



普通高等教育“十一五”规划教材



园艺植物 生物技术

巩振辉 © 主编



科学出版社
www.sciencep.com

普通高等教育“十一五”规划教材

园艺植物生物技术

巩振辉 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

全书包括绪论、园艺植物组织培养的理论基础与基本技术、园艺植物脱毒与离体快速繁殖、园艺植物种质离体保存与无性系变异筛选、园艺植物的细胞工程、园艺植物的染色体工程、植物基因工程的基础知识与技术、园艺植物基因的分离与克隆、园艺植物遗传转化载体的构建、园艺植物遗传转化、转基因技术在园艺植物育种上的应用、园艺植物的分子标记、园艺植物生物技术与生物信息学,以及园艺植物生物技术的安全性评价与管理等内容。其内容新,起点高,能充分体现本学科的新技术与新方法。每章有小结、复习思考题与推荐读物,书后附有参考文献,便于同学自学。

全书概念准确、内容丰富、资料翔实、信息量大、条理清晰、结构合理、逻辑性强、生物技术方法与技术详细具体、图文并茂、实用性强、通俗易懂。

本书可作为高等农林院校园艺专业及相关专业本科生教材,也可作为其他院校有关专业本科生、研究生、科研人员和教师的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

园艺植物生物技术/巩振辉主编. —北京:科学出版社, 2009

(普通高等教育“十一五”规划教材)

ISBN 978-7-03-023236-6

I. 园… II. 巩… III. 园林植物-生物技术 IV. S68

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 163399 号

责任编辑:甄文全 丛楠/责任校对:陈玉凤

责任印制:张克忠/封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京市农林印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009 年 1 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2009 年 1 月第一次印刷 印张:19

印数:1—3 000 字数:406 000

定价:36.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈农林〉)

序

在《园艺植物生物技术》将要付梓之际，我很高兴受主编巩振辉教授之邀为本书作序。我和巩振辉教授是大学同学。早在 1989 年，我们就一起在国内开展了农杆菌介导的遗传转化研究工作。1992 年我从西北农业大学（现西北农林科技大学）调入中国科学院上海植物生理研究所（现中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所）工作后，与巩振辉教授长期保持合作，曾经共同申请或参加多项国家、省部级研究课题。巩振辉教授于 1995~1996 年、2001~2002 年先后赴英国格拉斯哥大学与澳大利亚国立大学研修植物生物技术与分子遗传学，在园艺植物生物技术领域开展了大量卓有成效的工作，具有深厚的植物生物技术基础与丰富的教学经验。与其他植物生物技术的教材或专著相比，由他挂帅编撰的这本《园艺植物生物技术》教材更能体现园艺植物研究的特点和要求。生物技术涉及许多新的学科领域，发展迅速，它是学科交叉的产物，如何在如此广阔复杂的知识体系中找到适合园艺专业的内容，且能利于学生在有限的学时内学习领会其精髓？此书做到了“窥一斑而知全豹”的编写思路。作者对园艺植物生物技术的基础原理与实际应用有许多自己独特的思想与见解，深入浅出地反映了园艺植物生物技术的最新发展水平。

该书突出了交叉学科的特点，在强化生物技术基本理论知识的同时，十分注重这些知识在园艺植物研究中的实际应用。其内容覆盖了园艺植物生物技术的各个层面，包括脱毒与快繁、种质离体保存与无性变异系筛选、细胞工程、染色体工程、基因克隆与功能研究、转基因技术、遗传图谱构建与重要基因定位、分子标记辅助选择育种、生物信息学及生物技术安全性评价等，结构体系保持了学科的知识性、系统性、实用性和前瞻性。更可贵的是，在每章的最后都安排了小结、课后习题和推荐读物，为学生复习和进一步学习提供了拓展空间。

生物技术是 21 世纪最具活力的学科领域之一，生物技术产业将逐步成为世界经济体系的支柱产业之一，生物技术与农业的结合则是高速发展的新兴前沿学科之一，在粮食、环境以及能源等全球性问题的解决方面将发挥着越来越重要的作用。园艺植物生物技术是农业生物技术的重要组成部分，生物技术与传统技术密切结合已经成为园艺植物研究的重要工具，并在各个领域显示出了强大的生命力。任何学科都处于不断发展之中，及时总结学科理论知识与应用成果并传授给青年学生与科研工作者，对学科的传承与发展具有重大意义。很荣幸能有机会拜读此书，并为之作序。希望这本《园艺植物生物技术》的编辑出版对园艺植物生物技术学科的发展和人才的培养教育发挥重要的推动作用。

何玉科

中国科学院上海生命科学研究院

植物生理生态研究所

2008 年 8 月 18 日

前 言

国际科技界和各国政府普遍认为, 21 世纪是生物学世纪。生物技术在解决人类面临的重大问题, 如人类与健康、资源与环境、粮食安全、生物安全、能源安全以及国家安全等方面, 具有极为重要和不可替代的作用, 越来越为各国政府和科学家所关注。世界各国, 特别是一些发达国家投巨资进行生物技术的研究与开发, 发展势头强劲, 硕果累累。无可质疑, 生命科学的新发现, 生物技术的新突破, 生物技术产业与生物经济的新发展必将对经济和人类社会产生巨大而深远的影响。

生物技术发展的重点领域是基础生物学、医药生物技术、农业生物技术、环境生物技术、生物多样性和生物安全等。生物技术的研发与应用的主要内容包括动植物基因工程、细胞工程、酶工程及发酵工程等。园艺植物生物技术是农业生物技术的重要领域, 它以农业生物, 尤其是园艺植物为主要研究对象, 以应用为目的, 如培育无毒苗木、优良种苗快速繁殖、人工种子研究与应用、园艺种质资源的研究与利用、培育园艺植物新品种等, 以植物组织培养、植物细胞工程、植物染色体工程、植物基因工程、植物分子标记和生物信息学等现代生物技术为主体的综合性技术体系。大量生产实践证明, 园艺科学在我国产业结构调整、增加农民收入、解决“三农”问题、实现可持续发展、加速经济社会发展、全面建设小康社会的发展战略中发挥着重要作用。大力发展园艺植物生物技术对于改造和提升园艺学科、全面推进我国农业生物技术及其产业的发展、抢占生物经济的制高点, 具有极为重要的战略意义。

生物技术及其产业的迅猛发展极大地促进了园艺植物生物技术的教学与研究。自 20 世纪 80 年代以来, 国内外出版了不少有关生物技术的读本、专著与教材, 这些出版物无疑对推动园艺植物生物技术的教学、科研与产业发挥了重要作用。但是, 生物技术应用领域十分广泛, 分支学科非常多, 而目前真正能适应园艺及其相关专业教学的优秀教材却很少。此外, 近十年来, 园艺植物生物技术, 尤其是以基因工程为核心的现代生物技术在园艺学科上的应用理论不断完善和创新, 应用范围迅速扩大, 应用技术不断发展, 各校园艺专业及其相关专业都先后开设了园艺植物生物技术课程。基于此, 借全国普通高等教育“十一五”规划教材编写之机, 在科学出版社的统一规划和指导下, 我们在西北农林科技大学、四川农业大学、福建农林大学、安徽科技学院、海南大学、河南农业大学、河北农业大学、东北农业大学、河南科技大学、北京农学院等院校组织了长期从事园艺植物生物技术教学与科研的 14 位专家、教授, 在深入分析国内外优秀生物技术教材的基础上, 编写了本教材, 作为适应新时期教育教学改革的一次尝试。

2007 年 9 月, 我们在接受《园艺植物生物技术》教材编写任务后, 广泛征求了参加编写的各位专家、教授以及长期从事生物技术教学和科研的专家的意见和建议, 对编写大纲进行了补充、修改; 2007 年 11 月, 在科学出版社的主持下, 在杨凌召开了全国普通高等教育“十一五”规划教材《园艺植物生物技术》编写会议。会议根据普通高等教育“十一五”规划教材的编写要求, 与会专家、教授对编写大纲进行了深入的研讨与

交流,统一了编写思想,修改、完善了编写大纲,确定了编写的指导思想、编写体系与编写基本原则。园艺植物生物技术是园艺科学与生物技术、生物信息学交叉融合的一门新兴学科。基于此,本教材的指导思想是突出交叉学科特点,强化理论,注重应用,提高能力,根据专业特点,编成精品教材。在编写体系上,我们注意保持学科的知识性、系统性、实用性和前瞻性。从基本概念、基本原理入手,强调基本方法与技能,突出园艺植物特点,系统介绍园艺植物生物技术的知识体系与方法技术。在内容安排上,力求突出园艺专业应用学科特点,结合课程教学内容的衔接性以及生物技术的飞速发展,形成以脱毒与快繁、种质保存与突变系筛选、细胞工程、染色体工程、基因工程、遗传转化、分子标记、生物信息学、生物技术产业及其生物技术安全为核心的教学内容。其内容新,起点高,能充分体现本学科的新技术与新方法。为了便于同学自学,在内容安排上,每章有小结、复习思考题与推荐读物,书后附有参考文献。同时,编写过程体现了多接口的自学内容和研究生进一步学习的空间。总之,全书概念准确、内容丰富、资料翔实、信息量大、条理清晰、结构合理、逻辑性强、生物技术方法与技术详细具体、图文并茂、实用性强、通俗易懂。

全书共14章,各章的编写人员为:第一章巩振辉,第二章陈淑芳、王永清、巩振辉,第三章张菊平、孙守如、巩振辉,第四章邓群仙、王永清、巩振辉,第五章张喜春、巩振辉,第六章王永清,第七章王西平、巩振辉,第八章王彦华、王西平,第九章王勇、成善汉、巩振辉,第十章成善汉、王勇、巩振辉,第十一章孙守如、张菊平、巩振辉,第十二章逯明辉、巩振辉,第十三章赖钟雄、巩振辉,第十四章陈儒钢、巩振辉。全书初稿经巩振辉、王永清、赖钟雄多次讨论、修改后,由巩振辉对内容、编排和图表进行统一定稿、绘制。全书大多数章节示意图由西北农林科技大学吕元红同志绘制。在编写和审改过程中,得到了中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所著名生物技术专家何玉科研究员、西北农林科技大学崔鸿文教授、福建农林大学王家福研究员的关心与帮助,崔鸿文教授和王家福研究员对本书进行了细致的审阅,并提出了宝贵的修改意见,何玉科研究员赐序,逯明辉博士和陈儒钢博士对全书进行了校对。在本书出版之际,谨此向为本书面世做出贡献的所有人员表示衷心感谢。

本教材是全国普通高等教育“十一五”规划教材,其内容新、起点高、覆盖面广、涉及学科多、知识丰富。作为作者,深感责任重大。虽然在编审人员的共同努力下完成了这一艰巨任务,但由于时间紧、任务重,书中讹误和不妥之处在所难免。恳请读者提出宝贵意见,供再版时采用。

巩振辉

2008年8月28日

目 录

序

前言

第一章 绪论 1

第一节 园艺植物生物技术的主要内容 1

一、园艺植物组织培养 1

二、园艺植物细胞工程 2

三、园艺植物染色体工程 3

四、园艺植物基因工程 3

五、园艺植物分子标记 4

第二节 园艺植物生物技术的发展简史与趋势 5

一、植物生物技术发展简史 5

二、园艺植物生物技术发展趋势 11

第二章 园艺植物组织培养的理论基础与基本技术 15

第一节 概述 15

一、园艺植物组织培养的概念和类型 15

二、园艺植物组织培养的理论基础 16

第二节 园艺植物组织培养所需的仪器及设备 19

一、灭菌设备 19

二、无菌接种设备 20

三、可调控人工培养设备 20

四、其他仪器设备 21

第三节 园艺植物组织培养的基本技术 21

一、培养基配制技术 21

二、外植体的灭菌技术 25

三、接种环境和接种设备灭菌技术 26

四、无菌接种技术 27

五、组培苗的继代技术 28

六、组培苗的生根技术 28

七、组培苗的驯化和移栽技术 29

第四节 影响园艺植物组织培养的因素 30

一、外植体的种类 30

二、培养基成分及激素配比 31

三、组织培养环境条件 33

第三章 园艺植物脱毒与离体快速繁殖 37

第一节 园艺植物的脱毒 37

一、脱毒的意义 37

二、脱毒的方法 37

三、脱毒苗的鉴定 41

四、无毒苗的保存与繁殖 44

五、脱毒技术在园艺植物上的应用 45

第二节 园艺植物的离体快速繁殖 46

一、离体快速繁殖的意义 46

二、离体快速繁殖的方法 47

三、离体快速繁殖在园艺植物上的应用 49

第三节 园艺植物人工种子的生产 50

一、人工种子的概念及意义 50

二、人工种子的制备方法与技术 51

三、人工种子的储藏与萌发 54

四、园艺植物人工种子的制备技术 55

第四章 园艺植物种质离体保存与无性系变异筛选 58

第一节 园艺植物种质资源的离体保存 58

一、限制生长保存 58

二、超低温保存 60

三、园艺植物种质资源离体保存技术应用 66

第二节 园艺植物的无性系变异及其

筛选	67	及其发展方向	111
一、植物体细胞无性系变异的来源	68	一、成就	111
二、植物体细胞无性系变异的遗传学基础	70	二、存在的问题及今后的发展方向	111
三、植物体细胞无性变异系的筛选	72	第七章 植物基因工程的基础知识与技术	114
四、体细胞无性系变异在园艺植物育种中的应用	74	第一节 植物遗传物质的基础知识	114
第五章 园艺植物的细胞工程	76	一、DNA 的结构与功能	114
第一节 园艺植物细胞培养	76	二、RNA 的结构与功能	116
一、单细胞培养	76	三、蛋白质的结构与功能	117
二、细胞悬浮培养	81	四、遗传信息的传递	118
三、植物细胞的规模化培养	84	五、基因的概念	118
第二节 园艺植物的原生质体培养	87	第二节 植物基因工程常用的工具酶	119
一、原生质体培养的意义	87	一、限制性内切核酸酶	119
二、原生质体培养的基本技术	88	二、DNA 连接酶	120
第三节 园艺植物的细胞融合	93	三、DNA 聚合酶	120
一、细胞融合前的准备	93	四、其他工具酶	122
二、细胞融合技术	93	第三节 园艺植物基因工程常用的载体	123
三、杂种细胞的筛选技术	95	一、质粒载体	123
第六章 园艺植物的染色体工程	98	二、 λ 噬菌体载体	125
第一节 园艺植物单倍体制备	98	三、柯斯质粒载体	126
一、雄配子途径	98	四、人工染色体载体	126
二、雌配子途径	101	第四节 植物基因工程的基本技术	127
第二节 园艺植物多倍体制备	103	一、核酸分离技术	127
一、活体诱导	103	二、核酸电泳技术	130
二、离体诱导	104	三、核酸体外扩增技术	131
第三节 园艺植物非整套染色体操作	106	四、分子杂交技术	134
一、染色体代换系的创制	106	第八章 园艺植物基因的分离与克隆	138
二、染色体附加系的创制	106	第一节 文库筛选法	138
三、染色体易位系的创制	107	一、园艺植物基因组文库的构建	138
第四节 园艺植物染色体工程产物的鉴定	108	二、园艺植物 cDNA 文库的构建	140
一、形态学鉴定	108	三、目的基因的筛选	143
二、细胞学鉴定	109	第二节 图位克隆技术	144
三、生化鉴定	110	一、分离基因的程序	144
四、分子生物学鉴定	110	二、优缺点	145
第五节 园艺植物染色体工程的成就			

第三节 转座子标签法	145	载体类型	173
一、转座子的分类	145	一、正义表达载体	173
二、分离基因的程序	145	二、反义表达载体	173
三、优缺点	146	三、RNA 干涉载体	174
四、T-DNA 标签法	146	四、基因打靶载体	174
第四节 基因差异表达技术	147	五、其他载体	175
一、mRNA 差异显示技术	147	第五节 目的基因与载体的连接	175
二、抑制性消减杂交技术	148	一、插入灭活法	176
三、代表性差异分析法	149	二、定向克隆法	176
四、基因表达系列分析	150	第十章 园艺植物遗传转化	179
五、cDNA-AFLP 技术	151	第一节 园艺植物遗传转化受体系统	179
第五节 同源序列法	152	一、遗传转化对园艺植物受体系统的要 求	179
一、基于同源序列的候选基因法	152	二、常用的园艺植物受体系统	180
二、cDNA 末端快速扩增技术	153	第二节 园艺植物遗传转化方法	181
第六节 基因芯片技术	155	一、外源裸露 DNA 的转化	181
一、基因芯片的类型	155	二、载体介导的 DNA 转化	185
二、基本程序	155	三、种质转化法	188
三、优缺点	156	第三节 园艺植物转化植株的鉴定	190
第九章 园艺植物遗传转化载体的构建	158	一、利用选择标记基因和报告基因鉴定	190
第一节 根癌农杆菌 Ti 质粒基因转 化载体的构建	158	二、利用重组 DNA 分子特征鉴定	192
一、Ti 质粒的改造	158	三、利用外源基因的转录或表达鉴定	192
二、Ti 中间表达载体的构建	160	第四节 提高外源基因在园艺植物体 内表达水平的策略	193
三、Ti 共整合转化载体的构建	161	一、转基因园艺植物中外源基因的沉默	193
四、Ti 双元转化载体的构建	164	二、提高外源基因在园艺植物体内表达 水平的策略	195
第二节 发根农杆菌 Ri 质粒基因转 化载体的构建	165	第五节 基因沉默技术与基因剔除 技术	197
一、Ri 质粒的基因结构	165	一、基因沉默技术	197
二、Ri 中间表达载体的构建	166	二、基因剔除技术	199
三、Ri 共整合转化载体的构建	166	第六节 外源基因在园艺植物中的 遗传	200
四、Ri 双元转化载体的构建	166	第十一章 转基因技术在园艺植物育种	
第三节 载体构建中常用的选择标记 基因和报告基因	166		
一、选择标记基因和报告基因的基本 特点	167		
二、常用的选择标记基因	167		
三、常用的报告基因	171		
第四节 园艺植物常用的遗传转化			

上的应用	202	三、基于 PCR 扩增的 DNA 标记	226
第一节 培育抗病品种	202	四、基于序列测定的分子标记	234
一、抗病毒转基因园艺植物	202	五、园艺植物主要分子标记的技术特点比较	235
二、抗真菌转基因园艺植物	203	第三节 分子标记数据的处理与分析	236
三、抗细菌转基因园艺植物	204	一、数据的获得	236
第二节 培育抗虫品种	204	二、统计学处理	236
一、抗虫基因的来源	205	第四节 分子标记在园艺植物上的应用	238
二、抗虫转基因园艺植物	205	一、分子遗传图谱构建和基因定位	238
第三节 培育抗逆品种	207	二、分子标记辅助选择育种	241
第四节 培育抗除草剂品种	208	三、遗传多样性和亲缘关系分析	242
第五节 培育耐储运品种	210	四、核心种质构建	243
第六节 创造雄性不育材料	211	五、园艺植物品种鉴定与纯度分析	244
一、创造雄性核不育系的途径	211	第十三章 园艺植物生物技术与生物信息学	246
二、基因工程雄性不育系的恢复与保持	213	第一节 生物信息学基本知识	246
第七节 改良产品的营养品质	213	一、生物信息学的研究任务与内容	246
第八节 改变花卉作物的花型和花色	215	二、生物信息学常用数据库	246
一、改良花型	215	三、生物信息学信息检索系统	251
二、改变花色	216	四、核酸和蛋白质同源性比对检索分析系统	252
三、改变花期	217	第二节 生物信息学在园艺植物上的应用	253
第九节 提高光合效率和固氮能力	218	一、寻找园艺植物新基因	253
一、提高光合效率	218	二、克隆园艺植物新基因	254
二、提高固氮能力	219	三、预测园艺植物基因区域	255
第十节 改良其他性状	219	四、预测园艺植物基因功能	256
一、改良香味	219	五、预测园艺植物蛋白质结构	256
二、改良生长特性	220	六、分析园艺植物系统进化关系	257
三、单性结实	220	第三节 新基因的登录及其发明专利的申请	258
四、转基因生物反应器	220	一、新基因的登录	258
第十二章 园艺植物的分子标记	222	二、生物技术发明专利申请的意义与必备条件	259
第一节 园艺植物遗传标记概述	222	三、基因专利的申请	261
一、遗传标记的类型	222	四、生物技术发明专利申请存在的问题	262
二、理想的遗传标记应具备的特点	223		
第二节 园艺植物分子标记的种类及其原理	224		
一、分子标记多态性产生的分子基础	224		
二、基于 Southern 杂交的分子标记	224		

第十四章 园艺植物生物技术的安全性		第三节 园艺植物生物技术对人类健康的安全性评价	272
评价与管理	265	一、园艺植物转基因食品对人类健康存在的可能影响	273
第一节 概述	265	二、转基因食品的安全性评价	275
一、生物安全的内涵	265	第四节 园艺转基因植物生物安全管理	276
二、生物安全的种类	265	一、转基因植物生物安全控制措施	276
三、转基因技术的应用情况	266	二、转基因植物生物安全管理体系及实施原则	277
四、对转基因技术进行安全性评价的必要性	267	三、加强转基因植物生物安全工作的对策	279
第二节 转基因植物的环境安全性评价	267	主要参考文献	282
一、外源基因对受体植物的影响	267		
二、转基因植物在生态方面的潜在风险	269		

第一章 绪 论

生物技术 (biotechnology) 是以现代生命科学为基础, 结合其他基础学科的科学原理, 利用生物 (或生物组织、细胞、器官、染色体、基因、核酸片段等) 的特性和功能, 设计、构建具有预期性能的新物质或新品系, 加工生产产品或提供服务的综合性技术。目前, 生物技术已广泛应用于农林牧渔、医药食品、轻工业、化学工业和能源等领域, 与人民生活息息相关。它是 21 世纪最重要、最活跃、最有生命力的一项高新技术。生物技术产业将是 21 世纪的支柱产业, 在迈进 21 世纪以来, 世界各国纷纷出台重大举措, 力图抢占未来生物经济的制高点, 国际范围内的生物技术及产业的竞争更加激烈。毫无疑问, 生物技术是落实科学发展观, 增强我国国力和经济实力的关键性技术之一。

生物技术包括传统生物技术与现代生物技术。传统生物技术是指通过微生物的初级发酵来生产产品, 如酱油、醋、酒、面包、奶酪、酸奶等食品的制作技术。现代生物技术是指以现代生物学理论为基础, 以基因工程为核心的一系列技术的总称。本书重点介绍现代生物技术, 包括植物组织培养、植物细胞工程、植物染色体工程、植物基因工程、植物分子标记和生物信息学等在园艺科学上的研究与应用概况。

第一节 园艺植物生物技术的主要内容

园艺植物生物技术 (biotechnology in horticultural plant) 是以园艺植物为材料, 利用生物技术, 创造或改良种质或生产生物制品的一门技术, 它是园艺学和生物技术的交叉技术学科, 是在植物组织培养、植物细胞工程、植物染色体工程、植物基因工程、植物分子标记和生物信息学等现代生物技术手段基础上产生和发展起来的。这些先进的现代生物技术在园艺科学上的应用构成了园艺植物生物技术的主要内容。

一、园艺植物组织培养

园艺植物组织培养 (tissue culture in horticulture plant) 是指在无菌和人工控制的环境条件下, 利用人工培养基, 对园艺植物的胚胎 (成熟和未成熟的胚、胚乳、胚珠、子房等)、器官 (根、茎、叶、花、果实、种子等)、组织 (分生组织、形成层、韧皮部、表皮、皮层、薄壁组织、髓部等)、细胞 (体细胞、生殖细胞等)、原生质体等进行离体培养, 使其再生发育成完整植株的过程。用于培养的园艺植物胚胎、器官、组织、细胞和原生质体通常称为外植体 (explant)。由于外植体已脱离了母体, 因此, 园艺植物组织培养又称园艺植物离体培养 (plant culture *in vitro*)。

植物细胞全能性 (cell totipotency) 是植物组织培养的理论基础。它是指任何具有完整细胞核的植物细胞 (不管性细胞还是体细胞), 都拥有形成一个完整植株所必需的全部遗传信息, 在特定的环境下可表达出该细胞的所有遗传信息, 产生一个独立完整的

个体。植物细胞能够分裂、增殖和分化出不同形态、执行不同功能的组织和器官，从而使种族不断繁衍。外植体需要经过脱分化和再分化过程才能发育成一个完整的植株。脱分化也称去分化 (dedifferentiation)，是指离体培养条件下生长的细胞、组织或器官经过细胞分裂或不分裂，逐渐失去原来的结构和功能而恢复分生状态，形成无组织结构的细胞团或愈伤组织或成为未分化细胞特性的细胞的过程。这些脱分化的细胞或细胞团，在适宜的环境条件下，可进行重新分化，形成另一种或几种类型的细胞、组织、器官，甚至形成完整植株，这个过程（现象）称为再分化 (redifferentiation)。

园艺植物组织培养的主要内容包括：离体条件下，园艺植物细胞、组织、器官的形态发生和代谢规律；园艺植物细胞、组织、器官培养所需的营养条件和环境条件以及培养技术；园艺植物幼胚、远缘杂种胚、子房、胚珠、胚乳培养的方法与技术；园艺植物脱毒的方法与技术；珍贵园艺植物特别是一些繁殖系数低的植物大量快速繁殖的方法与技术；园艺植物人工种子制备的方法与技术；园艺植物再生植株的遗传和变异；园艺植物种质资源的离体保存技术；园艺植物体细胞变异的获得与筛选，以及遗传转化细胞、组织的再生与培养等。

二、园艺植物细胞工程

植物细胞工程 (plant cell engineering) 是指应用细胞生物学和分子生物学的原理和方法，通过某种工程学手段，以植物细胞为基本单位，在离体条件下进行培养、增殖，或人为地使细胞某些生物学特性按人们的意愿发生改变，从而达到改良植物品种和创造新品种，加速植物繁殖或获得某种有用物质的过程。园艺植物细胞工程 (cell engineering in horticultural plant) 的目的在于改良园艺植物品种和创造新品种，以及加速园艺植物繁殖。其核心内容主要包括细胞培养、原生质体培养、细胞遗传操作 (包括细胞融合)、细胞保藏等技术。

细胞培养是进行遗传操作、细胞繁殖与保藏的基础。分离细胞是细胞培养的第一步，常用的方法有机械法和酶解法，也可由离体培养的愈伤组织分离单细胞。细胞培养可分为悬浮细胞培养、平板培养、看护培养和双层滤纸植板等方法，它们都是将选定的植物细胞置于适宜的条件下进行培养，以获得大量基本同步化的细胞。

原生质体的培养是利用原生质体进行遗传操作、细胞融合以及植物体细胞杂交的基础，它是将取得的植物细胞去除细胞壁形成原生质体后进行培养，其方法与细胞培养有一定的相似之处。作为后继操作的基础，培养技术的选择是非常重要的。采用适当的培养方法可以更好地进行遗传操作、细胞融合和保存细胞，而培养不当可能影响结果甚至导致试验和生产失败，造成时间和金钱的浪费。

遗传操作技术的内容十分广泛，包括运用各种手段对生物进行遗传干预的技术措施。遗传操作技术在群体、个体、器官、组织、细胞、染色体以及分子水平等均可实施。但就细胞遗传操作技术而言，其主要是指转基因技术与细胞融合技术等。将外源 DNA 导入靶细胞，除了使用的质粒载体、病毒载体、转座因子和 APC (酵母人工染色体) 等途径外，外源裸露 DNA 通过化学诱导转化法、电穿孔转化法、基因枪转化法、激光微束穿孔转化法、脂质体介导转化法、超声波转化法等非生物方式进行遗传转化被

大量地成功应用。细胞融合 (cell fusion) 又称体细胞杂交 (somatic cell hybridization), 是细胞工程的核心基础技术之一, 在细胞遗传学、细胞核质关系、质核互作雄性不育以及远缘杂交育种等方面的研究具有重要意义。随着细胞融合技术的不断改进, 融合率增大, 细胞融合展示出了良好的发展前景。此外, 细胞诱变也取得了较大的进展, 诱变方法与技术不断完善, 体细胞诱变育种已受到高度关注与广泛应用。这些理论和技术的发展都为更好地改造细胞创造了条件。

培养或经改造的细胞是进行研究和生产的基本材料, 为了使其不致死亡并尽量保持优良的特性, 需要进行适当的保藏。一般是根据细胞的特点, 人工创造条件使其生长代谢活动尽量降低, 处于休眠状态, 以抑制增殖和减少变异。由于植物细胞有其自身的特点, 因而其保藏方法不可能与微生物完全相同。通常采用的方法是液氮超低温保藏方法。此外还有低温冻藏法及其他一些保藏方法, 但多用于短期保藏。

三、园艺植物染色体工程

广义染色体工程 (chromosome engineering) 包括染色体组工程和个别染色体工程, 前者的主要内容是增加或削减染色体组, 以改造植物的遗传基础, 达到人类利用的目的。增加染色体组 (genome chromosome complement) 是使细胞中的染色体多倍化, 即变成同源多倍体 (autopolyploid) 或异源多倍体 (allopolyploid)。个别染色体工程又称狭义染色体工程, 是指按人们需要来添加或削减一种植物的染色体, 或用别的植物的染色体来替换。植物染色体工程技术目前主要是利用包括远缘杂交在内的一系列细胞遗传技术和分子标记辅助育种技术, 实现染色体的附加、易位、交换, 将存在于野生近缘种中的大量有益基因转移到受体植物中, 丰富其遗传基础, 创造新物种、新种质, 育成新品种。园艺植物染色体工程 (chromosome engineering in horticultural plant) 的主要内容包括: ①培养获得单倍体, 通过染色体加倍, 迅速获得纯系, 聚集有益园艺性状基因, 加速亲本纯系的选育。园艺植物获得单倍体的主要途径有雄配子体途径 (包括花药培养、花粉培养和小孢子培养) 与雌配子体途径 (包括未受精子房培养和未受精胚珠培养)。②诱导多倍体, 通过选育直接获得多倍体品种, 或与杂交及杂优利用相结合, 培育多倍体品种。诱导获得园艺植物多倍体的有效方法是采用秋水仙素溶液处理单倍体、二倍体或其他倍性的植株、组织、器官或细胞, 也可通过与多倍体杂交的方法获得多倍体。③通过染色体的交换、附加或易位, 获得染色体代换系、附加系或易位系。这主要通过远缘杂交、细胞遗传技术以及分子标记技术来实现。

四、园艺植物基因工程

园艺植物基因工程 (genetic engineering in horticulture plant) 是以分子遗传学为理论基础, 以分子生物学和微生物学的现代方法为手段, 将不同来源的基因 (或 DNA 分子), 按预先设计的蓝图, 在体外构建杂种 DNA 分子, 然后导入园艺植物细胞, 以改良园艺植物原有的遗传特性, 获得新种质或新品种。其基本操作步骤及内容包括: ①利用各种基因克隆技术, 如转座子标签技术、图位克隆技术、文库筛选技术 (基因组

文库的构建与筛选, cDNA 文库的构建与筛选)、基因差异表达技术 (mRNA 差异显示技术、抑制性减法杂交技术、代表性差异分析法、基因表达序列分析和 cDNA-AFLP)、同源序列法以及基因芯片技术等从植物、动物、微生物等生物中分离目的基因。②生物信息学研究与基因表达载体的构建。生物信息学是分子生物学与计算机科学的交叉学科, 它借助于计算机及网络技术进行核酸序列分析、蛋白质序列分析、核酸序列的酶切位点分析、PCR 反应中的引物设计、核酸和蛋白质序列的同源性分析、新基因的功能预测以及分子进化分析等。基因表达载体的构建是进行基因表达与功能研究的前提, 是基因工程的核心。它将克隆获得的目的基因连接在能使其在植物细胞中表达的各种载体, 构建成不同类型的遗传转化载体, 如正义表达载体、反义表达载体、RNA 干涉载体、基因打靶载体等, 用于园艺植物的遗传转化研究。③园艺植物遗传转化方法的研究与目的基因的遗传转化。目前用于植物遗传转化的方法有多种, 不同的园艺植物适宜的遗传转化方法可能不同。建立与优化具体园艺植物的遗传转化体系是园艺植物基因工程的重要内容。除了借鉴已有的植物遗传转化方法外, 也可根据园艺植物的特点创建新的遗传转化体系。在此基础上将目的基因导入受体植物细胞。④目的基因导入受体植物细胞后, 是否可以稳定维持和表达其遗传特性, 只有通过检测与鉴定才能确定。转基因植株的检测与鉴定包括分子检测与遗传特性的鉴定。分子检测主要包括 PCR 技术鉴定、Southern 杂交技术鉴定、Northern 杂交技术鉴定 (包括点杂交)、RT-PCR 技术鉴定、Western 杂交技术鉴定、蛋白质免疫测定技术鉴定等; 遗传特性鉴定主要研究外源目的基因的表达、表达水平、遗传稳定性, 以及与其他重要园艺性状基因表达的关系等。

五、园艺植物分子标记

植物分子标记 (molecular marker of plant) 的概念有广义与狭义之分。广义的分子标记是指可遗传的并可检测的 DNA 序列或蛋白质。蛋白质标记包括种子储藏蛋白和同工酶 (指由不同基因位点编码的酶的不同分子形式) 及等位酶 (指由同一基因位点的不同等位基因编码的酶的不同分子形式) 标记。狭义的分子标记是指能反映园艺植物个体或种群间基因组中某种差异特征的 DNA 片段, 它直接反映基因组 DNA 间的差异。与其他遗传标记, 如形态标记 (morphological marker)、细胞学标记 (cytological marker) 和生化标记 (biochemical marker) 等相比较, 分子标记的优越性突出、种类多、用途广。园艺植物分子标记可分为以下几类: ①基于杂交的分子标记, 包括限制性片段长度多态性标记 (restriction fragment length polymorphism, RFLP 标记)、DNA 指纹技术 (DNA fingerprinting)、原位杂交 (*in situ* hybridization) 和可变串联重复 (variable number of tandem repeat, VNTR 标记) 等。②基于 PCR 扩增的 DNA 标记, 包括随机扩增多态性 DNA 标记 (random amplification polymorphism DNA, RAPD 标记)、简单序列重复标记 (simple sequence repeat, SSR 标记) 或简单序列长度多态性 (simple sequence length polymorphism, SSLP 标记)、序标位 (sequence tagged site, STS 标记)、简单序列重复区间扩增多态性 (inter-simple sequence repeat, ISSR)、相关序列扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP)、反转录转座子区间扩增多态性 (inter-retrotransposon amplified polymorphism, IRAP)、反转录转座

子微卫星扩增多态性 (retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism, REMAP) 等。③基于 PCR 扩增与限制性酶切相结合的 DNA 标记, 包括扩展片段长度多态性标记 (amplified fragment length polymorphism, AFLP 标记)、限制性位点扩增多态性 (restriction site amplified polymorphism, RSAP 标记) 和切割扩增的多态性序列 (cleaved amplified polymorphic sequence, CAPS 标记) 等。④基于单个核苷酸多态性的 DNA 标记, 如单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP 标记) 等。

分子标记已广泛用于园艺植物分子遗传图谱的构建, 植物遗传多样性分析与种质鉴定, 杂种优势鉴定, 杂种种子纯度分析, 重要农艺性状基因定位、克隆和核酸分析; 突变体和重组体的构建以及基因表达调控研究, 转基因植物鉴定, 遗传分析及分子标记辅助育种选择等方面。

第二节 园艺植物生物技术的发展简史与趋势

园艺植物生物技术是伴随植物生物技术的诞生与发展而发展起来的。事实上, 植物生物技术发展的大多数典例是以园艺植物为试材的。因此, 只有认真学习植物生物技术的发展历史与发展趋势, 才能更深刻地了解与理解园艺植物生物技术的发展历史与趋势。本节将重点讨论植物生物技术的发展历史和趋势, 以及对园艺植物生物技术的影响。

一、植物生物技术发展简史

植物生物技术研究历史可以追溯到 19 世纪中期。从其诞生到现在, 大体经历了植物组织培养理论探索与完善阶段、植物组织培养技术迅速发展, 以及基因工程的诞生与发展三个阶段。这三个阶段, 尤其是后两个阶段是相互交织在一起的, 很难将它们截然分开。植物组织培养迅速发展为基因工程技术的发展提供了技术保障, 而基因工程的发展又进一步促进了植物组织培养技术的深入与完善。

(一) 植物组织培养理论的探索与完善

从 19 世纪中期至 20 世纪 50 年代末期为植物组织培养理论探索与完善阶段。在这一阶段中, 细胞学说的产生和细胞全能性的提出为组织培养技术的产生奠定了理论基础。与组织培养技术有关的重要模式 (培养基模式与激素调控模式) 的提出则促进与完善了植物组织培养的理论与技术。

1838~1839 年, 德国的植物学家 Schleiden 和动物学家 Schwann 提出了“细胞概念” (cell concept)。其主要观点是: 细胞是生物体的基本结构单位, 由它构成整个生物个体; 植物细胞是在生理上、发育上具有潜在功能的单位。1858 年, 德国的细胞病理学家 Virchow 提出“一切细胞来自细胞”的观点, 并进一步提出细胞学说 (cell theory)。他认为“细胞是生命单位”, 他说: “每个生物是许多生命单位的总和, 每个生命单位本身带有生命的全部特性。”1901 年, Morgan 首次使用 totipotency (全能性) 一词, 不过, 并未作出定义。在这一学说的基础上, 1902 年, 德国著名植物生理学家

Haberlandt 提出了高等植物的器官和组织可以不断分割,直至单个细胞的观点,这种单个细胞是具有潜在全能性的功能单位。为了论证这个观点,首次进行了离体细胞培养实验。此外,他还提出了胚囊液在组织培养中的作用和看护培养法等科学的预见。

1904 年, Hanning 在无机盐和蔗糖溶液中培养了萝卜和辣根的胚,并使这些胚在离体条件下长到成熟。这是世界上胚胎培养最早获得成功的一例。1908 年, Simon 研究白杨嫩茎在培养中的发育,观察到愈伤组织的发生和根、芽的形成。1922 年,德国的 Kotte 和美国的 Robbins 分别报道了离体根尖培养获得某些成功。Kotte 采用了无机盐、葡萄糖、蛋白胨、天冬酰胺及添加各种氨基酸的培养基, Robbins 用含无机盐、葡萄糖或果糖的琼脂培养基,培养了长度为 1.45~3.75cm 的豌豆、玉米和棉花的茎尖,形成了一些缺绿的茎和根。这是有关茎尖培养的最早的实验。同年,美国的 Knudson 采用胚培养法获得兰花幼苗,克服了兰花种子发芽困难的问题。1925 年及 1929 年, Laibach 通过培养亚麻种间杂交幼胚,成功获得了种间杂种,从而证明了胚培养在植物远缘杂交中利用的可能性。1933 年,中国的李继侗和沈同首次报道了利用天然提取物进行植物组织培养的研究,他们利用加有银杏胚乳提取物的培养基,成功地培养了银杏的胚。

1934 年,美国的 White 利用包含无机盐、酵母浸出液(yeast extract, YE)和蔗糖的培养基进行番茄根的离体培养,建立了第一个活跃生长并能继代增殖的无性繁殖系,使根的离体培养首次获得成功;法国学者 Gautheret 在山毛榉和黑杨等形成层组织的培养中发现,虽然在含有葡萄糖和盐酸半胱氨酸的 Knop 溶液中,这些组织可以不断增殖几个月,但只有在培养基中加入了 B 族维生素和 IAA 后,形成层组织的生长才能显著增加;Kogl 等鉴定了第一个植物激素——IAA,它能使细胞增大生长。

1937 年, White 利用 3 种 B 族维生素,即吡哆醇(维生素 B₆)、硫胺素(维生素 B₁)和烟酸(维生素 B₃),取代酵母浸出液获得成功。

1939 年, Gautheret 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,都相继建立了类似的连续生长的组织培养物。因此, Gautheret、White 和 Nobecourt 一起被誉为植物组织培养的奠基人。现在植物组织培养中所用的若干培养方法和培养基,基本上都是在这 3 位科学家建立的方法和培养基基础上的演变。当时这 3 位科学家所使用的组织都包含了分生细胞。诱导成熟和已高度分化的细胞发生分裂和分化的研究直到后来发现了细胞分裂素才成为可能。

1941 年, Overbeek 等首次把椰子汁作为添加物引入到培养基中,使心形期曼陀罗幼胚离体培养至成熟。到 20 世纪 50 年代初,由于 Steward 等在胡萝卜组织培养中也使用了这一物质,从而使椰子汁在组织培养的各个领域得到了广泛应用。

1942 年, Gautheret 在植物愈伤组织培养中观察到次生代谢物质。

1943 年, White 出版了第一本专著《植物组织培养手册》。

1944 年,中国的罗士韦研究菟丝子的茎尖培养,于 1946 年发表了茎尖分化成花芽的报道,开创了用组织培养方法研究植物成花生理学的先河。

1948 年, Skoog 和崔澈等发现腺嘌呤或腺苷不但可以促进愈伤组织的生长,而且能解除培养基中 IAA 对芽形成的抑制作用,诱导芽的形成,从而确定了腺嘌呤与生长素的比例是控制芽和根形成的主要条件之一。