便于对各种环境条件进行调控。



- ③占用空间小，设施利用率高

一间30m<sup>2</sup>的培养室可同时存放1万多个培养瓶，培育数十万株苗木。

- ④管理方便，利于自动化控制

培养材料在人工环境中生长，省去了田间栽培的一些繁杂劳动，并可利用仪器进行自动化控制，便于工厂化生产和集约化经营，降低生产经营成本，提高经济效益。

- ⑤便于种质保存和交换

通过抑制生长 (或超低温贮存的方法)，使培养材料长期保存，并保持生活力，节约人力. 物力. 土地，便于种质资源的交换和转移。

- **⑥有利于病虫草害的控制**

有限的人工环境，易于对病虫草害全面防治，防止病虫害传播，提高苗木质量。

- **⑦便于新技术的推广应用**

易与现代生物技术结合，及时改造和提升生产技术，改革优化生产经营模式，引入最新生产经营理念，建设先进企业文化，打造企业品牌。

- **⑧有利于产.学.研相结合**

产.学.研一体化是现代知识与生物技术与产业发展的必然趋势，是最优化、最经济的结构与运作模式，三者互促互动，共同发展。

## 第1节 植物快繁器官的形成

- 植物种类、外植体类型及培养基等影响接种材料生长分化再生，快繁器官形成方式多样，可分为五种类型：

- ◆ 短 枝 发生型
- ◆ 丛生芽 发生型
- ◆ 不定芽 发生型
- ◆ 胚状体 发生型
- ◆ 原球茎 发生型

或称五种途径

## 一、短枝发生型（即微型扦插）

- 培养带侧芽茎段的外植体萌发，形成完整植株，再将其剪成带侧芽茎段继代，再长成苗。
- 类似于田间枝条扦插繁殖，能一次成苗，遗传性状稳定，培养过程简单，移栽成活率高（常用于花卉和葡萄等组培苗的繁殖）。





## 二、丛生芽发生型

- 培养携带顶芽或腋芽的外植体，不断发生腋芽而呈丛生状芽，将单个芽诱导生根成苗。
- 携带侧芽和(或)茎尖的外植体在含有外源细胞分裂素的培养基中，可促使顶芽或侧芽萌动，形成微型的多枝多芽的小灌木丛状结构。

杜鹃属

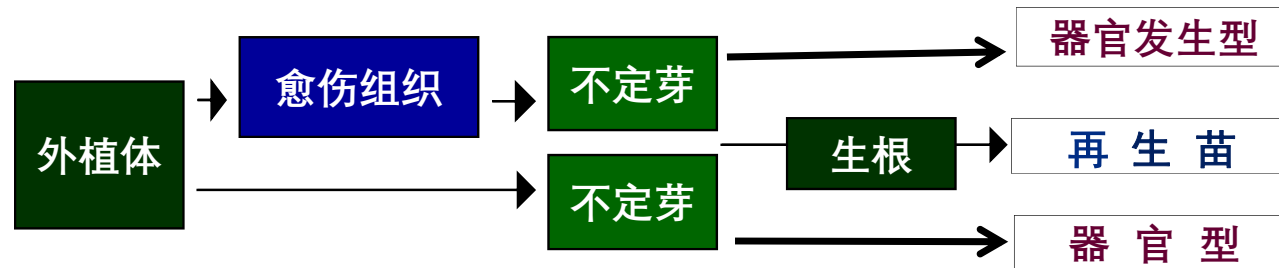


- 将丛生芽分割成带芽茎段，继代培养，重复芽的增殖培养，可获得大量芽。芽转移到生根培养基后，经培养得到完整小植株。
- 丛生芽发生型是多数植物快繁的主要方式，它不经过愈伤组织，最能使无性系后代保持原品种的特性，在生产中普遍应用。
- 外植体可用顶芽、侧芽或带芽茎段。

- ①如果顶芽仅切取茎的顶端分生组织部分，则可产生脱病毒植株。
- ②如果顶芽具有较强的顶端优势，侧芽萌发就受到抑制，产生分枝较少，影响繁殖速度，可采用三项措施：
  - ◆ 除去顶芽。
  - ◆ 适当增加培养基中的细胞分裂素。
  - ◆ 增加继代次数，使细胞分裂素在器官中逐渐积累，也可削弱顶端优势。

### 三、不定芽发生型

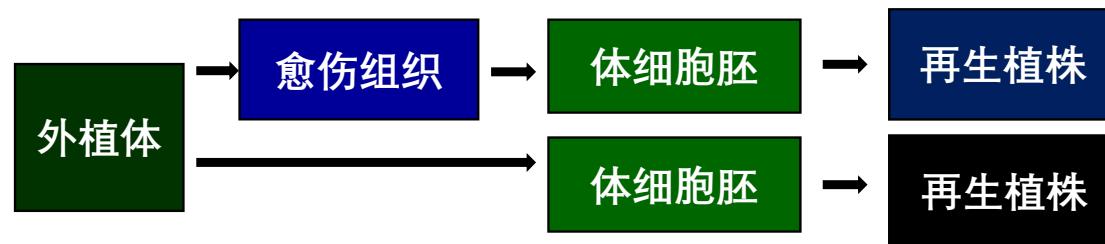
- 外植体在适宜培养基和培养条件下：
  - ◆ 经过脱分化形成愈伤组织，然后诱导愈伤组织经过再分化产生不定芽。
  - ◆ 外植体不形成愈伤组织而直接从其表面形成不定芽。
- 将芽转移到生根培养中，经培养获得完整植株。



- 不定芽发生型外植体可涉及多种器官，如茎段、叶、根、花组织等，是许多植物快繁的主要方式。
- 不定芽形成数量与腋芽数无关，其增殖率高于丛生芽发生型。但经愈伤组织或多次继代，易导致细胞分裂异常，增加变异频率。如香蕉继代次数控制在8代之内，再生植株的变异率则可控制在3%左右。
- 表现嵌合性状的植株通过不定芽方式再生时，往往导致嵌合性状发生分离，而失去原有价值，如观赏植物色彩镶嵌的叶子、带金边或银边的植物，通过不定芽途径再生植株，会失去这些具有观赏价值的特征。
- 这类植株应通过丛生芽途径快繁。

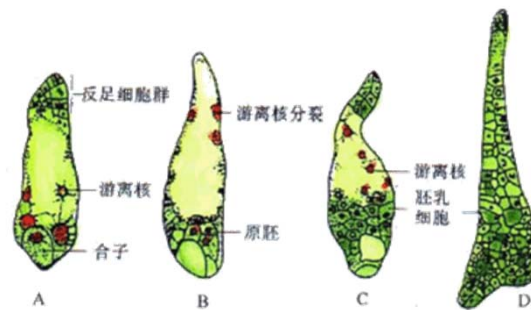
## 四、胚状体发生型

- 外植体经诱导产生体细胞胚，通过胚胎发生途径产生完整植株。
- 外植体诱导产生的愈伤组织进一步发育成类似合子胚的体细胞胚，或外植体表皮细胞直接发育成体细胞胚。
- 体细胞胚由于具有胚芽和胚根的两极原基，不经生根培养即可直接形成完整小植株。



- 胚状体发生成苗数量大、速度快、结构完整，是外植体增殖系数最大的途径。但胚状体发生和发育情况复杂，通过胚状体途径快繁的植物种类，远没有丛生芽和不定芽涉及的广泛。

- 体细胞胚再生的小植株与丛生芽或不定芽再生的小植株相比，具有两个显著差异：
- ①胚状体多起源于单细胞
- 体细胞胚很早就具有明显的根端和芽端的两极分化，极幼小时也是一个根、芽齐全的微型植物，无需诱导生根。



- ②生理隔离

- 胚状体发育的小植株与周围愈伤组织或母体组织间没有结构上的联系，出现生理隔离现象，小植株独立形成，易于分离。
- 丛生芽或不定芽发育的小植株，最初由分生细胞团形成单极性的生长点，发育成芽，致使芽与母体组织或愈伤组织紧密联系，如维管束组织、皮层和表皮组织等。转移生根时，需切割才能分开。



## 五、原球茎发生型

- 茎尖或腋芽外植体经培养产生原球茎 (即扁球状体、基部生假根) 的繁殖类型，是兰科植物的一种快速繁殖方式。
- 原球茎是短缩的、呈珠粒状的、由胚性细胞组成的、类似嫩茎的器官，它可以增殖，形成原球茎丛。

- 由茎尖或腋芽外植体诱导产生原球茎，切割原球茎进行增殖，或停止切割使其继续培养而转绿，产生毛状假根，叶原基发育成幼叶，将其转移培养生根，形成完整植株。
- 原球茎繁殖体系是兰花唯一有效的大规模无性繁殖方法，是1960年由法国学者G. Morel开创的，促使了兰花工业的形成，获得巨大经济效益。
- 是植物快繁技术在生产上应用的第一例。

## 第2节 植物快速繁殖的程序

- 植物快繁技术不断成熟，技术体系已程序化，大致包括4个阶段：

无菌培养体系的建立



繁殖体的增殖



芽的诱导生根



小植株的移栽驯化

## 一、无菌培养体系的建立

- 便捷高效低成本无菌培养系统的建立是植物快繁能否成功的重要一步，其任务：
  - ◆ 供体和外植体的选取
  - ◆ 无菌培养物的获得
  - ◆ 外植体的启动生长
- 以利于离体材料在适宜培养环境中以某种最有效的发生方式快速增殖。

## 1. 供体和外植体的选取

- ①供体的选择

- 供体(母株)应遗传基础雄厚、种性特征明显、性状稳定、生长健壮、无病虫害的成年植株。
- 田间植株受微生物污染严重，无法直接获得无菌外植体，可将其剪切后在室内栽种培养，喷洒内吸性杀虫剂和杀菌剂，待长出新枝后再取材。

- ②外植体的选择

- 植物器官和组织都可用作外植体进行快繁，实际选用外植体与植物种类有关。
- 木本植物、较大的草本植物多采用带芽茎段、顶芽或腋芽等。
- 易于繁殖、矮小或具短缩茎的草本植物多采用叶片、叶柄、花茎、花瓣等。

## 2. 无菌培养物的获得

- ①实验材料适当、有效灭菌处理。
- ②取外植体接种于基本培养基（一般1块/瓶，避免相互污染），以检测每个材料的污染情况。
- ③将接种15d以上仍未见污染且成活的外植体，转到促使其启动生长的培养基中。



### 3. 外植体启动生长的方式

- 不同外植体启动生长的方式不同，主要有：

- ◆ 顶芽启动生长。

- ◆ 腋芽被刺激后进行生长。

- ◆ 茎段、叶片、花芽、子叶和其他器官外植体的伤口处产生不定芽

- ◆ 外植体切口表面产生愈伤组织。

#### 4. 外植体启动生长所用培养基

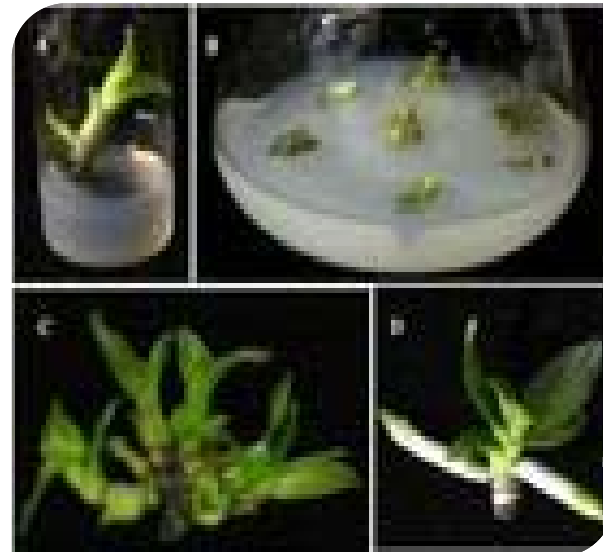
- 随植物种类、栽培方式和外植体类型不同而异，生长素和细胞分裂素的浓度最重要。
- 刺激腋芽生长，细胞分裂素 (*6-BA*、*KT*) 适宜浓度是  $0.5 \sim 1.0 \text{ mg/L}$ ，生长素浓度水平则很低，为  $0.01 \sim 0.1 \text{ mg/L}$ 。
- 诱导不定芽形成需较高水平细胞分裂素。
- 诱导愈伤组织形成，需增加生长素浓度并补充一定浓度的细胞分裂素。

## 5. 建立无菌培养体系需要的时间

- 通常需要约4~6周，获得的培养产物转移到增殖培养基中进行增殖。
- 有些外植体无菌培养体系的建立可能需要较长时间，必须将外植体转移到新培养基上培养。
- 如一些木本植物需 1 年时间，继代后具有正常茎芽的培养物才能稳定增殖，反之，则在发育中被抑制，无法增殖。

## 二、繁殖体的增殖技术

- 繁殖体的增殖是植物快速繁殖的重要环节之一，需大量的工作时间，其主要任务是对获得的培养材料进行快速高效地扩大增殖，不断分化产生新的丛生芽、不定芽及胚状体。



## 1. 培养材料的增殖

- 培养物以适当的方式进行增殖。不同种植物采用哪种方式进行快繁，既取决于培养目的，也取决于材料自身的可能性。一般大多数植物采用无菌短枝或腋芽萌发或诱导不定芽产生，再以芽繁殖芽的方式进行增殖。

- 兰科植物、百合等则采用原球茎增殖，保障繁殖材料的遗传稳定性。
- 增殖后形成的丛生芽或单芽分割后，转移到新培养基中继代培养。
- 在繁殖体增殖阶段，每4~8周继代 1 次。
- 一个芽增殖一般产生5~25个或更多的小芽，可进行多次连续继代增殖，满足生产等需求。

- 有时，芽随着继代培养次数的增多，培养时间的延长而出现衰退，即出现不能生长、茎尖褐化、进入休眠等异常现象，甚至失去再生的潜能。
- 降低培养基中生长调节剂的浓度和避免基部愈伤组织的产生等都可以降低出现异常的风险，延缓芽的衰退。但是，一个芽的快繁是有时间限制的，快繁体系要有计划不断更新。

## 2. 增殖培养基

- 增殖率

每次继代培养，应能产生最大数量的有效繁殖体，是植株快速繁殖特别是商业性繁殖的重要指标。

- 增殖培养基

因植物种类、品种和培养类型不同而异。基本培养基与无菌培养物建立相同，细胞分裂素和矿物元素的水平则较高，最佳浓度应通过实验确定。MS培养基适合多种植物培养。



### 3. 增殖体的大小和切割方法

- 为保证每次继代能获得最佳增殖效果，增殖茎段最小带1个茎节。
- 从初代培养物中切割的茎段一般有2~4个茎节。
- 茎段可垂直插入培养基但不淹没茎节或水平放入培养基表面刺激侧芽萌动。
- 初代培养物切割完茎段后，可继续分割再培养。如出现顶芽发育而抑制腋芽增殖的现象，应切除顶芽，对基部进行再培养。

### 三、芽的诱导培养生根

- 增殖培养获得的芽，需将单个芽转移到生根培养基或适宜环境中诱导生根，获得健壮的苗，为移栽准备小植株。
- 移栽，即将人工异养环境中的苗转变成在温室和田间能自养生存的植株。
- 芽的生根可在离体环境中进行，也可在活体条件下产生。



## 1. 离体诱导生根 (也称组织培养生根)

- ①生根用基本培养基同无菌培养物的建立，但需降低无机盐浓度(一般用1/2或1/4的量)，减少或除去细胞分裂素，增加生长素的浓度。
- ②有些植物，芽在含生长素的培养基中生长 1 ~ 2d，再转移至无生长素的培养基中生根。



- ③有些植物的芽在含生长素的生根溶液中浸蘸后直接插入无生长素的培养基中，生根效果好。
- ④如果在生长素处理阶段辅以黑暗条件，则生根效果更好。
- 将增殖的甜樱桃芽转至无或低浓度细胞分裂素培养基培养2~4周即可生根，或添加赤霉素，降低细胞分裂素的作用，这种芽可直接转入无细胞分裂素和赤霉素的培养基中诱导生根。

## 2. 活体生根 (又称基质生根)

- 操作如下：
- ①芽在生长素中快速浸蘸 (或在含有相对高浓度生长素的培养基中培养5~10d)。
- ②在温室中栽入适当基质 (如珍珠岩: 蛭石=2: 1)中。
- ③通过经常喷雾等, 提供高湿度环境, 几天后芽可生根。
- 这个阶段还应进行芽的选择, 淘汰明显不正常者。
- 可以利用低温处理来刺激其生长和增殖。
- 芽的诱导生根一般转接1次就能完成, 持续时间为2~4周。



## 四、小植株的移栽驯化

- 移栽驯化

是组织培养苗从异养到自养的转变，是组织培养苗逐渐适应栽培环境的过程。

- 1. 炼苗

- 移栽前对组培苗进行适应性锻炼，使植株生长粗壮，提高抗逆能力，温度、光照逐步朝着自然环境条件过渡，并打开瓶口，降低湿度，使其由组织培养环境逐渐适应外界自然环境，为移栽奠定基础。



## 2. 移栽

- ①组培苗移栽时，首先应彻底洗去其根部附着的培养基，避免微生物繁殖污染，影响生长，甚至造成小苗死亡。
- ②将组培苗栽入保湿又透气的基质中，如蛭石、珍珠岩、粗沙、泥炭等按比例混合，以利生长。
- ③科学管理，几天后长出新的功能根。

### 3. 科学管理

- ①湿度管理

组培苗在高湿（90%以上的相对湿度）环境中生长，茎叶表面防止水分散失的角质层等几乎全无，根系又不发达，移栽后难以保证水分平衡，即使根系周围有足够水分也不行。应加覆塑料薄膜、经常喷雾，提高空气湿度，减少叶面蒸腾。逐渐降低空气相对湿度，使其适应自然环境。



- ②光照管理

组培苗在营养丰富含糖培养基中异养生长，移栽后要通过自身的光合作用来维持生存，需要一个生理上组织结构上的转变适应过程。移栽初期光照强度应较弱，经过一段时间适应后，逐渐增加光照强度 (如1500~4000lx甚至10000lx)。

- ③ 温度管理

移栽所需的适宜温度与植物种类有关，喜温性植物以25℃左右为宜，喜凉性植物以18～20℃为好。

温度过高导致蒸腾作用加强，水分失衡，微生物滋生等。

温度过低则使幼苗生长迟缓或不易存活。

如使基质温度高于空气温度2～3℃，则有利于生根和促进根系发育，提高存活率。

- **④根际透气管理**

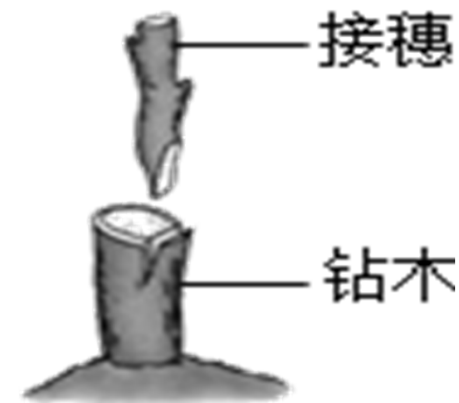
移栽应注意根际环境的透气状况。选用透气性好的栽培基质，防止根部长时间积水，引致烂根。

- **⑤病虫害防治**

应注意防治病虫害。在移栽驯化管理阶段，应防止菌类滋生，适当喷一定浓度的杀菌剂可有效保护移栽植株正常生长。

## 第3节 影响植物快繁的因素

- 由外植体到再生植株，是一个相当复杂的演变过程，其影响因素也多种多样。在植物快繁的研究中，应力争使各种影响因素处于最佳参数状态，最大限度地生产组培植株，获得最大经济效益。



## 一、外植体

- 起始的外植体状况如外植体的来源、发育阶段、大小及预处理等，是决定植株繁殖速率和再生植株质量的重要因素。
- 在一般情况下，组织内部带菌的材料不能用作外植体。
- 不同外植体对培养因子刺激的响应能力差别很大。

## 1. 外植体的来源

- 全能性是植物细胞的基本属性，但全能性的表达常局限于某些特殊细胞，即拟分生组织细胞，不同细胞的再生能力差异很大。
- ①茎尖、带芽茎段等具有拟分生组织，是最佳的快繁外植体，其形态已基本建成，生长速度快，遗传性稳定。当其他组织外植体再生都失败时，茎尖仍可获得成功。

- ②叶片、根段、花器、子房、子叶等无拟分生组织，如果在适当刺激下能产生拟分生组织，也是植物快繁的合适材料。由于培养技术和条件限制，有些植物的某些组织或器官（如非洲菊的花梗和花瓣），仍无法获得再生植株，确定合适快繁外植体来源很重要。
- ③有的植物可从多种组织或器官中获得再生植株，如香石竹等，这类植物外植体的确定应以采集和灭菌是否容易为标准。



## 2. 外植体生理年龄

- 同一植株的不同器官和同一器官的不同部位都具有不同的生理年龄。
- 沿植物主轴，越近下部生理发育年龄越小，远离发育上的成熟，不易形成花器官，但易分化，再生能力强。越近顶端的器官，生理年龄越老，接近发育上的成熟，易形成花器官，但分化和再生能力弱。嫩叶再生能力高于老叶，木本植物幼树嫩枝、老树基部萌蘖枝再生能力强。

### 3. 外植体大小

- 培养成活的外植体数及其生长速率和繁殖率与外植体的起始大小密切相关。
- 外植体越小存活率和繁殖率就越低。
  - ◆ 茎尖外植体离体成活的临界大小应为携带1~2个叶原基，为0.2~0.3mm。
  - ◆ 叶片、花瓣等约为5mm<sup>2</sup>。
  - ◆ 茎段则为0.5cm。
- 除非脱毒，否则外植体不宜太小。外植体不宜过大，否则易造成污染和遗传变异。

## 二、培养基

- 长期以来，根据培养的植物种类、组织或器官及培养目的不同，已设计了许多培养基配方。
- 正常情况下，普通的基本培养基配方都能适合无菌培养的建立和繁殖体的增殖，而芽的诱导生根对营养基的要求则比较次要。
- 植物生长调节剂种类、浓度及配比是影响植物快繁最重要因素。

## 1. 基本培养基

MS培养基在植物组织培养中应用最广泛。其无机盐含量足以满足多种植物无菌培养的建立和繁殖体的增殖的营养需求。但对某些植物，如乌饭树、越橘、捕虫堇等以及芽的诱导生根，MS的无机盐含量就显得过高，应以1 / 4MS或1 / 2MS为好。

有些植物快繁时需其他培养基。

- 对多数植物来说，蔗糖和葡萄糖是良好的碳源，其浓度为2%~4%，可满足无菌培养的建立和繁殖体的增殖需求，芽的诱导生根所需糖浓度较低，为1%~3%。
- 大规模离体快繁，常用白糖等食用糖代替蔗糖，再生植株未见有明显的差异，但可降低生产成本，提高制种效益。

## 2. 植物生长调节剂

- 植物生长调节剂是完成植物的快繁过程所必需的物质，其浓度的高低及其种类的配合决定着植物的快繁过程能否顺利进行。
- ①高浓度 (1.0~10.0mg/L) 的细胞分裂素和低浓度 (0.1~1.0mg/L) 的生长素配合 (或无需生长素)，可以使腋芽和茎尖外植体在培养起始期启动，形成丛生芽或单芽，并进行繁殖体的增殖；

- ②随着继代增殖次数的增加，应逐步降低细胞分裂素的浓度，甚至在进入芽的诱导生根前，不用细胞分裂素。这种浓度的激素配合或细胞分裂素与生长素浓度的比直接接近1的配比，都可使各种植物器官在培养起始期启动，形成不定芽，并进行繁殖体的增殖。

- ③在含有丰富还原氮的培养基上，附加生长素，特别是2, 4-D，可诱导外植体在培养起始期启动，产生胚状体，将其转移到低或无生长素的培养基上使其成熟、萌发和生长。繁殖体增殖常单独使用低浓度的生长素，或与低浓度细胞分裂素配合使用。
- ④ABA、多效唑、CCC等植物生长调节剂对促进试管苗生根、壮苗、提高成活率等均有一定的作用。

多效唑(*paclobutrazol*, PP333)



### 3. 培养基的物理特性

- 不同材料可选用不同物理状态的培养基。
- ①以原球茎或胚状体方式增殖的材料，可选用液体培养基，如兰花增殖后的原球茎分切后，在液体培养基中振荡培养，形成新的原球茎，然后或继续以同样方法增殖，或转移到固体培养基中，可得到小苗。
- ②大多数材料的培养用固体培养基，此时，pH一般为5.8~6.0。

### 三、培养条件

- 影响植物快繁的培养条件是光照、温度和湿度，也是日常调控管理的主要内容，在不同的培养阶段其适宜的指标不同，调控是个不间断的过程。
- 此外，培养瓶内的气体状况也对植株的生长和发育有一定影响。

## 1. 光照

- 光影响植物培养物的生长和器官发育，主要是光照强度和光照时间。在植物快繁的无菌培养的建立和繁殖体的增殖期间，光照强度应为1000～3000 lx，而阶段Ⅲ时，可将光照强度增至3000～10000 lx。
- 离体培养时增加光照强度可能阻滞培养材料生长，导致轻微减绿，但这种植株碳水化合物积累多，组织充实，易适应外界环境，移栽成活率比在低光强下所得植株高。

- 大多数植物每天14~16h的光照、8~10h的黑暗即可满足其生长发育的需求，但连续光照对有些植物可起到促进苗增殖和健壮的作用，而块茎和其他贮藏器官的形成则可能要求较长的黑暗时期，因为它们在正常形成时是短日照。
- 在大规模离体快繁时，可以利用自然光进行组培苗生产，以降低生产成本。

## 2. 温度

- 离体材料培养和快繁的温度要求应参照植物的原产地，高温(约27℃)适合热带品种，低温(约20℃)有利于高山植物的离体培养，多数植物在 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 都能正常地被诱导，低于10℃会停止生长，高于35℃会抑制正常生长和发育。
- 组织培养时，对外植体或试管苗进行低温或高温处理，可促进器官分化，提高诱导频率，增加脱病毒植株的获得率。

- 如先将植物原始材料置于较高温度 ( $35\sim40^{\circ}\text{C}$ ) 下，经不同时期处理可提高无病毒外植体的发生率。
- 或将组培的鳞茎或球茎小植株在移栽前，预先进行 4~6周 $2^{\circ}\text{C}$ 的低温处理，才能使之正常生长。
- 或在组培苗培养期间，在一定范围内降低温度，减慢其生长速度，可提高组培苗质量。如香石竹在 $18\sim25^{\circ}\text{C}$ 范围内随温度降低，组培苗生长速度减慢，但其质量有所提高，玻璃化现象减少；但当温度高于 $25^{\circ}\text{C}$ 时，组培苗徒长细弱，玻璃化苗明显增加。

### 3. 湿度

- 培养环境的湿度对组培苗生长发育的影响相对较弱，因组培苗是在较密闭容器中生长，容器内相对湿度几乎达100%，可满足其生长发育。但如果培养环境中相对湿度过低，培养基易失水、干裂，故环境中的相对湿度应为70%~80%。

## 4. 气体

- 固体培养时，培养基经高温灭菌及组培苗生长，培养瓶中产生乙烯并积累，乙烯浓度过高 ( $5\sim 6\mu\text{l/L}$ ) 时，可抑制组培苗的生长。需及时转接组培苗，并选择通透性好的封口材料。
- 液体培养时，培养物浸没在液体中会导致缺氧，致使生长停止、死亡。需要进行振荡培养，促进氧气交换，使培养物高效持续增殖。



## 四、继代培养

- 繁殖体以芽或不定芽方式增殖的植物，培养许多代后仍能保持其旺盛的增殖力，但开始继代培养时，需较高浓度生长调节物质，随继代时间延长，减少或不加入生长调节物质即可使其生长，应注意调整培养基激素浓度。
- 对生长速度快或繁殖系数高的植物，继代时间应短(15d)，反之继代时间应长(30d)。

- 繁殖体的增殖以培养细胞或愈伤组织方式继代增殖的植物，形态发生能力易随继代时间延长而减弱或丧失，原因：

- ◆ 全能性丧失

- ◆ 内源激素减少

- ◆ 染色体畸变积累

- 可通过外源生长调节物质的增加、筛选具有形态发生能力的细胞团、缩短继代时间等措施防止其再生能力的丧失。
- 最好的办法是重新建立新的培养细胞系。
- 繁殖体的增殖中的增殖率、污染、玻璃化等因素也影响着组培苗生产的效率和经济效益。

## 五、植株移栽

- 移栽驯化的成功与否直接影响着植物快繁的成本、工作效率及经济效益。
- 如葡萄组培苗移栽成本占总成本的56%~78%。
- 盲目移栽驯化，将导致快繁工作前功尽弃。
- 高湿、恒温、弱光下生长的异养组培苗，出瓶移栽后导致其死亡的因素包括以下几个方面。

## 1. 根系结构

- 根系结构不完善的组培苗移栽后，易造成死亡。死亡原因及克服方法为：

- ①不生根

一些植物，特别是木本植物的组培苗不生根，无法移栽，可采用嫁接法解决。

- ②根与输导系统不连接

从愈伤组织诱导产生的根与已分化芽的输导系统不相通。可将芽切割下来转移到生根培养基中，重新诱导根的形成。

- ③根无根毛或很少

许多试管植株再生根上无根毛，将小苗移栽前置入液体培养基中培养，有时可促进根毛发育。

- ④根无吸收功能或极低

有些组培苗再生根的吸收功能无或很低，移栽前将组培苗在培养液中培养一段时间(如1个月)，可恢复根的吸收功能。

## 2. 叶表皮组织

- 叶表皮组织不发达或结构不正常的组培苗移栽后也易造成死亡。表现为：
  - ①叶表角质层和蜡质层不发达或无

对组培苗和温室苗的扫描电镜观察发现，试管苗叶表光滑，无或极少有结构状的表皮蜡，温室苗成熟叶 (如香石竹) 上下表面均覆盖一层  $0.2\mu\text{m} \times 0.2\mu\text{m}$  的棒状蜡粒，且幼叶也具有少而小的蜡状结构。

- ②叶无表皮毛或极少

组培苗叶柄和叶脉中存在有寿命极短的球形有柄毛和多细胞黏液毛，但单细胞毛和刺毛较温室苗少，致使其保湿和反光性差，易失水。

- ③叶解剖结构稀疏

试管苗、温室苗和大田苗的叶栅栏细胞厚度和叶组织间隙存在明显差异，上表皮细胞长度则差异不显著。



- ④气孔开口大，不关闭

显微镜下观察发现，组培苗气孔始终处于开放状态，保卫细胞变圆，气孔开张很大。

如葡萄组培苗气孔开口很大，甚至气孔开口的横径大于纵径由于气孔的过度开放，气孔口横径的宽度过大，超过了两个保卫细胞膨压变化的范围，导致气孔无法关闭。这种过度开放的气孔要经过逐步炼苗，降低其开张度后，才能诱导关闭。

- **⑤叶片存在排水孔**

- 在长期高湿环境中，组培苗叶片出现排水孔，移栽后极易失水干枯。光合作用能力极低。
- 组培苗栅栏组织少而小，细胞间隙大，影响叶肉细胞中二氧化碳的吸收和固定。
- 气孔不关闭，导致叶片脱水而对光合器官造成持久伤害。
- 含糖培养基中，糖对植物卡尔文碳素循环呈现反馈抑制，二氧化碳量不足，使叶绿体内囊体膜上存在过剩电子流，造成光抑制和光氧化，致使光合作用低下。

- 培养基中加有蔗糖，小苗体内吸收后，无机磷大幅下降，减少了无机磷的循环，使核酮糖二磷酸羧化酶呈不活跃状态，无力固定二氧化碳或极少固定。
- 同时，由于蔗糖的刺激，促使组培苗的呼吸速率增强，呼吸作用大于光合作用。
- 为了克服上述不利因素，可采用如下措施。

- ①驯化锻炼，使试管苗健壮、坚实，形成表皮正常组织结构，恢复气孔功能。
- 驯化过程：移栽前打开瓶口进行2~3d湿度锻炼，然后移栽到高湿、弱光、温度适宜并略低的环境中，逐步降低空气相对湿度增加光照强度，直至小植株适应自然环境。一般移栽初始的光照强度为日光强度的1 / 10，其后每3d增加10%，湿度开始3d为饱和湿度，其后每3d降低10%，直至与大气相同。

- 经强光锻炼和未经锻炼的组培苗茎解剖结构也存在差异，未经锻炼植株的茎维管束被髓射线分割成不连续状，导管少，茎表皮排列松散、无角质、厚角组织少；而经锻炼植株的茎维管束发育良好，角质和厚角组织增多，自我保护作用增强。

- **②培育壮苗**

组培苗能否从异养过渡到自养，其自身生活力起决定作用，凡生活力强、健壮、有较发达根系的组培苗易移栽成活。

在培养基内添加PP333、CCC等植物生长延缓剂是培育壮苗的有效途径。

## 第4节 植物快速繁殖的商业化

- 植物快繁最重要的用途是进行植物的商业化生产，即将植物无性繁殖从田间移入室内，以每年数万倍或数十万倍甚至数百万倍的速度繁殖植物，进行商业化销售。
- 植物快繁的商业化应用始于20世纪70年代的美国兰花工业，80年代已被认为是能够带来经济效益的产业，全世界组培苗的产量已从1985年的1.3亿株增加到目前的10亿株以上，形成了美国的Wyford国际公司、以色列的Benzur苗圃、印度AVT实验室等一批植物快繁商业化公司或实验室，实现了植物生产的工厂化。

- 目前进行商业化生产的植物种类仍有限，多数组培苗还停留在实验阶段，原因：
  - ①生产成本低
  - ②缺乏生产经验
  - ③市场制约
  - ④组培苗生产性能不稳定
- 随着研究不断深入、经济实力的提高及人们认知的改变，植物快繁技术必然会得到更广泛的应用。



## 一、商业化生产规模及工艺流程

- 商业化生产规模的确定应以市场需求为标准，否则组培苗难以销售，造成经济损失。
- 外植体的入瓶、器官形成及增殖、试管小植株出瓶等试管苗生产过程均是在无菌条件下进行的，因此组培苗生产规模的确定是以无菌工作台和培养架的数量来衡量的。

## 1. 商业化实验室建设依据

- 一般情况下，一个单人无菌工作台可按年生产10万~15万株苗来计算；
- 一个 $1.2\text{m} \times 0.6\text{m} \times 2.0\text{m}$ 的6层培养架可年繁殖组培苗1.5万~2万株；
- 如规划一个年生产量达100万株的木本植物组培苗生产工厂，需设置8~10个无菌操作工作台，培养架40~50个。

- 无菌接种室的面积与放置的超净工作台数量有关。一个超净工作台占地面积一般为 $7\sim 8\text{m}^2$ ，两个则为 $10\sim 12\text{m}^2$ 。
- 培养室的面积大小由培养架数量和通道来决定，一个培养架( $1.2\text{m}\times 0.6\text{m}\times 2.0\text{m}$ )占地面积为 $1.5\sim 2.0\text{m}^2$ 。年生产量达100万株的组培苗工厂，接种室面积应为 $40\sim 50\text{m}^2$ ，培养室面积则为 $100\sim 120\text{m}^2$ 。

## 2. 商业化实验室的设计

- 根据已确定的生产规模和组织培养的生产程序，组培苗生产的实验室应尽量布局合理，使生产程序能连续、有效地进行。不同的商业化实验室的布局差异较大，较为理想的平面布置，有利于开展工作。

### 3. 商业化生产的配套设施

- 商业化实验室每天都有上万株组培苗移栽，相应配套设施应包括过渡培养室和露地炼苗场。
- 过渡培养室 可建成较先进的光、温、湿可调控温室，内装喷灌设施和可移动苗床：每平方米苗床可栽种800株试管苗，一茬苗的过渡周期为30d，考虑到组培苗难以完全按要求在固定时间内进入市场，应留出适当面积进行周转。

- 一般年产100万株苗的过渡培养室，建造面积应为400～600m<sup>2</sup>。如果用单坡塑料大棚代替调控温室，可大幅度降低试管苗生产成本。
- 过渡培养室锻炼的组培苗有些可直接进入市场，有些还需移入露地炼苗场做进一步驯化培养，以提高成活率。
- **露地炼苗场** 可以是完全露天，也可以建遮荫或防雨棚，既是二次过渡培养场地，也是种苗等待进入市场的存放地，其面积的大小视需要而定。

## 4. 商业化生产的工艺流程

- 组培苗商业化生产工艺流程是以其快繁程序为基础建立起来的，如最成熟的草莓脱毒苗生产流程和葡萄组培快繁流程。通过茎尖脱毒建立起来的草莓商业化组培苗生产，除必须配备的培养和驯化等条件外，还应增加病毒鉴定室。

## 二、商业化生产及效益分析

### （一）组培苗增殖率的估算

- 组培苗的增殖率多数以芽或苗为单位，但原球茎或胚状体因难以统计，多以瓶为单位。
- 增殖率的计算有理论计算和实际计算两种方法。
- 增殖率的理论值 是指接种一个芽或一块增殖培养物，经过一段时间培养后得到的芽或苗数。



- 增殖率的实际值
- 是指接种一个芽或一个苗，经过实际繁殖周期，得到的实际芽或苗数。
- 如葡萄一个芽，理论上一年可繁殖23万~220万株苗，但实际只得到3万株成活苗。
- 一株葡萄组培苗，理论上一年可繁殖53万株，但实际繁殖株数为3.1万株。

- 实际增殖数与理论增殖数出现很大差异的原因：

- ① 污染淘汰

- ② 出售、转让和实验所用

- ③ 移栽死亡

- ④ 培养容器等设备的限制

- 组培苗理论值的计算公式：

- $y = m \cdot x \cdot n$

- 式中：y — 年繁殖数

- m — 无菌母株苗数

- x — 每个培养周期增殖的倍数

- n — 全年可增殖的周期数

- 组培苗实际增殖值的计算，则需在生产实践中，通过经验的积累而获得。

## (二) 生产计划的制定和实施

### 1. 生产计划的制定

- 生产计划的制定是组培苗规范化生产的关键，生产量不足或过剩，都会带来直接的经济损失。商业化生产计划制定的依据是市场对组培苗的种类、品种及数量的需求及趋势，实验室具备的生产条件和规模。

- 首先应提出全年销售目标，再根据实际生产中各个环节的消耗，制定出相应的全年生产计划，一般生产数量应比计划销售的数量增加20%~30%，即：
- 销售计划=实际生产数量 $\times$ [1-损耗(一般为5%~10%)] $\times$ 移栽成活率
- 销售计划和生产计划应按月份做出，并依据当年总计划进行确认或调整。

- 生产日期则根据销售计划拟定：刚出瓶的组培苗由于不能成为商品苗出售，组培苗出瓶日期应比销售日期提前40～60d。
- 组培苗的成活及质量与苗龄有关，过小或老化的组培苗不应进入市场销售，以确保企业信誉。
- 根据市场需求制定的生产计划不一定十分准确，在实际生产中应根据市场变化及时调整，确保试管苗的适时生产和有效销售。

## 2. 生产计划的实施

- ①准备繁殖材料

繁殖材料必须是来源清楚、无检疫性病害、无肉眼可见病毒症状、具有典型品种特性的优良单株或群体。当外植体增殖形成5~10个繁殖芽时，需及时进行品种危害性病毒检测，淘汰带病毒的材料。

- ②合格繁殖材料的快速增殖

当其增殖达到所需基数后，存架增殖总瓶数的控制就成为影响组培苗效益的关键因素。

存架增殖瓶数过多，易产生人力和设备不足，增殖材料积压并老化，影响出瓶苗质量和移栽成活率，增加土产成本；反之则造成母株不足，延误产苗时期，不能完成生产计划，造成经济损失。



- 存瓶增殖总瓶数=月计划生产苗数 / 每个增殖瓶月可产苗数
- 月计划生产苗数=每个操作人员每天可接苗数x月工作日x人员数
- 控制组培苗生产中的增殖总瓶数，便于在一个周期内全部更新一次培养基，使增殖材料处于不同生长阶段的最佳状态，提高质量。
- 根据增殖的总瓶数及操作员工的工作效率，还可计算生产过程中需投入的人力，保证商业化生产顺利进行。

### (三) 产品质量监控

商业化生产的组培植株需进行产品质量的跟踪监控，如接种状况、污染率、生长情况、生根苗数量、出瓶苗质量等，并建立组培苗出瓶标准。根据出瓶苗的质量等级、移栽的气候条件，估算移栽成活率。并以估算结果为依据，控制和调整生产节奏及进度。

## （四）商业化生产效益分析

- 商业化生产的最终目的是获得经济效益，成本核算十分重要。通过成本核算可了解：

①生产过程中的各种消耗

②管理工作的质量

③各项技术措施的效果

④产品价格的制定标准

- 组培苗的商业化生产既有工业特点，可周年在室内生产，又有农业特征，在温室和田间种植，受气候和季节等影响，还存在种类间、品种间的繁殖系数和生长速度的差异，故成本计算方法比较复杂。
- 组培苗商业化的生产成本应包括：
  - ①人工费：管理人员、技术人员、操作人员的工资和奖金。
  - ②生产物资费：培养基配制所需的各种药品、低值易耗品、当年消耗品等。

- ③设备折旧费：组培苗生产所用的各种固定资产的折旧费。
- ④水电费：商业化生产环节中消耗的水电费。
- ⑤其他费：办公费、培训费、差旅费、种苗费、宣传费等。
- 云南农业科学学院园艺作物研究所花卉中心2001年核算的各类花卉组培苗生产成本为0.12元/株，过渡苗生产成本为0.14元 / 株，其综合成本理论上为0.26元 / 株。但由于组培苗移栽死亡、市场饱和而无法销售等原因，致使其综合实际成本达0.41元/株。

### 三、降低商业化生产成本的措施

- 针对组培苗生产所需的费用，应采取相应措施降低生产成本，增强产品竞争力，提高组培苗经济效益。

## 1. 提高劳动生产率

- 组培苗生产中人工费用是一项很大支出，如国外人工费用占组培苗总成本70%左右，国内占40%。一般情况下，一个熟练操作人员每天可转接200~250瓶（每瓶3~4株苗），且污染率低。因此，按工作性质进行操作人员分工，实行岗位责任制或定额管理、实行计件工资，是提高劳动生产率的有效措施。

## 2. 减少设备投资，延长使用寿命

- 商业化生产中科学管理，精准施策，降低设备使用成本。
- 必须投资的设备，如超净工作台、高压灭菌锅、培养架等，应正确使用，及时维修，延长使用寿命。
- 非必须使用的设备，如酸度计、可调控温室等，可使用替代品，降低生产成本。



### 3. 降低消耗

- 培养器皿用量大，投资大、消耗多 (如月损耗约5%)，使用耐高温高压塑料培养器皿可降低成本。
- 照明时间长 (有时是24h照明)，日光灯管易损坏。
- 水电费支出大，应尽量利用自然光照和温度，建成自然采光节能培养室。
- 充分利用培养室空间，合理安排培养架和培养瓶，保持室内合适温度。

#### 4. 降低污染，提高繁殖效率

- 污染影响繁殖速度、增加成本，所以，组培苗商业化生产中污染率应控制在5%以内此外，提高繁殖率和成活率，增加组培苗和商品苗的质量，也是降低成本、增加效益的有效措施。

## 5. 简化培养基

- 培养基中各种成分的费用是琼脂>蔗糖>生长调节剂>大量元素>有机成分>微量元素。
- 组培苗快繁生产中，可用白糖代替蔗糖，其他培养基成分的删减通过实验来确定。
- 但多种化学药品构成的植物培养基在组培苗成本中所占比例并不大，如葡萄培养基成本仅占总成本的3%左右。

## 四、商业化生产注意问题

### (一) 污染

- **污染** 是指在组培过程中，由于真菌、细菌等微生物的浸染，在培养容器中滋生大量微生物，培养材料不能正常生长和发育的现象。
- 广义的污染，泛指一切影响因素对组培的干扰。

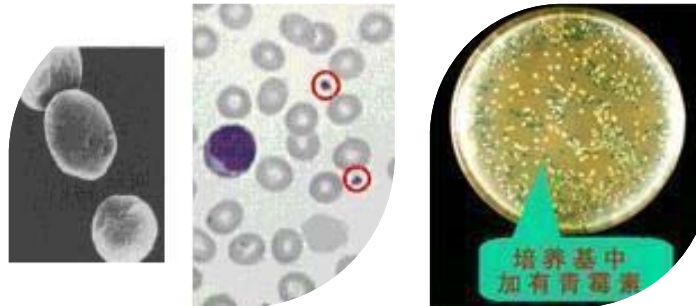
## 1. 污染发生原因

污染通常是由下列原因引起：

- ①培养基及各种接种器皿灭菌不彻底
- ②外植体灭菌不彻底
- ③操作时人为带入
- ④环境不清洁
- ⑤超净工作区域不清洁

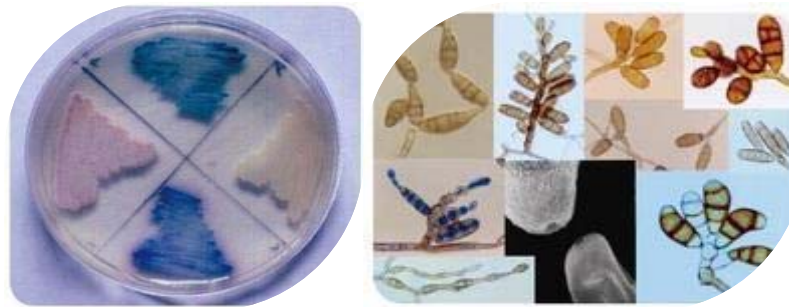
- 细菌性污染

在培养基表面或材料表面出现黏液状物、菌落或混浊的水迹状、泡沫发酵状的现象。细菌污染中以芽孢杆菌最普遍、最严重，高压灭菌锅未排尽冷空气、灭菌温度不够、持续时间不够等造成。



- 真菌性污染

指在培养材料表面或培养基上出现菌丝，继而很快形成黑、白、黄、绿等孢子。这种污染多是空气、瓶口及瓶塞的真菌孢子所引起。



## 2. 控制污染的措施

- 针对引起污染的原因，控制方法有：
- ①灭菌前充分排尽灭菌锅内冷空气，当灭菌锅压力达1.055~1.406 kg / cm<sup>2</sup>、温度为121~126℃时，应保持灭菌时间20~30min。
- ②接种器具每次使用后应用酒精灼烧。
- ③污染的外植体材料应及时淘汰，如果种源有限，对外植体材料可进行二次灭菌。



- ④操作人员接种时应用75%的酒精擦拭双手和培养瓶表面。操作区内不要放入过多待用培养瓶，防止气流被挡住。
- ⑤接种环境应定期用福尔马林等熏蒸灭菌，经常用紫外灯照射灭菌。
- ⑥超净工作台应定期对初过滤器清洗和更换，提前15~20min打开，并用75%酒精擦拭整个工作台。

## (二) 遗传稳定性

- 植物组织和细胞培养中，细胞、组织和再生植株均会出现各种变异，且具普遍性，涉及的植物性状也相当广泛。

### 1. 影响遗传稳定性的因素

- 影响培养材料遗传稳定性的因素有：
- ①基因型
- 培养材料的基因型不同，发生变异的频率也不相同，如甘蔗2个品系再生植株的变异频率分别为12.1%和 34.8%。

- ②继代次数

- 继代培养次数和时间是造成遗传变异的关键因素，一般随继代次数和时间的增加，变异频率呈上升趋势。
- 如：香蕉诱导不定芽过程中，继代5次时的变异率为 2.1%，10次为 4.2%，20次后则为100%，因而香蕉继代培养不能超过1年。

蝴蝶兰连续培养4年后，植株退化不开花，原球茎应2年更换一次茎尖。

- ③器官发生方式

- 离体器官5种发生方式中，以茎段、茎尖等形成的丛生芽、单芽、不定芽的方式繁殖，不易发生变异或变异率极低。

如：葡萄茎段快繁，经过5～8年继代培养，其变异频率与常规方法相同，数万株中只有一株产生变异。

菊花茎尖、腋芽培养，变异率较低，而花瓣诱导的变异率较高。

## 2. 降低遗传变异的措施

- ①选用不易发生遗传变异的基因型材料。
- ②缩短继代时间，限制继代次数，继代一定时间后，重新开始外植体的继代培养。
- ③采用不易发生遗传变异的增殖途径。
- ④采用适当的生长调节物质和较低的浓度，减少或不使用易引起诱变的物质，及时剔除生理和形态异常苗。

### (三) 玻璃化

- 组培苗一种生理失调症状，其叶片、嫩梢呈水浸透明或半透明状，叶片皱缩呈纵向卷曲，脆弱易碎，叶表缺少角质层蜡质，仅有海绵组织，没有功能性气孔。
- 玻璃化苗体内含水量高，干物质、叶绿素、蛋白贡、纤维素和木质素含量低，角质层、栅栏组织发育不全，光合能力和酶活性降低，组织畸形，器官功能不全，分化能力低，生根困难，移栽不易成活。

## 1. 玻璃化苗发生原因

- 玻璃化苗是在芽分化启动后的生长过程中，由碳水化合物、氮代谢和水分状态等发生生理异常所引起的，由多种因素影响和控制，主要原因有：

- ①培养基的琼脂和蔗糖浓度

琼脂和蔗糖浓度与组培苗玻璃化程度呈负相关即琼脂或蔗糖浓度越高，组培苗的玻璃化程度越低。

- 琼脂和蔗糖浓度影响着培养基的渗透势，渗透势不适时，组培苗的玻璃化程度增加。
- 琼脂浓度还影响培养瓶内空气湿度，高湿条件下组培苗生长快，玻璃化发生频率相对高。



- ②培养温度

培养温度与玻璃化程度呈正相关，即培养温度越高，玻璃化程度也越高。温度影响着试管苗的生长速度，一定范围内的高温，组培苗的生产和代谢受到影响，促进玻璃化的产生。

- ③生长调节剂浓度

高浓度的细胞分裂素可促进芽分化，也使玻璃化发生比例提高。细胞分裂素与生长素的比例失调，组培苗正常生长所需的激素水平失衡，导致玻璃化发生。但不同植物发生玻璃化的激素水平是不一致的。

- 如：香石竹在6-BA为0.5 mg / L时，就有玻璃化发生。

非洲菊在不定芽诱导中，6-BA的浓度可达5.0~10.0mg / L，不定芽增殖时，6-BA的浓度则只能是1.0mg / L。

- ④培养瓶中乙烯浓度

非受伤的物理和化学胁迫可加速乙烯的合成，促使玻璃化的发生。

- ⑤培养基含氮量

培养基含氮量高，特别是铵态氮含量高，易引起玻璃化发生。

- ⑥光照

植物在光照时间为10~12h / d、光照强度为1500~2000lx的条件下，能够正常生长和发育。当光照不足再加上高温，易引起试管苗过度生长，加速玻璃化发生。

## 2. 玻璃化苗发生机理

- ①内源激素乙烯在代谢调节中起关键作用。

组培苗在培养中，下列因素：

- ◆水势不当
- ◆通气不畅
- ◆生长调节剂浓度过高
- ◆温度过高等

导致乙烯产生。

- 培养瓶空气中过剩的乙烯抑制了组培苗体内乙烯的生物合成，诱发了其他激素及酶类变化，如降低苯丙氨酸解氨酶和酸性过氧化物酶的活性，从而发生蛋白质、纤维素和木质素的合成障碍及降解，叶绿素分解黄化，壁压降低，细胞过分吸水，导致玻璃化苗形成。

- ②培养瓶中气体组成的改变，也影响着磷酸戊糖途径、光呼吸途径的进行。当磷酸戊糖途径受阻时，细胞壁再生受抑制，戊糖化合物减少，核酸、蛋白质合成受阻；
- 当光呼吸途径被抑制时，减弱了光呼吸对光合的保护作用，过剩的同化力损坏了光合细胞器，降低了光合作用，阻碍了乙醇酸的转化，加重了乙醇酸对植物的毒害作用，从而导致组培苗玻璃化的发生。

### 3. 防止玻璃化苗发生的措施

- ①提高培养基硬度，降低培养基水势。
- ②提高培养基中蔗糖含量或加入渗透剂，降低培养基渗透压。
- ③利用可透气性瓶塞材料，降低培养瓶中过饱和湿度，增加气体交换。

- ④减少培养基中含氮化合物、生长调节物质的用量。
- ⑤增加光照强度，适当降低培养温度，并进行昼夜变温处理。
- 任何生态因子的调整，都要随着培养物的生长而变化，是一个极其复杂的过程。
- ⑥一些添加物或抗生素可减少或防止玻璃化发生，如马铃薯汁、活性炭可降低油菜玻璃化苗频率，CCC、PP333可减少重瓣香石竹玻璃化的发生，聚乙烯醇可防止苹果砧木玻璃化，青霉素 G钾可防止菊花玻璃化，青霉素可降低芥菜玻璃化等。



## （四） 褐 化

- 培养材料向培养基中释放褐色物质，致使培养基和培养材料逐渐变褐而死亡。
- 褐化的发生是由于组织中多酚氧化酶被激活，酚类化合物被氧化形成褐色的醌类物质。醌类化合物在酪氨酸酶的作用下，与培养材料组织中的蛋白质发生聚合，引起其他酶系统失活，导致代谢紊乱生长受阻。

## 1. 影响褐化发生的因素

### ①植物种类和品种

不同植物，同种植物不同品种，体内所含单宁及其他酚类化合物的数量不同，发生褐化的频率和严重程度也相差很大。

一般木本植物酚类化合物的含量较草本植物高，因此，木本植物更易发生褐化，增加组织培养难度。

**如：**核桃单宁含量很高，极易褐变，接种初期就褐化，继而在形成愈伤组织后会因褐化而死亡。

- ②外植体年龄、大小和取材时间

外植体越老化，木质素含量越高，越易褐化；外植体材料越小，越易发生褐化。生长季节的外植体含有较多的酚类化合物。

- ③外植体损伤

外植体切口越大，暴露创伤面越大（机械损伤），酚类物质被氧化就越加重，褐化程度越严重。

消毒剂也可使外植体受伤（化学损伤）而引起褐化，如次氯酸钠使不易发生褐化的植物产生褐化。

- ④光照

取材前对母株遮光处理，可有效抑制褐化发生，因为氧化过程中的许多反应受酶系统控制，而酶系统的活性又受光照影响。

- ⑤温度

温度对褐化发生影响很大，低温可减轻褐化发生，因为低温抑制酚类化合物氧化，降低多酚氧化酶活性。

- ⑥培养时间过长

接种材料转移不及时，导致褐化发生，甚至全部死亡。

- ⑦培养基成分

培养基中无机盐浓度和细胞分裂素浓度过高，易导致材料褐化。

## 2. 防止褐化的措施

- ①在冬春季节选择适当的外植体，即外植体屯具有较强分生能力。
- ②选择适宜的培养基，调整激素用量。
- ③控质温度和光照。在不影响正常生长和分化的前提下，应降低温度，减少光照。

④培养基中添加抗氧化剂和其他抑制剂或吸附剂。

如：抗坏血酸、硫代硫酸钠、柠檬酸、半胱氨酸及其盐酸盐、亚硫酸氢钠、氨基酸、聚乙烯吡咯烷酮、活性炭等，或用抗坏血酸和柠檬酸等抗氧化剂进行材料的冲洗处理。

⑤加快继代转瓶速度(频率)。

如：山月桂茎尖接种12 ~14h后转入液体培养基中，然后每天转接继代1次，连续1周，可完全控制褐化发生。

## （五）黄化

- 黄化
- 是指组培苗失绿，部分或全部叶片黄化、斑驳的现象。
- 在植物组织培养中常见。

## 1. 黄化发生的影响因素

- ①培养基成分

培养基中铁元素含量不足，矿质营养不均衡，激素配比不当，糖量不足。

- ②培养条件

培养瓶通气不良，乙烯含量升高，温度不适，光照不足。

- ③pH

pH变化过大。

- ④抗生素类物质

培养基中添加一些抗生素类物质，如青霉素、链霉素、头孢霉素等。



## 2. 控制黄化发生的措施

- ①严格培养基配制，保证培养基成分正确添加。
- ②调节培养基组成和pH。
- ③控制培养室温度，增加光照，使用透气瓶塞改善瓶内通气情况。
- ④减少或不用抗生素物质。

