



云南省普通高等学校“十二五”规划教材

植物细胞工程

陈荣 刘艳红 主编



本书为应用型本科教材，在一定程度上体现了区域本科院校转型发展中教育的岗位针对性、区域性和应用性，并着力于学生创新创业能力的培养，力争能够体现在植物细胞工程领域科技与生产力转换方面更直接有效的特色



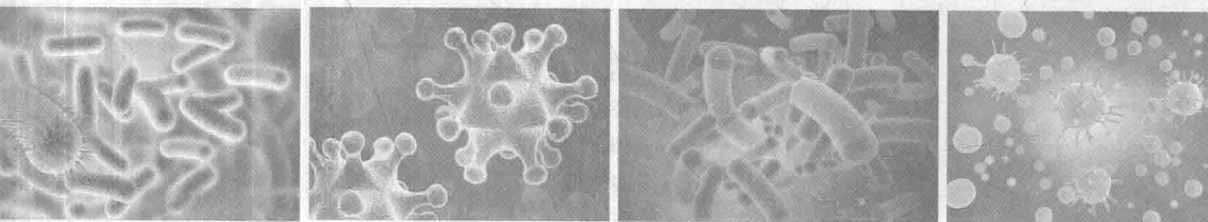
中国农业出版社



云南省普通高等学校“十二五”规划教材

植物细胞工程

◎ 陈 荣 刘艳红 主编
Zhiwu xibao gongcheng



中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

植物细胞工程 / 陈荣, 刘艳红主编. —北京: 中国农业出版社, 2015. 12

云南省普通高等学校“十二五”规划教材

ISBN 978-7-109-21368-5

I. ①植… II. ①陈… ②刘… III. ①植物—细胞工程—高等学校—教材 IV. ①Q943

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 310016 号

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)
(邮政编码 100125)
责任编辑 王玉英

北京万友印刷有限公司印刷 新华书店北京发行所发行
2015 年 12 月第 1 版 2015 年 12 月北京第 1 次印刷

开本: 720mm×960mm 1/16 印张: 13.5

字数: 230 千字

定价: 30.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

编写人员



主 编 陈 荣 刘艳红

参 编 (按姓名笔画排序)

公维昌 刘艳红 李晓静

杨 建 沈云玫 陈 荣

陶宏征 黄华希 薛春丽

前言



本教材为云南省普通高等学校“十二五”规划教材，由红河学院组织编写。适用于应用型本科教育农学、生物技术、中草药栽培技术、林业技术、园林技术等专业。

《植物细胞工程》是在《植物组织培养》基础上发展起来的新学科，是植物生物技术的重要组成部分，具有基础理论与实用技术并举的特点。该课程实践性强，技能培养特点鲜明，是高等教育农林技术类相关专业的一门专业主干课程。本教材编写的初衷是出于区域性本科院校转型发展中缺乏整合了该地方主要经济作物品种，且在编写体例和教材内容选取上具有较强的应用型特色的相关教材，故编写目的是满足当前区域性应用型本科院校转型发展的实际教学需要。教材编写中吸纳了国内同类教材的精华和近几年来在植物细胞工程方面科学研究、教学研究的最新成果。

在编写体例的选择上，针对地方应用型本科院校的生源特点，采用了以培养学生应用能力为目的的体例。教材基于岗位与职业能力分析，以项目为载体、能力培养为核心、工作任务为主线，设计情景教学场景。在突出能力培养的同时强调理论知识的应用性和职业素质的养成，在一定程度上体现了区域本科院校转型发展中教育的岗位针对性、区域性和应用性，有利于激发学生的学习兴趣。

在教学内容取舍上，选取生产和育种上应用较为广泛的实用技术，涉及种苗快速繁殖、植物脱毒苗生产、单倍体育种、胚胎培养和离体授粉、细胞悬浮培养和无性系变异育种、植物原生质体培养

与融合、细胞培养和药用植物次生代谢物质生产等工作任务,基本涵盖了植物细胞工程岗位所需的研发、生产、管理、创新创业等所需的知识与技能。摒弃为了系统和学科完整性而开设的理论性过强或者实用性不高的相关内容。目的是希望符合目前区域性本科院校转型发展的要求,并力争能够体现在科技与生产力转换方面直接有效,期待赋予教材应用型特点。

本书课程导入、任务一、任务二、任务三、任务四、任务五由陈荣编写;任务六由薛春丽编写;任务七、任务八由刘艳红编写;任务九由李晓静编写;任务二中的铁皮石斛、半夏、白芨的快繁由沈云玫编写,金线莲、蝴蝶兰、白掌的快繁由杨建编写,桉树、香蕉的快繁由公维昌编写;实训一、实训二、实训九、实训十、附录由黄华希编写,实训其余项目由陶宏征编写;陈荣负责统稿。

本教材的出版得到2015年云南省普通高等学校“十二五”规划教材《植物细胞工程》教材项目和2015年云南省高等院校提升专业服务产业能力建设“高原特色农业专业群”项目的经费资助。

本书在编写过程中引用了国内一些编著及参考资料,在此表示感谢。由于编者水平有限,书中错误疏漏在所难免,诚盼任课教师 and 广大读者批评指正。

编 者

2015年10月

目 录



<<

前言

课程导入 植物细胞工程概述	1
一、植物细胞工程的原理	1
二、植物细胞工程的范围及几种关系	2
三、植物细胞工程的应用	3
练习题	7
本章选读内容 课程背景资料	8
一、植物细胞工程的发展简史	8
二、植物细胞工程的成果	12
任务一 植物细胞工程的培养基和设施	14
一、植物细胞工程的培养基	14
二、植物细胞工程的基本设施设备	23
练习题	30
任务二 种苗快速繁殖技术	32
一、快速繁殖方式、程序及相关措施	32
二、培养基的选择与配制	37
三、外植体的选择、消毒与接种	41
四、培养条件的选择	46
五、继代培养和生根培养	49



六、组培苗的驯化移栽	50
七、组培常见问题	52
练习题	59
本章选读内容 生产技术资料	63
一、药用植物快繁示例	63
二、花卉快繁示例	71
三、林木快繁示例	75
四、蔬果类快繁示例	81
任务三 植物脱毒技术	84
一、植物病毒与茎尖培养	84
二、其他脱毒方法与病毒检测	89
练习题	93
任务四 花粉培养与单倍体育种	94
一、花药培养技术	94
二、花粉培养技术	103
三、单倍体的应用	104
练习题	105
任务五 胚胎培养和离体授粉	107
一、胚胎培养	107
二、离体授粉	113
三、胚乳培养	114
练习题	115
任务六 细胞悬浮培养和突变体筛选	116
一、细胞悬浮培养的方法和特点	116
二、无性系变异及突变体选择	118
练习题	122



任务七 植物原生质体培养与细胞融合	123
一、植物原生质体培养	123
二、植物原生质体融合	137
三、细胞杂种的选择与鉴定	140
练习题	142
任务八 细胞培养和次生物质生产	143
一、细胞培养和次生物质生产基础	143
二、小规模培养	147
三、大规模培养	151
四、细胞固定化培养和生物转化	152
练习题	155
任务九 植物遗传转化(自学任务)	156
一、植物遗传转化背景知识	156
二、植物遗传转化的方法、原理和程序	158
实训部分	162
实训一 植物组织培养实验室参观	162
实训二 植物组织培养实验室的卫生与灭菌	163
实训三 培养基母液的制备	164
实训四 培养基的配制与灭菌	167
实训五 万寿菊无菌体系的建立及愈伤组织的诱导	172
实训六 月季以芽繁芽种苗快繁	175
实训七 马铃薯茎尖脱毒培养及试管薯诱导	177
实训八 污染苗、玻璃苗、褐变苗的识别与观察	179
实训九 紫锥菊花药培养和花药植株倍性鉴定 ——花药愈伤组织诱导、分化和单倍体鉴定	179
实训十 紫锥菊四倍体诱导及再生植株倍性鉴定	182
实训十一 离体胚培养	184



实训十二 铁皮石斛原生质体培养	186
附录	188
一、常见缩写符号及中文名称	188
二、其他常用培养基	189
部分练习题参考答案	191
参考文献	204



课程导入 植物细胞工程概述

植物细胞工程，就是将植物组织或细胞进行必要的操作并培养于含有特定成分的“培养基”上，使植物组织或细胞按照预先设计的方向生长和发育，以便取得在通常情况下所不能得到的结果的一种生物技术。

植物细胞工程是生物技术的重要组成部分，是一门应用性很强的新兴学科，近年发展迅速。在植物科学基础理论研究和实际应用方面，都取得了重大的进展。特别是在农业生产上，植物细胞工程的应用已经取得的丰硕成果发展成为一种高效和应用广泛的技术。

近 10 多年来生命科学的发展引人注目，根据科学发展的趋势，21 世纪将是生命科学的世纪，以生命科学理论为基础的生物技术，必将成为 21 世纪的重要生产力。植物细胞工程，既是生物技术的一个重要组成部分，也是生物技术中的一个基本独立的体系。今天我们学习这门课程，可以说是作为 21 世纪的高素质生物技术专业人才一种必要的知识和技术准备。

一、植物细胞工程的原理

植物细胞工程的基础理论是植物细胞的全能性理论，即每个细胞都拥有该物种的所有遗传信息，并在条件合适的情况下能够发挥该物种的各种功能和具有发育成为一个正常和完整的独立个体的能力。根据这一理论，组织培养技术通过创造各种合适的培养条件，促使细胞或组织发挥某一功能（例如合成药物）或生长发育成完整的个体，以达到特定的某种目的（例如快速繁殖植物种苗）。

植物生长调节剂在植物细胞培养中起着十分重要的调控作用，是培养基中的关键性物质。植物生长调节剂包括生长素、细胞分裂素及赤霉素等，它们在植物细胞工程中具有不同的作用。

生长素的主要作用在于诱导愈伤组织的形成、体细胞胚的产生及试管苗的生根，更重要的是配合一定比例的细胞分裂素诱导腋芽和不定芽的产生。在植物组织培养中，常用的生长素有 2,4-二氯苯氧乙酸（2,4-D）、萘乙酸（NAA）、吲哚乙酸（IAA）和吲哚丁酸（IBA）等，它们的作用强弱顺序依次



为 2,4-二氯苯氧乙酸>萘乙酸>吲哚丁酸>吲哚乙酸。

细胞分裂素有促进细胞分裂与分化、延迟组织衰老、增强蛋白质合成、促进侧芽生长及显著改变其他激素作用的特点。在植物组织培养中,常见的细胞分裂素有 2-异戊烯腺嘌呤(2iP)、玉米素(ZT)、6-苄基氨基嘌呤(BA)和激动素(KT)。它们的作用强弱顺序为 2-异戊烯腺嘌呤>玉米素>6-苄基氨基嘌呤>激动素。

天然赤霉素,加上合成的一共有很多种,而最有代表性,研究得较多的是赤霉酸(赤霉素 A3 或 GA₃)。虽然赤霉素在非离体条件下具有很多的生理作用,例如促进茎秆的伸长、打破休眠、控制开花、防止落果等,但与生长素和细胞分裂素不同,赤霉素在组培上很少使用,总结有关报道,使用赤霉素的效果和目的主要有:用于果树的胚珠培养,以促进胚胎发育;用于草莓和马铃薯等的茎尖生长点培养;促进椰菜花的愈伤组织再分化。但也有报道说,赤霉素在愈伤组织不定胚分化初期有抑制作用,只有在后期才会对发育有促进作用。

其他植物生长调节剂,如脱落酸(ABA)、乙烯利(CEDP)等在植物组织培养中也有一定的作用,但效果不如上面三类明显。

1948 年,Skog 和我国学者崔激发现嘌呤或腺苷可以解除 IAA 对芽形成的抑制,并诱导成芽,从而确定嘌呤/IAA 的比例是根和芽形成的控制条件,细胞分裂素/生长素的比值,成为控制器官发育的模式,促进了植物组织培养的发展。通常认为,细胞分裂素和生长素的比值小时有利于根的形成,这时生长素起主导作用;比值大时,则促进芽的形成,这时细胞分裂素起主导作用。

二、植物细胞工程的范围及几种关系

(一) 植物细胞工程的范围

现在实际上还没有一个统一的看法,一般认为狭义的植物细胞工程应是以植物细胞为基本单位,在无菌条件下进行培养增殖(proliferation),发掘利用细胞的某些生物学特性或通过人为的精细操作,使细胞的某些生物学特性按照人们的意愿发生改变,以便达到某种特定目的的过程。狭义的细胞水平的细胞工程包括两个具体的内容:第一个内容是细胞融合(cell fusion),或称体细胞杂交(somatic cell hybridization)以及向细胞内注入遗传物质的遗传转化(transformation)或生理活性物质的微注射(microinjection),达到有目的的改造细胞的遗传或生理功能的细胞水平的技术操作;第二个内容是在现代工业生产条件下使植物的培养细胞生产高价值的次生代谢产物的技术过程。

广义的细胞工程包括无菌条件下对植物器官、组织和细胞等各个水平的各



种操作、培养技术和过程。包括试管苗微繁、生长点培养和脱毒、试管授精和胚胎挽救技术、大量培养和物质生产、组织脱分化和器官形成、细胞育种、原生质体培养和融合及基因工程相结合的遗传转化等内容。在这门课中，我们讲的是广义的细胞工程。

(二) 几种关系

1. 组织培养 (tissue culture) 狭义：愈伤组织或分化组织等的组织水平的无菌培养；广义：植物个体、器官、组织、细胞和原生质体各水平的无菌操作和培养。从字面上来看，组织培养着重讲的是培养技术和过程，而细胞工程着重讲的是操作技术。不过，在通常的情况下组织培养和细胞工程具有同样的内涵。相对地说，我们中国人比较喜欢用细胞工程这个词，外国人喜欢用组织培养这个词。因此，在外文期刊和资料中，细胞工程这个词少见。

2. 离体培养 (in vitro culture) (原义，玻璃器皿内的培养；引伸义，无菌培养；反义：in vivo，非离体，活体的)，可以说这个词的意义和组织培养是一样的，离体培养这个词的好的地方是避免使用组织这个词，因此可以不受组织这个定语的限制。实际上，从字面上看，组织培养这个词比较狭隘，为了不受这种狭隘性的限制和减少误解，有一个专业杂志就采用了植物细胞、组织和器官培养 (plant cell, tissue and organ culture) 这样一个很长的刊名。

3. 遗传工程内容 包括基因工程 [gene engineering (gene-technology)] 和细胞工程 (cell engineering)。植物基因工程的特点是有供体、载体和受体三个环节。根据现有的情况来看，基因工程除了受体是与原生质体培养和组织培养密切有关外，基因工程在理论与技术上都自成一体，与细胞工程处于一种并列的状况。细胞工程我们上面说过，是离体状态下对植物组织和细胞进行无菌培养和操作的具有一定目的的技术。基因工程和细胞工程的联接点是植物原生质体或培养细胞作为重组基因的受体进行遗传转化的过程。因此，也可以这样说，基因工程是遗传工程的上游工作，细胞工程是遗传工程的下游工作。

三、植物细胞工程的应用

植物细胞工程包括多种内容，各种内容各有其特殊的作用。本节仅就有关内容进行简要的介绍，而其中容易掌握和与农业生产有密切关系的内容将在本书以后的章节中作详细地进一步介绍。

(一) 种苗快速繁殖技术

用组织培养方法快速繁殖植物种苗，是组织培养技术应用于生产的最主要的实例。植物组织培养的实质性实验研究自 20 世纪初开始，在经过了 50 多年



的探索和发展后,首先在繁殖兰花种苗方面得到了应用,形成了以组织培养技术为基础的工厂化兰花生产产业。兰花的工厂化生产这一事件标志着组织培养技术开始走出实验室,成为一种能够大规模应用于生产的实用技术。

组织培养技术由于能够繁殖种苗,因此可以用来繁殖某些在正常情况下繁殖效率很低的植物品种。例如,用自然分株的方法 1 株兰花一年只能繁殖 2~4 株兰花小苗,而利用组织培养技术则可繁殖出成千上万株兰花小苗。近 40 年来,组织培养技术在繁殖种苗上的作用受到了人们普遍的重视,培养技术得到不断的改进和完善。现在,能够以组织培养技术进行种苗繁殖的植物种类有上百个,而最常见的植物种有各类兰花、草莓、马铃薯、香蕉、甘蔗、苧麻、杨树和桉树等。

在种苗快速繁殖中,近年来兴起了利用组织培养方式生产微型的植物繁殖体,然后再加上人工胚乳、生长调节剂和防腐剂等并裹上人工种皮,制作成“人工种子”的研究。人工种子具有方便储藏、运输和栽种的特点,现在某些杂种蔬菜的繁殖上已能够取代正常的种子而在生产上得到应用。

(二) 清除作物病毒的培养技术

农作物中有很多种植物常常受病毒感染而终身带有病毒,特别是如马铃薯、草莓、大蒜、康乃馨等无性繁殖的植物,由于利用了带有病毒的营养器官进行繁殖,使植株从苗期一开始就带有病毒,在生长的早期就发病而严重影响中、后期的生长发育。由于目前还没有对付病毒病的特效农药。因此,一旦发生病毒病就难以进行控制,病毒病的发生常常严重影响作物的产量和品质,给农业生产带来巨大的损失。

利用组织培养的方法清除病毒是根据病毒在植株上分布不均匀,在生长旺盛的茎尖生长点附近没有病毒的特点来进行的。在实际工作中,切取茎尖生长点进行培养,促使生长点发育成植株,就可能得到没有病毒感染的植株。在此基础上利用没有病毒的植株材料进行繁殖,就可以生产出大量的无病毒种苗供生产使用。

(三) 细胞突变体培育新品种的技术

植物细胞在培养过程中会产生各种各样的变异,当将这些细胞培养成植株后,一部分变异会在植株上表现并且能够进行稳定地遗传。这样,就可以在这些植株中选择出有用的变异用于生产。

利用培养细胞的变异进行筛选育种的优越性有多个方面,最主要的优越性是可以采用简单的方法,在培养瓶中对数以万计的细胞进行筛选,因此可以节省耕地和劳力。培养细胞由于处于特殊的生长环境,同时具有特殊的状态,例



如细胞没有功能的分化,细胞之间的联系松散,相互制约很小并且不断地进行分裂,因此培养细胞的突变频率往往较高。此外,还有很多方法可以提高培养细胞的突变频率。因此,细胞突变体筛选在很多情况下是一种行之有效的方法,在育种的实际中得到了广泛的应用。目前,采用这种方法已筛选到抗病、耐盐、高赖氨酸或高蛋白含量及矮秆高产的突变体。

(四) 单倍体培养快速育种技术

自1964年由曼陀罗花药培养获得了单倍体植株以来,各国许多科学家致力于花药培养,因此这一领域发展很快。到现在已有300种以上植物的花药培养取得了成功。如今花药或花粉培养已经作为一种高效的育种手段,开始广泛地应用于作物育种。我国科学家在单倍体育种方面做出了杰出的贡献,1974年用单倍体育种法育成了世界上第一个烟草新品种,随后又育成大面积栽培的水稻、小麦新品种和其他多种作物的花培新品系。

与常用的杂交育种相比,单倍体育种的优越性在于能够极大地缩短育种的年限。常规杂交育种通过确定亲本进行杂交和对后代变异进行选择可以培育出和父母本不同的新品种,但一般需要经过5~8代、甚至更多世代的选育才能够得到遗传稳定的后代。单倍体育种通过花粉或花药的培养,促使单倍体的花粉细胞发育成为单倍体的植株,然后再通过简单的处理使单倍体染色体加倍成为正常的有结实能力的二倍体植物。由于这种由花粉发育成的植株在遗传上是稳定的,因此可以从花粉植株中选择符合育种目标的个体,直接栽培繁殖成为新的品种。

(五) 试管授粉和胚胎培养的育种技术

远缘杂交是培育在农艺性状上能够明显超越双亲的优良新品种的有用方法,但由于父母品种在生理和遗传上的较大差距,因此杂交难以取得成功。造成杂交难以成功的主要原因有两个方面:第一是父本的花粉不能在母本的柱头上正常萌发,或不能在花柱中正常伸长并完成授精作用;第二是虽然花粉能够萌发和完成授精作用,但精子和卵子结合后形成的合子只能够进行阶段性的发育,在还未成熟时就发生败育,不能形成有活力的种子。

远缘杂交中出现的这两个方面的问题有可能通过试管授粉和胚胎培养技术而得到解决。试管授精可以克服父母本植物在授粉授精时的不亲和,而胚胎培养则可以避免杂种幼胚的败育。目前这项技术已经很成熟,在甘蓝属种间杂交得到了很好的应用,在许多其他植物种类上也有成功的例子。此外,利用胚胎培养技术还可以培养植物的胚乳,由胚乳发育成的三倍体植物能够结没有种子的果实,例如无籽西瓜等,在农业生产上也有重要的用途。



(六) 创造新物种的细胞融合技术

利用化学的方法将植物细胞从组织中相互分开并将细胞壁分解, 这些没有细胞壁的细胞称为原生质体。通过某些特殊的方法将两个来自不同植物种的原生质体进行融合的方法叫细胞融合, 通过培养融合的杂种细胞使其发育成为完整的植株可以培育出新的品种。因为一般采用的融合细胞不是性细胞, 也没有通过开花和授粉授精的有性杂交的过程, 因此细胞融合也称为细胞无性杂交。

细胞融合的重要作用是可以突破融合双方有性杂交的不亲和性, 创造新型物种或育成新的优良品种。细胞融合和上面提到的试管授粉和胚胎培养的作用相似, 但在突破物种间的遗传界限方面具有更大的潜力, 这也是生物技术中最诱人的一个方面。自 1978 年通过细胞融合获得了马铃薯和番茄的无性杂种后, 在很多其他植物也取得了不同程度的成功, 但近年来的研究表明, 亲缘关系远的植物种之间的融合难度很大, 需要克服很多困难才能取得杂种。

(七) 改造物种的遗传工程辅助技术

植物组织培养技术在遗传工程中有重要的应用。遗传工程由基因工程和组织培养两部分组成, 组织培养把基因工程和作物育种连接起来, 形成一个先进和实用的现代作物育种体系。基因工程将合成的或来自其他物种的有用基因连接到一种具有基因运载能力的载体上, 然后通过某些方法使带有有用基因的载体进入需要进行遗传改良物种的细胞中。这里组织培养的作用不仅是提供处于合适状态的细胞, 还必须创造合适的条件将经遗传改造的细胞培养成植株, 才能进行栽培和用于生产。现在这种由基因工程、组织培养和传统的栽培选育相结合的育种体系已成为农业生物技术的中心, 并由此体系培育出许多抗病毒、抗虫、抗病的作物新品种。

(八) 高价值的植物代谢产物的生产技术

植物细胞具有植物体的某些功能包括合成某些特殊代谢产物的功能。因此, 大规模培养植物组织和细胞可以利用这些细胞高效地生产人类所需的特殊天然产物, 如某些蛋白质、脂肪或糖类、香料、生物碱及其他对人体机能具有活性作用的化合物。利用细胞培养进行物质生产具有很多有利的特点。例如, 植物体由不同的器官组织和细胞组成, 但各种器官组织和细胞的生产能力是不同的。通常的作物栽培不能只要叶子不要根或只要根不要叶子, 但细胞培养可以只选择生产能力强的细胞进行培养。同时, 生产也可以不受季节的限制, 能够进行连续的生产。

1983 年日本首先实现了细胞培养的实用化工业生产。第一个实现实用化工业生产的是紫草素。紫草素是由紫草产生的一种化学结构比较复杂的天然产



物,既是一种染料,同时也具有抗菌消炎的功能。紫草素主要存在于紫草植物的根组织中,最高含量为2%。而通过合适的培养调控,培养细胞内的紫草素含量可以达到干物重的23%,比自然生长的植物组织含量高出10倍以上,表现出极大的经济效益。现在,可以进行商业化生产的品种已经扩大到人参、毛地黄(强心甘)、红豆杉等多种含有生理活性物质的植物细胞。

(九) 种质资源长期保存技术

利用组织培养的方法创造一种使植物细胞、组织或器官仅能够进行非常缓慢生长的条件可以对植物种质资源进行长期的保存;而通过一定方法程序的处理可以将植物组织保存在-196℃的绝对低温条件下,从而达到长期保存种质资源的目的。

这种方式的优点是节省人力和土地资源,减少由于自然灾害等造成的植物资源的丧失。

(十) 科学理论研究的辅助技术

应用植物组织培养技术,可以把某一特定的组织或器官从整体上分离出来,使这个器官独立于植物体的其他部分,在不受母体控制的情况下继续发育和进行有关的生命活动。所以,组织培养技术可以简化研究体系,成为某些研究的重要手段。例如,细胞培养可以研究植物的抗病性和生物合成等问题,并从中总结出理论用于指导实践;器官培养可以探讨植物各种器官的营养需求、生长发育规律、不同器官之间以及器官与母体之间的相互关系,从而达到促进器官的发育或者发挥该种器官特有的功能为生产服务的目的。

练习题

一、名词解释

1. 植物细胞工程
2. 细胞全能性

二、填空题

1. 生长素的作用有_____、_____和_____。
2. 植物细胞工程应用于_____、_____、_____、_____和_____等。
3. 植物生长调节物质有五大类_____、_____、_____、_____和_____。