



普通高校应用型人才培养规划教材
PUTONG GAOXIAO YINYONGXING RENCAI PEIYANG GUIHUA JIAOCAI

植物细胞工程

◎ 蒋细旺 秦凡 陈发菊 等编著

Plant Cell Engineering



经济科学出版社
Economic Science Press

普通高校应用型人才培养规划教材

植物细胞工程

主编 蒋细旺 秦凡 陈发菊

副主编 魏传斌 李秋杰 余超波 袁慧

经济科学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

植物细胞工程/蒋细旺等编著. —北京：经济科学出版社，2009. 8
普通高校应用型人才培养规划教材
ISBN 978 - 7 - 5058 - 8293 - 3

I. 植… II. 蒋… 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 (2009) 第 104406 号

责任编辑：范 莹 莫霓舫

责任校对：王苗苗

技术编辑：董永亭

植物细胞工程

蒋细旺 秦 凡 陈发菊 等编著

经济科学出版社出版、发行 新华书店经销

社址：北京市海淀区阜成路甲 28 号 邮编：100142

编辑室电话：88191417 发行部电话：88191540

出版社网址：www.esp.com.cn

读者服务部：www.jkbook.com

·北京欣舒印务有限公司印刷

787 × 1092 16 开 25.25 印张 400000 字

2009 年 8 月第 1 版 2009 年 8 月第 1 次印刷

印数：0001 - 6000 册

ISBN 978 - 7 - 5058 - 8297 - 3 定价：32.00 元（含《习题手册》）

（图书出现印装问题，本社负责调换）

（版权所有 翻印必究）

普通高校应用型人才培养规划教材

编 审 会

主任委员：

甘德安

委 员（以姓氏笔画为序）：

万玲莉 王秀珍 王超英 李立慧 何炜煌 余超波
欧阳仲威 皇甫积庆 崔正华 谢建群 黄镇宇

本书编写者

主 编

蒋细旺（江汉大学）

秦 凡（江汉大学文理学院）

陈发菊（三峡大学）

副 主 编

魏传斌（江汉大学）

李秋杰（长江大学）

余超波（江汉大学文理学院）

袁 慧（江汉大学）

参编人员（按姓氏笔画排列）

史黎黎（江汉大学文理学院）

李晓玲（三峡大学）

李 威（江汉大学文理学院）

李 萍（江汉大学文理学院）

吴春红（江汉大学文理学院）

常 逊（江汉大学文理学院）

熊 欢

闻 婷

总序

经过几年的快速发展，我国教育已进入高等教育大国的行列，按照党的十七大精神，向建设人力资源强国迈进。数以千万计的学生在各级、各类高等学校学习各种知识和培养能力，为成为社会主义的建设者和新时期的应用型人才而努力。高等教育从“精英化”到“大众化”的转变，除了数量的扩大外，必须在培养目标、教学内容、教学方法、教材等方面进行改革，以适应培养不同类型人才和不同类型高校的教学需要。

独立学院自开办以来，在教学各方面，特别是教材基本沿用了普通本科的教学资源，这给特色教育和定向教学带来了诸多不便，难以达到教委设定的教学目的。有鉴于此，我们在“服务于地方，培养应用型人才”这一总的目标指导下，组织了一批教学经验丰富、致力于教学改革研究、在相关课程方面有较深造诣的教师，按教育部的教育培养规划，编写了这套适合独立学院本科教学的系列教材，旨在有针对性地培养具有高等学历的应用型人才，因此我们称这套教材为“普通高校应用型人才培养规划教材”。

我们编写这套教材的基本思想是：对基本原理、基本理论，重在结论和应用。理论部分遵循教学大纲，不求深入全面，但求适用，对相关理论做必要的引介。书中编列了较多的例子和习题，增加了学生自我训练、独立解题的素材，期望帮助学生加深对理论知识的理解和应用。我们力求这套丛书在内容结构上既区别于传统本科教材，又不同于高职高专教材。在理论知识方面既有一定的系统性，也兼顾了现代性；既注重知识间的逻辑性，也突出了知识的应用性；在够用、实用、适用的前提下，还编入一些有深度知识的链接，供要求进一步提高的学生自学之用。本套教材在文字上力求准确易懂，适当增加例图，有较好的可读性，便于学生自学。

由于我们的水平有限，书中难免出现一些问题，敬请各位教师和广大学生给予细心的指正和热情的帮助。在此，对于大力支持这套教材出版发行的经济科学出版社也一并表示真诚的感谢。

教材编审会
甘德安
2008年1月

前 言

植物细胞工程通过对实验室组成与基本技术、植物细胞全能性与形态发生、植物离体快速繁殖、花药与花粉培养、胚胎培养与离体受精、植物细胞培养与次生代谢产物生产、植物原生质体培养与融合、植物病毒病害与病毒脱除、植物体细胞胚胎发生、人工种子、植物种质资源的保存、植物遗传转化体系建立等方面的科学叙述，使读者能较全面地掌握植物细胞工程的基础知识、基本技能，从而为植物细胞工程的研究和生产应用服务。本教材主要对象为普通高校生物技术、生物工程、生物教育及相关专业大学生、研究生使用，也可作为科研院校、生产开发部门及其他人员参考使用。

本书较全面、系统地介绍了植物细胞工程方面的基本理论、方法以及植物细胞工程前沿的技术、进展，具有一定的新颖性、实用性。编者们大多数在高校有二十余年的教学和科研工作的经历，特别是对植物细胞工程方面的研究和教学有较丰富的实践经验，并取得过一些成绩。该书积累了编者们在实际教学和科研中的一些成果，希望对读者学习该门课程有一定的指导和帮助。

本教材可供约为 32~48 学时的教学使用。全书共由绪论和 12 个章构成。编写者具体分工合作如下：

蒋细旺负责编写：第 2 章植物细胞全能性与形态发生；第 6 章植物体细胞胚胎发生；第 9 章植物遗传转化体系建立；第 11 章人工种子。

秦凡负责编写：第 4 章花药与花粉培养；第 5 章胚胎培养和离体受精；第 10 章植物病毒病害及病毒脱除。

陈发菊、李晓玲负责编写：绪论；第 7 章植物细胞培养及次生代谢产物生产；第 8 章植物原生质体培养及融合。

李晓玲负责编写：第 12 章植物种质资源的离体保存。

魏传斌负责编写：第 2 章植物细胞全能性与形态发生；第 3 章植物离体快速繁殖。

李秋杰负责编写：第 1 章实验室组成及基本技术；第 3 章植物离体快速繁殖。

袁慧负责编写：第9章植物遗传转化体系建立。

本书由蒋细旺、秦凡统稿。江汉大学园艺学专业的熊欢、闻婷参与了插图的绘制工作。由于参编人员较多，统稿工作难度大，任务重。此外，编写人员经验和知识积累十分有限，不足之处，望读者给予批评指正。

在教材编写过程中，得到江汉大学文理学院有关领导的大力支持，在此，我们一并表示感谢。

编者

2009年6月

目 录

绪 论	1
0.1 植物细胞工程的有关概念	1
0.2 植物细胞工程的特点	3
0.3 植物细胞工程的发展历史	4
0.4 植物细胞工程的应用	10
第1章 实验室组成及基本技术	19
1.1 实验室组成	19
1.2 培养基及其配制	21
1.3 培养条件的选择与控制	27
1.4 基本技术	29
第2章 植物细胞全能性与形态发生	43
2.1 植物细胞全能性	43
2.2 细胞的生长发育	46
2.3 形态建成	51
第3章 植物离体快速繁殖	57
3.1 植物快速繁殖的概述	57
3.2 植物快速繁殖再生途径	58
3.3 常见问题及克服措施	64
第4章 花药与花粉培养	71
4.1 花药与花粉培养的概念及意义	71
4.2 离体条件下的小孢子发育	73
4.3 花药与花粉培养的技术	79

4.4 花粉培养的实例	84
第5章 胚胎培养和离体受精	95
5.1 离体胚培养	95
5.2 胚乳培养	99
5.3 胚珠和子房培养	103
5.4 离体受精	106
5.5 植物胚胎培养实例	112
第6章 植物体细胞胚胎发生	117
6.1 植物体细胞胚胎发生的概念	117
6.2 植物体细胞胚的类别和特点	118
6.3 植物体细胞胚的发生途径	120
6.4 植物体细胞胚发生的主要影响因子	123
6.5 植物体细胞胚胎发生的应用实例	133
第7章 植物细胞培养及次生代谢产物生产	143
7.1 单细胞培养	144
7.2 细胞悬浮培养	148
7.3 植物细胞的规模培养	155
7.4 培养细胞的次生代谢及产物积累	160
7.5 培养细胞突变体筛选	163
7.6 细胞培养实例	173
第8章 植物原生质体培养及融合	181
8.1 原生质体分离与纯化	183
8.2 原生质体的培养	187
8.3 原生质体融合	192
8.4 杂种细胞筛选和体细胞杂种鉴定	197
8.5 原生质体的植株再生	202
8.6 植物原生质体培养的应用	204
8.7 原生质体研究的展望	206
8.8 原生质体培养和体细胞杂交研究实例	207

第 9 章 植物遗传转化体系建立	213
9.1 植物基因转化的受体体系	213
9.2 植物基因转化的方法	218
9.3 转基因植株再生及检测	222
9.4 植物遗传转化体系建立的实例	228
第 10 章 植物病毒病害及病毒脱除	237
10.1 植物病毒病害的概述	237
10.2 植物脱毒技术	239
10.3 植物脱毒培养实例	247
第 11 章 人工种子	251
11.1 人工种子概述	251
11.2 繁殖体的类型及其生产	253
11.3 人工种子制作	256
11.4 人工种子的研究及其应用前景	258
11.5 植物人工种子的应用实例	259
第 12 章 植物种质资源的离体保存	265
12.1 缓慢生长保存	266
12.2 超低温保存	268
12.3 超低温保存实例	274
附录一 植物组织、细胞培养常用培养基成分	279
附录二 植物细胞工程中常见缓冲液的配制	282
附录三 《植物细胞工程》缩略词表	287
附录四 常见植物细胞工程中英文对照	288
参考文献	292

绪 论

学习要求

植物细胞工程是一种利用离体培养细胞进行遗传操作，实现植物品种改良的生物技术。具有培养材料经济，培养条件可以人为控制，生长周期短和繁殖率高，管理方便和利于工厂化生产和自动化控制等特点。建立在细胞学说和细胞全能性基础上的植物细胞工程，经过近几十年的快速发展，已经成为成熟学科，并且其中的许多成果广泛应用于生命科学的多个领域。



0.1 植物细胞工程的有关概念

植物细胞工程（plant cell engineering）是一种利用离体培养细胞，按照预先设计，有目的、有计划地对植物细胞进行遗传操作，使其遗传和生物学特性改变，从而实现植物品质改良和创新的生物技术。细胞工程和基因工程是现代植物生物技术两个不可分割的组成部分。细胞工程本身已成为一种独立的、自成体系的生物技术。植物细胞工程涉及原生质体培养与体细胞杂交、花药培养与单倍体育种、细胞培养与无性系变异筛选、染色体工程技术以及植物脱毒快速繁殖与人工种子生产等内容。

高等植物是多细胞的有机体，无法在整体水平上进行遗传操作。通过离体培养使植物细胞或小块的组织在离体培养条件下生长、发育和分化，再生完整植株，使细胞水平上的遗传操作传递到植物体，实现植物的品种改良。植物细胞工程涉及诸多实际操作技术，首先是植物组织细胞培养技术，也就是将植物的器官、组织、细胞甚至细

胞器进行离体培养。它是对细胞进行遗传操作的基础。因此植物细胞工程是建立在植物离体细胞或组织培养基础上的一种生物工程技术。

植物细胞工程是建立在细胞全能性理论依据上的，以细胞培养为技术基础、在细胞水平上对植物进行操作的育种新技术。在特定条件下，保持形态结构稳定而执行着特定功能的分化细胞的基因表达模式发生可逆的变化，首先发生的变化是回复到分生状态，这一状态将发生一系列的生理生化变化，包括由溶酶体的活动而将失去功能的细胞质组分降解，并产生新的细胞质组分（即细胞器的破坏与重建），同时细胞内酶的种类与活性发生改变，蛋白质合成和细胞代谢过程也发生改变，最后引起细胞的性质和状态发生了扭转。这种由失去分裂能力的高度分化的细胞回复到分生状态并进行分裂，形成分生细胞团即愈伤组织的现象（或者说是过程）称为“脱分化”（dedifferentiation）。经过脱分化的细胞如果条件合适，就可以长久保持旺盛的分裂状态而不发生分化。由无分化的愈伤组织的细胞再转变成为具有一定结构，执行一定生理功能的细胞团和组织，构成一个完整的植物体或植物器官的现象（或过程），叫做“再分化”（redifferentiation）。一个已分化的细胞经过脱分化和再分化的过程，完成其全能性的表达过程，在此过程中进行有目的的定向遗传操作，这就是植物细胞工程所要达到的目的。因此，设计培养基和创造合适培养条件的主要原则就是如何促使植物组织和细胞完成脱分化和再分化过程。

植物激素在调节细胞脱分化和再分化中起到主要作用。植物对激素的反应十分敏感，培养基中生长素类和细胞分裂素类的种类、相对比例和绝对含量都能直接影响到细胞脱分化和再分化的过程，组织培养中常常是通过调节激素的种类、浓度和相对比例来达到调节脱分化和再分化的目的。

培养的植物细胞在经过脱分化和再分化及再生出新的植物体过程中，再分化时，可经过两条途径：一是由愈伤组织的部分细胞先分化产生芽（或根），再在另一种培养基上产生根（或芽），形成一个完整的植株，因为芽和根都是植物体的器官，所以这一过程叫做器官发生途径；二是培养细胞产生出一些与种子中的胚相似的结构，即同时形成一个有苗端和根端的两极性结构，然后由体细胞胚发育成再生植株，这一过程与种子中胚的形成和种子萌发形成幼苗的过程相似，所以叫做体细胞胚胎发生或无性胚胎发生途径（图1）。在离体培养条件下，植物再生是走器官发生途径还是走体细胞胚胎发生途径，随植物种的不同而不同，也随培养基的不同而产生变化，有时甚至同一种植物材料在同一条件下，既存在体细胞胚胎发生途径，也存在器官发生途径，这都是自然现象，是正常的，只是两种发育途径的频率随着基因型不同和培养条件的改变而发生变化。

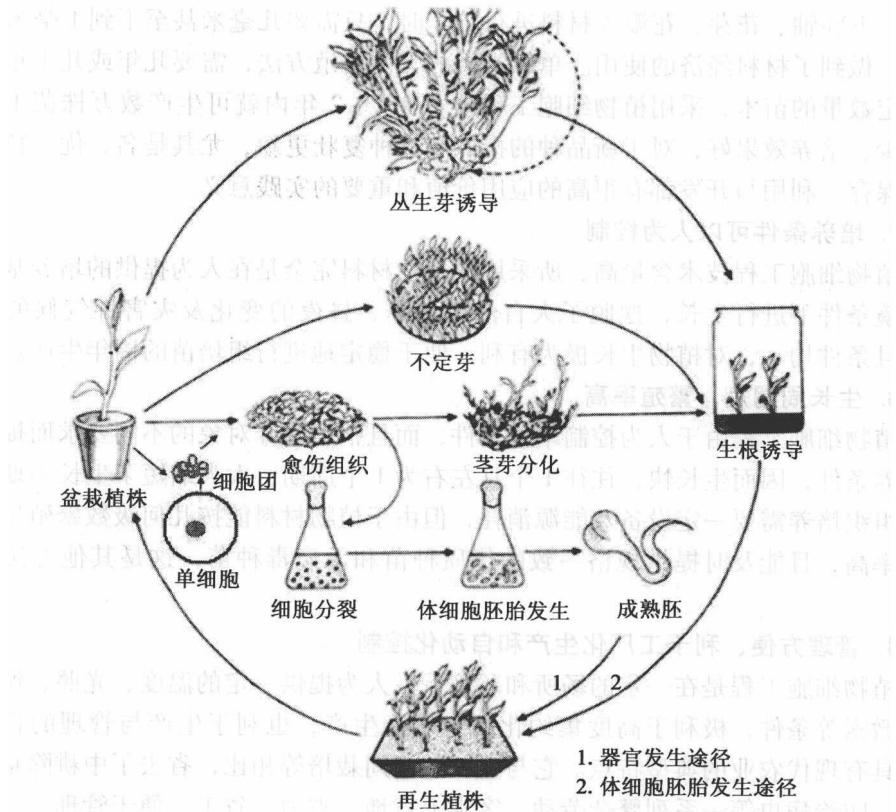


图1 植株再生的两种途径



0.2 植物细胞工程的特点

由于科学技术的进步，尤其是外源激素的应用，使植物细胞工程不仅从理论上为相关技术研究提供了可靠的试验证据，而且一跃成为一种大规模、工厂化生产种苗的新方法。植物细胞工程技术之所以发展迅速，应用广泛，是由于其具备以下几个特点。

1. 培养材料经济

由于植物细胞具有全能性，通过植物细胞工程技术能使植物体的单个细胞、小块组织、茎段等离体材料经培养获得再生植株。这不但在生物学研究上保证了材料来源单一和遗传背景一致，有利于试验成功，而且在生产实践中，以茎尖、根、茎、叶、

子叶、下胚轴、花芽、花瓣等材料进行培养时，只需要几毫米甚至不到1毫米大小的材料，做到了材料经济的使用。单靠常规的无性繁殖方法，需要几年或几十年才能繁殖一定数量的苗木，采用植物细胞工程技术在1~2年内就可生产数万株苗木。由于取材少，培养效果好，对于新品种的推广和良种复壮更新，尤其是名、优、特、新的品种保存、利用与开发都有很高的应用价值和重要的实践意义。

2. 培养条件可以人为控制

植物细胞工程技术含量高，所采用的植物材料完全是在人为提供的培养基和小气候环境条件下进行生长，摆脱了大自然中四季、昼夜的变化及灾害性气候的不利影响，且条件均一，对植物生长极为有利，便于稳定地进行组培苗的周年生产。

3. 生长期短，繁殖率高

植物细胞工程由于人为控制培养条件，而且根据培养对象的不同要求而提供适宜的培养条件，因而生长快，往往1个月左右为1个周期，大大缩短了生长周期。虽然植物组织培养需要一定设备及能源消耗，但由于植物材料能按几何级数繁殖生产，故繁殖率高，且能及时提供规格一致的优质种苗和无病毒种苗，这是其他方法无法比拟的。

4. 管理方便、利于工厂化生产和自动化控制

植物细胞工程是在一定的场所和环境下，人为提供一定的温度、光照、湿度、营养、激素等条件，极利于高度集约化的工厂化生产，也利于生产与管理的自动化控制，具有现代农业的典型特点。它与盆栽、田间栽培等相比，省去了中耕除草、浇水施肥、防治病虫等一系列繁杂劳动，客观上省地、省力、省工，便于管理。



0.3 植物细胞工程的发展历史

植物细胞工程科学的发展与细胞的发现和随后提出的细胞学说有不可分割的历史渊源。自1665年英国罗伯特·胡克（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19世纪上半叶，德国植物学家施来登（Mathias Schleiden, 1838）德国动物学家施旺（Theodor Schwann, 1839）提出了有关细胞理论（cell theory）。它包括两个基本方面：细胞是生物有机体的基本单位；细胞（特别是植物细胞）又是生理上、发育上具有潜在全能性的功能单位。1858年弗乔（Virchow）出版了《细胞病理学》一书，更有力地支持生物体都是由一个或多个细胞所组成和细胞是生命的功能单位的细胞学说。细胞的发现给生物科学的发展以极大的推动。250多年前，Henri-Louis Duhamel du Monceau（1756）开创性地进行了植物伤口愈合的实验，发现榆树树干被剥皮的部位能自然地形成愈伤组织。著名生物学家高

特格雷特 (Gautgeret, 1985) 认为, 它的研究揭开了植物细胞与组织培养研究的序幕。对植物细胞与组织培养有进一步影响的是细胞学说, 细胞学说指出每一个细胞都具有自主性并能表现潜在的全能性。从单细胞合子发育而来的多细胞或多器官有机体的高等生物就是细胞全能性的表现。孢子萌芽生长发育成完整的个体是单倍体植物世代交替中细胞的显著特征。类似的, 秋海棠表皮细胞能转变成新的秋海棠植株。在动物界, 水螅的任何部分的一个细胞都能发育形成新的个体。虽然一些植物或动物细胞具有全能性, 但是许多体细胞不能发育成完整的有机体, 因为这些细胞形成多细胞的组织或器官, 并且高度分化。这些细胞的分化几乎是不可逆的, 失去了分生组织活力。因此, 人们需要了解各种组织细胞和各种有机体器官之间的相互关系。

特里库尔 (Trecul, 1853) 观察到许多树被剥皮后形成愈伤组织。通过愈伤组织切片分析表明, 除形成层外, 髓射线、韧皮部和最幼嫩的木质部成分也可以作为组织培养的材料。约特廷 (Yachting, 1878) 观察到一种有趣的称为“极性”的现象, 这是一种与植物组织发育有关的特征。在对插条的经典实验中, Yachting 注意到茎上部总是产生芽, 而茎基部产生愈伤组织或根。他进一步进行仙人掌、柳树、甜菜和其他树木的嫁接试验, 结果表明一种组织的形态生长发育不受其他嫁接组织的影响, 原因是内部遗传因子十分严格地控制形态发生。威斯纳 (Wiesner, 1884) 提出一种理论, 认为器官形成的物质以极性方式分布在植物体中。外植体的大小可能是决定分化潜能的又一因素。瑞切尔 (Rechinger, 1893) 将芽、根和茎上分离的小块外植体置于润湿沙粒的表面, 发现厚度大于 20 毫米的切片能产生芽, 甚至形成植株; 而更小的外植体 (带微管成分) 能增殖, 但无组织形成; 小于 1.5 毫米的外植体 (不超过 21 层细胞) 不能生长。这些实验真实地表明了当时离体培养的研究在探讨植物组织培养的理论和实践问题中所经历的曲折过程。

1902 年德国著名植物学家哈伯兰德 (Haberlandt) 发表了著名论文“植物细胞离体培养实验”, 提出了高等植物的器官和组织可以不断分割直至单个细胞, 这种单个细胞可能在离体培养条件下进行分裂和分化, 乃至形成植株, 即细胞是具有潜在全能性的单位。他用被子植物的叶肉细胞、髓细胞和气孔保卫细胞等作为材料进行离体培养。由于当时对细胞培养所需的营养条件不够了解, 在培养中没能够观察到细胞分裂, 但发现培养细胞能合成淀粉, 并且体积增大, 可存活几个星期。虽然他的实验在当时未获得成功, 但提出了诱导培养细胞分裂的必要条件, 他的论断随时间的推移逐渐被证实。Haberlandt 被称为植物细胞与组织培养之父。此后, 1904 年, 汉宁 (Hanning) 最先在无机盐溶液及有机成分的培养基上成功地培养了萝卜和辣根菜的胚, 发现离体的胚可以在培养基上充分发育, 并有提早发育成苗的现象。

以后孔德森 (Knudson, 1922) 采用胚培养获得了大量的兰花幼苗, 克服了兰花种子发育的困难。同年, 罗宾斯和科特 (Robbins and Kotte) 培养了长度为 1.45 ~

3.75 厘米的豌豆等作物的茎尖，结果形成了一批绿的叶和根。1925 年 Laibach 通过培养亚麻种间杂交形成的幼胚，成功地获得了杂种幼苗。1933 年，我国植物学家李继侗等在银杏离体培养时，发现 3 毫米以上大小的胚在培养基上即可正常生长，其胚乳提取物能有效促进银杏离体胚的生长。这一发现对以后人们使用植物胚乳汁液、幼嫩种子及果实提取液等天然生长物质促进培养物的生长有着启蒙作用。直到 1934 年，美国植物生理学家怀特（White）通过对番茄根尖的离体培养，建立了第一个活跃生长的无性繁殖系，并能进行继代培养，并利用根系培养物，研究了光照、温度、pH 值和培养基组成对根生成的影响，至此有关离体根的培养实验才获得了真正的成功。1937 年 White 发现维生素 B 对培养离体根的生长具有重要作用，同年，法国的高苏尔特（Gautheret）在培养基中加入这些生长因子，发现这些因子能有效促进培养的柳树形成层的生长。1938 年诺伯考特（Nobecourt）培养了胡萝卜根的外植体，使细胞增殖获得了成功。1939 年 White 报道了由烟草种间杂种的粉蓝烟草 (*Nicotiana glauca* × *N. longsdorffii*) 幼茎切段的原形成层组织建立了类似的组织培养，并成功地进行了继代培养。在 Gautheret、White 和 Nobecourt 研究工作中所建立起来的植物组织培养的基本方法，成为以后以各种植物进行组织培养的技术基础。

从 20 世纪 30 年代开始以后的近 10 年时间里，植物细胞培养的研究主要与探讨培养器官和组织的营养需要有关。1941 年，奥弗比克（Overbeek）等用椰子汁作为培养基的添加物，使曼陀罗 (*Datura stramonium*) 的幼胚能够离体培养并发育成熟。1942 年，拉默茨（Lammerts）进行了杏、油桃和桃的杂种胚培养，提高了杂种的萌发率。1943 年，White 提出了植物细胞“全能性”学说，并出版了《植物组织培养手册》，使植物组织培养成为一门新兴学科。1944 年，莫雷（Morel）进行了葡萄茎尖组织培养的尝试，获得了愈伤组织和根。1946 年，罗士韦在培养寄生植物菟丝子的茎尖时观察到了花的形成，随后在这一方面的工作导致以后人们利用组织培养技术进行花芽诱导形成的研究。

20 世纪 40 年代末 50 年代初，植物组织培养的研究进入了一个新的活跃时期。卡缪斯（Camus, 1949）将芽嫁接在培养的组织上，结果诱导分化出维管组织，后来很多人对控制维管组织分化的因素做了很多重要的研究。斯库格（Skoog, 1948）和崔徵在烟草茎切段和髓培养以及器官形成的研究中，发现腺嘌呤或腺苷可以解除生长素（IAA）对芽形成的抑制作用，从而诱导烟草的茎段形成芽，确立了腺嘌呤与生长素的比例是控制芽和根分化的主要条件之一，建立了器官形成的概念，导致以后激动素（KT）的发现及利用激动素和生根素的配比关系控制植物器官分化工作的开展。1951 年，尼奇（Nitsch）进行的离体果实的培养工作，促进了对植物幼果、子房、胚珠、种子、胚胎及花部各器官的培养研究，特别是印度的马赫施瓦（Maheshwari）等在这方面做了大量的工作，这些研究工作是后来通过子房或胚珠培养进行试管离体授