

第六章 植物组织培养及

转基因技术

扬州大学农学院 Li QF

扬州大学农学院 Li QF

1. 什么是细胞全能性?

扬州大学农学院 Li QF

扬州大

2. 细胞全能性的理论基础是什么?

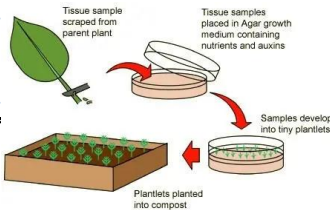


3. 植物细胞与动物细胞是否具有全能性?

一、植物组织培养

1. 概念

以植物体的一部分(外植体)，在人工控制的环境下离体培养发育，再生出完整植株或生产具有经济价值的其他产品的技术。



2. 发展简史

1839年，Schwann提出有机体的每一个生活细胞在适宜的外部环境条件下都有独立发育的潜能。

扬州大学农学院 Li QF

扬州大学农学院 Li QF

植物细胞全能性(totipotency): 指植物的每个细胞，都具有该植物的全部遗传信息，在一定培养条件下具有发育成完整植株的潜在能力。

1853年，Trecul利用离体的茎段和根段进行培养获得了**愈伤组织** (callus) 。

愈伤组织: 植物体的局部受到创伤刺激后，在伤口表面新生的组织。它由活的薄壁细胞组成，可起源于植物体任何器官内各种组织的活细胞。



水稻愈伤组织

文心兰根、茎及叶的愈伤组织

➢ 1902年，Haberlandt用人工培养基对分离的植物细胞进行培养，提出“细胞培养”与“激素作用”的概念。培养的细胞未分裂，原因：(1)培养基成分简单；(2)选材不合适。

扬州大学农学院 Li QF

扬州大学农学院 Li QF

➢ 1934年，White用离体的番茄根建立了第一个活跃生长的无性系，使根的离体培养实验首次获得了真正的成功。

➢ 1965年，随着生长素和细胞分裂素功能的发现，Vasil和Hildebrandt用单个分离的细胞培养获得整个植株的再生。

课后拓展-动物细胞全能性研究进展



3. 植物组织培养步骤



3.1 培养基

培养基: 植物组织培养中最主要的部分。

成分: 水、无机成分、有机成分、植物生长调节物质、琼脂、PH。

无机成分: 植物生长发育时所需要的各种矿质元素，包括大量元素（所需浓度>0.5 mmol/L，如氮磷钾钙等）和微量元素（所需浓度<0.5 mmol/L，如铁硼锰锌等）。

有机成分: 植物生长发育时所需的有机碳、氮等物质，包括糖、维生素等。

植物生长调节物质: 主要指植物激素生长素和细胞分裂素。

生长素: 主要功能是促进细胞伸长和细胞分裂，诱导愈伤组织形成，促进生根。常见的包括吲哚乙酸(IAA)、萘乙酸(NAA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)等。

细胞分裂素: 主要功能是促进细胞分裂，抑制衰老，当组织内细胞分裂素/生长素比值高时，可诱导芽的分化。常见的包括激动素(KT)、玉米素(ZT)等。

PH: 培养基的常用PH为5.8~6.0。

3.2 母本材料的选择与处理

外植体: 植物组织培养中作为离体培养材料的器官或组织。

选择: 外植体通常选择生长健壮的无病虫害的植株上正常的器官或组织，因为其代谢旺盛，再生能力强，比如水稻幼胚。

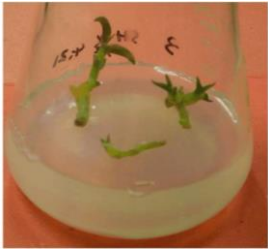
处理: 去除植物材料不用部分，进行清洗及灭菌操作。多采用表面浸润灭菌，灭菌试剂包括70%酒精、次氯酸钠、升汞等，配合表面活性剂（吐温等）可以降低植物材料表面的张力，达到更好的消毒效果。



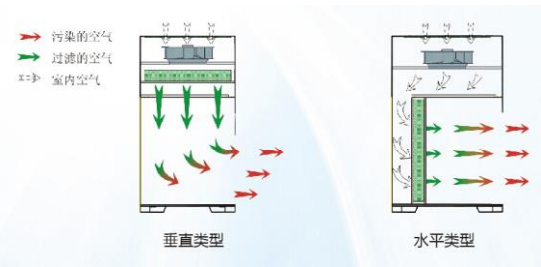
3.3 建立外植体无菌培养体系

本阶段主要是建立起外植体的无菌培养体系。成功的标志是外植体没有微生物污染，并且有一定的生长，例如茎尖的生长或愈伤组织的形成。

经过短期培养应该将有污染出现的培养容器丢弃掉，不再继续培养。



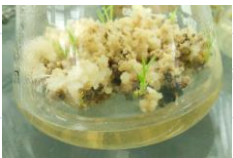
超净工作台



超净工作台

3.4 产生繁殖体

本阶段主要目标是扩增繁殖体的数量。例如，侧芽的生长，不定芽的产生，体细胞胚的形成和微型储藏器官（块茎和鳞茎）的形成。本阶段产生的繁殖体通常再次进入增殖循环中，以扩增到需要的数量。



3.5 移栽前培养

通过一些培养措施使得小苗生根并产生足够的光合能力。有些植物需要在这一阶段进行特殊处理以避免生长停滞或休眠。

3.6 移栽

本阶段为组培苗从组培瓶转入温室驯化培养。本阶段至关重要，如果操作不当，会造成大量损失。主要的原因有两个：

1. 组培苗容易失水死亡。组培苗通常在高湿度和低光强条件下培养，叶片表面的蜡质未形成。组培苗的气孔在遇到湿度降低时可能不会闭合。以上原因会导致组培苗在移栽后迅速失水死亡。

2. 组培苗以蔗糖为碳源且处于低光强下，光合能力较弱。如果在移栽后短时间内不能形成光合能力，也会出现死亡。

4. 植物组织培养的应用

4.1 植物繁殖与繁育

通过组织培养技术可以实现植物的无性繁殖。可以大幅提高繁殖速度和繁殖数量。可用于保存和恢复濒危植物种质资源及植物代谢物生产。

4.2 基因转化与遗传改良

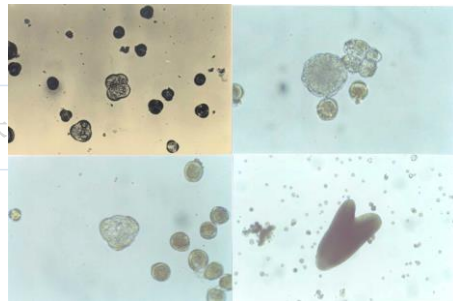
植物组织培养可用于将外源基因导入到植物体内，实现遗传转化。为植物功能基因组学研究及遗传改良提供了重要手段。

4.3 脱毒植物培育

植物生长点附近的病毒浓度很低甚至是无病毒，利用茎尖分生组织进行组织培养，可获得脱毒植物。脱毒可恢复原有优良性状。

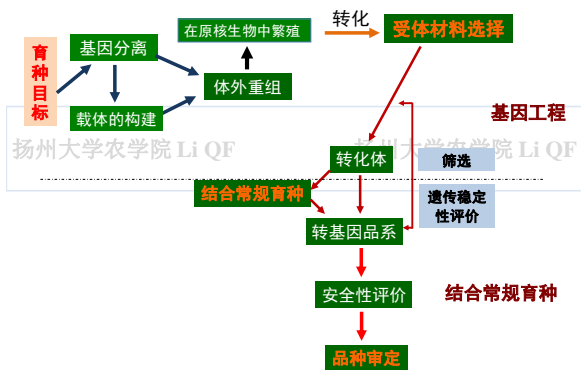
4.4 植物新品种培育

利用花药或花粉培养可获得单倍体植株；通过原生质体融合及培养，可部分克服有性杂交不亲和性。



油菜游离小孢子培养分化成胚的过程

二、植物转基因技术



转基因技术的应用

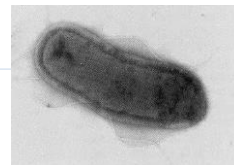


- 农杆菌介导法(Agrobacterium-mediated transformation)
- 基因枪转化法(Microprojectile bombardment)
- 聚乙二醇介导法(PEG-mediated transformation)
- 电激法(Electroporation)
- 花粉管通道法(Pollen-tubepathway)
- 显微注射法(Microinjection)
- 脂质体转化(Liposomes transformation)
- 激光微束转化法(Laser microbeam puncture)

1 农杆菌介导法

1.1 农杆菌简介

土壤农杆菌是一类侵染性非常广泛的革兰氏阴性土壤杆菌。在自然条件下，可影响六十多种的双子叶植物，是引起冠瘿瘤的“罪魁祸首”。土壤农杆菌是根瘤菌科的一员，在有氧条件下生长，细胞呈杆状，细胞长1.5-3.0μm、宽0.6-1.0μm。



1.2 农杆菌研究历史

1907年，Erwin Smith和Charles Townsend在《Science》上发文，一种被命名为根癌农杆菌（*Bacterium tumefaciens*）的细菌可在多种植物上引起冠瘿瘤的发生。



不同物种中的冠瘿瘤。(A)苜蓿上的冠瘿瘤，(B) 苹果根茎上的冠瘿瘤，(C) 卫矛属植物上的冠瘿瘤，(D) 葡萄树树干上丘疹状的冠瘿瘤。

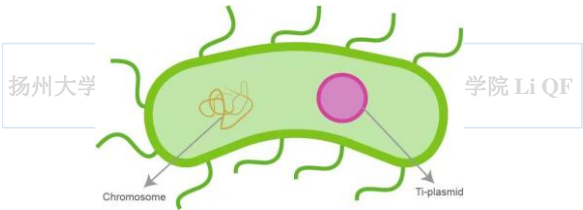
1941年，洛克菲勒研究所的Armin Braun发现在距农杆菌接种部位一定距离处产生的“继发性肿瘤”是无菌的，提出“DNA是肿瘤诱导因子”的假设。

1975年，比利时的Jeff Schell实验室发现农杆菌的致病性与某种大质粒的有无相关。加热会导致农杆菌菌株C58丧失致病性，这是由于大质粒的丢失所致。因而，这个大质粒被命名为肿瘤诱导（Tumor inducing, Ti）质粒。

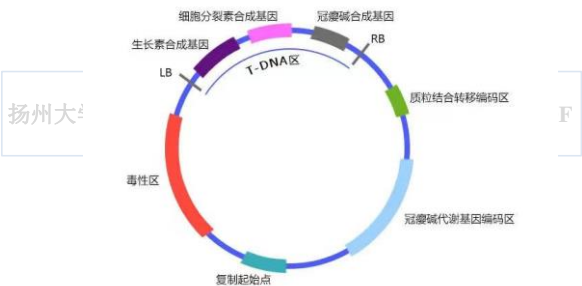
1977年，使用分子杂交技术发现冠瘿瘤中存在着农杆菌Ti质粒的一个片段，被称为可转移DNA（Transfer DNA, T-DNA）

T-DNA：是农杆菌Ti或Ri质粒中的一段DNA序列，可以从农杆菌中转移并稳定整合到植物核基因组中。

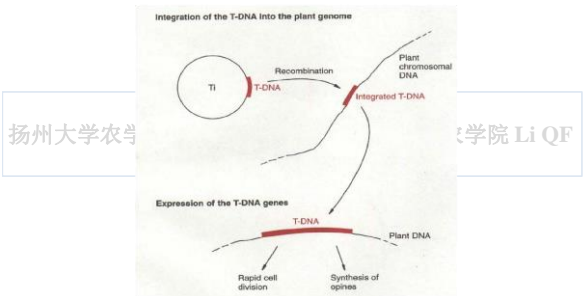
1.3 农杆菌侵染植物的机理



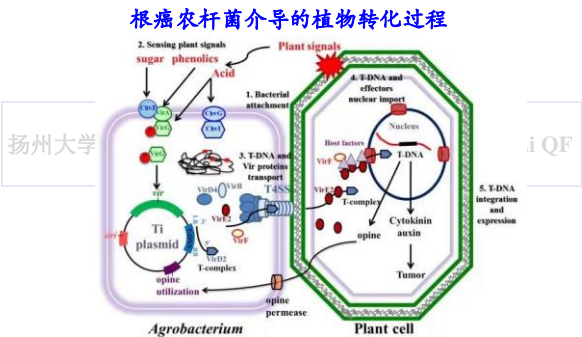
野生型农杆菌的结构，Ti质粒是菌体内独立于染色体外的一个环状质粒，大小为180-250kb，其上的T-DNA区会最终整合至植物基因组上。



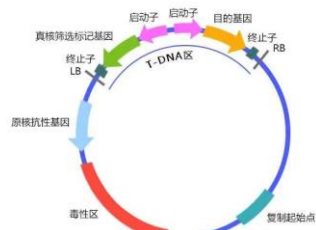
野生型Ti质粒结构



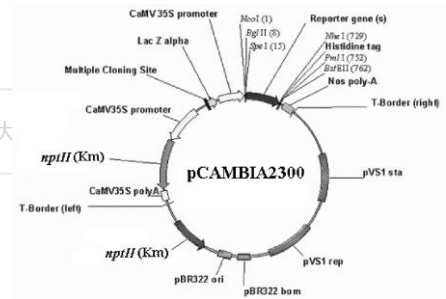
T-DNA区的转移



Opine: 冠瘿碱，农杆菌的主要碳源和氮源，其他土壤微生物不能代谢。



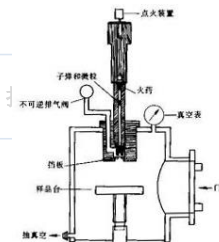
根癌农杆菌Ti质粒的改造



pCAMBIA2300载体图

2 基因枪转化法

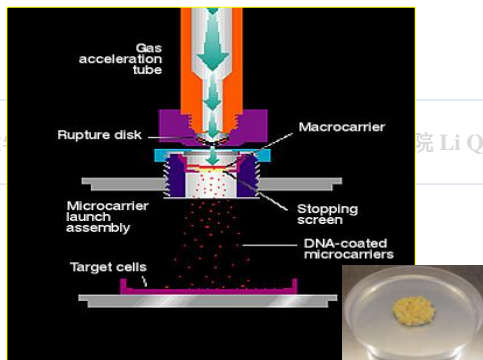
原理：金属微粒在外力作用下达到一定速度后，可以进入植物细胞，但又不引起细胞致命伤害，仍能维持正常的生命活动。利用这一特性，先将含目的基因的外源DNA同钨、金等金属微粒混匀，使DNA吸附在金属微粒表面，随后用基因枪轰击，使DNA随高速金属微粒进入植物细胞。



基因枪原理图

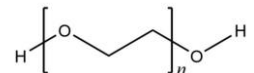


基因枪



3 聚乙二醇介导法

水溶性化学渗透剂



原理：在高pH条件下的PEG与原生质体（脱去全部细胞壁的细胞）融合，原生质体膜的通透性发生改变，增强了原生质对外源DNA的吸收，使目的基因整合到原生质体的基因组上并使之发生特异表达。

优点：实验成本低，不受植物种类限制，转化的稳定性、重复性好，可实现两个非连锁基因的共转化；

缺点：依赖于良好的原生质体制备技术，转化率较低。

4 电激法

原理：当植物细胞受到外界高压电击时，细胞膜会出现非对称穿孔，但这种开放小孔的出现是具有可逆性的，解除电击后这些小孔会关闭，所以在此期间要利用这种小孔作为外源基因导入细胞的通道，从而使目的基因导入并整合到受体细胞的基因组上。

操作简单，但转化效率较低。



5 花粉管通道法

原理：在植物开花之际，向植物花器的子房中注入含外源目的基因的DNA溶液，利用植物在开花、受精过程中形成的花粉管通道，将外源DNA导入受精卵细胞，并进一步整合到植物细胞的基因组中，然后随着受精卵的发育而产生转基因的新个体。

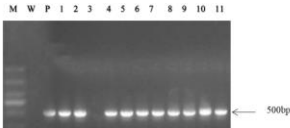
优点：不依赖植物组织培养，无需特殊仪器设备，技术简单。

缺点：重复性还有待进一步提高。



三、转基因植株的检测

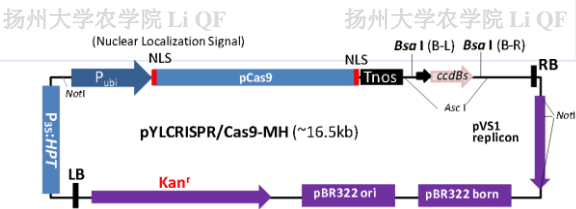
- 常采用报告基因作为标记，以便快速检测。
- 主要采用分子生物学方法检测，包括：PCR、Southern Blot、Northern Blot和Western Blot等方法。
- 进行分子生物学检测以后还要进行生物学鉴定，以确定基因是否可以正常地表达性状，并稳定地遗传给后代。



四、水稻转基因流程

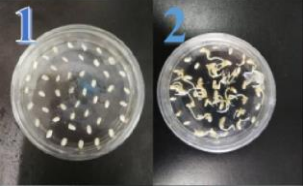
1 载体构建

根据转基因目的，构建相应的转基因载体。



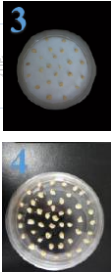
2 将载体转入农杆菌（热激法、电激法）


3 诱导水稻愈伤组织



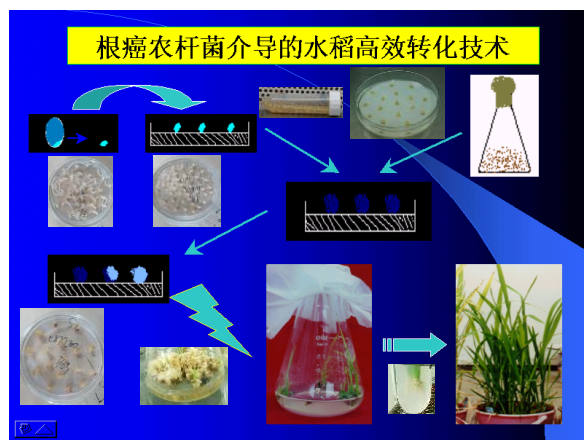
MS培养基添加2,4-D（生长素类似物），6-BA（细胞分裂素）及蔗糖、山梨醇、谷氨酰胺等物质。

4 农杆菌转化愈伤组织及筛选 5 分化





6 成苗



课后拓展

扬州大学 转基因生物的安全性及其应对策略 院 Li QF