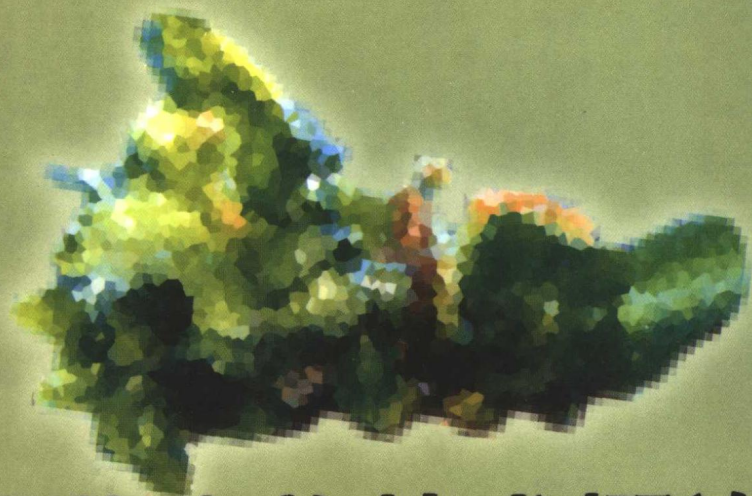


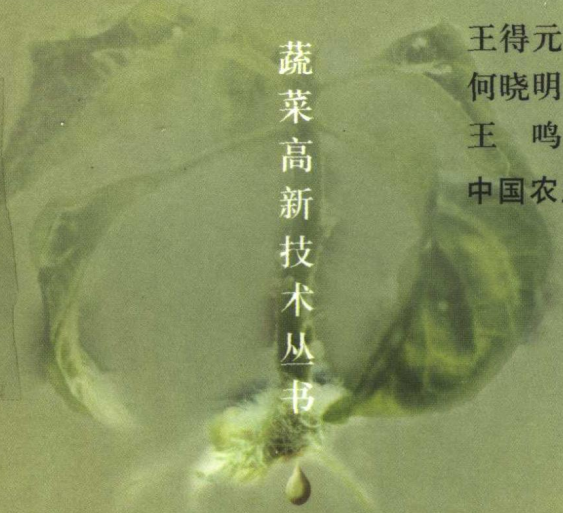
S C G X J S C S



蔬菜生物技术概论

蔬菜高新技术丛书

王得元
何晓明 编著
王 鸣
中国农业出版社



蔬菜高新技术丛书

蔬菜生物技术概论

王得元 何晓明 王 鸣 编著

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

蔬菜生物技术概论/王得元等编著. —北京: 中国农业出版社, 2001. 11

(蔬菜高新技术丛书)

ISBN 7-109-06830-7

I. 蔬... II. 王... III. 蔬菜-农业工程: 生物工程-概论 IV. S63-39

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2001) 第 13678 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 沈镇昭

责任编辑 杨金妹 舒 薇

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2002 年 1 月第 1 版 2002 年 1 月北京第 1 次印刷

开本: 850mm×1168mm 1/32 印张: 9.75

字数: 238 千字 印数: 1~2 000 册

定价: 23.50 元

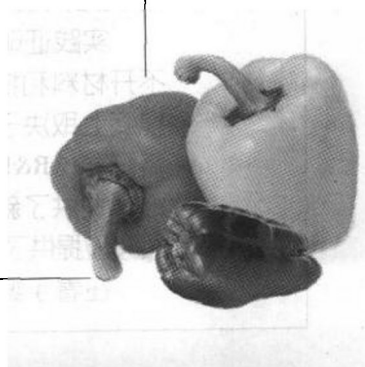
(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

内 容 简 介

本书系统介绍了蔬菜生物技术的原理和最新研究进展。全书共分13章，前三章重点论述蔬菜细胞工程的原理和应用，内容涉及蔬菜组织培养、花药（花粉）及小孢子培养和原生质体培养；第四章至第十一章主要论述了植物基因工程的基本原理及其在蔬菜抗虫、抗病、抗逆、抗除草剂、品质改良、杂种优势利用和蔬菜作为生物反应器等方面的成功应用；后两章着重反映了DNA分子标记在蔬菜种质资源和遗传育种方面的研究进展和应用前景。全书结构严谨，内容新颖、系统而全面，信息量大。

本书可以作为农业院校高年级大学生和研究生的教材，也可供相关学科的教师和科研人员参考。

BBY4164



前言

在国家重点科技攻关项目和各省（直辖市、自治区）科技项目的支持下，我国蔬菜育种工作自“六五”以来发展迅速，并取得了巨大成就。培育出的各类蔬菜良种在生产中得到了广泛的应用，据测算，在过去50年中，我国蔬菜产量增长的50%以上归功于品种改良。我国蔬菜育种水平已达到了一个较高的水平，但仍存在一些急需解决的问题，如长期采用有限的亲本种质和常规育种技术，使得新育成品种的遗传背景狭窄，传统育种技术的效应几乎达到了最高点；常规育种面临高产与优质、优质与抗病等矛盾，用常规技术难以解决；抗性基因存在于野生种质中，远缘杂交难以进行；新品种的生命周期越来越短，而其育种周期仍然较长等。如何再攀新高，以实现“高产、优质、抗病、适应性广”的育种目标，满足市场的需求和人们日益提高的要求，成了蔬菜科研人员努力探索的课题。

实践证明，蔬菜育种的重大突破任何时候都离不开材料和技术的双重突破，而材料的突破在很大程度上取决于技术创新。现代蔬菜生物技术与开发（R&D）为解决目前育种工作中存在的诸多难题提供了新的思路和方法，无疑为蔬菜育种的重大突破提供了良机。

在着手编著《蔬菜生物技术概论》时，我们的

主导思想是要让本书较全面地反映蔬菜生物技术（细胞工程、基因工程、分子标记育种）的基本原理、成功应用和最新进展，并着重论述了蔬菜生物技术的成功应用，因为蔬菜生物技术研究的目标是生产商业产品，这包括蔬菜新品种的培育、商品化生产和生物技术制药等。蔬菜生物技术产业化至关重要。

本书由广东省农业科学院与西北农林科技大学合作编著，编写人员为王得元（第四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三章）、何晓明（第一、二、三章）、王鸣（第三、十二章）。初稿完成后，由王得元和王鸣对全书进行了整理和校订。审稿人：西北农林科技大学巩振辉教授。

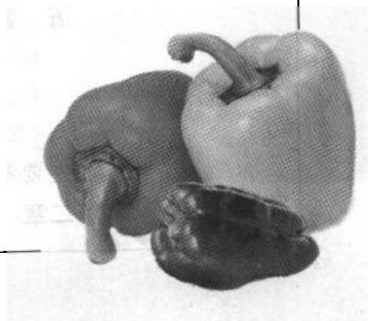
在编写过程中，我们引用了国内外许多科学家的文献；在出版过程中我们得到了中国农业出版社的大力支持，在此一并表示衷心的感谢。

限于编著者的水平和经验，书中难免会有缺点，敬请读者批评指正。

王得元

1999年9月9日

于广州



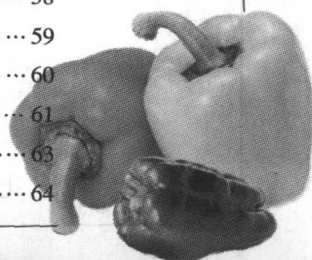
目

录

前言

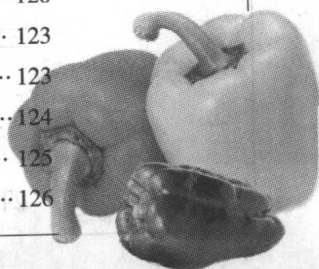
第一章 蔬菜组织培养及其应用	1
一、茎尖培养技术	2
(一) 试材的制备	2
(二) 接种与培养	3
(三) 生根与移栽	4
二、蔬菜的快速繁殖	5
(一) 蔬菜快速繁殖的基本程序	5
(二) 快速繁殖中应注意的几个问题	7
(三) 大白菜、甘蓝的侧芽培养	9
(四) 石刁柏的快速繁殖	9
(五) 无籽西瓜的快速繁殖	10
三、蔬菜脱毒培养	12
(一) 主要程序	12
(二) 马铃薯茎尖脱毒培养	16
四、种质资源超低温保存	18
(一) 取材与前处理	18
(二) 冷冻与贮存	19
(三) 解冻和重新培养	20
五、蔬菜体细胞突变体筛选	20
(一) 体细胞突变体筛选的意义	20
(二) 体细胞突变体的筛选方法	21
(三) 体细胞突变体筛选存在的问题	23
主要参考文献	24
第二章 蔬菜花药和花粉培养及单倍体育种	26

一、花药培养	28
(一) 花药培养基本程序	28
(二) 影响花药培养的因素	30
二、花粉培养	34
(一) 花粉与小孢子的分离	34
(二) 花粉培养方法	35
三、单倍体育种	36
(一) 花粉植株的再生	36
(二) 单倍体植株的加倍	37
(三) 单倍体育种的意义	38
主要参考文献	40
第三章 蔬菜原生质体培养与体细胞杂交	42
一、原生质体培养的意义及研究进展	48
(一) 通过原生质体融合获得体细胞远缘 杂种或胞质杂种	48
(二) 获得体细胞突变体	48
(三) 在基因工程方面的应用	49
二、原生质体分离程序	49
(一) 原生质体供体材料的选择	49
(二) 原生质体的分离方法	50
三、原生质体培养	54
(一) 培养基	54
(二) 培养方法	57
(三) 原生质体的分裂、增殖与植株再生	58
(四) 原生质体培养的影响因素	59
四、原生质体融合与体细胞杂交	60
(一) 原生质体融合	61
(二) 杂种细胞的选择	63
(三) 杂种植株的再生与鉴定	64



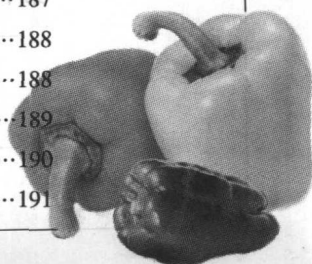
主要参考文献	65
第四章 植物基因工程	67
一、目的基因的分离和克隆	68
(一) 从植物中进行目的基因的分离	68
(二) 人工合成目的基因	72
二、植物基因转化载体系统的构建	73
(一) 根癌农杆菌 T_i 质粒基因转化载体构建	73
(二) 发根农杆菌 R_i 质粒基因转化载体构建	79
(三) 载体构建中常用的选择标记基因和报告基因	80
三、植物遗传转化系统	81
(一) 载体型植物遗传转化系统	81
(二) 裸露 DNA 直接转化系统	85
(三) 种质转化系统	88
(四) 各种转化系统的比较	89
四、外源基因整合的鉴定	90
(一) Southern 杂交	91
(二) PCR-Southern 杂交	92
五、外源基因表达的检测	92
(一) 报告基因的酶法检测	93
(二) 外源基因转录水平上的检测	95
(三) 外源基因翻译水平上的检测	95
六、外源基因在转基因作物中的遗传	96
(一) 外源基因在同源染色体上同一位点的整合概率	96
(二) 外源基因在作物基因组中的整合位置	97
(三) 外源基因在转基因工程植株中的遗传特性	98
七、转基因作物的生物安全性	99

(一) 转基因植物的环境安全性·····	99
(二) 转基因植物的食品安全性·····	100
八、蔬菜作物分子育种·····	102
(一) 通过种质转化技术开展的蔬菜分子 育种·····	102
(二) 通过植物基因工程技术开展的分子 育种·····	103
主要参考文献·····	103
第五章 蔬菜抗虫基因工程·····	104
一、抗虫基因及其作用机制·····	105
(一) 苏云金杆菌晶体蛋白基因·····	106
(二) 蛋白酶抑制剂基因·····	108
(三) α 淀粉酶抑制剂基因·····	110
(四) 植物凝集素基因·····	110
(五) 其他抗虫基因·····	111
二、抗虫转基因蔬菜研究·····	112
(一) 表达苏云金杆菌毒蛋白基因·····	112
(二) 表达蛋白酶抑制剂基因·····	115
(三) 表达其他抗虫基因·····	115
三、抗虫转基因蔬菜作物的合理应用·····	116
主要参考文献·····	117
第六章 蔬菜抗病基因工程·····	118
一、蔬菜抗病毒病基因工程·····	119
(一) 病毒外壳蛋白基因介导的抗性·····	120
(二) 病毒卫星 RNA 策略·····	123
(三) 病毒复制酶基因介导的抗性·····	123
(四) 病毒移动蛋白基因介导的抗性·····	124
(五) 病毒反义 RNA 策略·····	125
(六) 利用核糖体失活蛋白基因·····	126



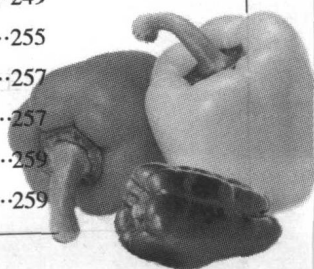
(七) 利用干扰素基因·····	127
(八) 利用与昆虫介体传播相关的基因·····	128
(九) 利用植物体内的抗病毒基因·····	128
二、蔬菜抗真菌病害基因工程·····	129
(一) 应用植物防卫基因·····	129
(二) 应用植物抗病基因·····	137
(三) 内在抗病机制的直接应用·····	142
(四) 应用植物体中的抗菌蛋白·····	142
三、蔬菜抗细菌病害基因工程·····	143
(一) 利用病原菌自身的抗性基因·····	143
(二) 应用抗菌肽基因·····	144
(三) 应用溶菌酶基因·····	145
(四) 植物防卫基因及其应用·····	146
主要参考文献·····	146
第七章 蔬菜抗逆境胁迫基因工程 ·····	148
一、蔬菜抗寒基因工程·····	148
(一) 与植物抗寒反应相关基因的应用·····	148
(二) 鱼类抗冻蛋白基因的应用·····	149
(三) 胡萝卜 AFP 蛋白基因及其利用·····	151
二、蔬菜耐旱耐盐基因工程·····	152
(一) 干旱、盐渍胁迫对作物的影响·····	152
(二) 干旱及盐应答基因·····	155
(三) 植物应答基因表达的调控·····	157
(四) 作物耐旱耐盐基因工程策略·····	157
三、蔬菜耐涝基因工程·····	163
(一) 水涝诱导的胁迫·····	163
(二) 作物对缺氧的耐性及其机理·····	164
(三) 蔬菜耐涝基因工程·····	165
四、蔬菜耐热基因工程·····	165

主要参考文献	166
第八章 蔬菜耐除草剂基因工程	168
一、主要除草剂及其作用机理	169
(一) 有机磷类除草剂	169
(二) 磺酰胺类除草剂	170
(三) 三氮苯类除草剂	170
(四) 2,4-D	170
(五) 溴苯腈	171
二、作物耐除草剂基因工程策略	171
(一) 过量表达靶酶基因的应用	171
(二) 经过修饰的靶酶基因的应用	172
(三) 除草剂解毒基因的应用	174
三、抗除草剂基因的其他应用	176
(一) 快速检测杂交种子纯度	176
(二) 抗病毒病	176
(三) 创造作物雄性不育工程植株	177
主要参考文献	177
第九章 蔬菜品质改良基因工程	178
一、控制果实成熟期的基因工程	178
(一) 乙烯与果实成熟	178
(二) 控制果实成熟的基因工程策略	180
(三) 控制番茄果实成熟的基因工程	181
(四) 控制瓜类果实成熟的基因工程	186
二、改良种子贮藏蛋白的基因工程	187
(一) 修饰自身种子贮藏蛋白基因	188
(二) 利用外源种子贮藏蛋白基因	188
(三) 利用人工合成的基因	189
(四) 增加游离的必需氨基酸含量	190
三、改良淀粉的基因工程	191



(一) 淀粉合成的生物化学和基因特点·····	191
(二) 淀粉合成的遗传操作·····	193
四、改良脂肪酸的基因工程·····	195
(一) 脂肪酸合成途径·····	195
(二) 改良脂肪酸组成的遗传操作·····	196
五、甜味改良的基因工程·····	197
(一) 改变蔗糖含量·····	197
(二) 改变果实中可溶性固形物含量·····	198
(三) 通过表达甜蛋白增加蔬菜产品的甜味·····	198
主要参考文献·····	201
第十章 蔬菜杂种优势利用的基因工程研究·····	203
一、细胞质雄性不育系的创制·····	203
(一) 作物细胞质雄性不育的分子机理·····	203
(二) 利用基因工程技术获得 cms 系·····	208
二、核雄性不育系的创制·····	209
(一) 创制核雄性不育系的基因工程途径·····	209
(二) 核雄性不育系的保持策略·····	212
(三) 核雄性不育系的恢复策略·····	212
三、自交不亲和系的创制·····	213
(一) 孢子体型自交不亲和性的分子基础·····	214
(二) 配子体型自交不亲和性的分子基础·····	216
(三) 植物自交不亲和系的创制·····	218
主要参考文献·····	219
第十一章 蔬菜作为生物反应器的基因工程·····	220
一、利用植物生产糖类物质·····	222
(一) 淀粉·····	222
(二) 新的糖类·····	223
二、利用植物生产可降解的生物塑料·····	224
(一) PHB 的微生物合成·····	224

(二) PHB 主导合成途径中关键酶基因的克隆	225
(三) 利用转基因植物生产 PHB	226
三、利用植物生产蛋白质和多肽	227
(一) 利用植物系统生产抗体	227
(二) 利用植物系统生产疫苗	233
主要参考文献	234
第十二章 分子种质资源鉴定	236
一、DNA 分子标记	237
(一) RFLP	237
(二) RAPD 类分子标记及其发展	238
(三) AFLP	241
(四) SPAR	241
(五) SSR 锚定 PCR 标记系统	242
(六) AMP-FLP, STR 和 SSR	243
(七) STS	244
(八) CAP	244
二、分子种质资源鉴定	244
(一) 绘制品种的指纹图谱	245
(二) 种质资源的遗传多样性及分类研究	245
(三) 物种的起源与进化	246
(四) 种质资源的创新与鉴定	248
三、种子遗传纯度鉴定	249
(一) 理论体系	249
(二) 技术体系	255
(三) 实践应用	257
主要参考文献	257
第十三章 分子标记育种	259
一、遗传图谱构建	259



(一) 作图群体的建立	260
(二) 连锁作图的理论基础	263
(三) 遗传图谱构建	264
(四) 蔬菜作物遗传图谱构建	271
二、质量性状基因的分子标记	273
(一) 抗病基因的定位	273
(二) 抗逆性基因的定位	275
(三) 雄性不育基因的定位	275
三、数量性状基因的定位	276
(一) QTL 定位的基本原理	276
(二) 遗传标记的编码	277
(三) 数据模式	277
(四) QTL 作图的统计方法	278
(五) QTL 图谱的信息	280
(六) 蔬菜作物 QTL 定位	280
四、标记辅助选择	283
(一) 回交育种	283
(二) 杂交育种	286
(三) MAS 的评价	287
五、杂种优势分析	288
(一) 作物杂种优势遗传机理研究	288
(二) 作物杂种优势预测方法研究	291
(三) 研究展望	292
六、无性繁殖品种的改良	294
主要参考文献	294

第一章

蔬菜组织培养及其应用

蔬菜组织培养 (vegetable tissue culture) 是指蔬菜器官、组织和细胞的离体无菌培养。这项技术的历史可以追溯到 20 世纪初, 为了证实植物细胞的全能性, 科学家进行了大量探索性实验, 至 1934 年番茄根的离体培养首次获得成功, 植物组织培养这一新的技术宣告诞生。随着植物组织培养技术的发展, 其在许多领域中显示出诱人的应用潜力, 20 世纪 60 年代以后, Morel 等利用茎尖培养技术进行兰花种苗生产, 使兰花的繁殖速度比传统方法提高几万倍; 在其后的几十年中, 马铃薯、草莓、大白菜等许多蔬菜作物的快速繁殖技术日趋成熟, 使其中一些经济价值高、繁殖系数低的名特优新品种得以大量繁殖和推广; 通过茎尖分生组织培养脱除病毒方法的确立解决了无性繁殖作物如大蒜、草石蚕、马铃薯等蔬菜种性退化这一生产上长期未能解决的难题; 植物离体组织细胞超低温保存及人工种子研究体系的不断完善, 赋予蔬菜种质资源保存及种子生产一种全新的概念; 而抗性突变体离体筛选技术的确立则提供了一种省时、省力、高效的抗性育种途径。不仅如此, 组织培养还在基因工程中起着承上启下的作用, 一方面可以为基因工程提供受体细胞, 另一方面又通过植株再生为基因的表达创造条件。蔬菜组织培养技术可以通过多种途径直接或间接地服务于蔬菜科学研究, 特别是品种改良与繁

殖的研究,应用前景十分广阔。

一、茎尖培养技术

茎尖培养根据培养目的和取材大小可以分为普通茎尖培养 (shoot culture) 和茎尖分生组织培养 (meristem culture) 两种类型。普通茎尖培养指较大的茎尖 (几毫米乃至几十毫米)、芽尖及侧芽的培养,其主要是通过腋芽增殖和反复继代培养来获得大量无性繁殖材料。这种方法技术简单,操作方便,易于成活,繁殖速度快,且在繁殖过程中可以保持遗传的稳定性,因而广泛应用于利用常规方法难以繁殖的蔬菜作物的快速繁殖及种质资源的保存。茎尖分生组织培养是指利用位于顶端生长锥区长度不超过 0.1mm 的茎尖分生组织为外植体的离体培养。研究表明,在茎尖分生组织部位几乎不存在病毒,因此利用茎尖无病毒区域进行离体培养可以减少乃至消除植物体内的病毒,使之恢复种性,提高产量和品质,目前这种方法在马铃薯、大蒜、石刁柏、草石蚕中已得以广泛应用。

(一) 试材的制备

进行茎尖培养快速繁殖时,可从大田种植的蔬菜作物中切取 2cm 左右的顶芽,进行茎尖分生组织脱毒培养时实验材料可小些 (1cm 左右),侧芽、休眠芽也可作为接种材料。将采到的试材流水冲洗后,用 75% 乙醇浸 30s,再用 0.1% 氯化汞或其他消毒剂浸泡一定时间以杀灭试验材料表面的各种微生物 (常用消毒剂及其使用效果见表 1-1),再用无菌水冲洗 3~5 次,即可完成消毒过程。如果进行普通茎尖培养,外植体以大些为好,一般切取 0.5~1cm 长的茎尖甚至整个芽;如进行茎尖分生组织脱毒培养,外植体则尽量小些,通常在解剖镜下剥去细叶及叶原基,将生长点暴露,然后切取 0.1~0.2mm 长的部分作为培养材料。从去除病毒的角度看,培养材料越小脱毒效果越好,但外植体越小,