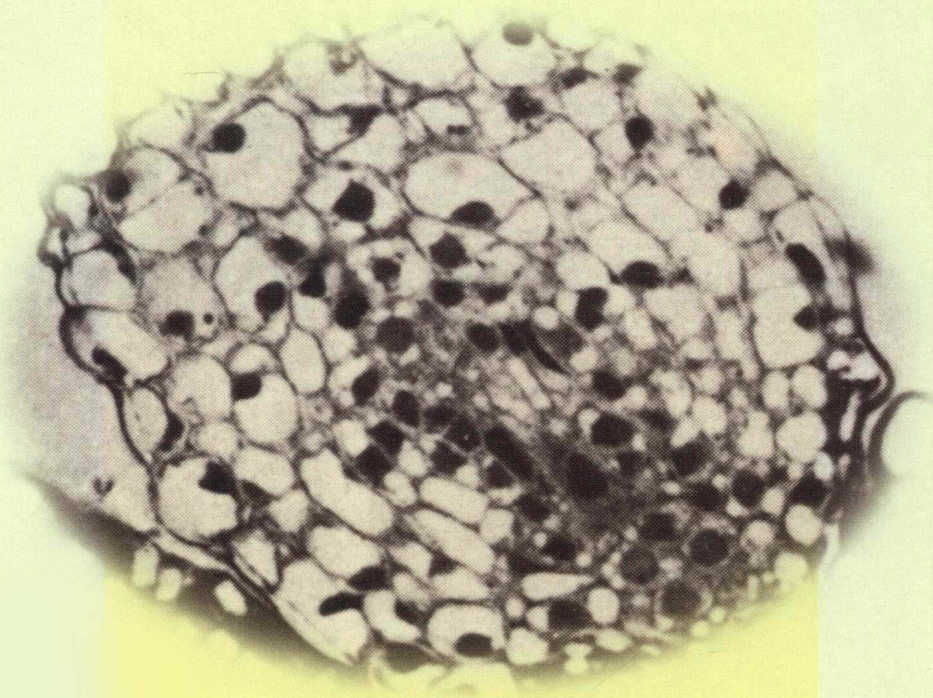


高等院校教材

植物细胞工程简明教程

刘进平 编著



中国农业出版社

➤ 高等院校教材

植物细胞工程简明教程

刘进平 编著

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

植物细胞工程简明教程 / 刘进平编著. —北京: 中国农业出版社, 2005. 2

高等院校教材

ISBN 7-109-09597-5

I. 植... II. 刘... 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 (2005) 第 002304 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 傅玉祥

责任编辑 李国忠

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2005 年 2 月第 1 版 2005 年 2 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×960mm 1/16 印张: 15.25

字数: 270 千字

定价: 20.80 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

内 容 简 介

本书包括植物组织培养、植物组织培养与抗病突变体筛选、植物细胞培养和次生代谢物生产、植物原生质体培养与融合、单倍体植株的诱导和利用、人工种子的研制。本书可作为综合性高等院校的生命科学学院及高等农林院校的本专科生、硕士生的教材，也可作为植物生物技术方面科教人员的参考书。

前 言

植物细胞工程是植物生物技术的基础，在许多综合性大学的生命科学学院及农林院校都作为一门重要的专业课或专业基础课程开设。在笔者多年的教学和科研工作中，一直希望有一本图文并茂、论述视角独到的教材，既适用于初学者的学习和实践，又能反映植物细胞工程的几个主要领域的最新研究进展，给研究者提供有益的参考。因此，笔者在参阅大量的国内外专著和教材的基础上，编成这本教程。植物细胞工程是一门技术性学科，本书尽可能做到图文并茂，使读者（尤其是初学者）能够直观地、感性地、快速理解技术要领。另外，本书文字叙述尽可能简明扼要，并注重将实际操作和原理理解两方面有机结合。

本书绪论，论述植物细胞工程的实质、研究目的、范围及与其他学科的关系。第一章植物组织培养，介绍植物组织培养的概念、特征、分类、用途、发展史、理论基础、培养基及其选择与配制、植物材料的采集和表面消毒、无菌操作技术、各类外植体的培养和再生途径、培养过程中出现的问题及解决、炼苗与移栽、植物组织培养的应用等。第二章植物组织培养与抗病突变体筛选，介绍体细胞无性系变异、体细胞无性系变异在抗病育种中的应用、离体选择在抗病育种中的应用、利用体细胞无性系变异和离体选择获得的抗病性的遗传基础、诱变结合植物组织培养在育种中的应用。第三章植物细胞培养和次生代谢物生产，介绍小规模植物细胞培养、单细胞培养技术、植物大规模细胞培养与次生代谢物生产。第四章植物原生质体培养与融合，介绍原生质体培养的概念、意义、研究进展、原生质体的制备、原生质体的培养和原生质体的融合。第五章单倍体植株的诱导和利用，介绍单倍体植株的产生和应用、花药培养技术、花粉或游离小孢子培养、再生植株的倍性鉴定与染色体人工加倍。第六章人工种子的研制，介绍人工种子的概念及人工种子生产的意义、程序和技术。

本书可作为综合性高等院校的生命科学学院及高等农林院校的本专科生、硕士生的教材，也可作为植物生物技术方面科教人员的参考书。

刘进平

2005年1月

目 录

前言

绪论	1
第一章 植物组织培养	3
第一节 概论	3
一、植物组织培养的概念和特征	3
二、植物组织培养的分类	3
三、植物组织培养的用途	4
四、植物组织培养发展简史	4
第二节 植物组织培养的理论基础	6
一、植物细胞全能性	6
二、植株再生途径	6
三、愈伤组织培养	7
四、器官发生	10
五、体细胞胚胎发生	11
第三节 植物组织培养基成分、选择与配制	14
一、培养基成分	14
二、培养基的种类与选择	18
三、培养基的配制	20
第四节 植物材料的采集和表面消毒	24
一、植物材料的采集	24
二、植物材料的消毒	25
第五节 无菌操作技术	28
第六节 各类外植体的培养和再生途径	29
一、芽类外植体	29
二、叶类、茎类和根类外植体	40
三、胚类和种子类外植体	42
四、花类外植体	49

五、愈伤组织、细胞和原生质体	52
第七节 培养过程中出现的问题及其解决办法	52
一、接种方式与生长观察	52
二、外植体褐变	52
三、玻璃化苗现象	53
第八节 炼苗与移栽	53
一、试管苗与大田苗的差异	53
二、炼苗方法	54
三、移栽	55
第九节 植物组织培养的应用	56
一、微繁殖	56
二、植物组织培养生产脱病毒植株	57
三、体外种质资源保存	59
四、植物遗传转化中基因受体的选择	61
主要参考文献	63
第二章 植物组织培养与抗病突变体筛选	65
第一节 体细胞无性系变异	65
一、体细胞无性系变异产生的来源和机理	65
二、体细胞无性系变异的类型	68
三、体细胞无性系变异的检测	69
第二节 体细胞无性系变异在抗病育种中的应用	71
一、体细胞无性系变异抗病育种的成就	71
二、利用体细胞无性系变异进行抗病育种的方法	74
三、体细胞无性系变异抗病育种的优缺点	75
第三节 离体选择在抗病育种中的应用	76
一、抗病离体选择研究概况	76
二、抗病离体选择方法	80
三、离体选择的优缺点	85
第四节 利用体细胞无性系变异和离体选择获得的抗病性的遗传基础	86
第五节 诱变结合植物组织培养在育种中的应用	87
一、诱变概念及诱变育种的成就	87
二、诱变与植物组织培养结合的方式	88
三、诱变与植物组织培养结合的优缺点	91
主要参考文献	93

第三章 植物细胞培养和次生代谢物生产	94
第一节 植物小规模细胞培养	94
一、单细胞的分离	94
二、小规模悬浮细胞培养	96
三、培养细胞的同步化	98
四、悬浮培养细胞生长的测定	99
五、培养细胞的生活力测定	101
第二节 单细胞培养技术	101
一、平板培养	101
二、液体浅层培养	103
三、看护培养	103
四、微室培养	104
第三节 植物大规模细胞培养与次生代谢物生产	105
一、利用植物大规模细胞培养生产次生代谢物质的意义和优势	105
二、植物大规模细胞培养生产次生代谢物质的种类和现状	107
三、植物大规模细胞培养生产次生代谢物质的方法及其影响因素	110
四、培养系统（生物反应器）及培养方法	125
主要参考文献	138
第四章 植物原生质体培养与融合	140
第一节 植物原生质体培养概论	140
一、植物原生质体培养的概念	140
二、植物原生质体培养的意义	140
三、植物原生质体培养的历史与进展	143
第二节 原生质体的制备	144
一、原生质体的分离	145
二、原生质体的洗涤和纯化	149
三、分离原生质体的特征	151
四、原生质体的活力测定	153
五、原生质体数目测定	154
第三节 原生质体的培养	155
一、原生质体培养方法	157
二、原生质体培养基	163
三、烟草叶肉原生质体的分离和培养举例	167
四、原生质体植株再生及其影响因素	170

第四节 原生质体的融合	175
一、原生质体融合和体细胞杂交的概念	175
二、植物体细胞杂交的重要性和局限性	176
三、植物体细胞杂交的历史与现状	179
四、原生质体融合方法	180
五、融合体的形成和发育	188
六、杂种细胞的选择	192
七、体细胞杂种植株的再生及鉴别	195
主要参考文献	198
第五章 单倍体植株的诱导和利用	200
第一节 单倍植株的产生和应用	200
第二节 花药培养技术	201
一、材料选取	202
二、预处理	208
三、外植体表面消毒和接种	209
四、体外培养和植株再生	211
五、水稻花药培养举例	219
第三节 花粉或游离小孢子培养	220
一、材料预处理及表面消毒	221
二、花药预培养	221
三、花粉的分离	222
四、培养方法	223
第四节 再生植株的倍性鉴定与染色体人工加倍	223
主要参考文献	225
第六章 人工种子的研制	226
第一节 人工种子概述	226
一、人工种子的概念及发展	226
二、人工种子研制的意义	227
第二节 人工种子生产的程序和技术	228
一、人工种子生产的程序和技术	228
二、问题与展望	233
主要参考文献	233

绪 论

植物细胞工程是指在细胞水平上对植物进行操作的技术，实质即植物组织培养（plant tissue culture）或体外培养（*in vitro* culture）及这些技术的应用。我国《学科分类与代码》国家标准采用“细胞工程”（180.7120）及国家自然科学基金委员会采用“细胞工程”（C010904）来涵盖生物技术和细胞培养的范畴。但国外很少使用 cytoengineering、cell engineering、plant cytoengineering 及 plant cell engineering 这样的名词或称谓。

植物细胞工程的主要研究任务和范围为：①研究包括器官、组织、细胞和原生质体在内的各种类型植物外植体的体外培养技术，如适合形态建成和植株再生的培养基、培养条件等；②研究适合的体外培养系统和相关设备，如适合植物细胞大规模培养的生物反应器等；③研究体外培养物（如培养细胞或试管苗）的各种生理学、生物化学和遗传学现象及规律；④对植物细胞、组织和器官进行操作，并以此进行微繁殖生产良种苗木、大规模细胞培养生产次生代谢物质、植物品种改良（如花药和花粉培养产生单倍体、胚乳培养产生三倍体、胚培养挽救杂种胚、原生质体培养进行体细胞杂交以及突变体筛选、遗传操作、体外种质保存、人工种子研制等）；⑤理论研究等。

在植物细胞工程的发展过程中，体外培养的相关技术与生物学科的诸多领域相互促进。一方面组织培养技术应用于植物学、细胞学、植物生理学、生物化学、病理学、（比较）胚胎学、遗传学、分子生物学等学科的研究，体外培养体系（尤其是细胞和原生质体培养体系）具有在植株水平上无可比拟的优势，这为解决这些学科中的有关理论问题（如营养代谢和物质代谢、生物合成、微生物与植物细胞的相互作用、激素在细胞分化和器官形态建成中的作用、雄核发育、胚胎发生、基因表达等）做出了不可替代的贡献；另一方面，这些学科也对植物细胞工程的发展提供了理论背景，开拓了新的应用方向，如植物组织培养中激素作用、器官发生和体细胞胚胎发生等的细胞、组织和分子机理等的研究需要多学科、多领域的理论和研究手段。作为植物生物技术的重要基础和分支，植物细胞工程通过对器官、组织、细胞和原生质体的操作，在工农业生产中发挥着越来越重

要的作用，有着广阔的应用前景。微繁殖工厂化育苗，大规模细胞培养工业化生产医药、农业生化物质、工业产品等重要的次生代谢物，以体外培养体系为基础的遗传资源保存和创新等，将为人类生产、生活做出越来越重要的贡献。

第一章 植物组织培养

第一节 概 论

一、植物组织培养的概念和特征

广义的植物组织培养 (plant tissue culture) 包括多种体外培养 (*in vitro* culture) 技术, 即在无菌条件下, 在营养培养基上对离体的植物器官、组织、细胞和原生质体进行, 甚至对完整植株进行培养。

植物组织培养的主要特征是: ①一般在玻璃培养器皿 (试管、培养皿、三角烧瓶等) 中进行; ②培养环境排除了微生物 (如病毒、细菌和真菌) 以及植物害虫 (如昆虫和线虫) 侵入的可能, 保持无病、无菌、无虫害的生长条件; ③各种环境条件 (如营养因子、激素因子) 以及光照、温度等物理因子处于人工控制之下, 并可达到最适水平; ④通常打破了正常的植物发育路线和格局; ⑤随着单细胞和原生质体培养技术的发展, 对植物体显微结构进行操作成为可能, 并为遗传操作奠定了重要基础。

二、植物组织培养的分类

植物组织培养可根据所采用的培养基、培养材料、培养方法和培养目标的不同, 采用不同的分类方法。例如, 根据培养基固化程度的不同, 可分为固体培养 (一般采用琼脂固化培养基)、半液半固体培养和液体培养。液体培养又可按培养方法分为振荡培养、旋转培养和静置培养等。如果在液体培养基中放入滤纸作为培养物的支持物, 则可称之为纸桥培养。根据培养材料不同, 可分为: ①完整植株培养; ②胚胎培养 (embryo culture); ③器官培养 (organ culture), 包括花序、花 (子房、胚珠及胎座组织、雌蕊、雄蕊、花萼和花冠)、根 (尖)、茎 (尖)、叶、果实、种子及其切段或原基等的培养; ④组织培养, 包括 (茎尖) 分生组织、薄壁组织、输导组织、胚乳组织等的培养, 以及对由各种外植诱导所形成的愈伤组织的培养, 愈伤组织培养 (tissue culture) 也称狭义的组织培养; ⑤细胞培养 (cell culture), 包括从

活体组织上分离的分散性较好的细胞（包括花粉小孢子）或微细胞团的培养；⑥原生质培养（protoplast culture）和体细胞杂交（somatic hybridization），包括对去掉细胞壁的细胞原生质体培养及杂种细胞原生质体的培养。在单细胞或原生质体培养中，可以采用看护培养、平板培养和微室培养等多种方法。

三、植物组织培养的用途

植物组织培养的用途可分为四大类。第一类是利用植物组织培养技术可以对植物体进行体外无性快速繁殖。第二类是大规模细胞培养可以用来生产次生代谢物质，如医药、香料等植物化学成分。第三类是用于育种，如花药、花粉培养产生单倍体；胚乳培养产生三倍体；胚培养挽救杂种胚；原生质体培养进行体细胞杂交；各种植物组织培养用于突变体筛选和遗传操作、体外种质保存等。第四类是用于理论研究，如植物组织培养用于植物生理学、病理学、（比较）胚胎学、细胞与分子生物学等的研究。

四、植物组织培养发展简史

植物组织培养的发展可追溯到 19 世纪。Schwann 和 Schleiden（1839）提出细胞学说（cell theory）及细胞全能性理论（totipotency theory）。细胞全能性理论认为，每个细胞都是一个自主的基本的有机体，原则上具备再生完整植株的能力。细胞全能性理论成为植物细胞组织培养的理论基础。1902 年德国植物生理学家 Haberlandt 第一次尝试采用植物组织培养技术对小野芝麻和凤眼蓝的叶肉组织以及万年青属植物的表皮细胞等进行培养，但未能诱导细胞分裂。1904 年 Hannig 首次在培养基上对十字花科的萝卜和辣根菜的胚培养获得成功。Laibach 于 1925 年利用胚培养技术对亚麻的种间杂种胚进行了培养，并于 1929 年利用亚麻胚培养来克服杂交不亲和性。1933 年中国生理学家李继侗培养银杏胚胎，并发现银杏胚乳提取液可促进离体胚的生长。这一发现启发后来的工作者在培养基中加入胚乳汁液、幼嫩种子或果实提取液，促进外植体的生长和分化。1934 年 White 对番茄的离体根培养获得成功。White 于 1937 年发现 B 族维生素对离体根培养的重要性，并指出生长素 IAA（吲哚乙酸）对植物生长发育的控制有着重要作用。1941 年 Van Overbeek 利用椰子汁（内含一种细胞分

裂因子)对曼陀罗的幼胚进行了培养,并达到成熟。1948年Skoog和Tsui通过对烟草茎段和髓组织培养发现,不定芽和不定根的发生由生长素/腺嘌呤的比例决定。1952年Morel和Martin通过分生组织培养获得大丽花的脱病毒植株;同年,他们首次应用微型嫁接技术。1953年Tulecke首次从花粉培养中获得银杏的单倍体愈伤组织。1955年Miller等发现了一种促进细胞分裂的植物激素——激动素,后来发现激动素可用来代替腺嘌呤促进芽的形成,而且其效力比后者高3万倍。1956年Tulecke和Nickell利用复升悬浮系统(multi-litre suspension system)从培养物中生产次生代谢产物。1957年Skoog和Miller发现改变细胞分裂素/生长素的比例可以控制根和芽的发生。1958年Reinert和Steward分别从胡萝卜愈伤组织和细胞培养中获得原胚,为组织培养经器官发生和体细胞胚胎发生途径再生奠定了基础,也为植物细胞全能性理论提供了证据。1960年Kanta首次成功地对虞美人进行试管授精。同年,Cocking利用真菌的纤维素酶酶解植物细胞壁,获得大量原生质体;Morel对兰花利用茎尖培养进行营养繁殖;Bergmann对细胞悬浮液进行过滤,并利用植板法培养单个细胞。1962年Murashige和Skoog提出最著名的Murashige和Skoog培养基(MS基本培养基),成为后来广泛采用的基本培养基。1964年印度人Guha和Maheshwari利用曼陀罗花粉培养获得第一例单倍体植株,从而开辟了以花药培养为基础的单倍体育种技术。Power等于1970年首次实现原生质体的融合。1971年Takebe等获得第一例原生质体培养的再生植株。1972年Carlson等利用原生质体融合在烟草属中进行种间杂交。之后,以植物组织培养技术为基础的遗传转化、突变体的体外选择、原生质体培养和体细胞杂交、种质保存等广泛开展起来。

目前,植物组织培养技术作为植物生物技术的一个重要组成部分,已成为许多其他技术的基础,如脱病毒植株的培育、植物次生代谢物生产、遗传转化等;以植物组织培养技术为基础的微繁殖已创造出巨大的经济、社会和生态效益。但是,仍然有许多植物,主要是一些木本植物和低等植物(如藻类、苔藓、蕨类和裸子植物)的组织培养技术仍不成熟,能够进行原生质体培养和体细胞杂交的植物种类还很有限,真正实现大规模细胞培养工业化生产次生代谢物的植物为数不多。未来,为提高农作物的产量和品质以及保护生物多样性,以植物组织培养技术为基础的遗传资源的保存和创新;为人类的健康、保护生态环境及可持续发展,以细胞培养为基础的医药和农业生化物质等植物次生代谢物的生产等,仍然是植物生物技术的重要研究领域。

第二节 植物组织培养的理论基础

一、植物细胞全能性

植物细胞全能性 (plant cellular totipotency) 是指植物体的每个生活细胞都具有该植物体的全部遗传信息, 在特定的离体培养条件下, 具有发育成完整植株的潜在能力。显然, 那些高度特化的组织和细胞, 几乎不可能再分裂以进一步表达其遗传潜力, 因而也不能表现细胞全能性, 如细胞核已经开始崩解、细胞壁增厚超过 $2\text{ }\mu\text{m}$ (成熟管胞的细胞壁有 $7\text{ }\mu\text{m}$ 厚) 的筛管和木质部成分。

细胞分化 (differentiation) 是指个体发育过程中, 不同部位的细胞的形态结构和生理功能发生改变, 形成不同的组织和器官。一般而言, 分化是一个不可逆转的过程。但是植物细胞即使高度成熟和分化, 只要它们有一个完整的膜系统和一个生活的核, 它们就具有向分生状态逆转的能力。在一个完整植株上, 不同部位上的体细胞, 由于特化程度不同而向分生状态逆转的程度和能力也不同, 特化程度越高, 向分生状态逆转的能力就越弱。

分化细胞在特定条件下 (如体外培养中), 从成熟和静止细胞恢复分裂活性, 向分生状态逆转和形成脱分化的愈伤组织过程, 称为脱分化 (dedifferentiation)。对于一个已分化的细胞, 表达其全能性的过程通常是首先经历脱分化, 然后再经历一个再分化的过程。再分化 (redifferentiation) 是指脱分化的细胞或组织在特定的条件下, 转变成各种不同的细胞类型的过程。一个分化的细胞也可以不经愈伤组织化阶段而直接发生再分化。

二、植株再生途径

培养物形态发生 (morphogenesis) 或植株再生途径有器官发生 (organogenesis, organ formation) 和体细胞胚胎发生 (somatic embryogenesis) 两种。

器官发生是指在自然生长或离体培养条件下形成根、芽、茎、枝条、花等器官的过程, 分直接器官发生和间接器官发生两种。直接器官发生是指直接从腋芽、茎尖、茎段、原球茎、鳞茎、叶柄、叶片等外植体上进行的器官发生。间接器官发生则先经历一个脱分化形成愈伤组织, 然后诱导再分化才能进行器官发生。

体细胞胚胎发生是指在离体培养条件下, 单倍体细胞或双倍体细胞 (未经

性细胞融合)诱导形成类似合子胚结构的体细胞胚胎,并进一步发育成完整植株的过程。体细胞胚胎发生也可分为直接体细胞胚胎发生和间接体细胞胚胎发生。

不定(adventitious)器官或不定胚发生是指从原本不是这些结构通常起源的部位进行的器官(根、芽、花等)或体细胞胚胎的发生和发育。从原始器官或器官原基上进行的器官发生或合子胚的发育就不能称为不定器官发生或不定胚发生。

三、愈伤组织培养

愈伤组织(callus)是指植物细胞脱分化而不断增殖形成的、主要由薄壁细胞构成的非器官化组织或不定形组织。它可以是植物在自然生长条件下,从机械损伤或微生物损伤、昆虫咬伤的伤口处产生,也可在特定的体外培养条件下诱导形成。不同颜色、形态(如表面光滑或有突起)或不同结构(如结构致密或松脆)的愈伤组织,其再生能力也可能不同。愈伤组织一般具有结构的不均一性(异质性),还具有生理和遗传上的不稳定性(或嵌合性),因而在突变体选择中经常使用。

愈伤组织培养分诱导、增殖和分化3个阶段。

在愈伤组织诱导培养中,不同基因型诱导愈伤组织的难易程度不同。同科的不同属,同属的不同种,甚至同种的不同品种在愈伤组织培养和再生能力上都存在差异。选用外植体时,双子叶植物通常采用幼嫩的各种外植体进行,而单子叶植物尽可能采用合子胚、幼叶、幼嫩花序、芽或茎尖进行诱导。一般选用盐浓度较高的基本培养基如MS、B₅及其改良培养基进行愈伤组织诱导。培养基成分中经常需要调整的是生长调节物质的种类和浓度组合。不同植物类型对外源激素的需求可能不同,通常有:只需生长素,如单子叶植物;只需细胞分裂素;既需细胞分裂素,也需生长素,通常为较高浓度的生长素和低浓度的细胞分裂素。但也有在不添加任何生长调节物质的基本培养基上可产生愈伤组织。不同生长素类型对愈伤组织的诱导效力也不同,一般活性从强到弱依次为2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)、NAA(萘乙酸)、IBA(吲哚丁酸)、IAA(吲哚乙酸),常用浓度为0.01~10 mg/L。最常用的细胞分裂素为KT(激动素)和BA(6-苄基氨基嘌呤),常用浓度为0.1~10 mg/L。

继代增殖培养基通常与诱导培养基类似,或者适当降低生长调节物质的浓度。愈伤组织继代培养时,将大的愈伤组织块切割成小块,然后转接到新鲜的

培养基上。转接时，愈伤组织块不能太小，太小不易恢复生长，也很容易由于褐化而死亡。另外，继代转接时间间隔不能太久，通常 10~25 d 转接一次，太久则也容易褐化死亡。如果想获得悬浮培养细胞，可将结构松脆的愈伤组织转接在液体培养基上进行振荡培养。

分化培养时，通常是首先诱导成芽，然后切割苗芽进行生根，而不是先形成根后形成芽。这是因为先形成根会抑制芽的形成，同时，芽原基多起源于培养物较表层组织，即外起源的；而根原基多发生于组织深部，为内起源的；两者之间通常没有联系，呈现单向极性。多数植物（尤其是双子叶植物），根据 Skoog 和 Miller 1951 的激素平衡假说，细胞分裂素（BA、KT 或 ZT）/生长素（NAA、IBA 或 IAA）比例高时有利于芽形成，而细胞分裂素/生长素比例低时有利于根形成。如图 1.1 所示，随细胞分裂素（激动素，kinetin）浓度高（1.0 mg/L），而生长素（吲哚乙酸，IAA）浓度在 0.005~0.18 mg/L 时，烟草愈伤组织上形成芽；而当吲哚乙酸浓度为 0.18~3.0 mg/L，而激动素不存在时，愈伤组织上诱导形成根。

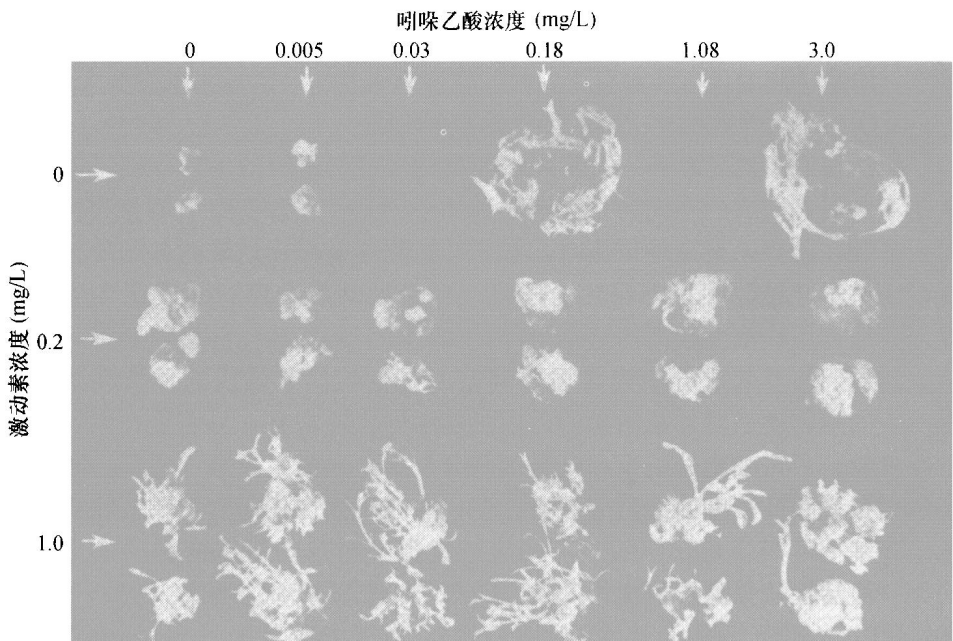


图 1.1 烟草愈伤组织上的器官发生

（引自 Skoog 和 Miller, 1957）

另外，分化培养也可通过控制培养基成分与培养条件诱导形成体细胞胚胎。