

# 植物组织器官培养

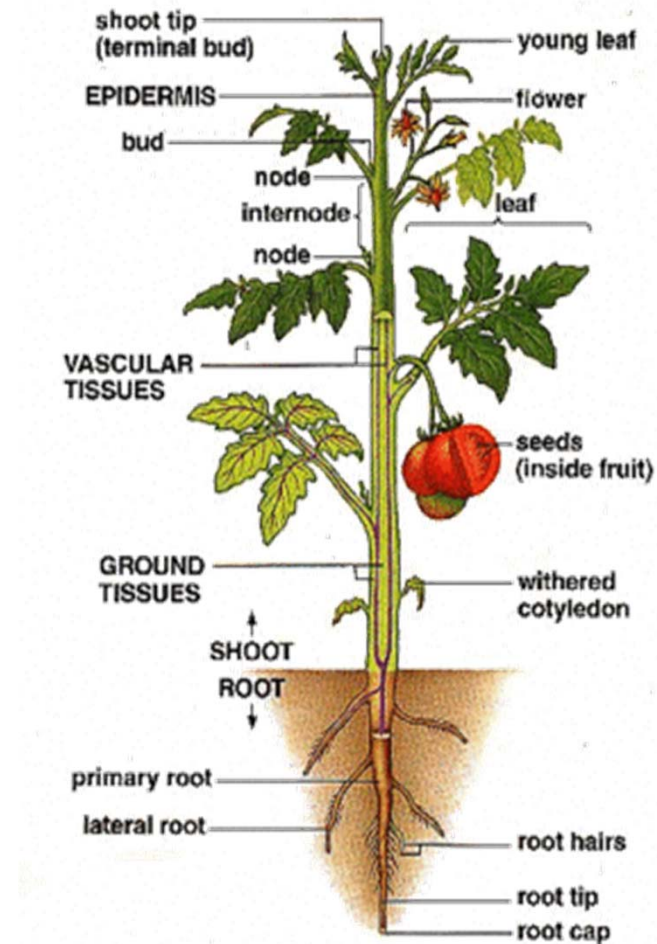
山东农业大学生命科学学院

- ◆植物器官培养

植物体的某部分、某器官的全部或部分、器官原基的离体培养(根、茎、叶、花器、果实和种子等营养和繁殖器官)。

- ◆植物组织培养

植物组织(分生、表皮、薄壁组织等)及愈伤组织离体培养。



# 第1节 植物组织器官培养程序

- 离体的植物器官组织在人工培养条件下，通过不同的器官发生途径，形成体细胞胚或茎芽，继而再生完整植株。

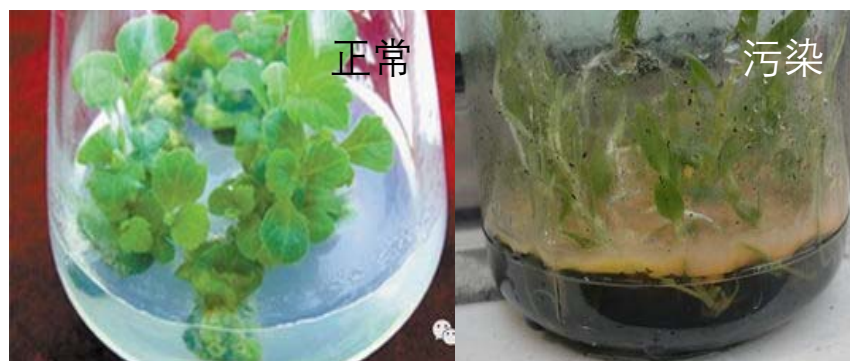
### 基本程序：

- ① 无菌外植体获得
- ② 初代培养物建立
- ③ 形态发生
- ④ 植株再生
- ⑤ 培养产物的观察记载



## 一、无菌外植体的获得

- 污染是组织培养的障碍之一。
- 来源于自然界和室内的开放、半开放生态环境的植物材料携带各种微生物，一旦进入培养容器，造成培养基和培养材料污染，实验无法进行。
- 实验材料灭菌处理，不同材料、不同实验所用灭菌剂种类、浓度、灭菌方法不同。



- 灭菌考虑因素
- 材料性质不同，实验性质和要求不同。

- **异种** ◆不同种植物
- **同种植物** ◆不同栽培制度
- **同种植物** ◆不同生长环境
- **同一植物** ◆不同的生育期
- **同一植物** ◆不同器官组织



带菌情况：带菌程度、带菌种类等

- 消毒实验设计要充分考虑以下几个方面的因素：

- ◆ 实验材料本身因素

- ◆ 实验材料带菌情况

- ◆ 实验的性质与要求

- ◆ 实验室条件等

理 论 指 导  
实 践 依 据  
切 合 实 际  
行 之 有 效

- 1. 茎尖. 茎段. 叶片的灭菌

- ①前处理

清水冲洗 (茸毛较多的用皂液洗涤后再清水冲洗), 去掉表面粘附物, 吸干表面残留水分。

- ②消毒处理 (见下表)


- ③取出灭菌实验材料, 置于无菌滤纸上, 吸干表面残留水分。

- ④取外植体接种于培养基 (一般3~5个/瓶)。





## 常用的消毒方法

消毒方法	消毒处理1	洗涤1	消毒处理2	洗涤2
1	0.2%氯化汞浸泡 10min	无菌水彻底洗涤3 ~5次		
2	70%酒精浸泡 一般 $\leq 10s$	无菌水洗涤 3~5次	10%次氯酸钙浸泡 10~20min	无菌水彻底 洗涤 3~5次
3			2%次氯酸钠浸泡 15~30min	
4			0.2%氯化汞浸泡 10~20min	

- 2. 根. 块茎. 鳞茎的灭菌

- ①这类材料生长在土壤或基质中，挖取时要仔细操作，避免因牵拉、挤压、刮蹭、针刺、切割等不当操作引致的损伤。
- ②灭菌较困难，灭菌前应仔细清洗，对凹凸不平及鳞片缝隙处，需用软刷清洗，切除损伤部位。



- ③应适当增加灭菌时间或增大灭菌剂浓度。如：

- ✱ 将实验材料浸泡在 0.2% 氯化汞溶液中10~12min。

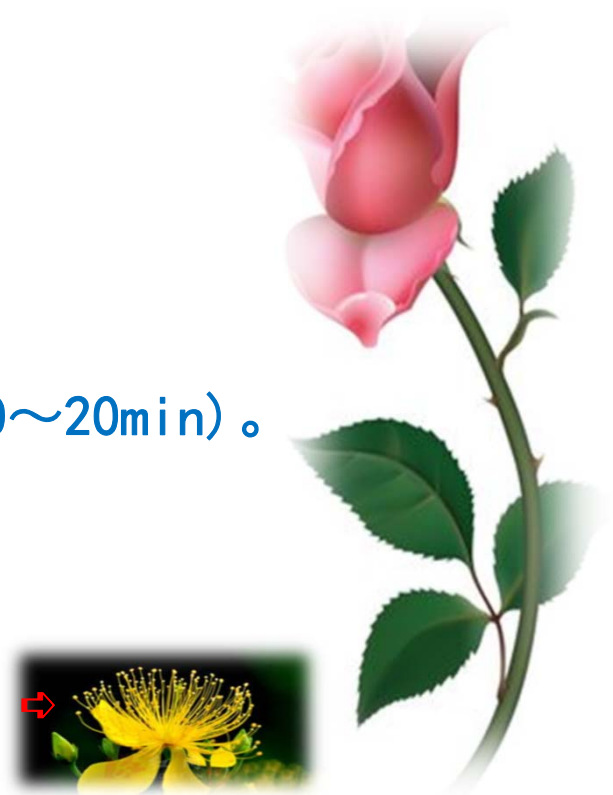
- ✱ 在70%酒精中浸数秒, 然后用6%~10%次氯酸钠溶液浸9~15min进行灭菌。

- ④灭菌后将实验材料取出，置于无菌滤纸上，吸干表面残留水分。
- ⑤取外植体，接种于培养基。

### • 3. 花蕾的灭菌

未开放花蕾中的花药为花被包裹，处于无菌状态采摘后可直接灭菌。

- ①清水冲洗，除掉花蕾表面携带的附属物。
- ②70%酒精浸蘸10~30s。
- ③无菌水洗涤3~5次。
- ④0.1%氯化汞浸泡5~10min(或1%次氯酸钠浸泡10~20min)。
- ⑤取出材料置无菌滤纸上，吸干表面残留水分。
- ⑥取外植体，接种于培养基。



#### • 4. 果实的灭菌

- ①清水冲洗并吸干表面水分。
- ②70%酒精浸泡数秒。
- ③2%次氯酸钠浸泡10~20min (或饱和漂白粉上清液浸泡10~30min) 灭菌。
- ④无菌水洗3~5次。
- ⑤取出果实内部组织或种子接种。

这类材料有的表皮具有茸毛或蜡质，需在灭菌剂中加入几滴吐温-80，增加灭菌效果。



## • 5. 种子的灭菌

- ①清水冲洗并吸干表面水分。
- ②用10%次氯酸钠浸泡20~30min  
(或0.1%~0.2%氯化汞浸泡5~10min) 灭菌。
- ③无菌水洗3~5次。
- ④取出种子接种。

这类材料有的表皮具有茸毛或蜡质，  
需在灭菌剂中加入几滴吐温-80，增加  
灭菌效果。





## 二、初代培养物的建立

- 外植体经过灭菌处理后，要获得初代无菌培养材料，建立起高效的初代无菌培养材料的培养体系并使其增殖和发育，需以下技术。



- 1. 无菌环境

- ①灭菌处理只是表面灭菌，无法去除侵入组织内部病菌。需在培养基中加入抗生素类物质，防止初代培养材料的污染。但抗生素对某些植物生长有抑制作用，适用的抗生素种类及浓度，要在实践中摸索。
- ②保证培养基、接种器械和超净工作台无菌，使接种室环境保持清洁。
- ③对污染的组培材料，应灭菌后再清洗，防止真菌孢子在空气中弥漫和繁殖。



- 2. 规范操作

- 建立无菌初代培养物，操作技术和工作经验等十分重要。

- 无菌操作时，严格操作程序，如：

进入超净工作台的物品和操作者的双手用70%~75%的酒精棉球进行擦拭灭菌，等。

- 3. 条件合适

- 培养材料在离体条件下能否正常生长发育，形成良好的初代培养物，相关因素：

- 培养基的种类

- 激素种类和浓度

- 其他添加物

- 外植体的来源及生长发育状态

- 培养条件

- 理论上，每种植物及其器官组织均具有再生完整植株能力，实际上其再生能力不同。
  - 菊花比月季容易分化出不定芽。
  - 香石竹的叶片、茎尖、茎段、花瓣、子房、花托等外植体均可得到再生植株。
  - 非洲菊的再生植株则多从花托、茎尖和花芽外植体中产生。



- 初代培养物的建立涉及组织培养工作的多个环节

进行组织培养时：

- 应先查找资料，决定所应选用的培养基组成、外植体类型、外植体接种方式以及其他培养条件等减少工作盲目性。

### 三、形态发生和植株再生

- 无菌培养物在适宜的离体环境中生长发育 (形态发生) 形成完整的小植株。
- 离体材料的形态发生是通过两种途径实现的，即器官发生途径和体细胞胚胎发生途径。

- 在器官发生途径中：
- 芽或芽原基起源于培养组织中比较表层的细胞，即**外起源**。
- 根原基则发生在组织较深处，即**内起源**。
- 两者之间一般没有什么必然联系，呈现**单向极性**。

- 在胚状体发生途径中：
- 大多数体细胞胚起源于单细胞，形成的胚状体具有**双极性**。
- 在其发育早期，极性两端分别分化出茎端和根端，其维管与外植体的维管组织没有联系，胚状体维管组织呈独立的“Y”字形。
- 已分化的细胞形成不同的组织。一般形态和机能相同的细胞**形成**同一种组织，机能相关的组织**形成**器官，进一步发育为完整的植株。

## 四、培养产物的观察记载

- 离体人工培养条件下，外植体经过一段时间的诱导培养后，需对培养产物及培养情况进行观察记载，确定下一步的工作方向及工作内容。



- 1. 愈伤组织

- 在伤口分泌的内源激素和培养基中添加的生长调节物质的作用下，外植体产生愈伤组织是一种普遍现象。
- 离体愈伤组织是一种正在增生的非组织化的细胞群，外部形态：
  - ① 坚实致密型，由小而致密的细胞构成。
  - ② 疏松型，由小而松散的细胞构成。
- 色泽有绿色、淡绿色、黄色、紫色等。

- 愈伤组织诱导率计算：

$$\text{愈伤组织诱导率} = \frac{\text{产生愈伤组织的外植体数}}{\text{外植体总数}} \times 100\%$$

- 愈伤组织生长量计算：

$$\text{愈伤组织生长量} = W_2 - W_1$$

$W_1$ ：接种时愈伤组织干重或鲜重。

$W_2$ ：培养一定时间后愈伤干重或鲜重。

- 2. 胚状体

- 许多器官和组织在离体培养时都能产生体细胞胚或胚状体，易与不定芽和愈伤组织区分。
- → 非洲紫罗兰叶片培养中，叶片逐渐变大肥厚，形成肿胀突起，表面逐渐出现密集的小突起，初为淡绿色，逐渐转绿，呈球形小点，用显微镜观察，可见到叉状对生的子叶原基。



- → 杨树茎尖、茎段、叶片等外植体培养中，在切口处产生黄色或乳黄色愈伤组织，表面逐渐呈颗粒状突起，出现大量球形、棒状胚状体，特别是叶脉部位发生的胚状体多而整齐。

$$\text{胚状体诱导率} = \frac{\text{产生胚状体的外植体数}}{\text{外植体总数}} \times 100\%$$

- 3. 芽

- 离体培养外植体被诱导成芽方式有两种：

- ①由顶芽或腋芽萌发产生丛生芽，一些木本和草本植物常见这种现象。

- ②经或不经愈伤组织产生不定芽，植物的许多器官经诱导都可以产生不定芽。

$$\text{芽分化率} = \frac{\text{产生芽的外植体数}}{\text{外植体总数}} \times 100\%$$

- 4. 根

- 组织培养通常先形成芽，再转到适当培养基，诱导不定根发生，获得完整再生植株。
- 根也可以由愈伤组织直接诱导产生。

生根率 = 生根芽数 / 培养芽数

有时需要计算每个材料平均发根数。

## 第2节 植物营养器官的培养

- 植物营养器官培养在植物繁殖中占有重要的地位，可以在短期内培育出大量再生植株。
- 如花卉、果树、林木等大多可通过茎芽、茎段诱导产生丛生芽或不定芽，获得大量再生植株。



## 一、植物根段的培养

- 植物根段培养
- 以植物的根切段为外植体进行离体培养。
- 离体根培养是研究根系生理代谢、器官分化及形态建成的良好实验体系。
- 对生产药物也有重要作用，有些化合物只能在根中合成。
- 离体根的培养多见于草本植物，木本植物相对较少。
- 但一些果树离体根培养取得进展，如杏离体根培养的实验体系已经建立，为开展生理生化研究提供了有效途径。

## (一) 根无性系的建立

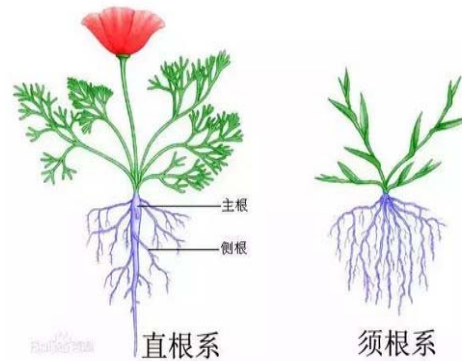
可以选择切实有效的方式进行组织培养，建立根的无性繁殖体系。

实验材料来源：

- ① 无菌种子发芽产生的幼根切段。
- ② 常规的植株根系经灭菌处理后的切段。

根的培养增殖方式，有两种：

- ① 根的直接增殖。
- ② 根的间接增殖。



- 1. 根的直接增殖

- 将根切段接种在适宜根生长的无机离子含量较低的培养基 (如White或1/2MS) 中，25～27℃暗培养，根段增殖形成主根和侧根。
- 每隔7～10d继代1次，取主根增殖，建立根的无性繁殖体系，侧根用作其他实验或增殖材料。
- 番茄根每天可生长10mm，数天后发育出侧根。

- 根切段有三种培养方式：

- ① 固体培养法

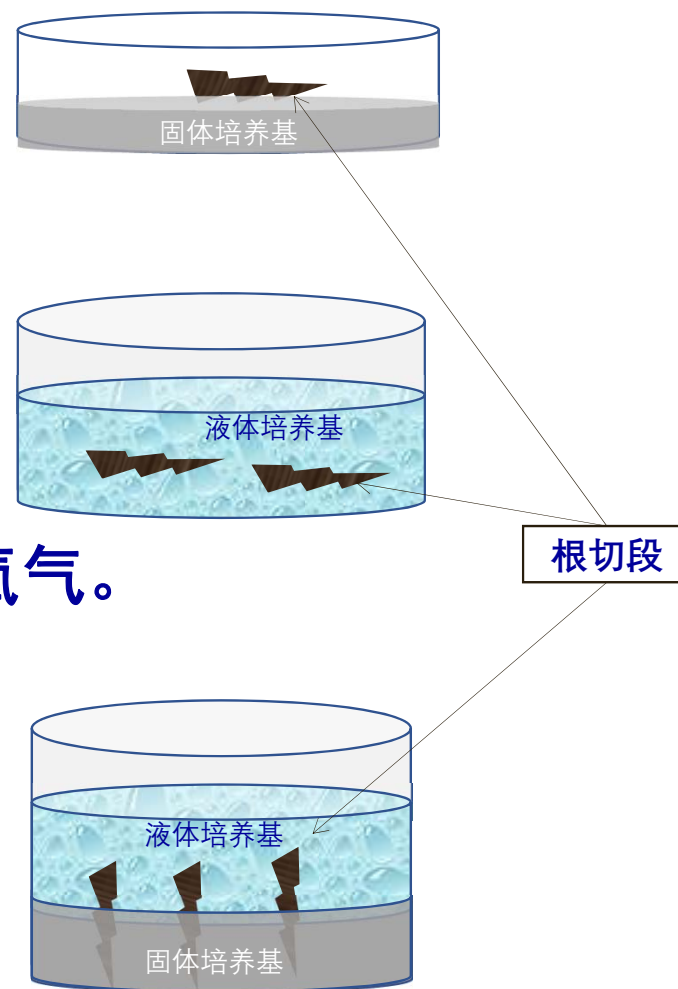
将根段平放在固体培养基上。

- ② 液体培养法

将根段放入液体培养基中，  
置摇床上连续振荡，保证根段获得充足的氧气。

- ③ 固-液双层培养法

将根段的形态学下方（根尖方）朝上，浸在液体培养基中，上方插入固体培养基中。



- 2. 根的间接增殖
- ①愈伤组织诱导

将无菌根切段接种在适宜愈伤组织诱导的培养基(如 MS培养基)中，诱导愈伤组织形成。



- ②植株再生

- 由愈伤组织诱导芽或根或根、芽同时产生，再进一步诱导芽形成根或根形成芽，成为完整植株。
- 毛白杨愈伤组织诱导根形成率达100%。
- 黑种草根的愈伤组织只产生根而茎和叶的愈伤组织仅产生茎。
- 需注意的是，愈伤组织如果先形成根则往往抑制芽的形成，但也有例外。
- 如颠茄愈伤组织先分化根，然后在根尖一端分化出不定芽，继而发育成完整植株。

- 不同植物离体根的继代繁殖能力不同。
- 如番茄、烟草、马铃薯、黑麦、小麦等的离体根，可进行连续继代培养，且能无限地生长。
- 萝卜、向日葵、豌豆、荞麦等能较长时间培养，但不能无限延长，久之则失去生长能力。
- 一些木本植物的根则很难进行离体生长。

### •3. 根的形成过程

- 离体根发生是以不定根方式进行的，可分为根原基的形成和根原基的伸长生长两个阶段。
- 根原基的启动和形成约历时48h，包括3次细胞分裂，即第1, 2次细胞横分裂及第3次的细胞纵分裂，然后是细胞快速伸长阶段，需24~48h。
- 生长素可以促进细胞横分裂，根原基的形成与生长素有关。
- 根原基的伸长生长则可在无外源激素条件下实现。
- 一般从诱导到不定根出现的时间，快的植物种类需3~4d，慢的植物种类需3~4周。



## (二) 影响离体根发生和生长的因素

### 1. 基本培养基

- 应具有离体根发生和生长所需无机盐，一般MS、B5、White等具备这些营养。  
**如：**水仙的小鳞茎在1/2MS培养基上能生根。
- 大量元素中硝态氮和钙、微量元素中硼和铁都有利于根的发生，生根也需磷和钾，但量不宜多。
- 有机物中VB<sub>1</sub>和VB<sub>6</sub>最重要，在生物体内参与多种酶的组成，起生物催化剂作用，缺乏则根生长受阻。

- VB<sub>1</sub>以辅基(辅羧化酶)形式参与羧化酶的组成，催化丙酮酸和其他酮酸的脱羧反应。
- VB<sub>6</sub>以辅脱羧酶的形式参与新陈代谢。
- VB<sub>1</sub>和VB<sub>6</sub>用量较小，一般0.1~1.0mg/L，添加要准确。
- 如番茄生根培养，1.0mg/LVB<sub>1</sub>与0.5mg/LVB<sub>6</sub>组合，效果最佳。
- 碳源以蔗糖效果最好，其使用浓度多数较低，为1%~3%，如马铃薯发根培养基的蔗糖浓度为1%

- 2. 生长调节剂

- 培养基中添加适当浓度的生长素有利于根的形成和生长，但所需生长素的种类和浓度是不一致的。
- **如：**毛白杨一个转基因细胞系的不定根继代培养中，培养基中添加不同浓度的NAA或IBA，观察根的生长情况如下：
  - 培养基中添加 0~0.1mg/LNAA或0.0~0.5mg/LIBA，7d后根平均生长量为58.3mm或40.3mm。
  - 当NAA浓度大于0.1mg/L或IBA浓度大于0.5mg/L时，根生长量减少。
  - NAA浓度达5.0mg/L或IBA浓度达10.0mg/L时，根停止生长。

- 3. 植物材料

- 不同植物、不同基因型、同一植物不同部位和不同年龄对根的发生都有影响。
- 一般情况下，木本植物比草本植物难、成年树比幼年树难、乔木比灌木难，如1年生桉树的插条易生根，但5年生插条则不能生根。

- 4. 培养方式

- 离体根的培养方式对发根率有一定影响，甚至于决定着根的发生与否。
- 如毛白杨只能在固 - 液培养基上获得再生根。

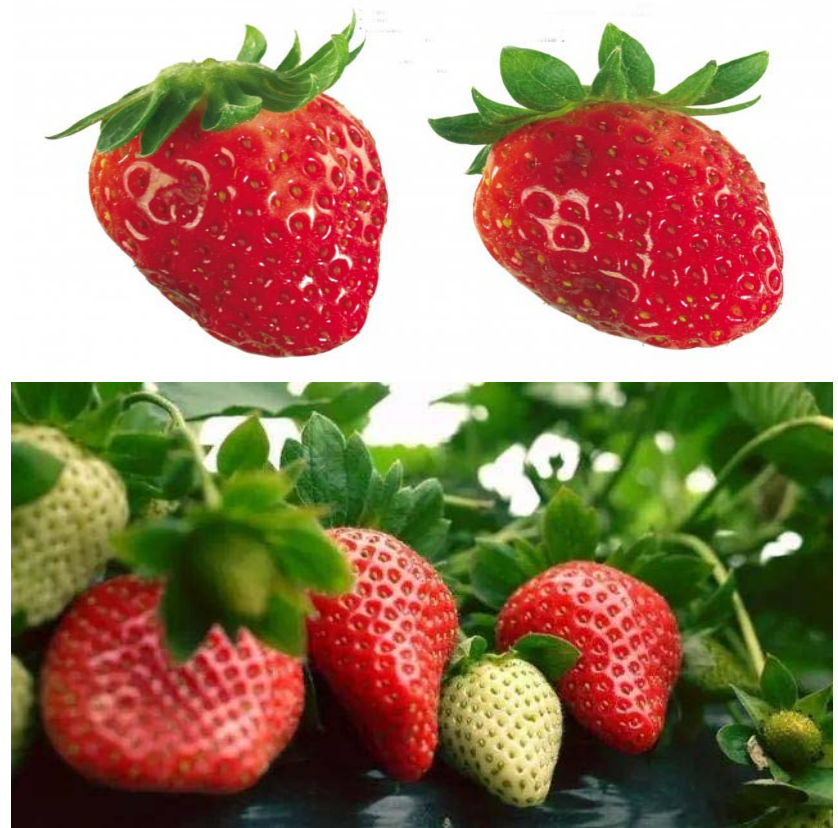
- 5. 光照

- 光照时间和强度对离体根发生和生长有一定影响一般认为黑暗有利于根的形成。如：
- 将苹果根愈伤组织置生根培养基中暗培养可再生不定根。
- 毛白杨根继代培养时发现，光照时间对发根率和根生长量影响不明显，说明植物生根所需的光照时间是不一致的。



- 6. 温度

- 生根所需温度一般为 $16\sim 25^{\circ}\text{C}$ 。
- 但不同植物生根所需要的最适温度不同，而且有较大的差异。
- 如草莓继代培养时，芽再生最适温度为 $32^{\circ}\text{C}$ ，而生根最适温度为 $28^{\circ}\text{C}$ 。





- 7. pH

- 根发生和生长所需的pH范围一般为5.0~6.0，但离体根培养的pH适宜范围因培养材料和培养基组成而异。
- 如番茄根的培养用 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 和 $\text{FeCl}_3$ 时，pH超过5.2时根的生长就很差，但用螯合铁时，pH到7.2时根的生长也不受影响。
- 这是因为：
  - 以 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 和 $\text{FeCl}_3$ 为铁源时，当pH为中性时，铁成为不溶性的氧化物而沉淀，造成铁供应不足而影响根的生长，而螯合铁为有机盐，不会产生沉淀现象。
  - 水稻根在一定pH范围内 (pH3.3~5.8)，随pH的升高而生长加速。

## 二、植物茎段培养

- 植物茎段培养
- 指对植物带有定芽或不定芽的外植体(包括块茎、球茎、鳞茎在内的幼茎切段)进行离体培养的技术。
- 茎段培养的主要目的：
  - ①进行植物的离体快速繁殖。
  - ②研究茎细胞的分裂潜力和全能性。
  - ③诱导细胞变异和突变体的获得等。

定芽 (nomol bud)



- 茎段培养的特点及应用：
- 茎段培养是以芽生芽的方法进行增殖。
- 具有容易成功、变异小、性状均一、繁殖速度快等优点。
- 茎段培养成为植物组织培养中应用最普遍的方法广泛应用于蕨类、木本植物、草本植物等。

- 茎段培养可能的直接产物：
- 带芽茎段经灭菌处理后，经适当培养可能获得：
  - ①单苗(芽)
  - ②丛生苗(芽) (单生芽和丛生芽的增殖方式适宜植物的离体快速繁殖)
  - ③完整植物
  - ④愈伤组织

- **如:**桉树从成熟树的萌芽、接穗芽、徒长枝和生长旺盛的顶芽等都成功地建立了无菌培养物，新生芽不断从茎段芽部(顶部或腋部)长出，但不伸长，形成丛生状。这个过程常伴随着接触到培养基的外植体基部开始愈伤化成为瘤状愈伤组织，并不断增殖，导致更多的芽从瘤状愈伤组织上长出。
- 但许多植物的顶芽或腋芽萌发的单苗或丛生苗(芽)是直接进行增殖的，无愈伤组织的产生，甚至不定芽的获得也不经过愈伤组织途径。
- 可见，茎段增殖时，不同植物及茎段组织的细胞对培养环境的反应是不一致的。

- 为了诱导植物变异、研究细胞全能性、分析茎细胞分裂和再生能力、建立转基因受体，常需进行茎段分化途径和再生植株的研究。
- 茎段愈伤组织的诱导以及其植株再生的研究，在许多植物中获得成功。
- 茎段能否进行芽的增殖，也受到多种因素的影响，但主要影响因素是生长素和细胞分裂素的比值。
- 众所周知，生长素水平增高，外植体有形成愈伤组织的倾向。
- 分裂素水平增高，增进芽的发育，易形成丛生芽。

- 不同植物内源激素的含量具有一定差异，不同植物茎段培养进行芽增殖或诱导愈伤组织时，培养基中添加的激素浓度和种类也不相同。
- 如进行芽增殖培养时，加入适量细胞分裂素，不加或少加生长素。
- 进行愈伤组织诱导时，加入适量生长素，不加或少加细胞分裂素。

### 三、植物叶培养

- 植物叶培养
- 以植物的叶器官为外植体进行离体培养的技术。
- 叶器官包括叶原基、叶柄、叶鞘、叶片、叶肉、子叶。离体叶培养的特殊用途是研究叶形态发生过程以及进行光合作用、叶绿素形成、遗传转化等。

- 自1953年蕨类植物紫箕叶原基再生成熟叶研究以来，叶器官离体培养再生植株已在许多植物中获得成功，尤以羊齿类植物最多，双子叶植物次之，单子叶植物最少。
- 叶器官在适宜条件下培养结果可能是：
  - ①不定芽或胚状体。
  - ②愈伤组织。
  - ③成熟叶（由叶原基发育成）。

- 叶器官的许多部位能前两种方式再生植株。
- 山新杨的叶柄分生能力强，可从一个叶柄基部形成20~30个不定芽。
- 虎眼万年青可从叶片伤口处直接形成不定芽。
- 离体培养花生幼叶可产生体细胞胚。
- 甘薯叶原基可诱导形成胚性愈伤组织。
- 许多植物可从叶柄或叶脉切口处形成愈伤组织，再生成植株。



- 条件化效应
- 不同植物、同一植物不同部位对培养的反应是不一致的。有些植物，从其离体培养的植物体上取得的外植体已具有了被促进的形态发生能力。
- **如：**厚叶莲花掌的叶外植体在培养中不能再生植株，而其茎切段则可再生小植株，用这种再生植株的叶片作外植体时，75%的叶片可再生植株。

- 影响叶器官离体培养的主要因素是植物激素的种类和浓度。
- 如：在杏离体叶片组织培养中，使用1/2MS培养基，附加TDZ和AgNO<sub>3</sub>，经过胚状体途径得到了再生植株。
- 一般叶培养较茎段培养难，常需要进行多种激素的配合使用。
- 如杏叶片培养时，ZT与2, 4-D的组合可诱导愈伤组织的产生，KT与NAA的组合可从愈伤组织中诱导不定芽的产生。

- 番茄叶片培养时，IAA与6-BA组合可诱导不定芽的产生，而NAA与6-BA或KT组合则不能诱导芽的形成
- 叶培养常用的培养基是MS、Heller等，有时附加一定浓度的水解酪蛋白(1mg/L)和椰子乳(15%)，可增强培养效果。

## 第3节 植物繁殖器官的培养

- 植物繁殖器官的离体培养研究：

- ①进行植物的离体快速繁殖

- ②改变植株的染色体倍性

- ③挽救远缘杂种的胚

- ④诱导三倍体植株等

- 所以植物繁殖器官的离体培养在植物育种和繁殖等方面起着重要作用。

# 一、植物花器官培养

- 植物花器官培养
- 对植物的整朵花或花的组成部分(包括花托、花柄、花瓣、花丝、子房、花药、胚珠等)进行离体培养的技术。
- 用于花的性别决定、果实和种子发育、花的形态发生等方面的研究。

- 培养获得可能的直接产物：
- 将未开放的花蕾或花柄、花瓣、花托等组织经过灭菌处理和适当切割后，在适宜的条件下进行培养，培养结果可能有：
  - ①成熟果实
  - ②不定芽或丛生芽
  - ③愈伤组织

- 如授粉或未授粉的花蕾在适宜条件下培养可形成成熟果实，在人参、番茄和葡萄等植物中成功获得了与天然果实相似的果实状结构，并将其培养成熟。
- 花椰菜花托可直接再生不定芽。
- 蝴蝶兰花梗腋芽可直接萌发形成丛生芽。
- 菊花的花托、花瓣和诸葛菜的花托和花序轴可先形成愈伤组织，再形成不定芽。



- 1959年，人们研究了激素对植物花性别决定的影响。
- 将发育早期 (0.5~0.7mm) 的花芽接种在添加不同激素的杂培养基中培养，发现添加 IAA 或幼蕾提早切离，可促进潜在雄蕊转化为子房，但这种促进作用可被赤霉素拮抗。
- 人们还利用生长抑制剂等对花性别决定进行了研究。
- 如用矮壮素 (CCC, 抗赤霉素试剂) 处理潜在花芽培养物，可抑制雄花分化。
- 三碘苯甲酸 (TIBA) 和马来酰肼 (抗生长素试剂) 则抑制雌花分化。

## 二、植物幼果培养

- 植物幼果培养
- 对植物不同发育时期的幼小果实进行离体培养的技术。
- 用途：
- 进行**果实发育、种子形成和发育**等方面的研究，进而为人工种子的研究生产提供理论支持。

- 不同发育时期的幼果经过适当灭菌处理后在适宜培养条件下可能获得：

- ①成熟果实

- ②愈伤组织

- 如：草莓、葡萄、越橘等幼果都在适宜条件下培养成熟。培养获得的成熟果实中，种子基本具有生活力，但形成种子的百分率比自然状态下低。

### 三、植物种子培养

- 植物种子培养

对受精后发育不全的未成熟种子和发育完全的成熟种子进行离体培养的技术。

- 用途：

打破种子休眠，缩短生活周期；挽救远缘杂种，提高杂种萌发率等。

- 将成熟或未成熟种子经过适当灭菌处理后在适宜培养条件下，种子可形成：

- ①小植株

- ②愈伤组织

- ③丛生芽或不定芽

- 种子因包含植物雏形，并有胚乳或子叶提供丰富的营养，很容易培养成功。

- 培养基组成对种子培养结果有一定影响，如果种子培养是以促进种子萌发、形成种子苗为目的，成熟种子所用培养基的成分可简单，并不加生长调节剂，而未成熟种子所用培养基的成分应适当增加，并需加生长调节剂。
- **如：**胡萝卜不同发育期的种子，经培养后可形成种子苗。

如果种子培养的目的是形成愈伤组织或丛生芽，进一步再生植株，培养基中应提供营养物质，并添加不同种类和浓度的生长调节剂。

种子培养对糖的浓度要求较低，一般为1%~3%。

- 培养不同发育时期种子，可研究种子休眠发生时期及部位。
- 向日葵种子整体休眠时期发生在生理成熟之前，即受精后第23d，表现为胚根及上胚轴不萌动，胚胎萌发率从受精后第19d明显下降，至第23d萌发率为0。
- 休眠发生在胚根及上胚轴部位，而且首先发生在胚根上，上胚轴约延迟2d，赤霉素可打破种子休眠。

## 第4节 植物组织的培养



- 植物组织培养对于：

- ✚ 植物的形态发生

- ✚ 器官发生

- ✚ 植株再生

- ✚ 植株脱病毒 等的研究十分有利，而且植物组织培养理论基础的建立多是以离体组织为研究对象的，因此，组织培养在整个离体培养研究中占有十分重要的地位。

# 一、植物分生组织培养

- 植物分生组织培养
- 对植物的分生组织进行离体培养的技术，包括对植物的根尖、茎尖等顶端分生组织和形成层组织进行的培养。
- 分生组织细胞具有持久的分裂能力和很强的生命力，离体培养时易发生细胞分化，再生完整植株，并利于获得脱毒植株。
- 在分生组织培养中，以茎尖培养的研究最为深入，广泛用于植株再生和脱病毒等研究。因此，以茎尖培养为例，说明分生组织培养。

顶端分生组织 (apical meristem)

- **茎尖培养**

- 对植物茎顶端的原分生组织和它衍生的分生组织进行培养的技术。
- 茎尖培养的材料可以是10~100 $\mu$ m的茎尖分生组织，也可以是几十毫米的茎尖或更大的芽。
- 植物带芽茎段经灭菌，剥去外层鳞片或幼叶，露出生长点，切取所需茎尖。
- 茎尖大小视要求而定，茎尖培养成活率及生长能力与茎尖大小呈正相关，不可过小。一般脱毒时茎尖要小于1mm，快繁时可取数毫米。
- 培养感染大丽花花叶病植株上0.2~0.3mm的茎尖，获得了脱毒苗。

- 茎尖组织培养可能发育的方向为：

①芽萌发

②产生胚状体

③产生不定器官

④形成愈伤组织

- 茎尖组织培养后向哪个方向发育，茎尖组织的大小、培养条件、特别是培养基中植物生长调节剂的种类和浓度密切相关。

- 一般外植体微小或为分生组织时，趋向于形成胚性愈伤组织或非胚性愈伤组织，取材部位不同，诱导频率不同。
- 如：甘薯不同部位外植体，胚性愈伤组织的诱导频率差别大。

枝尖生长点时为： 55%~60%

2、3节位时为： 35%

4、5节位时为： 0~25%

6节位以下为： 0

- 茎尖培养常用的培养基为MS基本培养基，其他添加物和植物生长调节剂种类及浓度随培养植物的种类而异，但应避免使用2, 4-D，因它常促使外植体愈伤化。
- 培养条件多为温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照12~16h/d，光强100~3000 lx。

- 茎尖培养可能出现：

- ①生长太慢，即茎尖不见明显增大，但颜色逐渐转绿，最后形成绿色小点。原因可能是茎尖进入休眠状态，或生长素浓度偏低，或培养温度低。
- ②生长过旺，接种后茎尖明显增大，随即在其基部产生愈伤组织，茎尖难于伸长，色泽较淡，说明所用生长素浓度偏高，或使用了2,4-D，或光照太弱、温度过高。

- ③生长正常，即茎尖色泽逐渐转绿，基部逐渐膨大，有时形成少量愈伤组织，茎尖也逐渐伸长，最终形成小枝，说明各因素适宜，此时可移入无生长调节剂或生长素含量很低的培养基中，小枝则继续伸长并形成根系，发育成完整小植株。



## 二、植物愈伤组织培养

- 植物愈伤组织培养
- 诱导植物外植体产生无序生长的薄壁细胞及对其培养增殖优化的技术。
- 植物的各种器官及组织，经培养都可产生愈伤组织，并能不断继代繁殖。

愈伤组织培养 (callus culture)

- **愈伤组织的用途：**

- ①愈伤组织可用于研究植物脱分化和再分化、生长和发育、遗传变异、育种及次生代谢产物的生产等。
- ②愈伤组织还是悬浮培养的细胞和原生质体的来源。
- ③愈伤组织是植物离体培养的良好实验体系。

- 如茶叶外植体接种5d后，开始肿胀，部分细胞尤其是大、小叶脉周围的薄壁细胞首先开始启动，细胞核和核仁增大，继而分裂增殖形成分生薄壁细胞团。
- 新形成的细胞细胞质浓密，单核糖体增多代谢活力强，进行大量蛋白质合成。
- 进一步培养，细胞大量分裂形成愈伤组织此时外植体已失去原来形态结构特点。

- 一般薄壁细胞和形成层易形成愈伤组织。愈伤组织质地差异大，或致密坚实，或疏松柔软，这是内部结构的差异所致。
- 致密坚实的愈伤组织内无大的细胞间隙；疏松的愈伤组织有较大细胞间隙，细胞排列无序。
- 两种质地的愈伤组织可利用生长素进行转换，即高浓度生长素变致密坚实愈伤组织为疏松柔软。

- 愈伤组织的颜色也不尽一致，有的无色，而有的呈绿色 (具叶绿素)、黄色 (具胡萝卜素等)、红色、紫色 (具花青苷)。
- 如当归愈伤组织为无色疏松状。
- 马铃薯为致密淡绿色。
- 边缘桉子叶愈伤组织为较硬的黄色，而雄蕊花丝愈伤组织是先灰色、后黄色。
- 蓝按下胚轴愈伤组织为致密的红色、黄色或淡绿色。
- 葡萄小植株产生的愈伤组织为红色、白色。

- 在愈伤组织中，可能出现液泡小、细胞质浓的小细胞，这种小细胞聚集为丛状，称为胚胎发生丛(EC)或胚性愈伤组织。
- 胚胎发生丛的表面是具有分生能力的细胞团，可产生大量胚状体，如茶的叶外植体开始形成淡黄色表面光滑的愈伤组织，进而逐渐变为表面长出大小不等颗粒状突起的淡黄色疏松愈伤组织。

- 同质细胞组成的外植体，如贮藏薄壁细胞、次生韧皮薄壁细胞等，诱导产生的愈伤组织的发育也高度一致。
- 异质细胞组成的外植体，如茎、叶、根等所形成的愈伤组织也是异质性的，即愈伤组织由不同类型细胞的分裂产物组成。
- 愈伤组织在适宜培养环境下生长迅速，使原培养基营养耗竭，有毒代谢物积累，琼脂失水龟裂，导致愈伤组织停止生长、老化及死亡。故需及时(2~4周)将愈伤组织进行继代培养，使其保持旺盛生长。
- 愈伤组织培养通常在黑暗或弱光下进行，温度为25℃。

### 三、植物薄层组织培养

- 对植物的薄细胞层组织进行离体培养, 是研究离体组织形态发生机理和影响因素、遗传变异产生机理的良好实验体系。
- 培养薄细胞层组织可获得不同的器官。
- **如：**烟草花序轴表皮及表皮下薄层组织, 在MS培养基中添加不同浓度蔗糖、生长素和细胞分裂素, 再生结果不同, 可直接形成叶、根、愈伤组织, 将愈伤组织转移到生根或生芽培养基中, 则形成根或芽。



- 器官的形成还受到糖的种类和浓度、光照强度和时间、水势(加入培养基的渗透因子、固体或液体)、温度等因素的影响。
- 实验培养条件：连续光照，光照强度52lx，温度24~27℃。
- 植物组织培养所用的细胞开始时都是高度分化的。培养 24h后，可见胸腺嘧啶核苷活跃地掺入表皮下的细胞中，说明表皮下细胞有丝分裂活跃，第4d后形成组织学上可分辨的花芽分生组织，8~10d形成花芽且这些花芽均可正常发育，受精后正常结实，种子可发育成正常植株。

- 可见，对于一种可能发生的形态发生过程而言，进行一系列的有丝分裂是必需的。
- 切取毛叶秋海棠叶片主脉表皮和相邻厚角组织5~6层细胞组成的薄壁组织，在1/6的HL溶液中22℃培养4d、5d、7d，可观察到表皮细胞的变化和表皮毛的形成。
- 可见表皮及其以下细胞都具有完善的器官形成能力。

