

植物分子育种

副主编 李冠一 黄骏麒
主编 林栖凤



科学出版社
www.sciencep.com

植物分子育种

Plant Molecular Breeding

主 编 林栖凤

副主编 李冠一 黄骏麒

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

自 1974 年周光宇先生提出外源 DNA 直接导入植物的分子育种技术以来,随着分子生物学及其技术的快速发展,植物分子育种研究在我国已取得巨大进展。本书概括了我国植物分子育种研究领域近十年来的最新成果以及相关理论、技术方法的最新研究进展。共分三篇,第一篇主要概述了植物分子育种的发展、研究及应用等;第二篇主要包括了植物分子育种的主要方法和技术以及一些相关问题的探讨;第三篇为植物分子育种方面最新的研究论文。

本书可供从事植物分子育种和相关生物技术研究、教学工作人员阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

植物分子育种/林栖凤主编. —北京:科学出版社, 2004

ISBN 7-03-014452-X

I. 植… II. 林… III. 分子生物学-应用-植物育种-遗传育种
IV. S336

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 103569 号

责任编辑:马学海 庞在堂 / 责任校对:钟 洋
责任印制:钱玉芬 / 封面设计:陈 敬

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>

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2004年11月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2004年11月第一次印刷 印张:18 1/2 插页:4

印数:1—1 500 字数:421 000

定价:60.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换(环伟))



著名科学家、原全国政协副主席钱伟长先生于1997年到海南大学视察并指导国家“九五”重点科技攻关项目——“耐盐植物分子育种”研究工作。

我们有责任见难而上去解决共和国发展过程中的困难问题，尤其是农业上的困难问题。

钱伟长

1997年1月22日

前进中的植物分子育种

周光宇

2004, 4, 16



著名科学家、植物分子育种花粉管通道技术创始人周光宇先生（1995年）

《植物分子育种》编辑委员会

主 编 林栖凤

副主编 李冠一 黄骏麒

编 委 方孝东 罗红丽 黄永芬

周海龙 邓用川 吴敬音

海南大学优秀学术著作出版基金资助

主要作者名单

(按汉语拼音顺序)

敖光明	曹宛虹	陈 洁	陈 松	陈全家
陈受宜	陈旭升	成卓敏	邓用川	方孝东
付 畅	龚蓁蓁	郭三堆	郝建江	何锶洁
黄骏麒	黄永芬	黄 薇	郎志宏	雷勃钧
李冠一	林栖凤	刘凤珍	刘鸿宇	罗光佐
罗红丽	马 盾	倪建福	倪万潮	余建明
万文举	汪清胤	王才林	王桂玲	王金生
王黎明	王丕武	周海龙	宗俊勤	

前 言

外源 DNA (基因) 直接导入植物的分子育种技术, 即以花粉管通道法 (pollen tube pathway) 为代表的生殖系统细胞原位转化技术, 自 1974 年我国周光宇先生首创以来, 至今已经整整 30 年。该技术由于具有无基因型限制和易于实现多基因转化的特点, 可以在开花植物和不同物种之间实现基因的转移, 使受体植物在获得新的基因型的同时, 也获得转基因所表达的新的表型性状, 因此自创建以来, 一直受到国内外的广泛关注。该技术在 1986 年已通过中国科学院与农牧渔业部组织的专家评议, 认定为一种有应用价值的育种新途径, 而后又被国家科技委员会 (国家科学技术部) 确定为一种可行的转基因技术。

为推动植物分子育种领域工作的发展, 周光宇先生曾先后于 1988 年 5 月在山东德州组织召开了第一届全国植物分子育种学术研讨会, 有 49 个单位 100 余人参加; 1991 年 12 月在上海召开了第二届全国植物分子育种学术研讨会, 有 80 多个单位 180 余人参加; 1994 年 5 月在长沙召开了第三届全国植物分子育种学术研讨会, 有 93 个单位 190 余人参加。从第三届全国植物分子育种学术研讨会至今, 已经历了整整 10 年。据不完全统计, 目前国内 25 个省市有近百家实验室应用生殖系统细胞原位转化的技术将外源 DNA (重组 DNA 分子) 直接导入水稻、麦类、棉花、大豆、花生、蔬菜以及果木等, 开展了大量的工作, 进行了广泛地研究。在国际上, 美、欧、亚洲的一些实验室应用这一技术进行水稻、麦类、棉花、豌豆、牧草等的研究, 也获得了一些有益的变异后代。在一批生物学家和广大农业科技工作者的共同努力下, 新的种质材料不断涌现, 成功的实例日益增多。

我们受中国生物化学与分子生物学会和农业分会的委托, 在周光宇先生的亲自指导下, 承担组织召开第四届全国植物分子育种学术研讨会的任务, 这将是从事分子生物学、基因工程和农业遗传育种方面专家的再一次聚会。在过去 30 年, 特别是最近 10 年来随着分子生物学及生物技术的快速发展, 植物分子育种的理论研究更加深入, 技术日臻完善, 分子育种的农作物种类更加丰富, 已取得了令人瞩目的巨大进展。为此, 特出版《植物分子育种》一书, 以飨读者。该书集中报道和展示了我国在植物分子育种研究领域取得的最新成果以及相关理论、技术方法的最新研究进展, 同时还对国内外植物分子育种研究状况进行了综述和评价, 可以预期它将为进一步推动我国植物分子育种的发展起到积极的作用。本书特此刊登我国著名科学家、原全国政协副主席钱伟长先生于 1997 年视察海南大学国家“九五”重点科技攻关项目——“耐盐植物分子育种研究”工作时的题词: “我们有责任迎难而上, 去解决共和国发展过程中的困难问题, 尤其是农业上的困难问题”; 同时刊登植物分子育种创始人周光宇先生于 2004 年专为本书出版的题词: “前进中的植物分子育种”, 以期共勉。

《植物分子育种》一书共分三篇, 第一篇为概述, 着重阐述植物分子育种的兴起与

发展，并全文介绍周光宇先生于1995年3月，致国家科技委员会“关于申请发展我国农业植物分子育种的报告”；第二篇为植物分子育种的理论与技术；第三篇为植物分子育种研究实例，包括基础研究实例和应用研究实例两部分。第一、二篇由林栖凤、李冠一、黄骏麒等撰写，第三篇由龚蓁蓁、陈受宜、敖光明、成卓敏、万文举、雷勃钧、黄永芬、王才林、黄骏麒、李冠一、林栖凤等我国从事植物分子育种或相关研究的专家学者撰写。“海南大学优秀学术著作出版基金”为本书的出版提供了部分资助，在此一并深表谢忱。由于时间仓促、编委分散，本书难免有不周欠妥之处，敬请读者批评指正。

林栖凤

海南大学生物科学技术研究所
海南省耐盐作物生物技术重点实验室
2004年9月12日

目 录

前言

第一篇 概 述

第一章 植物分子育种的兴起与发展	3
第一节 我国植物分子育种研究历程的回顾	3
第二节 植物分子育种发展概况	6
第二章 植物分子育种的主要目标	9
第三章 植物分子育种的研究与应用	18
参考文献	26

第二篇 植物分子育种的理论与技术

第一章 植物遗传转化的主要方法 (一)	33
第一节 农杆菌介导转化法	33
第二节 基因枪转化法	36
第三节 原生质体转化法	37
第四节 病毒介导法	39
第二章 植物遗传转化的主要方法 (二) —— 生殖细胞原位转化法	41
第一节 生殖细胞原位转化法的理论依据	41
第二节 花粉管通道转化技术的分子验证	43
第三节 主要方法	44
第四节 DNA 的提取	46
第五节 关键技术	49
第六节 方法评价	52
第三章 鉴定	54
第一节 目标性状的生物学鉴定	54
第二节 分子生物学鉴定	60
第三节 基因组的鉴定	64
第四节 外源基因表达蛋白的检测	68
第五节 细胞遗传学分析	71
第四章 DNA 标记辅助选择育种	73
第一节 分子标记技术分类	73
第二节 分子标记辅助选择	75
第三节 植物分子标记辅助育种的研究进展	77

第五章 若干问题的探讨	82
第一节 目的基因的分离	82
第二节 转化方法	83
第三节 组织培养	84
第四节 转化植株的遗传稳定性	84
第五节 转基因植物的生物安全性	85
参考文献	88

第三篇 植物分子育种研究实例

第一章 基础研究实例

盐生植物耐盐相关基因的分离与识别	95
花粉管通道法在转化棉花腺苷酸核糖基化作用因子 1 (<i>arf1</i> 基因) 启动子中的 应用	104
红树的抗盐性及其在分子育种中的应用	109
盐胁迫下红树植物秋茄某些生理特性的研究	119
转录后基因沉默在植物中的应用	124
分蘖调控相关基因 PF40 的克隆及其功能研究 (摘要)	132
水稻抗病性相关 homeodomain 型转录因子基因 <i>OsBIHD1</i> 的克隆鉴定与功能 分析 (摘要)	133
植物乙烯受体参与逆境胁迫反应 (摘要)	135
大豆遗传图谱构建及耐逆相关基因的克隆与鉴定 (摘要)	137

第二章 应用研究实例

水稻

用花粉管通道法将慈菇蛋白酶抑制剂(API)基因导入水稻获得转基因植株	138
水稻分子育种研究	145
红树 DNA 导入水稻引起的变异	153
水稻幼苗耐盐性半定量鉴定方法的建立 (简报)	157
转 <i>hrfA</i> 基因表达 Harpin_{Xoo} 增强植物对病害的广谱抗性 (摘要)	163

小麦、高粱

小麦抗黄矮病基因工程育种	164
导入高粱 DNA 选育高产抗逆春小麦新品系研究	168
高粱导入外源 DNA 后代的含糖量变异研究	174

棉花

慈菇蛋白酶抑制剂(API)基因导入棉花获得转基因植株	178
转基因抗虫杂交棉宁杂210(GKz27)的品种特性分析	183
提高棉花花粉管通道法转化率的研究	189

玉米

高赖氨酸蛋白基因 <i>SBgLR</i> 的克隆及其对提高玉米种子中蛋白质和赖氨酸的 作用	194
---	-----

大豆、花生	
外源 DNA 直接导入法的大豆分子育种成效	203
<i>Bt</i> + <i>CpTI</i> 抗虫基因转化大豆的研究	209
胆碱磷酸转移酶基因(<i>CPT</i>)转化大豆的研究(摘要)	215
异戊烯基转移酶基因(<i>IPT</i>)转化大豆的研究(摘要)	217
美洲拟鲈抗冻蛋白基因(<i>AFP</i>)转化大豆的研究(摘要)	219
外源 DNA 导入花生创造变异的研究(摘要)	221
果蔬	
耐盐番茄分子育种及染色体原位杂交分析	223
红树 DNA 导入茄子获得耐盐性性状及其显微结构观察	231
耐盐辣椒分子育种研究	240
外源 DNA 导入豇豆引起变异的研究	247
胆碱磷酸转移酶基因(<i>CPT</i>)植物表达载体的构建和转化番茄的研究(摘要) ..	253
美洲拟鲈抗冻蛋白基因 (<i>AFP</i>) 转化番茄的研究(摘要)	255
异戊烯基转移酶基因(<i>IPT</i>)的克隆和转化番茄的研究(摘要)	257
异戊烯基转移酶(<i>IPT</i>)基因转化青菜的研究(摘要)	259
树木草类	
<i>NTHK1</i> 基因在杨树中的转化及耐盐性研究(摘要)	261
农杆菌介导法获得草地早熟禾抗虫转基因植株(摘要)	262
草类植物分子育种研究进展	263
烟草	
抗真菌蛋白(<i>AFP</i>)基因转化棉花和烟草的研究	276

图版

第一篇 概 述

第一章 植物分子育种的兴起与发展

第一节 我国植物分子育种研究历程的回顾

早在 1974 年, 基因工程刚刚兴起之际, 我国科学家周光宇便已提出远缘 DNA 片段杂交的理论, 同时设计了一套外源 DNA (基因) 导入作物的技术, 即花粉管通道技术 (pollen tube pathway)。在 1978、1979 年获得实验证实之后, 相继于 1983 年, 在“Methods in Enzymology”上首次报道了通过棉花花粉管通道导入外源 DNA 获得成功的研究成果。此后, 这一为我国科学家首创的技术引起了国内外广泛地关注。

花粉管通道技术具有无须了解亲本双方的遗传背景, 无须事先分离识别基因, 也避免了组织细胞培养, 抗性标记、筛选再生等一系列繁复的操作, 可以直接获得转基因植物, 并从中获取目的基因等一系列独特的技术优点。因此为作物育种开辟了一条科学、简便、快捷实效而切实可行的途径。早在 1986 年, 该技术即已通过中国科学院与农牧渔业部组织的专家评议, 并获得了“七五”期间科学院 (1987) 和国家 (1989) 颁发的科技进步二等奖。为了表彰首席科学家周光宇教授的杰出贡献, 1991 年, 中科院还曾授予她“七五”重大科研任务先进工作者称号。

因为当时主要以总 DNA 作为供体, 以普通农作物作为受体, 因此, 周光宇将花粉管通道转移技术称为“农业植物分子育种”技术。但随着生化与分子生物学的发展, 使用的供体 DNA 扩大到了重组 DNA 分子, 转化方法也从以花粉管通道法为代表的生殖系统细胞的原位转化, 拓展到了任何一种直接或间接转化的技术。按照周先生十年前的设想, 我国农作物育种已进入分子育种的阶段。

植物分子育种也就是在分子水平上进行的遗传育种, 它包括了以植物基因工程为代表的基因工程育种, 也包含了传统的作物遗传育种的内容, 二者的结合是发展的必然趋势。在目前具有农业生产价值的基因仍然十分缺乏的情况下, 植物分子育种也是充分利用我国丰富的种质资源, 分离获取具有自主知识产权的目的基因的一条重要途径。

为了发展我国植物分子育种的事业, 周光宇先生曾先后分别于 1988 年 5 月在山东德州, 1991 年 12 月在上海, 1994 年 5 月在长沙主持召开了第一届、第二届、第三届全国植物分子育种学术讨论会。分别有 49 个单位, 100 余人; 80 多个单位, 180 余人; 93 个单位, 190 余人参加。从 1978~1993 年的 15 年期间, 周先生曾先后出国 14 次, 应邀讲学 50 余次, 学术报告 18 次。为此可谓奉献了她大半生的精力, 她在学术上的胆识、创造和准确的预见, 在精神品格上的执着、顽强与坚毅, 以及她为我国农业发展无私奉献的精神堪称楷模, 令人钦佩。

近十年来, 周先生由于健康的原因, 一直没有举行过植物分子育种领域的全国性学术研讨会, 但是一批生物学家和广大农业科技工作者一直在努力地工作, 植物分子育种获得了长足的进展。在中国生物化学与分子生物学会和农业分会的领导下, 第四届全国植物分子育种研讨会将于 2004 年 11 月在海口召开。这将是从事分子生物学、基因工程

和农业遗传育种方面专家学者的再一次聚会，并按照周先生的意愿，出版《植物分子育种》一书，以展示由我国首创的外源 DNA（基因）直接转化技术在植物分子育种方面取得的最新成果和进展。据不完全统计，目前国内 25 个省市、有近百家实验室应用外源 DNA（基因）直接导入水稻、麦类、棉花、大豆、花生、蔬菜以及果木等，进行了广泛地研究和应用。在国际上，美、欧、亚洲的一些实验室应用这一技术进行稻、麦、棉、豌豆、牧草等的研究，也获得了一些有益的变异后代。该书的出版必将为促进我国农业的可持续发展和在国内外进一步推广植物分子育种理论和技术的应用发挥积极的作用。

今天，当我们回顾植物分子育种所走过的 30 年历程，谨向读者全文介绍植物分子育种研究创始人周光宇先生于 1995 年 3 月致国家科技委员会“关于申请发展我国农业植物分子育种的报告”，其目的在于使人们了解植物分子育种的兴起与发展，引起植物分子育种学家和相关科技工作者以及政府有关部门对植物分子育种的深层思考。

关于申请发展我国农业植物分子育种的报告

周光宇

中科院上海生化所退休研究员

植物分子育种研究起始者之一

植物分子育种的 DNA 片段杂交理论，以及应用整体植物不同发育时期的种胚细胞和苗端分生组织细胞为受体，直接导入外源 DNA（基因）的系统技术，20 世纪 70~80 年代已经广泛应用，并在国内发表了一系列论文。通过 1986 年分子育种的介绍活动，受到与会者欢迎后，开办了学习班，印发了讲义，进行了理论与实验操作的培训，从而引导了全国范围内分子育种研究的发展，促进了三届全国学术交流会的召开。在第二届会后，出版了《农业分子育种研究进展》一书。第三届会中印发了论文摘要，现正在组织编写一本从理论到应用的植物分子育种系统论述，以期有关科研与教学的参考之用。

在生产方面，国内已开展了十余种农作物的分子育种研究，其中主要农作物如稻、麦、棉、豆等的分子育种成果尤为突出。例如湖南农业大学万文举等应用玉米的 DNA 导入水稻，选育出来的玉米稻系列粒大、穗大、品质与产量超过当地推广的杂交水稻，达每亩 600kg 左右或更高，深受农民欢迎，1993 年经省级鉴定，1994 年即从一万亩扩种至二百万亩。山东农业大学于元杰等应用小牛胸腺 DNA（基因）导入小麦，选育出高产、优质、抗病、抗干热的小麦品系，1994 年 5 月已经通过省级鉴定，同年秋在山东、安徽、江苏、河南、河北等地播种面积近 40 万亩，1995 年可突破 100 万亩。江苏农科院经作所黄骏麒等于 70 年代末，将海岛棉 DNA 导入陆地棉，选育出的 3118 棉是高抗枯萎、耐黄萎病的棉花品系，80 年代前期已在长江中下游地区推广 3 万亩。黑龙江农科院大豆所雷勃钧等应用野生大豆 DNA 导入栽培大豆，选育出早熟、蛋白质含量提高的大豆品系，已经通过鉴定并进入推广生产。海南大学的林栖凤等将可食的海洋植物红树 DNA（基因）导入豇豆，获得耐盐度 1%~1.5% 的豇豆，1995 年 1 月已经通过国家科委鉴定。抗盐旱的研究是国际上十分重要、迫切需要解决的课题。上列工作均进

行了不同程度的生物学和分子生物学的验证。通过与中科院遗传所和上海生化所协作都已陆续应用 RAPD 技术进行导入的外源 DNA (基因) 的识别, 其中大豆的结果已在《中国科学》上发表。因此进一步应用 RAPD 技术为外源 DNA (基因) 的分离和重组, 以及发展与基因工程相结合的分子育种, 均具有了起始研究的基础。

植物分子育种研究是分子生物学工作者与育种学工作者紧密结合发展起来的, 获得了七五期间科学院 (1987) 和国家 (1989) 颁发的科技进步二等奖 (中科院生化所周光宇等、江苏农科院经济作物所黄骏麒等、中国农科院作物栽培所段晓岚和陈善葆)。科学院 (1991) 授予周光宇“七五”重大科研任务先进工作者奖状。

这一在我国兴起的植物分子育种研究, 1989 年起即引起了国外分子生物学工作者和正在开始植物基因工程研究者的密切关注, 至 1993 的 15 年间, 周光宇即因此出国 14 次, 在美、欧、亚洲 10 个国家的大学和科研单位邀请讲学 50 余次, 在国内外的国际学术讨论会上报告 18 次。

农业植物分子育种能够在我国 20 世纪 70 年代开始发展, 是由于直接应用了生产植物为受体的分子育种技术, 在不可能得到分离的、具有农业生产价值的基因情况下, 应用外源供体 DNA (基因) 进行了育种研究。

我国是一个农业大国, 农业是我国的国民经济基础。当分子生物学发展到基因工程出现, 进入了农业育种与分子学科结合发展的历史必然, 也就决定了植物分子育种研究首先在我国兴起的必然。作为中国的分子生物学工作者, 经历过农业欠收的苦难, 就更理所应当的首先考虑到农业植物分子育种。但是当时国际上尚未开始植物基因工程研究, 因而不得不首先探索分子育种可行性的理论依据与研究技术, 为此调查了我国的农业育种实践, 总结了米丘林学派进行的远缘杂交现象, 提出了 DNA 片段杂交理论, 并由此设计了外源 DNA (基因) 导入的分子育种技术。

这一理论联系实际的技术提出后, 因不见经传, 而受到当时少数摩尔根遗传学派权威学者的强烈反对, 认为不符合遗传育种规律。致使分子育种的发展陷入了学派的偏见, 使得当时已是上海生化所研究员、室主任、遗传分子 DNA 研究课题主持者的我, 即由此被攻击而撤职改行环保三年。国内少数传统遗传学权威, 习惯于近源精卵结合的常规遗传规律, 不熟悉分子遗传学的进展, 坚持历史上的学派成见。这致使分子育种本可以在十年左右就能达到现在的发展水平, 却经历了 20 年。

如今分子育种虽然已经出土, 并终于为实事求是者所共识。可惜的是, 面对这一事实, 至今科学界仍有极少数的新老高层次的有关权威人士, 对分子育种事实不加研究, 却持有发言权, 使植物分子育种的天空很难得到应有的理解、支持和发展速度。

但是科学的就总能被理解。在漫长的 20 年中, 国内主要应用供体 DNA 完成了分子育种第一阶段的目标。第二阶段要在第一阶段工作继续发展的基础上, 从卓有成效的分子育种植物中识别分离导入的外源 DNA (基因), 组建基因工程重组分子, 使能应用有益基因, 自由地导入不同受体植物, 扩大分子育种效果。

“九五”是 20 世纪最后的 5 年, 抓住了这 5 年, 到 21 世纪, 就可能使分子育种成为全国农业育种生产的主导技术之一, 并在国际上仍能处于领先地位。目前一批开创和领导分子育种研究的同志, 大多在 50~60 岁左右, 周光宇已 77 岁。大家都在为推进全国农业植物分子育种的发展而十分努力。20 年来走过的道路是艰难的、必要的、成功