

# 基因编辑技术在农业育种中的应用

王维佳, 李萌鑫 (天津商业大学经济学院, 天津 300134)

**摘要** 介绍当下流行的基因编辑技术的发展现状以及在农业领域的具体应用, 对于种子性状改良与市场价值进行文献梳理, 试图说明基因编辑在农业育种上的发展趋势, 除了 TALEN (transcription activator-like effector nucleases) 和 ZFN (zinc finger nuclease) 这两类常用的基因编辑工具外, CRISPR-Cas9 (CRISPR-associated protein 9) 是目前最为流行的工具, 目前已经通过 CRISPR/Cas9 改变多项农作物性状, 如花色调控、延长货架寿命、抗除草剂、提升抗逆境能力、增加抗病性等。由于利用 CRISPR/Cas9 创造的作物通过孟德尔遗传分离后, 不含其他生物的外源基因, 因此不受基因改造法规的限制, 成为科学界研究与开发的最新利器。我国一向高度重视并取得一系列成果, 但是对于最新基因编辑技术的文献梳理相对较少, 该研究主要贡献是结合最新资料阐述基因编辑技术在农业育种领域的应用, 为我国发展基因编辑技术提供文献参考。

**关键词** 基因编辑技术; CRISPR/Cas9; 农业育种

中图分类号 Q943.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)03-0018-08

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.03.006



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Application of Gene Editing Technology in Agricultural Breeding

WANG Wei-jia, LI Meng-xin (School of Economics, Tianjin University of Commercial, Tianjin 300134)

**Abstract** We introduced the current development of gene editing technology and its specific application in the field of agriculture, combed the literature of seed character improvement and market value, and tried to explain the development trend of gene editing in agricultural breeding. In addition to the commonly used gene editing tools such as TALEN and ZFN, CRISPR/Cas9 is currently the most popular tool, and has now changed a number of crop traits through CRISPR/Cas9, such as flower color regulation, extend shelf life, anti-herbicide, improve resistance to stress, increase disease resistance, etc. Since the crops created by CRISPR/Cas9 are isolated through Mendel inheritance and do not contain exogenous genes of other organisms, they are not restricted by genetic modification regulations and have become the latest sharp tool in scientific research and development. China has always attached great importance to and achieved a series of results, but the literature on the latest gene editing technology is relatively less combed. The main contribution of this paper is to combine the latest data to explain the application of gene editing technology in the field of agricultural breeding, and provide literature references for the development of gene editing technology in China.

**Key words** Gene editing technology; CRISPR/Cas9; Agricultural breeding

随着全球人口数量增加, 极端气候所造成粮食作物生产面临频繁的生物与非生物不可抗力的干扰, 对于农业育种技术的改良显得尤为重要。基因编辑技术在近几年来发展迅速, 此技术可针对选定的基因目标区域序列进行编辑, 经过编辑后的目标序列可产生缺失、插入或置换等形式的突变, 这些变异形式都具有可遗传性。目前基因编辑技术中 CRISPR/Cas9 系统已经应用于许多植物上, 该研究将介绍此技术应用于农业育种的现状, 其中包含主要粮食作物水稻、小麦与玉米等。依照不同作物的性状, 基因编辑不仅能准确地对目标基因进行诱变, 而且可有效地同时针对多个目标基因或运用于多倍体基因组使序列产生变异。将基因编辑技术应用于作物上可协助创造出更多耐逆境的品种, 为解决全球粮食安全问题提供新思路。

### 1 新兴基因编辑技术现状

近年来新兴基因编辑技术如 CRISPR 系统、TALENs、ZFN、ODM 等(表 1), 通过诱发突变辅助育种, 诱导生物不表现特定基因片段等方法达成目的。ZFN 是 1996 年发现可以辨认基因特定位置并截切的酵素, 其特点是定点核酸酶 (site directed nuclease, SDN), 具有辨识特定核酸序列及使双链 DNA 断裂的功能, 利用这种技术概念为基础<sup>[1]</sup>, 后续研究发现 ODM、TALENs 及 CRISPR 等技术都可以使特定

序列产生断裂, 继而诱发细胞中 DNA 自我修复机制造成改变<sup>[2-3]</sup>。而不同于基因改造所造成的不确定性状, 基因编辑技术可使用“非人为转入外源基因”方式改良传统育种技术, 降低新品种开发成本与提高效率, 相比传统诱变技术更快、更精准地掌握特定性状, 在培育新品种时可大大提高效率。

表 1 新兴育种技术类别

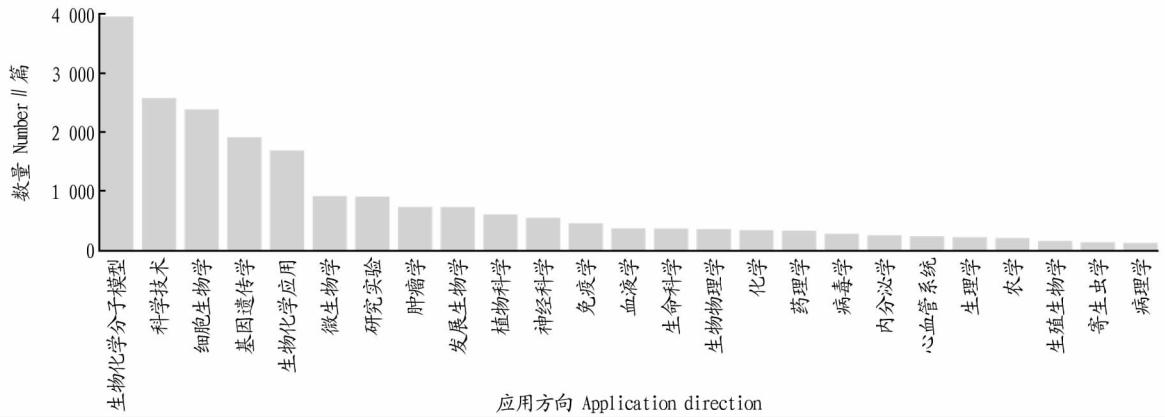
Table 1 Emerging breeding technology categories

类别 Category	技术应用 Technology application
辅助育种 Assistant breeding	诱变; CRISPR、TALENs、锌指核酸酶 (ZFN)、寡核苷酸定点突变 (ODM)、依赖 RNA 的 DNA 甲基化 (RdDM)  筛选; 反向育种 (reverse breeding)、农杆菌渗入法 (agro-infiltration “sensu stricto”, agro-inoculation)
新品种 New breed breeding	同源基因编辑 (cisgenesis/intragenesis)
栽培技术 Cultiva- tion techniques	嫁接 (grafting on GM rootstock)

已知的 3 种最受欢迎的基因编辑技术 CRISPR、TALENs、ZFN, 应用最多的还是生物工程领域 (图 1), 但是, 最近几年在农作物与经济类作物中的应用逐年增加并日趋成熟。自 CRISPR-Cas9 技术发展以来, 基因编辑改良植物性状是主要通过 CRISPR-Cas9 产生的双链断裂来诱导突变而实现的。

**作者简介** 王维佳 (1993—), 男, 河北保定人, 硕士研究生, 研究方向: 国际贸易理论与政策、跨国公司与中国直接投资。

**收稿日期** 2019-06-12; **修回日期** 2019-07-09



注:资料来源于 Web of science

Note: The data is from Web of science

图 1 基因编辑作物的应用方向

Fig. 1 Application direction of gene editing crops

## 2 基因编辑技术在农作物领域的应用

基因编辑技术具体分为 3 种典型的工具:ZFN、TALEN 和 CRISPR,而其中 CRISPR 由于操作简便、通用性强,引起学界广泛关注并获得巨大发展。2012 年,美国加州大学伯克利分校正式提出利用 CRISPR-Cas 系统可实现基因编辑<sup>[2]</sup>。

### 2.1 具体技术分析

**2.1.1 CRISPR。**目前 CRISPR 应用作物除模式植物阿拉伯芥和烟草外,还包括大宗作物,如水稻、小麦,以上 2 种作物以开发新抗病或耐逆境品种为主要研究方向,如抗白粉病小麦、抗白叶枯病水稻等,其他作物还包括玉米、高粱、番茄、地钱、柑橘、大豆等,目前已有提高 waxy corn 支链淀粉(amylpectin)含量的基因编辑品种上市,除一般作物外,CRISPR 还应用在真菌类上,如抗褐化的蘑菇,目前有许多厂商正积极开发相关作物,并已有相关产品通过认定准备上市。

**2.1.2 TALENs。**TALENs 应用的作物除了植物阿拉伯芥及烟草外,还包括水稻、番茄、小麦、大豆和马铃薯等,在水稻部分还开发出抗白叶枯病水稻,在番茄部分则是进行生长激素调控的研究,而马铃薯也有降低褐变速率及减少丙烯酰胺(acrylamide)产生的品种上市。

**2.1.3 ZFN。**ZFN-1 模式以植物烟草为主,另外也有使用抗除草剂 ALS(acetolactate synthase)基因突变或带有筛选目标的基因 GUS(bet aglucuronidase gene)或 GFP(green fluorescent protein)植株;ZFN-2 应用于模式植物阿拉伯芥及带有突变基因 GUS 植株。

目前基因编辑技术的应用系统包含同源重组(homologous recombination,HR)、重组酶(recombinase)基因置入、寡核苷酸(oligonucleotide)靶突变及核酸酶(nuclease)靶突变等(表 2)。近期研究趋向于开发应用核酸酶系统,主要包含 ZFN、TALENs、MGN 及 CRISPR/Cas 技术平台。但就便利性、操作性及效率性来看,CRISPR/Cas 系统成为近几年脱颖而出的技术平台,除了专利发明的数量增加外,其投入成本也相对较低,其中 2013 年建立的在线 CRISPR 数据库更是提升了此平台的使用性及普及性,在近期内也累积了相当多的与之相关的研究成果,同时也有部分产品被开发应用,如陶氏杜邦(Dow Du Pont)通过 CRISPR/Cas 技术平台开发新型改良后的糯玉米(waxy corn)品种,产量问题得以解决,并已取得美国农业部动植物健康检验局(USDA's Animal and Plant Inspection Service)的批准,目前已进入田间试验阶段并有望在市场销售。

表 2 基因编辑技术研究作物及项目

Table 2 Research crops and projects by gene editing technology

技术 Technology	作物 Crop	研究项目 Research project	优势 Advantage
CRISPR/Cas	阿拉伯芥、烟草、水稻、小麦、高粱、番茄、地钱、柑橘、蘑菇、大豆、玉米	小麦抗白粉病、蘑菇抗褐化、水稻白叶枯病抗性、育种	简单、效率高,2013 年已建立在线 CRISPR 数据库,使用性及普及性提升
TALENs	阿拉伯芥、烟草、水稻、番茄、小麦、大豆、马铃薯	抗水稻白叶枯病、番茄生长激素调控、育种、目标基因	比 ZFN 具更高的专一性;TALEN 结合区的设计专一性高,1 组可变双氨基酸(RVD),可辨识 1 个碱基
锌指核酸酶(Zinc finger nuclease (ZFN))	ZFN-1 烟草	抗除草剂基因 ALS、目标基因 GUS、GFP	具有专一性,1 个 ZFP 蛋白能够辨识 3 个碱基
	ZFN-2 阿拉伯芥	目标基因 GUS	
	ZFN-3 烟草、玉米	抗除草剂基因 PAT	
寡核苷酸定点突变(Oligonucleotide site-specific mutation (ODM))	稻米、油菜、玉米	抗除草剂基因 ALS、AHAS	分子小

**2.2 CRISPR/Cas9 基因编辑技术应用现状** CRISPR/Cas9 技术是目前应用最为广泛的技术。CRISPR 系统可分为 3 种类型,第一类型与第三类型的 CRISPR 系统需要复杂的 Cas 蛋白质复合体与 crRNA 结合,才能辨识并剪切目标片段;第二类型的 CRISPR 系统,也就是 CRISPR/Cas9,只需要 Cas9 蛋白质和 crRNA 与反式活化 CRISPR 来源 RNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 形成复合体,即可辨识并剪切目标片段<sup>[4-6]</sup>。2012 年将 crRNA 与 tracrRNA 合为一条 sgRNA (single guide RNA),减少 CRISPR/Cas9 系统建构的复杂度,经测试,仍具有辨识并剪切效果,使 CRISPR/Cas9 系统成为近几年来最热门的基因编辑工具<sup>[2-3]</sup>;而我国 2013 年初,率先利用 CRISPR 技术实现了对真核细胞基因组的编辑<sup>[7]</sup>。

CRISPR/Cas9 技术在动物研究领域得以蓬勃发展。植物细胞因具有细胞壁,Cas 蛋白质与 sgRNA,无法通过动物细胞用的显微注射法 (microinjection) 或电穿孔法 (electroporation) 送入细胞,必须将 Cas9 与 sgRNA 构筑于 DNA 载体,再以农杆菌媒介编辑法 (agrobacterium-mediated transformation) 或基因枪法 (particle bombardment) 送入植物基因组中,使 Cas9 与 sgRNA 编辑植物基因组中的目标序列。应用 CRISPR/Cas9 于植物的报导最早出现在 2013 年<sup>[8-9]</sup>。2013—2015 年 CRISPR/Cas9 系统在植物领域初步使用,直至 2015 年之后才开始出现明确应用 CRISPR/Cas9 于作物育种的报导。CRISPR/Cas9 系统初期研究中,多以阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*)、边沁烟草 (*Nicotiana benthamiana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、高粱 (*Sorghum bicolor*)、小麦 (*Triticum aestivum*) 等植物为主。少部分的研究使用甜橙 (*Citrus sinensis* L. "Valencia")<sup>[10-11]</sup>、番茄 (*Solanum lycopersicum*)<sup>[12]</sup> 等园艺作物为 CRISPR/Cas9 系统的材料。初期的研究多采用农杆菌渗入法 (agroinfiltration) 或 PEG 媒介原生质体转型法 (PEG-mediated protoplasts transformation),使 CRISPR/Cas9 产生的基因组编辑发生于 T<sub>0</sub> 世代。Feng 等<sup>[13]</sup>以 CRISPR/Cas9 使 12 个阿拉伯芥的基因发生突变,突变的基因可遗传至 T<sub>3</sub> 世代。Hsu<sup>[14]</sup>以 CRISPR/Cas9 编辑水稻的 11 个特定基因,这些由 CRISPR/Cas9 诱发的 T<sub>0</sub> 世代突变基因,可遗传至 T<sub>1</sub> 世代。以 CRISPR/Cas9 编辑后的基因遵守孟德尔遗传定律,可遗传至植物子代,因此 CRISPR/Cas9 适合应用于作物育种与探索植物基因的功能。

**2.2.1 改变花色。**花青素 (anthocyanin) 为构成花卉色彩的色素之一。通过 CRISPR/Cas9 默化烟草 (*Nicotiana glauca*) 与夏堇 (*Torenia fournieri* Linden) 的黄烷酮 3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H) 基因,能使烟草与夏堇的花呈现白色<sup>[15]</sup>,与 Zuker 等<sup>[16]</sup>以 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 使康乃馨 (*Dianthus caryophyllus* L.) 的 F3H 基因默化的结果相符。

**2.2.2 提高抗逆境能力。**ARGOS 基因为植物乙烯传导途径的负调节因子,为了降低编辑玉米对乙烯的敏感度,通过转移玉米 (*Zeamays*) 的 UBIQUITIN1 启动子驱动的 ARGOS8 基因,在玉米中过量表达 ARGOS8 基因,结果在干旱逆境下,对

比对乙烯不敏感的玉米的谷粒产量,比非基因编辑的玉米高<sup>[17]</sup>。通过 419 种玉米自交系筛选出内生 ARGOS8 mRNA 产量高的玉米品系,但所有自交系的玉米内生 ARGOS8 mRNA 产量都低于编辑 UBIQUITIN1::ARGOS8 的玉米。该团队利用 CRISPR/Cas9,将玉米内生 ARGOS8 的启动子,以同源重组修复的方法,置换为玉米中可连续表现的 GOS2 启动子,增加 ARGOS8 的 mRNA 表现量。结果显示,在开花阶段出现缺水逆境时,GOS2::ARGOS8 玉米的谷粒产量比野生型玉米的谷粒产量高<sup>[18]</sup>。

**2.2.3 延长寿命与改善品质。**番茄的 RIN (RIPENIN INHIBITOR) 基因会促使番茄果实后熟,诱导内源乙烯增生、增加茄红素 (lycopene) 的生成量、降解叶绿素 (chlorophyll),缩短番茄果实的保质期<sup>[19]</sup>。野生型番茄的果实在转红阶段 (breaker stage) 后 5 d 呈现橘红色,然而通过 CRISPR/Cas9 使 RIN 基因突变的番茄果实只呈现黄色。显示利用 CRISPR/Cas9 可以使果实后熟相关基因默化,延长果实保质期<sup>[20]</sup>。美国宾州州立大学的物病理学家杨亦农利用 CRISPR/Cas9 敲除蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 其中一个多酚氧化酶 (poly phenol oxidase, PPO) 基因的功能,使该种 PPO 活性降低 30%,达到推迟蘑菇褐化速度的目的。杜邦先锋国际种子子公司 (Du Pont Pioneer) 利用 CRISPR/Cas9 将糯玉米 (waxy corn) (*Zeamays* L. *sinensis* Kulesh) 内生的 Wx1 基因敲除。Wx1 基因可转译出胚乳淀粉粒结合性淀粉合成酵素 (endosperm's granule-bound starch synthase),使糯玉米产生较多的直链淀粉 (long-chain poly saccharide)。敲除 Wx1 基因的糯玉米只产生支链淀粉 (branched poly saccharide amylopectin),排除直链淀粉胶化的情形。

**2.2.4 抗除草剂。**硫酰尿素类除草剂 (sulfonylurea herbicides) 能抑制植物的乙酰乳酸合成酵素 (acetolactate synthase, ALS),导致属于支链氨基酸的缬氨酸 (valine)、白氨酸 (leucine)、异白氨酸 (isoleucine) 无法合成。将阿拉伯芥与大豆 (*Glycine max*) ALS 基因上特定位点的脯氨酸 (proline) 改为丝氨酸 (serine),可使植株对硫酰尿素类除草剂 Chlorsulfuron 具有抗性<sup>[1,21]</sup>。利用 CRISPR/Cas9 使玉米的 ALS2 基因产生 DSB,将第 165 个脯氨酸改为丝氨酸的 ALS2 单股模板以同源重组修复的方式进入玉米基因组,对玉米喷洒 100 mg/L Chlorsulfuron 21 d 后,仍可正常生长<sup>[22-23]</sup>,同时 Sun<sup>[22]</sup>以相同的方式编辑水稻的 ALS 基因,将水稻 ALS 基因第 548 个及 627 个氨基酸密码子分别由色氨酸 (tryptophan) 及丝氨酸改为白氨酸与异白氨酸,利用 CRISPR/Cas9 使改变过的单股 ALS 基因置换水稻内生的 ALS 基因,可惜没有成功。进一步将改变过的 ALS 基因与 sgRNA 及 Cas9 构筑于同一 DNA 载体上,通过基因枪编辑法与农杆菌编辑法将此构筑送入水稻愈伤组织,再于含除草剂双草醚的培养基上筛选,成功获得抗双草醚的水稻植株<sup>[22-23]</sup>。

**2.2.5 抗真菌性。**DMR6 (downy mildew resistant6) 基因解码为 2-oxoglutarate Fe(II) oxygenase。阿拉伯芥突变体 *dmr6* 中,抗病相关基因与水杨酸 (salicylic acid) 的含量均显著提高,

使露菌病菌、假单胞杆菌 (*Pseudomonas syringae*)、番椒疫病病菌 (*Phytophthora capsici*) 较不易感染阿拉伯芥<sup>[23]</sup>。以 CRISPR/Cas9 使番茄的 *DMR6* (*SLDMR6*) 基因产生 5 个与 7 个核苷酸缺失,引起移码突变,造成 *DMR6* 转译的蛋白质失去功能<sup>[24]</sup>。经病原菌接种试验后显示,由 CRISPR/Cas9 产生的 *dmr6* 番茄突变株对假单胞杆菌及番椒疫病病菌具有抗性,突变株与野生型番茄的株高无显著差异。

稻热病 (rice blast) 由稻热病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 引起。稻热病会使水稻产量减少,造成稻农受到严重的损失。*OsERF922* 基因突变会使水稻抗稻热病的相关基因表达量提高,使水稻不容易感染稻热病。以 RNAi 技术默化水稻 *OsERF922* 基因,可以增加水稻对稻热病的抗病性<sup>[25]</sup>。通过 CRISPR/Cas9 默化水稻的 *OsERF922* 基因也能增强水稻对稻热病的抗病性。将以 CRISPR/Cas9 获得的抗稻热病水稻自交,使突变的 *OsERF922* 基因与带有 Cas9/sgRNA 的 T-DNA (transfer DNA) 分离,获得只带有 *OsERF922* 突变基因的 T<sub>2</sub> 世代抗稻热病水稻。T<sub>2</sub> 世代抗稻热病水稻的株高、结实率及种子千粒重等农艺性状与野生型的水稻间无显著差异<sup>[11-13,25]</sup>。显示经 CRISPR/Cas9 只编辑植物的目标基因,并不影响植物的其他基因。

**2.2.6 抗病性。**以农杆菌渗入法将番茄黄化卷叶病毒 (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 复制起始点 (origin of replication) 的 sgRNA 表现于编辑 Cas9 内切酶 (Cas9 endonuclease) 基因的边沁烟草,再接种 TYLCV。TYLCV 的基因组 DNA 于植株内的累积量受到 CRISPR/Cas9 系统的干扰而有效地减少<sup>[26]</sup>。为观察 CRISPR/Cas9 系统表现活性,将菜豆黄矮病毒 (bean yellow dwarf virus, BeYDV) 载体中的移动蛋白 (movement protein) 与外鞘蛋白 (coat protein) 基因,以绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因取代,并与有 Cas9 及 BeYDVsgRNA 的构筑共同编辑野生型边沁烟草对比<sup>[27]</sup>。BeYDV 病毒载体受到 Cas9 与 sgRNA 表现影响,病毒载体所表达的 GFP 讯号强度减弱,显示 CRISPR/Cas9 技术可有效干扰植物病毒的基因。植物的真核转译作用起始因子 4E (eukaryotic translation initiation factors, eIF4E) 可与 mRNA 的 5' 端帽 (5'-terminal cap) 作用,参与 mRNA 转译<sup>[28]</sup>。eIF4E 与马铃薯 Y 病毒属 (Potyvirus) 的病毒蛋白基因组结合 (viral protein genome-linked, VPg) 蛋白,可协助 Potyvirus 完成

病毒的生命周期。编辑 Cas9 与 eIF4E 亚型 (eIF (iso) 4E) 的 sgRNA 至阿拉伯芥,使 eIF (iso) 4E 突变。eIF (iso) 4E 阿拉伯芥编辑株经自交分离后,获得纯型合子且非基因编辑的 eIF (iso) 4E 阿拉伯芥突变株 T<sub>2</sub> 世代。经接种芜菁嵌纹病毒 (*Turnip mosaic virus*) 后,eIF (iso) 4E 突变株表现抗病性<sup>[29]</sup>。Chandrasekaran 等<sup>[30]</sup>、Caj 等<sup>[31]</sup>也以 CRISPR/Cas9 技术使黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 的 eIF4E 突变,再经由杂交而获得纯型合子且非基因编辑的 T<sub>3</sub> 世代 eIF4E 黄瓜突变株。病毒接种试验显示,eIF4E 黄瓜突变株对黄瓜黄脉病毒 (Cucumber vein yellowing virus)、矮南瓜黄化嵌纹病毒 (Zucchini yellow mosaic virus) 及木瓜轮点病毒-西瓜型 (Papaya ringspot virus-watermelon strain) 具有抗病性。

CRISPR/Cas9、ZFN 与 TALEN 等技术的发展使编辑特定基因更为容易,已应用在农作物抗病、延长水果保质期、改变花卉色彩等农业性状的改良<sup>[32-34]</sup>。CRISPR/Cas9 可以取代 RNAi 及基因编辑技术,默化特定基因,再通过孟德尔遗传,使得到的植株中 Cas9 和 sgRNA 等编辑基因,在子代与编辑后的基因分离,可视为非基因编辑植物。通过 CRISPR/Cas9 技术,可以同时编辑多个目标基因,而不改变作物原本的优良性状<sup>[35-37]</sup>。综合以上几种优势,CRISPR/Cas9 将广泛应用于作物育种<sup>[4,38-39]</sup>。

### 3 农业基因编辑技术发展趋势

基因技术应用的目的是提高农作物生存率与生产率,农业基因技术在近几年获得了突飞猛进的发展,近几年极端气候、疾病和害虫的概率大大增加,与之相对的发展中国家面临人口增长而粮食和农业用地逐渐减少的现实。通过基因技术改善农作物的基因性状,促进品种迭代加速和适应环境能力的提升在目前农业经济学领域被广泛关注。

可以看出,基因编辑技术在植物作物中的应用逐渐增加,市场规模逐渐扩大。为了满足需求的增加,基因编辑技术在作物中应用的比重也在上升<sup>[26,40]</sup> (表 3)。

为了更加详细了解基因编辑技术在农作物领域的应用,表 4 利用国际专利数据库-Derwent Innovation (DI) 整理与汇总 2007 年 1—12 月这 10 年的发明专利情况,涵盖了 35 491 件发明 (DWPI 专利组),并以德温特世界专利索引 (Derwent World Patent Index (DWPI) Manual Code) 技术分类号进行技术趋势分析,探讨目前国际基因技术整体的趋势<sup>[41-42]</sup>。

表 3 2014—2016 年农业基因技术在经济作物中的应用规模

Table 3 Market scale of agricultural gene technology in economic crops (2014-2016)

类型 Type	2014 年 例	2015 年 例	2016 年 例	2021 年预测值 Forecasts for 2021//例	2016—2021 年 市场规模 Market size in 2016-2021//%
植物作物 Plant crops	5 192.2	5 507.5	5 859.1	8 459.3	7.62
畜禽水产 Livestock and poultry	3 040.7	3 237.9	3 458.3	5 099.5	8.08
合计 Total	8 233.0	8 745.5	9 317.4	13 588.8	7.79

注:资料来源于 Market and market 2017

Note: The data is from Market and market 2017

在这些经济物种上的与之相对应的基因技术平台仍是以杂交 (hybrid/cross breed)、人工授粉/精 (artificial pollina-

tion/insemination) 及遗传选型交配 (genetic assertive mating/inbreeding) 等传统育种方式的发明专利数据量最多,但育种

技术在历经 10 年的遗传基因工程及分子生物技术的精进以及技术改良后,也逐渐发生变化,并且形成一定趋势。从技术发展多元化角度看,除了前期传统育种技术外,之后的基因定序技术、基因探勘技术使得近几年育种技术的发明更多元化<sup>[43]</sup>,其中包括植物农杆菌基因编辑技术、分子筛选/标志技术、核酸干扰或是沉默基因等技术的发展,都是从遗传性状改变或基因调控方面去作育种改良。从数据中发现近期(2014年后)在产业上被专家们认定是基因编辑(genome

editing)技术的 ZFN、TALENs、CRISPR/Cas 的发明数量有明显增加的趋势,尤其是 CRISPR 技术平台在 2016 年的发明量达 108 件,也凸显了此技术平台在品种改良技术中的创造性(表 5)。虽然巨核酸酶(mega nucleases, MGN)、寡核苷酸(oligo nucleotide)标靶突变及重组酶(recombinase)基因置入等技术平台在农业基因技术应用领域上有所增长,但是和已经逐渐成熟的技术平台相比还具有很大的上升空间。

表 4 专利发明中农业基因技术平台分类

Table 4 Classification of agricultural gene technology platform in patent invention

基因组技术 Genomic technologies	2007年	2008年	2009年	2010年	2011年	2012年	2013年	2014年	2015年	2016年	2017年	发明 Inventions
杂交 Hybrid/Crossbreed	1 000	1 150	1 197	1 211	1 540	1 636	2 104	1 958	2 028	239	1 336	17 207
纯育种 Pure breeding	3	3	3	7	2	9	11	11	14	16	15	94
随机交配 Random mating/Panmixia	1					1		4	4	3	4	17
基因育种 Genetic assertive	347	449	572	536	644	675	1 141	1 000	1 116	1 051	681	8 292
近亲交配 Mating/inbreeding												
遗传畸变 Genetic dissortive	6	15	12	14	14	14	29	33	51	64	42	294
远系繁殖 Mating/outbreeding												
系统繁殖 Linebreeding	1	4	12	19	14	26	55	75	61	60	34	361
自我繁殖 Breeding back	1	2	2			1	6	2	4	7	3	28
人工繁殖 Captive breeding			1	1		2			2	3	2	11
诱变育种 Mutation/variation breeding	19	48	27	36	59	39	100	72	66	41	24	531
人工授精 Selective/artificial breeding	43	33	38	77	61	92	144	165	196	183	113	1 145
分子标记 Marker-associated selection	40	32	41	61	106	125	125	84	111	113	75	913
DNA 微阵列 DNA microarray	22	11	26	17	7	16	4	10	9	10	15	147
基因挖掘 Gene mining		1	2	1	1	11		3	18	2	2	41
数量性状基因 Quantitative trait	25	37	26	30	43	26	35	51	55	81	60	469
位点/AB-QTL locus/AB-QTL												
生物导入 Introgression libraries	52	34	99	92	187	280	337	354	314	265	205	2 219
多父体杂交 Multi-parent advanced	1				2	1	2		2	5	4	17
代际杂交 Generation inter-cross												
定向诱导基因组局部突变 TILUNG/Eco TILUNG	11	25	14	11	10	11	21	29	36	66	38	272
大规模平行信号测序 Massively parallel signature						1		1				2
基因序列 Sequencing												
焦磷酸测序 Pyrosequencing	3	1	2	1		4	1	2	3	1	1	19
微生物测序 Illumina sequencing					2	1	3	1	3	4	3	17
SOLiD 测序 SOLiD Sequencing				1		1						2
Roche 454® 测序 Roche 454® sequencing			1		1	2	1	1			1	7
Ion torrent semiconductor 测序 Ion torrent semiconductor sequencing						1		1				2
DNA naoball 测序 DNA naoball sequencing						1		1				2
Single molecule ral time 测序 Single molecule ral time sequencing											1	1
标记辅助自交 Marker-assisted back crossing	1		1	1	1	2	2	4	5	6	25	48
分子标记 Marker asisted recurrent selection		2		1	1	2		2		1	1	10
基因组繁殖 Genome wide selection									1			1
限制性片断长度 Restriction fragment length	87	49	26	44	19	23	20	30	38	19	19	374
多态性 Polymorphism												
末端限制性片段长度多态性 Aplified fragment length polymorphism	13	15	9	17	19	11	7	13	9	5	11	129
随机变数 Random amolified	15	13	10	18	7	10	6	9	9	7	5	109
随机扩增多态 DNA Polymorphic DNA												
人工授精 Artificial insemination	52	60	57	76	80	107	118	138	155	193	90	1 126

接下表

续表 4

基因组技术 Genomic technologies	2007年	2008年	2009年	2010年	2011年	2012年	2013年	2014年	2015年	2016年	2017年	发明 Inventions
超数排卵 Multiple ovulation embryo	2	2	3	1	2	2	2	3	1	2	1	21
技术转移 Transfer technology												
RNA 干扰 RNA interference	96	88	82	100	105	95	88	86	76	85	52	953
基因沉默 Gene silencing	54	69	68	55	61	52	71	53	55	63	47	648
归巢核酸内切酶 Meganucleases/engineered homing endo-nucleases	6	13	10	8	10	1	3	9	13	7	20	100
锌指核酸酶技术 Zinc finger nuclease technology	1	2	4	3	23	16	9	25	25	15	34	157
TALENs					2	7	5	27	39	35	37	152
CRISPR/Cas9 技术 CRISPR/Cas9 technology							2	50	70	108	93	323
单链寡聚脱氧核苷酸 Single-stranded iligo-deoxynucleotides			1		2			2	1	4		10
嵌合 RNA-DNA Chimeric RNA-DNA oligo-nucleotide	7	10	8	5	4	1	3	4	6	7	4	59
三链 DNA 形成脱氧寡核苷酸 Triple helix-forming oligonucleotide molecules			1		2			2	1	1		7
同源转基因 Cisgenesis		1	1			2	2	1	1		1	9
基因内 Intragenesis			1	2			4	3	1	2	1	14
人工授粉 Artificial pollination	268	399	596	652	1 025	1 029	1 291	867	1 442	1 629	1 103	10 301
农杆菌渗入法 Agro-infiltration	55	74	59	66	113	153	163	180	224	165	63	1 315
反向育种 Reverse breeding	2	1			1	3	1	20	8	9	3	48

注:资料来源于 Derwent Innovation,2017

Note:The data is from Derwent Innovation,2017

就近期针对发明及运用基因编辑技术平台的专利权人来看,美国陶氏杜邦(Dow DuPont)的发明量高达 67 件,多数集中在运用 ZFNs 及 CRISPR/Cas9 技术;其次为先正达(Syngenta),发明数量 44 件,多运用在 CRISPR/Cas9 技术平台;而雷杰纳隆(Regeneron)药厂居第 3 位,有 26 件发明量。可以发现专注在此技术开发的专利权人大多为植物作物或是种子种苗的国际厂商。除此之外,中国农业科学院(CAAS Chi-

na)也有 22 件的发明量,且以 CRISPR/Cas9 技术平台的发明最多。

在技术 CRISPR/Cas9 研发方面,美国保持着优势地位,我国科研机构在 CRISPR/Cas9 平台建设方面也取得了一定成绩(图 2)。中国农业科学院联合国际水稻研究所完成了全球 3 000 份水稻 DNA 的重测序工作,为研究水稻靶向基因、指导水稻育种提供了重要技术支持<sup>[44]</sup>。

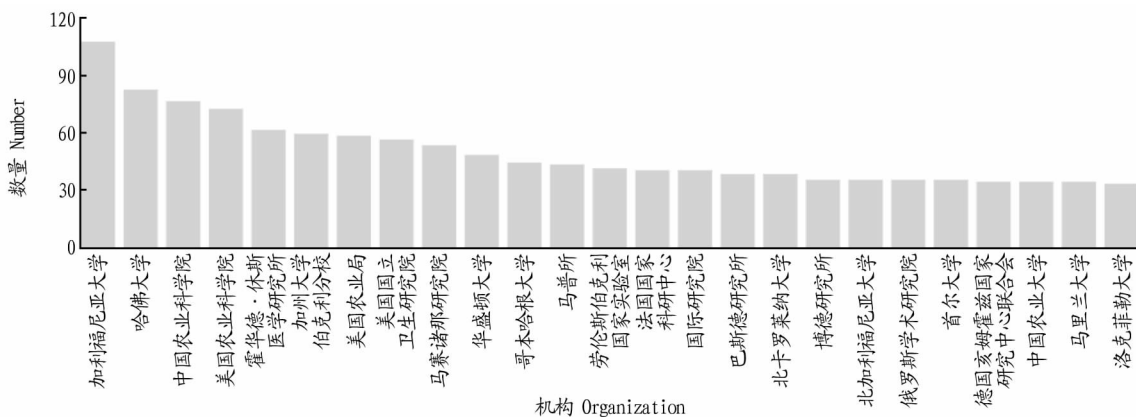


图 2 Gene editing + CRISPR / Cas 机构  
Fig. 2 Gene editing + CRISPR / Cas institution

基因技术包括很多,按照产值可以分为 DNA/RNA sequencing、Genotyping、Marker-assisted selection、Gene expression profiling、GMO/trait purity、DNA extraction/purification。由表 2 可见产值比例较高的集中在核酸的序列分析、遗传基因的分型及基因分子标识的筛选等技术项目,且各产值分别达 18.770 亿、18.233 亿及 16.899 亿美元(表 5)。预计到 2021 年全球各基因技术的市场产值可达 135.588 亿美元,此产业市场的复合增长率(CAGR%)高达 7.8%。

近年来国际市场在面对因为极端气候逐渐增加的同时出现粮食安全危机的市场环境下,推动科技进步和技术更新,从市场规模的增长可以看出基因技术的重要程度。

从图 2 可以看出,基因技术的应用趋向于植物作物,并且多用于油料作物、谷类作物和豆类作物。其中水稻(rice)是重点基因编辑对象,说明为了应对全球粮食危机,应重点发展粮食作物的基因编辑技术。

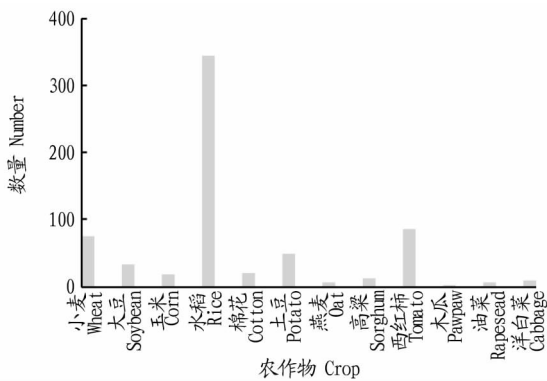
表5 2014—2016年各基因技术的市场产值

Table 5 Market output value of gene technology in 2014-2016

技术应用 Technology application	2014 年//×10 <sup>6</sup> 美元	2015 年//×10 <sup>6</sup> 美元	2016 年//×10 <sup>6</sup> 美元	2021年预测值 Forecasts for 2021 ×10 <sup>6</sup> 美元	市场占有率 Market share//%
DNA/RNA 测序 DNA/RNA sequencing	1 671.6	1 768.8	1 877.0	2 675.9	7.4
基因型鉴定 Genotyping	1 605.1	1 708.2	1 823.3	2 677.6	8.0
标志选择 Marker-assisted selection	1 476.9	1 577.5	1 689.9	2 528.0	8.4
基因表达谱分析 Gene expression profiling	1 269.1	1 353.0	1 446.8	2 144.2	8.2
GMO/性状纯度 GMO/trait purity	721.4	764.6	812.7	1 169.0	7.5
DNA 提取 DNA extraction/purification	718.8	755.9	797.1	1 099.5	6.6
其他 Others	769.9	817.5	870.6	1 264.5	7.8
总值 Total	8 233.0	8 745.5	9 317.4	13 558.8	7.8

注:资料来源于 Market and market 2017

Note:The data is from Market and market 2017



注:资料来源于 Web of science

Note:The data is from Web of science

图3 主要农作物发文数量

Fig. 3 Number of major crop papers issued

#### 4 小结与展望

为了应对未来粮食需求与极端气候,基因编辑技术应用农业市场的主要目的是物种改良,使新品种产能提高、繁育率增加及储藏时间延长等,功能性地改善农作物的具体性状以提高产量。从近期专利发明的数量以及相关文献的分析整理方面可以看出国际种子种苗企业对于基因编辑技术平台的高度重视。CRISPR/Cas9、ZFN 与 TALEN 等技术的发展使编辑特定基因更为容易,这些技术目前主要应用在农作物抗病、延长果园产品货架寿命、改变花卉色彩等农业性状的改良方面。CRISPR/Cas9 可以取代 RNAi 及转基因技术,默化特定基因,再通过孟德尔遗传,使得到的植株中 Cas9 和 sgRNA 等基因在子代与编辑后的基因分离,可视为非转基因植物。通过 CRISPR/Cas9 技术,基本可以同时编辑多个目标基因,而不改变作物原本的优良性状。综合以上几种优势,CRISPR/Cas9 将广泛应用于作物育种。目前我国相关研究还比较薄弱,除了投入研究资源外,还应该积极地与其他具有基因编辑技术研发能力的小型生物实验室或研究单位共同合作,加速运用技术平台所开发的作物产品推广进程,增加市场粮食供应量。当然,技术与产品从开发到推广是个漫长的过程,在植物作物基因改变的情况下仍存在着诸多问题,但是科技发展刻不容缓,如何在环境风险与研发投入间取得效益的平衡也是将来需要克服的问题。

#### 参考文献

- [1] HAUGHN G W, SMITH J, MAZUR B, et al. Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides[J]. Molecular and general genetics, 1988, 211(2): 266-271.
- [2] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821.
- [3] CONG L, ANN R F, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.
- [4] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III[J]. Nature, 2011, 471(7340): 602-607.
- [5] SAPRANAUSKAS R, GASIUNAS G, FREMAUX C, et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli* [J]. Nucleic acids research, 2011, 39(21): 9275-9282.
- [6] SAPRANAUSKAS R, GASIUNAS G, FREMAUX C, et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli* [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39: 9275-9282.
- [7] BROUNS S J J, JORE M M, LUNDGREN M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes[J]. Science, 2008, 321(5891): 960-964.
- [8] JIANG W Z, ZHOU H B, BI H H, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(20): 1-12.
- [9] LI J F, NORVILLE J E, AACH J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31: 688-691.
- [10] BORTESI L, FISCHER R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond[J]. Biotechnology advances, 2015, 33(1): 41-52.
- [11] JIAO Y Q, WANG Y H, XUE D W, et al. Regulation of *OxSPL14* by *OsmiR156* defines ideal plant architecture in rice[J]. Nat Genet, 2010, 42: 541-544.
- [12] PAN C T, YE L, QIN L, et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations[J]. Rep, 2016, 6(1): 1-9.
- [13] FENG Z Y, MAO Y F, XU N F, et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad, 2014, 111(12): 4632-4637.
- [14] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. Cell, 2014, 157(6): 1262-1278.
- [15] NISHIHARA M, HIGUCHI A, WATANABE A, et al. Application of the CRISPR/Cas9 system for modification of flower colors in *Torenia fourieri* [J]. BMC Plant Biology, 2018, 18: 1-9.
- [16] ZUKER A, TZFIRA T, BEN-MEIR H, et al. Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene[J]. Mol Breed, 2002, 9: 33-41.
- [17] RITCHIE M E, PHIPSON B, WU D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies[J]. Nucleic acids research, 2015, 43(7): 1-13.
- [18] TELLIER J, SHI W, MINNICH M, et al. Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the un-



- folded protein response[J]. *Nature immunology*, 2016, 17: 323-330.
- [19] FUJISAWA M, NAKANO T, SHIMA Y, et al. A large-scale identification of direct targets of the tomato MADS box transcription factor RIPENING INHIBITOR reveals the regulation of fruit ripening[J]. *Plant cell*, 2013, 25: 371-386.
- [20] SVITASHEV S, YOUNG J K, SCHWARTZ C, et al. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA[J]. *Plant Physiol*, 2015, 169(2): 931-945.
- [21] HAUGHN G W, SMITH J J, MAZUR B, et al. Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides[J]. *Mol Gen Genet*, 1988, 211(2): 266-271.
- [22] SUN Y W, ZHANG X, WU C Y, et al. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase [J]. *Mol Plant*, 2016, 9(4): 628-631.
- [23] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [24] CHO S W, KIM S, KIM J M, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease[J]. *Nature biotechnology*, 2013, 31(3): 230-232.
- [25] DICKINSON D J, WARD J D, REINER D J, et al. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination[J]. *Nature methods*, 2013, 10(10): 1028-1034.
- [26] GRATZ S J, UKKEN F P, RUBINSTEIN C D, et al. Highly specific and efficient CRISPR/CAS9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila* [J]. *Genetics*, 2014, 196(4): 961-971.
- [27] HERMANS P W, VAN SOOLINGEN D, BIK E M, et al. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains[J]. *Infection and immunity*, 1991, 59(8): 2695-2705.
- [28] JACKSON R J, HELLEN C U T, PESTOVA T V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 113-127.
- [29] PYOTT D E, SHEEHAN E, MOLNAR A. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants[J]. *Mol Plant Pathol*, 2016, 17(8): 1276-1288.
- [30] CHANDRASEKARAN J, BRUMIN M, WOLF D, et al. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology[J]. *Mol Plant Pathol*, 2016, 17(7): 1140-1153.
- [31] GAJ T, GERSBACH C A, BARBAS C F III, ZFN, TALEN, and CRISPR Cas-based methods for genome engineering[J]. *Trends in biotechnology*, 2013, 31(7): 397-405.
- [32] HILSCHER J, BÜRSTMAYR H, STÖGER E. Targeted modification of plant genomes for precision crop breeding[J/OL]. *Biotechnology journal*, 2017, 12(1) [2019-03-21]. <https://doi.org/10.1002/biot.201600173>.
- [33] JUDGMENT OF THE COURT (Grand Chamber); In Case C-528/16[Z]. 2018-07-25.
- [34] LUSSER M, PARISI C, PLAN D, et al. New plant breeding techniques [R]. JRC reference reports, 2011.
- [35] WALTZ E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation [J]. *Nature*, 2016, 532(7599): 293.
- [36] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315: 1709-1712.
- [37] BOLOTIN A, QUINQUIS B, SOROKIN A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin[J]. *Microbiology*, 2005, 151: 2551-2561.
- [38] CHO S W, KIM S, KIM J M, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease [J]. *Nature biotechnol*, 2013, 31(3): 230-232.
- [39] DICKINSON D J, WARD J D, REINER D J, et al. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination[J]. *Methods*, 2013, 10: 1028-1034.
- [40] GRATZ S J, UKKEN F P, RUBINSTEIN C D, et al. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila* [J]. *Genetics*, 2014, 196: 961-971.
- [41] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [42] JANSEN R, EMBDEN J, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [43] JIA H G, WANG N. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): 1-6.
- [44] 许丽, 王玥, 姚驰远, 等. 基因编辑技术发展态势分析与建议[J]. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(12): 113-122.

(上接第 17 页)

- [13] 黄慧莲, 刘贤旺, 吴祥松, 等. 金线莲无根苗的壮苗促根试验研究[J]. *中国野生植物资源*, 2001, 20(6): 74-75.
- [14] 刘润东, 郭文杰, 林忠, 等. 金线莲组织培养及营养成分的分析研究[J]. *广西农业科学*, 2006, 37(5): 506-509.
- [15] 林兰英, 陈钢, 王建勤. 金线莲组织培养中若干因素的研究[J]. *亚热带植物通讯*, 1993, 22(2): 7-11.
- [16] 王建明, 王松良, 詹巧杰, 等. 金线莲组织培养的条件优化研究[J]. *中国现代中药*, 2013, 15(1): 45-49.
- [17] 冯亦平, 张利平, 王岩花, 等. 金线莲外植体的筛选及不定芽诱导的研究[J]. *种子*, 2009, 28(10): 19-22.
- [18] 陈汉鑫, 王雅英, 杨忠耿, 等. 金线莲组织培养快繁技术[J]. *广西农业科学*, 2004, 35(4): 325-326.
- [19] 段玉云, 曾黎琼, 程在全. 台湾金线莲的组织培养与快速繁殖[J]. *植物生理学通讯*, 2005, 41(2): 198.
- [20] 李海鹰, 王桂文, 范嘉晔, 等. 影响花叶开唇原球茎与丛生芽形态建成、生根与移栽因素的试验研究[J]. *广西科学*, 1999, 6(3): 235-237.
- [21] 江建铭, 俞旭平, 沈晓霞, 等. 金线莲组织培养快繁技术研究[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(2): 408-410.
- [22] 吴坤林. 金线莲快繁及工业化生产中间试验[J]. *中药材*, 1997, 20(12): 595-597.
- [23] 祁永琼, 王丽莉, 罗瑞芳, 等. 金线莲不同外植体组织培养成苗技术探讨[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(8): 57-59.
- [24] 黄慧莲, 刘贤旺, 吴祥松, 等. 金线莲种子诱导成苗的研究[J]. *中药材*, 2002, 25(1): 3-5.
- [25] 张铁, 田雪琪, 李彬. 滇越金线莲快速繁殖技术研究[J]. *文山师师范高等专科学校学报*, 2006, 19(3): 110-114.
- [26] 罗晓青, 申刚, 蒙秋伊, 等. 兴仁金线莲组织培养与快繁试验[J]. *西南农业学报*, 2014, 27(1): 331-336.
- [27] 黄德贵, 陈振东. 金线莲组织培养与人工栽植研究 II. 芽的快速繁殖[J]. *福建热作科技*, 1994, 19(1): 1-6, 10.
- [28] 阙世超, 张明生, 李花. 金线莲丛生芽诱导研究[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(3): 981-982.
- [29] 毛碧增, 姜沂春, 蔡素琴, 等. 金线莲的快速繁殖[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 1999, 25(5): 527-528.
- [30] 刘伟, 王牛柱. 金线莲组织培养增殖培养基的筛选[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(4): 1475-1476.
- [31] 高燕, 白燕水, 赵云翔. 金线莲组织培养几种培养基的筛选[J]. *热带农业科技*, 2004, 27(3): 12-14.
- [32] 王建勤, 林兰英, 陈钢. 金线莲原球茎的诱导与植株再生[J]. *植物学通报*, 1996, 13(1): 54-55.
- [33] 刘芳, 韦鹏霄, 岑秀芬, 等. 外植体和基本培养基对台湾金线莲丛生芽诱导的影响[J]. *北方园艺*, 2009(4): 103-114.
- [34] 曹天旭, 廉美兰, 朴炫春, 等. 外部因子对金线莲丛生芽增殖和发根的影响[J]. *延边大学农学报*, 2004, 26(2): 109-112.
- [35] 何云芳, 杨霞, 余有祥, 等. 金线莲组织培养快繁技术[J]. *浙江林学院学报*, 1999, 16(2): 170-174.
- [36] 杨柏云, 高荫榆, 李春华, 等. 金线莲原球茎的诱导与快速繁殖[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(10): 3999-4001.
- [37] 黄勇. 金线莲组织培养新体系建立及优化[J]. *北方园艺*, 2010(13): 178-179.
- [38] 陈永快, 林一心, 邹晖, 等. 福建金线莲和台湾金线莲的组培快繁技术[J]. *现代园艺*, 2008(10): 9-12.
- [39] 黄德贵, 陈振东. 金线莲组织培养与人工栽植研究 III. 壮苗生根培养[J]. *福建热作科技*, 1994, 19(2): 1-5, 17.
- [40] 周玉美, 陈丽, 崔永一, 等. 台湾金线莲 (*Anoectochilus formosanus*) 快繁体系的构建[J]. *东北林业大学学报*, 2009, 37(12): 43-47.
- [41] 魏翠华, 秦建彬, 谢宇, 等. 应用正交设计法优选台湾金线莲快繁培养基[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(4): 114-117.