

□ 全国高等学校农林规划教材

园艺植物生物技术

■ 邓秀新 胡春根 主编



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

全国高等学校农林规划教材

园艺植物生物技术

邓秀新 胡春根 主编

高等教育出版社

内容提要

本书是在生物技术迅速发展、应用越来越广泛的新形势下,为未来园艺专业培养高级人才增开的“园艺植物生物技术”课程编写的一本教材。

全书共十章。首先介绍园艺生物技术发展的历史、现状、发展趋势及应用前景,然后介绍园艺植物组织培养、原生质体培养和体细胞杂交技术、园艺植物病毒的脱除、检测及鉴定技术、分子标记技术、基因分离与克隆和转基因植物几类专项技术,最后几章分别总结果树、蔬菜和花卉生物技术的研究进展。

本书可作为高等农业院校园艺专业及园林等相关专业本科生的教材,也可供从事园艺科研、管理和生产人员阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

园艺植物生物技术 / 邓秀新,胡春根主编. —北京:

高等教育出版社,2005.8

ISBN 7-04-017603-3

I. 园... II. ①邓...②胡... III. 园艺作物-生物技术-高等学校-教材 IV. S601

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 088804 号

策划编辑	潘 超	责任编辑	张晓晶	封面设计	张 志	责任绘图	朱 静
版式设计	范晓红	责任校对	杨雪莲	责任印制	陈伟光		

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 100011

总 机 010-58581000

经 销 北京蓝色畅想图书发行有限公司

印 刷 北京民族印刷厂

开 本 787×1092 1/16

印 张 15.25

字 数 370 000

购书热线 010-58581118

免费咨询 800-810-0598

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>

版 次 2005 年 8 月第 1 版

印 次 2005 年 8 月第 1 次印刷

定 价 19.40 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 17603-00

郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010) 58581897/58581896/58581879

传 真：(010) 82086060

E - mail: dd@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮 编：100011

购书请拨打电话：(010)58581118



园艺植物生物技术

主 编 邓秀新(华中农业大学)

胡春根(华中农业大学)

副主编 韩振海(中国农业大学)

曹家树(浙江大学)

包满珠(华中农业大学)

编写人员

第一章 邓秀新(华中农业大学)

第二章 伊华林(华中农业大学)

第三章 刘继红(华中农业大学)

第四章 洪 霓(华中农业大学)

第五章 曹家树(浙江大学)

第六章 胡春根(华中农业大学)

第七章 郭文武(华中农业大学)

第八章 韩振海 王忆(中国农业大学)

第九章 欧阳波(华中农业大学)

第十章 包满珠 张俊卫(华中农业大学)

审 稿 郑用铤



前言

改革开放以来,中国人民感觉到的最大最实在的变化就是农业的变化,特别是园艺产业的变化对我国人民生活质量的提高起了重要的推动作用。目睹近十几年来琳琅满目的园艺产品大市场的巨大变化,分析园艺产业发展的动力和科技问题,不难发现,生物技术的应用对园艺产业发展的贡献。例如,组织培养技术带动了兰花产业的发展,无病毒苗木快繁技术改变了以前香蕉、草莓以及许多花卉的繁殖方式。生物技术的发展减少了人类对自然的依赖程度。有人认为,21世纪是生命科学的世纪。生物技术是目前生命科学中最为活跃的领域。由于它侧重在技术,必然与产业联系紧密。作为园艺学专业方面的学生对于这一学科的发展应该有全面的了解和掌握。为满足各院校开设生物技术课程的要求,我们编写了这本教材。本书在编写过程中考虑了两个协调与统一:一是内容上考虑了技术的成熟性与前瞻性的统一,二是基础理论与实际操作的统一。在章节取舍时,考虑了目前生物技术在我国的发展现状。全书共十章,第一章为绪论,对生物技术在园艺中的应用做了概括性的陈述,二至七章为各专项技术,从器官、组织、细胞、基因水平几个层面进行了较为详细的介绍。考虑到作物的个性,在书的后三章按作物类型分别编写了果树、蔬菜和花卉生物技术研究的进展。

本教材由华中农业大学、浙江大学和中国农业大学三校的有关老师共同编写而成。华中农业大学郑用链教授负责审稿。

生物技术是一门发展十分迅速的学科,我们在编写过程中已经认识到,编写速度可能赶不上生物技术发展的速度,加上编写人员的学识所限,书中难免存在缺点甚至错误。希望广大读者提出意见和建议。

编者
2005.7



目 录

第一章 绪 论	1
一、组织和细胞培养是园艺植物生物技术的平台	1
二、基因工程技术是未来园艺生物技术的核心	2
三、生物技术对园艺科学发展的贡献	3
四、园艺生物技术的展望	6
第二章 园艺植物组织培养	7
第一节 概说	7
一、植物组织培养的基本含义	7
二、园艺植物组织培养的意义	8
第二节 园艺植物组织培养的原理与技术	10
一、组织培养室的设计及其基本设备	10
二、操作技术	11
三、培养基的成分与作用	14
四、园艺植物组织培养的技术步骤	19
第三节 园艺植物组织培养的应用	24
一、器官培养与离体繁殖	24
二、胚抢救技术	26
三、花药、花粉培养与单倍体育种	28
第三章 原生质体培养和体细胞杂交	30
第一节 原生质体研究的发展和应用	30
一、原生质体研究的发展	30
二、原生质体的应用	31
第二节 原生质体分离、纯化	32
一、原生质体分离	32
二、原生质体纯化	33
三、原生质体活力测定	34
四、影响原生质体分离的因素	34
第三节 原生质体培养及植株再生	35
一、原生质体培养方法	35
二、原生质体培养基	36



三、原生质体培养及植株再生·····	36
四、原生质体再生植株的遗传变异及其利用·····	38
第四节 原生质体融合·····	40
一、原生质体融合的发展·····	40
二、原生质体融合方法·····	41
三、原生质体融合方式·····	43
四、体细胞杂种的筛选和鉴定·····	44
第五节 体细胞杂种核质遗传·····	46
一、体细胞杂种核遗传·····	46
二、体细胞杂种细胞质遗传·····	47
第六节 原生质体融合与植物遗传改良·····	48
一、克服生殖障碍,创造新种质·····	48
二、转移有利性状,改善作物品质·····	49
三、转移部分染色体,获得非对称杂种·····	49
四、转移细胞质基因组,得到胞质杂种·····	50
第四章 园艺植物病毒的脱除、检测及鉴定技术·····	52
第一节 园艺植物病毒病·····	52
一、园艺植物病毒病的发生及危害特点·····	52
二、重要的园艺植物病毒及类似病原·····	53
三、园艺植物病毒病的防治·····	53
第二节 病毒鉴定及检测技术·····	54
一、生物学鉴定·····	54
二、血清学检测·····	57
三、核酸分析·····	63
第三节 园艺植物病毒脱除技术·····	66
一、热处理脱病毒·····	66
二、茎尖培养脱病毒·····	67
三、热处理与茎尖培养相结合脱病毒·····	68
四、微芽嫁接脱病毒·····	69
五、化学处理脱病毒·····	70



第五章 分子标记技术原理与应用	71
第一节 分子标记的原理	71
一、DNA 是主要的遗传物质	71
二、DNA 复制和体外扩增	71
三、DNA 片段鉴定技术	74
第二节 几种常用的分子标记技术	76
一、限制性片段长度多态性	76
二、随机扩增多态性 DNA	77
三、简单重复序列	77
四、扩增限制性片段长度多态性	78
第三节 分子标记的应用	79
一、种质评价和核心种质筛选	79
二、杂种鉴定和早期辅助选择	82
三、连锁遗传图的构建	84
第六章 基因分离与克隆	89
第一节 基因分离的策略	89
一、功能克隆法	89
二、图位克隆法	90
三、差异表达分析	90
四、同源序列法	91
五、转座子标签法与 T-DNA 标记法	91
六、基因芯片	92
第二节 基因分离和克隆的基本步骤	93
一、实验材料的选择	93
二、目标 DNA 片段的制备与克隆	93
三、目的基因的筛选	94
第三节 cDNA 文库的构建	95
一、cDNA 文库的构建流程	95
二、RNA 提取	95
三、cDNA 合成	96



四、将 cDNA 装配到载体上	97
五、文库滴度测定和扩增	100
第四节 目的 cDNA 克隆的筛选	101
一、菌落杂交	101
二、抗体筛选	102
三、cDNA 顺序测定和连接	102
第五节 基因组 DNA 克隆	103
一、制备可供克隆的 DNA 片段	103
二、构建基因组文库的克隆载体	104
第七章 转基因植物	107
第一节 引言	107
一、发展历程	108
二、应用现状	108
第二节 植物遗传转化体系的建立	110
一、农杆菌介导的遗传转化	110
二、基因枪介导的遗传转化	112
三、原生质体介导的遗传转化	112
四、花粉管通道法	114
五、无选择标记基因的转化系统	115
第三节 外源基因整合表达的鉴定与分析	116
一、报告基因及其检测	116
二、选择标记及其检测	118
三、外源基因表达的检测	120
四、转基因沉默	121
第四节 转基因植物安全管理	122
一、转基因植物的食品安全性	122
二、转基因植物的生态环境安全性	124
三、转基因植物安全性管理的范畴及重要性	125
第八章 果树生物技术研究进展	128
第一节 果树细胞学技术研究	128



一、茎尖培养	128
二、胚培养	129
三、花粉、花药培养	131
四、悬浮细胞培养	131
五、原生质体培养	132
六、原生质体融合	133
第二节 果树分子标记技术应用	133
一、果树分类	134
二、种质资源鉴定及品种鉴别	136
三、果树基因分子标记及辅助选择育种	139
四、构建遗传图谱	141
五、其他方面	142
第三节 果树基因分离与克隆	143
一、与果实成熟相关的基因	143
二、多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白基因	145
三、多酚氧化酶基因	145
四、钙调蛋白基因	145
五、自交不亲和基因	145
六、花分生组织基因	146
七、抗病性基因	146
八、抗逆性基因	146
九、着色基因	147
十、品质基因	147
十一、其他一些基因	147
第四节 果树转基因研究	147
一、常用转化方法	153
二、常用受体	154
三、选择标记基因与转化细胞的筛选	154
四、导入的外源基因	155
五、展望	157



第九章 蔬菜生物技术研究进展	159
第一节 蔬菜细胞学技术	159
一、蔬菜组织培养、脱毒与快速繁殖	159
二、蔬菜花粉、花药培养与单倍体育种	161
三、蔬菜原生质体培养和体细胞杂交	162
四、蔬菜作物细胞悬浮培养	164
第二节 分子标记技术应用	164
一、蔬菜作物遗传图谱的构建	164
二、蔬菜种质资源的研究	165
三、分子标记与比较基因组学	167
四、蔬菜作物基因的定位	169
五、分子标记辅助选择加速育种	171
六、作物指纹图谱与品种纯度鉴定	171
第三节 基因分离与克隆	172
一、蔬菜作物抗病、虫基因的克隆	172
二、与生长发育有关的基因以及其他基因的克隆	174
第四节 转基因蔬菜	176
一、蔬菜遗传转化体系的研究与转基因的发展方向	176
二、抗病转基因蔬菜	178
三、抗虫转基因蔬菜	181
四、转基因蔬菜与品质改良	182
五、转基因创造耐贮藏蔬菜	183
六、抗逆性改良转基因蔬菜	184
七、雄性不育与单性结实	186
八、转基因蔬菜生产乙型肝炎口服疫苗	186
第十章 生物技术在花卉遗传改良上的应用	188
第一节 组织培养技术	188
一、花卉的离体快繁和工厂化育苗	188
二、利用微茎尖培养获得无病毒植株	193
三、结合细胞和组织培养进行突变体的诱导和筛选	194



四、利用花药与花粉培养等进行单倍体育种	194
五、利用胚乳培养等获得三倍体植株	194
六、利用胚胎培养和体细胞杂交等克服远缘杂交障碍	195
七、利用离体培养进行种质资源的长期保存和远距离运输	195
八、通过组织培养提供生物技术育种的中间材料	195
第二节 分子标记在花卉遗传改良中的应用	195
一、分子遗传图谱的构建	196
二、遗传多样性、亲缘关系分析	196
三、农艺性状的定位	197
四、标记辅助选择	197
第三节 基因工程在花卉遗传改良中的应用	197
一、花色修饰	203
二、株型改良	204
三、增加香味	205
四、延长花期	206
五、开花调控	206
六、改良花型	207
七、创造不育基因工程	208
八、提高抗病虫能力基因工程	208
九、增加抗逆性基因工程	209
十、展望	209
参考文献	210

第一章 绪 论

20 世纪 80 年代以来,生物技术(biotechnology)一词由专业性刊物逐步走向大众。生物技术是一个不断发展的概念。随着科技的发展,生物技术的内涵也不断发生变化。过去将生物发酵制造酱油等产品的技术称为生物技术,即利用生物通过工业化途径获得产品的技术总称。80 年代以前,生物技术主要包含细胞水平、器官水平的一些技术;今天,人们谈论的生物技术已远远超出了这一范畴,它是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。狭义的植物生物技术是指:在离体条件下,对植物(细胞)进行遗传改良或使其增殖的各种技术的总称,包括细胞水平、分子水平两个大的层面。分子生物学以及分子生物学技术的发展大大促进了生物技术的进步。细胞学以及分子生物学是生物技术的基础。目前,人们在谈论生物技术时,经常将分子水平的一些研究手段,如分子标记也归入生物技术范畴。为此,本书将以园艺植物作为研究对象,介绍一些有关的生物技术。这些技术包括一般的组织培养(器官培养,例如花药、茎尖、胚乳等)、细胞培养(原生质体)、细胞融合、基因克隆、遗传转化及分子标记等。



一、组织和细胞培养是园艺植物生物技术的平台

早在 1838—1839 年, Schleiden 和 Schwann 提出了植物和动物均由细胞构成,细胞进行分裂而增多,组建了生物体的“细胞学说”,并指出,如果所提供的条件能同在活体内一样,每个细胞应该能独立生存和发展。1898 年德国植物生理学家 Haberlandt 试图通过实验来证明该学说,于 1902 年发表了植物细胞培养方面的第一篇论文,提出了植物细胞全能性(totipotency)的概念。这一概念是指植物的每一个细胞在一定条件下,具有发育成一棵完整植株的能力。这一概念直到 1971 年烟草单细胞培养成功才得到完全证明。在这几十年的探索中,科学家不断接近成功,经历了培养物(外植体, explant)由器官到组织,由多细胞到单细胞的漫长过程。1922 年, Kott 用稀释的 Knop 溶液加入一些复杂的有机成分,培养豌豆和玉米根尖,获得了成功。1930—1950 年认为是组织培养技术的发展时期,法国的 Gautheret 和美国的 White 为首的科学家形成了两个植物组织培养研究中心。White 首先建立了人工合成培养基,发现 B 族维生素对离体培养根的影响。1933 年,我国的李继侗和沈同研究银杏的幼胚培养,将银杏胚乳的提出物加入培养基,获得了成功,这是首次利用天然提出物获得成功的报道。1934 年,我国植物生理学家罗宗洛和罗士韦研究玉米等根尖培养,取得很有意义的结果。1943 年, White 出版了《植物组织培养手册》。1958 年, Steward 用烟草的髓细胞培养出完整植株,向证明细胞全能性迈进了一大步。这一结果促进了多细胞组织和器官培养的研究与应用。1960 年 Morel 培养兰花茎尖获得再生植株,并证明脱除了病毒。这一研究结果催生了兰花工业的发展,直到今天,世界兰花种苗基本上都是通过

组织培养生产的。就在同一年,Cocking 通过酶解方法从植物组织中分离得到去除了细胞壁的原生质体,使组织培养技术又向前迈进了一步。1962 年,Murashige 和 Skoog 发表了促进烟草快速生长的培养基配方,即今天十分流行的 MS 培养基。1964 年,Cuha 和 Maheshwari 成功地用曼陀罗花药培养得到再生植株,开创了花药培养获得单倍体的先河。1971 年,Takebe 等报道了烟草原生质体培养成为完整植株,至此,植物细胞全能性得到完全证明。次年,Carlson 获得烟草两个种的原生质体融合再生的体细胞杂种植株。回顾这一历程,不难看出,植物组织培养的发展得益于两个方面的进展:第一是对植物激素(plant hormone)的认识,以及人工合成激素(生长调节剂 plant growth regulator,PGR)的生产和应用,促进了植物组织培养技术的发展。1934 年 Went 发现了植物生长素,1956 年 Miller 发现了细胞激动素。正是这些发现带动了植物组织培养技术的发展。今天,组织培养研究多数情况下是在摸索激素配比,也说明了植物激素研究对于组织培养的重要性。第二是植物营养学科的发展。人们认识了植物生长必需的营养物质后,利用该学科的成就,不断改进培养基配方,使得组织培养技术迅速推广。

正是有了植物组织培养技术的发展和成熟,有了这样一个离体无菌的技术平台,人们才有可能进行今天的转基因研究,才会有“植物分子设计”的概念产生,才会有今天依赖离体培养的诸多技术的产生,如快繁技术、离体保存、茎尖微芽嫁接脱除病毒技术等。可以说,组织培养技术是植物生物技术的基本平台,一个植物组织培养技术的成熟程度可以影响其基因工程的进展。

二、基因工程技术是未来园艺生物技术的核心

基因工程技术的发展以 20 世纪 70 年代 DNA 重组技术的建立为标志。人们把 1953 年 Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋结构模型,作为分子生物学和基因工程技术的里程碑。与组织培养技术的发展历程类似,基因工程技术的发展得益于生物化学、遗传学、细胞学等多个学科的发展。1983 年,世界上首批转基因烟草和马铃薯问世;1986 年,首批转基因植物进入田间实验;1993 年,转基因番茄在美国面市。尽管转基因番茄没有在美国得到大面积推广应用,但转抗除草剂基因的大豆、转抗虫基因的玉米却在美等国家大面积推广,产品已销往世界上许多国家。根据美国农业部的资料,到 2000 年,全世界转基因作物面积达到 4 420 万 hm^2 ,比 1996 年增长了 26 倍。2001 年全球转基因作物种植面积超过 5 000 万 hm^2 ,2002 年更是创出了历史新高,达 5 867 万 hm^2 。全世界大豆的 45%,玉米的 11%,棉花的 20% 以及 11% 的油菜种植的是转基因品种。在美国则达到 75% 的大豆,34% 的玉米以及 71% 的棉花为转基因品种。2004 年美国种植的大豆中,将有 86% 为转基因品种,高于 2003 年的 81% 和 2002 年的 75%。我国转基因研究开始于 20 世纪 80 年代初,1986 年国家“863”计划的启动实施,在组织和经费上为我国植物转基因研究提供了保障。根据有关部门统计,农业部生物技术安全委员会批准进入田间环境试验的转基因作物有水稻、玉米、大豆、番茄和马铃薯等 60 余种,2001 年中国转基因作物(主要是转基因棉花)种植面积达到 70 万 hm^2 ,列世界第四位。蔬菜作物是我国园艺作物中较早开展转基因研究的类型,我国首例商品化生产的转基因作物就是耐贮藏的番茄。之后,有抗病毒的番茄、辣椒,花色改变了的矮牵牛等获得商品化生产批准。2003 年,国家“863”计划开始资助果树、花卉的转基因研究,目前正在开展转基因研究的园艺作物除上面提到的外,还有柑橘、苹果、甘蓝、土豆、康乃馨等。值得指出的是,我国园艺作物转基因研究相对于大田作物而言起步晚一些。更为

重要的是我国自己克隆的目标基因十分有限,在转基因作物的产业化过程中将遇到一些障碍。

我国在园艺作物组织培养技术方面积累了很多的经验,特别是对于组织培养这样一门“不仅是科学而且是艺术”的学科和领域,这些经验是我国园艺作物基因工程研究的宝贵资源。

我们也不得不看到,目前转基因研究改良的性状主要还是抗性,如抗虫、抗除草剂和抗病等一些相对而言比较简单的质量性状。转基因作物由于从别的生物获得了抗性基因,特别是转基因的同时,转入了一些抗性标记基因,对其安全性人们比较重视。世界各国对于这种新生事物表现出的态度也不相同,总体上对于转基因的安全性的态度可以分为:反对、支持和无所谓三种。由于经济一体化带来的问题,各国对于转基因农产品的安全性的看法掺杂着科学、经济、贸易、政治多种因素。就科学层面而言,目前转基因作物以及农产品是否安全没有定论。但是,各国科学家和政治家对于这一技术的深远意义的认识是一致的,发展转基因技术是一个正确的方向,因此,各国均在大力研究其理论基础、实用技术、潜在的问题及克服办法。可以认为基因工程技术的研究将是未来一段时间各国生物科学研究的热点,也是竞争未来农作物品种国际市场的一个制高点,因此必将成为生物技术研究的核心,特别是与之相关的基因克隆研究将成为竞争的焦点。

三、生物技术对园艺科学发展的贡献

生物技术促进了园艺产业的发展,克服了一些常规技术无法解决的困难,给园艺种(苗)业带来了革命性变化。

1. 脱毒与快速繁殖(快繁)技术广泛应用于园艺作物种(苗)生产

园艺作物有不少是通过无性繁殖途径进行种(苗)生产的,例如绝大多数果树作物、蔬菜中的土豆、石刁柏、生姜、大蒜,花卉中的兰花等。植物长期生长在自然条件下,难免会感染各种病毒性病害,通过无性繁殖途径,在扩繁植物体过程中也将病毒扩繁和扩散。自组织培养技术成熟以来,人们就通过茎尖培养或者茎尖微芽嫁接途径将已感染病毒及类病毒的材料进行病毒脱除,获得无病毒的原种,“恢复”原来品种的面貌。脱毒后的品种比原来感染病毒时,产量提高了10%~15%,植株健壮,个体间整齐一致。目前这一技术已经广泛应用于柑橘、苹果、香蕉,兰花,生姜、土豆等作物中,成为了一项常规化的高技术。在本园艺作物中,对于一些成年态特别是生理年龄比较老的品种,茎尖培养往往比较困难。20世纪70年代,西班牙 Navarro 等人建立了一种微芽嫁接技术(shoot tip grafting, STG 技术)。该方法利用茎尖的一部分组织尚未分化输导组织而不带病毒的原理,将这一部分茎尖组织(0.14~0.18 mm)在显微镜下嫁接在无病毒砧木(试管实生苗)上,获得脱毒苗木。目前这一技术已成为柑橘等木本果树主要的脱毒方法。

利用脱除病毒或无病毒材料在离体条件下快速繁殖,可以短期内提供大批量、规格一致的种(苗),提高了繁殖效率。有人计算过,理论上一个苹果茎尖在试管中,一年内可以繁殖1 000 万个小苗;1 m² 的培养面积可以相当于 0.066 7 hm² (1 hm² = 15 亩)地提供的土豆产种量。过去常规繁殖香蕉是通过分株形式进行的,一年的繁殖系数大约为 4~6 倍,如果短期内需要大面积发展香蕉,往往种苗供应是发展的瓶颈。自从快繁技术成熟后,今天一个小楼可以年产上百万株苗木,解决了品种更新、产业发展的种苗供应问题。客观地讲,生物技术在园艺中应用最广泛、取得效益最大的方面就是快繁技术;它突破了种苗生产的时空局限,繁殖效率高,运输和出口方便,也

便于种苗的跟踪管理。目前,实现种(苗)产业化的园艺植物以草本居多,如香蕉、草莓、土豆和兰花等花卉,木本果树主要是利用该技术培养原种。

应该指出的是,快速繁殖与田间繁殖相比,效率提高了,但是容易出现体细胞无性系变异(somaclonal variation)。20世纪80年代,人们已经注意到这一问题。目前,对于这一问题的认识主要有几点:第一,产生变异是生物的一个特性,在离体条件下,由于在同一时间段内细胞繁殖次数比田间增加许多,一些在自然界中也产生的变异得到放大,有机会在个体水平表现。第二,组织培养体系与活体条件有着很大的差别,植物细胞在这种特殊的条件下,被诱导出许多变异。第三,作物快繁以及保持种性的需要,培养过程中出现的这种变异应该尽量避免,控制的主要途径包括尽量减少激素的使用,及时剔除变异和非正常的苗木,尽量少利用高代苗木进行繁殖。

2. 花药培养以及小孢子培养是获得单倍体以及纯合二倍体材料的最佳途径

自从印度科学家 Guha 和 Maheshwari 首次得到植物花药植株以来,目前世界上已有近 300 种植物成功获得了花药植株。我国薛光荣等人在苹果花药培养研究方面坚持了 20 余年,目前已获得优良的富士花培品系。此外,在大白菜等十字花科蔬菜的小孢子培养后代中,选育出品种(系)。如今,花药或小孢子培养已成为蔬菜育种中创造亲本材料的有效途径。

3. 胚抢救技术克服了果树早熟品种选育的技术难题

许多作物,特别是木本果树,果实成熟时胚还没有成熟,要对早熟品种进行杂交改良,遇到胚不能成熟,得不到后代的问题,影响了杂交育种效率,这些情况在核果类果树育种中经常遇到。此外,在柑橘等果树的倍性育种中,由于亲本的限制,需要用低倍性亲本作母本,而在低倍性作母本的杂交中,经常遇到胚早期败育的问题。例如,在二倍体柚子与四倍体体细胞杂交培养三倍体的过程中,就遇到了杂种胚在授粉后 80~90 d 败育的情况,再过 100 d 果实成熟时,种子已成为败育的瘪子,无法得到杂种。利用组织培养技术进行幼胚抢救(embryo rescue),彻底解决了这一问题。这一技术已成为果树育种的一个重要辅助手段。20世纪70年代,上海和江苏等地就通过胚抢救技术培育出早熟桃新品种;新近,山东农业大学通过这一技术培育出早熟杏品种;华中农业大学利用胚抢救技术,获得了二倍体柚子与四倍体体细胞杂种等 10 个杂交组合的三倍体植株,有望培育出无核的柑橘新品种。

4. 细胞融合技术创造出 200 多例柑橘体细胞杂种

20世纪70年代初,烟草种间细胞融合获得体细胞杂种的报道给园艺作物遗传改良提供了一条新途径,几年后,番茄与土豆的融合得到再生植株,尽管该杂种没有达到上结番茄下结土豆的预期效果,但毕竟人们在突破植物亲缘关系等原因造成的生殖隔离方面向前迈进了一步。该技术经过 10 多年的发展到 80 年代中期,人们对它的价值已经有比较客观的认识。第一,体细胞融合技术是不同于有性杂交的植物细胞遗传重组的体系,这种无性杂交方式不受季节的限制;在实现细胞核重组的同时,还有细胞质重组,对于许多作物是研究细胞质重组的唯一技术途径。第二,细胞融合技术在一定程度上可以克服亲缘关系造成的生殖隔离,在柑橘中的研究表明,嫁接亲和的两物种融合一般才能得到遗传稳定的杂种后代,亲缘关系太远的两种细胞杂交,即使得到了杂种植株,获得可育的后代也比较困难。第三,体细胞融合技术在培育可以无性繁殖的园艺作物,特别是在种植目标是收获营养体器官的作物中将可能具有较大的潜在价值。第四,细胞融合技术在实现遗传重组的同时,将导致倍性的增加;在融合后代中,既有预期的四倍体,也有二倍体杂种和非整倍体后代。以上这些认识对于今后的研究具有指导意义。在所有植物中,目前仍然