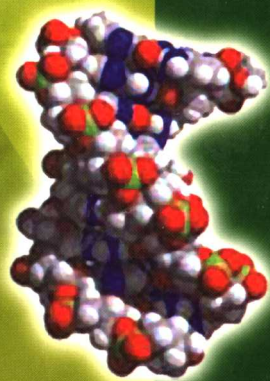


植物生物技术

胡尚连 王丹 编著



西南交通大学出版社
[Http://press.swjtu.edu.cn](http://press.swjtu.edu.cn)

植物生物技术

胡尚连 王 丹 编著

西南交通大学出版社

· 成 都 ·

图书在版编目 (C I P) 数据

植物生物技术 / 胡尚连, 王丹编著. —成都: 西南交通大学出版社, 2004.11

ISBN 7-81057-821-9

I. 植... II. ①胡...②王... III. 植物-生物技术
IV. Q943

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 125417 号

植物生物技术

胡尚连 王丹 编著

*

责任编辑 祁素玲

封面设计 何东琳设计工作室

西南交通大学出版社出版发行

新华书店 经销

(成都二环路北一段 111 号 邮政编码: 610031 发行部电话: 87600564)

<http://press.swjtu.edu.cn>

E-mail: cbsxx@swjtu.edu.cn

西南交通大学印刷厂印刷

*

开本: 850mm × 1168mm 1/32 印张: 5.625

字数: 142 千字

2004 年 11 月第 1 版 2004 年 11 月第 1 次印刷

ISBN 7-81057-821-9/Q · 002

定价: 14.00 元

图书如有印装问题 本社负责退换

版权所有 盗版必究 举报电话: (028) 87600562

《植物生物技术》编著者与主审

编著者

胡尚连 西南科技大学生命科学与工程学院博士、教授

王 丹 西南科技大学生命科学与工程学院教授

主 审

李文雄 东北农业大学教授、博士生导师

曾寒冰 东北农业大学教授

前 言

生物技术是 21 世纪主导技术之一，是 21 世纪高新技术的核心，在解决人类面临的食物、资源、健康、环境等重大问题中将发挥重要作用。近 10 多年来世界生物技术发展迅猛，在基础研究和应用开发方面都取得了令人瞩目的成就，生物技术的研究成果越来越广泛地应用于农业、医药、轻工食品、海洋开发及环境保护等多个领域。发展生物技术及其产业已成为世界各国经济发展的战略重点。生物技术作为 21 世纪主导技术，对人类社会的生产、生活各方面必将产生全面而深刻的影响。

由于生物技术的快速发展推动了生物科学各个领域的发展，植物生物技术也发展迅速，在农业产业结构的改善和产量增加中起到很大作用，已引起世界各国政府和科学家的高度重视。目前，植物生物技术领域中研究最活跃的是应用转基因技术，将目的基因导入植物体内，从而获得高产、优质、抗病虫害等转基因植物新品种，以达到充分提高资源利用效率和降低生产成本的目的。但外源基因的遗传转化技术必须以植物组织、细胞和原生质体培养及植株再生技术体系为基础，因此，了解和掌握植物生物技术的基本原理和相应实验操作技术显得尤为重要。

本书以植物生物技术有关概念、基本原理和关键技术为主线，结合国内外有关报道，介绍该领域研究历史和发展动态、消毒灭菌技术、培养基、愈伤组织诱导与植株再生、植物体细胞胚胎发生、植物细胞悬浮培养与细胞突变体筛选、植物原生质体培养与遗传操作、转基因植物、人工诱发单倍体及其应用、植物快速繁殖技术等，共分 10 章，并附相应实验技术和综合试验设计、植物生物技术基本概念等。该教材系统性强，内容简练，概念明

确，图文并茂。由于涉及学科面较宽，在编写过程中，限于编者水平，书中不妥之处，望读者批评指正。因引用资料来源较多，仅列出主要参考文献，并在引述处标注著者和年份以便查阅。

本书适合作为生物技术、农学、园艺等专业本科生教材，也可作为从事植物生物技术研究应用的科技工作者的参考书。

编者

2004年8月

目 录

第一章 植物生物技术的概念和发展过程	1
第一节 植物生物技术的概念和应用	1
第二节 植物生物技术研究内容与任务	6
第三节 植物生物技术的基本理论依据及其发展过程	8
第二章 实验室的建立与消毒灭菌技术	12
第一节 生物技术实验室的建立和基本设备	12
第二节 消毒灭菌技术	13
第三章 培养基	20
第一节 培养基的基本成分和主要培养基	20
第二节 培养基的选择及制备	33
第四章 愈伤组织的诱导、形成及分化	35
第一节 愈伤组织的诱导、形成及特点	35
第二节 愈伤组织的形态建成	40
第三节 愈伤组织形成及形态建成的生理生化基础	54
第五章 植物体细胞胚胎发生	59
第一节 体细胞胚胎发生特点及方式	59
第二节 体细胞胚胎的起源和发育成植株的能力	61
第三节 体细胞胚发生生化基础及 影响体细胞胚发生的因素	67
第四节 体细胞胚胎发生基因表达与调控	77
第五节 植物体细胞胚形成与人工种子	81

第六章 植物细胞悬浮培养与细胞突变体筛选	87
第一节 植物细胞悬浮培养体系的建立和愈伤组织诱导与植株再生	87
第二节 细胞突变体筛选与作物改良	94
第三节 细胞培养物的超低温保存及种质库建立	97
第七章 植物原生质体培养与遗传操作	103
第一节 植物原生质体分离和培养与植株再生	103
第二节 植物体细胞杂交	114
第八章 转基因植物	117
第一节 转基因植物研究进展	117
第二节 植物转基因方法	118
第三节 转基因植株的检测	129
第九章 人工诱发单倍体及其应用	130
第一节 植物单倍体概念及人工诱发单倍体的应用 ..	130
第二节 花药培养及应注意的问题	130
第三节 花粉培养及应注意的问题	132
第十章 植物离体快速繁殖技术	135
第一节 植物离体快速繁殖及其应用	135
第二节 植物离体快速繁殖技术程序与关键	136
附录一 基本实验技术	140
附录二 综合性试验设计	164
附录三 植物生物技术基本概念	167
附录四 常用植物激素与维生素	169
参考文献	170

第一章 植物生物技术的 概念和发展过程

第一节 植物生物技术的概念和应用

一、植物生物技术的概念与应用领域

植物生物技术 (Biotechnology) 是现代遗传学、细胞生物学和分子生物学的一个复杂集合体, 是以生命科学为基础, 利用生物体系和工程原理生产生物制品和创造新物种的综合性科学技术。

植物生物技术所涉及到的主要技术为植物组织与细胞培养、植物细胞大批量培养、植物细胞融合、植物染色体工程、植物细胞器移植、DNA 重组与外源基因导入及以上技术与物理、化学技术的结合, 主要应用于花卉和苗木离体快速繁殖、植物新类型的创造和品种改良以及次生代谢物质生产等领域。

二、植物生物技术在作物品种改良中的应用

通过植物生物技术改良作物是 20 世纪 70 年代以后农业科学中最重要的发展之一, 对了解、操作、修饰和保护农作物种质具有潜在价值。20 世纪 70 年代以后, 随着生物技术和分子生物学的发展, 植物生物技术备受重视, 并开始应用于作物品种改良。但对于体细胞无性系变异的存在, 曾经有过怀疑和争论, 焦点在

于这种变异有无遗传基础，后代能否稳定遗传，在作物品种改良中是否有实际应用价值。直至 20 世纪 90 年代初，随着研究手段的提高，大量研究证明，体细胞无性系变异确实存在并可以遗传，可应用于作物品种改良，并且在有些作物上获得成功，如小麦（胚培养和细胞培养）、水稻（原生质体培养）、大豆（原生质体培养）等。不断有许多成功的实例应用于生产，进展速度比过去预期要快，但困难和障碍仍有待克服。

植物生物技术在作物品种改良和次生代谢产物生产以及脱毒培养等中的应用具有很多优点，尤其是在作物品种改良中的应用比传统育种方法具有如下优点：① 应用植物生物技术进行作物品种改良可以省时省力；② 进行品种改良可以更有有的放矢；③ 可供选择的变异范围广；④ 可作为拯救远缘杂交杂种胚发育中止的手段。但由于传统方法可以为植物生物技术的应用提供变异基础，因此，植物生物技术手段必须与传统育种方法相结合才更有生命力。

植物生物技术在农业上的应用主要有以下几个方面。

1. 幼穗、幼胚、胚珠和子房以及试管受精克服远缘杂交不育性与扩大遗传变异范围在许多作物远缘杂交育种中都得到广泛应用

幼胚培养作为解决种间、属间等远缘杂交中杂种胚停止发育的手段已在许多作物的远缘杂交育种中广为应用。离体幼胚培养可用于杂种育种。早在 20 世纪 20 年代，Laibach（1925）通过培养亚麻种间杂交时形成的幼胚成功地获得了杂种，从而开创了植物胚胎培养的应用。其后，20 世纪 30 年代，不少人在果树胚胎上做了很多工作，所培养的胚都较大。LaRue（1936）通过研究认为，小于 0.5 mm 的胚的培养不能成功。20 世纪 40 年代起，由于对离体幼胚培养中营养需要的大量研究，主要是在培养基中加入椰子汁、麦芽提取液等物质，从而使培养心形期或比心形期

更早时期的胚（0.1 ~ 0.2 mm）获得了成功。我国胚培养（简称胚培）开始较早，但主要用于裸子植物。建国后，中国科学院植物研究所、遗传研究所和北京大学生物系相继开展这一工作，并取得一定进展，如大小麦杂种幼胚、小麦和山羊草胚培养等。东北农业大学小麦研究室自 1983 年以来也开展这一工作。胚培养成功地用于远缘杂交育种和种内杂交育种实践，同时也广泛地利用胚培养技术研究胚胎发育和与胚胎发育有关的内外因素，以及与其发育有关的代谢生理生化变化。

在胚胎发生初期就停止发育的胚，不仅取胚困难，而且培养条件也很差，但通过胚珠培养或子房培养可以获得完全成熟的种子。

在以往的杂交工作中，柱头、花柱与花粉的萌发，花粉管伸长之间的不亲和性是很大障碍。Kanta（1963）用花菱草等植物直接将花粉散布在置于培养基上的未受精胚珠上受精成功。随后，我国西北生物研究所在小麦和烟草等作物上进行的试管受精试验均获成功。这一技术的成功运用使远缘杂交在作物改良中的利用前景更广阔。

2. 花药、花粉培养育成单倍体植株，培育成功的植物很多，如小麦、大麦、水稻、橡胶等

利用花药、花粉培养（简称花培）育成的单倍体植株，经过染色体加倍，可在短期内育成遗传变异稳定的株系，有利于缩短育种年限。我国花培在 20 世纪 70 年代后发展迅速，处于世界领先地位并首次成功获得小麦花培单倍体植株，培育出许多有实用价值的品种，如冬小麦京花一号，水稻和烟草等也有育成品种应用于生产。我国的花培技术日趋完善，研究单位虽然减少，但工作逐渐深入，如利用花培中产生的异源代换系和附加系等材料进行遗传学和细胞学方面的研究，并在实际应用中将花培与常规育种技术密切结合。

3. 原生质体融合产生体细胞杂种，在烟草属植株物种间细胞融合获得成功

通常在受精时可以看到细胞融合，雌雄配子体融合而形成合子，但在远缘植物及无亲缘关系的植物间，甚至动植物间，这种生殖细胞的融合困难很大，甚至完全不可能，然而通过体细胞进行融合就可能实现。烟草属植物间细胞融合已获成功。在大麦与小豆、胡萝卜与烟草等一些植物中，这种融合细胞也进行分裂并形成细胞群。更突出的例子是1978年 Melchers 将番茄的叶肉细胞与马铃薯块茎组织细胞融合获得新的体细胞融合杂种。这种植物虽然不结果，但可形成薯块，说明通过细胞融合可以创造出新的体细胞杂种。但目前成功的实例不多，有实际应用价值的实例尚未出现，体细胞融合过程的细胞学方面研究资料尚嫌不足，远缘不亲合性以及属科间杂种细胞分化等问题仍未克服。此外，融合产物中存在两个亲本的两套遗传物质，比有性杂交远为复杂，细胞器和基因组间的相互关系以及它们之间发生重组或排斥的机理尚不清楚，这些问题有待于进一步研究。体细胞杂交技术是否能获得有用的杂种并应用于生产尚待深入研究。

4. 组织培养用于无病毒植物体的培育——脱毒

植物脱毒和离体快速繁殖是目前植物组织培养应用最多、最有效的一个领域。农业生产中，许多农作物都带有病毒，无性繁殖方式植物如马铃薯、甘薯、大蒜等尤为严重，但感病植株并非每个部位都带有病毒。White 早在1943年就发现植物生长点附近的病毒浓度很低甚至无病毒。利用组织培养方法进行茎尖培养，再生的植株就有可能不带病毒，从而获得脱毒苗，再用脱毒苗进行繁殖，则不会或极少发生病毒。目前，组织培养在甘蔗、菠萝、香蕉、草莓等作物上已成功应用。外植体已不仅限于茎尖，侧芽、鳞片、叶片、球茎、根等都可以应用组织培养技术。

5. 植物次生代谢产物生产

利用组织或细胞大规模培养生产人类所需要的有机化合物，如蛋白质、脂肪、糖类、药物、香料、生物碱及其他活性化合物已成为可能。目前，已有 20 多种植物组织培养物，其中的有效物质高于原植物。利用单细胞培养技术生产蛋白质，将给饲料和食品工业提供广阔的原料生产前景；对用组织培养方法生产人工不能合成的药物或其有效成分的研究正在不断深入，人参、毛地黄、毒芹、蛇根碱、紫草素、黄连素等已在日本实现工业生产，直接生产蛋白质等也正在试验研究，并正向调味品和色素等代谢产品的生产发展。

6. 应用基因工程技术获得转基因植株，进行作物品种改良

基因工程技术是一种按照人们的构思和设计在体外操作遗传物质，把有利用价值的目的基因克隆下来，通过载体使其整合进植物基因组并加以表达的技术，它可以提高作物育种的目的性和可操作性，真正实现有针对性改良作物品种的目的。利用基因工程的手段实现作物改良、增加作物产量、改善作物品质、改良食品特性以及减少农药使用等是 21 世纪需要解决的问题，但对转基因植物的安全性，仍有不同的认识。

7. 高倍繁殖园艺作物

无性系的快速繁殖在 20 世纪 70 年代未受到应有的重视，80 年代后才逐渐成为热门，原因在于它可以直接产生经济效益，且操作比较容易。由于组织培养繁殖作物的突出特点是快速，因此，对一些繁殖系数低、不能用种子繁殖的“名、优、特、新、奇”作物品种的繁殖，意义更大。对于脱毒苗、新育成或新引进的优良单株和濒危植物以及基因工程植株都可通过离体快速繁殖，不受地区和气候影响，比用常规方法繁殖的速度快数万倍到数百万倍。如马铃薯脱毒、无毒种苗和微型脱毒种薯已在生产上广泛应

用，解决了马铃薯退化问题。目前，观赏植物、园艺作物、经济林木等部分或大部分都通过离体快速繁殖技术大量提供苗木，试管苗已出现在国际市场上并实现产业化。

我国已经推广应用这一技术的植物有马铃薯、甘蔗、水稻、菠萝、桉树、苧麻、菊花、罗汉果、月季和香石竹等。有的研究提出对细胞培养快速繁殖产生的胚状体加以包装，然后采用机械播种，并开设生产“超级种子”的工厂。这一设想如能实现，将会导致整个农业的技术革命。

8. 体细胞无性系变异在作物品种改良中的应用

无论是植物愈伤组织培养还是细胞培养，培养细胞内的遗传物质均处在不稳定状态，容易受培养条件的影响而产生体细胞无性系变异，从中可以筛选出有利用价值的突变体，进一步选择育成新品系或品种，达到作物品种遗传改良的目的。

第二节 植物生物技术研究内容与任务

一、研究内容

植物细胞工程研究内容主要包括以下四个方面（见图 1.1）。

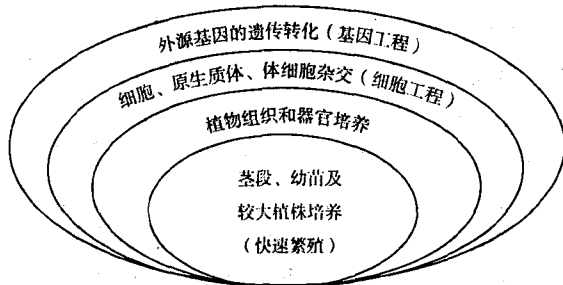


图 1.1 植物生物技术研究的主要内容

1. 茎段、幼苗及较大植株的培养

茎段、幼苗及较大植株的培养很少产生变异，可用于快速繁殖等。

2. 植物组织和器官的培养

植物组织和器官的培养包括成熟胚及未成熟胚的离体培养、离体器官的培养（包括根尖、茎尖、叶原基、花器官各部分原基或未成熟的花器官各部分以及未成熟的果实的培养）。在培养器官范围内，应用茎尖培养技术加速植物无性繁殖已取得了一定的成功，但存在不恰当地应用“分生组织培养”或“生长锥培养”两个词的现象，造成概念上的混淆。真正的分生组织，如茎尖分生组织仅限于顶端圆锥区，长度不超过 0.1 mm。这样一种外植体实际上不易取得，而且培养存活率很低，生长也缓慢。所以在用组织培养技术加速植物繁殖时往往并不是用这么小的外植体，而是较大的茎尖组织。但是，用较大的外植体时，再生植株不一定能去除可能已感染母体植株的病原体。为了重新获得无病原体植物，则需培养分生组织或尽可能小的茎尖。

3. 植物细胞和原生质体的培养及体细胞杂交

植物组织、器官、细胞、原生质体的培养以及体细胞杂交培养所获得的变异是随机不可预测的，但只要注意用于培养的起始材料的筛选（起始材料遗传背景的复杂性），获得有利变异的几率以及供筛选的可遗传变异的范围就很宽。

4. 基因工程

利用基因工程进行作物品种改良比上述技术更具明显的目的性，拟进行改良的性状具有明显的目的性和可操作性，被改良的性状可以很快稳定，所需时间也比上述技术短。应用这一方法进行品种改良的前提是，必须明确作物的生理生化特性和每一个性状的遗传基础和位点，才有可能将基因工程更好地应用于作物品种改良。

二、研究任务

植物生物技术的研究任务是，通过植物生物技术这一手段在离体培养条件下研究植物组织、器官、细胞、原生质体经离体诱导形成的愈伤组织形态发生规律、外界环境条件和培养基对它的作用以及由其诱导而形成的再生植株群体的遗传稳定性和变异性。

第三节 植物生物技术的基本理论依据 及其发展过程

要了解和掌握植物生物技术，首先必须理解细胞学的两个基本原理：细胞是构成植物有机体和生命活动的基本结构单位；植物细胞的全能性，即植物细胞是在生理上和发育上具有潜在全能性（Totipotent）的功能单位。

① 自 1665 年英国 Robert Hooke 第一个发现细胞以来，不少学者陆续对细胞的显微结构进行观察。直至 19 世纪上半叶，德国动物学家 Schwann（1838）提出了有关细胞理论。20 世纪上半叶的植物学家 Schleiden（1839）对此作出了最后的结论，提出细胞学说（Cell Theory），即细胞是有机体，整个动物和植物是细胞的集合体。细胞的发现给生物学的发展以极大的推动。

② 20 世纪初（1902），德国著名植物学家 Haberlandt 根据细胞理论，大胆提出高等植物器官和组织可以不断分割，直至单个细胞的观点。为证明这一观点，他用离体叶肉细胞进行细胞培养，但未能成功。以后多人的试验都由于技术上的原因，进展甚微。虽然有时细胞可以在培养条件下存活很长时间，甚至体积还会增大，但仍不能分裂而形成细胞团。

③ 1904 年，Hanning 成功地培养了萝卜和辣根菜的幼胚，

发现离体胚可充分发育，并有提早萌发形成小苗的现象。1925年，Laibach 通过培养亚麻种间杂交形成的幼胚而成功地获得了杂种。20 世纪 30 年代（1933），我国李继侗等离体培养苦杏仁幼胚，并发现植物胚乳汁液对培养组织生长有促进作用。

④ 1922 年，Kottet 和 Robbins 分别报道离体根尖培养获得一定的成功。但直到 1934 年，当 White 用番茄根建立了第一个活跃生长的无性繁殖系时，有关离体根的培养试验才获得真正成功，并发现离体培养感染烟草花叶病植株的根和根尖病毒浓度很低。1952 年，Morel 等用茎尖培养法获得无病毒植株。

⑤ 自 20 世纪 30 年代开始，很多学者如 Gautheret（1934、1937、1938）和 White（1937）等，在培养基中加入了维生素和生长素等，使植物离体培养技术取得一定进展。

⑥ 不久，White（1939）报道在烟草种间杂种幼茎切段的原形成层组织建立了类似的组织培养，并成功进行了继代培养。Gautheret 和 White 在工作中建立起来的植物组织培养的基本方法成为以后各种植物进行组织培养技术的基础。这一时期是组织培养技术创建的阶段。

⑦ 自 20 世纪 30 年代末之后的近 10 年内，很多植物组织培养的研究与探讨培养器官和组织的营养需要有关。Overbeek 等（1941）用椰乳作培养基添加物，以后在培养基中得到广泛应用。

⑧ 20 世纪 40 年代末及 50 年代初，由于在植物生理及实验形态研究方面提出许多问题，使植物组织培养的研究又进入了一个新的活跃时期。以后，各国的学者开展了多项研究，使培养组织能够增殖，而且逐渐明确从增殖组织能形成不定芽或不定根，并可能再生形成新个体，也就是说，构成组织的已分化的细胞可以返回到未分化的状态（脱分化），使未分化细胞的集团形成愈伤组织且增殖，由此形成一定的组织结构，进而分化（再分化）芽和根等器官，最后再生植株。这段时间的研究中，Skoog 等在