

病粒率为1.8%。对照子实赤霉病粒率为4.0%。

6. 施铜经济效益十分显著,要从增产和防病两个方面衡量。亩施基肥有效铜 179 克,费用每亩 2.76 元,亩利润 14.77 元;亩施有效铜 90 克,亩费用 1.39 元,亩利润 28.5 元;亩有效铜 45 克施量,亩费用 0.70 元,亩利润 11.17 元。三叶期结合灭草叶面施铜 15 克/亩(折商品量硫酸铜 40 克),亩费用 0.23 元,亩盈利 10.93 元,204 905 亩示范田,共盈利 200 万元左右。

三、小 结

1. 铜肥对缺铜的黑土、白浆土、草甸土、

暗棕壤均有显著的增产作用;增产率 5.95~14.97%。

2. 铜肥对小麦白粉病、根腐病、锈病、赤霉病有一定的防效。

3. 在施氮较高水平时,铜肥增产效果更突出,达 15%以上。

4. 施铜可增加小麦抗倒伏性,抑制基节的长度。

5. 推荐剂量变动为 0.6~15 公斤铜/公顷(亩商品量),视土壤缺铜程度而定,施法有土壤条施和叶面喷施,有用量少,效果好,见效快的优点,土壤条施要与大量元素肥料混合,以便施用均匀,因铜在土内极少移动,施在表层,有效性低。试验结果证明,基肥以亩施 90 克有效铜效果较好。

外源 DNA 直接导入技术 在作物育种上的应用

雷勃钧

(黑龙江省农科院生物技术研究中心)

利用开花植物授粉后形成的花粉管通道,直接导入外源 DNA 来转化尚不具备正常细胞壁的卵、合子或早期胚胎细胞,进而实现某些目的基因转移技术。自七十年代由我国学者周光宇先生提出后,相继在多种作物上进行了实验研究,并获得了可喜的进展。此项技术实用可行,不仅为研究外源 DNA 直接导入植物提供了一个良好的实验系统,而且为扩大植物变异范围,丰富遗传基础提供了一项新技术,为我国农业分子育种开辟了一条切实可行的途径,并使我国分子育种首先进入了应用阶段。

一、技术的提出及主要原理

1974 年开始,周光宇先生对国内粮食作

物远缘杂交进行了广泛深入细致的调查和分子验证,通过对“高粱稻”及其亲本同工酶分析,发现“高粱稻”中有一条来自高粱(父本)而水稻(母本)没有的酯酶同工酶谱带。因为酶蛋白是基因活动的直接产物,所以这条谱带肯定是来自父本控制酶蛋白合成的 DNA 片段表达的结果。又通过分子杂交,以高粱 DNA 制成探针与水稻 DNA 进行杂交,发现高粱 DNA 序列重组入水稻基因组内,进一步证明了“高粱稻”的分子基础。这就解决了为什么远缘杂交后代在染色体水平上没有变化,而却存在与母本不同的显示父本性状的某些变异,同样也可以说明玉米和水稻杂交,虽然不是精卵结合或染色体加倍,但不能排

除由于局部分子的亲和性而产生了片段 DNA 的杂交。在此工作的基础上,她提出“远缘遗传分子 DNA 的整体排斥性和局部亲和性”的理论,并根据这种远缘杂交所产生的染色体水平以下的杂交现象提出了 DNA 片段杂交的假设。14 年前,即 1977 年,在她发表的一篇论文中这样写到:这类通过人工杂交技术获得的后代,有明显的变异而染色体宏观未变的事实是不能忽视的,它可能给我们提供一个遗传育种的新课题。即 DNA 片段杂交,如果我们能掌握片段杂交的规律,就可能为分子定向育种开辟途径。基于这种理论,并根据作物授粉受精的特点和胚囊中特殊结构:胚囊中的胚细胞一般没有正常的细胞壁似天然的原生质体,易于 DNA 的进入;受精后的细胞分裂旺盛, DNA 复制活跃,易于整合;胚胎发育早期是接受异源遗传物质的敏感时期等。进而她设计了自花授粉后,利用形成的花粉管通道途径,进行外源 DNA 直接导入植物的技术。1984 年和 1988 年又相继发表了对此项技术的分子验证。

中科院上海生化所与江苏农科院经作所应用缺口翻译的 H^3 标记大分子(50kb)棉花 DNA 于自花授粉 24 小时后,注入棉花子房顶部。30 分钟到 8 小时后,部分胚囊已有 DNA 进入,2~4 小时 80% 以上的胚囊均有 DNA。除从珠孔到胚囊间的花粉管通道外,珠心的任何其它部位均无自显斑点。珠心在花粉管到达之前为一封闭组织。珠心细胞具有细胞壁,外源 DNA 不可能通过,只有花粉管到达前,从珠孔到胚囊中间的细胞退化形成柱细胞,花粉管才得以通过。从棉花胚珠冷冻切片中看到花粉管通道是相当宽的,易于 DNA 的进入,因此,授粉后形成的通道是导入外源 DNA 的现成途径。

中国科学院上海生化所与中国农科院作物所应用带有卡那霉素抗性基因在植物中能表达的质粒 PNE0105 与受体的共同顺序重组后导入棉花与水稻,子代中均出现了卡那霉素耐性明显高于受体的植株。并已在水稻

中测出强的卡那霉素磷酸转移酶活力和 Southern Blot 图片上的卡那霉素抗性基因杂交带,证明单基因导入成功。

在此期间,国外学者也在探索植物授粉受精时期,进行外源 DNA 直接导入技术,如有的利用花粉萌发时吸收种内或种间 DNA,获得来自外源 DNA 的花色变异子代;或利用此技术于玉米叶斑病抗性的转移;或应用外源 DNA 与玉米花粉混合授粉,得到当代高频率的胚乳基因的转移。国外这些技术比我国所创立的直接导入技术多了一道花粉吸收 DNA 的程序,二是还没有进入应用阶段。

二、技术的应用

最先开始应用于棉花作物,1978 年初,中国科学院上海生化所周光宇等和江苏农科院黄骏麒等协作,将海岛棉 DNA 直接导入中棉,获得变异后代;将抗枯萎病的陆地棉 52-128 总 DNA 导入了优质的陆地棉江苏一号和二号,获得了优系 3072 和 3049,既保持了江苏棉的质优,又比江苏棉一号和二号分别增产 30% 和 70%,抗性达供体水平;将海岛棉 7124 DNA 导入陆地棉 9101,获得后代 3118 是高抗枯萎耐黄萎病的棉花品系,产量比受体高 22.8%,平均亩产皮棉 81.9 公斤,稳定遗传达 9 代,扩大种植 12 000 亩,普遍增产 15% 以上。

中国科学院上海生化所周光宇等还和中国农科院段晓岚、陈善葆等协作,进行了水稻外源 DNA 导入的研究。他们将大米草、早熟紫玉米、紫色稻、高粱等为供体,分别将其 DNA 导入水稻品种中,其中早熟紫玉米的 DNA 导入水稻,获得了水稻新品种 829042,具有早熟耐旱等优异特性。目前正在北京市郊旱田扩大试种。大米草 DNA 导入水稻,获得的后代蛋白质含量高达 12.75%。紫色稻 DNA 导入水稻,获得了紫色性状的转移。

进入八十年代中期,利用花粉管通道技术实现分子育种,并扩大到多种农作物及作物种间或属间、科间的遗传物质转移。如湖南农学院吴小月等育成湘棉 12 进入区域试验;

广西农科院李道远将药用野生稻 DNA 导入栽培稻,并育成桂 D1 号品种,质优,抗逆性强,亩产高达千斤;河南农科院阎新甫等将大麦 DNA 导入小麦品种中,获得稳定遗传的高抗白粉病的转化后代。吉林农大富威力等将菰(*Zizania*)DNA 导入水稻,育成抗病、耐低温、抗倒、抗旱衰品种通 31 号、通 35 号,亩产最高达 1 718 公斤/亩。1992 年种植面积可达百万亩以上。1989 年北京农业大学报道了将抗病野生茄子 DNA 导入中国长茄,引起性状变异产量明显提高。1989~1990 年,中国油料,大豆科学又相继报道了黑龙江省农科院大豆所雷勃钧等将野生大豆 DNA 导入栽培大豆及将大豆 DNA 导入玉米、茄子的研究。其中,将高蛋白(48%以上)野生、半野生大豆 DNA 导入栽培大豆,获得了一批性状基本同受体,蛋白质含量高于受体 2 个百分点左右;或不同于受体(疯狂分离),蛋白质含量高于受体 5 个百分点左右的后代材料。还将具有早熟血缘的栽培大豆 DNA 导入推广品种大豆中,后代获得一批早熟品系并已进入异地鉴定,田间表现良好,1993 年选入区域试验。这对于改造一、二积温带推广品种,使之迅速向北推移具有重要意义。通过几年实验,他们在外源 DNA,包括目的基因直接导入大豆的时期、方法,建立起可行的实验系统,获得一批转化后代,有些具有一定的应用价值。为丰富大豆遗传基础,为育种和大豆生产提供了后备材料。他们还对不同科属间作物 DNA 导入进行了探索,如将大豆 DNA 导入茄子、玉米、小麦、高粱等作物,也初步看到了蛋白质含量转化的效果。另外,黑龙江省农科院园艺所生物技术研究室在进行黄瓜抗病 DNA 导入研究中,已获得黄瓜抗病材料。同时还获得一个果型小,结瓜率高适于加工类型的株系并可望进入生产。

目前,利用花粉管通道技术来实现目的基因的直接转移,更为令人兴奋。随着目的基因分离的获得,几年来多集中于原生质体水平的转移技术的研究。如国外的电激,基因枪

等等。可是由细胞到整株及遗传表达,必定要经历很多复杂的变化。当然按着各自的不同研究水平和研究条件,可选择不同的方法。但事实已证明,利用花粉管通道技术,是更为直接、简便有效的基因转移技术。1991 年《中国科学》报道了中国农科院生物技术研究中心谢道昕等,利用此技术将苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因导入棉花,获得转基因植株。而近几年国外应用农杆菌介导的叶盘法及以胚性悬浮系为材料采用的基因枪法,只得到了转外源模式基因(抗卡那霉素及抗 Hygromycin 基因)的棉花植株,迄今尚未见到将重要农艺性状基因导入棉花的报告。

三、技术的效应

纵观近十年利用花粉管通道途径,进行外源 DNA 导入技术在棉花、水稻、大豆等作物上的应用效果,我们可以看到:

缩短了生物工程技术为农业生产服务的时间。利用 Ti、Ri 质粒为载体,进行植物基因工程离应用还较遥远,特别是在我国目前条件下还有很多困难。为了使生物工程技术在农业生产上尽快见到效益,实践证明,此方法简便易行。

利用花粉管通道途径是选择植物整体为受体。因此可任意选择生产上的当家品种作为受体,进行外源 DNA 导入。在保留受体优良性状基础上加以基因改进。因此,省略了细胞组织培养的继代及诱导过程,并越过了植株再生的障碍。

导入时期为授粉受精时期,转化的是整体植株的卵细胞、受精卵或早期胚细胞。此时期细胞的特殊生理特点,决定了导入的 DNA 易于整合,进而产生变异,并且这种变异大部分是在基本保持受体性状基础上出现的。

在自花授粉基础上只是部分片段 DNA 或目的基因进入受体基因组,因而避免了供体基因组与受体基因组的全面重组,也不同于有性杂交的染色体重排,因此,易于稳定,可节约一半的育种时间。

授粉后外源 DNA 导入技术的研究,不

但为外源 DNA 直接导入作物提供了一个良好的实验系统,同时也获得了一批有价值的材料。按周光宇先生所划分的两个层次的分
子育种技术,是适合我国国情的生物工程技术。在此思想指导下,预计本世纪末,将有一大批由此技术而产生的农作物新品种用于生产实践。而且随着目的基因分离获得,将逐渐由总 DNA 导入转为目的基因的导入,最终实现基因工程的全部设想,这比预先设计的蓝图要节省好多环节,在这一点上我们国家将走在世界前列。

也正因为如此,1987 年第二次中日生物技术科学讨论会上,中国的植物外源 DNA 直接导入水稻的研究、引起很大反响,日本专家认为此方法可不经原生质体培养即可将目的基因直接导入受体,简便易行。今后要引用此技术。美国康乃尔大学等已有论文对这一技术作了重复的分子验证。美国、英国、荷兰、法国等也开始应用这一技术于小麦、水稻、豌

豆等农作物的遗传操作,选育优良品种。

当然,目前对于总 DNA 导入,其目的后代的筛选还带有很大的随机性。但就此技术而言,当前关键的问题是证明此途径在多种作物上的可行性和实用性。至于导入的遗传物质是带有目的基因的重组 DNA 分子,还是带有目的性状基因的供体总 DNA 片段分子,将由目的基因分离的进展而决定。在目前还不能大量随意分离提取某个目的基因的情况下,首先实施导入总 DNA 片段分子不但可行,而且更重要的是能迅速解决农业生产中的某些问题。这是实现植物基因工程带有战略性的一步。也是本项技术能在短短 10 年中被国内外许多实验室所用,并在几个重要的作物上育成品种的意义所在。随着目的基因分离技术的发展,逐渐可由总 DNA 导入转向目的基因的导入,进而实现基因工程的全部设想。

农副产品加工新方法 ——辐照加工技术

付立新 袁 芳

(黑龙江省农科院原子能所)

农副产品加工在我国有悠久的历史,随着科学技术的发展,传统的加工技术也在不断更新和发展。辐照加工技术,成为农副产品加工的一种新方法。

辐照加工属于原子能和平利用的一个重要方面,是对辐照技术大量研究应用中发展起来的新技术。利用放射性核素 C^{60} 、 C^{137} 产生的 γ 射线处理农副产品,在一定剂量范围内,能起到杀虫、灭菌、消毒、防腐、改质等作用,使农副产品贮藏期延长,调节供应期和扩

大销售地区。据国际原子能机构统计,到 1990 年 5 月 15 日止,有 45 个国家和地区批准近三百种农副产品经辐照可以上市^[1]。

辐照技术属于物理方法,但与其他物理方法比较,具有灭菌杀虫彻底,不产生环境污染,无药物残留,不破坏营养成分等优点,而且由于 γ 射线穿透能力极强,可以在不拆包装的情况下,杀灭害虫、寄生虫和微生物,减少了二次污染的机会。一些国家建立了食品保鲜、辐照消毒、辐照加工等装置,因其利用