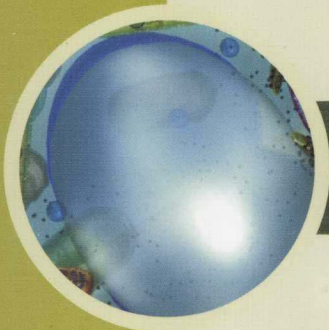




21世纪普通高等院校规划教材

ZHIWU XIBAO GONGCHENG

植物细胞工程

主编 胡尚连 尹静



西南交通大学出版社
[Http://press.swjtu.edu.cn](http://press.swjtu.edu.cn)

21 世纪普通高等院校规划教材

植物细胞工程

主 编 胡尚连 尹 静

副主编 曹 颖

参 编 孙 霞 向珣朝 郑桂玲

图书在版编目 (C I P) 数据

植物细胞工程 / 胡尚连, 尹静主编. —成都: 西南交通大学出版社, 2011.1

21 世纪普通高等院校规划教材

ISBN 978-7-5643-0920-6

I. ①植 II. ①胡·②尹 III. ①植物—细胞工程—高等学校—教材 IV. ①Q943

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 194314 号

21 世纪普通高等院校规划教材

植物细胞工程

主编 胡尚连 尹 静

责任编辑	李晓辉
特邀编辑	陈慧清
封面设计	本格设计
出版发行	西南交通大学出版社 (成都二环路北一段 111 号)
发行部电话	028-87600564 87600533
邮政编码	610031
网 址	http://press.swjtu.edu.cn
印 刷	成都蜀通印务有限责任公司
成品尺寸	185 mm×260 mm
印 张	19.375
字 数	479 千字
版 次	2011 年 1 月第 1 版
印 次	2011 年 1 月第 1 次
书 号	ISBN 978-7-5643-0920-6
定 价	32.50 元

图书如有印装质量问题 本社负责退换
版权所有 盗版必究 举报电话: 028-87600562

前言

生物技术是 21 世纪主导技术之一，是 21 世纪高新技术的核心，在解决人类面临的食物、资源、健康、环境等重大问题中将发挥重要作用。近 10 多年来世界生物技术的发展迅猛，在基础研究和应用开发方面都取得了令人瞩目的成就，生物技术的研究成果越来越广泛地应用于农业、医药、轻工食品、海洋开发及环境保护等多个领域。发展生物技术及其产业已成为世界各国经济发展的战略重点。生物技术作为 21 世纪主导技术，对人类社会的生产、生活各方面必将产生全面而深刻的影响。

由于生物技术的快速发展推动了生物科学各个领域的发展，植物生物技术也发展迅速，在农业产业结构的改善和产量增加中起到很大作用，已引起世界各国政府和科学家的高度重视。目前，植物生物技术领域中研究最活跃的是应用转基因技术，将目的基因导入植物体内，从而获得高产、优质、抗病虫害等转基因植物新品种，以达到充分提高资源利用效率和降低生产成本的目的。但外源基因的遗传转化技术必须以植物组织、细胞和原生质体培养及植株再生技术体系为基础，因此，了解和掌握植物生物技术的基本原理和相应实验操作技术显得尤为重要。

本书以植物细胞工程有关概念、基本原理和关键技术为主线，结合国内外有关报道，介绍该领域研究历史和发展动态、消毒灭菌技术、培养基、愈伤组织诱导与植株再生、植物体细胞胚胎发生、植物细胞悬浮培养与细胞突变体筛选、植物原生质体培养与遗传操作、转基因植物、人工诱变单倍体及其应用、植物快速繁殖技术等，共十四章，并附相应实验技术和综合试验设计、植物生物技术基本概念等。该教材系统性强，内容简练，概念明确，图文并茂。由于涉及学科面较宽，在编写过程中，限于编者水平，书中不妥之处，望读者批评指正。因引用资料来源较多，仅列出主要参考文献，并在引述处标注著者和年份以便查阅。

本书由西南科技大学生命科学与工程学院胡尚连教授和东北林业大学生命科学学院尹静博士共同担任主编，西南科技大学生命科学与工程学院曹颖副教授任副主编。本书的具体编写分工如下：胡尚连编写第一、第二、第三、第五、第六、第七、第十、第十一章及实验一、二、三、四、五、七、九、十、十一、十二、十四、十五，附录一、二、三、四；尹静编写第八章及实验十七、十八、十九；孙霞编写第四章及实验六；曹颖编写第九章和第十四章；向珣朝编写第十三章及实验八、十六和实验七中的水稻花药培养实例；郑桂玲编写第十二章及实验十三。

本书适合作为生物技术、农学、园艺等专业本科生教材，也可作为从事植物生物技术研究和应用的科技工作者的参考书。

编者

2010 年 9 月

目 录

理论部分

第一章 植物细胞工程的理论基础和应用	3
第一节 植物细胞工程的概念和应用	3
第二节 植物细胞工程研究内容与任务	6
第三节 植物细胞工程的基本理论依据及其发展过程	8
小 结	11
思考题	11
参考文献	12
第二章 植物细胞工程实验室的建立与基本操作技术	13
第一节 实验室的设计和基本设备	13
第二节 实验室的基本操作技术	15
小 结	23
思考题	23
参考文献	24
第三章 培 养 基	25
第一节 培养基的基本成分和主要培养基	25
第二节 培养基的选择及制备	36
小 结	37
思考题	37
参考文献	37
第四章 细胞分化与器官培养	38
第一节 细胞分化和器官分化	38
第二节 器官培养	42
第三节 胚胎培养	45
小 结	50
思考题	51
参考文献	51
第五章 愈伤组织培养	52
第一节 愈伤组织的诱导与继代	52
第二节 愈伤组织的形态建成与调控	57

思考题	67
参考文献	68
第六章 植物体细胞胚胎发生与调控	69
第一节 体细胞胚胎建成	69
第二节 体细胞胚胎发生的基因调控	85
第三节 体细胞转变为胚性细胞的机制	88
小 结	89
思考题	89
参考文献	89
第七章 人工种子	92
第一节 人工种子发展概况与特点	92
第二节 人工种子的制备技术	94
小 结	100
思考题	100
参考文献	100
第八章 植物细胞悬浮培养与次生代谢产物生产	101
第一节 植物细胞悬浮培养体系的建立	101
第二节 植物细胞生产有用次生代谢产物	109
第三节 规模化细胞培养实例	124
小 结	127
思考题	127
参考文献	128
第九章 植物细胞培养物的超低温保存及种质库建立	131
第一节 植物细胞培养物超低温保存的概念与原理	131
第二节 超低温保存的基本程序与方法	132
小 结	137
思考题	138
参考文献	138
第十章 植物原生质体培养与体细胞杂交	140
第一节 植物原生质体培养与植株再生	140
第二节 植物体细胞杂交	151
小 结	154
思考题	155
参考文献	155
第十一章 植物体细胞无性系变异	156
第一节 体细胞无性系变异的来源与特征	156
第二节 植物体细胞无性系变异机理	161

第三节 细胞突变体诱导和筛选	168
小 结	173
思考题	173
参考文献	174
第十二章 转基因植物与安全性	176
第一节 转基因植物研究进展	176
第二节 植物转基因主要方法	176
第三节 转基因在作物品种改良中的应用	183
第四节 植物转基因的方案与目的基因的表达	200
第五节 转基因植株的检测	203
第六节 转基因植物安全性	206
小 结	211
思考题	211
参考文献	212
第十三章 人工诱发单倍体及其应用	214
第一节 植物单倍体概念及人工诱发单倍体的应用	214
第二节 花药培养	217
第三节 花药培养应注意的问题	228
第四节 花粉培养	229
第五节 单倍体植株的鉴定和二倍化的方法	234
小 结	236
思考题	236
参考文献	236
第十四章 植物离体快速繁殖和脱毒技术	238
第一节 植物离体快速繁殖的概念与应用	238
第二节 植物离体快速繁殖技术程序与关键	240
第三节 植物脱毒的原理与植物脱毒的程序	251
小 结	258
思考题	258
参考文献	259

实验部分

实验一 培养基母液配制	265
实验二 培养基制备与灭菌	268
实验三 幼胚或成熟胚愈伤组织诱导培养与植株再生	269
实验四 幼穗愈伤组织诱导	270
实验五 植物茎尖离体培养	271
实验六 子房离体培养	272

实验七 花药离体培养	273
实验八 甘蓝型油菜小孢子培养	275
实验九 细胞悬浮培养	277
实验十 植物原生质体分离与培养	278
实验十一 植物抗盐细胞突变体的筛选	280
实验十二 植物抗病细胞突变体的筛选	281
实验十三 植物快速繁殖技术	282
实验十四 植物外源基因农杆菌介导的遗传转化	284
实验十五 植物外源基因基因枪遗传转化	285
实验十六 转基因植物的检测与鉴定	286
实验十七 白桦细胞悬浮培养与次生代谢产物检测	291
试验十八 红豆杉细胞培养中筛选高产细胞株的方法	294
试验十九 氯化三苯四氮唑还原法 (TTC) 测定细胞活力	296
附录一 试验设计	297
试验设计一 禾谷类植物愈伤组织诱导与植株再生培养体系建立	297
试验设计二 豆类植物愈伤组织诱导与植株再生培养体系建立	297
试验设计三 植物脱毒技术体系建立	298
附录二 植物细胞工程基本概念	299
附录三 缩略语	300
附录四 有关名词对应英文名称	301

理论部分

第一章 植物细胞工程的理论基础和应用

植物细胞工程是在植物组织培养和植物细胞融合技术等基础上发展起来的一门实验性、实践性、综合性十分强的新兴学科，是现代生物技术的重要组成部分，也是现代生物学研究的重要技术手段。它涉及的许多理论原理和实际操作技术，是对细胞进行遗传操作及细胞保藏的基础。

随着现代遗传学、分子生物学和细胞生物学的快速发展，植物细胞工程也发展迅速，在植物细胞生物学基础理论和实际应用方面的研究取得了令人瞩目的成就，这些成就都与研究方法的改进和实验技术的革新密切相关。现在，人们可以利用细胞融合和 DNA 重组技术等现代生物技术从细胞和分子水平改良现有品种，甚至创造新品种。

第一节 植物细胞工程的概念和应用

植物细胞工程对人们的生活影响越来越大，为了使植物细胞工程能更好地为人类服务，了解和掌握其概念及应用显得十分必要。

一、植物细胞工程的概念与应用领域

1. 植物细胞工程的概念

植物细胞工程 (Plant Cell Engineering) 是生物技术中的重要分支，是指在植物细胞水平上进行的遗传操作，是现代遗传学、植物细胞生物学和分子生物学的一个复杂集合体。它是以生命科学为基础，利用生物体系和工程原理生产生物制品和创造新物种的综合性科学技术，是以植物组织培养和细胞的离体操作为基础的实验性很强的一门新兴学科。

2. 植物细胞工程应用领域

植物细胞工程所涉及的主要技术包括植物组织与细胞培养、植物细胞大批量培养、植物细胞融合、植物染色体工程、植物细胞器移植、DNA 重组与外源基因导入及以上技术与物理、化学技术的结合。它主要应用于花卉和苗木离体快速繁殖、植物新类型的创造和品种改良以及次生代谢物质生产等领域。其与植物遗传育种相结合，如花粉单倍体育种、细胞突变体筛选、植物茎尖脱毒培养和快速繁殖以及植物体细胞胚胎发生与人工种子生产等，直接为作物的遗传改良服务；它与次生代谢物质的生产相结合，可以为药物生产服务。

二、植物细胞工程在农业上的应用

通过植物细胞工程改良作物是 20 世纪 70 年代以后农业科学中最重要的发展之一,对了解、操作、修饰和保护农作物种质具有潜在价值。20 世纪 70 年代以后,随着生物技术和分子生物学的发展,植物细胞工程备受重视,并开始应用于作物品种改良。但对于体细胞无性系变异的存在,曾经有过怀疑和争论,焦点在于这种变异有无遗传基础,后代能否稳定遗传,在作物品种改良中是否有实际应用价值。直至 20 世纪 90 年代初,随着研究手段的提高,大量研究证明,体细胞无性系变异确实存在并可以遗传,可应用于作物品种改良,并且在有些作物上获得成功,如小麦(胚培养和细胞培养)、水稻(原生质体培养)、大豆(原生质体培养)等,因此随后不断有许多成功的实例应用于生产,进展速度比过去预期要快,但困难和障碍仍有待克服。

植物细胞工程在作物品种改良和次生代谢产物生产以及脱毒培养等中的应用具有很多优点,尤其是在作物品种改良中的应用比传统育种方法具有如下优点:① 应用植物细胞工程进行作物品种改良可以省时省力;② 进行品种改良可以有的放矢;③ 可供选择的变异范围广;④ 可作为拯救远缘杂交杂种胚发育中止的手段。但由于传统方法可以为植物细胞工程技术的应用提供变异基础,因此,植物细胞工程手段必须与传统育种方法相结合才更有生命力。

植物细胞工程在农业上的应用主要有以下几个方面。

1. 幼穗、幼胚、胚珠和子房以及试管受精克服远缘杂交不育性,扩大遗传变异范围

幼胚培养作为解决种间、属间等远缘杂交中杂种胚停止发育的手段已在许多作物的远缘杂交育种中广为应用。离体幼胚培养可用于杂种育种。早在 20 世纪 20 年代,Laibach (1925) 通过培养亚麻种间杂交时形成的幼胚成功地获得了杂种,从而开创了植物胚胎培养的应用。其后,20 世纪 30 年代,不少人在果树胚胎上做了很多工作,所培养的胚都较大。LaRue (1936) 通过研究认为,小于 0.5 mm 的胚的培养不能成功。20 世纪 40 年代起,由于对离体幼胚培养中营养需要的大量研究,主要是在培养基中加入椰子汁、麦芽提取液等物质,从而使培养心形期或比心形期更早时期的胚(0.1~0.2 mm)获得了成功。我国胚培养(简称胚培)开始较早,但主要用于裸子植物。新中国成立后,中国科学院植物研究所、遗传研究所和北京大学生物系相继开展这一工作,并取得一定进展,如大小麦杂种幼胚、小麦和山羊草胚培养等。东北农业大学小麦研究室自 1983 年以来也开展这一工作。胚培养成功地用于远缘杂交育种和种内杂交育种实践,同时也广泛地利用胚培养技术研究胚胎发育和与胚胎发育有关的内外因素,以及与其发育有关的代谢生理生化变化。

在胚胎发生初期就停止发育的胚,不仅取胚困难,而且培养条件也很差,但通过胚珠培养或子房培养可以获得完全成熟的种子。

在以往的杂交工作中,柱头、花柱与花粉的萌发,花粉管伸长之间的不亲和性是很大障碍。Kanta (1963) 用花菱草等植物直接将花粉散布在置于培养基上的未受精胚珠上受精成功。随后,我国西北生物研究所在小麦和烟草等作物上进行的试管受精试验均获成功。这一技术的成功运用使远缘杂交在作物改良中的利用前景更广阔。

2. 花药、花粉培养进行单倍体育种

利用花药、花粉培养(简称花培)育成的单倍体植株(如小麦、大麦、水稻、烟草、玉米、辣椒等),经过染色体加倍,可在短期内育成遗传变异稳定的株系,有利于缩短育种年限。

我国花培在 20 世纪 70 年代后发展迅速,处于世界领先地位,并首次成功获得小麦花培单倍体植株,培育出许多有实用价值的品种,如冬小麦京花一号、水稻“单丰 1 号”、水稻“中花 9 号”和烟草“单育 1 号”等。我国的花培技术日趋完善,研究单位虽然减少,但工作逐渐深入,如利用花培中产生的异源代换系和附加系等材料进行遗传学和细胞学方面的研究,并在实际应用中将花培与常规育种技术密切结合。

3. 原生质体融合产生体细胞杂种,扩大遗传变异范围

通常在受精时可以看到细胞融合,雌雄配子体融合而形成合子,但在远缘植物及无亲缘关系的植物间,甚至动植物间,这种生殖细胞的融合困难很大,甚至完全不可能,然而通过体细胞进行融合就可能实现。烟草属植物种间细胞融合已获成功。在大麦与小豆、胡萝卜与烟草等一些植物中,这种融合细胞也进行分裂并形成细胞群。更突出的例子是 1978 年 Melchers 将番茄的叶肉细胞与马铃薯块茎组织细胞融合获得新的体细胞融合杂种。这种植物虽然不结果,但可形成薯块,说明通过细胞融合可以创造出新的体细胞杂种。但目前成功的实例不多,有实际应用价值的实例尚未出现,体细胞融合过程的细胞学方面研究资料尚嫌不足,远缘不亲和性以及属科间杂种细胞分化等问题仍未克服。此外,融合产物中存在两个亲本的两套遗传物质,比有性杂交远为复杂,细胞器和基因组间的相互关系以及它们之间发生重组或排斥的机理尚不清楚,这些问题有待于进一步研究。体细胞杂交技术是否能获得有用的杂种并应用于生产尚待深入研究。

4. 组织培养用于无病毒植物体的培育——脱毒

植物脱毒和离体快速繁殖是目前植物组织培养应用最多、最有效的一个领域。农业生产中,许多农作物都带有病毒,无性繁殖方式植物如马铃薯、甘薯、大蒜等尤为严重,但感病植株并非每个部位都带有病毒。White 早在 1943 年就发现植物生长点附近的病毒浓度很低甚至无病毒。利用组织培养方法进行茎尖培养,再生的植株就有可能不带病毒,从而获得脱毒苗,再用脱毒苗进行繁殖,则不会或极少发生病毒。目前,组织培养在甘蔗、菠萝、香蕉、草莓等作物上已成功应用。外植体已不仅限于茎尖,侧芽、鳞片、叶片、球茎、根等都可以应用组织培养技术。

5. 植物次生代谢产物生产

利用组织或细胞大规模培养生产人类所需要的有机化合物,如蛋白质、脂肪、糖类、药物、香料、生物碱及其他活性化合物已成为可能。目前,已有 20 多种植物组织培养物,其中的有效物质高于原植物,如人参、三七、红豆杉等。利用单细胞培养技术生产蛋白质,将给饲料和食品工业提供广阔的原料生产前景;对用组织培养方法生产人工不能合成的药物或其有效成分的研究正在不断深入,人参、毛地黄、毒芹、蛇根碱、紫草素、黄连素等已在日本实现工业生产。

目前已经建立了 400 多种药用植物组织和细胞培养物,且从中分离出 600 多种代谢产物。我国许多重要药用植物(如人参、西洋参、丹参、紫草、甘草、黄连等)细胞培养都十分成功,其中人参和新疆紫草细胞培养技术已接近国际先进水平。我国草药研究和利用具有悠久的历史,但由于过渡采挖使某些具有重要经济价值的药用植物资源遭到严重破坏。因此,开展药用植物次生代谢产物实现工厂化生产具有重要意义。

6. 应用基因工程技术获得转基因植株,进行作物品种改良

基因工程技术是一种按照人们的构思和设计在体外操作遗传物质,把有利用价值的目的

基因克隆下来,通过载体使其整合进植物基因组并加以表达的技术,它可以提高作物育种的目的性和可操作性,真正实现有针对性改良作物品种的目的。利用基因工程的手段实现作物改良、增加作物产量、改善作物品质、改良食品特性以及减少农药使用等是 21 世纪需要解决的问题,但对转基因植物的安全性,仍有不同的认识。

7. 高倍繁殖园艺作物

无性系的快速繁殖在 20 世纪 70 年代未受到应有的重视,80 年代后才逐渐成为热门,原因在于它可以直接产生经济效益,且操作比较容易。由于组织培养繁殖作物的突出特点是快速,因此,对一些繁殖系数低、不能用种子繁殖的“名、优、特、新、奇”作物品种的繁殖,意义更大。对于脱毒苗、新育成或新引进的优良单株和濒危植物以及基因工程植株都可通过离体快速繁殖,不受地区和气候影响,比用常规方法繁殖的速度快数万倍到数百万倍。因此,为快速获得花卉苗木提供了一条经济有效的途径。

自 1960 年 Morel 用兰花茎尖离体培养获得脱病毒植株后,国内外相继建立了兰花工业,世界上 80%~85% 的兰花通过组织培养进行脱毒和快繁。利用试管繁殖建立的兰花工厂使新加坡、泰国每年出口创汇数百万美元。在兰花工业高效益的刺激下,观赏植物的试管快繁技术研究取得了很大的进展。目前能用试管快速繁殖的花卉近 200 种,观赏植物、园艺作物、经济林木等部分或大部分都通过离体快速繁殖技术大量提供苗木,试管苗已出现在国际市场上并实现产业化。

我国无性系快速繁殖开始于 20 世纪 80 年代,已经推广应用这一技术的植物有甘蔗、菠萝、桉树、菊花、罗汉果、月季和香石竹等。据初步统计,在观赏植物中就涉及 182 个种以上,分属 58 个科,124 个属。有的研究提出对细胞培养快速繁殖产生的胚状体加以包装,然后采用机械播种,并开设生产“超级种子”的工厂。这一设想如能实现,将会导致整个农业的技术革命。

8. 体细胞无性系变异在作物品种改良中的应用

无论是植物愈伤组织培养还是细胞培养,培养细胞内的遗传物质均处在不稳定状态,容易受培养条件的影响而产生体细胞无性系变异,从中可以筛选出有利用价值的突变体,进一步选择育成新品系或品种,达到作物品种遗传改良的目的。

9. 种质保存和基因库的建立

在育种工作中,种质库的保存和基因库的建立十分必要。由于组织培养和细胞培养物的体积很小,可以利用低温或超低温技术长期保存。目前已经在草莓、苹果、玉米、马铃薯、水稻、甘蔗、胡萝卜、花生等植物上获得成功。

第二节 植物细胞工程研究内容与任务

一、研究内容

植物细胞工程研究内容主要包括以下四个方面(见图 1.1):

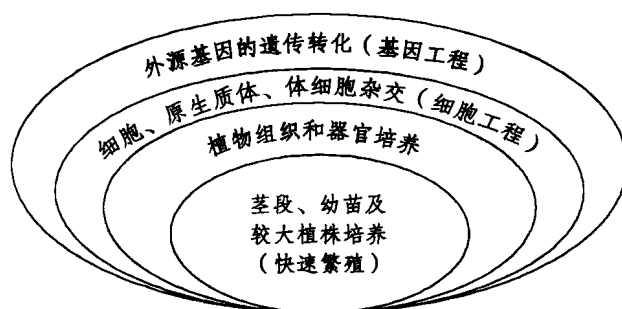


图 1.1 植物细胞工程研究的主要内容

1. 茎段、幼苗及较大植株的培养

茎段、幼苗及较大植株的培养很少产生变异，可用于快速繁殖等。

2. 植物组织和器官的培养

植物组织和器官的培养包括成熟胚及未成熟胚的离体培养、离体器官的培养（包括根尖、茎尖、叶原基、花器官各部分原基或未成熟的花器官各部分以及未成熟的果实的培养）。在培养器官范围内，应用茎尖培养技术加速植物无性繁殖已取得了一定的成功，但存在不恰当地应用“分生组织培养”或“生长锥培养”两个词的现象，造成概念上的混淆。真正的分生组织，如茎尖分生组织仅限于顶端圆锥区，长度不超过 0.1 mm。这样一种外植体实际上不易取得，而且培养存活率很低，生长也缓慢。所以在用组织培养技术加速植物繁殖时往往并不是用这么小的外植体，而是较大的茎尖组织。但是，用较大的外植体时，再生植株不一定能去除可能已感染母体植株的病原体。为了重新获得无病原体植物，则需培养分生组织或尽可能小的茎尖。

3. 植物细胞和原生质体的培养及体细胞杂交

植物组织、器官、细胞、原生质体的培养以及体细胞杂交培养所获得的变异是随机不可预测的，但只要注意用于培养的起始材料的筛选（起始材料遗传背景的复杂性），获得有利变异的几率以及供筛选的可遗传变异的范围就很宽。

4. 基因工程

利用基因工程进行作物品种改良比上述技术更具明显的目的性，拟进行改良的性状具有明显的目的性和可操作性，被改良的性状可以很快稳定，所需时间也比上述技术短。应用这一方法进行品种改良的前提是，必须明确作物的生理生化特性和每一个性状的遗传基础和位点，才有可能将基因工程更好地应用于作物品种改良。

二、研究任务

植物细胞工程的研究任务是，通过植物细胞工程这一技术手段在离体培养条件下研究植物组织、器官、细胞、原生质体经离体诱导形成的愈伤组织形态发生规律、外界环境条件和培养基对它的作用以及由其诱导而形成的培养物和再生植株群体的遗传稳定性和变异性。

第三节 植物细胞工程的基本理论依据 及其发展过程

植物细胞全能性 (totipotancy) 是指植物的细胞具有发育为胚胎和植株的潜能。实践也证明, 在适宜的离体培养条件下, 许多类型的植物细胞都可以发育为胚状体或者植株。因此, 植物细胞全能性是植物细胞工程的理论基础。

一、植物细胞工程的理论基础——细胞全能性

广义的细胞全能性是指一个细胞发育成一个完整有机体个体的潜能或特性, 是在细胞学说和组织培养实践的基础上建立起来的。自 1665 年英国 Robert Hooke 第一个发现细胞以来, 不少学者陆续对细胞的显微结构进行观察。直至 1838 年德国植物学家 Schleiden 在他的“植物发生论”中, 提出植物结构的细胞学说 (Cell Theory), 提出细胞是一切植物结构的基本单位, 是一切植物借以发展的实体; 最简单的植物是由一个细胞构成的, 大多数植物由多个细胞组成。在此之后, 1839 年德国动物学家 Schwann 发表了《动植物结构和生长相似性的显微研究》, 把 Schleiden 的细胞学说成功地引入动物学, 建立起了生物学中统一的细胞学说。Schleiden 和 Schwann 奠定了细胞学说的基础, 他们的观点形成了作为 19 世纪三大发现之一的细胞学说, 这一学说的基本观点是: 生物是由细胞组成的, 细胞是生物的基本结构、功能和发育的基本单位。细胞的发现给生物学的发展以极大的推动。

20 世纪初 (1902), 德国著名植物学家 Haberlandt 根据细胞学说理论, 大胆提出高等植物器官和组织可以不断分割, 直至单个细胞, 并有可能在离体培养条件下实现分裂和分化, 乃至形成胚胎和植株。为证明这一观点, 他将分离的小野芝麻栅栏细胞、大花凤眼兰叶柄木质部髓细胞、疗肺草和荨麻腺毛细胞、紫鸭跖草雄蕊绒毛细胞、虎眼万年青气孔保卫细胞等, 在添加葡萄糖和蛋白胨的 Knop 盐溶液中培养, 试图诱导培养细胞的分裂和分化, 尽管这些培养细胞能合成淀粉、体积增大, 存活几个星期, 但没有细胞分裂发生, 培养未获得成功, 主要是由于他所选择的实验材料和培养基不合适。此后多人的试验都由于技术上的原因, 进展甚微。虽然有时细胞可以在培养条件下存活很长时间, 甚至体积还会增大, 但仍不能分裂而形成细胞团。直至 1948 年, Skoog 和 Tsui 证明烟草茎段髓组织的细胞在添加 IAA 和腺嘌呤的培养基上可以分裂和生长, 并可分化形成不定芽。1952 年, Earlier 和 Steward 等设计了一种振荡培养装置, 在振荡培养条件下, 培养物形成大量分离的单细胞或细胞团。1953 年, Muir 将万寿菊和普通烟草愈伤组织转移到液体培养基中, 并进行机械摇动, 分离出了单细胞和小细胞团。1954 年 Muir 等把滤纸放在愈伤组织上, 再将万寿菊和烟草悬浮培养的单细胞置于滤纸上, 使大约 8% 的单细胞增殖, 形成细胞克隆, 这种培养方法称为“看护培养”。1958 年, Steward 等对胡萝卜根部组织诱导的愈伤组织细胞进行离体培养, 单个细胞经过胚的发育过程, 发育成一个完整的胡萝卜植株 (见图 1.2)。由此科学地证实, 在植物体构成单位的细胞中, 包含全部遗传信息, 细胞具有发育成完整植物体的能力, 证实了植物细胞的全能性。迄今为止, 大量的研究从 1 000 多种植物的各种类型的组织和细胞, 乃至原生质体, 都已诱导出胚胎和完整植株,

进一步证实植物细胞全能性的存在，证明它是植物细胞工程的理论基础。

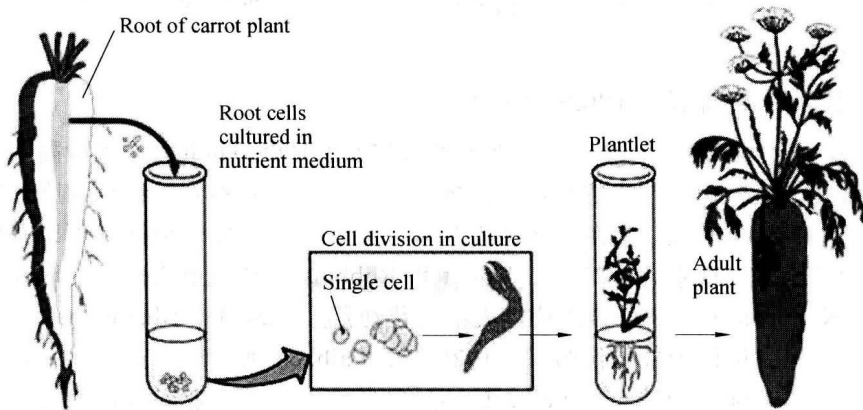


图 1.2 胡萝卜根细胞培养获得再生植株

1—Root of carrot plant 胡萝卜根；2—Root cells cultured in nutrient medium 在培养基中培养的根细胞；
3—Cell division in culture 培养过程中细胞分裂；4—Single cell 单细胞；
5—plantlet 再生小植株；6—Adult plant 成熟植株

植物细胞的类型多种多样（见图 1.3），大量的实验证明，并不是植物体内的每一个细胞在离体培养条件下都能发育成完整植株，如高度分化或特化的细胞（如纤维细胞、筛管细胞等）已经失去分裂和分化的能力，在离体培养条件下不能获得再生植株。只有植物体的胚性细胞或分化程度不高的细胞，经过离体诱导可以发育成完整植株，如合子和早期胚胎细胞、茎端分生细胞和成熟组织中遗留的胚性细胞（包括被子植物胚囊中的细胞、珠被和珠心细胞、营养体中的薄壁细胞）以及由分化细胞诱导获得的胚性细胞。

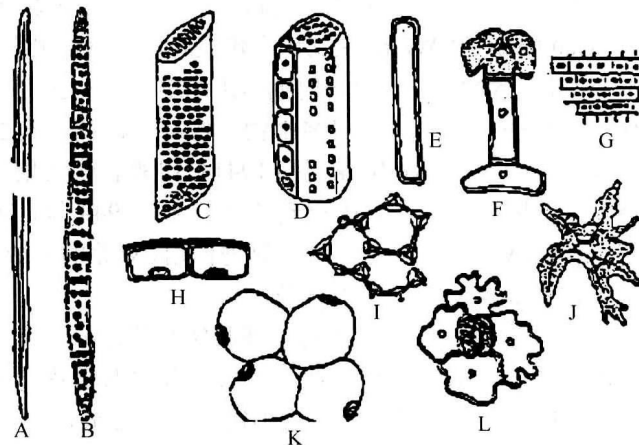


图 1.3 种子植物各种形状的体细胞

A—纤维；B—管胞；C—导管分子；D—筛管分子和伴胞；E—木薄壁组织细胞；F—分泌毛；G—分生组织细胞；
H—表皮细胞；I—厚角组织细胞；J—分枝状石细胞；K—薄壁组织细胞；L—表皮和保卫细胞

二、植物细胞工程的发展史

植物细胞工程的发展可以追溯到 20 世纪初，从 1902 年德国著名植物学家 Haberlandt 用