

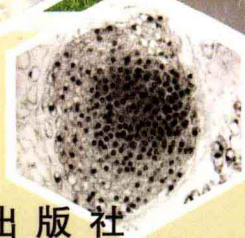


普通高等教育“十二五”精品课程建设教材

牧草生物技术

Forage Biotechnology

郭振飞 主 编
方 程 米福贵 王彦荣 副主编



中国农业大学出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS

普通高等教育“十二五”精品课程建设教材

牧草生物技术

郭振飞 主编

方 程 米福贵 王彦荣 副主编

中国农业大学出版社
• 北京 •

图书在版编目(CIP)数据

牧草生物技术/郭振飞主编. —北京:中国农业大学出版社,2011.1
ISBN 978-7-5655-0134-0

I. ①牧… II. ①郭… III. ①牧草-生物技术 IV. ①S540.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 215800 号

书 名 牧草生物技术

Mu Cao Sheng Wu Ji Shu

作 者 郭振飞 主编 方 程 米福贵 王彦荣 副主编

策划编辑 刘 军 宋俊果

封面设计 郑 川

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路 2 号

电 话 发行部 010-62731190,2620

编辑部 010-62732617,2618

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

经 销 新华书店

印 刷 涿州市星河印刷有限公司

版 次 2011 年 1 月第 1 版 2011 年 1 月第 1 次印刷

规 格 787×1 092 16 开本 19.25 印张 470 千字

印 数 1~3 000

定 价 29.00 元

责任编辑 田树君

责任校对 王晓凤 陈 莹

邮政编码 100193

读者服务部 010-62732336

出 版 部 010-62733440

e-mail cbsszs @ cau. edu. cn

图书如有质量问题本社发行部负责调换

编写人员

主 编 郭振飞(华南农业大学)

副 主 编 方 程(中国农业大学)
米福贵(内蒙古农业大学)
王彦荣(兰州大学)

参 编 者 (以姓氏笔画为序)
马晖玲(甘肃农业大学)
马 啸(四川农业大学)
王永雄(西南农业大学)
毕玉芬(云南农业大学)
张 博(新疆农业大学)
易克贤(华南热带农业大学)
曾会明(北京林业大学)

前 言

随着草业科学研究的不断深入,现代分子生物学理论和技术越来越多地渗透到草业科学的各个分支学科。最近十几年,国内外牧草和草坪草生物技术研究不断深入,在牧草、草坪草基因克隆、重要性状的 QTL 定位、遗传转化技术及目的基因转化等方面取得了相当的进展,已连续召开了 6 次国际牧草和草坪草分子育种学术会议。“十五”以来,国家的重点科技研究计划中列入了牧草和草坪草生物技术研究课题,科研投入不断增加,现代生物技术在牧草和草坪草育种研究中获得了日益广泛的应用。为了适应草业科学学科发展的新形势和新形势下草业科学人才培养的需要,在著名草地学专家、中国农业大学韩建国教授的倡议下,我们决定编写一本适合我国草业科学专业本科生用的《牧草生物技术》教材,由中国农业大学出版社出版。

2005 年《牧草生物技术》教材的编写工作开始,由华南农业大学郭振飞任主编,中国农业大学方程、内蒙古农业大学米福贵、兰州大学王彦荣任副主编,编写人员分工如下:绪论,郭振飞、方程;第 1 章,曾会明;第 2 章,马晖玲、方程;第 3 章,马晖玲;第 4 章,马晖玲、米福贵、曾会明;第 5、6、7 章,郭振飞、方程;第 8、9 章,郭振飞;第 10 章,方程;第 11 章,毕玉芬;第 12 章,易克贤、张博;第 13 章,王晓娟、王彦荣、张吉宇;第 14 章,何庆元、王永雄;第 15 章,马啸;第 16 章,马啸、方程;第 17 章,方程。郭振飞和方程对全书进行了统稿。

由于这是第一本《牧草生物技术》教材,我们在编写过程中,重点参考了国内生物技术相关的教材、专著和论文综述等,主要的参考书目已列在各章的参考文献中,限于篇幅,部分文献未列出。韩建国教授对本教材的编写给予了多方面的指导和帮助,李聪研究员对编写提纲提出了宝贵建议。我们对上述提及的所有人员表示衷心感谢!由于作者水平有限,此教材错误与不足之处一定很多,希望读者在使用中能提出意见和建议,以利于我们以后进一步修改和完善。

编 者

2010 年 8 月

目 录

绪论	1
第 1 章 植物细胞工程概述	5
1.1 植物组织培养的发展历程	5
1.2 植物细胞工程相关概念、任务与研究内容	6
1.2.1 植物细胞工程的概念	6
1.2.2 植物细胞工程的任务	7
1.2.3 植物细胞工程的内容	7
1.3 植物细胞工程基本理论与原理	7
1.3.1 植物细胞全能性	7
1.3.2 植物细胞的脱分化和再分化	8
1.3.3 植物细胞的形态建成	11
1.4 植物细胞工程研究的基本设备和方法	12
1.4.1 基本设备	12
1.4.2 无菌操作	12
1.4.3 培养基	15
第 2 章 植物愈伤组织的培养、再生及体细胞无性系变异	19
2.1 愈伤组织的诱导与继代培养	19
2.1.1 脱分化及愈伤组织的诱导	19
2.1.2 愈伤组织的继代培养	20
2.2 愈伤组织的再分化与植株再生	21
2.2.1 器官发生途径与植株再生	21
2.2.2 体细胞胚发生途径与植株再生	22
2.3 体细胞变异与育种	23
2.3.1 体细胞无性系变异的概念及特点	23
2.3.2 体细胞无性系变异的机理	23
2.3.3 体细胞无性系变异的类型与频率	26
2.3.4 体细胞无性系变异的诱导和筛选	27
2.3.5 体细胞无性系变异在作物育种上的应用	30
2.3.6 体细胞无性系变异在牧草和草坪草育种上的应用	31
第 3 章 植物细胞培养、原生质体培养与体细胞杂交	35
3.1 植物单细胞培养及应用	35

3.1.1	单细胞的分离	35
3.1.2	单细胞的培养方法	36
3.1.3	影响单细胞培养的若干因素	39
3.2	植物原生质体培养	40
3.2.1	植物原生质体研究的历史和现状	40
3.2.2	原生质体的应用	41
3.2.3	原生质体的分离和纯化	41
3.2.4	牧草原生质体培养	46
3.3	原生质体融合	46
3.3.1	原生质体融合方法	46
3.3.2	原生质体融合方式	47
3.3.3	体细胞杂种的筛选和鉴定	49
3.4	体细胞杂交与育种	50
3.4.1	植物体细胞杂交的用途	50
3.4.2	植物体细胞杂交技术在牧草研究中的应用	51
第4章	单倍体培养、胚器官培养、植物快繁与脱毒	54
4.1	单倍体培养及育种	54
4.1.1	单倍体及其获得	54
4.1.2	花药培养及其影响因素	55
4.1.3	花粉(小孢子)培养	57
4.1.4	从雌配子体诱导单倍体植株	58
4.1.5	单倍体细胞培养与植物育种	58
4.2	胚器官培养与育种	59
4.2.1	胚培养	60
4.2.2	胚乳培养	62
4.2.3	胚器官培养在牧草育种上的应用	63
4.3	快繁与脱毒	64
4.3.1	植物的离体快速无性繁殖	64
4.3.2	植物的脱毒培养	65
4.3.3	无毒苗的繁殖	66
第5章	基因工程的概念与原理	68
5.1	基因工程概述	68
5.1.1	基因的概念及其发展	68
5.1.2	基因工程的概念及其发展	72
5.2	基因工程的主要研究内容	75
5.3	植物基因工程的应用	76
5.3.1	基因工程在农作物优质丰产及综合性状改良育种上的应用	76
5.3.2	基因工程在抗生物胁迫上的应用	77

5.3.3 基因工程在抗非生物胁迫育种上的应用	78
5.3.4 基因工程在植物医药基因工程上的应用	79
5.3.5 转基因作物的应用及前景	79
第6章 目的基因的克隆	82
6.1 聚合酶链式反应	82
6.1.1 PCR 反应体系	82
6.1.2 PCR 反应的步骤	83
6.1.3 PCR 产物的克隆	85
6.1.4 PCR 技术的应用	85
6.2 植物基因克隆常用的工具酶	85
6.2.1 限制性内切酶	86
6.2.2 DNA 聚合酶	88
6.2.3 其他酶	90
6.3 植物基因的克隆	93
6.3.1 根据已知基因的序列分离克隆目的基因	93
6.3.2 根据 DNA 的插入作用分离克隆目的基因	95
6.3.3 根据基因的差异表达分离克隆目的基因	97
6.3.4 根据基因定位分离克隆目的基因	100
6.3.5 利用生物信息学手段分离克隆目的基因	101
第7章 植物基因工程常用的载体及其构建	103
7.1 载体概述	103
7.1.1 载体概念和基本条件	103
7.1.2 载体的种类	103
7.2 常用的克隆载体	104
7.2.1 质粒载体	104
7.2.2 噬菌体载体	107
7.2.3 柯斯质粒载体	109
7.2.4 噬菌粒载体	110
7.2.5 人工染色体载体	111
7.2.6 植物转化载体	112
7.2.7 植物表达载体	118
7.3 载体的构建	122
7.3.1 植物克隆载体的构建	122
7.3.2 嵌合基因表达载体的构建	123
7.3.3 植物转化载体的构建	125
第8章 遗传转化技术	127
8.1 植物遗传转化概述	127
8.2 遗传转化的受体系统	128

8.2.1 遗传转化受体系统的条件	129
8.2.2 遗传转化受体系统的类型	129
8.3 遗传转化技术	130
8.3.1 农杆菌介导的转化	131
8.3.1 基因枪法	138
8.3.3 将 DNA 直接转移导入原生质体	140
8.3.4 超声波转化法	141
8.3.5 硅碳纤维漩涡介导的转化	142
8.3.6 花粉管通道法	142
8.3.7 生殖细胞浸泡法	142
8.3.8 各种基因转化系统的评价及选择原则	143
第 9 章 转基因植物的检测与鉴定	145
9.1 外源基因整合的检测与鉴定	145
9.1.1 PCR 检测	145
9.1.2 Southern 杂交	146
9.2 外源基因表达的检测	150
9.2.1 外源基因转录的检测——Northern 杂交	151
9.2.2 RT-PCR 检测	152
9.3 外源基因表达蛋白的检测——Western 杂交	154
9.3.1 Western 杂交的原理	155
9.3.2 Western 杂交的步骤	155
9.4 报告基因的检测	156
9.4.1 GUS 的检测	156
9.4.2 GFP 的检测	157
9.5 转基因植物性状鉴定	157
9.6 转基因植物的遗传特性	158
9.6.1 转基因的整合及其遗传效应	158
9.6.2 转基因的遗传稳定性	161
9.6.3 转基因的遗传规律	161
第 10 章 转基因植物的安全性评价	163
10.1 转基因植物安全性	164
10.1.1 转基因植物的环境安全性	164
10.1.2 转基因植物食品的安全性	166
10.2 转基因植物安全性评价内容	169
10.2.1 转基因植物环境安全性评价	169
10.2.2 转基因植物食品安全性评价内容	170
10.3 我国对转基因植物的管理	171
10.3.1 法律法规建设	171

10.3.2 管理体系建设	172
第 11 章 基因工程在牧草品质改良上的应用	173
11.1 牧草品质及其形成因素	173
11.1.1 植物器官比例、结构、质地、成熟度等	173
11.1.2 矿物质元素含量	174
11.1.3 蛋白质含量与蛋白质组分	174
11.1.4 采食量和消化率	174
11.1.5 适口性	175
11.1.6 植物有毒有害物质含量	175
11.1.7 抗病抗虫性	175
11.2 品质相关基因	175
11.2.1 木质素生物合成相关基因	175
11.2.2 提高蛋白质含量、改良蛋白组分的基因	176
11.2.3 缩合单宁生物合成相关基因	176
11.3 基因工程在牧草品质改良上的应用	176
11.3.1 增加蛋白质组分中含硫氨基酸的含量	177
11.3.2 降低木质素含量,增加果聚糖含量,提高牧草消化率	177
11.3.3 改变次生代谢物含量	178
第 12 章 基因工程在牧草抗生物胁迫育种上的应用	181
12.1 抗病性	181
12.1.1 牧草常见的病害及其抗病机制	181
12.1.2 常用的抗病基因	184
12.1.3 基因工程在牧草抗病育种上的应用	187
12.1.4 牧草抗病基因工程的前景与展望	189
12.2 抗虫性	189
12.2.1 牧草常见的虫害及抗虫性	189
12.2.2 常用的抗虫基因	191
12.2.3 基因工程在牧草抗虫育种上的应用	193
第 13 章 基因工程在牧草抗非生物胁迫育种上的应用	196
13.1 抗旱性	196
13.1.1 植物对干旱的适应及抗性机制	196
13.1.2 常见的抗旱相关基因	198
13.1.3 基因工程在牧草抗旱育种中的应用	200
13.2 抗盐性	201
13.2.1 植物对盐碱胁迫的适应及抗性机制	201
13.2.2 常见的抗盐相关基因	202
13.2.3 基因工程在牧草耐盐育种中的应用	203
13.3 抗寒性	204



13.3.1 植物对低温的适应及抗性机制	204
13.3.2 常用的抗寒相关基因	205
13.3.3 基因工程在牧草抗寒育种中的应用	206
13.4 抗热性	207
13.4.1 植物对高温的适应及抗性机制	207
13.4.2 常用的抗热相关基因及其在牧草抗热育种上的应用	208
13.5 抗铝毒能力	208
13.5.1 植物对铝毒的适应及抗性机制	208
13.5.2 常用的抗铝毒基因	209
13.5.3 基因工程在牧草抗铝毒育种上的应用	209
13.6 抗除草剂能力	209
13.6.1 除草剂的作用机制	209
13.6.2 抗除草剂基因及其应用	210
13.6.3 基因工程在抗除草剂牧草育种中的应用	211
第14章 豆科牧草-根瘤菌的共生固氮	213
14.1 共生固氮的概念	213
14.1.1 共生固氮的类型	213
14.1.2 共生固氮研究的历史回顾和展望	214
14.2 根瘤的形成、结构与功能	215
14.2.1 根瘤的形成过程	215
14.2.2 根瘤的结构和功能	217
14.3 根瘤菌与豆科植物的关系	218
14.3.1 根瘤菌与豆科植物的互接种簇关系	219
14.3.2 与共生固氮相关的基因与作用	219
14.3.3 共生固氮各阶段的信息传递和基因表达	220
14.4 共生固氮机制	222
14.4.1 固氮的酶学机制	222
14.4.2 固氮的基因及其调控	223
14.4.3 影响固氮效率的因素	223
14.5 生物技术在改良豆科牧草共生固氮上的应用	224
14.5.1 根瘤菌的改良	225
14.5.2 固氮技术在豆科牧草中的应用	225
第15章 遗传标记概述	227
15.1 遗传标记的发展和重要性	227
15.2 遗传标记的种类和特点	229
15.2.1 形态标记	229
15.2.2 细胞学标记	231
15.2.3 生化标记	233

15.2.4 分子标记	235
第 16 章 常用 DNA 分子标记技术	239
16.1 基于分子杂交的分子标记技术	239
16.1.1 RFLP 标记	239
16.1.2 VNTR 标记	242
16.1.3 EST 标记	243
16.2 基于 PCR 技术的分子标记技术	244
16.2.1 任意引物的 PCR 标记	244
16.2.2 特异引物的 PCR 标记	254
16.3 基于单核苷酸多态性的 DNA 标记——SNP 标记	259
16.3.1 单链构象多态性分析法	260
16.3.2 变性梯度凝胶电泳分析法	260
16.3.3 芯片杂交分析法	261
第 17 章 植物基因组学简介	263
17.1 植物基因组学概述	263
17.1.1 植物基因组学概念及内容	263
17.1.2 基因组学发展过程	264
17.1.3 基因组学研究意义	264
17.2 基因文库的构建	264
17.2.1 基因文库的种类	265
17.2.2 基因文库的基本要求	265
17.3 DNA 测序技术	266
17.3.1 经典核苷酸测序技术基本原理	267
17.3.2 现代常用测序技术	269
17.4 植物结构基因组学	271
17.4.1 图谱构建	271
17.4.2 基因定位	277
17.4.3 比较基因组学	283
17.5 功能基因组学	285
17.5.1 功能基因组学的主要研究内容	285
17.5.2 功能基因组学的研究方法	286

绪 论

生物技术(biotechnology),又称生物工程(bioengineering),是以生命科学为基础,利用生物(或生物组织、细胞及其他组成部分)的特性和功能,设计、构建具有预期性能的新物质或新品系,以及与工程原理相结合,加工生产产品或提供服务的综合性技术。随着生物技术的不断进步,生物技术与人类的关系日益紧密,人们对生物技术重要性的认识也不断提高,许多专家学者认为 21 世纪是生命科学的世纪,它的发展为缓解和从根本上消除人类发展面对的人口、资源和环境三大问题带来了希望。

1. 生物技术的产生和发展

生物技术自古有之,它是随着人类的进化而产生、伴着人类为提高生活水平的不懈努力行为而进步的,它是人类文明不断前进的必然产物。几千年来世界范围普遍采用的生产酱、醋、酒(酒精)、面包、奶酪、酸奶等的工艺,中国特有的制造腐乳、臭豆腐技术等都是生物技术的应用,这些技术称为传统生物技术。Biotechnology 一词最早是由匈牙利农业工程师 Ereky 于 1917 年提出,他把用甜菜作为饲料进行大规模养猪定义为生物技术,表达了利用生物将原料转化为产品的含义。限于该事件的影响这一新名词并没有引起太多人的注意,到 1933 年英文的 biotechnology 一词才第一次在 Nature 杂志中出现。在 20 世纪,生物技术的应用在许多领域都有重大的进步:1928 年英国著名细菌学家 Fleming 发明了青霉素,1945 年后,这一对提高人类的健康水平有重要意义的抗生素在全世界得到了推广;50 年代后,对医药、食品行业等都有重要意义的氨基酸工业成为一个朝气蓬勃的新兴工业体系;60 年代后,酶制剂工业也取得了快速发展。这些生物技术产业中的新成员,都有力地提高了社会生产力,从而使人们对生物技术有了较深的认识。

人们目前所说的生物技术是特指现代生物技术,而现代生物技术是以 20 世纪 70 年代 DNA 重组技术的建立为标志。1973 年,美国加利福尼亚大学旧金山分校的 Boyer 教授和斯坦福大学的 Cohen 教授共同完成了一项著名的实验,他们选用一个仅含有单一 *EcoR* I 位点的质粒载体 pSC101,并用 *EcoR* I 将其切为线性分子,然后将该线性分子与同样具有 *EcoR* I 黏性末端的另一质粒 DNA 片段和 DNA 连接酶混合,从而获得了具有两个复制起始位点的新的 DNA 组合,并据此提出了基因克隆的策略,从而揭开了人类现代生物技术的新纪元。

DNA 重组技术是建立在以遗传学、分子生物学等为核心的生命科学研究不断取得重大突破的基础之上的。1860 年, Mendel 发现了分离定律和自由组合定律,提出了遗传因子概念。1910 年 Morgan 发现了基因的连锁和交换,1903 年 Sutton 发现了染色体是遗传因子的载体,1944 年 Avery 阐明了 DNA 是遗传信息的携带者,1953 年 Watson 和 Crick 提出了 DNA 的双螺旋结构,并阐明了 DNA 的半保留复制。1961 年 Crick、Nirenberg 等

开始破译遗传密码,到了 1966 年,所有 64 种密码子全部被破译出来。1970 年 Sndth 和 Wilcox 分离了第一种限制性内切酶。

此后,现代生物技术取得了飞速发展。20 世纪 70 年代中期,Sanger 等人首次建立了 DNA 测序技术,并测定了 Φ X174 病毒基因,接着猴病毒 SV40 的基因全 DNA 序列被测定。20 世纪 80 年代人类胰岛素通过基因工程在细菌的表达进行了商业化生产,成功地获得了转基因植物,发明了聚合酶链式反应(PCR)。1988 年和 1990 年美国先后启动的“人类基因组计划”和“植物基因组学”计划,更是加速了生物技术基础研究和应用的步伐,促进了生物技术的发展。在 2000 年完成人类基因组和模式植物拟南芥的测序后,多种模式生物的基因组测序相继完成,为生物技术的开发应用奠定了基础。

近年来现代生物技术的研究和开发取得了显著的成果,使得现代生物技术成为一门分支众多、涉及诸多学科的综合性的技术,依据研究对象不同有微生物生物技术、动物生物技术、植物生物技术等;依研究领域不同有医药生物技术、食品生物技术、环境生物技术、海洋生物技术、军事生物技术、航天生物技术等。涉及的学科主要有分子生物学、微生物学、生物化学、遗传学、细胞生物学、化学工程、生物统计学、计算机科学等。

2. 生物技术的主要内容

现代生物技术主要包括如下几个方面的内容:基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程和蛋白质工程。

基因工程(gene engineering)又称基因重组技术(recombinant DNA technique)或基因工程技术(gene technology),是指根据人们的意愿获取目的基因,在体外进行基因的切割、拼接和重新组合,然后再转入生物体内,使该基因能在受体细胞内复制、转录和翻译,以产生人们所期望的产品。基因工程是现代生物技术的核心内容,它不仅可克服物种间的遗传障碍,获得理想的物种,以满足人类社会的需要,还可有力地带动现代细胞工程、现代酶工程、现代发酵工程和现代蛋白质工程的发展。

现代细胞工程(cell engineering)是指应用现代细胞生物学、发育生物学、遗传学和分子生物学的理论与方法,在细胞水平上研究、开发、利用各类细胞的工程。根据细胞类型的不同,可以把细胞工程分为植物细胞工程和动物细胞工程两大类。细胞工程由 4 个方面的内容组成,它们分别是染色体工程、染色体组工程、细胞质工程和细胞融合工程。

现代酶工程(enzyme engineering)又称酶工艺学,是利用酶的催化作用,通过工程学的手段,在一定的生物反应器中,将相应的原材料转化成所需的产品。将酶引入工业,充分利用了酶专一性强、效率高、反应条件温和、不污染环境等特点,可极大提高生产效率。酶工程主要包括生物酶工程和化学酶工程两方面。酶工程的产生和发展给人工合成食物开辟了光辉的前景,相信总有一天,人类将能实现在工厂里生产食品的愿望。

现代发酵工程(fermentation engineering)是指采用工程技术手段,利用生物(主要是微生物)和有活性的离体酶的某些功能,为人类生产有用的生物产品,或直接用微生物参与控制某些工业生产过程的一种技术。前面提到的传统生物技术主要就是发酵工程技术,而现代技术与传统技术的本质区别是现代技术能通过基因工程人为控制和改造微生物,提高产量和质量。

现代蛋白质工程(protein engineering)是利用基因工程手段和基因表达对蛋白质进行

改造,以期获得性质和功能更加完善的蛋白质分子的技术。而广义的蛋白质工程还可包括蛋白质的分离纯化、结构和功能的分析等。蛋白质工程的基本途径是:根据预期的蛋白质功能,设计预期的蛋白质结构,推测可能的氨基酸序列,找到相对应的基因或对基因进行改造。

3. 植物生物技术在农业上的应用

20 世纪 70 年代细胞生物学和分子生物学的迅速发展导致了植物细胞工程和基因工程的建立,两者的结合构成了现代植物生物技术,80 年代后诞生了分子标记技术,扩充了现代植物生物技术的内容。植物生物技术(plant biotechnology)是指对植物性状进行改造的生物技术,主要包括植物基因工程、细胞工程和分子标记技术等。

植物基因工程包括目的基因的分离及其在植物性状改良上的应用。植物性状改良的目的是培育高产、优质、高效和抗逆性强的作物新品种,以生产足够的粮食、蔬菜、水果及其他经济植物,保障人类的生存,促进社会的发展。基因工程突破了物种间的生育隔离,使远缘植物之间甚至不同物种之间可以进行基因交换,定向改变植物的某种性状,为作物育种提供了新的手段。随着生命科学的发展及一些模式植物和重要经济植物基因组测序的完成,已从植物中分离和鉴定了众多的有用基因,为植物的性状改良打下了基础。自 1983 年世界上首次成功获得第一株转基因植物以来,植物的遗传转化技术也在不断完善,越来越多的植物能够成功地被导入外源基因,并获得转基因植株,这些研究成果推动了植物基因工程在农业上的应用。目前至少有 300 多种基因(性状)用于转化几十种植物,在农作物的品质改良、提高油料含油量、增强抗虫性、抗病性和抗除草剂等方面,取得了显著进展,获得了转基因大豆、玉米、马铃薯、水稻、小麦等粮食作物,油菜、花生等油料作物,番茄、白菜、甜椒、香蕉、木瓜、矮牵牛、康乃馨等果蔬、花卉植物,棉花、亚麻等纤维植物,转基因作物在美国、加拿大、阿根廷、中国、巴西、澳大利亚等国家种植面积逐年扩大,为现代农业发展做出了巨大的贡献。

植物细胞工程包括器官培养、胚胎培养、组织培养和原生质体培养及其延伸出的植物脱毒培养、突变体筛选、细胞无性系变异、体细胞杂交、超低温冷冻贮藏和人工种子等技术,植物组织和细胞培养是植物细胞工程的核心技术。自 20 世纪 30 年代建立植物组织培养技术后,经过了 60 年代以来的迅速发展,并在农业生产上得到广泛应用。植物组织培养技术已应用于快速繁殖某些重要花卉、园艺植物、经济植物和药用植物等,对珍稀濒危植物进行快速繁殖或超低温保存,通过花药培养、花粉培养进行单倍体育种,药用植物及其有效成分的工业化生产,通过诱导无性细胞系变异、筛选突变体、原生质体融合等培育农作物新品种。此外,植物组织培养技术还是进行植物遗传转化的基础。

分子标记(molecular markers)技术在植物分类学、遗传多样性、种质资源保护、遗传图谱的建立、基因定位与辅助选择育种、指纹图谱应用于作物品种鉴定等方面均取得了较好的应用效果。自 20 世纪 80 年代限制性片段长度多态性技术(RFLP)的建立和基因指纹图谱应用于 DNA 多态性分析后,新的分子标记技术不断涌现,推动了农作物的遗传作图,目前已建立了许多重要农作物的分子图谱。分子图谱又推动了数量性状基因座(quantitative trait loci, QTL)定位的研究和进展。指纹图谱在资源保护、品种鉴定、指导杂交组合配制和杂种优势预测等方面具有重要作用。

4. 牧草生物技术发展与展望

牧草是植物的重要组成部分,牧草生物技术是指以牧草为研究对象的生物技术。

牧草生物技术研究起步较晚,相对于农作物来说,无论是其基础理论还是应用技术研究都存在差距。出现这种状况的原因是多方面的,但基本有两条:①人们对牧草在国民经济中的重要性认识不足,对牧草生物技术研究投入的人力和物力太少。②大多数牧草存在一些不利于分子研究的特性,如自交不孕或严重衰退、染色体组的多倍性等。尽管如此,20多年来牧草生物技术研究仍取得了一定的成绩,为促进牧草育种、草产品的加工利用等做出了重要贡献。当前牧草生物技术研究成果主要集中在如下三个方面:①牧草组织培养:世界上约有75%的牧草属于禾本科牧草,而禾本科牧草的组织培养再生相对较难。目前已形成再生植株的禾本科牧草和草坪草有30多个属的65个种。少数禾草与小麦杂交通过胚拯救获得了再生植株。②牧草转基因研究:到目前为止有近20个牧草种成功建立遗传转化体系,也产生了一些转基因的牧草和草坪草,但转基因牧草在生产中的应用少见报道。③基因组学研究:约有12个牧草和草坪草构建了遗传图谱,并对种子产量等一些重要农艺性状进行了QTL定位研究,近年来国际上启动了豆科牧草模式植物截型苜蓿基因组测序计划和欧洲黑麦草属基因组启动计划,并取得了较好的进展。

随着生活水平的不断改善,人们必然会更加关注生态环境的保护,草与人类关系重要性的认识也将会不断提高。另外,草在生物质能源的研究中也占有相当重要的地位。由此,我们有理由相信,随着大豆、截型苜蓿等豆科模式植物及禾本科的水稻及一些草类植物基因组测序的相继完成和功能基因研究的进展,牧草生物技术将迎来一个新的大发展时期。

第 1 章 植物细胞工程概述

细胞工程(cell engineering)是指应用细胞生物学和分子生物学的方法,在细胞或亚细胞(细胞器)水平,按人们的意愿来改变细胞的遗传物质或获得细胞产品的一门综合技术科学。细胞工程涉及的领域相当广泛,就其技术范围而言,大致有细胞融合技术、细胞拆合技术、胚胎移植技术、组织培养技术、染色体导入技术和基因转移技术等。根据研究对象的不同,可以把细胞工程分为植物细胞工程和动物细胞工程两大类。植物细胞工程是在植物组织培养基础上发展起来的。

1.1 植物组织培养的发展历程

20 世纪初,在 Schleiden 和 Schwann 所发展起来的细胞学说推动下,1902 年德国植物学家 Haberlandt 提出了高等植物的器官和组织为许多细胞组成的观点以及植物细胞全能性的理论,即植物的体细胞在适当的条件下具有不断分裂和繁殖、发育成完整植株的潜在能力。他首次发表了植物离体细胞培养实验的报告。1912 年,Haberlandt 的学生 Kotte 和美国的 Robins 在根尖培养中获得了组织培养的成功。Robins 用含无机盐、葡萄糖或果糖的琼脂培养基,培养了长度为 1.45~3.75 cm 的豌豆、玉米和棉花的茎尖,形成了一些缺绿的茎和根。

自 Haberlandt 的实验之后,直到 1934 年美国的 White 由番茄根建立了第一个活跃生长的无性繁殖系,并反复转移到新鲜培养基中继代培养,使根的离体培养实验获得了真正的成功,并在以后 28 年间培养了 1 600 代。这之后,White 又以小麦根尖为材料,研究了光、温度、通气、pH、培养基组成等各种培养条件对生长的影响,并于 1937 年建立了第一个组织培养的综合培养基,其成分均为已知化合物,包括 3 种 B 族维生素,即吡哆醇、硫胺素和烟酸,该培养基后来被定名为 White 培养基。与此同时,Gautheret(1934)在研究山毛柳和黑杨等形成层的组织培养实验中,提出了 B 族维生素和生长素对组织培养的重要意义,并于 1939 年连续培养胡萝卜根形成层获得首次成功。同年,White 由烟草种间杂种的瘤组织,Nobecourt 由胡萝卜均建立了与上述类似的连续生长的组织培养物。因此,Gautheret,White 和 Nobecourt 一起被誉为组织培养学科的奠基人。我们现在所用的培养方法和培养基,基本上都是由这三位科学家建立的。后来,White 于 1943 年发表了专著《植物组织培养手册》,使植物组织培养开始成为一门新兴的学科。

20 世纪 40 年代,Skoog 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培养基中生长素(IAA)对芽形成的抑制作用且能诱导形成芽,从而