



面向 21 世纪 课 程 教 材

Textbook Series for 21st Century

植物细胞工程原理与技术

周维燕 主编

中国农业大学出版社

面向 21 世纪课程教材
Textbook Series for 21st Century

植物细胞工程原理与技术

周维燕 主编

中国农业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

植物细胞工程原理与技术/周维燕主编. —北京: 中国农业大学出版社,
2001.8

面向 21 世纪课程教材

ISBN 7-81066-358-5/S·277

I. 植… II. 周… III. 植物-细胞工程-高等学校-教材 IV. Q943

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2001) 第 032158 号

出版	中国农业大学出版社
发行	
经销	新华书店
印刷	涿州市星河印刷厂
版次	2001 年 8 月第 1 版
印次	2001 年 8 月第 1 次印刷
开本	16 印张 17.75 千字 313
规格	787×980
印数	1~3050
定价	24.00 元

图书如有质量问题本社负责调换

社址 北京市海淀区圆明园西路 2 号 邮政编码 100094

电话 010-62892633 网址 www.cau.edu.cn

《植物细胞工程原理与技术》编委会

- | | | |
|-----|-----|---------------------|
| 主 编 | 周维燕 | 中国农业大学园艺学院教授 |
| 副主编 | 刘青林 | 中国农业大学园艺学院副教授、博士 |
| 编 委 | 曹家树 | 浙江大学农学院教授、博士生导师、博士 |
| | 陈龙清 | 华中农业大学林学系教授、博士 |
| | 张成合 | 河北农业大学园艺系教授 |
| | 陈发棣 | 南京农业大学园艺学院副教授、博士 |
| | 李 云 | 北京林业大学生物学院副教授、博士 |
| | 徐 虹 | 西北农林科技大学生命科学院副教授、博士 |
| | 陈丽静 | 沈阳农业大学生物科学与技术学院讲师 |
| 主 审 | 李合生 | 华中农业大学教授 |
| | 程金水 | 北京林业大学教授 |

内 容 提 要

本书以与植物细胞工程有关的概念、基本原理、操作程序和关键技术为主线，系统地介绍了该领域的研究历史和最新发展动态、植物细胞的全能性、植物细胞脱分化和再分化、细胞脱分化和再分化的条件、植物快速微繁殖、无病毒植物的培养和鉴定、人工诱发单倍体及其应用、植物胚胎培养、植物单细胞培养和突变体筛选、植物原生质体培养和细胞融合、人工种子技术、超低温冷冻贮藏种质技术和植物细胞遗传转化体系的建立等。本书共分 11 章，并附相应的无菌操作实验技术 10 个以及常用培养基配方、药品浓度换算表和温湿度换算表等。该书系统性强、图文并茂、涉及植物广泛，适合作为园艺、农学、医药学、草地科学、植保、生物物理、生物工程、生物技术、生物科学等专业的研究生和本科生的教材。同时，也可作为从事植物细胞工程和基因工程研究和应用的科技工作者的参考书。

前 言

自 20 世纪初 Haberlandt 根据细胞理论,大胆提出:“高等植物的器官和组织,可以不断地分割直至单个细胞”的预言以来,植物细胞工程的研究和应用经历了 90 多年的历史。这期间国内、国外许多学者付出了艰辛的劳动并取得了卓越的成就。时至今日,植物细胞工程在理论上已有力地推动了生物科学各领域的发展,在实践中不仅成为生物学的重要研究手段,而且也是生物工程领域中,率先应用于生产实践并取得社会效益和经济效益的典范。

有关植物细胞工程研究和应用的专著和译著很多,如:《植物细胞培养手册》(White, 1943; Evans, 1983; 颜敬昌, 1990)、《植物の器官と组织の培养》(加古舜治, 1978)、《植物细胞组织培养》(原田 宏、驹岭 穆, 1979)、《植物组织和细胞培养》(中国科学院上海植物生理所细胞室, 1978)、《园艺植物组织培养》(裘文达, 1986)、《木本植物组织培养及其应用》(陈正华等, 1986)、《植物组织培养教程》(李浚明, 1992)等。这些著作对推动植物细胞工程的研究和应用起着或正在起着积极的作用。近年来,根据社会各方读者的需求,希望能有一本系统性强,既有具体技术而又紧密联系基础理论,适合作为高等学校教材的书籍。著者在多年教学、科研实践的基础上并参阅了不少同行的专著和论文,著了《植物细胞工程原理与技术》一书作为教材。该教材的特点:以与植物细胞工程有关的概念、基本原理、操作程序和关键技术为主线,分章、节全面地概述了植物细胞工程方面的知识。该教材概念明确、系统性强、图文并茂、涉及植物广泛,读后可以收到“学以致用,举一反三”的效果。同时,该教材也是国家教育部面向 21 世纪教学内容和课程体系改革 04-10 项目研究的成果。

由于所引用的资料来源较多,不可能全部引入文献目录,故仅在引述处注明著者和年份以便查阅。本书涉及的学科面较广,限于本人水平,书中不妥之处,望读者批评指正。

周维燕 刘青林

2001 年 6 月

目 录

0 绪论	(1)
0.1 植物细胞工程的概念和任务	(1)
0.2 植物细胞工程的发展历史	(2)
0.3 植物细胞工程的展望	(4)
1 细胞工程研究的基本设备和无菌操作	(6)
1.1 基本设备	(6)
1.2 无菌操作	(14)
1.3 培养基组成及母液配制	(18)
2 植物细胞工程的应用	(23)
2.1 植物细胞工程与植物育种	(23)
2.1.1 花粉单倍体及其育种中的应用	(23)
2.1.2 胚胎培养与育种	(27)
2.1.3 细胞融合与育种	(34)
2.1.4 突变体筛选与育种	(34)
2.2 细胞工程与植物快速无性繁殖和脱毒	(34)
2.2.1 植物离体培养与育苗工厂化	(34)
2.2.2 植物离体培养与脱除植物病毒	(36)
2.3 植物细胞工程与种质保存	(36)
2.3.1 种质保存的研究概况	(36)
2.3.2 超低温保存种质基因库的研究进展	(36)
2.4 植物细胞工程与医药和食品工业化生产	(37)
2.4.1 酶制品	(37)
2.4.2 生物碱类	(37)
2.4.3 甾体类	(37)
2.4.4 萜类	(37)
2.4.5 天然色素类	(37)
3 植物细胞全能性和细胞脱分化、再分化	(39)

3.1 植物细胞全能性	(39)
3.1.1 植物的再生现象	(39)
3.1.2 植物细胞全能性概念	(39)
3.1.3 植物细胞全能性的实现途径	(40)
3.2 植物细胞的分化	(43)
3.2.1 植物细胞的分化现象	(43)
3.2.2 植物细胞分化的概念	(46)
3.2.3 分子遗传学观点如何解释细胞分化	(46)
3.3 离体培养条件下植物细胞的脱分化和再分化	(47)
3.3.1 细胞脱分化和再分化的概念	(47)
3.3.2 离体培养条件下细胞的脱分化和再分化的时期	(48)
3.3.3 植物细胞脱分化和再分化的条件	(50)
3.4 植物胚状体	(53)
3.4.1 植物胚状体发生的普遍性	(53)
3.4.2 植物胚状体的概念	(56)
3.4.3 胚状体的类别和特点	(57)
4 影响植物细胞脱分化和再分化的因子	(59)
4.1 培养基组成对植物细胞脱分化和再分化的影响	(59)
4.1.1 培养基的营养组成	(59)
4.1.2 培养基的渗透压	(66)
4.1.3 培养基的酸碱度	(67)
4.2 环境条件与植物细胞的脱分化和再分化	(69)
4.2.1 湿度条件	(69)
4.2.2 温度条件	(69)
4.2.3 光照条件	(72)
4.3 供体遗传性和生理状态与植物细胞脱分化和再分化	(76)
4.3.1 供体植物的遗传性与器官发生	(76)
4.3.2 供体植物的生理状态与器官发生	(77)
5 植物离体快速无性繁殖和无病毒植物的培养	(79)
5.1 植物的离体快速无性繁殖	(79)
5.1.1 离体无性繁殖的概念和优越性	(79)
5.1.2 离体无性繁殖中的器官发生方式	(80)

5.1.3	离体无性繁殖的程序和技术关键	(81)
5.2	无病毒植物的培养	(89)
5.2.1	植物病毒的危害和培养无病毒植物的意义	(89)
5.2.2	脱除植物病毒的原理及方法	(90)
5.2.3	无病毒植株脱毒程序	(98)
5.2.4	无毒原种苗的繁殖	(102)
6	人工诱发单倍体及其应用	(104)
6.1	植物单倍体的概念和单倍体的发生方式	(104)
6.1.1	植物单倍体的概念和来源	(104)
6.1.2	单倍体在植物育种中的应用	(105)
6.2	离体培养条件下小孢子发育成植物体的途径	(110)
6.2.1	花粉孢子体概念的建立	(110)
6.2.2	花粉孢子体的发育途径	(111)
6.2.3	花粉植株的形态发生方式	(115)
6.3	花粉单倍体植物的培养程序	(115)
6.3.1	材料准备	(116)
6.3.2	诱导小孢子脱分化和再分化	(120)
6.3.3	分化培养和壮苗培养	(122)
6.3.4	完整植物体的形成	(123)
6.3.5	再生小植株的驯化和移植	(124)
6.4	单倍体植株的鉴定和二倍化的方法	(124)
6.4.1	花粉单倍体植株的鉴定	(124)
6.4.2	单倍体植物的染色体加倍	(127)
7	植物胚胎培养	(129)
7.1	胚胎培养的内容及意义	(129)
7.1.1	胚胎培养的意义	(129)
7.1.2	胚胎培养的内容和概念	(132)
7.2	胚培养	(133)
7.2.1	离体胚培养的方法	(133)
7.2.2	胚龄与胚性发育的关系	(133)
7.2.3	离体胚培养的技术关键	(135)
7.3	胚乳培养	(136)

7.3.1	胚乳离体培养的意义	(136)
7.3.2	胚乳培养的方法	(139)
7.3.3	胚乳培养的技术关键	(139)
7.4	植物的离体受精	(142)
7.4.1	离体受精的概念和意义	(142)
7.4.2	离体受精的方法	(142)
7.4.3	离体受精成功的技术关键	(143)
8	植物单细胞培养和突变体筛选	(145)
8.1	单细胞培养	(145)
8.1.1	植物单细胞培养的意义	(145)
8.1.2	植物单细胞培养的方法	(145)
8.1.3	单细胞培养的程序	(147)
8.1.4	单细胞培养的技术关键	(149)
8.1.5	单细胞培养成功的范例	(152)
8.2	突变体筛选	(154)
8.2.1	突变体筛选及其应用	(154)
8.2.2	突变体筛选的原理及诱变剂	(156)
8.2.3	植物细胞突变体的选择方法	(158)
8.2.4	突变体筛选程序	(158)
8.2.5	突变体筛选的成功范例	(161)
9	植物原生质体培养和细胞融合	(163)
9.1	植物原生质体培养	(163)
9.1.1	原生质体的概念及培养的意义	(163)
9.1.2	原生质体的分离	(164)
9.1.3	原生质体的纯化	(167)
9.1.4	原生质体培养及其技术关键	(168)
9.2	植物细胞融合	(171)
9.2.1	植物细胞融合的概念和意义	(171)
9.2.2	诱导细胞融合的方法及融合剂	(172)
9.2.3	植物细胞融合的程序	(174)
9.2.4	融合体的类型	(175)
9.2.5	细胞杂种的选择和鉴定	(177)

10 超低温冷冻保存种质和人工种子	(181)
10.1 超低温冷冻保存种质	(181)
10.1.1 种质保存的发展概况	(181)
10.1.2 超低温冷冻保存种质的方法及原理	(182)
10.1.3 超低温冷冻保存种质的程序	(182)
10.1.4 超低温冷冻保存种质技术的应用前景	(184)
10.2 人工种子	(186)
10.2.1 人工种子的概念及其研制的意义	(186)
10.2.2 植物体细胞胚胎发生及其同步性技术的研究	(187)
10.2.3 人工种皮的研制	(188)
10.2.4 人工种子包埋方法的研究	(189)
10.2.5 人工胚乳的研制	(191)
10.2.6 人工种子的应用前景	(192)
11 植物细胞遗传转化体系的建立	(194)
11.1 植物基因转化的受体	(194)
11.1.1 原生质体	(194)
11.1.2 悬浮细胞	(194)
11.1.3 胚性愈伤组织	(195)
11.1.4 胚状体	(196)
11.1.5 叶圆片	(196)
11.1.6 其他受体	(197)
11.2 植物基因转化的方法	(197)
11.2.1 农杆菌介导法	(197)
11.2.2 基因枪转化法	(199)
11.2.3 聚乙二醇-介导法	(200)
11.2.4 其他转化方法	(202)
11.3 转基因植株再生及其检测	(204)
11.3.1 转基因植株再生	(204)
11.3.2 转基因植株的检测	(207)
附录一 实验技术	(211)
实验1 培养基母液的配制	(211)
实验2 培养基配制与灭菌	(214)

实验 3	培养材料的灭菌与接种	(216)
实验 4	花粉发育时期的鉴定	(219)
实验 5	种胚的离体培养	(221)
实验 6	植物原生质体的游离和融合	(223)
实验 7	植物离体培养中的形态观察	(227)
实验 8	根尖染色体数目鉴定	(229)
实验 9	植物细胞的生长计量技术	(232)
实验 10	烟草遗传转化实验	(239)
附录二	常用的培养基配方 (单位 mg /L)	(241)
附录三	药品浓度换算表 [mol 和 ppm (mg /L) 的换算表]	(252)
附录四	温湿度换算表	(260)
附录五	常用英文缩写词	(262)
参考文献		(265)

0 绪 论

0.1 植物细胞工程的概念和任务

0.1.1 植物细胞工程的概念

植物细胞工程系指在细胞水平上，对植物进行遗传操作的新兴技术。它是一项无菌操作技术（方法或手段）。用该项技术研究在人工控制的条件下，将植物体的任何一部分，或器官、或组织、或细胞进行离体培养，使之成为完整的植物体。所谓人工控制的条件：即营养条件和环境条件；植物体的任何一部分系指根、茎、叶、花、果以及它们的组织切片和细胞。

0.1.2 植物细胞工程的任务

(1) 研究植物器官、组织和细胞在离体培养条件下，所需要的有机营养、无机营养、植物激素等营养条件和刺激因素。

(2) 研究植物器官、组织和细胞，在离体培养条件下，所需的温度、湿度和光照等环境条件。

(3) 研究植物的不同生理年龄、遗传组成（基因型）在离体培养条件下，形态发生的规律。

(4) 研究离体培养条件下再生植株群体的遗传稳定性和变异性。

0.1.3 植物细胞工程的内容

(1) 器官培养(Organ culture)。器官培养系指对植物根(Root)、茎(Shoot)、叶(Leaf)、花(Flower)、果实(Fruit)以及各部原基(芽原基、根原基)的培养。

(2) 胚胎培养(Embryo culture)。胚胎培养系指以胚珠(Ovule)、幼胚、成熟胚为材料的离体培养。也包括胚乳(Endosperm)的离体培养。

(3) 组织培养(Tissue culture)。组织培养系指植物各部分组织的离体培养，使之形成愈伤组织称之为组织培养。如：茎组织、叶肉组织、根组织、中

柱鞘、形成层、髓组织、贮藏薄壁组织（大蒜瓣、洋葱、百合鳞片）、珠心组织等。以它们为培养材料进行离体培养。

(4) 细胞培养 (Cell culture)。细胞培养系指用能保持较好分散性的植物细胞或很小的细胞团（6~7 个细胞）为材料进行离体培养。如：生殖细胞（小孢子）、叶肉细胞、根尖细胞、髓组织细胞等。

(5) 原生质体培养 (Protoplast culture)。原生质体培养系指借助某些方法，除去植物细胞的胞壁，培养裸露的原生质体，使其在特定的培养基上，重新形成细胞壁并继续分裂、分化形成植株的方法。

从上面 5 个方面延伸的内容有：植物脱毒培养；突变体筛选；细胞杂交；超低温冷冻贮藏；人工种子等。可见植物细胞工程的内容是非常丰富的，从大到器官小到细胞，乃至脱除细胞壁的原生质体。给这一领域命以一个恰如其分的名称，还是非常必要的。目前出现如下诸多称谓：植物器官、组织和细胞培养 (Organ, Tissue and cell culture of plants)，植物离体培养 (*In Vitro* Culture of plants)。这两种称谓均不如植物细胞工程 (Plant cell engineering) 来得更确切。同时，《学科分类与代码》国家标准采用“细胞工程” (18.7120)，国家自然科学基金委也用“细胞工程” (C010904) 作为学科代码。

0.2 植物细胞工程的发展历史

植物细胞工程技术的研究始于 1902 年德国植物学家 Haberlandt，至今已有近百年历史。它的发展分为如下几个阶段：

0.2.1 探索阶段 (1902—1929 年)

1902 年，Haberlandt 根据细胞理论 (Schwann, 1939) 大胆地提出：高等植物的体细胞，可以不断分割，直至单个细胞的理论。预言体细胞在适宜条件下，具有发育成完整植株的潜在能力。为了证实这一观点，他用野芝麻、紫鸭跖草等植物的叶栅栏组织、表皮细胞、毛、刺细胞进行离体培养。由于受当时技术和设备的限制，结果仅观察到组织和细胞体积的膨大，而未见到细胞分裂。1904 年，Hannig 在加有无机盐和有机成分的培养基中，培养萝卜和辣根的幼胚，得到了充分发育的胚并提前萌发成小苗。这是离体培养的第一个成功例子。1922 年，Kotte 和 Robbins 离体培养根尖获得成功并在含无机盐，葡萄糖或果糖、琼脂的培养基上使 1.45 ~ 3.75 cm 的豌豆、玉米、棉花茎尖、根尖

培养成苗。1925 年, Laibach 培养亚麻种间杂交幼胚获得成功并得到杂种。

0.2.2 技术建立阶段 (1930—1940 年)

1933 年, 李继侗将 3 mm 以上的银杏胚培养成功。同时发现加入胚乳汁可以促进离体胚的生长。1934 年, Gautberet 培养三毛柳、黑杨的形成层, 成功地得到愈伤组织。培养基是 Knop 液加葡萄糖、酵母提取物、水解酪蛋白的固体培养基。同年, White 将番茄根尖细胞离体培养, 得到一个活跃分裂的单细胞无性系。这个无性系一直培养到 20 世纪 60 年代。1937 年, White 发现 B 族维生素、吲哚乙酸对植物生长的促进作用。发明了第一个人工合成培养基。1937—1938 年, Nabecourt 使胡萝卜根组织经培养而获得愈伤组织并继代培养了几十年。1939 年, White 培养烟草的形成层获得愈伤组织。同时使愈伤组织继代培养获得成功。这一阶段, 人们对培养细胞的分裂和不分裂的原因尚不能解释, 但在李继侗银杏幼胚培养中, 由于加入胚乳汁而促进了幼胚发育的启迪下, 人们开始注意到离体培养条件下的营养需要。

0.2.3 器官形成和个体发生阶段 (1941—1959 年)

1941 年, Overbeek 等以椰子乳汁作为培养基补加物, 使曼陀罗心形期幼胚培养成功。1946 年, 罗士韦将菟丝子茎尖培养成功并在试管内开花。这给人们以启迪, 离体培养技术可以控制花芽的形成。1948 年, Skoog 和崔激在烟草茎切段和髓培养以及器官发生的研究中, 发现腺嘌呤和腺苷可以解除培养基中生长素 (IAA) 对芽形成的抑制作用而诱导芽形成。生长素和腺嘌呤的比例是控制芽或根形成的重要条件。1951 年, Nitsch 将果实、子房、未受精的胚珠、以及花器官的各个部分培养成功。1953 年, Muir 将万寿菊和烟草的愈伤组织, 转移到液体培养基中, 放在往复式摇床上振荡, 获得由单细胞或细胞聚集体组成的细胞悬浮液, 而且可以继代繁殖。这是培养方式的突破。1956 年, Miller 为了寻找细胞分裂物质, 发现了激动素 (6-糠基氨基嘌呤)。同时发现激动素代替腺嘌呤促进生芽, 其效果增加 3 万倍。1958 年, Steward 和 Shantz 用胡萝卜根韧皮部细胞悬浮培养, 从中诱导出胚状体并使其发育成完整小植株。第一次证实 Haberlandt 提出的细胞全能性学说。

0.2.4 技术迅速发展阶段 (1960—2000 年)

1960 年, Cocking 用纤维素酶和果胶酶溶解了番茄根尖的细胞壁, 得到了

原生质体。继续培养原生质体,可重新长壁、分裂、分化形成根和芽,最终形成植物体。1960年,Kanata、Rangas Wamy 和 Mahshwari 培养罂粟未受精的胚珠并在试管内撒播花粉,成功地获得能正常发芽的种子。1964—1966年,Guha 和 Maheshwari 培养毛叶曼陀罗的花药,得到由花粉发育来的单倍体植物。1972年,Carlson 在培养两个不同种的粉蓝烟草 (*Nicotiana glauca*) 和郎氏烟草 (*N. langsdorffii*) 原生质体时,加入诱导剂(甘露醇、盐类),使两种原生质体发生融合,得到了细胞杂种,而且该细胞杂种经细胞分裂、分化形成完整的杂种植物。随后由加籍华人高国楠在聚乙二醇(PEG)的诱导下,使大豆和粉蓝烟草(科间)融合成功,而且得到3%的异核体。单离培养异核体2~3个月,可分裂出几百万个细胞。1974年,Bonne 和 Eriksson 成功地完成了细胞器(叶绿体)的摄入。将具有叶绿体的海藻和不具有叶绿体的胡萝卜根原生质体,在聚乙二醇诱导下融合成功。观察到16%的活胡萝卜原生质体中,含1至多个叶绿体。试验证明原生质体是引入外源遗传物质的极好材料,为基因工程奠定良好基础。

0.3 植物细胞工程的展望

通过长期反复研究和实践,细胞工程技术逐步发展和完善起来。特别是近20年来,从理论和实践两个方面,有力地推动了生物科学各领域的发展。

0.3.1 植物生理学方面

用该项技术研究植物生长的外界条件,如光、温度、湿度和气体成分;营养条件;植物激素条件等。

0.3.2 植物胚胎学和细胞学

探明胚胎发生条件,胚乳作用,助细胞、反足细胞的作用;乃至从形态发生规律中,探明物种起源;细胞分化和脱分化的条件。

0.3.3 遗传学和育种学方面

遗传学方面应用此项技术研究染色体数量变异和结构变异,染色体工程(基因定位,基因图谱)。育种学方面开辟了新途径,大小孢子培养,试管受精和原生质体融合来克服受精障碍,创造自然界新物种。

0.3.4 病理学方面

研究冠瘿肿瘤的形成；病毒分类及在植物体内的分布；脱除病毒的方法以及病毒快速检测的方法。

0.3.5 基因转化受体的建立

近年来，生物工程技术作为一种高新技术，在生物科学领域中愈来愈显得重要。植物基因工程在以农业生产为广泛应用前景和巨大的经济价值，在众多新兴学科中格外引人注目。离体培养条件下的茎尖分生组织、愈伤组织、单细胞以及脱除细胞壁的原生质体等都是基因工程中，遗传转化的良好受体。外来的遗传信息（基因），通过一定的基因载体（Ti 或 Ri）可以引入上述各种类型的细胞。然后通过细胞工程技术，使转基因细胞再生成完整的植物体。由此可见，只有在细胞工程与基因工程紧密结合下，才能使生物工程技术取得突破性进展。

细胞工程技术作为优良的研究手段，从理论和实践两个方面，有力地推动了生物科学各个领域的发展。