



普通高等教育“十一五”国家级规划教材



全国高等农林院校“十一五”规划教材

# 园艺植物

## 生物技术

林顺权 主编



 中国农业出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材  
全国高等农林院校“十一五”规划教材

# 园艺植物生物技术

林顺权 主编

中国农业出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

园艺植物生物技术/林顺权主编. 北京: 中国农业出版社, 2007. 8

普通高等教育“十一五”国家级规划教材. 全国高等农林院校“十一五”规划教材

ISBN 978-7-109-11883-6 Ⅰ. 园… Ⅱ. 林… Ⅲ. 园艺植物—生物技术—高等学校—教材 Ⅳ. S68

I. 园… II. 林… III. 园艺植物—生物技术—高等学校—教材 IV. S68

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 113687 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

责任编辑 戴碧霞

北京通州皇家印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2007 年 8 月第 1 版 2007 年 8 月北京第 1 次印刷

开本: 820mm×1080mm 1/16 印张: 19.5

字数: 462 千字

定价: 28.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

主 编 林顺权

副主编 汤浩茹 赵长增 何松林

编 者 (按姓氏笔画排列)

汤浩茹 (四川农业大学)

杨际双 (河北农业大学)

何松林 (河南农业大学)

张玉萍 (山西农业大学)

张喜春 (北京农学院)

陆建良 (浙江大学)

林顺权 (华南农业大学)

赵长增 (甘肃农业大学)

郭文武 (华中农业大学)

曹必好 (华南农业大学)

霍秀文 (内蒙古农业大学)

审 稿 雷建军 (华南农业大学)

何业华 (华南农业大学)

刘成明 (华南农业大学)

包满珠 (华中农业大学)

江昌俊 (安徽农业大学)

# 前 言

“在生物技术的研发日新月异的今天，园艺植物作为一类独具特色的作物种类，其生物技术的研究和生产也正在突飞猛进！”

这是我们两年前说的一句话，是我和我所在的华南农业大学园艺生物技术研究所的同仁们，在2005年出版的研究生教学用书《园艺植物生物技术》的前言里说的话。不需做更多的解释，事实本身已经做出说明：两年前我们为研究生编这样一本教学用书，两年后的今天，我就要为本科生编写同名教材了。园艺植物生物技术的发展速度由此可见一斑！

2006年6月，由中国农业出版社主持，在华南农业大学召开的《园艺植物生物技术》编写计划工作会议上，与会的兄弟院校的专家们一致认为：宜以前述的研究生教学用书作为重要参考，再根据本科教学的特点，充实细胞工程的内容，精简基因工程和分子标记等方面的内容，增加各论的内容。各论编写了果树、蔬菜、观赏植物和茶树共四章。茶树生物技术一章的编写，弥补了以往园艺学科的一个缺陷——茶学虽属于园艺学一级学科，但往往独立或“游离”于园艺学科之外。如今的园艺植物生物技术书里能有茶树一章，特别感谢浙江大学茶学研究所和安徽农业大学有关老师的协助和支持。

本书在结构上包括绪论、总论和各论三部分；内容上主要包括细胞工程、基因工程和分子标记等；叙述顺序上一般先介绍原理，再介绍方法技术和应用；体例上各章都以引言开篇，章末附有小结和思考题，以便学习和复习。编写中，参考了大量文献，很多的原始文献都是园艺生物技术上的重要进展。但是，由于本书是一本教科书，篇幅所限，无法一一列出原始参考文献，只能列出一些著作和个别经典性的论文。在此向有关作者表示谢意和歉意。特别需要指出的是，细胞工程所涉及的几章，大量参考了前述的研究生教学用书。

本书各章的编者均在章末注明。审稿者则仅在版权页后注明。在此，主编向各位一并致谢！

由于编者的水平所限，本书一定有不少需要改进的地方，诚挚地欢迎读者提出批评意见。

编 者

2007年5月于广州五山

# 目 录

## 前言

|                        |    |
|------------------------|----|
| 绪论 .....               | 1  |
| 一、园艺植物生物技术的含义和内容 ..... | 1  |
| 二、植物生物技术的发展简史 .....    | 3  |
| 三、园艺植物生物技术的应用 .....    | 15 |

## 上 篇 总 论

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 第一章 细胞工程原理 .....                 | 20 |
| 第一节 细胞全能性 .....                  | 20 |
| 一、细胞全能性概念的提出及其发展 .....           | 20 |
| 二、植物活细胞具有生命特征属性 .....            | 21 |
| 三、离体培养条件下的细胞可以展现该物种的生命特征属性 ..... | 23 |
| 第二节 培养细胞的营养及代谢 .....             | 24 |
| 一、培养细胞的营养和初级代谢 .....             | 24 |
| 二、培养细胞的次级代谢及产物积累 .....           | 25 |
| 第三节 培养细胞的分化与形态发生 .....           | 26 |
| 一、离体条件下植物细胞的脱分化 .....            | 26 |
| 二、离体条件下植物细胞的再分化 .....            | 28 |
| 三、器官分化和植株形成 .....                | 31 |
| 四、体细胞胚胎发生 .....                  | 33 |
| 第四节 培养细胞的遗传变异 .....              | 34 |
| 一、培养细胞的遗传与变异特点 .....             | 34 |
| 二、变异增多的原因 .....                  | 35 |
| 三、培养细胞变异的遗传机理 .....              | 36 |
| 第二章 离体培养基本技术 .....               | 39 |
| 第一节 外植体的类型及其选择与处理 .....          | 39 |
| 一、外植体的类型及选择依据 .....              | 39 |

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 二、外植体的预处理及消毒 .....            | 41 |
| 三、褐变的防止 .....                 | 41 |
| 第二节 培养基及其配制 .....             | 43 |
| 一、培养基 .....                   | 43 |
| 二、培养基的制备 .....                | 48 |
| 第三节 无菌技术 .....                | 50 |
| 一、超净工作台 .....                 | 50 |
| 二、试材和器具的灭菌 .....              | 50 |
| 三、接种与污染控制 .....               | 53 |
| 第四节 培养条件的影响 .....             | 54 |
| 一、温度 .....                    | 54 |
| 二、光照 .....                    | 55 |
| 三、氧和其他气体 .....                | 55 |
| 四、湿度 .....                    | 55 |
| 五、培养基的 pH .....               | 55 |
| 第三章 细胞培养 .....                | 57 |
| 第一节 细胞分离的方法 .....             | 57 |
| 一、从叶片直接分离细胞的方法 .....          | 57 |
| 二、从愈伤组织分离细胞的方法 .....          | 58 |
| 第二节 细胞悬浮培养 .....              | 58 |
| 一、细胞悬浮培养振荡器的选择 .....          | 58 |
| 二、悬浮培养细胞的特点及细胞悬浮液的制备 .....    | 59 |
| 三、细胞悬浮培养方法 .....              | 60 |
| 四、细胞悬浮培养的培养基 .....            | 61 |
| 五、悬浮培养细胞的同步化 .....            | 62 |
| 六、悬浮培养中细胞生长量的计量方法 .....       | 63 |
| 第三节 单细胞培养 .....               | 64 |
| 一、植物单细胞培养的意义 .....            | 64 |
| 二、单细胞培养的程序 .....              | 64 |
| 三、单细胞培养方法 .....               | 65 |
| 第四节 影响细胞培养的因素及培养细胞活力的测定 ..... | 68 |
| 一、影响细胞培养的因素 .....             | 68 |
| 二、培养细胞活力的测定 .....             | 69 |
| 第四章 原生质体技术 .....              | 71 |
| 第一节 原生质体分离 .....              | 71 |

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 一、酶解材料准备 .....           | 71 |
| 二、材料预处理 .....            | 72 |
| 三、酶解 .....               | 72 |
| 四、原生质体纯化 .....           | 73 |
| 五、原生质体活力测定 .....         | 73 |
| 第二节 原生质体培养 .....         | 74 |
| 一、植板密度 .....             | 74 |
| 二、原生质体培养基 .....          | 74 |
| 三、原生质体培养方法 .....         | 74 |
| 四、原生质体再生植株过程 .....       | 75 |
| 第三节 体细胞杂交 .....          | 75 |
| 一、融合方法 .....             | 76 |
| 二、融合方式 .....             | 77 |
| 三、杂种细胞筛选 .....           | 78 |
| 四、体细胞杂种鉴定 .....          | 79 |
| 五、体细胞杂交的影响因素 .....       | 80 |
| 第五章 生殖细胞工程 .....         | 82 |
| 第一节 花药与花粉培养 .....        | 82 |
| 一、单倍体的意义及应用价值 .....      | 82 |
| 二、花药培养 .....             | 83 |
| 三、花粉培养 .....             | 86 |
| 四、影响雄核发育的因素 .....        | 87 |
| 第二节 未授粉胚珠和子房培养 .....     | 88 |
| 一、未授粉胚珠和子房培养及其有关因素 ..... | 89 |
| 二、离体条件下的孤雌生殖 .....       | 90 |
| 第三节 离体受精 .....           | 90 |
| 一、离体受精的意义 .....          | 90 |
| 二、离体子房授粉 .....           | 91 |
| 三、胚珠试管授粉 .....           | 91 |
| 四、影响离体授粉的因素 .....        | 91 |
| 五、离体受精 .....             | 92 |
| 第四节 胚胎培养 .....           | 93 |
| 一、成熟胚培养 .....            | 93 |
| 二、幼胚培养 .....             | 93 |
| 第五节 胚乳培养 .....           | 94 |
| 一、胚乳愈伤组织的建立 .....        | 95 |

|                              |            |
|------------------------------|------------|
| 二、影响胚乳培养的因素 .....            | 95         |
| 三、胚乳再生植株的染色体倍性 .....         | 96         |
| <b>第六章 细胞工程应用 .....</b>      | <b>97</b>  |
| 第一节 离体繁殖、人工种子与无病毒苗培育 .....   | 97         |
| 一、离体繁殖 .....                 | 97         |
| 二、人工种子 .....                 | 102        |
| 三、无病毒苗培育 .....               | 106        |
| 第二节 种质离体保存 .....             | 112        |
| 一、限制生长保存 .....               | 112        |
| 二、调控生长保存 .....               | 113        |
| 三、超低温保存 .....                | 113        |
| 第三节 细胞工程育种 .....             | 115        |
| 一、体细胞无性系变异育种 .....           | 115        |
| 二、体细胞杂交育种 .....              | 116        |
| 三、杂种胚挽救 .....                | 117        |
| 第四节 植物培养细胞生物反应器 .....        | 118        |
| 一、植物培养细胞生物反应器的特点 .....       | 118        |
| 二、植物生物反应器的生产技术 .....         | 118        |
| 三、植物次生代谢物的主要类型和生物转化 .....    | 120        |
| <b>第七章 基因工程基本原理和技术 .....</b> | <b>123</b> |
| 第一节 基因工程的分子生物学基础 .....       | 123        |
| 一、基因与基因组 .....               | 123        |
| 二、真核基因的结构 .....              | 124        |
| 三、基因的表达与调控 .....             | 127        |
| 第二节 基因工程基本技术 .....           | 131        |
| 一、核酸的分离 .....                | 131        |
| 二、分子杂交 .....                 | 132        |
| 三、PCR 技术 .....               | 136        |
| 四、生物芯片技术 .....               | 139        |
| 第三节 基因分离与克隆 .....            | 139        |
| 一、基因工程中常用的工具酶 .....          | 139        |
| 二、基因克隆策略与载体 .....            | 141        |
| 三、基因分离 .....                 | 148        |
| <b>第八章 转基因植物及其应用 .....</b>   | <b>156</b> |
| 第一节 植物基因工程载体及其构建 .....       | 156        |

|                               |     |
|-------------------------------|-----|
| 一、植物基因工程载体种类及命名规则 .....       | 156 |
| 二、根癌农杆菌 Ti 质粒的结构与功能 .....     | 157 |
| 三、Ti 质粒基因转化的原理 .....          | 159 |
| 四、Ti 质粒的改造与载体构建 .....         | 159 |
| 五、植物遗传转化中常用的选择标记基因及报告基因 ..... | 162 |
| 第二节 植物遗传转化方法和技术 .....         | 164 |
| 一、载体转化 .....                  | 164 |
| 二、直接转化 .....                  | 166 |
| 三、种质系统介导转化 .....              | 167 |
| 第三节 转化体的筛选与检测 .....           | 167 |
| 一、转化体的选择和筛选 .....             | 167 |
| 二、外源基因整合的检测 .....             | 168 |
| 三、转录水平的检测 .....               | 168 |
| 四、蛋白质水平的检测 .....              | 169 |
| 五、转基因植物性状检测与遗传分析 .....        | 169 |
| 第四节 应用基因工程改良园艺植物的性状 .....     | 169 |
| 一、果实耐贮运性状 .....               | 170 |
| 二、抗病性状 .....                  | 171 |
| 三、抗虫性状 .....                  | 172 |
| 四、其他性状 .....                  | 172 |
| 五、转基因植物应用中存在的问题 .....         | 172 |
| 第五节 转基因植物的环境释放及生物安全性问题 .....  | 173 |
| 一、转基因植物的安全性问题 .....           | 173 |
| 二、转基因植物的安全性评价和环境释放 .....      | 174 |
| 第九章 分子标记技术 .....              | 177 |
| 第一节 分子标记概述 .....              | 177 |
| 一、遗传标记 .....                  | 177 |
| 二、分子标记简介 .....                | 178 |
| 三、分子标记的遗传基础 .....             | 179 |
| 第二节 常用分子标记原理及试验技术 .....       | 180 |
| 一、RFLP .....                  | 180 |
| 二、RAPD .....                  | 182 |
| 三、SSR 和 ISSR .....            | 184 |
| 四、AFLP .....                  | 186 |
| 五、SNP .....                   | 189 |
| 第三节 分子标记数据收集与分析 .....         | 190 |

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| 一、数据收集 .....              | 190 |
| 二、数据处理 .....              | 191 |
| 三、分子标记分析软件简介 .....        | 194 |
| 第四节 分子标记的应用 .....         | 195 |
| 一、遗传多样性分析 .....           | 195 |
| 二、亲缘关系和系谱分析 .....         | 196 |
| 三、种质资源鉴定 .....            | 196 |
| 四、遗传图谱构建 .....            | 197 |
| 五、基因标记和定位 .....           | 197 |
| 六、分子标记辅助选择 .....          | 200 |
| 七、分子标记在园艺植物应用中存在的问题 ..... | 200 |

## 下 篇 各 论

|                         |     |
|-------------------------|-----|
| 第十章 果树生物技术 .....        | 204 |
| 第一节 概述 .....            | 204 |
| 一、离体繁殖及其拓展应用 .....      | 204 |
| 二、细胞工程在品种改良上的应用 .....   | 204 |
| 三、基因转化 .....            | 205 |
| 四、DNA 分子标记 .....        | 205 |
| 第二节 柑橘 .....            | 206 |
| 一、离体培养及其应用 .....        | 206 |
| 二、分子标记技术应用 .....        | 208 |
| 三、柑橘基因工程 .....          | 210 |
| 第三节 苹果 .....            | 213 |
| 一、苹果脱毒与快繁 .....         | 213 |
| 二、苹果花药培养 .....          | 214 |
| 三、苹果叶片再生技术研究 .....      | 214 |
| 四、苹果原生质体培养 .....        | 215 |
| 五、苹果遗传转化 .....          | 216 |
| 六、DNA 分子标记在苹果上的应用 ..... | 217 |
| 第四节 香蕉 .....            | 218 |
| 一、香蕉离体快繁与脱毒技术 .....     | 218 |
| 二、香蕉细胞和原生质体培养 .....     | 219 |
| 三、香蕉的遗传转化 .....         | 220 |
| 第五节 葡萄 .....            | 221 |

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| 一、葡萄快繁与脱毒 .....            | 221        |
| 二、葡萄原生质体培养 .....           | 222        |
| 三、葡萄遗传转化 .....             | 222        |
| <b>第十一章 蔬菜生物技术 .....</b>   | <b>224</b> |
| 第一节 概述 .....               | 224        |
| 一、细胞工程应用 .....             | 224        |
| 二、基因工程应用 .....             | 225        |
| 三、分子标记应用 .....             | 226        |
| 第二节 番茄 .....               | 227        |
| 一、细胞工程应用 .....             | 227        |
| 二、番茄分子图谱构建 .....           | 229        |
| 三、基因定位 .....               | 231        |
| 四、分子标记辅助选择 .....           | 231        |
| 五、番茄转基因研究 .....            | 233        |
| 第三节 西瓜、甜瓜 .....            | 236        |
| 一、细胞工程在西瓜、甜瓜上的应用 .....     | 236        |
| 二、转基因技术在甜瓜作物上的应用 .....     | 238        |
| 三、分子标记技术在西瓜、甜瓜上的应用 .....   | 240        |
| <b>第十二章 观赏植物生物技术 .....</b> | <b>244</b> |
| 第一节 概述 .....               | 244        |
| 一、快繁技术和脱毒技术应用 .....        | 244        |
| 二、胚培养技术应用 .....            | 244        |
| 三、原生质体培养及融合 .....          | 245        |
| 四、花卉基因工程的应用 .....          | 245        |
| 第二节 兰花离体培养 .....           | 246        |
| 一、兰花组织培养基本程序 .....         | 247        |
| 二、蝴蝶兰离体培养 .....            | 248        |
| 三、大花蕙兰离体培养 .....           | 250        |
| 四、墨兰离体培养 .....             | 251        |
| 五、兰花生物技术研究展望 .....         | 252        |
| 第三节 香石竹 .....              | 252        |
| 一、香石竹茎尖培养 .....            | 253        |
| 二、香石竹无毒苗生产技术 .....         | 254        |
| 三、组织培养技术在香石竹其他领域的应用 .....  | 258        |
| 第四节 其他观赏植物的组织培养 .....      | 259        |

|                               |     |
|-------------------------------|-----|
| 一、菊花 .....                    | 259 |
| 二、百合 .....                    | 262 |
| 三、非洲菊 .....                   | 265 |
| 四、月季 .....                    | 267 |
| <b>第十三章 茶树生物技术</b> .....      | 272 |
| <b>第一节 茶树细胞工程</b> .....       | 272 |
| 一、茶树再生体系研究 .....              | 272 |
| 二、细胞工程在天然产物生产中的应用 .....       | 275 |
| <b>第二节 茶树重要功能基因克隆研究</b> ..... | 276 |
| 一、与茶树儿茶素类代谢相关基因的克隆 .....      | 276 |
| 二、与咖啡因合成相关基因的克隆 .....         | 277 |
| 三、与芳香物质代谢相关基因的克隆 .....        | 278 |
| 四、与抗逆性相关基因的克隆 .....           | 278 |
| 五、与基础代谢相关基因的克隆 .....          | 279 |
| 六、其他基因的分离 .....               | 280 |
| <b>第三节 茶树重要功能基因表达研究</b> ..... | 281 |
| 一、茶树儿茶素类代谢相关基因表达 .....        | 281 |
| 二、茶树咖啡因合成基因表达 .....           | 281 |
| 三、茶叶芳香物质代谢相关基因表达 .....        | 281 |
| 四、茶树其他基因表达研究 .....            | 282 |
| <b>第四节 茶树转基因研究</b> .....      | 282 |
| 一、外源基因载体构建 .....              | 282 |
| 二、外源基因转化茶树材料 .....            | 283 |
| <b>第五节 茶树分子标记研究</b> .....     | 284 |
| 一、茶树种质资源鉴定 .....              | 284 |
| 二、茶树品种资源遗传多样性分析 .....         | 285 |
| 三、茶树亲缘关系和分类学研究 .....          | 286 |
| 四、茶树遗传图谱构建和基因定位 .....         | 286 |
| <b>第六节 茶树酶工程</b> .....        | 287 |
| 一、固定化酶发酵生产茶黄素类物质研究 .....      | 287 |
| 二、固定化酶改善茶饮料品质研究 .....         | 287 |
| <b>附录1 常用缩略词表</b> .....       | 289 |
| <b>附录2 常用基本培养基</b> .....      | 291 |
| <b>主要参考文献</b> .....           | 293 |

# 绪 论

## 一、园艺植物生物技术的含义和内容

园艺植物生物技术 (biotechnology in horticultural plant) 是园艺学和生物技术的交叉技术学科, 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。它也是生物技术的一个分支。

### (一) 生物技术的含义

生物技术 (biotechnology) 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 (中国农业百科全书·生物学卷, 1991)。1973 年发明的 DNA 重组技术标志着现代生物技术的诞生。现代生物技术包括众多领域, 通常包括细胞工程 (cell engineering)、基因工程 (genetic engineering)、酶工程 (enzyme engineering) 和发酵工程 (fermentation engineering) 四大领域。此外, 还有一些相对新的领域, 如染色体工程、蛋白质工程、生化工程等。酶工程、发酵工程 (也称微生物工程) 和生化工程三者的相互联系较为紧密。在生物技术中, 以酶为催化剂的酶促反应, 其工业过程即为酶工程; 以细胞为催化剂者, 常称发酵, 相应的工业过程为发酵工程 (顾其丰, 1997); 而生化工程是解决酶工程和发酵工程 (甚至细胞工程) 产业化过程中生物的遗传特性、代谢特性和工程水平的传递特性耦合在一起所形成的特殊问题, 称为生物技术的下游工程 (顾其丰, 1997; 欧阳藩, 1998)。

生物技术还可依研究材料的不同而分为植物生物技术、动物生物技术和微生物生物技术。

### (二) 植物生物技术的含义

植物生物技术是以植物离体培养和分子生物学为基础技术, 所形成的以细胞工程和基因工程为主体, 酶工程和生化工程等领域也有不同程度发展的技术科学。

植物离体培养 (*in vitro* culture) 是指通过无菌操作, 把植物细胞或其他类型的外植体 (explant), 接种于人工配制的培养基 (medium) 上, 给予人工控制的环境条件, 使培养或操作对象表现生长发育等生命活动。离体培养是植物生物技术尤其是细胞工程的基础技术。借助离体培养技术, 人们证明了每一个植物活细胞都具有再生成完整植株的能力, 建立了细胞全能性 (totipotency) 的概念, 植物细胞全能性概念的建立使植物离体培养的不同研究领域都有了一个共同的理论基础。即不管培养或操作的对象是胚胎、器官、组织或细胞, 由于起决定性作用的是细胞的全能性, 所以, 所有的离体培养或操作的内容均归入植物细胞工程。也就是说, 虽然有时培养的直接对象不是细胞, 而是其他对象, 如器官或组织, 但研究的目的是使细胞全能性向操作者所期望的方向表达。

植物细胞工程目前尚无明确、统一的定义。在本书中, 植物细胞工程的含义是指: 通过细胞培养、融合等细胞水平的操作, 以及包含有多细胞的植物结构的离体培养或操作, 实现以细胞全

能性为基础的改良品种或生产生物产品的目的。

植物基因工程是指通过重组 DNA 技术, 获得转基因再生植物, 从而定向地改变植物性状, 使之更符合人类的要求。

### (三) 园艺植物生物技术的含义和内容

园艺植物生物技术是植物生物技术的一个分支。在植物生物技术中, 园艺植物生物技术的发展特别活跃且富有特色, 这与园艺植物的某些特点有关。

园艺植物包括果树、蔬菜、茶树和观赏植物等。这些植物具有如下特点: ①多数园艺植物常规上是采用无性繁殖的, 再生性强, 但易积累病毒, 因此脱毒与快繁的研究特别活跃, 也特别有效; ②大多杂合性强, 不易获得纯系, 采用常规育种方法改良品种速度慢、效果差, 因此有必要借助生物技术; ③比较而言, 园艺植物是集约栽培的农作物, 单位面积的生产效益较高, 有较高的研究和应用价值。另一方面, 不少园艺植物的童期长且遗传背景复杂不清, 是导致其分子生物学基础研究较薄弱的原因之一。

同其他所有的技术学科一样, 园艺植物生物技术也包括原理、方法技术和应用这三大部分。

园艺植物生物技术的基本原理是细胞全能性。细胞全能性的展现基于两个基本事实: 一是每一个植物活细胞都具有该物种的全套遗传信息; 二是活细胞具有新陈代谢能力、应激性、脱分化和再分化以及遗传变异的潜能。对于基因工程而言, 虽然其基本原理也包括在上述之中, 但必须涉及分子生物学的基本内容。

园艺植物生物技术的方法技术除了离体培养基本技术外, 还涉及体细胞和生殖细胞的培养和操作、原生质体技术、基因操作技术和分子标记技术等。

同植物生物技术的其他分支类似, 园艺植物生物技术也包括细胞工程、基因工程、酶工程和生化工程等领域, 不过, 不同的“工程”领域的发展程度有较大的不同。

在园艺植物生物技术的不同领域中, 细胞工程技术较为成熟, 而且应用越来越广。以脱毒和快繁为代表的包括种质保存和作为品种改良辅助手段等多方面的园艺植物细胞工程, 是迄今为止农业生物技术中应用最普遍、效益最好的领域之一, 同时也是园艺植物生物技术中较突出的领域。细胞工程的内容是本书的重点。

园艺植物基因工程起步较早, 进展较快, 如众所周知的耐贮藏番茄、嵌合花色的矮牵牛都是较早取得成功并被批准投放市场的转基因作物产品。不过, 由于园艺植物的分子生物学基础薄弱, 近几年的发展优势减弱了。但是, 由于园艺植物在人类生活中的重要性日益显现, 其基因工程不但终将发展成为园艺植物生物技术的主角, 而且将在植物生物技术中扮演重要角色。

园艺植物 DNA 分子标记技术也得到广泛的应用。相对于经典遗传育种侧重使用的形态性状标记而言, 分子标记具有许多不可比拟的优点, 因而其应用也越来越广泛。一些过去难以开展的研究, 如环境因素的影响、数量性状的多重效应等, 现在借助分子标记技术可以顺利开展。另外, 利用分子标记技术, 能够比较准确地对育种材料进行分析评价, 为亲本的选择选配、为选育种材料的检测与早期鉴定提供科学依据, 能够大大加快育种速度, 降低选育种的成本, 有效地推动传统育种工作的发展。

园艺植物生物技术发展的一个特殊方面是酶工程。酶工程也可以说是利用酶的催化作用进行物质转化的技术, 是将酶理论与化工技术结合而形成的新技术。包括微生物发酵在内的酶工程经

历了商业酶的开发和利用→固定化酶和固定化细胞→多酶反应器→仿生技术的发展过程。但园艺植物酶工程主要包括自然酶的开发利用和固定化技术两方面；而且应用的不甚多，因此在本书中不作为一个专门的领域进行系统介绍，只在这里简要提及并在茶树生物技术中述及。在自然酶的开发利用方面，园艺植物是工业中使用的一些酶类来源。如萝卜（过氧化物酶）、刀豆（脲酶）、木瓜（木瓜蛋白酶）、菠萝（菠萝蛋白酶）等。这些酶在食品工业中和医学领域得到应用。木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶用于肉的嫩化（底物为蛋白质），前者还用于啤酒的去浊（底物也是蛋白质），萝卜的过氧化物酶（底物为胡萝卜素）用作烘烤中的漂白剂。菠萝蛋白酶在医学领域的作用是助消化、消肿，木瓜凝乳蛋白酶和木瓜蛋白酶均可用于治疗赫尼亚盘，后者也有助于消化、消肿及牙科保健。无花果蛋白酶也可用于助消化。刀豆的脲酶则用在尿素生产的分析检测上。固定化酶方面，开发新型固定化载体在我国得到重视。如成都生物研究所开发的魔芋葡甘露聚糖（kongjac glucomannab', KGM）载体很有代表性。KGM在我国资源丰富且廉价，用它作为固定化载体，对于工业应用很有价值。用该载体制备的固定化酿酒酵母细胞，批式发酵可连续使用300 d（1次/d），酒精产率每小时可达20 ml/L湿载体。制成固定化啤酒酵母连续10批，前酵时间由原来的7 d缩短至1.5~2 d，后酵时间由原来的22~30 d缩短至11~14 d，产品纯正。

园艺植物生物技术的应用领域相当广泛，将在绪论的第三部分简述。就具体的应用而言，生物技术已在诸多的果树、蔬菜、观赏植物以及茶树上应用，但受本书的篇幅和本课程授课学时两方面的限制，本书各论中只能简要介绍园艺植物生物技术应用概况。

## 二、植物生物技术的发展简史

虽然植物生物技术研究中的不少重大突破都是以园艺植物为材料获得的，但是，就发展史而言，仅介绍园艺植物毕竟是不完整的，甚至会使历史发展的链条断裂。因此，本文将循着胚胎（器官）→组织→细胞→基因（DNA分子）渐次深入的方向，介绍植物生物技术发展史，其中，将更多关注园艺植物。

### （一）理论渊源和实践肇始

植物生物技术肇始于细胞培养。而细胞培养研究的理论渊源可以追溯到19世纪30年代德国的植物学家Schleiden和动物学家Schwann的“细胞概念”（cell concept）。细胞概念包含如下主要观点：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。Schwann还指出：“每一个细胞应该可以独立生活和发展，假如具有的条件正如它存在于有机体内一样……”。1858年，德国细胞病理学家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（vital unit）”。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”。

细胞培养的早期尝试则是肇始于1902年德国著名植物学家Gottlieb Haberlandt（1854—1943）“关于单离的植物细胞培养试验”，在这篇著名论文中，他描述了培养细胞的生长情况，但没有观察到细胞分裂增殖。

后来的学者，特别是Krikorian和Berquam（1969）对Haberlandt的远见卓识、成功之处以及认识上的时代局限性和失败的原因等进行了评述。这些评述主要涉及无菌技术、植物材料和培养基这3个方面。

在无菌技术方面,令人费解的是,Haberlandt认为没必要达到完全无菌,他解释道:“被培养的植物细胞在溶液中存在大量细菌时只受轻微影响”。

Haberlandt所用的材料具有两个特点:一是全为单子叶植物,且多为园艺植物,包括紫露草属、赤莲属、虎眼万年青属和凤眼莲等;二是外植体为已分化组织(栅栏组织)里的细胞。后来人们知道,这样的选材是难以取得成功的。因为单子叶植物组织培养相对难一些。而且细胞分化程度越高,要使其再分裂与生长就越不容易。直至1968年,Joshi和Ball报道从许多植物分离的栅栏细胞都表现出良好的生长情况。但Haberlandt试验过的物种之一——凤眼莲的叶片细胞仍没能培养成功。

Haberlandt当时选择初始材料的出发点,是企求利用光合材料作为营养来源,因而选择了成熟而高度分化的叶肉与栅栏细胞。另外,也与取材的难易有关,取叶片细胞要比取初生和侧生分生组织的细胞更容易,他特意选择松散结合的部分——“使它们容易通过机械分离”。

一心致力于细胞理论的Haberlandt将精力全部投向最基本的组织结构——细胞,他将细胞看作“最基本的器官”,所以他着手从细胞进行培养。

培养基方面,20世纪初,人们的植物营养和激素知识很有限。Haberlandt缺乏分离细胞对营养和激素特殊要求的代谢知识。他所用的培养基只是简单矿质盐溶液里添加了一些有机混合物。尽管如此,Haberlandt曾用过的Knöp配方经Nitsch修改后至今还在使用。

但是,细胞分裂需要的条件不是单一的,Haberlandt所用的培养基不可能满足细胞分裂对营养的全面需求。现在很容易知道该培养基中还缺有机物和植物生长调节剂。

尽管Haberlandt坚信离体叶片组织可在有光的条件下继续光合作用,为细胞的存活和生长提供必要的糖等有机物,但试验仍然失败了,Haberlandt认为是因为缺乏某种生长因子。Haberlandt建议从花粉管释放出一种物质使细胞开始生长。后来,Fitting(1909)在兰花花粉管发现的一种物质导致兰花中合蕊柱的膨胀,这就是后来所知的植物生长素,“荷尔蒙”这个词由Fitting(1910)在植物学文献中首次使用。

Haberlandt最著名的观点是他所称之为的“细胞全能性”(经查证,1901年,Morgan首次使用totipotency一词,不过并未做出定义)。在这个问题上,他提出了自己的观点:“若不允许我提出更进一步的问题,我想在这个方向指出其可能性,应该不至于说我做出了一个不切实际的设想:人们可以成功地从营养细胞培养出人工胚”。这些话透露出他对最新的发展有高屋建瓴的目光。他的观点在时隔半个世纪后,被人们普遍接受(稍后将述及)。

可惜Haberlandt本人并没有沿着细胞培养的道路走下去,实际上他将精力投入到“感觉生理”的研究中。正像后来所见的那样,虽然他的实验室转向了根的培养,但其他的实验室转向胚的培养,并取得了长足进展,而他本人再也没有回到原来的问题上来。

## (二) 胚培养和器官培养的探索

Haberlandt的工作几乎没有立即引起人们的注意。Hanning(1904)进行萝卜和辣根菜的胚培养,结果发现离体胚可以充分发育,并可提早萌发形成小苗。但在他的工作中并没有参考Haberlandt的论文。

胚培养探索中,值得详细介绍的是美国的Knudson在1922年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。Knudson发明的“胚培养”法,严格来说是种子培养,实际