



植物组织培养与生物技术

陈劲枫 主 编

娄群峰 蔡 润 张万萍 副主编



张外借



科学出版社

植物组织培养与生物技术

陈劲枫 主 编

娄群峰

蔡 润 副主编

张万萍

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书系统地介绍了植物组织培养与生物技术的基本概念、基本原理、操作技术与研究方法。全书分为绪论、理论方法、技术应用、组培实践和附录 5 个部分,共 22 章。绪论部分阐述了基本概念、发展历史及应用;理论方法部分详细阐述了基本原理、相关技术操作、研究方法等内容;技术应用部分介绍了植物不同组织和器官的培养、脱毒苗技术、体细胞无性系变异、人工种子、遗传转化与品种改良等内容;组培实践部分选取了长江流域 30 余种重要的蔬菜、观赏植物、果树、药用植物、茶树和大田作物等,介绍了组织培养和现代生物技术应用研究的新成果、新动态及产业化进展;附录为植物组织培养中常用培养基配方。

本书可作为普通高等农林院校种植业类本科生及研究生的教材使用,也可作为相关行业从业者、科研工作者及推广人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

植物组织培养与生物技术 / 陈劲枫主编. —北京: 科学出版社, 2018.8
ISBN 978-7-03-057325-4

I. ①植… II. ①陈… III. ①植物组织-组织培养-生物工程
IV. ① Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 092030 号

责任编辑: 王玉时 马程迪 / 责任校对: 王晓茜

责任印制: 吴兆东 / 封面设计: 迷底书装

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京中石油彩色印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018 年 8 月第 一 版 开本: 889×1194 1/16

2018 年 8 月第一次印刷 印张: 24

字数: 777 000

定价: 88.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《植物组织培养与生物技术》编写委员会

主 编 陈劲枫 (南京农业大学)

副主编 娄群峰 (南京农业大学)

蔡 润 (上海交通大学)

张万萍 (贵州大学)

编 者 (以姓氏笔画为序)

王三红 (南京农业大学)

王冬良 (安徽农业大学)

王志敏 (西南大学)

王康才 (南京农业大学)

邓 英 (贵州省农业科学院)

李良俊 (扬州大学)

李 季 (南京农业大学)

杨有新 (江西农业大学)

杨寅桂 (江西农业大学)

宋 明 (西南大学)

张万萍 (贵州大学)

陈友根 (安徽农业大学)

陈劲枫 (南京农业大学)

武 喆 (山西农业大学)

周庆红 (江西农业大学)

周晓慧 (江苏省农业科学院)

房婉萍 (南京农业大学)

娄群峰 (南京农业大学)

徐迎春 (南京农业大学)

解 敏 (安徽农业大学)

蔡 润 (上海交通大学)

臧运祥 (浙江农林大学)

潘俊松 (上海交通大学)

审 稿 李式军 (南京农业大学)

前言

自 1902 年德国植物学家哈伯兰特 (Gottlieb Haberlandt) 第一次采用人工培养基培养植物叶肉细胞以来, 经过 100 多年各国学者的不懈努力, 植物组织培养及以植物组织培养技术为基础的生物技术得到了蓬勃发展, 并广泛应用于作物优良种质的快速繁殖、脱毒苗木生产、种质离体保存、单倍体培养等生产实践中, 取得了巨大的效益。随着现代分子生物学理论与技术的不断进步, 植物组织培养与生物技术研究 and 应用得到了进一步的拓展, 被认为是 21 世纪生命科学中最具活力的前沿领域和高科技支柱产业之一。我国和世界其他国家都非常重视植物组织培养与生物技术的相关研究, 并在高等教育中开设相关专业课程, 加强相关人才的培养。

2015 年 7 月 10 日, 由科学出版社组织的《植物组织培养与生物技术》编写会在南京农业大学召开, 来自南京农业大学、上海交通大学、贵州大学、西南大学、江西农业大学、浙江农林大学、安徽农业大学、山西农业大学、江苏省农业科学院、贵州省农业科学院等单位的编委和科学出版社的责任编辑参加了会议, 确定了本书的结构体系和章节内容, 明确了编写分工。2015 年 10 月 30 日在南京召开了第一次统稿会, 编委会成员对每一章节的内容进行了讨论, 提出了修改意见和建议。2016 年 1 月 15 日在贵阳召开了第二次统稿会, 编委会成员讨论了各章节修改后的内容, 提出了进一步的修改意见。2017 年 5 月 8 日在南京召开了定稿会, 编委会成员针对前期各编委相互审稿提出的修改意见进行逐章说明、讨论, 并提出进一步的修改意见, 修改后由主编单位定稿, 交李式军教授审稿。

本书由绪论、理论方法 (第一至第六章)、技术应用 (第七至十六章)、组培实践 (第十七至二十二章) 和附录 5 个部分组成, 创新性地增加了植物显微观察与组织学技术、植物组织培养实验设计与统计分析、植物遗传转化与品种改良等章节内容, 更好地满足了学习需要, 对丰富和完善植物组织培养与生物技术理论和技术体系具有重要意义。组培实践部分选取了长江流域具有代表性的 30 余种作物, 分蔬菜、观赏植物、果树、药用植物、茶树和大田作物六大类, 系统地介绍了其组织培养与生物技术的相关实践操作。编委对每一章节的内容都进行了仔细的推敲、确认, 力求本书内容翔实, 并注意体现相关研究和产业化应用的新进展, 使本书具有更好的理论性、系统性和应用性。本书将对人才的培养与科学研究发挥积极的作用。

编写内容具体分工如下: 绪论由陈劲枫编写, 第一章由臧运祥编写, 第二章由李良俊编写, 第三章由张万萍编写, 第四章由娄群峰、陈劲枫编写, 第五章由潘俊松编写, 第六章由李季、陈劲枫编写, 第七章由杨寅桂编写, 第八章由蔡润编写, 第九章由陈友根编写, 第十章由徐迎春编写, 第十一章由解敏编写, 第十二章由周晓慧编写, 第十三章由周庆红编写, 第十四章由宋明编写, 第十五章由王康才编写, 第十六章由潘俊松编写, 第十七章由王志敏、邓英、李良俊、陈劲枫、杨有新、杨寅桂、张万萍、臧运祥编写, 第十八章由王冬良、徐迎春编写, 第十九章由王三红编写, 第二十章由王康才编写, 第二十一章由房婉萍编写, 第二十二章由武喆编写, 附录由陈劲枫等编写。全书由陈劲枫和娄群峰统稿、定稿, 李式军审稿。

本书的面世是各位编委和责任编辑共同努力的结果。感谢李式军教授对全书进行系统的审阅, 并提出了宝贵的修改意见, 感谢南京农业大学张璐在本书校对工作中做出的贡献。尽管在编写过程中力求达到高等教育培养人才的要求, 但限于编者的知识水平有限, 书中不足之处在所难免, 恳请同行和广大使用者批评指正, 以便修订。

陈劲枫

2017 年 12 月 5 日

目 录

绪论	001
----	-----

第一篇 理论方法

第一章 植物组织培养的基本原理	013
第一节 植物细胞全能性和细胞分化	013
第二节 植物离体培养下的形态发生	015
第三节 影响离体培养形态发生的因素	022
第二章 植物组织培养设备与无菌操作技术	027
第一节 实验室的规划与设计	027
第二节 基本仪器与设备	029
第三节 无菌操作技术	033
第三章 植物组织培养的培养基	039
第一节 培养基的成分及其作用	039
第二节 培养基种类	044
第三节 培养基的配制	046
第四章 植物显微观察与组织学技术	049
第一节 显微观察技术	049
第二节 材料的组织学技术	054
第五章 植物转基因技术	061
第一节 植物基因的结构与表达	061
第二节 植物遗传转化的方法	062
第三节 植物转基因操作的过程	066
第四节 植物转基因操作的实例	068
第五节 转基因植物的安全性评价	069
第六章 植物组织培养实验设计与统计分析	074
第一节 实验设计的概念和原理	074
第二节 实验设计方法	077
第三节 常用统计分析软件介绍及应用举例	083

第二篇 技术应用

第七章 植物组织培养技术	095
第一节 植物分生组织培养	095
第二节 植物非分生组织培养	096
第三节 植物离体快速繁殖	099
第四节 植物离体快繁的商业化应用	107
第八章 植物脱毒苗的培养技术	114
第一节 植物脱病毒的意义	114
第二节 茎尖脱病毒培养	117
第三节 其他脱病毒的方法	119

第四节 脱毒苗的鉴定	123
第五节 脱毒苗的移栽与繁殖	126
第九章 植物原生质体培养及体细胞杂交	129
第一节 植物原生质体培养基本概念及意义	129
第二节 植物原生质体分离与纯化	131
第三节 原生质体培养	134
第四节 体细胞融合	138
第十章 植物体细胞无性系变异及应用	144
第一节 植物体细胞无性系变异的概念及筛选	144
第二节 植物体细胞无性系变异的遗传学原理	148
第三节 影响植物体细胞无性系变异的因素	150
第四节 植物体细胞无性系变异的优缺点及在育种中的应用	152
第十一章 人工种子	155
第一节 人工种子的概念、结构与意义	155
第二节 人工种子的制备	157
第三节 人工种子的贮藏与植株成苗	160
第十二章 植物种质资源离体保存	164
第一节 限制生长保存	164
第二节 超低温保存	165
第三节 离体保存种质的遗传完整性	170
第四节 植物超低温种质保存实例	171
第十三章 植物单倍体培养	173
第一节 植物单倍体的起源	173
第二节 植物花药和小孢子培养	174
第三节 未授粉子房和胚珠培养	180
第四节 单倍体植株鉴定和染色体加倍	183
第十四章 植物胚胎培养及离体授粉	187
第一节 植物胚培养	187
第二节 植物胚乳培养	192
第三节 植物胚珠和子房培养	194
第四节 植物离体授粉	198
第十五章 植物细胞培养	204
第一节 植物细胞培养基本概念	204
第二节 悬浮液培养细胞生长和活力的测定	213
第三节 植物细胞规模化培养与天然产物生产	216
第四节 生物转化	223
第十六章 植物遗传转化与品种改良	228
第一节 转基因植物生产现状	228
第二节 转基因在作物品种改良中的作用	231

第三节	转基因植物应用的实例之一 (Bt 抗虫)	232
第四节	转基因植物应用实例之二 (抗 PRSV 木瓜)	235

第三篇 组培实践

第十七章	蔬菜作物组织培养与生物技术	241
第一节	白菜	241
第二节	芥菜	243
第三节	生姜	246
第四节	蒜	248
第五节	百合	252
第六节	石刁柏	256
第七节	芋	261
第八节	魔芋	264
第九节	水生蔬菜	267
第十八章	观赏植物组织培养与生物技术	272
第一节	唐菖蒲	272
第二节	牡丹	277
第三节	蝴蝶兰	280
第四节	大花蕙兰	282
第五节	国兰	283
第六节	菊花	285
第七节	非洲菊	287
第八节	香石竹	288
第九节	红掌	289

第十九章	果树组织培养与生物技术	291
第一节	苹果	291
第二节	柑橘	296
第三节	香蕉	301
第四节	葡萄	307
第五节	猕猴桃	312
第二十章	药用植物组织培养与生物技术	317
第一节	金线莲	317
第二节	白及	319
第三节	石斛	321
第四节	人参	324
第五节	红豆杉	328
第六节	紫草	332
第二十一章	茶树组织培养与生物技术	338
第一节	茶树组织与器官培养	338
第二节	花药和花粉培养与单倍体育种	341
第三节	茶树的遗传转化	344
第四节	茶树分子标记与育种	346
第二十二章	大田作物组织培养与生物技术	350
第一节	马铃薯	350
第二节	玉米	354
第三节	水稻	357
第四节	小麦	359
第五节	棉花	361

附录	植株组织培养中常用培养基配方	367
----	----------------------	-----

绪 论

1838~1839年,德国植物学家施莱登(Matthias Jakob Schleiden)和动物学家施旺(Theodor Schwann)提出了**细胞学说(cell theory)**。该学说直到1858年才得以完善,论证了整个生物界在结构上的统一性及在进化上的同源性。在此基础上,1902年,德国植物学家哈伯兰特(Gottlieb Haberlandt)第一次采用人工培养基成功地对多种分离的植物叶肉细胞进行了培养。虽然他培养的细胞并未分裂,更没有获得再生植株,但他却大胆预言离体的植物细胞能够进一步分裂发育成为完整的植物体,这就是后来成为组织培养基本理论的**细胞全能性(totipotency)**。**植物组织培养(plant tissue culture)**,简称植物组培,就是以植物能够被分解成不同部分(器官、组织、细胞),然后通过离体培养再生完整植株为前提逐步发展起来的。百余年来,植物组织培养技术已成为极为重要的技术手段,尤其与以转基因为主要内容的生物技术的结合,在植物生理学、病理学、药理学、遗传学、育种学、生物化学等多个学科的研究和应用中发挥着重要作用。在顶级学术刊物,如*Nature Biotechnology*、*The Plant Cell*、*Plant Physiology*等,以及应用专业刊物,如*Crop Science*、*Hort Science*、*Plant Science*等中都常有关于植物组织培养的文章发表。植物组织培养成为生物科学中最有生命力的领域之一。

一、基本概念

植物细胞全能性是指植物的每个细胞都包含着该植物的全部遗传信息,从而具备发育成完整植株的遗传潜力。也就是说,在适宜条件下,任何一个细胞都可以发育成一个新的完整个体。植物细胞全能性是植物组织培养的理论基础。

植物组织培养是指在无菌和人工控制的环境条件下,利用适当的培养基,对离体的植物器官、组织、细胞及原生质体进行培养,使其再生细胞或完整植株的技术。由于培养的植物材料已脱离了母体,因此植物组织培养又称为植物离体培养(*plant in vitro culture*)。

植物组织培养有广义和狭义两个概念。广义植

物组织培养是指从植物体分离出符合需要的组织、器官、细胞、原生质体等,在无菌条件下,接种在含有各种营养物质及植物激素的培养基上进行培养,以获得再生的完整植株或生产具有经济价值的其他产品的技术。由于广义的植物组织培养在农业生产中的重要作用,早期人们也直接将其称为生物技术。实际上植物组织培养是生物技术的重要组成部分。

狭义植物组织培养是指用植物各部分组织,如形成层、薄壁组织、叶肉组织、胚乳等进行培养获得再生植株的技术,也指在培养过程中从各器官上产生愈伤组织的培养,愈伤组织经过再分化形成再生植物的技术。

外植体(explant)是植物组织培养中作为离体培养起始材料的器官或组织的片段。在继代培养时,将培养的组织切段移入新的培养基时,这种切段也称为外植体。无论是离体培养繁殖种苗还是进行生物技术研究,培养材料的选择都要从主要的植物入手,选取性状优良的种质或特殊的基因型。对材料的选择要有明确的目的,具有一定的代表性,以提高成功概率,增加其实用价值。通常选择生长健壮的、无病虫害的植株上正常的器官或组织,因为它代谢旺盛,再生能力强。此外,靠近植株基部的部分有时比较容易成功。

植物组织培养采用微生物学的实验手段来操作植物的离体器官、组织和细胞。具体表现在:无菌条件、人工培养基、离体、继代繁殖、封闭的容器、人工控制的环境。植物组织培养具有如下三个特点。

第一,培养条件可以人为控制,不受地区、季节限制。一间30m²的培养室,可同时存放1万多个培养瓶,培育数十万株苗。组培采用的植物材料完全是在人工培养基和小气候环境条件下进行生长的。此过程没有自然中各种不利因素的影响,对植物生长非常有利,组培材料能够稳定地进行周年培养生产。

第二,生长周期短,繁殖效率高。根据不同植物不同部位的不同要求而提供不同的培养条件,因此培养物生长较快。组培中的植株也比较小,往往20~30d为一个周期。所以,虽然组培需要一定的

设备及能源消耗,但由于植物材料能按几何级数繁殖生产,故总体来说成本低廉,且能及时提供规格一致的优质种苗或脱病毒种苗。

第三,管理方便,利于工厂化生产和自动化控制。植物组织培养是在一定的场所和环境条件下,人为提供一定的温度、光照、湿度、营养、激素等条件,极利于高度集约化和高密度工厂化生产,也利于自动化控制生产。它是未来农业工厂化育苗的发展方向。组培与盆栽、田间栽培等相比省去了中耕除草、浇水施肥、防治病虫害等一系列繁杂的劳动,可以大大节省人力、物力及田间种植所需要的土地。

植物组织培养依据外植体来源可分为以下几类。

1. 胚胎培养 (embryo culture) 是指以从胚珠中分离出来的成熟或未成熟胚为外植体的离体无菌培养。

2. 器官培养 (organ culture) 是指以植物的根、茎、叶、花、果实等器官为外植体的离体无菌培养。例如,根的根尖和切段,茎的茎尖、茎节和切段,叶的叶原基、叶片、叶柄、叶鞘和子叶,花器的花瓣、雄蕊 (花药、花丝)、胚珠、子房,果实等的离体无菌培养。

3. 组织培养 (tissue culture) 是指以分离出植物各部位的组织,如分生组织 (meristem)、形成层 (cambium)、木质部 (xylem)、韧皮部 (phloem)、表皮 (epidermis)、皮层 (cortex)、胚乳组织 (endosperm)、薄壁组织 (parenchyma)、髓部 (pith) 等或已诱导的愈伤组织 (callus) 为外植体的离体无菌培养。

4. 细胞培养 (cell culture) 是指以单个游离细胞 (如用果酸酶从组织中分离的体细胞、花粉细胞或卵细胞) 为接种体的离体无菌培养。

5. 原生质体培养 (protoplast culture) 是指以除去细胞壁的原生质体为外植体的离体无菌培养。

生物技术 (biotechnology) 是以生命科学为基础,利用生物体系和工程原理生产制品和创造新物种的科学技术。Higgins (1985) 在 *Biotechnology-Principle and Applications* 一书中将生物技术定义为依赖识别和催化知识的生物系统或过程的工业化应用。Ignacimuthu (1997) 在 *Plant Biotechnology* 一书中将生物技术定义为现代科学技术在改良植物、动物、微生物或培养细胞中的应用。

通过生物技术可以获得的产品包括生物体本身和细胞或器官代谢的产品。前者包括全部或部分生物有机体 (微生物、动物、植物),后者包括各种酶、代谢物等重要的医药、农业、食品、化工等产品。

生物技术是一门以遗传学 (genetics)、生理学 (physiology)、生物化学 (biochemistry)、分子生物学 (molecular biology)、细胞学 (cytology)、微生物学 (microbiology)、工程学 (engineering)、统计学 (statistics)、计算机科学 (computer science) 等为基础的科学。生物技术加上应用科学即可成为一门新的学科,如环境生物技术 (environmental biotechnology)、食品生物技术 (food biotechnology)、植物生物技术 (plant biotechnology) 等。可以说多学科配合及科学研究与技术应用的密切结合是生物技术的显著特点。

Kung (1989) 在 *Plant Biotechnology* 中将植物生物技术 (plant biotechnology) 定义为通过调控生物系统解决农业产业化中存在的实际问题。植物生物技术有狭义和广义两个概念。狭义的植物生物技术概念强调通过来源于对植物细胞、分子生物学理解的技术调控生物系统解决农业产业化中存在的问题。广义的植物生物技术是指所有与生物体遗传、生化功能相关的技术,以及直接进行遗传改良的技术。在这个广义概念下,基础研究和应用科学与技术成为合作者,分别形成生物技术的上游和下游。

植物生物技术包括三个研究领域:受体系统 (recipient system)、供体系统 (donor system) 和转化系统 (transformation system)。受体系统可以简单理解为植物组织培养,任务就是通过培养获得组织器官或细胞的再生植株。供体系统可以简单理解为基因克隆与分子生物学,任务就是通过克隆获得基因。转化系统就是转基因,任务是研究建立有效的转化方法将基因导入植物体中。

二、发展历程

早期的植物组织培养也称为生物技术。植物组织培养是生物技术重要的组成部分。如果将植物组织培养和生物技术分作两个相对独立的概念的话,生物技术以 1831 年达尔文 (Charles Darwin) (图 0-1) 发表物种起源为标志的发展历史早于以 1902 年哈伯兰特的细胞全能性为标志的植物组织培养的历史。综合起来,生物技术和组织培养的发展历程大体可以分为三个时期。

(一) 初步尝试

生物技术的起源以达尔文在 1831 年发表《物种起源》和孟德尔 (Gregor Mendel) (图 0-2) 提出遗传因子为标志。经典遗传学是生物技术的重要基础。孟德尔发现了分离定律和自由组合定律,提出了遗传因子的概念;摩尔根 (Morgan, 1910) 发现了连锁和

交换现象。他们采用的统计与实验方法为生物遗传学从描述性科学向精确性科学的转变奠定了基础。

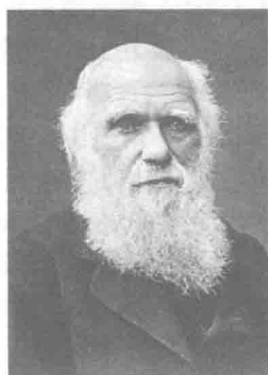


图 0-1 达尔文 (Charles Darwin, 1809~1882)



图 0-2 孟德尔 (Gregor Mendel, 1822~1884)

20 世纪初, 在施莱登和施旺所发展起来的细胞学说的推动下, 1902 年哈伯兰特 (图 0-3) 提出了高等植物的器官和组织为许多细胞组成的观点, 以及植物细胞全能性的理论, 即植物的体细胞在适当的条件下, 具有不断分裂和繁殖, 发育成完整植株的潜在能力。他成功分离并培养了多种植物的叶肉细胞 (图 0-4), 首次发表了植物离体细胞培养实验的报告。虽然没有获得细胞分裂和再生植株, 但他预言培养中的植物细胞能够形成胚, 进而形成完整植株。1922 年, 哈伯兰特的学生 Kotte 和美国的 Robbins 在根尖培养中获得了组织培养的成功。Kotte 采用了添加无机盐、葡萄糖、蛋白胨、天冬酰胺及各种氨基酸的培养基。Robbins 用含无机盐、葡萄糖或果糖的琼脂培养基, 培养出了长度为 1.45~3.75cm 的豌豆、玉米和棉花的茎尖, 形成了一些缺绿的茎和根。



图 0-3 哈伯兰特 (Gottlieb Haberlandt, 1854~1945)

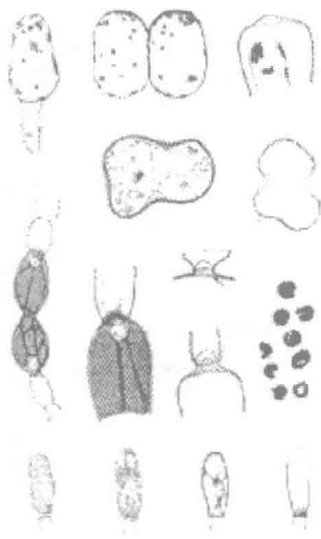


图 0-4 哈伯兰特分离培养的叶肉细胞

(二) 重要突破

自哈伯兰特的实验之后, 美国的怀特 (Philip White) (图 0-5) 开展了大量的植物组织培养和动物组织培养研究。1934 年他建立了第一个活跃生长的番茄根无性繁殖系, 并反复转移到新鲜培养基中继代培养, 使根的离体培养实验获得了真正的成功, 并在以后的 28 年里培养了 1600 代。这之后, 他又以小麦根尖为材料, 研究了光、温度、通气状况、pH、培养基组成等各种培养条件对生长的影响, 并于 1937 年建立了第一个组织培养的综合培养基, 其成分均为已知化合物, 包括 3 种 B 族维生素, 即吡哆醇、硫胺素和烟酸, 该培养基后来被定名为 White 培养基, 他也因此被称为“组织培养之父”。法国科学家伽师雷特 (Roger Gautheret) (图 0-6) 在研究山毛柳和黑杨等形成层的组织培养实验时, 提出了 B 族维生素和生长素对组织培养具有重要意义, 并于 1939 年连续培养胡萝卜根形成层时获得首次成功。1939 年怀特培养出了烟草冠瘿瘤组织。然而, 快速发展的植物组织培养不久就被爆发的第二次世界大战打断了。



图 0-5 怀特 (Philip White, 1901~1968)



图 0-6 伽师雷特 (Roger Gautheret, 1910~1997)

第二次世界大战 (1939~1945 年) 期间, 尽管科学研究 (尤其在欧洲) 非常困难, 但植物组织培养仍然取得了一些进展, 以植物形态建成为主要目标, 对植物生长调节剂和其他因子进行了大量的测试。美国康奈尔大学的斯图沃德 (Frederick C. Steward) 开展了大量试验, 通过对胡萝卜培养中添加椰汁等研究证实了植物细胞的全能性, 奠定了植物组织培养等基本程序。Johannes van Overbeek 等通过在培养基中添加椰汁培养心形胚, 获得了实生苗。Armin Braun 等报道肿瘤诱导与冠瘿瘤病有关。Folke Skoog 等进行的烟草组织培养实验通过培养组织、诱导器官形成获得器官建成。

1945 年第二次世界大战结束后植物组织培养并没有立刻获得快速发展，但植物组织培养技术仍然取得了一些进展。Ernest Ball 的报道极大地促进了旱金莲和羽扇豆茎尖培养的潜力。Albert Hildebrandt 等改良了烟草和向日葵组织培养的培养基。Morel 采用组织培养的方法，研究了植物组织与生物共生的关系。Herber Street 等开始了一系列番茄离体根尖的营养实验。1944 年，Avery 等阐明了 DNA 是遗传信息的携带者。

(三) 快速发展

1950 年以后，植物组织培养进入了快速发展时期，在取得组织培养技术快速进步的同时，在植物发育，尤其在植物生长调节剂效应等理论上取得了重要成就。1951 年，斯库格 (Folke Skoog) (图 0-7) 和崔徵在烟草茎切段和髓的培养及器官形成的研究中发现，腺嘌呤或腺苷可以解除培养基中生长素 (auxin) ——吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA) 对芽形成的抑制作用，而能诱导形成芽，从而明确了腺嘌呤与生长素的比例是控制芽和根形成的主要条件之一。1957 年，Skoog 和 Miller 提出植物激素 (phytohormone) 控制器官形成的概念，指出通过改变培养基中生长素和细胞分裂素 (cytokinin) 的比值，可以控制器官的分化，即生长素和细胞分裂素比值高时促进生根、低时促进茎芽分化、相等时倾向于无结构方式生长。这种器官发生 (organogenesis) 的激素调控模式的建立为植物组织培养中完整植株的再生 (regeneration) 奠定了理论和技术基础。



图 0-7 斯库格 (Folke Skoog, 1908~2001)

1953 年，Watson 和 Crick 提出了 DNA 双螺旋结构模型，阐明了 DNA 的半保留复制方式，奠基了分子生物学研究。

1960 年，Cocking 用真菌纤维素酶分离番茄幼

根原生质体获得成功，为进一步开展原生质体培养和体细胞杂交创造了条件。1961 年，Nirenberg 等破译了遗传密码，逐步揭开了 DNA 编码的遗传信息是如何传递给蛋白质的这一奥秘。在人们不断探索如何能为离体组织提供足够营养的过程中，1962 年 Murashige 和 Skoog 发表了促进烟草组织快速生长的 MS 培养基，其至今仍被广泛应用，成为植物细胞和组织培养历史中主要成就之一。Murashige 是出生在夏威夷的日裔，1954 年开始在威斯康星大学-麦迪逊校区做 Skoog 的博士研究生。他们以烟草髓组织为实验材料，以 White 培养基为对照，经过一系列有机成分 / 无机成分比例、各种不同的无机成分比较后发表的 MS 培养基是一个技术上的巨大成功，是世界范围内被广泛应用的基本培养基。1964 年，Guha 和 Maheshwari 成功地在毛叶曼陀罗花药培养中，由花粉诱导得到了单倍体植株，从而促进了花药和花粉培养的研究。

1970 年，Power 等首次成功地实现了原生质体的融合。1971 年，Takebe 等在烟草上首次由原生质体获得了再生植株，这不仅在理论上证明了无壁的原生质体同样具有全能性，而且在实践上为外源基因的导入提供了理想的受体材料。1972 年，Stanley Cohen 和 Herbert Boyer 开发了单个基因在生物体间移动的技术。Cohen 一直在研究基因分离与克隆的方法，Boyer 发现了限制性内切核酸酶，能够在特殊的 DNA 序列进行剪切，他们成功地在细菌细胞中复制了 DNA，这项工作被誉为开创了现代遗传工程与生物技术。遗传转化方法的最终实现是在 20 世纪 70 年代后期，由 Mary-Dell Chilton 完成的。她第一个证明了植物冠瘿瘤是由在农杆菌质粒中一小段 DNA 的转化引起的。她利用农杆菌成功地进行了遗传转化 (图 0-8)，将 Stanley Cohen 和 Herber Boyer 提出的想法变成了现实。1973 年，Carlson 等通过两个烟草

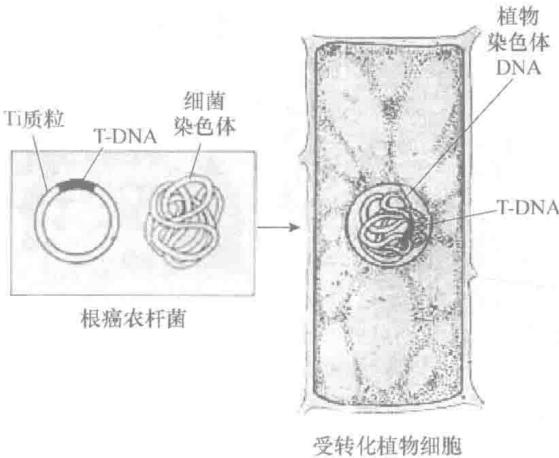


图 0-8 农杆菌转化植物细胞示意图

物种之间原生质体融合, 获得了第一个体细胞杂种, Cocking 等倡导的原生质体培养和体细胞杂交研究得到了迅速发展, 已经能使矮牵牛和烟草属的杂种细胞增殖分化生成杂种植株。1978 年, Murashige 提出了“人工种子”(artificial seed)的概念。

1981 年, Larkin 和 Scowcroft 提出了体细胞无性系变异(somaclonal variation)的概念。1982 年, Zimmermann 开发了原生质体电融合法(electrofusion)。随着根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)和发根农杆菌(*A. rhizogenes*)成功地应用于植物遗传转化(genetic transformation)上, 植物基因工程研究成为当时生物技术研究的重点和热点之一。1983 年, Zambryski 等利用根癌农杆菌转化烟草获得首例转基因植物。1985 年, Horsch 等建立了农杆菌介导的叶盘法(leaf discs), 在许多双子叶植物中得到成功应用。1987 年, Vlein 报道了应用康奈尔大学 Sanford 等发明的基因枪法(gene gun method)将烟草花叶病毒吸附到钨粒表面(图 0-9), 轰击洋葱表皮细胞。之后, 这个方法在小麦、大麦、水稻、甘蔗、棉花、大豆、菜豆、甜橙、葡萄等多种作物上获得成功。20 世纪 80 年代中期大量开展的原生质体培养研究, 相继在水稻、小麦、玉米、番茄、辣椒、草莓、苹果等多种植物培养中获得成功, 此时期是植物原生质体培养研究的高潮阶段。

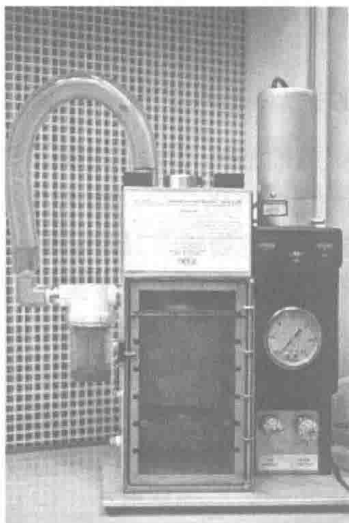


图 0-9 基因枪

进入 20 世纪 90 年代后, 植物遗传转化在水稻、玉米、小麦等主要农作物上取得了突破性进展。以植物组织培养和遗传转化为主要内容的现代生物技术之所以日益受到重视, 主要是由于传统育种存在两大局限: 一是狭窄的遗传变异, 二是物种间存在的杂交障碍。相比之下, 植物组织培养和生物技术就有明显的优势。传统育种作用于整个生物体, 而

生物技术在细胞或分子水平上工作。另外, 传统育种需要有性杂交来转移性状, 而生物技术可以绕开有性杂交途径, 通过基因转移或原生质体融合将需要的基因从毫无关系的生物体导入。1996 年, 国际上第一个商业化释放的转基因作物是番茄, 随后转基因作物有了快速发展。

国际农业生物技术应用服务组织(International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, ISAAA)发布的报告显示, 自 1996 年首个转基因作物应用以来, 全球转基因作物种植面积增加了 100 多倍, 2014 年全球转基因作物面积达 1.815 亿 hm^2 , 转基因作物成为近年来应用最为迅速的作物, 给种植者带来了很大效益。在目前的转基因作物中, 大豆转基因面积超过 81%, 棉花转基因面积超过 64%, 玉米转基因面积超过 29%, 油料转基因面积超过 23%。2014 年共有 28 个国家种植转基因作物, 孟加拉国是新成员。2013 年 10 月, 孟加拉国批准了 *Bt* 茄子的种植。在批准后不到 100d, 120 户小农户于 2014 年 1 月开始种植了 12 hm^2 *Bt* 茄子。美国是迄今最大的种植转基因作物的国家, 2014 年种植面积达 7300 万 hm^2 , 种植的转基因作物包括玉米、大豆、棉花、油菜、甜菜、苜蓿、木瓜、南瓜等。一个令人瞩目的事件是, 美国 2014 年 11 月批准了 InnateTM 土豆的种植。InnateTM 土豆中丙烯酰胺的含量比传统品种更低(在高温烹饪土豆时会产生丙烯酰胺, 此物质对人类有潜在致癌性)。此外, 因为 InnateTM 土豆在剥皮时不会变色并且黑斑挫伤更少而减少了 40% 的产量损失, 所以提高了消费者的满意度。

三、主要应用

植物组织培养已有上百年的发展历史, 但无论是研究还是应用, 植物组织培养至今仍然非常活跃, 这其中重要的原因是多年的研究实践建立了非常有效的技术方法。第一是能够从不同的植物部位形成再生植株, 包括从配子体形成单倍体/双单倍体, 分离原生质体并获得再生植株; 第二是能够进行大规模的细胞悬浮培养; 第三是掌握了植物细胞/组织的超低温保存方法; 第四是建立了遗传转化方法实现了基因转移。相对于其他一些技术, 植物组织培养技术更容易掌握使用, 同时成本较低。因此, 植物组织培养技术在农业和工业中都有很重要的应用。

(一) 农业生产相关的应用

1. 植物离体快速繁殖 这是在生产上应用最广泛且能产生较大经济效益的一项技术。植物离体快速繁殖的特点是繁殖系数大、繁殖速度快、

苗木整齐一致,能够周年生产。植物快速繁殖在许多作物中得到了有效应用,其中最成功的一个例子是兰花。兰花种子小于1mm,只含100~200个细胞。由于兰花种子没有胚乳,所以在自然条件下需要真菌共生才能发芽。20世纪50年代,法国人 Georges Morel 采用马铃薯培养基培养兰花茎尖,通过拟原球茎 (protocorm-like body) 途径获得了大量小植株。这项技术称为“分生组织克隆”,在兰花繁殖中广泛应用而开创了“兰花工业”。

2. 培育无病毒苗木 一些无性繁殖植物,如马铃薯、草莓、大蒜、香蕉等,由于长期无性繁殖,病毒在体内积累而引起种性退化,严重影响了产量和质量,对生产造成了巨大损失。由于病毒在植株体内依靠维管系统移动,在植物分生组织区域没有病毒,因此利用茎尖分生组织培养方法可脱除病毒。植物脱毒之后生长势明显增强,整齐一致,产量增加。通过茎尖培养的方法脱毒并不复杂,剥离茎尖是关键,一般需要在显微镜下操作,剥离2~3mm的茎尖。理论上讲,剥离的茎尖越小,病毒就越少,但茎尖越小培养就越困难。茎尖培养脱毒通常采用MS培养基。实践中为了进一步提高脱毒效果,还可以配合应用一些其他处理,如高温或化学物质处理等。

3. 培育新品种或创制新物种 第一是培育远缘杂种。植物远缘杂交存在受精前和受精后障碍。对于受精后障碍,可以采用胚胎培养拯救杂种胚,获得远缘杂交的成功。第二是原生质体融合。通过原生质体融合,可以绕过有性杂交,克服有性杂交不亲和性,获得体细胞杂种,创造新物种或育成优良品种。第三是选择离体突变体。培养的细胞无论是愈伤组织还是悬浮细胞,由于处在分裂状态,易受培养条件和诱变因素(如射线、化学物质)的影响产生变异,产生对人类有用的突变体,从而育成新品种。第四是单倍体育种。单倍体育种就是采用组织培养技术培育花药、小孢子、未授粉子房等包含单倍体的细胞,进而获得单倍体/双单倍体的方法。其中以花药或小孢子培养获得单倍体最为有效,因而被广泛应用。单倍体培育具有高效、快速、一次性纯合等优点,已成为一种重要的育种手段,在许多作物育种中应用。

4. 人工种子 人工种子是指植物离体培养中产生的胚状体或不定芽,被包裹在含有养分和保护功能的人工胚乳和人工种皮中,从而形成能发芽出苗的颗粒体。人工种子的研究已有近40年的历史,但目前仍处于探索阶段。一些难题仍然未能很好解

决,如人工种皮、防腐、贮藏运输、在体外条件及类似土壤的底物中转化率较低、制作成本高等。但由于人工种子具有繁殖速度快、固定杂种优势、节约粮食等优点,相关研究仍在大量进行。人工种子技术的研究已逐渐由体细胞胚人工种子转向非体细胞胚人工种子。无论是体细胞胚人工种子,还是非体细胞胚人工种子,随着研究的深入,限制其应用的问题将逐步得到解决,对作物遗传育种、良种繁育和栽培等起到了巨大的推进作用。

5. 植物种质资源的离体保存 植物种质资源 (germplasm) 又称为遗传资源或基因资源,是研究与生产的物质基础。种质资源越多,遗传改良的潜力就越大。因此,种质资源的保存对未来农业具有十分重要的意义。传统的种质资源保存有许多限制因素:一是种子活力随储藏期的延长逐渐丧失;二是无性繁殖作物在种子繁殖后会发生变异;三是常规田间保存耗资巨大,且往往达不到万无一失的目的。植物种质资源离体保存是指对离体培养的小植株、器官、组织、细胞或原生质体等材料,采用限制、延缓或停止生长的方法实现资源材料的保存,在需要的时候恢复生长,并再生植株的技术。植物种植资源离体保存是20世纪70年代冷冻生物学和植物组织培养结合发展起来的技术,此技术有许多优点,如占用空间少,节省人力、物力和地力,目前已被广泛地研究和应用。

(二) 工业/医药生产相关的应用

利用组织或细胞的大规模培养,可以生产人类需要的一些天然有机化合物,如蛋白质、脂肪、糖类、药物、香料、生物碱及其他活性化合物,为药物、染料、香料、食品等的生产提供新途径。利用细胞培养生产这些次生物质,不仅可以克服天然资源的不足,而且不受自然条件限制,还可以通过研究不断改进方法提高效率。日本三井石油化学工业公司(现三井化学公司)1983年就使用750L植物反应器培养紫草细胞生产紫草宁。已从200多种植物的培养组织或细胞中获得了500多种有效代谢化合物,有40余种化合物在培养细胞中的含量超过原植物。例如,人参皂苷含量在愈伤组织为21.4%,冠瘿组织为19.3%,再分化根为27.4%,都高于天然人参根的含量(4.1%)。特别是天然植物蕴藏量少、含量低,但临床效用高的成分,如紫杉醇(taxol)等,利用组织培养法进行大规模生产,具有巨大的经济效益和社会效益。表0-1统计了利用植物组织培养方法生产的部分药物。

表 0-1 植物组织培养产生的部分药用物质（徐忠东，2001）

药用植物	组织类型	药用成分	研究者
人参（ <i>Panax ginseng</i> ）	愈伤组织，悬浮培养细胞	人参皂苷	朱蔚华，1978
三七（ <i>Panax notoginseng</i> ）	愈伤组织	三七皂苷元	Tomita et al., 1976
盾叶薯蓣（ <i>Dioscorea zingiberensis</i> ）	愈伤组织	薯蓣皂苷	罗士韦，1978
獐牙菜（ <i>Swertia bimaculata</i> ）	愈伤组织	獐芽菜苦苷	向凤宁等，1998
毛地黄（ <i>Digitalis sp.</i> ）	愈伤组织	强心内酯	Buchnex, 1964
刺甘草（ <i>Glycyrrhiza echinata</i> ）	悬浮培养细胞	海胆甙	Furuya et al., 1976
颠茄（ <i>Atropa belladonna</i> ）	愈伤组织	颠茄碱	West et al., 1957
曼陀罗（ <i>Datura stramonium</i> ）	愈伤组织，悬浮培养细胞	托平生物碱	Sairm et al., 1971
三分三（ <i>Anisodus acutangulus</i> ）	愈伤组织	莨菪碱，东莨菪碱	郑光植等，1976
烟草（ <i>Nicotiana tabacum</i> ）	愈伤组织	烟碱	Fabata et al., 1971
喜树（ <i>Camptotheca acuminata</i> ）	愈伤组织	喜树碱	Misawa et al., 1973
日本黄连（ <i>Coptis japonica</i> ）	愈伤组织	盐酸小檗碱	Furuya et al., 1972
罂粟（ <i>Papaver somniferum</i> ）	愈伤组织，悬浮培养细胞	鸦片碱	Furuya et al., 1972
长春花（ <i>Catharanthus roseus</i> ）	愈伤组织，悬浮培养细胞	蛇根碱，阿吗碱	Carew et al., 1977
日本粗榧（ <i>Cephalotaxus harringtonia</i> ）	愈伤组织	粗榧碱	Puha et al., 1971
云南萝芙木（ <i>Rauvolfia yunnanensis</i> ）	愈伤组织	降压灵，利血平	郑光植等，1978
飞龙掌血（ <i>Toddalia asiatica</i> ）	愈伤组织	喹啉，呋喃类生物碱	司书毅，2000
星花绣线菊（ <i>Spiraea japonica</i> ）	愈伤组织	二萜生物碱	胡益明等，2001
黄麻（ <i>Corchorus olitorius</i> ）	悬浮培养细胞	甾醇	Tarng et al., 1975
番泻树（ <i>Cassia senna</i> ）	愈伤组织	游离蒽醌	Rai et al., 1978
大黄（ <i>Rheum palmatum</i> ）	愈伤组织	蒽醌	Furuya, 1975
紫草（ <i>Lithospermum erythrorhizon</i> ）	愈伤组织，悬浮培养细胞	紫草宁	Tabata et al., 1974
苦瓜（ <i>Momordica charantia</i> ）	果实，种子	胰岛素	Khanna et al., 1974
油麻藤（ <i>Mucuna pruriens</i> ）	悬浮培养细胞	L-多巴	Brain et al., 1976
彩叶苏（ <i>Coleus blumei</i> ）	悬浮培养细胞	迷迭香酸	Razzaque et al., 1977
商陆（ <i>Phytolacca acinosa</i> ）	悬浮培养细胞	抗生素	Misama et al., 1974
灰毛豆（ <i>Tephrosia purpurea</i> ）	悬浮培养细胞	鱼藤酮	Sharma et al., 1975
红豆杉（ <i>Taxus chinensis</i> ）	悬浮培养细胞	紫杉醇	吴蕴祺等，1978
柴胡（ <i>Bupleurum falcatum</i> ）	愈伤组织	花色素	Hiraoka et al., 1986
肉桂（ <i>Cinnamomum cassia</i> ）	悬浮培养细胞	黄烷酮	Yazaki et al., 1993
来檬（ <i>Citrus aurantiifolia</i> ）	愈伤组织	黄酮	Berhow, 1994
银杏（ <i>Ginkgo biloba</i> ）	悬浮培养细胞	黄烷醇醇，藻蓝素	Stafford et al., 1986
玫瑰茄（ <i>Hibiscus sabdariffa</i> ）	愈伤组织，悬浮培养细胞	花色素	阮茜等，1996
紫苜蓿（ <i>Medicago sativa</i> ）	悬浮培养细胞	异黄酮	Edwards et al., 1991
水母雪莲（ <i>Saussurea medusa</i> ）	愈伤组织，悬浮培养细胞	黄酮	赵德修等，1998
钩藤（ <i>Uncaria elliptica</i> ）	愈伤组织，悬浮培养细胞	黄酮	Das et al., 1993

（三）生物种业、肥料、农药

1. 生物种业（bio-seed industry） 生物种业是指以生物技术为代表的现代科技支撑的种业及种业科

技。国际生物种业呈现出高技术、高投入、集约化发展的趋势。基因组学、蛋白质组学等前沿技术不断突破，引领生物育种技术的发展方向。现代生物育种表现出高通量、规模化、工厂化、信息化的特征。以企

业为主导的全产业链集约化科技创新成为国际生物种业竞争的核心。大宗农作物和动物种业企业的兼并重组不断加速,产业集中度不断提高。特色林果花草种业呈现出精品化、专业化发展的特征。

我国生物种业及种业科技快速发展,在植物高产、优质、多抗新品种选育、杂种优势利用和生物技术育种等方面取得了显著成就,以杂交水稻、转基因抗虫棉等为代表的部分领域持续保持国际领先水平。农作物良种覆盖率达95%,在我国粮食增产中的贡献率达到40%。林果生物技术研究与应用目标主要集中在提高对生物和非生物胁迫的抗性、增加产量、改进采后货架期、增加营养品质等方面,然而转基因林果商业化生产面临着法规限制。

我国生物种业科技基本形成了基础研究、前沿技术和品种开发相结合的科技创新体系,但目前与国际先进水平相比,仍有较大差距。生物种业整体自主创新能力不足,以企业为主体的商业化育种体系尚未形成,生物种业的国际竞争能力较弱。

2. 生物肥料 (bio-fertilizer) 生物肥料泛指利用生物技术制造的、对作物具有特定肥效(或有肥效又有刺激作用)的生物制剂,其有效成分可以是特定的活生物体,如微生物、动植物组织或细胞,也可以是生物体的代谢物或基质的转化物等。生物肥料与化学肥料、有机肥料一样,是农业生产中的重要肥源。长期以来,化学肥料和化学农药的大量不合理施用,不仅耗费了大量不可再生的资源,而且破坏了土壤结构,污染了农产品品质和环境,影响了人类的健康生存。

生物肥料无公害,在未来绿色农业、生态农业的发展中有重要意义:①改善作物品质、提高作物产量。试验表明,施用生物菌肥,蔬菜硝酸盐含量平均降低19.09%,维生素C含量平均提高9.96mg/100g。②降低生产成本。生物肥料充分利用微生物的某种特征,其施用量一般不大,施用生物肥料的同时还可减少化肥的施用量,因而节约了施

肥成本。③有效利用大气中的氮素或土壤中的养分资源。从目前的研究结果来看,虽然微生物的固氮效率因土壤条件的不同而有较大差异,但这种作用的存在无疑是氮肥工业的一个有力补充。④减少环境污染。施用生物肥料如固氮类生物肥料,不仅可适当减少化学肥料的施用量,而且因其所固定的氮素直接贮存在生物体内,相对而言,对环境污染的机会也就小得多。⑤能改善土壤的理化性质。施用生物肥料,由于减少了化肥对土壤养分、结构等方面的不良影响,同时又使微生物的活动能力得到增强,所以在一定程度上改善了土壤的理化性质。

3. 生物农药 生物农药(bio-pesticide)是指利用生物活体(真菌、细菌、昆虫病毒、转基因生物、天敌等)或其代谢产物(信息素、生长素等)针对农业有害生物进行杀灭或抑制的制剂。生物农药又称为天然农药。传统农药造成的环境污染,其目标族群逐渐养成的抗药性,以及农药对于非目标族群的负面影响等因素促进了生物农药的发展。早在1690年烟草的水溶成分就用于对抗谷类害虫。

我国是最早应用杀虫剂、杀菌剂防治植物病虫害的国家之一,早在1800年前就已应用汞剂、砷剂和藜芦等。直到20世纪40年代初,植物性农药和无机农药仍是防治病虫害的有力武器。尽管生物农药已经有相当长的发展历史,但是生物农药的市场占有率仍然有限。一些因素限制了生物农药的成长:生物农药通常不具广效性,与化学农药相比效果较为缓慢,有效期限较短而成本较高。然而在当今提倡减少化肥和农药使用、发展有机农业的时代,生物农药具有良好的发展前景。

生物农药具有的优点包括:选择性强,对人畜安全;对生态环境影响小;利用天然可再生资源加工,可降低生产成本等。生物农药可分为植物源农药(如除虫菊酯)、动物源农药(如蜘蛛毒素)和微生物源农药(如苏云金菌剂)三类。

— 小 结 —

植物组织培养是指在无菌和人工控制的环境条件下,利用适当的培养基,对离体的植物器官、组织、细胞及原生质体进行培养,使其再生细胞或完整植株的技术,其基本理论是细胞全能性。植物组织培养是生物技术重要的组成部分。生物技术是以生命科学为基础,通过调控生物系统实现产业化应用的技术。

生物技术和植物组织培养的发展历程大致可分为三个时期:初步尝试(1930年以前);重要突破(1930~1950年);快速发展(1950年以后)。

植物组织培养与生物技术已有上百年的发展历史,但无论是研究还是应用,仍然是一个非常活跃的领域,在农业生产(如植物离体快速繁殖、无病毒苗培育、人工种子、种质资源保存等)、工

业/医药生产(如大规模细胞培养生产多种天然有机化合物)及生物制品(生物种业、生物肥料、生物农药)等多方面都有许多成功的、重要的应用。

复习思考题

1. 什么叫作植物组织培养?其理论基础是什么?
2. 细胞学说(cell theory)与细胞全能性(totipotency)的概念分别是什么?
3. 简述植物组织培养的主要特点。
4. 植物组织培养的形成和发展分为哪几个阶段?哈伯兰特单个细胞离体培养失败的原因是什么?
5. 植物组织培养在哪些方面有成功的应用?

主要参考文献

- 巩振辉,申书兴. 2013. 植物组织培养. 2版. 北京:化学工业出版社
- 刘庆昌,吴国良. 2010. 植物细胞组织培养. 北京:中国农业大学出版社
- 彭立新. 2013. 园艺植物生物技术. 北京:中国农业出版社
- 石晓东,高润梅. 2008. 植物组织培养. 北京:中国农业科学技术出版社
- 王蒂,陈劲枫. 2013. 植物组织培养. 2版. 北京:中国农业出版社
- 夏海武,陈庆榆. 2008. 植物生物技术. 合肥:合肥工业大学出版社
- 徐忠东. 2001. 植物组织培养生产药物研究进展. 生物学杂志, 18(6): 6, 13~14
- 张献龙,唐克轩. 2004. 植物生物技术. 北京:科学出版社
- Germana MA. 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104(3): 283~300
- Gerszberg A, Hnatuszko-Konka K, Kowalczyk T, et al. 2015. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 120(3): 881~902
- Gong XQ, Liu JH. 2013. Genetic transformation and genes for resistance to abiotic and biotic stresses in *Citrus* and its related genera. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 113(2): 137~147
- Juturu VN, Mekala GK, Kirti B. 2015. Current status of tissue culture and genetic transformation research in cotton (*Gossypium* spp.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 120(3): 813~839
- Rai MK, Shekhawat NS. 2014. Recent advances in genetic engineering for improvement of fruit crops. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 116(1): 1~15
- Silva JATD, Kim H, Engelmann F. 2015. Chrysanthemum low-temperature storage and cryopreservation: a review. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 120(2): 423~440
- Tanakal Y, Katsumoto Y, Brugliera F, et al. 2005. Genetic engineering in floriculture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 80: 1~24
- Trigiano RN, Gray DJ. 2000. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press

