

生产技术

生物技术在种植业中的应用前景*

李云龙 张贤泽 郑秋媚 郑金玲 吴裕芝 王 英

(东北农业大学)

近十几年来,在世界范围内蓬勃兴起的生物技术热已成为令人瞩目的现代高技术群支柱之一。生物技术具有巨大的潜力,它的发展和应用,必将对人类社会产生深远的影响。因此,各国都高度重视这一新兴技术,制定各种策略和措施促进它的发展。

1 生物技术与持续农业

五十年代的绿色革命是以追求水稻和小麦高产为主要目标;七十年代以来,在农业生产中通过生物技术来创造优质、高产、抗病、抗虫、抗逆的新农作物品种,新时代的绿色革命有着更加深刻和广泛的内涵。

随着 DNA 双螺旋结构的揭示,生命科学得到了空前的大发展,新学科和新技术层出不穷,在改善人与自然和谐相处的持续农业实施中,生物技术将渗透到种植业、养殖业、林业、食品、环保、资源利用等生产和科研各前沿领域中,发挥无可比拟的作用。实践证明,生物技术是生物学理论成果走向实际应用的纽带,是攻克未来农业中关键性课题的决定性技术途径,在农业生产与科研中占有举足轻重的战略地位。

2 植物基因工程与植物改良

2.1 植物基因工程的概况

2.1.1 植物基因工程的技术性进展 迄今分离的高等植物基因有 100 多个,其中常用的种子贮藏蛋白基因与抗性有关基因等才有 30 几个。我国已分离了花生青枯病致病假单孢菌的致病基因,与抗旱耐盐有关的黑麦脯氨酸合成酶基因等。尽管高等植物基因复杂,研究较困难,而近年来科学家应用限制性片段长度多态性技术来制作一些重要作物基因组的遗传图谱,并采用聚合酶链式反应来扩增小的 DNA 片段。外源基因导入方法不断改进,整合型 Ti 质粒和双元型 Ti 质粒转化系统的建立,使外源基因可高频地整合至受体染色体中并获高效表达。

近年来,基因直接导入法进展很快,利用 PEG 或电激法或两者结合将外源基因导入植物原生质体,从而克服了 Ti 质粒做为载体时狭隘的寄主范围的限制;利用花粉管通道将外源 DNA 导入胚囊,避开某些植物原生质体再生的困难,直接导入植株;利用基因枪可将外源基因导入细胞和细胞器,如叶绿体 DNA;还有超声波转移技术等。受体有原生质体、胚、愈伤组织和植物体等。

鉴定转基因植物中外源基因的方法很多,主要有胭脂碱检测、报告基因(包括 CAT 基因、GUS 基因、萤光素酶基因和 β -半乳糖苷酶基因等)、杂交检测和多聚酶链式反应检测等。

植物组织细胞培养再生完整植株的不断突破,加之多种转化方法已趋成熟,即将出现一批

* 本文系农业部“九五~2010 年”农业科技规划与发展战略研究课题。

收稿日期 1996-01-09

抗病、抗虫、抗除草剂和品质优良的转基因农作物。

2.1.2 植物抗病基因工程 1986 年美国将烟草花叶病毒(TMV)的外壳蛋白(CP)基因转入烟草成功之后,采用病毒外壳蛋白基因、卫星 RNA、反义 RNA、核酸酶法、运动蛋白基因、复制酶基因和病毒抗体基因等转基因操作,已获得 15 种病毒组的 30 多种抗病基因工程植物,例如抗水稻条纹病毒的转基因水稻、抗番茄斑萎病转基因烟草等;还有用双链 DNA 病毒和单链 DNA 病毒转移成功的实例。利用基因工程培育多价抗病毒作物品种是有价值的探索课题。

2.1.3 抗细菌、真菌性病害的基因工程 采用的方法有①将原核或真核生物的溶菌酶基因导入植物表达后,可溶解病原菌的细胞壁;②把抗菌多肽基因转入植物细胞,表达产物可破坏病原菌的质膜;③乙酰转移酶基因导入植物体,由于该酶能解除细菌毒素的致病作用,则使植物得到保护;④还可把与增强抗菌能力有关蛋白质的基因转入植物,会使这种转基因植物获得较强的抗菌力。

2.1.4 抗虫的植物基因工程 自 1987 年把苏云金杆菌的伴胞晶体蛋白(δ -内毒素)基因转入烟草、番茄、棉花而获得抗虫性后,各国正在进行田间试验。抗虫转基因植物的研究,仍需解决安全性、器官或组织特异地高效表达,昆虫体以及对生态环境的影响等。

2.1.5 抗除草剂的植物基因工程 发达国家非常重视采用基因工程方法创建抗现有除草剂作物,旨在扩大除草剂的应用范围。例如抗草甘磷基因工程是把三种芳香族氨基酸合成途径中的关键酶 EPSP 合成酶基因转进油菜细胞的叶绿体中,转基因植物叶绿体中 EPSP 合成酶活性大大提高,并能抵抗草甘磷,现在又把 EPSP 合成酶基因修饰后转至烟草、玉米、棉花、番茄、大豆等作物;另一类是抗阿特拉津基因工程,把光系统 II 反应中心内负责电子传递的 32KD 蛋白结构中的第 246 位丝氨酸,改为甘氨酸则不能与阿特拉津结合而表现了抗性;人们把人工合成和上述同工酶极相似基因转入烟草内获得了抗性。将含在龙葵中的抗阿特拉津 32KD 蛋白基因(PSbA)的中间载体质粒注入大豆子房也获得抗性植株,其抗性能遗传给后代。利用基因工程方法,还获得了抗黄酰脲类、抗咪唑酮类烟草,利用体细胞变异也选出了具有抗性的玉米和甜菜。

2.1.6 耐逆境的植物基因工程 美国从一种细菌分离出抗旱基因,以卡那霉素作选择剂,用 Ti 质粒介导法转入棉花,已获得抗旱转基因棉花。又在豌豆中分离出抗低温基因,成功地转入烟草,现在进行转入棉花的试验。将植物表面存在的“冰核活性(INA)细菌”的冰核基因转入甘蓝,在该植株中得到表达。有人进行棉花抗盐基因的分离和 DNA 序列研究,现已定出抗盐基因位点并制成 DNA 序列图。从大豆中分离出来的热休克基因导入烟草中,该烟草在 42℃ 条件下基因表达,并起保护作用。

2.1.7 品质改良的植物基因工程 提高马铃薯淀粉含量 20%~40%,提高番茄蔗糖含量等方面均获得成功。把巴西豆种子硫基因导入烟草得到表达,又把大豆、菜豆贮藏蛋白基因转入马铃薯,培育出“肉土豆”,其蛋白质含量提高。从高蛋白的黑糯中提取 DNA 导入优质籼稻粘米品种中,获得含蛋白高达 13.75% 的品系等。采用反义 RNA 技术可随意延迟或减少某一特定基因的表达,从而可在时相上调节作物或果实的成熟,防止腐烂,有利于运输和贮藏。除此之外,把植物体做为生物反应器的研究十分活跃,干扰素在茺青中表达,抗体基因在烟草中表达,在马铃薯中产生人血清蛋白,在番茄、莴苣中表达甜蛋白 Monellin 等方面都有了很大进展。

2.1.8 提高产量的植物基因工程 美国和比利时的科学家相继从植物(如油菜等)的花粉中分离出了与花粉发育有关的基因启动子,将这种启动子与雄性不育基因或水解酶基因构建成嵌合基因,转入植物阻止花粉的产生,杀死所有花粉,从而获得了雄性不育植物。把含 barnase

基因的植株(雄性不育)与含 Barstar 基因的植株杂交,其后代都可遗传,又获得可育的植株。这项技术将应用于玉米、油菜、番茄和棉花中。要提高产量,对光合作用和固氮作用的遗传操作至关重要,近年来在固氮根瘤菌与豆科植物相互识别上做了许多工作,已搞清了固氮菌结瘤基因受植物分泌的类黄酮控制,结瘤基因协同活动可形成四糖衍生物,该衍生物发出信号,使植物根部长瘤。现已有人把 1~2 个 *nif* 基因转入向日葵、烟草和胡萝卜等植物细胞中,由于叶绿体放氧对固氮酶有害,使固氮能力只能稳定两小时左右,可见把固氮基因转入作物还有许多尚需解决的问题。为提高作物光合效率,迄今已在叶绿体基因组、Rubisco、PEP 羧化酶、光系统以及属于 $C_3 \sim C_4$ 中间类型的植物中开展了有关基因工程研究,然而,这些工作尚处在尝试阶段。

2.2 植物基因工程有待解决的问题

①植物基因结构及其表达与调控,基因表达的特异性与发育阶段的关系;②定位、分离有价值基因技术的改进;③许多栽培和野生植物对害虫、真菌、细菌、病毒和理化环境压力下表现出来的天然抵抗力及其天然抗性基因的鉴定;④植物病原菌与寄主的相互关系,植物抗病原菌和理化逆境的分子机理;⑤光合作用和生物固氮的分子生物学机理等。

3 植物细胞工程与植物改良

细胞工程不但可为基因工程提供理想的受体,而且与常规育种方法相结合,在新品种和新材料的创造、良种培育、种质保存等领域中,也能发挥重要作用。

3.1 植物细胞工程的概况

3.1.1 花药培养和单倍体育种 当今世界已有 200 多种植物的花药、小孢子和大孢子被培养成单倍体植株。如果再使这些单倍体植物染色体数目加倍就很容易得到纯合二倍体,而且是可育植株,它们在育种上很有价值。现利用此法育成了水稻、小麦、玉米、油菜、烟草中一些新栽培品种。

3.1.2 原生质体培养与体细胞杂交 我国已从水稻、小麦、玉米、谷子、大豆、高粱和棉花等原生质体培育出再生植株,在国际上居领先地位。通过体细胞杂交已经实现了种间、属间、科间的原生质体融合,在有性亲和和有性不亲和的亲本之间,已经育成了若干个体细胞杂种,我国最近创建了栽培大豆与野生大豆之间的体细胞杂种。尽管原生质体融合的精确性较基因操作差,但通过融合,可进行不对称体细胞杂交以实现部分基因组的转移或细胞质内遗传信息的转移,所以原生质体融合在作物改良中潜力较大。

3.1.3 试管受精与合子胚培养 试管受精已在有些远缘杂交中获得成功,如烟草×德氏烟草,玉米×墨西哥玉米等。如果遇到受精后障碍,可以进行合子胚培养或胚拯救,克服远缘杂交不实,此法也是大量无性繁殖远缘杂种的一种手段。迄今,通过栽培稻与多种野生稻杂交所得幼胚的离体培养,并结合 2~3 次回交,已分别获得了相应杂种材料及异源附加系。还可进行胚乳培养和三倍体育种,以使产生杂种优势或获得无子果实。

3.1.4 茎尖培养与植物脱毒 分生组织不含病毒或其效价很低。这种分生组织可通过微繁技术快速增殖,迄今,至少已在 65 个物种通过这一途径获得了无病毒植株。以无毒马铃薯植株取代被病毒侵染的母株之后,平均增产 30%~300%,这项技术的实用价值是相当可观的。

3.1.5 无性繁殖 植物生物工程最广泛并成功的应用,是利用分生组织培养实现快速大量无性繁殖,目前该技术也应用于水果、蔬菜、树木等植物的科研和生产。

3.1.6 体细胞无性系变异在作物改良中的应用潜力 无性变异是植物组织、细胞培养一种普遍现象,变异频率一般在百分之几到几十之间,明显高于自然突变频率($10^{-5} \sim 10^{-6}$)。体细胞无性系变异能够遗传,因而可以此作为植物育种新手段。现已在几十种作物改良中应用,并取

得可喜成果。在水稻组织细胞培养中,已获得一批包括形态性、抗逆性、抗病性及育性变异的体细胞无性系,如雄性不育材料、雌性不育个体、抗纹枯病变异体、大粒无性系等,此法还培育出早熟辣椒新品种和核 8 小麦新品种。

以生物工程获得的体细胞胚、减数分裂不稳定的基因型、远缘杂种、基因工程珍贵物种等种质要贮存和运输,可做人工种子或放入试管中贮存。生物技术在遗传资源保存方面的利用主要有冷冻保存(栽培植物茎尖浸入液氮而不致冻死)和低温贮藏(离体培养的种质存放在 1~9℃低温下,每年更换一次新鲜培养基可保存 6~9 年)。这种种质保存方法,节省空间、免受病原菌危害,保证遗传稳定性,有利于国际间资源交流。

3.2 植物细胞工程有待解决的问题

3.2.1 在花培育种中应首先解决单倍体愈伤组织诱导率和分化率不高的问题 因为花培育种通常通过培养 F_1 代植株花药得到的,因此只一次进行减数分裂交换,花粉植株中经常发生倍数性变异,产生多倍体和非整倍体等。

3.2.2 原生质体培养获得完整植株的再生率低、重复性差 在体细胞杂交中研究能够普遍应用的选择异核体方法,解决异核体再生植株和再生植株遗传性不稳定等问题。一般来说,由两个亲缘相近或无关亲本的完整基因组简单组合,很难得到有用并且可育的杂种,以不对称杂交来获得一些胞质杂种,对转移胞质雄性不育尤其有用。

3.2.3 体细胞分裂和分化过程中会发生突变 这种突变性在有性生殖时会被消除,不遗传给子代,然而这些突变细胞在组织培养时分裂增殖,外加选择性压力可以使突变细胞优先生长,建立起突变细胞系,可再生植株。这种方法只对单基因性状适用,但筛选抗各种逆境(如盐碱、干旱和霜冻等)的突变细胞系和与产量、生长相关的突变体还很困难,因为这些性状的影响因子都是多重而复杂的。因此必须深入研究体细胞无性系变异的机理。

3.2.4 茎尖培养与植物脱毒中,有些病毒容易通过茎尖培养而消除,有些则不然 如马铃薯 S 病毒(PVS)等。值得注意的是,所谓无病毒苗是相对的,在马铃薯已知的十几种病毒中,通过茎尖培养只能消除其中 4~5 种,应尽快解决病毒快速鉴定方法,否则脱毒是没有保障的。

另外,人工种子和无性繁殖最终能否应用于农业生产,还要取决于它的成本高低,这些技术自动化后会使生产成本降低,有利于广泛应用。

参 考 文 献

- 1 旭止. 遗传导入植物汇関する研究の現状と将来. 植物细胞工学, 1993(1)
- 2 三上哲夫. 细胞中雄性不稳定性与遗传子. 植物细胞工学, 1990(2)
- 3 山田康之. 有用物质的生产と产生制御. 植物细胞工学, 1990(1)
- 4 佐藤公行等. 光合成系の動的构筑. 植物细胞工学, 1990(3)