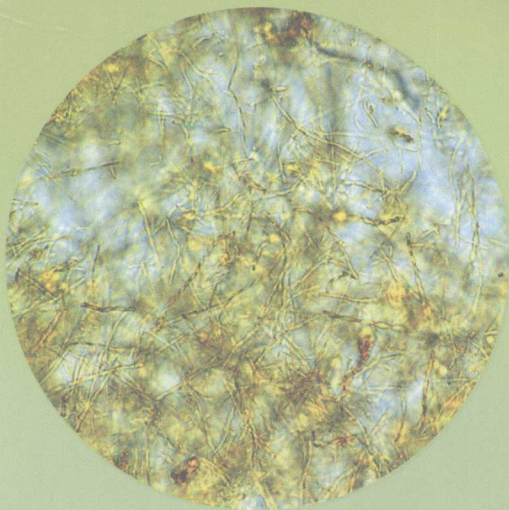




全国高职高专教育“十一五”规划教材

细胞工程

■ 庞俊兰 主 编
张丽君 副主编



高等教育出版社
Higher Education Press

全国高职高专教育“十一五”规划教材

细胞工程

庞俊兰 主 编

张丽君 副主编



高等教育出版社

Higher Education Press

内容提要

本书是全国高职高专教育“十一五”规划教材。

本书以细胞工程基本概念、基本理论和关键技术及其实际应用为主线,从高职高专教学的培养目标出发,本着“理论够用,突出技能”的原则,以基础知识为主体,强化对学生的实践技能和创业精神的培养,全面提高学生的综合素质。

本书由三部分组成:总论重点介绍细胞工程的概念、发展简史及其在现代生物技术中的地位与应用;细胞工程的基础;细胞工程的基本设备和基本技术。理论部分分别介绍植物细胞工程和动物细胞工程的相关概念、基本原理、关键技术;实训部分介绍当前细胞工程最实用和前沿技术及规范标准,使学生能真正掌握,进入工作岗位能直接上手。

本书适于作为应用性、技能型人才培养各类教育生物技术、生物制药、食品等专业教学用书,亦适合相关领域工作人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

细胞工程/庞俊兰主编. —北京:高等教育出版社,
2007.6

ISBN 978 - 7 - 04 - 021756 - 8

I. 细… II. 庞… III. 细胞工程 - 高等学校:技术
学校 - 教材 IV. Q813

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 072245 号

策划编辑	张庆波	责任编辑	薛 玥	封面设计	张 楠	责任绘图	朱 静
版式设计	马静如	责任校对	殷 然	责任印制	尤 静		

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街 4 号
邮政编码 100011
总 机 010 - 58581000

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 北京市南方印刷厂

开 本 787 × 1092 1/16
印 张 20.75
字 数 500 000

购书热线 010 - 58581118
免费咨询 800 - 810 - 0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2007 年 6 月第 1 版
印 次 2007 年 6 月第 1 次印刷
定 价 26.00 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 21756 - 00

前 言

细胞工程是现代生物工程中的一门综合性生物技术,它与基因工程一起代表着现代生物工程最新的发展前沿。细胞工程涉及面极其广泛,在生命科学、医药、农业、食品、生物资源与环境保护等领域起着越来越重要的作用。

鉴于细胞工程日益重要的地位,该领域的研究和开发工作需要大批科技工作者的加入,许多高校纷纷开设了细胞工程课程。但是,目前有关细胞工程的书籍大都是针对本科生的教材,不适用于高职高专的学生,因此,我们在多年的教学基础上编写了这本《细胞工程》教材。本书具有以下特点:

一、以关键技术及应用为主线,全书分为总论、植物细胞工程和动物细胞工程三编。

总论介绍细胞工程概况、细胞工程基础、细胞工程研究的基本设备和通用技术,是后两编的基础。后两编各成完整体系,既有理论部分,又有实训部分。每章又分为基本概念、基本理论、关键技术、注意事项、本章小结、复习思考题、参考文献等几大部分,力求做到理论够用,突出技能。

二、实训部分阐述技术方法详细具体,实用性强。

三、本书采用了大量的图片和表格,简洁、明了、形象、直观地介绍较为抽象的基本概念、基本原理和技术,力争文字简练,图文并茂,通俗易懂。

本书共十三章,北京城市学院庞俊兰编写第1章绪论、第3章细胞工程研究的基本设备和基本技术、第8章植物种质资源温保存以及植物细胞工程实训部分;深圳职业技术学院张丽君编写第9章动物细胞培养的基本知识与技术、第11章动物细胞培养的应用技术和动物细胞工程实训部分;第10章动物细胞大规模培养技术由屈毅编写;第4章植物组织器官培养技术、第6章植物原生质体培养和体细胞杂交由杨艳芳编写;第2章细胞工程基础由廖俊杰和屈毅编写;第5章植物细胞培养技术由信阳农业高等专科学校王德芝编写;第7章植物基因转化受体系统由杨清编写;第12章动物干细胞技术简介由张丽君、杨兆勇编写。动物细胞工程部分由张丽君统稿,植物细胞工程的统稿以及全书的定稿由庞俊兰完成。

北京大学生命科学院的田清涑教授对全书进行了认真审定,提出了许多宝贵意见,其严谨的写作态度,科学化、规范化的写作要求使我们受益匪浅。

本书引用和参考了一些文字和图片,在此向其作者表示衷心感谢。

本书的编写力求系统、生动、形象地介绍细胞工程的主要技术原理和方法,但是由于细胞工程的迅猛发展,以及编著者本身的知识能力的限制,书中难免有不足之处。衷心希望各位专家、读者批评指正,以待重印、再版时改正和充实。

庞俊兰

2007年2月

郑 重 声 明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010) 58581897/58581896/58581879

传 真：(010) 82086060

E - mail：dd@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街 4 号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮 编：100011

购书请拨打电话：(010)58581118

目

录

总 论

论

第一章 绪 论	3
第一节 细胞工程的基本概念	3
第二节 细胞工程的主要技术	4
一、细胞与组织培养技术	4
二、细胞融合技术	4
三、细胞拆合技术	5
四、染色体工程	5
五、胚胎工程	5
六、细胞遗传工程	5
七、干细胞与组织工程	6
第三节 细胞工程的发展历史	6
一、植物细胞工程的发展简史	6
二、动物细胞工程的发展简史	8
第四节 细胞工程的应用	9
一、植物脱毒和离体快繁	9
二、新型动植物品种的培育	10
三、珍惜动植物种质资源的保存和保护	10
四、利用动植物细胞培养生产有用物质	10
五、通过体外受精和胚胎移植技术产生试管动物(婴儿)	11
六、获得克隆动物	11
七、干细胞的研究和应用	11
第五节 细胞工程与其他现代生物技术的关系	12
第二章 细胞工程基础	14
第一节 细胞生物学基础	14
一、细胞的发现	14
二、细胞的分类	15

三、细胞器的结构与功能	17
四、染色质和染色体	18
五、细胞分裂与增殖	20
六、细胞周期	24
七、细胞分化与细胞全能性	25
八、细胞衰老、凋亡与癌变	26
第二节 分子生物学基础	29
一、核酸	29
二、蛋白质	30
三、遗传信息从 DNA 复制到蛋白质表达	31
四、基因工程技术	33
第三章 细胞工程实验室设置与基本技术	35
第一节 实验室设置	35
一、洗涤室	35
二、灭菌室	36
三、配制室	36
四、无菌操作室(接种室)	36
五、培养室	36
六、鉴定室	37
七、驯化移植室	37
第二节 实验室主要仪器设备	37
一、常规设备	37
二、灭菌设备	38
三、培养设备	39
四、培养容器与用具	40
五、无菌操作设备	42
第三节 细胞工程的基本操作技术	43

第五节 植物细胞培养的应用	130	第八章 植物种质资源的保存	173
一、筛选突变体	130	第一节 植物种质资源保存类型	173
二、生产植物次生代谢产物	133	第二节 试管保存	174
第六章 植物原生质体培养和体细胞杂交	140	一、常温下试管保存	174
第一节 原生质体的分离和培养	140	二、常温抑制生长保存	174
一、原生质体的分离	140	三、中低温调控生长保存	174
二、原生质体的纯化与活力测定	143	四、常温抑制生长保存与中低温调控生长保存相结合	174
三、原生质体的培养	144	第三节 超低温保存	174
第二节 体细胞杂交	151	一、超低温保存的概念	175
一、植物体细胞杂交的概念	151	二、超低温保存的基本原理	175
二、体细胞杂交技术	153	三、超低温保存技术	175
第七章 植物基因转化受体系统	160	实训上	179
第一节 植物基因转化受体系统的类型及其特性	160	实训项目一 细胞工程基础实验技术	179
一、植物基因转化受体系统应具备的条件	160	实训项目二 无菌操作及愈伤组织诱导技术	183
二、几种植物基因转化受体系统	161	实训项目三 器官发生与植株再生调控培养、愈伤组织增殖培养	185
第二节 植物基因转化受体系统建立的程序	163	实训项目四 细胞悬浮培养及种细胞筛选技术	186
一、高频再生系统的建立	163	实训项目五 细胞规模化培养	187
二、抗生素敏感性试验	165	实训项目六 原生质体分离与体细胞杂交	188
三、农杆菌的敏感性试验及菌种的选择	166	实训项目七 烟草遗传转化实验	190
四、影响受体系统转化效率的因素	166	实训项目八 小麦成熟胚培养	191
第三节 植物基因转化受体系统建立中常遇的问题	168	实训项目九 月季组织培养	192
一、试管苗的玻璃化现象	168	实训项目十 马铃薯试管微薯的诱导	193
二、培养物的褐变	169	附 常用的培养基配方 (浓度单位:mg/L)	194
三、白化苗的产生	170		
四、试管苗的移栽成活率	171		
第二篇 动物细胞工程			
第九章 动物细胞培养的基本知识与技术	207	一、体外细胞培养所用器具的无菌处理	208
第一节 动物细胞体外培养的设备器具与体外培养用液	207	二、体外培养用液	208
		三、培养基	210

四、细胞培养基种类	211	生物反应器简介	257
第二节 动物细胞的体外培养生长		一、气升式细胞培养生物反应器	258
特征	214	二、机械搅拌式生物反应器	258
一、贴附生长	215	三、填充床反应器系统	260
二、生长的接触抑制及密度		四、动物细胞培养反应器的设计	
依赖性	216	策略	262
第三节 细胞培养的基本方法与		第六节 微载体培养技术	263
过程	216	一、微载体种类	263
一、原代培养基本原理	216	二、微载体表面的细胞生长	264
二、原代培养步骤	217	第十一章 动物细胞培养的应用技术	267
三、传代培养	225	第一节 动物细胞培养在单克隆	
四、细胞的纯化和克隆	227	抗体制备中的应用	268
五、细胞的冻存与复苏	232	一、杂交瘤技术的基本原理和	
六、细胞计数及活力测定	233	过程	268
七、细胞的分裂指数测定	234	二、杂交瘤技术制备单克隆抗体的	
八、细胞周期的测定	234	基本过程及方法	269
九、培养物的污染及防止	235	三、典型制备单克隆抗体具体	
第四节 几种常见动物细胞培养	237	步骤	271
一、上皮类细胞培养	237	四、单克隆抗体的应用	277
二、结缔组织类细胞培养	238	第二节 外源基因在动物细胞中的	
三、肌组织类细胞培养	238	表达	279
四、人胚肾细胞培养	239	一、外源基因在动物细胞中表达的	
五、神经组织细胞培养	239	基本原理与基本技术	280
六、神经胶质细胞培养	239	二、外源基因在动物细胞中表达的	
七、肿瘤细胞培养	240	具体过程	282
第十章 动物细胞大规模培养技术	244	三、转染细胞鉴定	287
第一节 动物细胞的增殖过程	244	第三节 动物细胞培养法生产	
第二节 大规模培养技术简介	246	疫苗	289
第三节 大规模培养常用方法	247	一、疫苗的分类	289
一、悬浮培养	247	二、疫苗的生产技术	290
二、贴壁培养	249	三、生产病毒和制备病毒疫苗的	
三、固定化培养	250	常用方法	291
第四节 大规模培养技术的操作		四、疫苗制品纯化技术	293
方式	252	第四节 动物细胞培养在组织工程中	
一、批式操作	253	的应用	294
二、加式操作	253	一、组织工程研究内容	294
三、连续式操作	255	二、组织工程实现方式	294
第五节 动物细胞大规模培养用		三、动物细胞培养在组织工程研究的	
		重要性	294

四、组织工程研究进展	295	五、ES 细胞的冷冻保存	308
第十二章 动物干细胞技术简介	299	六、ES 细胞系的建立及保存	308
第一节 干细胞简介	299	第四节 胚胎干细胞的定向分化 ...	309
一、干细胞的定义	299	一、胚胎性干细胞定向分化的常用	
二、干细胞的分类	300	策略	309
第二节 胚胎干细胞的特性	300	二、分化细胞的鉴定与纯化	310
一、形态学特征	301	实训下	312
二、特异性标志分子的表达	302	实训项目一 细胞分离培养前准备	
三、细胞周期的特征	302	工作	312
四、端粒酶	302	实训项目二 血管平滑肌细胞原代	
第三节 胚胎干细胞的分离培养 ...	303	分离培养	314
一、分化抑制物的选择和培养基的		实训项目三 血管平滑肌细胞传代	
设计	303	培养	316
二、早期胚胎的选择及培养	304	实训项目四 血管平滑肌细胞鉴定、	
三、分离及培养过程	304	冻存及复苏	317
四、ES 细胞的鉴定	307		

总 论

第一章 绪论

知识目标:

- 了解细胞工程的发展简史
- 掌握细胞工程及其相关概念
- 掌握细胞工程主要技术
- 了解细胞工程的应用

细胞是生物体的基本结构单位和功能单位。随着细胞生物学和分子生物学的迅猛发展,以培养条件下细胞全能性表达的调控为核心的一门综合性技术科学——细胞工程产生和发展起来。近年来细胞工程已经成为现代生物技术的一个重要性领域。本章概括介绍细胞工程的基本概念、主要技术、发展历史、重要应用及其与其他生物技术的关系等。

第一节 细胞工程的基本概念

掌握细胞工程的基本概念,是从事该领域工作的基础,本节重点介绍细胞工程的基本概念。

所谓细胞工程(cell engineering)是指在细胞水平上的遗传工程,即应用细胞生物学、分子生物学的方法,对细胞进行遗传操作,如细胞培养、细胞融合、细胞诱变、细胞重组、细胞遗传物质转移和生殖工程等,以获得所期望遗传组成的细胞或生物体,从而达到改良生物品种或创造新品种,加速繁育动植物个体,或利用细胞培养产生某种有用物质的过程。广义的细胞工程包括所有的生物组织、器官及细胞离体操作与培养。狭义的细胞工程是指细胞融合和细胞培养技术。

细胞工程涉及的领域相当广泛,根据研究对象的不同,分为微生物细胞工程、植物细胞工程、动物细胞工程三大类。

其中植物细胞工程(plant cell engineering)是细胞工程的一个重要的分支,是一门以植物组织和细胞的离体操作为基础的实验性学科。它是以植物组织细胞为基本单位,在离体条件下进行培养、繁殖或人为的精细操作,使细胞的某些生物学特性按人们的意愿发生改变,从而改良品种或创造新物种,或加速繁殖植物个体,或获得有用物质的过程统称为植物细胞工程。就培养层次而言,植物细胞工程包括植物组织、器官培养、细胞培养、原生质体培养等培养技术。组织培养(tissue culture)是指植物各部分组织的离体培养,使之形成愈伤组织。胚胎培养(embryo culture)是组织培养的一个重要领域,是指以胚珠(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。器官培养(organ culture)是指对植物根(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。细胞培养(cell culture)是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)进行离体培养,如生殖细胞(小孢子)、根尖细胞、叶肉细胞等。原生质体培养(protoplast culture)是指利用某些方法去除植物细胞的细胞壁,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进行分裂、分化形成植株的技术。

由上述基本的培养技术延伸出细胞的融合、离体快繁、脱毒技术、超低温冷冻贮藏、人工种子等,构成了植物细胞工程的主要内容。

动物细胞工程(animal cell engineering)则是细胞工程的另一个重要的分支,是对动物的细胞、组织和器官培养、细胞融合、细胞重组、遗传物质转移和生殖工程等从细胞水平改变动物细胞的遗传物质,用于生产特定生物制品、培育动物新品种和应用于人类的优生。就技术范围而言,动物细胞工程包括细胞培养技术(组织培养、器官培养);细胞融合技术;胚胎工程技术(核移植、胚胎分割等);克隆技术(单细胞系克隆、器官克隆、个体克隆),这些便是动物细胞工程的主要内容。

第二节 细胞工程的主要技术

掌握了细胞工程的基本概念,进一步了解细胞工程的主要技术,是从事该领域工作的关键。就细胞工程技术范围而言,既包括长期以来得到广泛应用的动植物细胞与组织培养技术,又有近20年来才发展起来的细胞融合技术、细胞拆合技术、染色体导入技术、胚胎和细胞核移植技术和以基因转移技术为核心的细胞遗传工程。具体来讲,细胞工程的主要技术如下:

一、细胞与组织培养技术

细胞培养与组织培养(cell and tissue culture)都属于体外培养(in vitro culture),可分为三个层次的培养:细胞培养、组织培养和器官培养。细胞培养是进行细胞工程操作的基本技术和内容。尽管动物和植物细胞在结构上有所不同,但其细胞培养的基本技术和程序是相似的。首先是取材和消毒,除了淋巴细胞可直接抽提以外,动植物材料在取材后都要借助一定的化学试剂对材料进行表面清洗和消毒。其次是培养基的准备,结合培养材料的特点和目的准备相应的培养基,灭菌后备用。最后是将无菌的材料按需要接种到无菌的培养基上,并转移到培养室培养。

该技术最显著的价值在于能快速、大量繁殖一些有价值的苗林、花卉、药材和濒危植物等,并可以在培养无毒苗、长期贮存种子、细胞和原生质融合以及生产次生代谢产物方面发挥作用。动物细胞培养技术可生产许多有应用价值的细胞产品,如多种单克隆抗体、疫苗、酶、激素以及免疫调节因子等。其中单克隆抗体的生物反应器的大规模生产,已经在医药领域产生了极大的社会和经济效益。

二、细胞融合技术

细胞融合(cell fusion)又称细胞杂交(cell hybridization),是指在外力(诱导剂或促融剂)作

用下,两个或两个以上的异源(种、属间)细胞或原生质体融合形成一个细胞的过程。细胞融合是转移异源遗传物质、创造新种质或新材料的一种重要的细胞工程技术。它包括原生质体的制备、细胞融合、融合细胞的培养、杂种细胞的筛选、杂种细胞的分化与再生、再生植株的鉴定等过程。

细胞融合最大的贡献是在动植物、微生物新品种的培育方面。应用该技术能把亲缘关系较远,甚至毫无亲缘关系的生物体细胞融合在一起,为远源杂交架起了桥梁,是改造细胞遗传物质的有力手段;动物细胞融合后形成的杂交瘤主要用来获得单克隆抗体,被称为“生物导弹”,将为治疗癌症开辟一条新的途径;此外细胞融合技术为携带外源基因的载体(如携带抗病基因的载体 Ti 和 Ri)进入细胞创造了条件。

三、细胞拆合技术

细胞拆合技术(nuclear transplantation)也称为细胞核(包括细胞器)移植技术,是用某种方法如利用显微操作技术将细胞核和细胞质拆开或者把细胞核从细胞质中吸取出来,或用紫外线等把细胞中的核杀死,然后再把分离的同种或异种细胞核和细胞质重新组合起来,形成一个新细胞或新生物个体,赋予重建的细胞以某种新的功能。细胞拆合技术和细胞融合技术汇合,建立了细胞重组技术。细胞重组技术已成为一种十分重要的现代生物技术。

四、染色体工程

染色体工程(chromosome engineering)是指按照人们一定的设计,把单个的染色体或染色体组转入或移出受体细胞,从而形成新的染色体组合和遗传构成,达到定向改变遗传性和选育新品种的一种技术。该技术最大的价值是新品种的培育。主要分为植物染色体工程和动物染色体工程两种。植物染色体工程目前主要是利用传统的杂交回交等方法达到改变染色体的目的。动物染色体工程主要是通过对染色体应用显微操作技术达到转移基因的目的。

五、胚胎工程

胚胎工程(embryonic engineering)是以生殖细胞和胚胎细胞为对象进行的操作,主要技术包括体外受精、胚胎切割、胚胎移植等。胚胎移植技术是将一个生物体内的胚胎移植到另一个生物体内进行繁殖的技术,这样可能大量繁殖优良的品种。具体操作是先注射雌性激素在一雌性动物的体内,促使其大量排卵,然后在体外人工授精后发育成为胚胎后再植入其他同类动物的子宫内使其发育成为个体。这样一头优良的牛、马等动物一年可以产四五十头,大大提高了繁殖率,从而可以降低胚胎成本,扩大移植胚的来源,使农畜动物胚胎移植的推广应用成为可能。体外受精可以准确地确定受精的时间和胚胎发育阶段,因此,利用体外受精技术进行核移植、性别控制和基因导入,可望工业化生产遗传性稳定、生产性能优良的家畜,以加快农畜良种化。

六、细胞遗传工程

细胞遗传工程主要包括细胞克隆和转基因技术。生物繁殖后代通常是以精、卵细胞结合的有性生殖方式进行。通过营养体细胞繁殖个体的方法称为无性繁殖。克隆是指离体条

件下的无性繁殖。现在已经在畜牧业、珍稀动植物遗传资源保护与繁衍、医学等方面展示出诱人的前景。动物克隆技术主要是指核移植技术。简单地讲,将发育各个阶段(胚胎、胎儿、幼子、成年)的一个细胞,利用显微操作技术,移植到一个去掉了细胞核的成熟的卵母细胞中,在适当的条件下,重新形成一个胚胎,把这个胚胎移植到生殖周期相近的代理母体内,最终发育成一个正常的动物个体。转基因技术即将目标性状基因分离出来,构建重组 DNA 分子导入生物体,得到稳定表达,并能够遗传给后代的技术。目前已成为物种遗传改良的最有效途径。

七、干细胞与组织工程

干细胞(stem cell)是动物体内具有分化潜能,并能自我更新的细胞,分为胚胎干细胞和组织干细胞。胚胎干细胞来自囊胚期的细胞团,属于全能干细胞,每个细胞可以发育成为完整的个体。组织干细胞存在于成体组织中,属单能或多能干细胞,可以定向分化成一种或几种不同的组织。

组织工程是在干细胞的基础上发展起来的,将干细胞与材料科学相结合,将自体或异体的干细胞经体外扩增后种植在预先构建好的聚合物骨架上,在适宜的生长条件下干细胞沿聚合物骨架迁移、铺展、生长和分化,最终发育成具有特定形态及功能的工程组织。

如果能够消除体细胞的“记忆”,它们就有可能恢复到胚胎细胞的状态——科学家称之为把细胞“重编程”。把通过“重编程”得到的干细胞在不同的环境条件下进行培养,就能得到各种分化细胞。人们通常把这种利用体细胞制造胚胎干细胞,分化后再移植回人体的技术称作“治疗性克隆”。

第三节 细胞工程的发展历史

本节分别介绍植物细胞工程和动物细胞工程的发展历史。

一、植物细胞工程的发展简史

植物细胞工程的发展大致经历了三个阶段:探索阶段、培养技术建立阶段和应用研究阶段。

(一) 探索阶段(1902~1929)

在这一阶段中,细胞学说的产生和细胞全能性学说的提出为组织培养技术的产生奠定了理论基础。在这些理论的指导下所开展的有关试验,对组织培养技术的建立进行了有益的探索。

细胞工程的理论基础是细胞学说(cell theory)和细胞全能性学说。Schleiden 和 Schwann 分别于 1838 年和 1839 年提出的细胞学说,认为植物和动物都是由细胞构成的,细胞进行分裂而增多,形成生物体。随后, Schwann 在 1839 年更明确地指出:“如果具有与有机体内一样的条件时,每个细胞应该可以独立存活和发展”。这一论点已成为组织培养研究的思想基础。细胞全能性学说是德国著名植物学家 G. Haberlandt 在细胞学说的基础上于 1902 年提出了高等植物的器官

和组织可以不断分割,直至分到单个细胞的观点。他认为,如果每个细胞都有植物个体一样的性质和能力,那么可以通过植物细胞培养,把单个细胞培养成一个新个体。由此 G. Haberlandt 被誉为“植物组织培养之父”。在他思想的指导下,许多科学家从事组织培养研究。1904 年,德国植物胚胎学家 Hanning 用萝卜和辣根的胚进行离体培养,首次获得胚培养成功。1922 年,Knudson 对兰花幼胚进行培养获得幼苗,克服了兰花种子发芽难的困难。1922 年,Kotte 和 Robbins 对豌豆、玉米、棉花等的茎尖、根尖进行了离体培养。发现了培养的分生组织只能进行有限的生长。1925 年,Laibach 进行亚麻种间杂种幼胚培养,成功地得到了杂种植物。证明了胚培养在植物远源杂交中利用的可能性。

(二) 培养技术建立阶段(1930 ~ 1959)

建立一定的技术模式对于一门技术十分重要。在这一阶段,植物组织培养建立了两个与培养技术相关的重要模式,一是培养基模式,二是激素调控模式。

1934 年,White 等用番茄根尖的组织培养,建立了第一个活跃生长的无性繁殖系。1934 年,Gautheret 培养山毛柳、黑杨的形成层组织,获得愈伤组织形成。1937 年,White 和 Went 等分别发现 B 族维生素和吲哚乙酸(IAA)对培养的离体根生长具有重要作用。1937 ~ 1938 年,Gautheret 在 1934 年培养山毛柳、黑杨成功获得愈伤组织的基础上,在培养柳树的培养基中,加入 IAA 和 B 族维生素等,使形成层的生长大为增加。1937 ~ 1938 年,Nobecourt 培养胡萝卜根和马铃薯的块茎薄壁组织,获得愈伤组织。将愈伤组织置于琼脂培养基上继续培养,可无限发生细胞增殖,形成愈伤组织。首次从液泡化的薄壁细胞建立愈伤组织培养物。White、Gautheret、Nobecourt 等科学家被誉为植物组织培养的奠基人。在此基础上建立了植物组织培养的综合培养基,包括无机盐成分、有机成分和生长刺激因素。这是随后创立各种培养基的基础,同时也建立了植物组织培养的基本方法,成为当今各种植物组织培养的技术基础。

20 世纪 40 年代末开始,进行从脱分化细胞组织培养进入探讨器官再分化的研究。脱分化即离体培养条件下,一个已分化的细胞回复到原始无分化状态或分生组织细胞状态或胚性细胞的状态的过程就是细胞脱分化。再分化即脱分化后的分生细胞(愈伤组织)在特定的条件(离体培养)下,重新恢复细胞分化能力,并经历器官发生形成单极性的芽或根,或经历胚胎发生形成双极性的胚状体,进一步发育成完整生物体,这一过程称为细胞再分化。

1957 年,Skoog 和 Miller 提出了植物激素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的比率,可以控制器官的分化,即生长素和细胞分裂素高促进根的分化,低则促进茎和芽的分化。

1958 年,Steward 和 Reinert 以胡萝卜根的悬浮细胞诱导分化成完整的小植株,发现了体细胞胚,为细胞离体培养中研究形态发生机制开拓了新的领域。

(三) 应用研究阶段(1960 至今)

组织培养领域的研究迅速在世界各国的有关实验室广泛展开;技术体系日臻完善。这一阶段的技术体系包括根据不同的培养目的外植体的取材和灭菌方法,不同外植体及其培养产物的培养程序,适合于不同植物种类和外植体类型的培养基等,同时形成了较为完整的理论体系。在植物组织培养研究的基础上,植物细胞工程现已形成了以细胞全能性为基本理论基础,以细胞脱分化和再分化调控为中心的理论体系。研究目的性更加明确,并已广泛应用到生物科学研究的各个领域,以细胞工程为基础的新型生物技术产业正在兴起。