

林顺权 编著

植物细胞

工程

植物细胞工程

林顺权 编著

0942

出版社

林顺权 编著

植物细胞 工程

厦门大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

植物细胞工程/林顺权编著. —厦门:厦门大学出版社, 2000. 4
ISBN 7-5615-1599-5

I. 植… II. 林… III. 植物学-细胞学 IV. Q942

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 05195 号

厦门大学出版社出版发行

(地址:厦门大学 邮编:361005)

<http://www.xmupress.com>

xmup@public.xm.fj.cn

三明日报印刷厂印刷

(地址:三明市新市南路 166 号 邮编:365001)

2000 年 4 月第 1 版 2000 年 4 月第 1 次印刷

开本:787×1092 1/16 印张:9.5 插页:2

字数:242 千字 印数:1—2 200 册

定价:16.00 元

如有印装质量问题请与承印厂调换

前言

早在 1983—1984 年间,我就读硕士研究生、参加“果树组织培养”选修课的教学实习时,就萌生过编写一本讲义的念头。事情起因于修课的学生在对这门课表示浓厚兴趣的同时,强烈反映该课理论阐述不足,可以说实践性强,也可以说实验成功的或然性太大。由此,我想到要大量搜集有关资料,编写一本既有理论又有实践的讲义。真叫“初生牛犊不畏虎”!

我的同事和同学王天池、胡又厘和郑德森都十分支持我做这一件事。胡又厘帮助搜集了数以千计的文献题录;郑德森帮我选择并复印了不少资料;王天池则在精神上给予我极大的支持和鼓励。我至今还清楚地记得我俩在我的宿舍里讨论“细胞全能性”概念时,他为我的一个见解而欢呼雀跃的情形。这样的友谊对于学子来说,是多么宝贵的啊!

及至 1986 年,我已写成了一个共八章、十余万字的“离体培养生物学”讲义稿。寄请罗士韦先生审阅,罗老把稿子转给李文安先生,李先生阅后评价“对教学、科研人员有一定的参考价值”。

此后在我被国家教委派赴日本佐贺大学任普通访问学者期间,又搜集了一批资料,回国后对原讲义稿进行修改补充,改成了共有十九章的《植物离体培养》讲义稿。并用此稿为两届的本科生上了课。

90 年代上半期,我的导师陈振光教授担任统编教材《园艺植物离体培养学》的主编。我是编者之一,分担了若干章节的编写。这样既完成了该统编教材中本人所承担的任务,又使这些章节的内容成为本书稿相应内容的基础。这里包含着陈振光教授、山东农科院石荫坪先生以及本研究室同仁的支持和帮助。

1998 年福建农业大学设立了国家理科基地,招收生物技术本科生。1999 年初学校安排我承担《细胞工程》课的教学。接受任务后,我就开始落实教材,但找不到合适的教材。于是,着手把“植物离体培养”讲义稿改编为“植物细胞工程”。

此稿的完成得到了武汉大学生命科学院博士生导师周嫦教授的鼓励和支持,周教授还提出宝贵的修改意见。本校胡又厘副教授再次帮助查找了大量文献,并帮助整理绪论、第一、五、十三章的初稿。陈发兴和宋刚同志帮助录人和打印部分文稿。厦门大学出版社陈进才同志对本书稿进行了细致的编校。

最后,必须提及:福建省“百千万人才工程”人选培养基金和福建农业大学教材出版基金给予本书出版资助。

值本书付梓之际,向所有上述提及的以及无法在这里一一提及的、给予本书的成书和出版以各种帮助的诸位前辈和同仁表示衷心的感谢。

编著者

2000. 3. 20

目 录

前言

绪 论

- 一、植物细胞工程的含义和内容 (1)
- 二、植物细胞工程的发展历史 (2)
- 三、植物细胞工程的应用 (5)

第 1 篇 原理

- 第一章 细胞全能性 (11)
 - 第一节 培养细胞展现生命特征属性 (11)
 - 第二节 脱分化与再分化 (15)

第 2 篇 方法与技术

- 第二章 细胞工程基本技术 (29)
 - 第一节 外植体的选择与处理 (30)
 - 第二节 培养基及其配制 (31)
 - 第三节 无菌技术 (35)
 - 第四节 环境条件的控制 (37)
- 第三章 细胞培养方法 (40)
 - 第一节 悬浮培养 (40)
 - 第二节 固相化细胞培养 (44)
 - 第三节 单细胞培养 (47)
- 第四章 原生质体技术 (51)

第一节 原生质体游离	(51)
第二节 原生质体培养	(53)
第三节 原生质体融合	(54)
第五章 生殖细胞技术	(59)
第一节 花药与花粉培养	(62)
第二节 未授粉胚珠和子房培养及离体受精	(64)
第三节 杂种胚挽救	(69)
第四节 胚乳培养	(71)
第六章 细胞转化技术	(74)
第一节 直接转化	(75)
第二节 介导转化	(78)

第 3 篇 应 用

第七章 细胞培养生产有用物质	(85)
第一节 培养物的次级代谢	(85)
第二节 培养细胞的生长动态	(89)
第三节 利用培养细胞生产有用物质	(92)
第八章 离体快速繁殖	(97)
第一节 离体繁殖	(98)
第二节 人工种子	(102)
第三节 培育无病毒苗木	(105)
第九章 种质离体保存	(111)
第一节 常温限制生长保存	(111)
第二节 中低温调控生长保存	(112)
第三节 超低温长期保存	(113)
第十章 细胞工程育种	(117)
第一节 体细胞杂交	(117)
第二节 培养细胞变异系的利用	(120)
第三节 生殖细胞工程育种	(126)
第四节 遗传转化与作物改良	(134)
参考文献	(141)
附录 常用基本培养基配方	(146)

绪论

一、植物细胞工程的含义和内容

细胞工程(Cell Engineering),也称细胞技术(Cell Technique),是生物技术(Biotechnology)的主要内容之一,也有人称之为分支学科之一(另三个分支为基因工程、酶工程和发酵工程)。细胞工程的一般定义为:用细胞培养、细胞融合等细胞水平的遗传操作,改良品种、生产生物产品或组分的技术。

细胞工程依研究对象不同,分为植物细胞工程与动物细胞工程。植物细胞工程与动物细胞工程在研究内容及其深度上已有较大的差别,最重要的差别是细胞全能性的表现。早期提出的细胞全能性概念是指体细胞在合适的条件下,有胚胎发生能力。这个概念至20世纪70年代,已在植物细胞上完全得到证实和发展,即培养一个植物的活细胞可以得到胚状体以至得到完整植株。而动物细胞全能性的证实工作直至1997年才获得了阶段性的突破——把羊的乳腺细胞核移植到去核的卵细胞中,培养出成体羊——“多利”。植物细胞全能性的概念则在80年代之后又进一步演变发展了,植物细胞不但具有发育完整植株的潜能,而且具有在细胞水平上表达出合成该物种的药用成分等多方面的能力。概而言之,每一个植物活细胞都具有该物种的生命特征属性,在合适的离体培养条件下,这些特征属性均可以表现出来。

基于植物细胞全能性,植物细胞工程取得了较快发展,并且不同研究领域都有了一个共同的理论基础。即不管培养或操作的对象是胚胎、器官、组织或细胞,由于起决定性作用的是细胞的全能性,所以,所有的离体培养或操作的内容均归入植物细胞工程。也就是说,虽然有时培养的直接对象不是细胞,而是其他对象,例如器官或组织,但研究的目的是为了细胞全能性向操作者所需的方向表达。

这样,植物细胞工程的含义就超出了前述的细胞工程一般定义,植物细胞工程的内容比动物细胞工程丰富得多。

植物细胞工程(Plant Cell Engineering)目前尚无明确、统一的定义。在本书中,植物细胞工程的含义是指:通过细胞培养、融合等细胞水平的操作,或者通过基于细胞全能性的非细胞水平的离体培养或操作,以达到改良品种或生产生物产品目的的一种技术。

植物细胞工程包括的内容较广。依操作对象或技术内容分,包括:①细胞工程基本技术;②细胞培养方法;③原生质体技术;④生殖细胞技术;⑤细胞转化技术等。依研究或应

用目的又可分为:细胞育种、有用物质生产、快速繁殖、离体种质贮存等。

离体培养是植物细胞工程的基础技术。它是通过无菌操作,把植物细胞或其他类型的外植体(Explant),接种于人工配制的培养基上,给予人工控制的环境条件,使培养或操作对象表现生命活动。这样的离体培养,是植物细胞工程的基本操作。在此基础上,根据不同的应用目的,附加一些必要的操作技术,形成植物细胞工程的各种不同技术,例如,在培养之前,先去除细胞壁,获得原生质体,就可以开展原生质体技术研究;又如,对培养的细胞施加转化操作,就形成细胞转化技术。

二、植物细胞工程的发展历史

(一)植物细胞工程的理论渊源及其早期的尝试

植物细胞工程的理论渊源可以追溯至 19 世纪 30 年代德国的植物学家 Schleiden 和动物学家 Schwann 的“细胞概念”(Cell Concept),其主要观点:细胞是生物体的基本结构单位,由它构成整个生物个体;同时认为植物细胞又是在生理上、发育上具有潜在的全能性功能单位。Schwann 还指出:“每一个细胞应该可以独立生活和发展,假如具有的条件正如它存在于有机体内一样……”1858 年,德国的细胞病理学家 Virchow 提出“一切细胞来自细胞”的观点,并进一步提出细胞学说(Cell theory)。他认为“细胞是生命单位(Vital unit)”,他说:“每个动物是许多生命单位的总和,每个生命单位本身带有生命的全部特性。”

1902 年德国著名植物学家 Haberlandt 根据细胞学说,提出高等植物的器官和组织可以不断分割,直至单个细胞的观点,这种单个细胞是具有潜在的全能性功能单位。为了论证这个观点,他首次进行高等植物的细胞培养实验,利用野芝麻和紫鸭跖草等植物,分离出叶肉栅状组织、表皮、毛刺的细胞进行培养。在他所发表的“关于单离的植物细胞培养实验”论文中写道“我愿意指出:在我的培养实验中,虽然经常观察到细胞的明显生长,但从未观察到细胞分裂。发现单离细胞分裂的条件,将是未来培养试验的难题”。由于当时技术水平的限制,也因为采用的材料是培养难度较大的单子叶植物成熟细胞,细胞培养实验没有获得成功,此后多年,其他研究者继续进行类似的实验,同样未能取得成功。十分可贵的是,Haberlandt 当时预言:“在未来,人们可以成功地从营养细胞培养出人工胚。”

(二)植物组织培养技术的建立

植物组织培养最早是以胚为材料进行研究而获得成功的。Hanning 在 1904 年对萝卜和辣根菜胚进行培养,结果发现离体胚可以充分发育,并有提早萌发形成小苗的现象。美国的 Knudson 在 1922 年采用胚培养法获得兰花幼苗,克服了兰花种子发芽困难的问题。Laibach(1925)进行亚麻种间杂种幼胚培养也成功地获得杂种植株。20 年代中,器官培养仅取得有限的进展。1922 年 Haberlandt 的学生 Kotte 和美国的 Robbins 分别获得离体根尖培养的某些成功,能生长很长的一段时间,并进行继代培养。同年,Robbins 进行豌豆、玉米和棉花的茎尖培养,形成一些缺绿的叶和根。

植物组织培养基本技术体系的建立,始于 30 年代中期。1934 年美国的 White 等用番

茄根尖的组织培养,首次建立了活跃生长的无性繁殖系;同时用带有花叶病毒的烟草根离体培养,发现迅速生长的根尖病毒浓度很低,往根颈成熟区的根组织的病毒浓度逐渐升高。1937年,White又发现B族维生素和吡啶乙酸对离体根的生长有重要作用。1939年进行了烟草种间杂种(*Nicotiana glauca* $\times$ *N. Cotsdorffi*)幼茎切段的形成层组织培养,并成功地进行继代培养。法国的Gautheret(1934)报道了培养山毛榉、黑杨的形成层时,可以不断地增长几个月;随后1937—1938年在培养柳树的培养基中,加入IAA和维生素B等生长因素,结果使柳树形成层的生长大为增加。与此同时,法国的另一位学者Nobecourt(1937—1938)培养胡萝卜根和马铃薯的块茎薄壁组织,也使细胞增殖获得成功。由于White、Gautheret和Nobecourt等科学家杰出的工作,初步建立起植物离体培养的基本方法。

30年代末,很多研究者开始注意培养物的器官形态建成的调控。1938年著名的植物生理学家、生长素的发现者Went提出“器官形成的特殊物质”的假说,促使许多植物生理学家都致力于寻找这种对器官形成起控制作用的“特殊物质”。1941年Van Overbeek等在刺激曼陀罗没有受精的卵细胞发育试验时,发现椰乳可以促进曼陀罗胚的发育,使心形期幼胚离体培养至成熟。当时还不知道椰乳里含有细胞分裂素,但很快被许多美国的研究者用来促进器官发生的研究。1944年美国的Skoog用烟草愈伤组织研究器官发生,他观察到生长素对根有促进作用,同时对芽的形成有抑制作用,而这种抑制作用可部分地为有机磷酸盐和蔗糖所克服。1948年Skoog和崔微在烟草茎切段和髓的培养及其器官形成研究中,发现腺嘌呤或腺苷可以解除培养基中生长素(IAA)对芽的抑制作用,而诱导烟草茎段形成芽,从而确定了腺嘌呤/生长素的比例是控制芽和根形成的主要因素之一。1955年Miller和Skoog在鲑鱼精子的提取物中发现激动素,它的促芽效果比腺嘌呤增强约3万倍。1957年Skoog和他的同事又发现生长素与激动素不同配比对植物生长和分化的作用,即激动素/生长素的比例高形成芽,而比例低则形成根。从根本上否定了Went的“器官形成特殊物质学说”,建立起离体培养的器官分化激素配比模式。这一规律的发现,成为不同植物离体技术的统一基础。

(三) 细胞培养方法的建立

40年代末至50年代末,许多研究者对细胞培养技术方法上作了大量探索,取得了重要的进展。Muir(1953)最早报道细胞悬浮培养法。他将万寿菊和烟草的愈伤组织置于液体培养基中振荡培养,建立了细胞悬浮培养。同时,他还应用“看护培养”技术,使冠瘿瘤组织分离培养得到单细胞,并建立了单细胞培养系。还有De Ropp(1955)发明的“微室培养法”,Bergmann(1960年)建立的“琼脂平板培养法”。

1952年,在美国康乃尔大学工作的英国科学家Steward与他的同事共同设计一种培养装置auxophyton(细胞增殖器)。他们在胡萝卜组织培养过程中,观察到培养液常常出现混浊的现象,并查明是由于培养组织上散落的游离细胞和细胞团。1956年他发表了可以利用愈伤组织液体培养产生悬浮细胞,悬浮细胞可以继代培养的论文。1958年他们又报道,利用胡萝卜的次生韧皮部的悬浮培养物,在椰乳的培养基中观察到类似胚胎发生的结构(胚状体)。由胚状体先长根,后长芽,并形成完整植株,首次论证了植物细胞全能性。

(四) 原生质体技术的建立

1960年 Cocking 等人用真菌的纤维素酶,从番茄幼根分离原生质体,首次获得成功。1971年 Takebe 和 Nagata 用烟草叶肉细胞分离原生质体,并培养成完整植株。1972年 Carlson 等利用粉蓝烟草和郎氏烟草原生质体进行融合,获得了烟草体细胞杂种。1978年 Melchers 等,首次获得了番茄和马铃薯属间体细胞杂种——“Potamato”。此后,人们获得了数百种植物的原生质体再生植株和数十种体细胞杂种。原生质体也被用于细胞转化和种质贮存。

(五) 生殖细胞工程研究

早在 50 年代,人们就已开展了一些裸子植物的花粉培养研究,获得了愈伤组织。1964—1966 年 Guha 和 Maheshwari 首次从毛叶曼陀罗花药培养中,诱导未成熟花粉形成单倍体植株,从此开创了利用花药培育单倍体植物的新途径。1970 年 Kameya 和 Hinata 用悬滴法培养甘蓝×芥蓝的杂种一代成熟的花粉,获得单倍体再生植株。1973 年 Debergh 和 Nitch 培养番茄小孢子获得单倍体植株。至 1986 年,已有 200 多种植物的花药或花粉培养获得再生植株(Dunwell, 1986)。1976 年, San Noeum 培养普通小麦的未授粉子房,获得了雌性单倍体植株。我国武汉大学的杨弘远和周嫦在生殖细胞工程上作出了创造性的贡献。他(她)们首次揭示了未传粉子房与胚珠培养诱导的水稻助细胞无配子生殖和向日葵卵细胞孤雌生殖现象;用酶法由金鱼草、向日葵、烟草的胚珠中分离出完整的生活胚囊并进行了多方面的研究。在孤雄生殖方面,研究了水稻花药培养时影响花粉两条发育途径(配子体途径、孢子体途径)的因素,探讨了花粉孢子体发育不同阶段对培养条件的要求;研究了由众多植物花粉中分离生活精子的技术及其保存条件;成功地进行了精卵离体融合。有力地推动了植物生殖细胞工程研究的进展。

1973 年, Johri 等首先从一种檀香科植物柏形外果的胚乳培养中,看到器官发生。1973 年, Srivastava 等从罗氏核木胚乳培养获得了三倍体植株。

(六) 生物技术中的细胞工程

70 年代前期,重组 DNA 技术诞生了,生物技术(也称生物工程)受到了全世界科学家的瞩目。以此为契机,引发了一次生物学领域内的学科大调整,许多以生物为材料、类似工程技术的研究领域(例如发酵技术)都被列属于生物工程学科之下。细胞工程作为生物工程的一个分支学科,包括细胞培养和细胞融合等。

于此同时,植物组织培养本身仍继续取得发展。人们认识到胚胎发生不再是受精后发生在胚珠内的特发事件。正如 Reinert(1978)所提出:“胚状体发生的能力是植物体细胞的一个基本特性”。Raghavan 也指出:“任何活细胞(不管是单倍体、二倍体或三倍体)潜在地产生一个胚状体”。胚状体理论对植物组织培养的发展具有重要意义。数不清的植物种类的各种外植体,包括胚胎、器官、组织、细胞和原生质体的培养都取得了成功。一些作者把“植物组织培养”改称为“植物离体培养”,并把它看作植物生物技术的两大基础技术(学科)之一(另一为分子生物学技术)。

80年代后期开始,一些作者把植物离体培养(或组织培养)整个领域归列于植物细胞工程。现在看来这样做是合适的,因为植物离体培养成功的基础是细胞全能性,细胞是植物的基本单位,离体培养发挥效能归根结底离不开细胞的生命活动。把离体培养归入细胞工程的另一个好处是使生物技术的学科体系更完整,可以使植物细胞转化和基因转移更好地联系起来。

细胞转化最早是以土壤农杆菌中的 Ti 质粒为载体的。90年代起国际上开发出其他种类的载体,如利用病毒、脂质体构建载体。对导入基因的方法,还研究 DNA 直接导入法,如 PEG(聚乙二醇)法,电击穿孔法(Electroporation)和基因枪法(Particle gun bombardment 或 microprojectile bombardment,微弹射击法),或直接 DNA 注射,包括花粉管转基因法等。

植物细胞的全能性为植物基因转化提供方便,在高等植物中已有许多植物获得成功。1987年德国人将玉米色素合成中的一个还原酶基因导入矮牵牛,产生一种砖红色的矮牵牛。1988年美国科学家运用反义基因延缓果实的成熟,达到果实保鲜的目的。美国批准的第一批转基因植物可以大量生产,就是通过转基因工程培育的保鲜番茄新品种。我国也已获得耐贮藏的番茄。

总之,细胞工程不仅已发展成为生物技术中的一个重要组成部分,而且是植物基因工程的重要基础。

三、植物细胞工程的应用

(一)细胞培养生产有用物质

细胞培养与药学和工艺学的结合打开了次级代谢产物的宝库。大规模的细胞发酵罐的培养、生产药物、食品、调料、香精和颜料等日用化工产品,成为生物技术的一个重要组成部分,并正在日益发展成为新兴的产业。

应用细胞培养生产次生物质,或其他有用物质的植物种类已超过 100 种,经鉴定有用物质成分达 300 多种,主要是药物、色素、食品添加剂、酶、农药等。这些物质的经济价值高,如具有特殊用途的一些名贵挥发油,价格高达 6 000 美元/kg。据报道,已进行工业化生产的植物次生物质有:烟草细胞培养生产的泛酸-10 和磷酸二酯酶,人参生产的人参皂苷,黄连生产的小檗碱,紫草生产的紫草宁;已进入中试阶段的有:长春花生产的抗癌生物碱(如蛇根碱、阿玛辛),以及其他维生素 E 类似物,莨菪碱、咖啡树细胞培养生产的咖啡因和银胶菊生产橡胶等等。

与栽培植物相比,利用植物细胞培养生产有用物质有以下优点:1. 离体培养细胞在人工控制的环境条件下进行,因而不受地理、气候以及包括病虫害在内的各种环境变化的影响。而栽培植物则不同,如生产皂苷的人参,在中国只有东北一带才能栽培,而且还要受季节的影响,不能在一年四季内都可以提供产品。有些植物是在高山或边远地区生长,在那里往往交通不便,产品远销都很困难。此外,栽培植物遭病虫害,用化保控制又可能有降低产品质量、增加生产费用等弊端。2. 减少占用大量土地以及栽培植物的管理。3. 细胞生长可以自动化控制,代谢过程可以进行合理的调节,提高生产效率,并可得到稳定的产品

质量。4. 细胞培养的生产系统较规范化,可根据市场供销情况有计划地调控。

(二) 良种繁育

许多园艺植物和木薯、甘蔗等经济作物是采用无性繁殖的,藉以保持其优良性状的遗传稳定性和一致性。但传统的无性繁殖方法繁殖系数较低、速度慢,不能适应现代化生产要求。而离体培养繁殖的技术特点是繁殖系数大,周年生产,繁殖速度快,苗木整齐一致。例如,兰花离体繁殖,一个外植体一年可繁殖 400 万个原球茎;草莓的一个顶芽一年可繁殖 10^8 个芽。因此,细胞工程技术已成为上述作物良种繁育的一种有力手段,并带来很好的经济效益。

发达国家中已成立不少快速繁殖的专业公司,如荷兰是世界花卉生产出口国,也是试管苗的生产王国,年出口花卉苗 4 000 万株。意大利主要生产桃、柑桔等果树砧木苗,年产量约 1 000 多万株。据估计,目前全球年产试管苗超过 6 亿株。此外,人工种子的研制,在欧洲尤里卡计划中成为生物技术研究的重点项目。德国、法国、瑞士的大公司正在联合研制开发蔬菜人工种子和胚芽生产。匈牙利研制的马铃薯人工种子,欧共体研制的非洲海枣人工种子,已进行大规模田间试验。苜蓿、芹菜、番茄、胡萝卜和绿胡椒已实现胚芽生产,现正在扩大到大田作物上的应用研究。

一些植物的病毒病相当严重,给生产造成极大损失。利用微茎尖培养可以脱除病毒,因而离体培养成为培育无病毒木的主要途径。迄今已在草莓、马铃薯和柑橘等多种植物上取得成功,获得无病毒苗。我国先后在内蒙古、黑龙江和河北等地建立无病毒马铃薯原种场,为全国各地提供无病毒种薯,平均可增产 30% 以上,经济效益十分明显。优质草莓脱毒苗已向全国各省市推广,在草莓生产上发挥了重要作用。

(三) 离体种质保存

植物种质资源保存是世界性重要课题。若采用常规方法,建立田间种质资源保存圃,占用大量土地,且耗费大量人力物力。利用离体培养保存方法可以克服上述缺点,并方便种质资源交换,避免病虫害的人为传播。目前,不但可以在常温条件下,通过抑制培养物的生长来达到离体保存种质的目的,而且可以通过温度的控制(低温或超低温),中期或长期保存培养的种质,并能在需要时较快恢复生长。

(四) 细胞工程育种

应用细胞工程技术,在细胞水平上进行突变体筛选,有可能大大提高选育种效果。通常在离体培养中,可以发现各种各样的变异,如植株形态、高矮,花、叶的颜色和形态变异,以及果实形态特征特性的差异等等。在愈伤组织培养中最常见到染色体畸变,而且是可遗传的变异较多。因此离体培养诱变育种潜力很大。

生殖细胞工程中,杂种胚挽救及试管受精技术对于克服远缘杂交育种障碍有重要意义。如在兰花育种中,离体胚培养取得显著效果,对于败育胚的育种也有很大的潜在利用价值。胚乳培养三倍体是无籽果实育种的新途径之一。花粉单倍体育种可以提高杂交育种效率,这已在小麦、水稻等作物上得到应用。

利用原生质体融合技术,可以把不同品种或种属之间的体细胞融合为一体,获得体细胞杂种,克服植物有性杂交和远缘杂交的不亲和性。由于原生质体还是不同遗传信息的良好受体,把细胞工程与分子生物学方法结合起来,可以在细胞水平上进行遗传修饰,重组DNA,改良植物品种。

(五) 细胞工程在植物学基础研究上的应用

细胞工程是多学科,如植物学、细胞生物学、生物化学、植物生理学、植物病毒学以及微生物学等等,相互渗透的产物。另一方面,它又反过来为植物学的基础研究提供有力的手段。应用细胞工程技术,在人工控制的环境条件下,可以进一步深入地研究植物细胞的生长与分化、组织分化和器官形态建成,包括根、茎、叶、花、果的发育等植物发育生物学的问题;可以研究细胞与细胞之间的生理代谢活动与生物合成;还可以研究细胞生物学上的诸多问题。

第 **1** 篇

原
理

第一章

细胞全能性

第一节 培养细胞展现生命特征属性

细胞全能性是植物细胞工程学的核心概念。但目前对这个概念的定义却因作者不同而异,而且往往有相当大的差异。本节在简要回顾细胞全能性概念发展之后,根据植物细胞工程的发展现状,对细胞全能性作进一步的讨论。

一、细胞全能性概念的发展

细胞全能性概念同其他许多科学概念的形成一样,经历了一个不断发展、不断完善的过程。

根据 Krikorian 等(1969;1982)的考证,是 Schwann 首先提出了细胞具有独立发育潜能的见解,而第一个使用细胞全能性(totipotency)一词的人可能是 Morgan(1901)。1902年 Haberlandt 作出了著名的预言——在未来,人们可以成功地从体细胞培养出人工胚。1934年,White 首次给细胞全能性下定义:每个植物活细胞在合适的培养条件下,都有发育为胚的能力。1958年,Steward 等和 Reinert 等分别从胡萝卜培养细胞中获得了人工胚,首次证实了 White 所提出的细胞全能性假说;而且两组科学家均使人工胚进一步形成完整植株。接着,Guha 等(1964;1966)先后获得了曼陀罗的花粉胚和单倍体植株;Vasil 等(1965)首先观察到培养的烟草单细胞再生植株;Backs-Hüsemann 等(1970)出版了一组照片,确凿无误地显示了单个胡萝卜细胞发育为胚,进而形成完整植株的过程。继后,从胚乳三倍体组织(寄生植物罗氏核实木胚乳, Srivastava, 1973;种子植物黑种草, Sethi 等, 1976)也都获得了胚状体。而且,众多植物种类的离体培养均获得了胚状体。Reinert (1978)概括指出:胚状体发生的能力是植物体细胞的一个基本特征。Raghavan(1978)也指出:任何植物活细胞(不管是二倍、单倍、还是三倍的)潜在地产生一个胚状体。至此,White 所定义的细胞全能性得到了普遍的证实和承认。而且,必须指出,实践的发展到那时实际上已经突破了 White 对细胞全能性的定义范围。如上所述,植物活细胞不但能形成胚状体,而且能发育为完整植株。与此同时,由于分子生物学的崛起以及随之而来的它对生物学各分支学科的辐射和渗透,使得植物学界能给细胞全能性提出新的定义。例如:全能性意味着