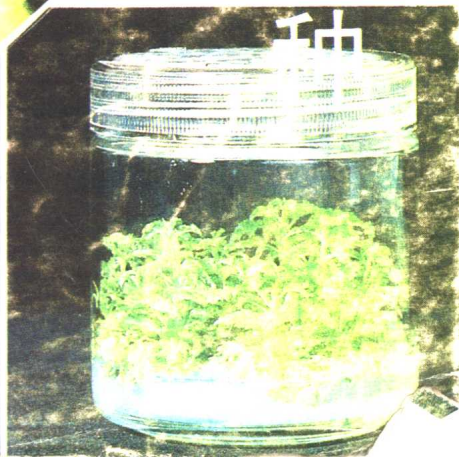


果树瓜类生物工程育种

傅润民 主编

农业出版社



果树瓜类生物工程育种

傅润民 主编

农业出版社

(京)新登字060号

果树瓜类生物农药

傅润民 主编

* * *

责任编辑 王琦塔 董江峰

农业出版社出版发行 (北京市朝阳区农展馆北路2号)

北京市昌平印刷厂 印刷

850×1168mm32开本 15.5印张 415千字

1994年5月第1版 1994年5月北京第1次印刷

印数 1--1,000册 定价: 25.00元

ISBN 7-109-03307-4/S·2124

前 言

过去果树育种仅限于常规的有性杂交，无性系选择与诱变技术的应用，虽然取得了不少成就，但由于受种种因素的限制，所以旷日持久。随着现代高新技术的发展，生物技术日益显露出它的重要作用，特别是现代分子生物学的成就为改良作物品种开辟了新的途径。为了提高我国果树遗传育种研究的水平，作者利用在美国合作研究的两年时间搜集了国内外最新成就，并联合在美国的留学博士与本课题组的同志在作者原著《果树瓜类组织培养》一书的基础上重新综合编写这本《果树瓜类生物工程育种》专著，全书大体分两部分，前半部介绍了开展生物工程育种的基础技术——组织培养，后半部重点介绍了生物工程育种的各个方面，主要是基因转移与表达、鉴定和PCR的原理与应用。最后附录介绍了组织培养名录，可供教学与科研工作参考。

本书的编写引用了不少单位和个人的资料，在此表示谢意。

由于时间仓促，许多内容还不够细，也不够全面系统，加之本人水平所限，错误之处敬请批评指正。

编 者

1992年12月25日

主 编：傅润民

编著者：傅润民 R. L. 安德森 程宗明

赵政阳 税守歧 施念清 姚春潮

黄智敏 曹晓玲

目 录

第一章 概论	1
第一节 组织培养原理	1
第二节 研究概况	3
第三节 实验室的建立	10
一、实验室设计	10
二、基本设备	12
三、所用仪器	13
四、常备药品	14
五、材料器皿洗涤消毒	17
六、实验室要求与无菌操作	30
第四节 基本技术	31
一、培养基	31
二、材料选择与表面消毒	44
三、接种方法	46
四、培养室条件	47
五、培养技术	47
六、组织培养步骤	50
第二章 组织培养	55
第一节 茎尖培养	55
一、主要用途	55
二、培养方法	56
三、苹果茎尖培养	58
四、梨茎尖培养	63
五、葡萄茎尖培养	66

六、桃茎尖培养	70
七、樱桃茎尖培养	74
八、山楂茎尖培养	77
九、黑穗醋栗茎尖培养	78
十、草莓茎尖培养	78
十一、枇杷茎尖培养	80
十二、番木瓜茎尖培养	81
十三、香蕉茎尖培养	83
十四、柑桔茎尖培养	84
十五、核桃茎尖培养	85
十六、板栗茎尖培养	87
十七、柿茎尖培养	88
十八、梨、榲桲茎尖培养	88
十九、李茎尖培养	89
第二节 花药培养	89
一、培养方法	90
二、培养基	91
三、苹果花药培养	96
四、梨花药培养	97
五、葡萄花药培养	98
六、草莓花药培养	100
七、柑桔花药培养	101
八、荔枝花药培养	102
九、龙眼花药培养	103
十、西瓜花药培养	104
第三节 胚培养	105
一、胚培养	105
二、苹果种胚辐射离体培养	109
三、苹果胚培养	111
四、葡萄胚培养	111
五、桃胚培养	112

六、酸枣胚培养	115
七、山楂胚培养	115
八、樱桃胚培养	117
九、草莓胚培养	117
十、梨胚培养	117
十一、猕猴桃胚培养	119
十二、核桃胚培养	119
十三、柑桔胚培养	120
十四、四季桔种胚培养	121
十五、哈密瓜幼胚培养	121
十六、西瓜种胚培养	122
十七、甜瓜胚培养	124
第四节 胚乳培养	125
一、胚乳培养中愈伤组织形成与器官分化的条件	126
二、胚乳培养中的组织学和细胞学研究	128
三、胚乳培养物的形态建成	129
四、胚乳培养物的染色体	131
五、苹果胚乳培养	132
六、葡萄胚乳培养	134
七、桃胚乳培养	135
八、猕猴桃胚乳培养	135
九、枣胚乳培养	137
十、柑桔胚乳培养	138
十一、枇杷胚乳培养	139
十二、梨胚乳培养	139
第五节 器官培养	140
一、苹果的短枝扦插	140
二、猕猴桃器官培养	141
三、石榴叶片培养	146
四、核桃愈伤组织诱导	148
五、金柑组织培养	149

六、枳胚珠培养	150
七、柑桔茎段培养	157
八、菠萝组织培养	152
九、黄菠萝组织培养	152
十、香蕉组织培养	153
十一、柚子组织培养	155
十二、葡萄组织培养	155
十三、无籽西瓜组织培养	156
十四、白兰瓜组织培养	156
十五、菠萝果实培养	157
十六、西瓜子叶和下胚轴培养	157
十七、苹果叶片培养	158
十八、苹果叶柄培养	159
十九、核桃器官培养	159
二十、枣茎段培养	160
二十一、榛子组织培养	161
二十二、凤梨组织培养	162
三十三、扁桃组织培养	163
二十四、李胚与子叶培养	164

第三章 愈伤组织与细胞培养..... 165

第一节 愈伤组织培养 165

- 一、培养技术..... 165
- 二、愈伤组织的诱导..... 167
- 三、愈伤组织的生长..... 168
- 四、愈伤组织的分化..... 169

第二节 细胞悬浮培养 170

- 一、概述..... 170
- 二、操作程序..... 170

第三节 胚状体 173

- 一、胚状体的概念与研究胚状体的意义..... 173

二、胚状体发生的普遍性	174
三、胚状体的胚胎发生过程	175
四、诱导胚状体的因素	175
五、胚状体与器官发生型的识别	176
第四章 果树无病毒苗的培育	177
第一节 病毒危害	177
第二节 脱毒方法	177
第三节 脱毒苗的鉴定	179
第四节 无病毒苗的保存与利用	180
第五节 苹果无病毒苗的培育	181
第六节 柑桔无病毒苗的培育	182
第七节 草莓无病毒苗的培育	187
第八节 葡萄无病毒苗的培育	192
第五章 生长发育与激素控制	194
第一节 激素与胚胎培养	195
第二节 激素与花药培养	202
第三节 激素与器官培养	208
第四节 激素与原生质体培养	213
第六章 种质资源的低温保存	217
第一节 低温保存	217
第二节 冷冻保存	218
第三节 超低温冰冻保存的操作程序	222
第四节 苹果培养茎尖的超低温保存	223
第五节 苹果冬芽的超低温保存	223
第六节 草莓茎尖分生组织的冷冻保存	224
第七节 冷冻保存技术的应用及其问题	225

第七章 体细胞突变与筛选	227
第一节 从植物培养细胞分离突变体	227
第二节 突变体的选择	230
第三节 从培养离体器官分离突变体	231
第四节 分子生物学诱变	234
第五节 植物培养细胞的染色体变异与鉴定方法	237
一、培养细胞的染色体变异.....	237
二、染色体的鉴定方法.....	238
第六节 果树染色体观察方法	241
第七节 同工酶的应用与测定技术	246
一、应用.....	246
二、测定技术.....	247
第八章 试管受精	250
第一节 操作方法	250
第二节 影响试管受精成功的因素	252
第三节 试管受精技术在杂交育种上的应用	254
第九章 原生质体培养	256
第一节 果树原生质体培养现状与展望	256
一、概况.....	256
二、原生质体分离.....	258
三、原生质体培养.....	264
四、展望.....	268
第二节 原生质体分离与培养	270
一、原生质体分离纯化.....	270
二、原生质体培养.....	281
三、原生质体培养中的生长与分化.....	285
第三节 苹果原生质体培养	287

第四节	梨原生质体培养	293
第五节	葡萄原生质体培养	296
第六节	猕猴桃原生质体培养	297
第七节	樱桃原生质体培养	302
第八节	柑桔原生质体培养	307
第九节	龙眼原生质体培养	309
第十节	甜瓜子叶原生质体培养	311
第十一节	哈密瓜原生质体培养	315
第十章	原生质体融合	318
第一节	自发融合与诱导融合	319
第二节	诱导剂与诱导方法	319
一、PEG诱导融合法		319
二、融合体培养和核融合		322
三、融合体的选择		323
第三节	柑桔种间原生质体融合	326
一、原生质体分离		326
二、原生质体融合		327
三、融合体的培养		327
第十一章	基因工程	331
第一节	基因的构成和组建	332
一、启动子		332
二、结构基因		336
三、调整子		337
四、终止子		338
第二节	选择标志基因介绍	339
第三节	基因转移方法	340
一、农杆菌基因转化法		340
二、生物射击法		351

三、聚乙二醇转化法·····	353
四、电场诱导转化法·····	354
五、显微注射法·····	355
六、其它基因转化法·····	355
七、基因转化法小结·····	356
第四节 基因的表达分析与鉴定 ·····	357
一、GUS测定 ·····	358
二、DNA与DNA杂交法·····	359
三、DNA与RNA杂交法·····	360
四、蛋白质杂交技术·····	362
五、聚合酶链反应·····	363
第五节 抗性及其它有关基因的研究与应用 ·····	364
一、抗病毒基因的转化·····	364
二、抗虫基因的转化·····	366
三、抗细菌性病害的基因转化·····	368
四、抗真菌性病害的基因转化·····	371
五、其它基因研究·····	373
第六节 几种果树瓜类的基因转移 ·····	380
一、苹果的基因转移·····	380
二、桃的基因转移·····	382
三、核桃的基因转移·····	383
四、葡萄的基因转移·····	385
五、草莓的基因转移·····	386
六、李的基因转移·····	388
七、香瓜的基因转移·····	388
 第十二章 PCR技术原理与应用 ·····	 390
第一节 原理 ·····	390
第二节 特点 ·····	391
第三节 影响PCR的因素 ·····	393
第四节 问题及解决办法 ·····	395

第五节	Tag DNA聚合酶的性能.....	396
第六节	PCR方法	397
第七节	PCR的应用	400
附录		403
一、	术语解释	403
二、	果树组织培养名录	407
参考文献		471

第一章 概 论

第一节 组织培养原理

组织培养是生物技术中的一个基本技术。植物组织培养就是从植物体上取下某一器官或组织，在人工培养基上分化、再分化，最后长成完整植株的过程。

近年来，果树的组织培养研究工作发展较快，在许多方面取得了新的进展，特别在科学研究和生产实践中显示出重要作用。例如组织培养产生的新个体能消除营养繁殖类型的病毒病；能够加速繁殖良种苗木；通过胚乳培养能获得三倍体无核果实；花粉培养能获得纯合亲本，有助于控制后代的遗传；单细胞和原生质体的培养，有助于解决嵌合体对突变育种的干扰，通过组织培养与诱变育种相结合，可为果树育种开辟新的途径等等。

从1902年德国的Haberlandt开始培养植物叶肉组织算起，植物组织培养研究已有90年的历史。当时他提出了一个大胆的设想：从一个体细胞可以得到人工培养的胚，即细胞“全能性”的问题。“全能性”是指离体的植物体细胞或性细胞（花粉）在一定培养条件下，能被诱导发生器官分化和再生植株的能力，而且再生植株具有与母体植株相同的全部遗传信息。组织培养的原理就在于细胞的全能性。通过组织培养巧妙的利用这种全能性，使在各方面取得成效。

具有全能性的细胞大体分为三类，即受精卵（合子）；发育中的分生组织细胞（包括幼嫩器官的细胞）；雌、雄配子及单倍体细胞。

细胞全能性的实现可用图1—1来表示，其中包括三个循环，A循环表示生命周期，包括孢子体和配子体的交替。果树常用无性繁殖保持遗传性的稳定性。B循环表示细胞所决定的核质周期，由于核质的互作，DNA进行复制，转录RNA并翻译为蛋白质，使全能性形成和保持。C循环是组织培养周期，组织或细胞与供体失去联系，处于无菌条件下，靠人工的营养及激素条件进行代谢，使细胞处于异养状态。在这种情况下，一个分生组织可通过三个途径实现细胞的全能性，第一途径，由分生组织直接分生芽而达到快速繁殖的目的；第二途径，由分生组织形成愈伤组织，经过分化实现细胞的全能性；第三途径，游离细胞或原生质体

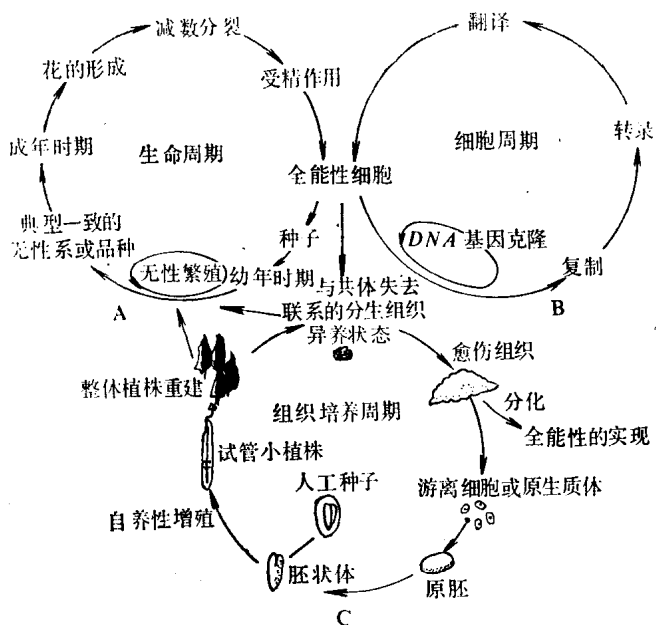


图1—1 细胞全能性的实现与利用

(参考Durzan, 1980, 1984a, 1984b, Watada等, 1984)

体形成胚状体，由胚状体直接重建完整植株、或制成人工种子后

再重建植株，此阶段自养性明显加强。B循环也可与C循环相结合，繁殖具有特殊有益遗传性状的个体，然后进入生命周期(A)，还可设想，用重组DNA技术可直接将异种DNA引入培养中的细胞或原生质体，并在植株中表达。

可以预期，细胞全能性的进一步开发和利用，可望创造更多的新品种，并在改良现有品种的过程中，大大节约时间和空间。

第二节 研究概况

果树品种改良过去多采用常规技术，但选择效率降低，育种周期太长，已不能满足生产发展的需要。近年来迅速发展的生物技术为改良果树品种开辟了一条新途径。随着组织培养技术的不断改进和日臻完善，特别是基因工程和细胞工程技术的兴起，不仅可以克服常规育种历来存在的某些障碍，而且可以获得常规育种难以或无法得到的新基因型，从而可以创造出新的品种或物种。

应用生物技术改良果树品种的研究范围较广，这里仅从组织培养和生物技术的实际应用两部分作一介绍。

组织培养研究：组织培养是生物技术的重要工具，世界各国都很重视，开展了多方面研究。至今，美国、加拿大、日本、印度、英国、意大利、法国、原苏联、澳大利亚等国，以及我国的北京、上海、辽宁、黑龙江、吉林、山东、山西、河南、河北、江苏、浙江、湖南、湖北、福建、广东、陕西、甘肃、宁夏、新疆等省、市、自治区，都开展了果树和瓜类组织培养研究工作，涉及范围很广，几乎所有主要果树和瓜类都进行过组织培养研究，并且成效显著。例如，茎尖培养用来快速繁殖品种苗木，已在苹果品种、苹果矮化砧及梨、桃、李、葡萄、扁桃、樱桃、板栗、核桃、山楂、猕猴桃、柑桔、草莓和西瓜上得到应用；并且已在苹果、柑桔和草莓上获得无病毒植株，同时利用试管苗的微型嫁接技术消除了柑桔病毒。通过胚乳培养以获得三倍体植株的工