

外源 DNA 直接导入植物技术的研究及应用

刘德璞 袁 鹰

李大敬

(吉林省农科院大豆所,公主岭 136100) (双辽市农业广播学校,双辽 136400)

提 要 外源 DNA 直接导入植物的技术理论基础来源于国内广泛的远缘杂交科学实验活动,由生物化学家周光宇先生提出 DNA 片段杂交假说,根据假说,确立了通过花粉管通道导入外源 DNA 的技术。国内将此技术广泛应用于农业育种,从抗病、抗虫、抗盐、品质、光合效率等多个方面,在棉花、水稻、小麦、大豆、高粱、豇豆、白菜、茄子、黄瓜、烟草、油菜以及林木等 40 多种植物上获得理想育种效果,有 5 种作物培育出 14 个品种。并介绍了外源 DNA 导入技术的内涵和理论研究的几个方面。

关键词 DNA 导入;分子育种;花粉管通道;基因重组;作物育种新技术

外源 DNA 直接导入植物的技术研究开始于 70 年代中期。70 年代初,基因工程技术的出现,使从事生物化学和分子生物学的科技工作者很自然地提出了植物基因工程的课题。我国学者周光宇先生在对吉林省李贞生培育的玉米稻进行调查分析后,从分子遗传学角度,提出了 DNA 片段杂交的假说,随后与江苏农科院黄骏麒等在棉花上,和中国农科院陈善葆等在水稻上设计模拟了远缘杂交进行 DNA 导入植物的花粉管通道路线,确定了具体的外源 DNA 导入技术,开始了大田农作物育种应用工作。

1 外源 DNA 直接导入植物的技术

1.1 理论基础

我国从 50 年代开始广泛进行远缘杂交的科学实验,许多杂交后代表型表现为母本型的,只有少数性状发生变异。李贞生的玉米稻在光学显微镜下进行的染色体组型分析证明,染色体数目、形态等都与母本相同,但植株高大、穗大、耐旱、耐寒、高产,而且这些性状可以遗传。而高粱稻、甘蔗稻、芦苇稻等也都表现出类似的变异。如何解释这些结果和评价这些远缘杂交的实践工作? 理论界存在着激烈的学术之争,其焦点是算不算杂种。周光宇从分子生物学角度认为,这是 DNA 片段杂交的结果。虽然远缘亲本间的染色体结构从整体上说是不亲和的,但部分基因间的结构可能保持着一定的亲和性。当远缘花粉基因组进入受体后,被分解成片段,而大部分片段又被分解,只有极少数参与受体基因组,在子代中表现出典型和非典型的遗传变异。非典型变异可能是外源 DNA 加入了受体性状的基因表达调控,影响了基因表达的体系,使子代出现差异。由于是 DNA 片段的插入,所以在染色体水平是观察不到的,子代性状的变异是少数的,而大部分是受体的性状。这就是当时对远缘杂交变异现象的 DNA 片段杂交假说。这个假说成为开展 DNA 直接导入植物研究的理论依据。

1.2 花粉管通道技术

如何人为地将外源 DNA 直接导入植物? 经过一段探索之后, 主要集中于授粉受精过程的利用。1980 年 Hess 报道, 利用萌发的花粉吸收种内或种间 DNA, 导入矮牵牛中, 获得来自外源 DNA 的花色变异子代。Dewet 应用 Hess 的技术于玉米叶斑病抗性的转移。1986 年 Ohta 报道, 用外源 DNA 与玉米花粉授粉, 得到当代高频率的胚乳基因转移。周光宇设计了自花授粉后外源 DNA 导入植物的技术——花粉管通道技术, 即将供体总 DNA (不小于 $10^6 \sim 10^7$ 道尔顿) 片段, 在受体自花授粉后一定时期, 使其沿着花粉管的通道进入胚囊, 转化受精卵或其前后的细胞 (由于这时期的胚囊细胞壁不完整, DNA 容易渗入)。之后, 陆续与邵启全、张光程和黄骏麒在棉花上对导入方法确定了细节, 与段晓岚和陈善葆在水稻上确定了细则, 使棉花和水稻的导入效果达到了具有农业育种的实用程度, 转化成株率达 $10^{-1} \sim 10^{-2}$ 。继棉花、水稻、小麦之后, 刘德璞、雷勃钧也先后在大豆上确立了具体操作技术, 获得了变异后代。从 1988 年以后, 花粉管通道技术在多种植物上开始了研究和应用工作。

花粉管通道技术不仅在农业育种上得到育种工作者的青睐, 而且在最近几年也得到了基因工程工作者的关注。他们在采用了原生质体融合、基因枪、电激法等技术之后, 开始对花粉管通道技术有了兴趣, 并实际进行了重组基因的成功转移, 得到了高频率的转化结果。

1.3 外源 DNA 导入技术的发展

80 年代以来, 福建农学院陈应峰和朱秀英等应用浸渍培养导入外源 DNA 的方法, 成功地将小牛胸腺 DNA 导入水稻, 获得变异植株。湖南农学院万文举等用浸胚法将玉米 DNA 导入水稻, 培育出高产优质水稻新品系。山东农业大学于元杰等以外源 DNA 浸渍小麦种子和幼苗, 引起后代性状变异。北京大学生物系何笃修等利用干种子吸胀法, 将含有小鼠金属硫蛋白-1 (MT-1) 的 cDNA 重组分子导入酸浆, 获得的转基因酸浆, 对镉的耐受力较受体对照提高约 1 倍。经分析, MT-1 的 cDNA 已整合至受体的各个组织部位的细胞, 包括分生组织细胞, 并有表达。

把花粉管通道技术和 DNA 浸渍技术对比一下, 可将 DNA 导入技术分为两类: 根据受体细胞的不同, 分为以胚细胞为受体的和以生长点分生细胞为受体的外源 DNA 导入技术。前者是将外源 DNA 导入种胚发育成种子, 然后从种子长成转化植株; 而后者是用种子吸收 DNA, 种胚直接发育成植株, 可以在当代即表现出外源 DNA 导入的影响, 但影响的遗传结果要在结实以后。

2 外源 DNA 导入技术的应用——农业分子育种

分子育种是继自然选择、杂交育种、远缘杂交之后, 建立在 DNA 分子操作基础上的又一个新的育种途径。自国内用外源总 DNA 导入技术培育出抗枯萎病棉花和水稻新品系, 国外应用基因工程育出抗除草剂和抗虫烟草开始, 标志着农业分子育种已进入实施阶段。基因工程技术需要精良的设备和人员, 因而广泛应用还受到限制; 而外源总 DNA 导入的花粉管通道技术自创立以来, 已在国内 40 家以上的实验室进行了多种植物的广泛应用, 并获得了生产上推广的农作物品种和品系。江苏省农业科学院的黄骏麒等用耐黄矮病海岛棉 DNA 导入抗枯萎病陆地棉, 选育出既耐黄矮病又抗枯萎病的新品种 3118 棉, 大田增产 15%, 已大面积推广。广西省农科院季道远等将药用野生稻 DNA 导入栽培稻, 选育的糯稻精 D₁ 号, 耐旱、耐瘠、抗早衰、产量高, 也大面积推广。中国农科院陈善葆、段晓岚等以玉米、高粱、大米草、水稻等 DNA 导入水稻, 获得一批供体性状转移的后代, 有的可作为育种的新种质, 有的直接用于生产。据粗略统计, 已在棉花、水稻、小麦、高粱、大豆、豇豆、蚕豆、白菜、茄子、黄

瓜、烟草、油菜、马铃薯、甘蔗以及林木等 40 多种植物上用此技术育种获得了理想结果,已报道有 5 种作物培育出 14 个品种。

目前,利用外源 DNA 直接导入技术进行分子育种已扩展至各个方面:

①抗病

江苏农科院培育的 3118 棉。中国农科院成卓敏将大麦的抗黄矮病基因导入小麦得到抗黄矮病小麦。河北农科院阎新甫将抗白粉病的二棱大麦 DNA 导入小麦得到高抗白粉病小麦。笔者用抗 SMV 抗源材料 DNA 导入吉林 20、21 等得到抗 SMV 的大豆品系。

②抗虫

中国农科院和江苏农科院将苏云金农杆菌的毒蛋白基因用花粉管通道技术导入棉花,得到抗棉铃虫棉花。山东农业大学将罗布麻 DNA 导入陆地棉鲁棉 6 号,得到农艺性状优良又抗棉铃虫的 92-15 品系。笔者近年用皂角、鹰咀豆以及老的农家品种的 DNA 导入现推广品种吉林 30、吉林 27 和吉林 20,得到抗食心虫和耐蚜虫的品系。

③抗盐和抗逆境

海南大学林栖凤等将海边盐生的小乔木红树的总 DNA 导入普通豇豆得到耐盐的豇豆,与对照比,在 1.0% 的盐度下,耐盐后代完成了整个生活周期,而对照只活了 17 d。山东农业大学将罗布麻 DNA 导入陆地棉获得抗盐碱的 3 个新种质系,抗盐性比鲁棉 6 号提高近 2 倍。新疆石河子农学院生物技术中心,将新疆盐湖水中分离出的高耐盐细菌和重盐碱土中生长的耐盐植物碱毛草、芦苇的 DNA 导入小麦,得到耐盐小麦。黑龙江农科院以碱蓬草为供体,向水稻导入 DNA,得到耐盐比较强的水稻。

④品质

湖南溆浦农业科学研究所将无芥酸的油菜 DNA 导入含芥酸 45% 以上的油菜,得到芥酸含量降至 0.14% 的油菜,而且油酸提高 3 倍,亚油酸提高 0.5 倍。江西省农科院将豌豆 DNA 导入小麦,豌豆 50 kd 球蛋白得以表达。兰州大学和甘肃农科院合作进行高粱 DNA 导入小麦的研究,高粱的蛋白组分在小麦中出现。吉林省农科院和黑龙江农科院将高蛋白的野生大豆 DNA 导入栽培大豆,变异后代蛋白质含量比受体提高 4~6 个百分点。

⑤光合效率

湖南农业大学利用浸胚法将玉米 DNA 导入水稻,得到 GER-1 品系,通过对其进行生理生态研究,探明其光合效率高、物质生产源充足、库容量大、物资转运通畅、分配合理的高产形成内在机理,经初步分析,可能是改变了原亲本的光合碳化途径,即表现了 C₄ 功能。甘肃农科院通过导入高粱 DNA 至小麦得到一白粒新品系,叶功能期较受体延长 1 周,产量性状得到很大提高,淀粉含量明显提高。在 1991 年成熟期持续高温干旱,1992 年多雨低温的不利条件下,仍能保持子粒饱满,实现高产。据分析,可能是高粱 C₄ 功能导入 C₃ 小麦中得以表达,此结论正在深入地分子水平加以验证。

3 基础理论探讨

外源 DNA 直接导入植物的技术开展 20 余年来,取得了瞩目的成就,但也确实历尽艰难困苦。由于此项研究以实践和应用为先导,可用性使众多从事农业育种的人士致力于此技术的研究与实践,但在理论界却存在争论,特别是最初的岁月,否定的意见占主导地位,即便是现在也还是存在怀疑态度,将此技术称之为“模糊导入”,意思是理论上还是不明的。为此,从事此项研究的工作者们在应用研究的同时,也在努力从理论上进行深入的探讨。

3.1 有关花粉管通道

花粉管通道技术是外源 DNA 导入技术的最早的最成功的技术。外源 DNA 要导入植物,首先要解决途径问题,这个问题涉及的技术也是基因工程技术中的必要技术环节。花粉管通道技术的关键在于花粉管通道途径,这个途径如何形成与外源 DNA 如何通过此途径进入受体?中国科学院上海生化所与江苏农业科学院用缺口翻译法³H 标记棉花 DNA 分子(50 kb),于棉花自花授粉后 24 h 从子房颈部注入,经过 30 min 到 8 h 之间分别取样,冷冻切片,放射自显影,观察 DNA 运动过程。结果表明,30 min 后可见胚囊已有³H-DNA 进入,2~4 h 之间有 80% 以上的胚囊均有³H-DNA。除从珠孔到胚囊之间的花粉管通道外,珠心的任何其他部位均无显影斑点,进入胚囊的花粉管内亦无同位素。还观察到珠孔在花粉管到达之前是关闭的,花粉管长至胚珠时,珠孔开放。实验表明花粉管珠心通道是 DNA 从珠孔到达胚囊的途径。为了进一步证明此通道可作为转基因的通道,翁建等用 MP₁ 质粒与受体重复顺序重组导入棉胚中,取成熟种子 DNA 经 Sau3A 酶切,以 MP₁ 为探针,从 Southern Blot 分子杂交证明,MP₁ 整合进入了棉花基因组中,从分子水平验证了外源 DNA 导入的花粉管通道技术。

3.2 有关 DNA 重组

在水稻的试验上,中国科学院生化研究所与中国农科院作物所用有卡那霉素抗性基因并可在植物中能表达的质粒 PNE105 与受体的重复顺序重组后导入水稻,后代出现了比受体明显提高耐性的植株,并测出了卡那霉素磷酸转移酶活力和 Southern Blot 图片上的卡那霉素基因杂交带。在这个试验中,为了使重组分子在受体中更容易整合,在卡那霉素抗性基因重组分子的设计上分别插入了 5 种水稻重复顺序,组建不同的质粒导入受体水稻。结果所有带重复顺序的重组分子导入后,子代均不同程度地对卡那霉素具有抗性,其中 PRR23 重复顺序重组分子的种苗在卡那霉素培养基上生长完全正常。试验表现出具重复顺序的卡那霉素抗性基因的整合最强,说明受体同源顺序可以帮助重组分子基因的整合。

这个试验说明外源 DNA 只要具有与受体的同源性,就有与受体基因组整合的可能。而在生物进化过程中,相当多的重复顺序是很保守的,这种保守性为远缘供体 DNA 能插入受体基因组提供了机会。

对于应用供体总 DNA 导入获得的变异后代,想知道是什么 DNA(基因),如何与受体基因组整合,一直无法在分子水平验证。近几年,新的分子生物学技术——RAPD 技术的出现,为此提供了方便。黑龙江农科院已用此技术分析了通过外源 DNA 导入引起的大豆变异后代,找到了不存在于受体而存在于供体的 DNA 片段。RAPD 技术在外源 DNA 导入结果的分析上,不仅可追踪导入片段,更有意义的是有可能从供体 DNA 导入培育的优良品系中识别和分离出导入的有效外源 DNA,进而应用基因工程技术广泛组建有效重组分子,扩大基因工程育种的范围。可见,外源 DNA 直接导入植物的技术已开始和基因工程连接,必将使分子育种工作推向新的阶段。

参 考 文 献

- 1 周光宇·从生物化学的角度探讨远缘杂交的理论·中国农业科学,1978,2:16~20
- 2 周光宇,龚葵蓁等·远缘杂交的分子基础——DNA 片段杂交假设的一个论证·遗传学报,1979,6(4):405~413
- 3 周光宇·农业分子育种——授粉后外源 DNA 导入植物技术·中国农业科学,1988,21(3):1~6
- 4 龚葵蓁·授粉后外源 DNA 导入植物技术——DNA 通过花粉管通道进入胚囊·中国科学 B 辑,1988,6:611~614

- 5 段晓岚,陈善葆·外源 DNA 导入水稻引起性状变异·中国农业科学,1985,3:6~10
- 6 罗忠训等·克隆的玉米醇溶蛋白基因向水稻的成功转移·生物工程学报,1986,2(2):67
- 7 张福泉,万文举·胚培法导入外源 DNA 的试验初报,湖南农业科学,1991,3:20~22
- 8 阎新甫,刘文轩等·抗白粉病基因导入小麦获得突破·河南农业科学,1990,11:40
- 9 周文麟,倪健福等·外源 C₄ 作物 DNA 导入小麦的研究·中国遗传学会第四次代表大会暨学术讨论会论文摘要汇编,北京:中国科学出版社,1991,146~147
- 10 刘博林,岳绍先·龙葵阿特拉津抗性基因向大豆叶绿体基因组的转移及在转基因植株中的表达·中国科学 B 辑,1989,7:699~705
- 11 刘德璞·外源 DNA 导入大豆变异后代的 SOD 同工酶分析·大豆科学,1991,10(3):194~198
- 12 雷勃钧·外源野生大豆 DNA 导入栽培大豆引起的变异·中国油料,1989,3:11~13
- 13 刘德璞·导入外源 DNA 获得抗 SMV 大豆品系·大豆科学,1997,16(4):278~282
- 14 雷勃钧·导入外源总 DNA 获得优质高蛋白和双高大豆新品系·大豆科学,1995,14(3):203~207
- 15 黄骏·外源海岛棉 DNA 导致陆地棉性状的变异·遗传学报,1981,81(1):56~62
- 16 吴小月·多种外源 DNA 对陆地棉引变效果的研究·湖南农业科学,1984,4:4~7
- 17 许勇·外源 DNA 注射番茄子房后代性状的变异·园艺学报,1991,18(1):49~54

(责任编辑:张 瑛)

(上接第 13 页)

标准计算的,有一定科学性。从耗油看,以连耕区公顷耗油 60.75 kg 为 100%,耙茬区耗油为 36.75 kg(60.49%),留茬区耗油为 30.75 kg(50.61%)。从机耕费看,以连耕区公顷收费 81 元为 100%,耙茬区费用为 54.75 元(67.59%),留茬区费用为 47.25 元(58.33%),经济效益显著。

目前我省玉米产量为 7 500 kg/hm²,若按前述增产 4%~5% 计算,每公顷可增产 300~375 kg。我省黑土地地区玉米种植面积约 200 万 hm²,可增产 6~7.5 亿 kg。按每公斤玉米 0.6 元计算,农民可多获利 3.6~4.5 亿元。按每公顷节油 24~30 kg 计算,可节约油料 4.8~6 万 t。按每公顷节约机耕费 27~33 元计算,可节约机耕费 5 400~6 600 万元,还可节约农机具投入量 50%,提高农机具利用率 50%。社会经济效益十分显著。

3 小 结

耙茬少耕法与留茬少耕法经过 6~7 年试验,在黑土上有明显增产趋势。在河淤土上的增产效果虽不如黑土显著,其社会经济效益是十分明显的。

少耕法可节约大量能源和机耕费,减少农机具的投放量和提高利用率,社会经济效益十分显著。

少耕法的耕层较紧实、地温较高、水分较多,有利于作物生长。少耕法有促进土壤团粒结构形成和保持地力的作用,为我省农业持续发展提供了科学依据。少耕法的有效年限还有很大潜力,有关问题还待继续试验探讨。

(责任编辑:任 禾)