



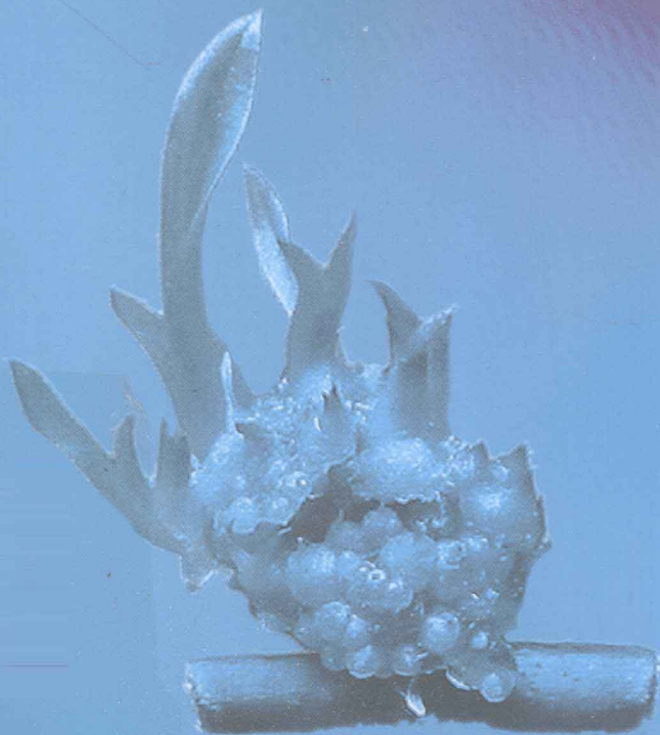
普通高等教育“十一五”国家级规划教材



Plant Biotechnology

# 植物生物技术

主编 肖尊安



高等教育出版社  
HIGHER EDUCATION PRESS



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

Plant Biotechnology

# 植物生物技术

主编 肖尊安

编者 肖尊安 北京师范大学

余龙江 华中科技大学

栗茂腾 华中科技大学

李永春 河南农业大学



高等教育出版社·北京  
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

## 内容简介

本书涵盖了植物组织培养、植物细胞工程和植物基因工程的内容,将植物生物技术理论与实践相结合,简明扼要地介绍了植物生物技术的基本原理、具体方法、技术特点、操作流程、研究策略与发展趋向,为读者学习和了解植物生物技术提供了一个平台。

本书在内容上,不仅有的放矢地引用了较新的前沿进展,如植物“感受态细胞”和“细胞决定”、“不定芽发生的特异性基因表达”、“Gateway 植物表达载体”、“位点定向整合质粒系统”等;在章节的划分上便于对教学与自学内容进行筛选,可灵活应对教学要求。本书除可供高等院校本科师生使用外,还可以供研究生和有关科技人员等参考。

## 图书在版编目(CIP)数据

植物生物技术/肖尊安主编. —北京:高等教育出版社,  
2011. 4

ISBN 978-7-04-031498-4

I. ①植… II. ①肖… III. ①植物-生物技术-高等学校-教材 IV. ①Q94-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 027354 号

策划编辑 赵晓媛 责任编辑 孟 丽 特约编辑 佟 丽 封面设计 张 楠  
版式设计 王 莹 责任校对 胡晓琪 责任印制 朱学忠

---

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 100120

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司

印 刷 山东省高唐印刷有限责任公司

开 本 787×1092 1/16

印 张 23.5

字 数 570 000

购书热线 010-58581118

咨询电话 400-810-0598

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 2011 年 4 月第 1 版

印 次 2011 年 4 月第 1 次印刷

定 价 38.80 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 31498-00

# 前 言

---

21 世纪是生命科学的世纪,伴随着生物学科的发展和新兴生物产业的出现,生物技术对农业生产和社会经济等领域将产生越来越大的影响。为适应我国社会经济的发展,培养生物技术方面的人才,我们在多年教学和科研的基础上,将植物生物技术中的植物组织培养、植物细胞工程和植物基因工程的内容整合,编写了《植物生物技术》教材。

本书共 12 章,第一章至第四章讨论植物生物技术的发展、植物细胞的全能性、组织培养的基本操作技术和培养细胞的形态发生;第五章至第八章讨论植物细胞工程的研究和应用,内容包括无病毒苗木的培育、试管苗的快速繁殖与种质资源保存、细胞培养生产有用次生代谢产物与突变体的诱导和筛选、单倍体和多倍体的细胞培养,以及原生质体培养和体细胞杂交;第九章至第十二章介绍植物基因工程,内容包括植物基因的克隆、植物细胞的遗传转化、DNA 分子标记、转基因植物的性状改良和转基因植物的安全性。可以说,本书比较系统地介绍了植物生物技术的原理、方法、技术特点、研究策略与发展趋向,为读者学习和了解植物生物技术研究 and 应用提供了一个平台。

此外,本书比较注重引用较新的前沿进展,如第二章介绍植物“感受态细胞”和“细胞决定”、第四章介绍“不定芽发生的特异性基因表达”和“体细胞胚发生的基因调控”、第十章“Gateway 植物表达载体”、“位点定向整合质粒系统”和“外源基因清除技术外源基因清除技术”等,这些内容在国内外同类书籍中尚未介绍或介绍不足;而且本书对教学的灵活性大,根据教学要求可选择一部分章节教学和一部分章节自学,特别是各章的思考题有助于读者自学。为了便于追踪相关研究进展,各章列举了主要参考文献或文献作者,读者依此可查阅原文以追踪相关研究的进展。

中国科学院遗传与发育研究所陈正华研究员细致地审阅了本书,为本书修改提出了许多宝贵的意见,编者谨此向陈正华研究员表示衷心的感谢!

参加本书编写的人员有:北京师范大学肖尊安博士(编写第一章至第八章、第十章和第十二章),华中科技大学余龙江博士和栗茂腾博士(编写第十一章),河南农业大学李永春博士(编写第九章)。由于编著者水平有限,难免出现错误,殷切期盼同行专家和广大读者不吝赐教,使本书得到进一步修改和完善。

编者

2010 年 4 月 15 日

# 目 录

第一章 植物生物技术发展的简介 .....	1	一、无机营养 .....	27
一、植物生物技术发展的简史 .....	1	二、有机营养 .....	34
二、植物生物技术主要领域的发展 .....	5	三、植物生长调节剂 .....	40
思考题 .....	8	四、凝胶剂 .....	42
主要参考文献 .....	8	五、培养基中的其他物质 .....	44
第二章 植物细胞的全能性 .....	9	六、培养基的类型 .....	45
第一节 植物细胞的脱分化与植物感受 态细胞的发生 .....	9	七、培养基的配制 .....	45
一、细胞周期与脱分化 .....	9	第二节 实验室的配置 .....	47
二、植物细胞脱分化的条件和特征 .....	10	一、准备实验室 .....	47
三、感受态细胞 .....	11	二、无菌操作室 .....	48
第二节 植物细胞的决定作用 .....	15	三、培养室 .....	48
一、诱导细胞决定的信号分子 .....	16	第三节 植物材料的表面消毒 .....	49
二、决定细胞的特征 .....	18	一、消毒剂 .....	49
三、细胞决定作用发生的时期 .....	20	二、外植体的表面消毒 .....	49
第三节 细胞和组织分化 .....	20	思考题 .....	50
一、维管束组织的分化 .....	21	主要参考文献 .....	50
二、导管细胞分化的分子调控 .....	21	第四章 培养细胞的形态发生 .....	51
三、培养基成分对维管束成分分化的 影响 .....	21	第一节 愈伤组织的诱导和生长 调节 .....	51
第四节 细胞全能性在细胞培养过程 中的变化 .....	22	一、愈伤组织的诱导 .....	51
一、愈伤组织的驯化 .....	22	二、愈伤组织的生长调节 .....	51
二、长期培养物形态发生潜力的丧失 .....	23	第二节 器官发生 .....	53
思考题 .....	23	一、培养细胞器官发生的特征 .....	53
主要参考文献 .....	23	二、器官发生过程中培养细胞的生理 变化 .....	53
第三章 植物组织培养基和组织培养基本 技术 .....	25	三、诱导器官发生的特异性基因表达 .....	54
第一节 培养基 .....	25	四、器官发生的假说 .....	61
		第三节 体细胞胚的发生 .....	64
		一、体细胞胚发生的特征 .....	64
		二、胚性细胞的生理变化 .....	69
		三、体细胞胚发生的基因调控 .....	71

四、体细胞胚发生的假说 .....	74	三、高效生产次生代谢产物的策略 .....	126
第四节 培养细胞形态发生的调节 .....	77	第三节 细胞突变体的诱导和筛选 .....	137
一、外植体的选择 .....	77	一、突变细胞的来源 .....	137
二、培养基的成分 .....	79	二、培养细胞突变发生的机理 .....	142
三、培养条件 .....	81	三、诱导培养细胞突变的主要类型 .....	147
思考题 .....	82	四、培养细胞变异的筛选和鉴定 .....	150
主要参考文献 .....	83	思考题 .....	152
第五章 试管苗的快速繁殖 .....	85	主要参考文献 .....	153
第一节 无病毒苗木的培育 .....	85	第七章 单倍体和三倍体的细胞培养 .....	154
一、培育脱毒苗的途径 .....	86	第一节 单倍体植株的来源 .....	154
二、脱毒苗的鉴定 .....	91	一、单倍体植株产生的途径 .....	154
第二节 试管苗的快速繁殖 .....	92	二、诱导小孢子形成胚的过程 .....	155
一、启动阶段 .....	93	第二节 通过雄核发育途径培育	
二、组培苗的增殖 .....	96	单倍体 .....	159
三、生根 .....	98	一、花药培养 .....	159
四、移栽 .....	101	二、小孢子培养 .....	165
五、光自养快速繁殖 .....	102	三、影响花药和花粉培养的因素 .....	167
第三节 人工种子 .....	105	第三节 通过雌核发育途径培育	
一、人工种子的种类和制备 .....	105	单倍体 .....	170
二、人工种子的萌发 .....	107	一、未受精胚珠和子房的培养 .....	170
第四节 种质资源的保存 .....	108	二、产生单倍体的其他途径 .....	176
一、低温保存 .....	108	第四节 单倍体植株的染色体加倍和	
二、冷冻保存 .....	108	鉴定 .....	178
思考题 .....	112	一、单倍体植株的鉴定 .....	178
主要参考文献 .....	112	二、染色体加倍 .....	178
第六章 细胞培养及其应用 .....	113	三、单倍体培养在植物遗传和育种中的	
第一节 细胞培养 .....	113	应用 .....	181
一、悬浮细胞的来源和初始培养 .....	113	第五节 胚乳培养 .....	182
二、悬浮细胞的培养方式 .....	115	一、取样 .....	185
三、固定化培养 .....	117	二、接种与培养 .....	185
四、培养细胞生长量和活力分析 .....	119	三、培养基 .....	186
第二节 细胞培养生产有用的次生		四、胚乳植株再生 .....	186
代谢产物 .....	120	五、三倍体的应用与局限性 .....	187
一、植物细胞反应器的类型 .....	120	思考题 .....	188
二、细胞培养生产有用次生代谢产物的		主要参考文献 .....	188
种类 .....	124		

<b>第八章 植物原生质体培养和体细胞杂交</b> .....	189	<b>方法</b> .....	234
<b>第一节 植物原生质体培养</b> .....	189	一、生物芯片 .....	235
一、植物原生质体的分离 .....	189	二、基因文库的构建和目的基因的 筛选 .....	236
二、原生质体培养 .....	194	三、蛋白质组的差异分析 .....	240
<b>第二节 植物体细胞杂交</b> .....	197	四、mRNA 差异显示 .....	240
一、原生质体融合的方法 .....	197	五、插入失活技术 .....	240
二、体细胞杂交的类型 .....	200	六、图位克隆 .....	242
三、体细胞杂种的选择和鉴定 .....	203	七、其他方法 .....	243
<b>第三节 体细胞杂种的遗传</b> .....	204	<b>第六节 植物 microRNA 基因的克隆         及其靶基因的确定</b> .....	245
一、细胞核对称体细胞杂种 .....	205	一、植物 miRNA 的生物合成 .....	246
二、细胞核不对称体细胞杂种 .....	205	二、miRNA 基因的克隆 .....	247
三、细胞质基因组的遗传 .....	206	三、miRNA 靶基因的确定 .....	248
<b>思考题</b> .....	209	<b>思考题</b> .....	248
<b>主要参考文献</b> .....	210	<b>主要参考文献</b> .....	249
<b>第九章 植物基因的克隆</b> .....	211	<b>第十章 外源基因导入植物细胞</b> .....	250
<b>第一节 植物基因的结构和功能</b> .....	211	<b>第一节 根癌土壤杆菌介导的遗传         转化</b> .....	250
一、植物基因的结构和特点 .....	211	一、Ti 质粒 .....	250
二、植物功能基因的类型 .....	213	二、农杆菌介导的遗传转化机理 .....	253
<b>第二节 基因克隆的载体</b> .....	215	三、Ti 质粒的改造和利用 .....	257
一、质粒载体 .....	215	四、农杆菌介导的基因转移方法 .....	266
二、噬菌体载体 .....	219	<b>第二节 基因直接转移方法</b> .....	266
三、黏粒载体 .....	222	一、化学方法 .....	267
四、人工染色体载体 .....	223	二、物理方法 .....	267
<b>第三节 基因克隆的工具酶</b> .....	224	三、农杆菌微弹转化方法 .....	269
一、限制性核酸内切酶及其应用 .....	224	<b>第三节 转基因表达的调控</b> .....	270
二、DNA 连接酶及其应用 .....	225	一、组成型表达 .....	270
三、DNA 聚合酶及其应用 .....	226	二、诱导型表达 .....	271
四、修饰性工具酶 .....	228	三、基因瞬时表达和稳定表达 .....	281
<b>第四节 基因克隆的策略</b> .....	229	<b>第四节 转基因的表达特征</b> .....	281
一、目标 DNA 片段的获得 .....	229	一、外源基因拷贝数量、插入位点与 排列 .....	281
二、载体的选择及制备 .....	230	二、外源基因表达序列的特征 .....	283
三、目的 DNA 片段和载体的连接 .....	231	三、外源基因表达的沉默 .....	284
四、重组载体转化宿主细胞 .....	232	四、外源基因表达产物的定位 .....	288
五、重组克隆的筛选 .....	233		
<b>第五节 植物目的基因的分离与克隆</b>			

第五节 删除标记基因的技术 .....	289	二、高等植物来源的抗虫基因 .....	329
一、共转化 .....	289	第二节 抗病毒病害 .....	330
二、位点特异性重组 .....	290	一、外壳蛋白基因 .....	331
三、转座 .....	290	二、卫星 RNA .....	332
四、MAT 载体系统 .....	290	三、核糖体灭活蛋白 .....	333
五、不使用选择标记基因 .....	291	第三节 抗细菌和真菌病害 .....	333
思考题 .....	291	一、抗菌蛋白 .....	334
主要参考文献 .....	292	二、诱导超敏反应的抗性蛋白 .....	335
第十一章 DNA 分子标记 .....	293	第四节 抗除草剂 .....	337
第一节 非 PCR 依赖的分子标记 .....	293	一、修饰除草剂的靶蛋白 .....	338
一、限制性片段长度多态性标记 .....	293	二、解毒蛋白 .....	339
二、染色体原位杂交 .....	297	第五节 抗逆性 .....	339
第二节 基于 PCR 的分子标记 .....	298	一、耐干旱和盐碱 .....	339
一、随机扩增多态性 DNA .....	298	二、抗寒 .....	340
二、简单序列重复 .....	302	三、耐重金属污染 .....	341
三、扩增片段长度多态性 (AFLP) .....	303	第六节 植物品种品质的改良 .....	342
四、相关序列扩增多态性 (SRAP) .....	306	一、种子贮藏蛋白 .....	342
五、DNA 扩增指纹印迹 (DAF) .....	308	二、淀粉和糖类 .....	343
六、随机引物聚合酶链式反应 (AP-PCR) .....	309	三、脂肪酸 .....	345
七、特异的 PCR 标记 .....	310	四、维生素 .....	346
第三节 DNA 分子标记的应用 .....	313	五、延迟果实成熟 .....	346
一、遗传多样性与亲缘关系研究 .....	313	第七节 植物生长发育的调节 .....	348
二、图谱定位控制重要性状的基因 .....	313	一、调节内源激素水平 .....	349
三、分子标记辅助选择 .....	316	二、调节小孢子发育 .....	349
四、比较基因组研究 .....	317	三、调节甜味蛋白和花色素成分 .....	349
五、杂种优势的预测 .....	317	第八节 药物生产 .....	351
第四节 生物芯片 .....	319	一、抗体 .....	351
一、生物芯片的种类 .....	319	二、可食疫苗 .....	353
二、生物芯片技术的应用 .....	322	第九节 转基因植物的安全性及其 评价 .....	358
思考题 .....	324	一、选择标记基因 .....	358
主要参考文献 .....	324	二、转基因食品 .....	358
第十二章 转基因植物的研究与应用 .....	326	三、转基因植物对生态安全性的风险 .....	359
第一节 抗虫害 .....	327	四、转基因植物的安全性评价 .....	362
一、微生物来源的抗虫基因 .....	327	思考题 .....	363
		主要参考文献 .....	364



# 第一章 | 植物生物技术发展的简介

植物生物技术属于生物技术研究领域之一。按照联合国粮食与农业组织《生物多样性公约》中对生物技术的定义,生物技术指利用生物系统、活生物体或其衍生物为特定用途而生产或改变其产品或过程的任何技术应用。植物生物技术由植物组织培养、植物细胞工程和植物基因工程三部分内容组成。广义的植物生物技术指提高农作物的产量,或改良其品质的所有技术;狭义的植物生物技术指通过在植物器官、组织、细胞和分子水平上的操作,促进植物繁殖、用于物质生产和植物品种遗传改良的技术。本书讨论的内容属于狭义的植物生物技术范畴。

## 一、植物生物技术发展的简史

植物生物技术的起源可以追溯到19世纪30年代,Schleiden在细胞理论中提出了细胞的全能性,但没有引起同时代学者的关注。直到1902年,德国植物生理学家Gottlieb Haberlandt(1854—1945)提出了植物细胞的全能性理论,即植物体细胞在适当的条件下,具有不断分裂、繁殖,并进而发育成完整植株的能力。首次培养了小野芝麻和凤眼莲叶栅栏组织细胞,以及虎眼万年青的表皮细胞,标志着现代植物生物技术的开始,Haberlandt也被誉为植物组织培养之父。从Haberlandt到现今的100多年间,许多开创性的研究(表1-1)使植物生物技术逐步成熟并取得了巨大的成果。

表1-1 植物生物技术发展的历程

年份	主要进展
1902	Haberlandt G 开创植物组织培养的实验,提出植物细胞的全能性理论
1904	Hannig B 首次探讨十字花科植物的胚胎培养
1922	Knudson L 非共生萌发兰花种子
1922	Robbins WJ 离体培养根尖
1924	Blumenthal F 和 Meyer PZ 利用椰乳汁诱导胡萝卜根外植体形成愈伤组织
1925	Laibach F 培养亚麻植物种间杂交的胚胎
1929	Laibach F 通过胚胎培养克服亚麻植物种间杂交不亲和的现象
1934	Guatheret RJ 离体培养不同树木和灌木的形成层组织失败
1934	White PR 长期培养番茄根获得成功
1934	Kogl F 等鉴定出植物第一种激素 IAA
1939	Gautheret RJ 等成功培养持续生长的愈伤组织
1940	Gautheret RJ 诱导榆属愈伤组织形成不定芽

年份	主要进展
1941	van Overbeek J. 等研究椰子乳对曼陀罗属植物的幼胚生长和发育的影响
1942	Gautheret RJ 观察到植物愈伤组织培养中产生次生代谢产物
1944	Skoog F 诱导烟草离体培养物形成不定芽
1945	Loo SW(罗士韦)培养芦笋茎尖
1946	Ball E 获得羽扇豆属与旱金莲植物茎尖培养的完整植株
1948	Skoog F 和 Tsui C(崔激)诱导烟草不定根和不定芽的形成
1949	Nitsch JP 离体培养果树植株
1950	Ball E 培养美洲杉愈伤组织再生器官
1951	Nitsch JP 离体培养胚珠
1952	Morel G 和 Martin C 通过培养顶端分生组织获得无病毒的大丽花植株
1952	Morel G 和 Martin C 首次微嫁接成功
1953	Tulecke WR 获得银杏花粉粒的单倍体愈伤组织
1954	Muir WH 等通过看护培养得到单细胞来源的再生植株
1955	Miller C 等发现激动素的合成与结构
1957	Skoog F 和 Miller CO 发现烟草根和茎的形成依赖于生长素和细胞分裂素的比例
1957	Vasil IK 培养洋葱花药
1958	Maheshwari P 和 Rangaswamy NS 诱导柑橘胚珠再生体细胞胚
1958	Reinert J 和 Steward FC 培养胡萝卜悬浮细胞和愈伤组织形成体细胞胚
1960	Kanta K 首次进行虞美人试管受精
1960	Cocking EC 利用纤维素酶和果胶酶降解细胞壁获得原生质体
1960	Morel G 通过培养顶端分生组织繁殖兰花
1962	Murashige T 和 Skoog F 提出 MS 培养基
1962	Aghion D 诱导离体培养的烟草开花
1964	Guha S 和 Maheshwari SC 首次培养曼陀罗植物花药,并得到其单倍体植株
1967	Pierik RLM 通过春化作用诱导银扇草( <i>Lunaria annua</i> )离体开花
1967	Kaul B 和 Staba EJ 培养阿密茴( <i>Ammi visnaga</i> )细胞,获得的次生代谢产物产量与同重量的整体植物相等
1967	Bourgin JP 和 Nitsch JP 培养烟草花粉粒,并得到其单倍体植株
1968	Meselson IM 和 Yuan R 发现限制性核酸内切酶
1970	Carlson PS 筛选生物化学诱导的烟草突变体
1970	Power JB 等首次进行原生质体融合

续表

年份	主要进展
1971	Takebe I 等获得烟草叶肉原生质体再生植株
1972	Carlson PS 等获得烟草种间原生质体融合的体细胞杂种植株
1972	Berg P 等用限制性内切酶得到 DNA 重组分子
1973	Pierik RLM 等利用细胞分裂素打破大丁草休眠
1974	Murashige F 等应用细胞分裂素诱导大丁草茎尖产生侧枝
1974	Melchers G 和 Lalib G 通过单倍体原生质体融合获得多倍体
1974	Reinhard E 利用植物组织培养进行有机化合物的生物转化
1974	Zaenen I 等和 van Larebeke N 等报道 Ti 质粒在冠瘿瘤诱导中起主要作用
1975	Gengenbach BC 和 Green CE 筛选抗玉米小斑病菌 ( <i>Helminthosporium maydis</i> ) 的玉米愈伤组织
1975	Chu CC (朱至清) 等设计出水稻花药培养的 N6 培养基
1976	Seibert M 冷冻保存的康乃馨茎尖恢复生长形成茎
1976	San-Noreum LH 培养大麦未成熟胚珠, 并获得其单倍体植株
1976	Bomhoff C 等分析章鱼碱和胭脂碱的合成是 Ti 质粒控制的
1977	Chilton MD 将 T-DNA 整合到植物染色体中
1977	Noguchi M 等利用 20 000 L 生物反应器培养烟草细胞
1978	Melchers G 等进行番茄和马铃薯的属间体细胞杂交
1978	Tabata M 等通过工厂化细胞培养生产紫草素
1979	Brodelius P 等利用藻酸盐球粒固定植物细胞进行生物转化和次生代谢产物生产
1979	Marton L 等研究了农杆菌与原生质体的共培养
1980	Alfermann AW 等利用固定化细胞培养将毛地黄毒苷 (digitoxin) 转化为异羟毛地黄毒苷, 又称地高辛 (digoxin)
1980	Botstein D 等创立限制性片段长度多态性 (RFLP) 技术
1981	Larkin PJ 和 Scowcroft WR 提出体细胞变异的概念
1981	Sidorov V 等利用诱变剂处理白花丹烟草单倍体原生质体后筛选出营养缺陷型细胞
1981	Suler ML 利用中空纤维反应器生产次生代谢产物
1982	Krens FA 等直接将裸露的 DNA 导入原生质体
1982	Zimmermann U 研究原生质体电融合
1983	Wolters B 和 Eilert U 首次在紫草悬浮细胞中使用诱发子生产次生代谢产物
1983	Zambryski P 等构建共整合载体
1983	Mullis K 创立链式多聚酶反应 (PCR) 技术
1984	Paszkowski J 等利用质粒 DNA 转化烟草原生质体, 并获得再生转基因植株

年份	主要进展
1985	Horsch RB 等和 De Block M 等将农杆菌与叶圆片共培养后得到转基因植株
1985	Fraley RT 提出卸甲 Ti 质粒载体系统
1985	An G 等构建双元载体
1985	Fromm ME 用电激法将外源基因导入双子叶植物和单子叶植物原生质体中
1986	Crossway A 等直接将 DNA 微注射到烟草原生质体中
1986	Powell-Abel P 等将烟草花叶病毒(TMV)衣壳蛋白 cDNA 导入烟草和番茄,获得抗 TMV 病毒的转基因烟草和番茄
1987	Klein TM 等采用基因枪(生物微弹轰击)方法进行遗传转化
1987	Barton 等从苏云金芽孢杆菌中分离出 <i>Bt</i> 基因
1987	Miki BLA 将 DNA 直接微注射到植物细胞中
1988	Klein TM 采用基因枪法稳定转化玉米并再生植株
1988	Levi R 自动化大量生产不定芽和体细胞胚
1988	Nelson RS 等获得表达烟草花叶病毒衣壳蛋白的抗病毒番茄植株
1989	Delannay X 等得到转基因抗虫番茄
1990	Williams JCK 等, Welsh J 和 McClland M 发展随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术
1990	Neuhaus G 微注射整体植物细胞获得转基因植株
1990	Dekeyser RA 等通过电击整体植株组织直接导入 DNA
1990	Kaeppeler HF 等报道硅碳(silicon carbide)纤维介导的 DNA 转移
1991	Lynch PT 和 Benson EE 冷冻保持长春花细胞系,并在解冻后使其恢复生物碱合成能力
1991	Kozai 利用光自养或无糖培养基微繁殖试管苗
1992	Dutta SK 等利用聚乙二醇(PEG)介导的原生质体转化得到抗除草剂的水稻植株
1993	Kranz E 和 Lorz H 利用单配子离体受精产生合子胚,并获得可育的玉米植株
1994	遗传工程番茄品种“Flavr-Savr”进入市场
1995	Vos P 等报道扩增片段长度多态性(AFLP)技术
1996	Hansen G 和 Chilton MD 发展农杆菌微弹(agrolistic)的转化方法
1996	Hamilton CM 等发展双元细菌人工染色体载体(BBIC),转化能力达 150 kb
1997	Arntzen CJ 和 Mason HS 利用转基因植株生产可食疫苗
1997	Schmidt ED 等发现 SERK1 是体细胞胚发生过程中感受态细胞的分子标记
2000	拟南芥基因组测序完成
2001	Potrykus I 报道转维生素 A 基因的“金水稻”
2001	Escobar MA 等利用 RNA 干扰(RNAi)技术抑制冠瘿瘤的发生

续表

年份	主要进展
2002	水稻基因组测序完成
2003	Curtis MD 和 Grossniklaus U 改良 Gateway 高通量基因克隆载体
2004	Daniell H 等以叶绿体基因组为分子农业 (molecular farming) 生产药物
2005	Paine JA 等和 Parkhi V 等获得无选择标记 (marker-free) 的转基因水稻
2007	Conner AJ 等发展基因内载体 (intragenic vector) 系统, 培育无外源基因的遗传修饰植物
2007	Gordon SP 等提出愈伤组织分化不定芽的基因调控模式
2008	Braybrook SA 和 Harada JJ 等提出体细胞胚发生的基因调控模式
2009	华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室研发的抗虫水稻恢复系‘华恢 1 号’和杂交水稻系‘Bt 汕优 63’通过了转基因作物生物安全性论证

## 二、植物生物技术主要领域的发展

100 多年来,植物生物技术经历了植物组织培养技术、植物细胞工程技术和植物基因工程技术的发展过程,各个发展过程有先后顺序,又相互交叉,并与其他相关学科的发展紧密相联。植物细胞工程是在植物组织培养的基础上发展起来的,植物基因工程技术依赖于分子生物学、植物组织培养和细胞工程技术,三者之间的相互渗透促进了植物生物技术的深入发展。无论如何,植物组织培养是植物生物技术最根本的基础。

### (一) 植物组织培养的奠基和发展

20 世纪初至 50 年代是植物组织培养的奠基和发展阶段。其特征是培养基得到不断完善,成功地诱导离体培养细胞和组织再生植株,科学地论证了植物细胞的全能性理论。在 Haberlandt 的实验中,没有一个培养细胞能发生细胞分裂。其实验失败的原因在于:一是使用过于简单的培养基,即仅在 Knop 溶液中加入蔗糖;二是选用高度分化的实验材料,难以诱导细胞脱分化和细胞分裂。此后的 30 多年中,培养基成分没有得到较大的改进,因而仍然是制约植物组织培养发展的主要因素。直到 20 世纪 30 年代中期,B 族维生素的应用和生长素的发现,才奠定了植物组织培养的基础。White(1934)在培养基中加入酵母浸出液和蔗糖,培养番茄根获得成功。接着,他用 3 种 B 族维生素,吡哆醇(维生素 B<sub>6</sub>)、硫胺素(维生素 B<sub>1</sub>)和烟酸(维生素 B<sub>3</sub>)代替酵母浸出液,建立了适合于根培养的 White 培养基。Gautheret(1934)在 Knop 溶液中加入 B 族维生素和吲哚乙酸(IAA)后,使山毛柳形成层的生长显著增加。Skoog 和崔激(1948)发现,腺嘌呤与生长素的比例是控制烟草髓愈伤组织上芽和根形成的主要条件之一。随着细胞分裂素的发现,Skoog 和 Miller(1957)提出植物激素控制器官形成的概念,指出在烟草髓组织培养中,根和芽的分化取决于两类生长调节剂的相对浓度,生长素与细胞分裂素的比例高促进生根,其比例低则促进芽的分化。这一概念至今仍然被人们所接受。Reinert 和 Steward(1958)首次报道了胡萝卜悬浮培养细胞和愈伤组织形成体细胞胚胎,用实验科学地论证了植物细胞的全能性,标志着植物生物技术快速发展的开始。现今,人们已在分子水平上逐步揭示了基因对离体形态发生的调控

(第四章)。

## (二) 植物细胞工程技术的发展

细胞工程技术应用的领域包括试管苗快速繁殖(微繁殖)、花药和胚胎培养、通过细胞培养生产有用次生代谢产物、突变细胞的诱导和筛选、原生质体培养和融合,以及无病毒苗木的培育和种质资源保存等。

试管苗快速繁殖可以通过茎尖、侧芽、种子和愈伤组织再生苗,以及脱毒苗等进行。最早研究试管苗繁殖的 Knudson(1922)研究了兰花种子的非共生萌发,我国罗士韦教授在1945年率先进行了植物茎尖的培养,在植物生物技术发展中发挥了显著的作用。据许智宏院士统计,1996年我国已经有700种植物通过茎尖和愈伤组织培养再生植株。目前,已经实现试管苗繁殖产业化的植物有兰花、马铃薯、甘薯、香蕉、草莓、杨树、桉树、苹果、安祖花和月季等。试管苗年生产量达到千万株以上的植物有兰花、马铃薯、香蕉、草莓和杨树等。

花药或小孢子和未成熟胚珠培养是获得纯合杂种的主要途径。Vasil(1957)最早研究了洋葱花药的培养。1964年,Guha和Maheshwari获得了曼陀罗植物花药培养来源的单倍体植株,1976年培养未受精胚珠获得其单倍体植株。特别值得提出的是,朱至清教授(1975)设计出N6培养基,适合于水稻和其他禾本科植物花药的培养,在世界各国实验室中得到广泛应用,对主要农作物小孢子单倍体植株的培养起到很大的推动作用。据Bhojwani和Razdan(1996)统计,有25科134种植物的花粉诱导成单倍体植株。我国学者通过花药培养,育成10个小麦新品种,并使推广种植面积达到116万公顷;育成22个水稻新品种,种植面积达100万公顷;玉米1个新品种,推广种植面积为1万公顷;甜椒1个新品种,种植面积为0.58万公顷。我国在花药和胚珠培养研究领域处于领先地位。

Cocking(1960)利用纤维素酶和果胶酶降解细胞壁获得产量高的原生质体之后,促进了植物原生质体培养和体细胞杂交的研究。1971年,Takebe等获得烟草叶肉原生质体再生植株。据许智宏院士(1999)统计,原生质体培养成功的植物涉及46个科、161个属、368个种或亚种。我国学者首次报道的原生质体再生植株的植物有50多种。在原生质体培养成功的基础上,Carlson等(1972)获得光烟草(*Nicotiana glauca*)和蓝格斯多夫烟草(*N. langsdorffii*)种间体细胞杂种植株。Melchers等(1978)获得了马铃薯和番茄的属间体细胞杂种,并发现其具有耐寒性。1990年,加拿大烟草业公布了第一个原生质体融合的烟草新品种。除了获得植物种内、种间、属间和科间的体细胞杂种植株外,Makankawkeyoon等(1995)获得了植物界与动物界之间,即烟草与小鼠的体细胞杂种植株,杂种叶片中有小鼠免疫球蛋白G基因的表达。据贾敬芬教授统计,1984—1993年增加的体细胞杂种植物,种内组合的有14个,种间62个,属间47个,并有2个种间组合的胞质杂种。Li等(1999)报道,1983—1996年利用原生质体融合技术改良作物品种的涉及12个科、22个属、33个种的植物作为原生质体融合的受体,优良农艺性状的供体物种有89个种和2个杂种,涵盖40个属。这些体细胞杂种中种间体细胞杂种占65%,属间体细胞杂种占25%,种内体细胞杂种占10%。我国学者成功地进行了大豆与野大豆,烟草与龙葵,烟草与中宁枸杞,日本水稻与药用野生稻(*O. officinalis*),水稻与大黍,小麦与冰草(*Agropyron elongatum*),小麦与簇毛麦(*Haynldia villosa*),小麦与羊草(*Leymus chinensis*),小麦与新麦草(*Psathyrostachys juncea*),中华猕猴桃与美味猕猴桃,中华猕猴桃与狗枣猕猴桃,以及柑橘种、属间的体细胞杂交,并获得了再生植株。

早在1942年,Gautheret就报道了组织培养中的次生代谢产物,但直到Kaul和Staba(1967)发现阿密茴(*Ammi visnaga*)培养细胞的次生代谢产物产量与整体植物相等后,通过细胞培养生产有用化合物的研究才得到发展。在生物反应器设计、细胞培养阶段、诱发子和生物转化研究的基础上,国内外研究了工厂化培养细胞生产有用化合物,例如利用紫草细胞生产紫草素,长春花细胞生产吲哚碱,烟草细胞生产烟碱,人参细胞生产人参皂苷,红豆杉细胞生产紫杉醇等。从工厂化生产方面,Noguchi等(1977)使用了20 000 L的生物反应器培养烟草细胞;Tabata等(1978)报道了工厂化培养细胞生产紫草素;1983年,日本三井石油化学工业公司使用750 L植物细胞反应器培养紫草细胞生产紫草素。20世纪90年代,我国华中科技大学研究了工厂化培养红豆杉细胞及其紫杉醇的生产,成果显著。

植物组织培养中体细胞变异的研究起步较晚。Carlson(1970)进行生物化学诱变并筛选出烟草突变体。1981年,Larkin和Scowcroft提出体细胞变异的概念。根据Maluszynski等(1995)统计,利用组织培养诱导、筛选和培育的突变品种达1 700多个,涉及154种植物。

### (三) 植物基因工程技术的发展

植物基因工程对植物育种有间接和直接的影响作用。间接作用是筛选DNA分子标记和构建DNA分子标记遗传图谱,为植物育种,特别是数量性状遗传育种提供了参考。直接作用就是对植物基因进行遗传操作。植物基因工程的核心是DNA重组技术、T-DNA转化原理和植物细胞的全能性。DNA重组技术来源于分子生物学,而后两者完全体现了植物基因工程自身的特征。人们通过揭示T-DNA转化的原理,改造Ti质粒并构建植物表达载体系统,诱导转基因细胞分化,使植物基因工程成为植物生物技术中发展最快的研究领域。

20世纪80年代中期,转基因烟草问世。Powell-Abel等(1986)首次获得抗烟草花叶病毒(TMV)的转基因烟草植株,展现了转基因植物应用的前景,植物基因工程随即进入了快速发展时期。根据James的统计,1986—1997年,就有45个国家对60多种作物进行了近25 000例转基因植物的田间试验,其中仅1996—1997年即有约10 000例,约占40%。1994年,第一个基因工程农产品,即耐贮存的转基因番茄FLAVR SAVR<sup>®</sup>被批准在美国市场上销售。到1997年底,全球已有12种作物的48种转基因作物产品获准进行商品化生产;到2009年,被批准的转基因作物产品增加到762种,涉及24种农作物。转基因作物的全球种植面积从1996年的170万公顷增加到2009年的1.34亿公顷,提高了78.8倍,共有57个国家种植转基因作物。种植转基因作物面积达到5万公顷以上的国家从1996年的6个增加到2009年的25个。2009年转基因植物种植面积排名前6名的国家依次为:美国(6 400万公顷,占全球种植总面积的47.8%)、巴西(2 140万公顷,16%)、阿根廷(2 130万公顷,15.9%)、印度(840万公顷,6.3%)、加拿大(820万公顷,6.1%)和中国(370万公顷,2.8%)。主要转基因作物的种植面积依次是大豆6 920万公顷(占全球转基因作物种植面积的52%)、玉米4 170万公顷(31%)、棉花1 610万公顷(12%)和油菜640万公顷(5%)。主要的转基因性状是抗除草剂(62%)和抗虫(15%)。

植物基因工程不受自然界物种之间有性杂交不育的限制,充分利用不同的遗传资源来改良农作物,或使用植物生产有用次生代谢物质,以满足人类对食品和医药工业的需要,为科学和社会的发展提供了很好的机遇。据报道,1995年全球转基因产品的市场销售额为0.75亿美元,1996年增加了3倍,1997年为2.35亿美元,1998年为6.7亿美元,2002年达到40亿美元,2008年农民获得的净收益达到92亿美元,2009年转基因作物的全球市场价值增加到105亿美元,预

计到 2015 年转基因作物种植面积和产值都将翻一番。

我国的农业基因工程研究启动于 20 世纪 80 年代初期,并于 80 年代中期开始将生物技术列入国家高科技发展规划,即“863”计划。据中国农业生物技术学会统计,截至 1996 年底,我国正在研究的转基因植物种类达 47 种,涉及各类基因 103 个。经过我国科学工作者十多年的努力,在抗虫、抗病、品质改良、抗除草剂以及基因工程的安全性管理等方面均取得了很大进展。1997—1999 年批准的转基因中间试验共 48 项,涉及植物 11 种,有水稻、小麦、玉米、番茄、白菜、甜瓜、番木瓜、花生、广藿香、棉花和烟草;涉及的性状为抗虫(螟虫、飞虱),抗病(真菌、细菌、病毒),耐盐,抗冻和抗衰老。1997—1999 年批准的转基因植物向环境释放为 49 项,涉及植物 10 种,即水稻、玉米、大豆、马铃薯、番茄、甜椒、线辣椒、棉花、杨树和烟草;涉及的性状为抗虫、抗病、抗除草剂、耐贮藏。到 1998 年 12 月,已批准的转基因农作物商品化生产有 6 份。这 6 份批准的商品化生产包括两种抗棉铃虫棉花、耐贮藏番茄、转查尔酮合成酶基因矮牵牛、抗黄瓜花叶病毒、番茄和抗病毒甜椒。2009 年,我国抗虫棉种植面积达到 367 万公顷,占棉花种植总面积 680 万公顷的 68%。同年 11 月,农业部颁发了转植酸酶基因玉米“BVLA430101”、转 *Bt* 基因水稻恢复系‘华恢 1 号’和杂交水稻系‘Bt 汕优 63’的转基因作物生物安全证书,为转基因玉米和水稻的产业化生产建立了基础。在 21 世纪,我国科学工作者将在转基因作物研究和产业化生产中取得更大的成就。

## 思考题

1. 植物生物技术的发展经历了哪些阶段,各阶段突出的成果有哪些?
2. 在 21 世纪,植物组织培养、细胞工程和基因工程将可能取得哪些进展?

## 主要参考文献

- [1] 朱至清. 20 世纪我国植物学家对植物组织培养的贡献. 植物学报, 2002, 44: 1075-1084.
- [2] Altman A. Plant biotechnology in the 21st century: the challenges ahead. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1999, 2.
- [3] Bhojwani S S, Razdan M K. *Studies in plant science 5, plant tissue culture: theory and practice. a Revised Edition.* Amsterdam; Elsevier Science, 1996.
- [4] Chawla H S. *Introduction to Plant Biotechnology.* New Hampshire; Science Publishers Inc., 2002: 4-9.
- [5] Gamborg O L. Plant tissue culture. *Biotechnology milestones. In Vitro Cell Dev Biol - Plant*, 2002, 38: 84-92.
- [6] James C. 2009 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势——第一个十四年 1996—2009. *中国生物工程杂志*, 2010, 30: 1-22.
- [7] Soh W Y, Bhojwani S S. *Morphogenesis in Plant Tissue Cultures.* Kluwer Academic Publishers, 1999.



## 第二章 | 植物细胞的全能性

植物细胞的全能性是进行植物细胞工程和基因工程研究的重要理论基础。广义的细胞全能性(totipotancy)指一个细胞发育成一个完整有机个体的潜能或特性。植物细胞的全能性指具有完整细胞核的细胞,在适宜的条件下能够分化发育成完整植株的潜在能力。具有完整细胞核的植物细胞具有形成完整植株所必需的全部遗传信息,在生长发育过程中不同器官或组织细胞的基因表达有很大的差异,这种差异是遗传信息表达调控机制发生变化的结果,而不是遗传信息发生不可逆的消失或钝化。

将离体培养的植物细胞或组织诱导分化成完整植株的过程称为植物细胞全能性的表达。不同细胞基因的差异表达导致细胞生长发育和形态功能的差异,并造成细胞全能性表达的差异。在整体植株中,卵细胞的全能性表达最强,受精卵经过细胞分裂、分化直接形成种胚,并萌发生长成植株。茎尖或根尖分生组织细胞和形成层细胞的全能性次之,它们分别能形成茎叶、根和其他组织或器官。少数植物已分化成熟的器官,例如落地生根叶片,叶肉细胞的全能性可直接表达,使其分化生长成新的植株。对绝大多数植物而言,非分生组织细胞难以在整体植株上表达细胞的全能性,必须将它们与整体植株分离后,在适宜的培养条件下诱导细胞脱分化和再分化,才能使细胞的全能性得到表达,并发育成完整植株。离体培养细胞的全能性表达经历3个阶段,即植物细胞的脱分化与植物感受态细胞的发生,细胞分化的诱导或细胞的决定作用,以及组织、器官的形态分化和发育。

### 第一节 植物细胞的脱分化与植物感受态细胞的发生

脱分化指已分化的细胞在一定条件下恢复分裂机能,转变成分生组织细胞和形成愈伤组织的过程。脱分化过程中细胞的生化代谢、细胞生理和结构发生本质的变化,其中一部分细胞形成感受态细胞,即感受信号分子的刺激后,其生长和发育的途径发生改变的细胞。因此,脱分化是分化细胞在离体培养条件下细胞全能性表达的第一步。

#### 一、细胞周期与脱分化

成熟细胞脱分化成为分生组织细胞,需要进入细胞周期。植物分裂细胞从 $G_1$ 或 $G_2$ 期脱离细胞周期进入分化;同样,分化细胞脱分化也从 $G_1$ 或 $G_2$ 期进入细胞周期(图2-1)。分化细胞能否诱导脱分化进入细胞周期,取决于其分化程度和原初的生理状态。Gautheret(1966)观察到筛管细胞、细胞核开始降解的木质部细胞,以及细胞壁厚度超过 $2\mu\text{m}$ 的纤维细胞(成熟的纤维细胞细胞壁厚度为 $7\mu\text{m}$ )都不能再进入细胞周期。一般来说,脱分化能力的强弱依次是营养生长点细胞、形成层细胞、伴胞和分泌细胞、薄壁细胞等(图2-2)。脱分化的营养生长点细胞、形成层细胞、伴胞和分泌细胞、薄壁细胞能再分化成完整植株,而厚壁细胞、纤维细胞和筛管只能成