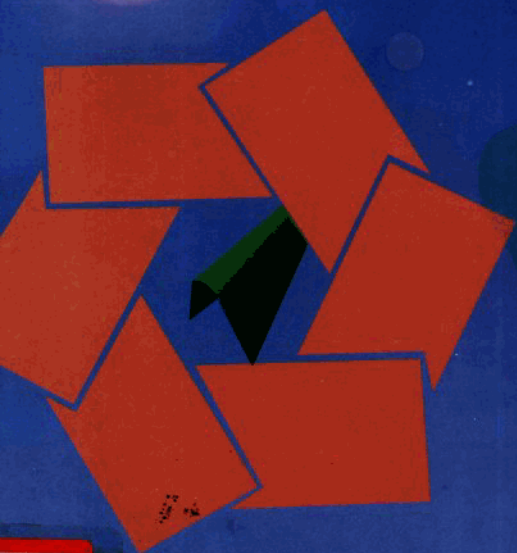


面向新世纪的海南高新技术产业

海南省首届科技论坛论文集

主编 尹双增



南方出版社

面向新世纪的海南高新技术产业

海南省首届科技论坛论文集

主编 尹双增

南方出版社

2000.10

责任编辑：张学安

图书在版编目 (CIP) 数据

面向新世纪的海南高新技术产业；海南省首届科技论坛论文集/尹双增
主编. —海口：南方出版社，2000.10

ISBN7-80660-193-7

I. 面… II. 尹… III. ①高新技术产业—研究—海南—文集②高技术—
研究—文集 IV. F124.3-53

中国版本图书馆 CIP 数据核定 (2000) 第 72161 号

面向新世纪的海南高新技术产业
海南省首届科技论坛论文集
主编 尹双增

南方出版社出版发行

地址：海口市海府一横路 19 号华宇大厦 1201 室
邮编：570203 电话：(0898) 5371546 传真：(0898) 5371264

*

海南毕伦印刷厂印刷 新华书店经销

2000 年 10 月第 1 版 2000 年 10 月第 1 次印刷

开本：787×1092 1/16 印张：28.94 字数 71.5 千字

印数：1—1 000 册

ISBN 7-80660-193-7/F·4

定价：35.00 元

海南省首届科技论坛组织委员会

顾 问 阮崇武 黄宗道 吴葵光 林栖凤

主任委员 尹双增

副主任委员 许祥源 余让水 林维纲

委 员 (按姓氏笔划排序)

王 路 冯 鸣 李唯实 陈秋波 张鑫真

林顺坤 郑学勤 黄明安 黄俊忠 韩长日

焦解歌 曾 渝 彭京宜

秘 书 长 李玉明

副秘书长 (按姓氏笔划排序)

方 佳 卢灿云 李 生 吴代飞 吴 飞

林 阳 林 强 庞春华 周 鹏 明建鸿

陈家博 陈汉诗 郑才成 张 岐 张信文

黄晓光

海南省首届科技论坛论文集编辑委员会

主 编 尹双增

副主编 许祥源 余让水 林维纲

编 委 (按姓氏笔划排序)

王 路 王道儒 王献仁 尹双增 许祥源 史海涛

李开写 李唯实 林顺坤 余让水 余诞年 沈行良

林维纲 林 强 金志强 郑学勤 张 岐 陈秋波

蒋菊生 曾 渝 黄俊忠 康耀红 焦解歌 韩长日

编辑组 (按姓氏笔划排序)

毛根海 李 生 李玉明 吴代飞 吴钟海 卢灿云

肖发宣 明建鸿 张令宏 陈家博 陈雄涛 陈泽林

陈汉诗 林 阳 周广耀 周 涛 周 鹏 张信文

屈淑玉 符史强 符 灵 符启文 郑 红 郑才成

龚 莉 黄晓光 潘家森

序

2000 年是世纪更替之年，千载历程即将逝去，新世纪的曙光已经在 21 世纪的地平线上闪现。翘首未来，我们相信，科学技术日新月异的发展必将把人类带入一个社会、经济全面变革和飞速发展的崭新境界。在这世纪之交的历史时刻，省科协按照省委、省政府的部署，以“面向 21 世纪的海南高新技术产业”为主题，组织全省广大科技工作者，开展海南省首届科技论坛。

当前，相互交叉、渗透、融合已成为世界科学发展的主流趋势，高质量的学术交流是实现科技进步和创新的重要方式和手段。省科协与有关部门联合，组织综合性、跨学科、开放性的科技论坛活动，符合科学发展的趋势，是丰富学术交流形式、提高学术交流水平的有益探索。希望通过科技论坛，提高学术活动的水平 and 质量，活跃学术思想，推动学科发展，促进人才成长，促进科技与经济相结合，为推动我省科学技术的不断繁荣发展作出新的贡献。

我们处在国际国内新的环境中，面临着结构调整、体制创新、全球经济一体化、工业化、信息化以及人口、资源、环境等一系列新的重大的问题，而这些问题都与科技发展密切相关。因此，热忱希望全省广大科技工作者，树立高度的历史责任感和使命感，以科学的眼光、渊博的知识和丰富的经验，围绕论坛的主题，广泛而深入地进行前瞻性、导向性的探讨，为海南的科技、经济和社会发展献计献策。

本书收录了海南各界专家学者撰写的主题报告和论文摘要，内容涉及生物技术、信息产业、热带农业现代化、海洋科技与海洋产业、医药产业、生态与环保等方面，这是专家学者辛勤劳动的成果和智慧的结晶。借此机会，向参加本届科技论坛的专家学者表示衷心的感谢！

尹双增

2000 年 10 月

目 录

生 物 技 术

耐盐辣椒分子育种	林栖凤等 (1)
海南热带生物资源的生物技术研究进展和新构思	郑学勤 (6)
种质资源, DNA 芯片与良种信息库	余诞年 (10)
人类基因组计划——从基因组到后基因组	金志强 (13)
生物芯片技术及其应用	黄俊生 (16)
基因组学将解读人类自身奥秘	符生苗等 (23)
海南生物技术及产业发展现状的基本估价	谢秀祯 (26)
转基因植物口服疫苗的研究	周 鹏等 (29)
海洋生物修复技术的研究与展望	林 茂等 (32)
关于抗菌肽研究进展	王宇光等 (36)
几丁质酶基因在大肠杆菌的中表达及其酶对柱花草胶炭疽病原菌的抑菌效果	蒋昌顺等 (41)
橡胶树死皮病与细胞程序性死亡——世纪难题的新视点	刘志昕等 (45)
植物诱导抗病性研究	王锐萍 (49)
巴西橡胶 (<i>Hevea Brasiliensis</i>) 体胚植株发生的微量元素调优和 REEA 的使用	王泽云等 (52)
细胞分裂素生物合成相关基因在植物叶片抗衰老基因工程研究中的应用	张治礼等 (56)
轮状病毒疫苗研究进展及其转基因植物疫苗的开发前景	杨国锋等 (58)
利用 RAPD 标记和种间杂交组合构建葡萄的分子标记连锁图谱	罗素兰等 (62)
转基因水牛生物反应器的研究	董克家等 (64)
几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶基因转化香石竹的研究	郑思乡等 (64)
抗病基因导入籽瓜及其转化体的筛选和鉴定	施 江 (65)
海南山蛭蛭素基因的克隆和序列测定	谭 琳 (66)
拟南芥干旱诱导性启动子 Prd29A 的克隆及其序列分析	王自章等 (67)
西瓜体细胞无性系变异的筛选及 AFLP 分析	方再光等 (67)
对导入红树 DNA 获得的耐盐辣椒的 RFLP 分析	方孝东等 (68)
红树 cDNA 文库的构建	林栖凤等 (69)
抗菌肽 AD 基因双拷贝表达载体的构建及其在 <i>Pichia pastoris</i> 中的表达	谢学立等 (70)
重组昆虫杆状病毒的组建及其杀虫机制的研究简报	吴代飞 (70)
安祖花茎尖离体培养的研究	张桂和 (71)
盾叶薯蓣愈伤组织与悬浮细胞的培养研究	李明芳等 (72)
杂交小麦不同发育时期叶绿素蛋白复合体的变化	李妮亚等 (73)
可积性与 DNA 和蛋白质	王 斌等 (74)

信 息 技 术

信息化是当代企业生存和发展的基本条件	李唯实 (75)
我省电子商务“十·五”发展构想	王献仁 (80)
海南现代远程教育工程的构架、设计和实现	张伯敏 (86)
智能交通与信息化	王 静 (90)
关于海南发展电子商务的几点看法	倪定华 (93)
当代计算机互动性教育应用的新发展	吴丽华 (95)
海南可持续发展与遥感应用	胡兴树等 (98)
基于椭圆曲线加密算法的密码技术	唐正星 (102)
从信息安全看民族信息产业的发展	杨志成等 (105)
海南省国土资源空间信息动态管理系统与数字海南研究	吴雪明等 (108)
基于光电读卡技术的自学考试管理系统的设计与实施	李文化 (111)
未来的网络基础——LDAP 目录服务	杜富殿 (114)
PDF 文档在 Web 上出版技术研究	林 天 (119)
用南方 NGS—200 型 GPS 接收机进行城市控制测量的试验研究	符永好 (125)
海南省信息智能岛建设浅议	傅治平 (130)
海南省远程教育问题研究	高新瑞 (132)
现代远程教育模式的探讨	魏应彬 (134)
Windows 流式媒体在网络教学中的应用	李太君等 (134)
信息社会、信息经济和信息贸易发展研究	刘 丹 (135)
利用 ASP 技术开发 MIS	云 敏 (136)
试论卫星遥感技术在海南省国土资源调查中的应用	余龙师 (137)

热 带 农 业

海南椰子产业发展中的若干问题及对策	王永壮 (139)
加速海南荔枝、龙眼产业发展浅议	陈业光 (142)
世界胡椒产销和海南发展胡椒生产的发展规划和措施	王澄群 (145)
海南冬季瓜菜产业化发展现状及对策	覃新导 (148)
海南岛花卉产业构建及其发展策略	宋希强等 (151)
海南热带作物可持续发展的问题和对策	陶忠良等 (155)
面向二十一世纪高新技术的海南果业发展战略	苗平生等 (159)
依靠科技进步 发展海南“三高”农业	陈良秋等 (163)
试论热带农业产业化发展中的技术创新与制度创新	徐知斌等 (166)
海南农业的产业化和产业升级	韦 明 (169)
对完善我省农村集体土地制度的几点看法	黄 嵩 (172)
海南热带高效农业产业化经营的几点思考	张蔚椿 (175)
海南名牌畜牧业发展的现状及对策	黄礼光 (177)

开展农业地质研究与应用 为海南建设中国热带农业基地奠定基础	廖香俊 (180)
海南省农垦农业高新技术产业发展战略构思	董保健 (183)
非正态分布状态对林木遗传力估算的影响	于冬梅等 (187)
海南岛野生蔬菜资源调查研究及开发利用	党选民等 (191)
菠萝叶纤维的研究动态及发展对策	李明福等 (195)
我国椰子产业化发展的机遇和挑战	赵松林 (195)
发展热带果树加强果期调整	周光精 (196)
香蜜杨桃品种特性及其在我省产业化发展对策	云天海等 (197)
海南芒果业现状、存在问题与对策	谢国干 (197)
海南咖啡产业化之我见	李 颖 (198)
关于构建南海茶叶优势的思考	符学林 (199)
海南瓜菜种子产销现状及对策	肖日新等 (199)
海南反季节瓜菜产业化及优势研究	吴小立 (200)
海南花卉业发展前景及对策	张汉尧 (201)
浅谈有关标准橡胶拉伸强度的几个问题	黄克奋 (201)
发挥地区优势, 推进木薯产业化发展	李开锦等 (202)
开发海南珍稀和野生果树资源促进旅游业发展	林 盛等 (203)
建立现代农产品加工观念, 促进海南省高效农业的可持续发展	吉建邦等 (203)
推行机械化旱作农业技术, 促进热带农业可持续发展	李 明等 (204)
加入 WTO 对海南畜牧业的影响及对策	刘国道等 (204)
抓住机遇, 做好海南农业发展大文章	蔡东宏 (205)
我国主要热带、亚热带水果生产现状, 及发展两高一优的对策	孙观荣 (206)
依靠高新技术, 发展海南现代热带高效农业	韦伟权等 (206)
因地制宜发展海南热带高效农业	孙继华等 (207)
发展生物技术, 促进海南热带高效农业的飞跃	韩 剑 (207)
加强对外广告和宣传的力度 提高科技成果转化率的几点建议	王顺基 (208)
加强农业科研管理 促进海南农业产业化	庄光辉等 (208)
海南省农村经济发展的制约因素及其对策	李玉凤 (209)
生物肥料——无污染无公害绿色肥料	刘志威 (210)
海南中部地区农业发展策略探讨	明建鸿等 (210)
谈发展海南热带农业高新产业的关键	张以山 (211)
浅谈畜牧业发展的新模式——生态畜牧业	刁晓平 (212)
提高割胶劳动生产率的途径分析	校现周等 (212)
海南省绿色食品基地建设中的施肥与病虫害防治问题	周小飞 (213)
浅析生态文明与可持续发展	常春荣 (214)
水稻花药特异表达基因 RA8 的启动子的分离和结构分析	彭世清等 (214)
热带作物椰子的综合利用工艺	吴春华 (215)
发挥热农院校的科教优势创建国家热带农业高科技创新体系	韦 勇 (216)
南沙岛礁蔬菜无土栽培设施的设计与研究	王玉彦等 (217)
生物绿篱在木薯地的水土保持作用及应用前景	黄 洁等 (217)

不同温度对香蕉果实后熟过程的调节	陈惠萍 (218)
谈谈海南椰子品种发展问题	唐龙祥 (219)
抗菌肽基因转化辣椒的研究	张银东等 (219)
热带、亚热带水果采后病害的生物防治	胡美姘 (220)
海南农业和农村经济面临的新问题及建议	孙俊萍 (221)
关于开展热带农产品市场营销的必要性及对策	牛文健 (222)
建立优质种苗示范基地加快海南椰子产业发展	尹 峰 (222)
21 世纪海南花卉业发展思路	夏春华 (223)
试论农业价值工程	邓须军等 (224)
发挥海南热带自然优势 立两系杂交稻繁殖基地	孟卫东 (224)
关于海南省中部山区种草养牛项目的几点看法	何华玄 (225)
海南果蔬生产存在的主要问题及其对策	王弗能 (226)
椰子产业化开发的优势及存在的问题	罗文杰 (226)
21 世纪海南林业技术创新发展的思路与对策	吴师强 (227)

海 洋

海南海洋产业发展战略思考	张 本 (228)
增强海南海洋文化意识 促进海南海洋产业发展	陈智勇 (231)
依托高新技术, 建设海洋经济强省	潘建纲 (234)
海水灌溉农业的现状和展望	林栖凤等 (238)
海南水产养殖病害现状及其防治策略	周永灿 (241)
海南省灾害性海浪预报及防御措施	梁海燕 (244)
水产资源废料虾蟹壳合理利用的一种新方法	张 岐等 (247)
加强海洋减灾防灾工作 促进海洋可持续开发利用	李文欢 (250)
大做“海”字文章 发展海洋渔业	盛运英 (253)
海南省外海捕捞业拓展前景	麦有攀 (255)
南沙深水大网目三重定置刺网新技术应用研究	李文池 (257)
海南海洋捕捞业的困境及出路	陈积明 (260)
海南省海洋环境信息系统的建立	朱万里等 (263)
海洋药物的研究现状与开发对策	鲍时翔等 (266)
海洋固氮生物多样性及其对海洋生产力的氮、碳贡献	董俊德等 (270)
海南虾贝类养殖存在问题与对策	黄 勃等 (275)
黄边糙鸟蛤繁殖生物学研究: I. 黄边糙鸟蛤性腺发育的组织学和细胞学研究	吴洪流等 (276)
海南省海岸带和海洋资源环境问题及对策研究	陈春福 (276)

医 药

十五期间海南医药产业发展的主要方向	曾 渝 (278)
-------------------------	-----------

大力推进药品生产流通体制改革 促进我省医药产业的健康发展	韩英伟 (279)
缺氧-复氧对培养的大鼠心肌细胞损伤与细胞凋亡的影响	姚 震 (281)
辅助生育技术的临床应用系列研究	黄元华等 (284)
海南省中药产业发展的思考与对策之探索	刘明生 (289)
海南黎族 β -地中海贫血红细胞膜蛋白异常的研究	姚红霞等 (291)
科学补碘	毕 华等 (293)
“十五”发展我省医药支柱产业的建议	李开写 (296)
现代医学模式形成与疾病治疗	周绍辉 (301)
我国加入世贸组织后医药工业结构调整的思考	张艳秋 (305)
推进中药材 GAP 基地 大力发展南药	郑才成 (309)
知识经济与制药企业经营管理	刘平怀 (311)
海南医药产业要走群体化、基地化的发展之路	韩宇东 (314)
医、药分开对城镇医药产业的影响与对策	王康剑 (318)
从抗癌化疗药物研究发展方向看海南地区药用资源优势	张 岐等 (320)
当前新药研究开发领域的新战略	蔡小惠 (325)
眼镜蛇心脏毒素对狗肺通气及肺循环功能的毒性研究	符 健 (327)
医院信息化系统的建设以及在医院管理中的作用	李道章等 (330)
中草药的超细化	裴重华 (332)
肾上腺素和血管紧张素 II 促心肌细胞肥大的协同作用	谢协驹等 (332)
70 岁以上静止性脑梗死患者的危险因素与临床特点	陈志斌等 (333)
米非司酮保守治疗异位妊娠的疗效观察	陈彩霞等 (334)
充分发挥地源优势, 大力推进药用资源研究与开发	于挽平 (335)
脑卒中急性期抑郁发生有关因素探讨	蔡美华 (336)
胰岛素对局灶性脑缺血再灌注损伤的作用	苏庆杰 (337)
甲硫氨酸脑啡肽和抗 δ 阿片受体抗体对小鼠骨髓瘤细胞信号传递系统的作用	黄冬爱 (337)
海南岛斑点热立克次体病的血清学和病原学调查研究	林英姿等 (338)
海南汉族、黎族人葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的基因突变型分析及一种新的 G6PD 基因突变型的鉴定	蔡望伟等 (339)
建立海南黎族永生细胞库	李冬娜等 (340)
海南省主要蚊媒微量元素测定	刘瑞梓等 (340)
吗啡对创伤性休克没有保护作用	陈世民等 (341)
高血压病与血脂异常的联系	陈汉诗 (342)
红厚壳属植物化学成份及药理活性研究进展	陈光英等 (342)
针刺治疗弱视的体会	陈炳荣 (343)
中医药为主预防原发性肝癌	王虹彩 (344)
严格掌握抗生素的联合应用	苏 洋等 (345)
我省医药产业研究开发战略探索	周广耀 (346)
珊瑚人工骨修复长段骨缺损的实验与临床研究	孟志斌等 (346)

生态与环境保护

中部开发与海南生态省建设	杨冠雄 (348)
海南省农业可持续发展研究	杨小波等 (351)
应将生态教育摆在海南生态省建设的重要战略地位	史海涛等 (355)
海南可持续发展能力评估与生态省建设	柳树滋 (358)
生态旅游与海南生态省建设	游长江 (361)
绿色化学: 可持续发展的重要途径	陈祥平 (363)
自然保护区当地居民与物种资源保护	梁伟等 (366)
海南岛沿海地区土地荒漠化的防治探讨	叶能录 (369)
海南岛综合环境功能区划研究	符国基 (373)
海南生物多样性保护战略研究	谢会斌等 (378)
海南省环保产业发展现状与对策	林生 (382)
保护生态环境使用清洁能源	韩才元 (386)
海南岛海岸砂矿开采区生态恢复及复合农林业的发展	刘强等 (388)
工业原料气的净化与气体污染物治理新技术	王睿 (392)
生态应成为海南的最大特色	傅治平 (394)
提高全民环保意识 必须从青少年抓起	韦迪兴 (397)
海南发展生态旅游的思路	唐少霞 (398)
流域尺度河流水质综合评价方法研究	梁德华 (398)
浅析海口市生活废弃物资源一体化管理模式	杜娜 (399)
浅谈三亚的生态建设	张有义 (400)
养牛制奶——中部地区开发与环保双赢并举的理想选择	刘新宜 (401)
实行产业化运行, 全面启动海南生态省建设	黄邦升 (401)
海口建设生态城市的思路与对策	宋伟 (402)
调整产业结构 保护生态环境 促进中部地区可持续发展	金羽 (402)
海南岛中部山区自然保护区建设管理对策初探	祝朝俊 (403)
海南省固体废物资源化研究	于文霞等 (404)
加快海口生态环境建设的十大对策	邢孔魁 (405)
对我省城市化进程中几个问题的思考	陈永富 (406)
海南省森林生态价值评估	罗晓宁 (406)
城市生活垃圾综合利用的探索	张宜生等 (407)
“发羊财”海南中部开发与可持续发展战略的思考	唐晓阳 (408)
试论征收汽车尾气排污费的必要性和可行性	陈玉南 (409)
做好本地区生态环保工作之我见	林松 (409)
海南省农业产业化建设与农业可持续发展研究	李雯等 (411)
海南中部地区加快发展与生态环境保护	林荃 (411)
试论三亚市生态建设	王凌 (412)
加入 WTO 与环境政策调整	庄晓娟 (412)
关于在海南中部民族地区建立生态博物馆的思考	陈立浩 (413)

关于海南主要天然林区纳入国家级森林公园经理的建议	杜世拔 (414)
加快发展城市排水事业, 推进海口生态城市建设	郑道英 (415)
“白色污染”危害与消除“白色污染”的政策建议	周元坚 (416)
海南省乡镇工业污染防治对策	周祖光 (417)
浅析生态文明与可持续发展	常春荣 (418)
浅谈促进生态产业发展的管理措施和优惠政策	王清奎 (418)
农能生态与农业可持续发展战略	陈奕辉等 (419)

青年学者论坛综合部分

精细化工及其在海南的投资前景	林 强 (421)
我省技术创新的问题及对策	李俊侃 (424)
利用糖蜜酒精废液生产单细胞蛋白中试研究	孙达远等 (426)
海南省旅游业的可持续发展	吕开华 (429)
论海南建设工程抗震防灾存在的问题与对策	陈孝京 (432)
几何方法在有序共轭域中的应用	史贻云 (436)
聚氨酯粉末涂料的固化	艾亚菲 (437)
环氧化反式-1, 4-聚异戊二烯的性能与应用	冯玉红等 (438)
增感效应火焰原子吸收光谱法测定毛发中的微量钾	罗盛旭等 (438)
高温短时反应装置的研制	孙中亮 (439)
芦荟微胶囊微胶囊剂的研制	王新广等 (440)
金属盐对甲壳胺的配位控制降解	尹学琼等 (441)
海南桉叶油成分分析和提取工艺研究	于文霞等 (442)
乙醛酸法合成乙基香兰素的研究	陈泽林等 (442)
壳聚糖凝胶树脂的制备及其对金属离子的吸附性能研究	庞素娟 (443)
计及流固耦合的船体薄壁梁波浪载荷响应研究	陈超核 (443)
4'-庚氧基-4-联苯甲酸的合成	彭明生 (444)
赤果鱼木叶挥发油化学成份研究	宋小平等 (445)
胡椒及其有效化学成份	史载锋等 (445)
落后地区初级中学治理学生辍学的有效举措	谢慧盈 (446)
再生氮氟激光器的应用与寿命的探讨	王建新 (446)
光催化还原法制备载银二氧化钛	史载锋 (447)
ES-3 电子液压振动台研制	陈宏东 (447)

耐盐辣椒分子育种

林栖凤 邓用川 吴多桂 陈菊培 李冠一

摘要 利用自花授粉后形成的花粉管通道将海岸耐盐植物红树总 DNA 导入辣椒,其后代的耐盐性明显增强,在海滩上试种,用海水直接浇灌,约 55% 的转化株能开花、结果,而对照株全部死亡。进行蛋白质 SDS-PAGE 电泳和 RAPD 分析,分别发现一条 17.5KD 蛋白质和一条 1.1Kb DNA 的特异性谱带,表明通过花粉管通道导入外源 DNA 是可行的,其后代植株耐盐能力提高与基因组变异有关。

关键词 外源 DNA 导入 耐盐 SDS-PAGE RAPD 辣椒

地球表面的水资源十分丰富,约占地球表面的 70%,但其中淡水仅占总量的 1.6%,对地球上依赖淡水生存的一百多万种动植物和五十多亿人口而言,这 1.6% 的淡水显然是不足的。另外在地球表面 30% 的陆地上分布着大面积不能耕种的盐地,我国盐渍化和次生盐渍化土地约占耕地面积的 20%^[1],而且,由于灌溉方法不当,每年还造成大量次生盐渍化土地。随着人口的增加,对农产品的需求越来越多,近 50 年的统计表明,我国人口已增长 1.26 倍^[1]。在人口不断增加,耕地日趋减少和淡水资源不足的压力下,培育耐盐作物,开发利用大面积盐荒地和咸水资源发展农业是生物科学技术急需解决的重要课题。

长期以来,无论是用常规方法还是用遗传工程方法培育耐盐作物品种都已取得一定进展,但遗憾的是至今成功的例子太少,其主要原因是植物的抗盐机理还了解不多,目前普遍认为植物的耐盐性是多种抗盐生理性状的综合表现,由位于不同染色体上的多个基因控制^[2],因此,转移单个基因往往只能获得部分耐盐性,培育转基因耐盐植物可能需要同时转移多个基因。1992 年以来,我们运用周光宇建立的花粉管通道技术^[3],选择盐生植物(红树、盐藻等)作供体,开展了耐盐作物分子育种研究。植物在授粉后,花粉在柱头上形成花粉管,穿过花柱进入子房,沿子房的内壁或胎座继续生长直到胚珠,通常经珠孔进入胚囊。在花粉管到达之前,从珠孔到胚囊的一些珠心细胞退化成一条便于花粉管生长的通道,即花粉管通道,利用该通道使外源 DNA 进入胚囊,转化尚不具备正常细胞壁的受精卵、合子或早期胚细胞,实现某些目的基因的转化。这一理论和技术自七十年代由周光宇提出后,相继在棉花^[4]、小麦^[5]、大豆^[6]、水稻等^[7]二十余种作物获得成功。本文首次报道以海岸耐盐植物红树作供体,将其 DNA 通过花粉管通道导入栽培辣椒,获得了耐盐能力明显增加的后代,在海滩上试种,用含盐 2.5% 的海水浇灌,约 55% 的转化株能开花、结果,已繁殖到第三代,而对照株全部死亡。对该组合的受体、供体及转化后代进行了随机扩增多态 DNA 分析(Random Amplified Polymorphic DNA 简称 RAPD),在 22 个引物中发现 1 个引物检测出 DNA 的多态性,另外对叶片可溶性蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析表明,在盐胁迫条件下,转化后代有盐诱导的基因表达,产生了新的蛋白质谱带。

1. 材料和方法

1.1 材料

供体:海岸植物红树(*Rhizophora apiculata*, 红树科,小乔木)采自海南岛琼山东寨港盐场出口处,其生长环境的海水盐度为 30-35‰。红树是典型的盐生植物,生长在热带和亚热带海岸

的潮间带,形成红树群落,被称为“海上森林”,是沿海的重要经济资源。

受体:牛角椒 (*Capsicum annuum* cv. 茄科), 购于海口种子公可。

dNTPs, TaqDNA 聚合酶, RCR marker 购于加拿大真达科技有限公司, RAPD 扩增引物购自美国 Operon 公司, 9600 型 PCR 仪为美国 PE 公司产品。其它试剂为进口分装或国产分析纯试剂。

1. 2 方法

1. 2. 1 红树 DNA 的提取

按照本实验室建立的 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵) 方法^[8]进行。盐生植物红树比普通植物具有更坚固的细胞壁, 含有大量单宁、多糖、脂类、色素及酚类物质, 给 DNA 提取带来很大困难。我们建立的 CTAB 法对于盐生植物 DNA 提取具有普遍意义。将红树叶片剪碎, 加液氮研磨, 用巯基乙醇/CTAB 缓冲液提取, 65℃ 恒温 1 小时, 氯仿/辛醇抽提 2—3 次, 最后在 1 mol/L NaCl 高盐条件下加入异丙醇沉淀, 经乙醇洗涤、干燥, 制得的 DNA 紫外检测其 A260/A280 ≥ 1.8, 分子量约 50kb, 符合分子育种要求。

1. 2. 2 外源 DNA 导入

基本上按照周光宇的方法 [3] 进行。选择生长势态良好的辣椒母本株, 在人工授粉后, 经过不同时间进行外源 DNA 导入试验, 表明人工授粉后 10—16 小时, 即从花粉管形成到受精和原胚发育时期, 导入外源 DNA 结实率较高。此时切除柱头, 将供体红树 DNA (浓度为 0.5mg/ml) 滴于切口处, 并用 1 × TE (10mmol/L Tris-HCL, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 溶液作对照。

1. 2. 3 耐盐性试验

导入外源 DNA 获得的种子称为第一代种子 (D1), D1 代种子培育的植株称为 D1 代植株。本文是 D2、D3 代植株的实验结果。

方法一: 在四个瓦盆中放置普通淡土, 其基础含盐量约 0.05%。每盆土划分成两部分, 分别移栽导入红树 DNA 的 D2 代辣椒幼苗, 和未导入外源 DNA 的对照苗, 待苗长至 4—5 个叶片、约 5—7cm 高, 将其中三盆浇 1:2 的海水 (即 1 份海水与 2 份自来水混合, 含盐约 0.8%), 另一个盆浇自来水对照, 观察生长情况。

方法二: 在盛有普通淡土的瓦盆中播种、育苗 (D3 代), 幼苗长至 4—5 个叶片后移栽到海滩试验地, 待幼苗生长稳定后, 用海水浇灌。以未导入外源 DNA 的受体作为对照, 观察其生长情况。试验地位于海南大学海滩, 为沙质土壤, 其含盐量随天气晴、雨有所变动, 约 0.1—0.3%, pH7 左右, 海水含盐量约 2.3—3.1%, pH8.0 左右。

1. 2. 4 蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

参考文献^{[9][10]}分别取含盐 0.8% 条件下生长的 D2 代辣椒转化株和对照株叶片约 1 克, 按每克鲜重加 2ml 20% ATCA (三氯醋酸), 冰浴中匀浆, 4℃, 22, 000xg 离心 10min, 沉淀用冷丙酮洗 2 次, 在沉淀中加入提取液 (60mmol/L Tris-HCL, 0.5% SDS, 2mmol/L EDTA, 5% 甘油, 5% 巯基乙醇, pH8.0) 匀浆。22, 000xg 离心 15min, 上清液用冷丙酮 (终浓度 80%) 沉淀, -30℃ 过夜, 22, 000xg 离心 15min, 沉淀加蛋白质溶解液 (62.5mmol/L Tris-HCL, 2% SDS, 10% 甘油, 5% 巯基乙醇 pH6.8) 溶解, 供电泳使用。

蛋白质 SDS-PAGE 分析的条件为浓缩胶 3%, 分离胶 12%, 在 20mA 恒流下电泳。凝胶在 0.05% 考马斯亮兰 R-250, 10% 冰醋酸, 25% 异丙醇中染色, 在 10% 甲醇-10% 醋酸中脱色。

1. 2. 5 随机扩增多态 DNA (RAPD) 反应

参考文献^[11]进行 RAPD 扩增时, 采用去除 RNA 的供体 (红树)、受体 (辣椒) 及导入了供体 DNA 的受体后代 (D2 代) DNA 做模板, 各取 100ng, Operon 引物 1μl, dNTPs (2mmol/L) 2μl,

10×缓冲液 (MgCl_2 1.5 mmol/L) 2 μl , 加无菌水至反应总体积为 20 μl 。RAPD 反应的条件和程序参照引物生产厂家 Operon 公司的建议, 即将待扩增系统于 94℃ 变性 1 分钟, 36℃ 退火 1 分钟, 72℃ 延伸 2 分钟, 循环 45 次。

2. 结果和分析

2.1 导入外源 DNA 的结实情况

辣椒是自花授粉植物, 在人工授粉后 10—16 小时导入红树 DNA, 在 62 朵花中, 收获到 32 个果实, 结果率为 51.6%, 果实的外形与受体牛角椒基本相同, 但果实内种子数普遍较少。

2.2 后代植株的耐盐性

2.2.1 盆栽情况

D2 代和对照株在四个盆中各占一半, 其中三盆用含盐 0.8%, 即 1:2 的海水浇灌, 另一盆用自来水浇灌, 2—3 周后逐渐显示差别。D2 代植株用 1:2 海水浇与用淡水浇的生长情况基本相同, 但对照株不能耐受海水, 生长受到明显抑制, 叶片卷曲、变形、枯萎, 在开花期以前全部死亡。在盐胁迫下, D2 代植株大约 60% 存活, 其中 50% 能开花、结果 (如图 1)。



图 1 辣椒 (D2) 耐盐性试验

左盆: 用 1:2 海水 (即 1/3 海水) 栽培 左盆: 用淡水栽培

2.2.2 海滩地试验

转化株 D3 代和对照株幼苗移栽海滩试验地, 待生长稳定后, 用海水浇灌。海水含盐量 2.5—3.1‰, 海滩地沙质土壤基础含盐量约 0.1—0.3‰, pH7.0 左右。其生长情况如表 1 所示。

表 1. 导入红树 DNA 的辣椒后代在海水盐度下的生长情况

Table 1. The growth state of *Capaicum annuum* cv. watered with saline

植 物	总株数	成活数(株)	成活率(%)	株果数(个)	结果率(%)	盐 害 症 状
对照(ck)	226	0	0	0	0	盐害严重, 开花期前全部死亡。
转化株 (D ₃)	1094	29	2.65	16	55	大部份植株逐渐死亡, 两个株系的 29 株生长基本正常, 其中 55% 能结果。



图2 用海水栽培的辣椒转化株(左)和对照株(右)

Fig 2 Transformed (Left) and non-transformed control of *Capsicum annuum* cv. (right) grown under saline

对照株浇海水后盐害症状严重, 叶片逐渐变黄、卷曲、枯萎、烂根, 在开花期以前全部死亡。在 1094 棵转化株中大部份不能耐受海水的高盐胁迫, 陆续死亡, 但其中 29 株 (编号: 38-R-D2 和 10-R-D3) 生长基本正常 (图 2), 农艺性状与受体基本相同, 有 55% 可以开花、结果。虽然植株较矮, 产量较低, 但能完成整个生长周期, 所得种子可以繁殖传代。

2.3 RAPD 分析结果

用 22 个引物分别对供体、受体和 D2 代三个样品进行 RAPD 反应, 所得扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。结果发现有一个引物 OperonK01 简称 OPK01 (引物序列: 5' - CATTGAGCC - 3') 得到的 D2 代的扩增产物出现了一条特异性谱带, 其位置与供体的一条扩增产物带一致, 分子量约 1.1Kb, 其他谱带与受体的扩增产物完全一致 (图 3)。表明通过花粉管通道导入的外源 DNA 可能已进入辣椒转化株基因组, 因此用适当的引物能特异性的扩增出该 DNA 片段。

2.4 蛋白质电泳

在 0.8% 盐胁迫条件下, D2 代转化株与对照株叶片的可溶性蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳如图 4 所示。比较两者的电泳图谱, 发现 D2 代转化株产生了一条 17.5KD 的特异谱带, 该蛋白可能与外源 DNA 的导入有关。在盐胁迫条件下, 转化后代基因组中可能有被融合的外源耐盐相关基因的表达, 因而产生了新的蛋白。

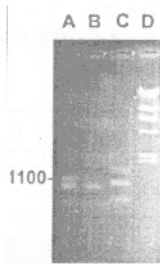


图3 RAPD 扩增产物

A. 导入外源 DNA 的辣椒 D2 代 (94-002) B. 牛角椒 (受体) C. 红树 (受体) D. 分子量标记

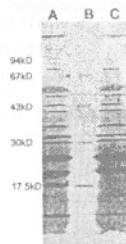


图4 蛋白质 SDS-PAGE 图

A. 导入外源 DNA 的辣椒 D2 代 (94-002) B. 分子量标准 C. 牛角椒 (受体)