



农业分子育种研究进展

ADVANCES IN MOLECULAR BREEDING RESEARCH OF AGRICULTURE

周光宇 陈善葆 黄骏麒 主编



中国农业科技出版社

农业分子育种研究进展

Advances in Molecular Breeding
Research of Agriculture

周光宇 陈善葆 黄骏麒 主编

编 委 (按姓氏笔划排列)

朴亨茂 孙 寰 庞忠美 李道远
陈善葆 周光宇 邬信康 黄骏麒

中国农业科技出版社

(京)新登字 061 号

内 容 提 要

外源 DNA(基因)直接导入植物的技术及应用于育种研究在我国已开展 10 余年,并取得了显著成果。本文集论述和报道这一农业分子育种的兴起、技术的原理、方法与分子验证,以及在水稻、小麦、棉花、大豆等多种不同类型作物上表现的遗传变异与育种效果。本文集可供从事植物遗传育种和有关生物技术研究、教学工作人员阅读参考。

* * *

农业分子育种研究进展

主 编 周光宇 陈善葆 黄骏麒

责任编辑 刘晓松 庞忠美

技术设计 徐 毅

*

中国农业科技出版社出版(北京海淀区白石桥路 30 号)

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

北京理工大学印刷厂印制

开本: 787×1092 毫米 1/16 印张: 13.75 字数: 326 千字

1993 年 7 月第一版 1993 年 7 月第一次印刷

印数: 1—1300 册 定价: 12.00 元

ISBN7-80026-489-0/S·353

前 言

旨在培育作物新品种的农业分子育种,包括两个层次的生物工程技术,即外源DNA导入和基因工程技术。基因工程的基本技术环节是分离目的基因,构建重组分子,导入受体植物,筛选获得目的基因表达的后代。基因工程无疑可以实现人工控制分子定向育种的目的,但由于这一高技术的复杂性,需要有专门的技术人才、现代化设备和充足的经费,因此只能限于少数实验室进行,短期难以广泛实用。外源DNA导入植物技术,是将带有目的性状基因的供体总DNA片段导入植物,筛选获得目的性状的后代,培育新品种。应用这一层次的技术,不需要原生质体或细胞等离体组织培养和诱导再生植株,方法简便,易于育种工作者掌握和实践,可以在常规育种的基础上发展分子育种,并为高层次的基因工程技术提供基础。

外源DNA直接导入植物技术的设想,由周光宇教授1974年提出,中国科学院上海生物化学研究所、江苏省农业科学院经济作物研究所和中国农业科学院作物育种栽培研究所于1978年开始在棉花和水稻上进行研究,他们确定了导入技术的细节;成功地转移了不同来源的抗病和其它性状基因;获得广泛变异的后代并筛选品种;研究了导入后代的遗传变异;进行了导入技术的分子验证。1986年9月经中国科学院和农牧渔业部联合组织专家评议,认为这一技术为研究外源基因导入提供了一个良好的实验系统,为扩大植物的变异范围提供了一项新的技术,在育种上,这是一个有应用价值的新途径。1987年获得中国科学院科技进步二等奖,并于1989年获国家科技进步二等奖。

为了推广这一技术,曾于1986年4月在江苏南京举办外源DNA导入农作物技术介绍班。1988年5月在山东德州组织了第一届全国植物分子育种学术讨论会,有49个单位,100余人参加。1991年12月在上海召开了第二届分子育种讨论会,有近百个单位,180余人参加。此外,还多次在国际学术会上作了介绍。外源DNA导入植物技术及应用于育种研究,一开始就引起人们的关注,特别是受到农业育种工作者的重视,现已在我国广泛开展,据不完全统计,有16个省市近30个实验室应用于稻、麦、棉、大豆、花生、蔬菜等以及果木的基因转移研究,取得良好的育种效果,在技术上不断完善并有所发展。本文将汇集、展示这方面的进展,促进交流,以推进农业分子育种向深度与广度发展。

我国的工作在80年代初就引起国际上的关注,美、欧、亚洲的一些实验室引用这一技术于稻、麦、棉、豌豆、牧草等的基因重组分子和供体总DNA的导入研究,获有重复的结果。

在第二届分子育种会上,与会者热烈希望汇编一册论文集,我们受托承担了这一任务。由于经验不足和编委分散,未能集中对来稿的取舍、修改逐一进行研讨,因版面和印刷上的考虑,图表删略较多,都难免有不当和粗糙之处,望作者谅解。过去10余年,我国作者在国内刊物和国际会议上已发表100余篇,连同国外的文章,附印了文献目录,供查阅。

从国情出发,应用外源DNA导入植物技术开展基因工程的分子育种已有了良好的基础,今后还要不断完善与发展,并研究其机理及DNA(基因)导入后的整合、表达与遗传的鉴定分析,总结提高育种的经验和效果。希望这第一本文集对发展分子育种能有所帮助。

编 者

1992年10月

目 录

植物分子育种的兴起与展望	周光宇 (1)
农业分子育种——授粉后外源 DNA 导入植物的技术	周光宇 黄骏麒 陈善葆等 (13)
外源 DNA 直接导入水稻及在育种上的应用	
..... 陈善葆 段晓岚 阎长生 邢全党 张 艳 (19)	
野生稻 DNA 导入栽培稻的研究	李道远 陈成斌 周光宇 杨晚霞 龚慕慕 (25)
探索作物分子育种技术, 培育黑米稻	赖来展 王志坚 刘毅敏 许秀珍 (31)
菰 (<i>Zizania L.</i>) DNA 导入水稻引起的性状变异	
..... 富威力 王晓丽 顾德峰 高春福 崔秋华 马景勇 郭信康 朴亨茂 赵粉善 (35)	
外源 DNA 直接导入水稻的研究报告	陈启锋 陈 璋 李慧强 林学健 卢 勤 (39)
外源 DNA 导入水稻的方法及性状变异研究	徐庆国 伏 军 罗 弘 洪亚辉 (47)
水稻孕穗期茎注射法导入外源 DNA 引起的性状变异	
..... 黄兴奇 宋令荣 陈 利 杜 彬 李成云 蒋志农 (53)	
水稻与菰属间性状转移研究初报	
..... 朴亨茂 赵粉善 赵基洪 郭信康 崔秋华 全顺子 (61)	
抗白粉病大麦 DNA 导入普通小麦的研究	
..... 阎新甫 刘文轩 王胜军 王西成 王锡锋 (69)	
偃麦草 DNA 导入小麦的研究	
..... 倪建福 周文麟 仲乃琴 胡 钺 王亚雄 陈克明 崔凯荣 (76)	
小麦花粉管途径导入外源 DNA 的初探	刘金元 柳 青 (81)
芦苇 DNA 导入小麦及其性状变异	
..... 刘志生 于复生 袁海涛 周光宇 龚慕慕 杨晚霞 (84)	
玉米 DNA 导入小麦后引起白化突变体的质体超微结构的研究	
..... 王亚雄 崔凯荣 陈克明 周文麟 倪建福 (86)	
小麦 DNA 导入及转化的初步研究	孔 青 徐乃瑜 林 琼 (92)
玉米 DNA 处理二棱大麦的初步研究	李慧强 陈启锋 (96)
牛胸腺 DNA 处理普通小麦 (<i>T. aestivum</i>) 出现重演性变异的研究	
..... 于元杰 尹承价 杨欣同 程 立 张德水 (102)	
外源海岛棉 DNA 导致陆地棉性状的变异	
..... 黄骏麒 钱思颖 刘桂玲 翁 坚 曾以中 周光宇 (107)	
棉花分子育种研究	倪万潮 黄骏麒 陈 松 张震林 徐英俊 周宝良 钱思颖 (114)
罗布麻 DNA 导入陆地棉引起性状变异的研究	
..... 于元杰 尹承价 杨欣同 沈法富 程 立 (119)	
外源 DNA 导入技术在棉种改良中的应用研究	吴小月 (125)

异种外源 DNA 导入棉花胚囊技术的验证	张恒悦	于元杰	彭卫东	(129)
外源 DNA 导入栽培大豆研究	刘德璞	袁 鹰	孙 寰	(134)
外源 DNA 直接导入大豆的研究				
..... 雷勃钧 尹光初 卢翠华 钱 华 周思君 张开旺 李希臣 王树林				(142)
花生 DNA 导入大豆的研究				
..... 黄承彦 顾廷进 战明奎 赵径荣 栗翼玟 周同度 赵双宜				(147)
花生 DNA 导入栽培大豆的研究初报 ...	王丕武	许守民	张晓玲	宋 惠 邬信康 (150)
花生野生种 DNA 导入栽培种引起性状变异的研究	申毓玉	王传堂		(154)
油桐 (<i>Aleurites fordii</i>) 分子育种初报	花锁龙	杨晚霞	谢伟军	龚蓁蓁 (157)
通过干种子在 DNA 溶液中吸胀以获得转基因酸浆植株 ...	何笃修	罗建沅	李懋学	(164)
马铃薯 X 病毒外壳蛋白基因的克隆和遗传转化的研究				
..... 吕玉平 王福钧 毛炎麟 周长久 方荣祥 莽克强				(171)
PCR 法研究慈姑蛋白酶抑制剂 A、B 的部分基因结构				
..... 许文峰 龚蓁蓁 杨晚霞 戚正武				(179)
青菜-大蒜杂种及其亲本中 RuBp 羧化酶等电聚焦和交叉免疫电泳比较分析				
..... 应燕如 孙雪英 柴常呈 陆妙康				(185)
植物材料 DNA 的提取及纯化	刘镛山	陈翼伯	杨世民 李万安 王西瑶	(190)

简 报

直接导入外源 DNA 转移水稻白叶枯病抗性				
陈善葆 段晓岚 章 琦 阎长生 邢全党 张 艳 龚蓁蓁 杨晚霞 吴文土				(194)
小麦不同品种 DNA 导入后代性状变异研究				
..... 于元杰 尹承伦 杨欣同 张德水 程 立				(195)
外源 DNA 导入陆地棉引起性状变异	李传林	侯振泉		(197)
外源 DNA 导入黄瓜引起的性状变异初报	邓立平	郭亚华	杨晓晖	(198)
DNA 浸泡法分子育种原理的探讨	周光宇	陶全洲		(199)
外源基因直接导入植物研究概况——已发表文献汇集	阎新甫			(200)

CONTENTS

The Rise up and Prospective View of Plant Molecular Breeding	Zhou Guangyu (1)
Molecular Breeding of Agriculture — A Technique for Introducing Exogenous DNA into Plants After Self Pollination	Zhou Guangyu et al. (13)
Introduction of Exogenous DNA Directly into Rice and Its Application in Breeding	Chen Shanbao et al. (19)
A Study on the Introducing Exogenous Wild Rice DNA into Rice Cultivars	Li Daoyuan et al. (25)
Breeding Higher Content of Protein Black Rice Using the DNA Molecular Techniques	Lai Laizhan et al. (31)
Variation in the Characters of Rice (<i>O. Sativa</i>) Induced by Introduction DNA of Wild Rice (<i>Zizania</i>)	Fu Weili et al. (35)
Studies on Direct Foreign DNA Introduction into Rice	Chen Qifeng et al. (39)
Study on Method and Variation of Characters of Exogenous DNA Introducing into Rice ...	Xu Qingguo et al. (47)
Variant Rice Plants Obtained by Injecting Exogenous DNA into Stem of Them in Boot Stage	Huang Xingqi et al. (53)
Studies on the Intergeneric Gene Transfer Between Rice and Wild Rice (<i>Zizania</i> L.)	Piao Hengmao et al. (61)
Study on Introducing Powdery Mildew Resistance Gene of Distant Plant into Common Wheat Cultivar	Yan Xinfu et al. (69)
The Studies of DNA Introducing from Quackgrass into Wheat	Ni Jianfu et al. (76)
Primary Study on the Introducing of Wheat Via the Pollen - tube pathway	Liu Jinyuan et al. (81)
Variation of the Characters in Wheat Introduced Exogenous DNA	Liu Zhisheng et al. (84)
Ultrastructural Studies of Plastids of Albino Mutant of Wheat Introduced Exogenous DNA of Corn	Wang Yafu et al. (86)
Preliminary Study on the Introduction and Transformation of Exogenous DNA of Wheat	Kong Qing et al. (92)
Primary Studies on Maize DNA Treatment on Two - row Barley	Ji Huiqiang et al. (96)
Studies on Recapitulation of Variations Caused by Introducing Thymus DNA of Calf into Wheat (<i>T. aestivum</i>)	Yu Yuanjie et al. (102)
Variations in the Characters of Upland Cotton (<i>Gossypium hirsutum</i>) Induced by	

Exogenous DNA of Sea - island Cotton (<i>Gossypium barbadense</i>)	Huang Junqi et al. (107)
Study on Cotton Molecular Breeding	Ni Wanchao et al. (114)
Variation of the Characters in Upland Cotton (<i>G. hirsutum</i>) after Introduction by Dogbane DNA	Yu Yuanjie et al. (119)
Applied Studies of the Technique for Introducing Exogenous DNA on Cotton Varieties Improvement	Wu Xiao yue (125)
Verification of the Method of Introducing Exogenous DNA from Other Families into the Embryo Sac in Upland Cotton (<i>G. hirsutum</i>)	Zhang Hengyue et al. (129)
A Study on Exogenous DNA Introduction into Cultivarted Soybean	Liu Depu et al. (134)
Studies on Introducing Directly Exogenous DNA into Soybean	Lei Bojun et al. (142)
Study on Introducing Peanut DNA into Soybean	Huang Chengyan et al. (147)
The Preliminary Report of Study on the Exogenous DNA of Peanut Introduction into Soybean (<i>Glycine max</i>)	Wang Peiwu et al. (150)
Study on Variation in the Characters of Cultivated Peanut Induced by Introducing DNA of Wild <i>Arachis</i> Species	Shen Fuyu et al. (154)
Preliminary Report on Molecular Breeding of <i>Aleurites Fordii</i>	Hua Suolong et al. (157)
Transgenic Groundcherry Plants Obtained by Dry Seeds Imbibition in DNA Solution	He Duxiu et al. (164)
The Cloning of Potato Virus X Coat Protein Gene and Genetic Transformation	Lü Yuping et al. (171)
Study on Partial Genomic Structure of Arrowhead Proteinase Inhibitor A and B by the PCR Method	Xu Wenfeng et al. (179)
Comparative Analysis by Electrofocusing and Cross Immunoelectrophoresis for RuBpCase Between Chinese Cabbage - Chinese Gralic Hybrids and Their Parent Plants	Ying Yanru et al. (185)
The Extraction and Purification of DNA from Plants	Liu Rongshan et al. (190)
Transfer of Bacterial Blight Resistance by Exogenous DNA Introduced Directly into Rice	Chen Shanbao et al. (194)
Studies on Variation of Characters Induced by Introducing DNAs from Different Varieties of Wheat into Receptors (Wheat)	Yu Yuanjie et al. (195)
Variation in the Characters of Upland Cotton Induced by Exogenous DNA	Li Chuanlin et al. (197)
Preliminary Report on Character Variation Induced by Exogenous DNA into Cucumber ...	Deng Liping et al. (198)

A Theoretical Approach to DNA Penetration Method for Plant Molecular Breeding	
.....	Zhou Guangyu Tao Quangzhou (199)
Brief of Study on Introducing Exogenous DNA into Plant — Information	
Compilation Published	Yan Xinfu (200)

植物分子育种的兴起与展望

周光宇

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

The Rise up and Prospective View of Plant Molecular Breeding

Zhou Guangyu

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai, 200031)

植物分子育种工作经历了 18 个春秋, 取得了很大的进展, 技术日臻完善, 在应用过程中取得了丰硕的成果。

植物分子育种在我国的兴起是两种因素促成的。一是 60 年代初, 我国三年自然灾害, 促使各行各业的科研人员认真思索, 深刻地理解了农业是我国国民经济的基础; 二是 70 年代基因工程的出现。作为一个生物化学和分子生物学工作者, 很自然地提出了植物基因工程的研究课题, 决心探索农业分子育种的道路。从构思、兴起, 到第二届全国植物分子育种学术讨论会 (1992. 12. 24~26) 的召开, 经历了一个长期的艰苦发展过程。

18 年前, 出现在文献中的基因工程, 是以微生物为材料作为一个划时代的成就报道的。当时的技术只是初步, 以高等生物为材料的研究尚未开始, 要在国内开展基因工程研究是一个很大的难题。为此, 笔者走向农业育种实际进行调查, 请教许多遗传育种专家和实践工作者。特别是从中国科学院植物研究所孙敬三先生处获知中国科学院组织了有关专家学者讨论吉林农民李贞生培育的玉米稻, 又一次引起了不同学术观点之争。笔者从分子遗传学的角度来看, 认为实际培育出来的玉米稻类远缘杂交种是 DNA 片段杂交的结果, 从而提出 DNA 片段杂交假说, 并模拟远缘杂交进行外源 DNA (基因) 导入植物的花粉管通道路线, 与农学专家黄骏麒、钱思颖和陈善葆、段晓岚在棉花和水稻方面研究确立了具体的分子育种技术, 成功地打开了大田的育种工作。

通过广大农业育种工作者的共同努力, 在棉花、水稻、小麦、大豆等作物上进行了广泛的应用, 获得许多变异的后代, 从中培育出一批新品种 (系), 正在生产上推广种植。在技术上, 除花粉管通道方法外, 还发展了外源 DNA 浸泡种子或幼苗的方法、孕穗期茎注射法等, 实践证明都是行之有效的。这样, 在技术上就形成了百花齐放, 为农业分子育种开拓了更广阔的前景。

第二届全国植物分子育种学术讨论会的召开, 是分子育种工作的一个重要的里程碑。因此, 在此时回顾过去, 总结经验, 展望未来, 对加快分子育种的发展进程, 是很有必要的。

外源 DNA (基因) 导入植物技术的理论基础 ——DNA 片段杂交假说的提出

我国从 50 年代开始广泛进行远缘杂交实验, 许多的杂交后代表型基本上是母本的, 只有少数性状发生特殊变异。前面提到的李贞生的玉米稻, 事实上还是水稻。在光学显微镜下进行的染色体组型分析, 发现染色体的数目、形态等均与母本相同, 但植株高、穗大、耐旱、耐寒和产量较高的性状可以遗传, 说明这些性状变异是由于受玉米遗传影响而产生的。其它如高粱稻、甘蔗稻、芦苇稻等许多以水稻为母本的远缘杂交, 也都出现了某些性状变异, 这类实验是育种工作者在自然条件下进行的工作。分子生物学虽已发展到基因工程的时代, 但遗传育种界还存在着强烈的学派之争, 一些人认为, 在光学显微镜下没有看到染色体的变化, 不能称之为杂交的后代; 还有说, 玉米稻不长出玉米棒就不算是真正的杂种。而实践工作者以田间实验为主, 坚持后代的变异是自己杂交实验的结果。笔者从分子生物学的角度认为这种远缘杂交现象应是 DNA 片段杂交的结果。由于远缘亲本间的染色体结构从整体上说是不能亲和的, 但从进化的角度来看, 部分基因间的结构有可能保持一定的亲和性。当远缘花粉的基因组进入母本 (受体) 后, 被分解成片段, 大部分片段被受体分解, 侥幸保存下来的某些 DNA 片段有可能被整合进入受体染色体, 而在子代中表达典型的或更多的是非典型的遗传变异。后者可能是外源 DNA 片段加入了受体性状基因表达的调控或数量遗传, 影响了多基因表达体系的结果, 而使子代出现差异。由于插入的片段很小, 所以在光学显微镜下可能看不到因片段杂交引起的染色体形态结构上的差异。由此, 引起子代的性状差异也只能是少数的, 大部分仍是受体的性状。因此, 笔者对这类的远缘杂交提出了 DNA 片段杂交假说。由于基因工程亦即使 DNA 片段 (基因) 杂交整合, 研究这一假说就成了当时可能开展 DNA (基因) 导入植物的理论依据。

DNA 片段杂交假说的分子验证

1979 年笔者与龚葵葵等发表了高粱稻 (祖德明、陈善葆等培育, 下同) 及其亲本的酯酶同工酶分析, 发现高粱稻中有一条来自高粱的酶带, 因而为 DNA 片段杂交假设提供了一个间接的证明。1980 年与曾以申等分析高粱稻基因组, 应用“父本”高粱 DNA 预先与“母本”水稻 DNA 分子杂交, 除去高粱与水稻的同源顺序, 然后利用已去除和水稻同源的高粱 DNA 为探针, 与高粱稻 DNA 进行分子杂交, 发现仍然存在高粱同源顺序, 表明高粱的部分 DNA 确实存在于已稳定的高粱稻中。沈建华进行的水稻、高粱、高粱稻重复顺序 DNA 复性动力学分析, 发现高粱稻基因组在中度重复顺序部分, 与“母本”水稻相比发生了变化, 这一结果应是在杂交后, 远缘亲本高粱 DNA 片段插入了“母本”水稻基因组内造成的。

以上结果都说明远缘杂交获得的子代, 确有 DNA 片段杂交现象的存在, 至少在重复顺序方面得以证明。以后应用纯化的 DNA 片段导入稻、麦、棉等植物中得到相似变异的结果, 更直接地证明了 DNA 片段杂交的假说。

外源 DNA 导入植物的技术

一、花粉管通道技术

为了验证远缘杂交中的 DNA 片段杂交假说,并由此探索外源 DNA 育种的途径,1974 年提出了模拟授粉杂交的育种技术,以 DNA 片段代替花粉进行杂交。当时有一个问题,即如果远缘杂交表现 DNA 片段杂交,并非精卵结合,那么如何能产生具有双倍染色体的后代?笔者设想,除了孤雌生殖染色体自我加倍以外,更重要的可能是去雄不彻底造成的。调查中发现,育种工作者在田间进行远缘杂交时,很难保证百分之百的去雄,由于去雄不彻底,受体就会通过自花授粉而结实。有的远缘花粉不能长出花粉管而在柱头上破裂,释放的花粉内容物可以沿着花粉管通道而进入胚囊;有的远缘花粉可以在柱头上萌发,将精核带入胚囊,但由于不能精卵结合而被分解,幸存的 DNA 片段被整合到受体的基因组中去。由此,设计了自花授粉后外源 DNA 导入植物技术,即花粉管通道技术。

植物授粉后,花粉在柱头上萌发形成花粉管,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。以棉花为例,胚珠在授粉之前,珠心是一个封闭的体系,在花粉管到达之前,从珠孔到胚囊的一些珠心细胞退化形成一条便于花粉管生长的通道。我们就利用这条花粉管通道,使外源 DNA 进入胚囊,转化受精卵或其前后的细胞(卵、早期胚细胞),而自然发育成种子,观察后代的变异。这就是花粉管通道导入外源 DNA 的技术。但这一方法也有一定的局限性,对于如棉花多胚珠的大子房是很适用的,注射 DNA 时损伤较小,并且处理一朵花可以获得较多的 DNA 转化的种子。而对于水稻等单胚珠小颖花,每处理一朵花只能得到一粒种子,工作量大,且子房小,注射子房或剪去柱头,影响结实率,特别在低纬度地区气温高,影响导入效果。

二、花粉管通道技术的分子验证

中国科学院上海生化所与江苏省农业科学院经作所应用缺口翻译法³H 标记棉花 DNA 分子(50Kb),于棉花自花授粉后 24 小时从子房顶部注入,经过 30 分钟到 8 小时之间分别取样,冷冻切片,放射自显影,可以观察到 30 分钟后胚囊内已有³H-DNA 进入,2~4 小时之间 80%以上的胚囊均有³H-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影斑点,进入胚囊的花粉管内亦无同位素。实验表明了花粉管珠心通道是外源 DNA 从珠孔到达胚囊内的唯一途径。

翁坚等用 MP₇ 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 MP₇ 为探针,从 Southern Blot 分子杂交证明 MP₇ 整合进入了棉基因组中,进一步从分子水平上验证了外源 DNA 导入技术。

中国科学院上海生化所与中国农业科学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(重复顺序)重组后导入棉花与水稻,从筛选的子代中均出现了卡那霉素耐性明显高于受体的植株,并在这些基因转化的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。在水稻的实验中,为了使重组分子在受体中更容易整合,对卡那霉素重组分子的设计分别插入了 5 种水稻重复顺

序, 组建不同的质粒 (PRR) 导入受体水稻。结果表明, 所有带有水稻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, 其中导入 PRR23 重复顺序重组分子的种苗, 在卡那霉素培养基中生长完全正常, 分子杂交亦表现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。

上述工作是用已知基因重组分子导入植物后的分子验证, 其结果只能说明外源 DNA (基因) 导入技术的可行性。至于应用供体总 DNA 进行的分子育种, 如想查明是什么 DNA (基因) 得到受体整合遗传, 这是另一个性质的验证问题。在当前没有导入的 DNA (基因) 的探针, 就无法进行这些 DNA (基因) 的分子杂交验证, 只能根据子代的性状或基因产物的差异予以判断。DNA 结构很复杂, 除结构基因外, 还有调控基因、重复顺序 DNA, 这些 DNA 进入受体都可能产生一些影响。并且 DNA 片段进入受体, 它的整合是随机的, 在细胞内大部分 DNA 可能被分解, 只有少数片段被整合, 整合的 DNA 还必需是和受体 DNA 在结构、功能上有一定的亲和性。当用总 DNA 导入后, 受体的性状得到改变, 并能遗传, 就可以说明外源 DNA 进去了。

导入技术可行性的分子验证一经证明, 就不需要每一应用同一技术的工作都去做同样的验证, 何况这种验证需要较多的人力、时间和经费才能完成。有不少实验室迫切地要求帮助进行他们工作的分子验证, 说没有分子验证, 论文难于发表。这似乎是对当前科学的进展期望过高过早, 因为科学本身尚未发展到可以随意识别、分离指定基因的阶段。正如针麻早是事实, 但其分子机理要后人不断地努力去阐明。人体和水稻等的基因组结构分析, 国际上正在着手进行, 如果现在要求进行供体总 DNA 导入的未知基因的识别, 那为时还早。如果科学上已经能够做得到, 那么国际上植物基因工程已开始了十几年, 为什么进展却如此之缓慢? 农业生产上有用基因的识别分离仍是一个卡口。

三、外源 DNA 导入技术的发展

外源 DNA 导入技术可以分为两大类, 一类是以分离培养的细胞为受体, 导入 DNA 后再生成植株; 另一类是以整体植株体内的细胞为受体, 直接得到 DNA 转化的种子。后者比前者直接简单, 育种者能轻车熟路地开展分子育种, 可直接以作物的植株在田间进行导入和选育新品种, 因此易于在全国推广应用。

以整体植物细胞为受体的导入技术, 是以已表现分子育种效果的田间技术为主, 又可以分为两种, 一是以种胚细胞为受体, 另一种是以生长点细胞为受体。前者包括授粉前、后的卵细胞及不同发育时期的种胚细胞为受体的技术, 实际发展的技术有幼穗茎 DNA 注射法、授粉后花粉管通道技术、幼胚注射法, 都是将外源 DNA 导入种胚细胞发育成种子, 然后从种子成长为 DNA 转化植株。如果应用 DNA 溶液浸泡成熟的种子, 种胚发育成植株, 有可能在当代植株上即表达外源 DNA 导入的影响, 但影响的遗传结果将在结实之后。看来外源 DNA 的遗传应是保留在种子发芽的顶端生长点细胞中, 因而能分化进入当代的种胚细胞中。这一保留外源 DNA 的途径, 对一些采用 DNA 浸泡幼苗法有异曲同工之处。后者, DNA 从根吸收进入茎端生长点细胞, 其结果与种子浸泡法相似, 可以得到 DNA 转化后的种子。有人指责目前发展的各种行之有效的转移 DNA 技术荒唐而不可思议, 但是实践出真知, 种胚细胞和顶端生长点细胞是不需要人工培养的全能发育细胞。

植物分子育种的现状

分子育种技术创立以来,已在国内 30 家以上的实验室进行了广泛的应用,美、欧、亚洲少数实验室也开始应用这一技术于稻、麦、棉、豌豆、牧草等的基因重组分子和供体总 DNA 的导入研究,有的获得了有益的变异后代。江苏省农业科学院经作所黄骏麒等用耐黄萎病的海岛棉 DNA 导入抗枯萎病陆地棉,选育出的耐黄抗枯新品种 3118 棉,已在长江中下游累计种植 8 万余亩,大田增产可达 15%。他们还将苘麻 DNA 导入海岛棉,得到高产长绒棉。湘棉 12 号是湖南农学院吴小月等用中棉 DNA 导入陆地棉培育的新品种,已通过鉴定,在省内外试种 6 万余亩。广西省农业科学院品种资源所李道远等将药用野生稻 DNA 导入栽培稻,选育的糯稻桂 D1 号,耐旱、耐瘠、抗早衰、产量高,已大面积推广,并获省科技进步二等奖。中国农业科学院作物所陈善葆、段晓岚等以玉米、高粱、大米草、水稻等 DNA 导入水稻,获得一批供体性状基因转移的后代,经鉴定筛选,有的作为育种的新种质,有的直接投入生产种植。湖南农学院万文举等应用浸胚法进行玉米 DNA 导入,获得大量的变异后代,从中选育出高产新品系 GER-1。小麦方面已有 4 家实验室成功地转移了白粉病抗性基因,如河南省农科院小麦所阎新甫等抗白粉病的二棱大麦 DNA 通过花粉管通道导入小麦感病品种,后代中出现了高抗的变异株。大豆已有 6 家实验室获得变异植株和有益基因的转移。

分子育种技术已于 1986 年经中国科学院和农牧渔业部联合组织专家评议,认为是一有应用价值的育种途径。并于 1987 年和 1989 年先后获得中国科学院和国家科委颁发的科技进步二等奖。1991 年被列为“七五”国家科技任务重大成果汇报展览,笔者获得中国科学院“七五”重大科研任务先进工作者证书。全国许多省市也在积极开展这方面工作,说明我国自己设计的植物分子育种技术已进入了实际应用阶段。

植物分子育种的展望

第二届全国植物分子育种学术讨论会的召开,标志着分子育种已进入发展的第二阶段。我国的植物基因工程,经过“六五”和“七五”的努力,有些课题已逐步进入应用实验的阶段。这次会议有研究两种技术的人员参加,尽管进行总 DNA 导入的占多数,但也有比以往更多的从事基因工程的研究者参加,标志着两种技术将更好地结合,共同发展分子育种。如今总 DNA 导入这个概念已经得到广大育种工作者的认识和采用,但仍存在一个问题,即 DNA 进去后,到底是什么和多少 DNA(基因)在起作用?我们目前对它们的识别和分离都还没有进行,也不可能进行。前已论及,用已知的标记基因对外源 DNA 导入花粉管通道技术的验证,但还不能对应用供体总 DNA 导入植物进行验证,因为科学的发展还达不到这一步,这不是具体做分子育种工作者的问题,而是目前分子生物学进展中尚未做到的问题。反之,植物基因工程文献上能够做到的,我们也能做到。我们是农业大国,农业科研的积极性比发达国家高,现在有些课题就是我国科学家提出来的,如抗旱、蛋白酶抑制剂、抗病等,都是立足在自己的课题上进行科研的。无论国内,还是国外,植物基因工程的难点都在于对农业有益基因的识别与分离。不认识基因,怎样分离?以致形成了植物基因工程发展的一个卡口。目前分离的可用于农业的基因,主要是来源于微生物,真正来源于植物的还是极少数。如果能利用分子生

生物学和基因工程的理论和技术的进展,来探索总 DNA 导入后代的基因识别和分离,也许比单纯的从作为基因源的植物中识别分离更有可能,因为它有供体、受体和子代,子代和受体的差别就是供体组合进来的极少数的 DNA 或基因。所以通过三个材料就比单纯的从一个材料中去识别和分离基因可能容易些。如果能将进行两种技术的科研人员结合起来进行分子育种,就可以相辅相成,互相提高。

这次不少从事分子生物学、基因工程和农业遗传育种等方面的专家聚会,应是总结过去十几年来发展分子育种的新阶段,展示和进入分子育种的第二阶段,就是要把这两方面的人才更多更好地结合起来,使大家认识到这种结合的必要性和可能性。这个设想很早就有,只是时候未到,这是由于分子育种发展过程中,植物基因工程发展较难较慢的原因。现在时机已经成熟。

要把分子技术、基因工程技术引入到目前用总 DNA 分子育种成果的验证、人才的培养上去,就需要一个实验室,需要较多仪器和进行分子工作的人员参加。因此笔者认为,在我国当前的形势下,根据国情需要建立一个分子育种的支撑实验室,以发展分子技术为主,支撑农业分子育种,其主要目标是把分子技术、理论和总 DNA 的技术成果结合起来,进行分子育种研究和分子验证,以及阐明哪些基因可以获得农业上更好的效益。譬如,获得了稳定的有经济价值的后代后,可以研究清楚它们的机理,进行外源导入的 DNA 或基因的识别和分离,以便更好地扩散到其它植物的基因工程导入。所以,这样的支撑实验室是一条可能在较短时期内帮助我国走向分子育种更好结合的道路。

中国生化学会(分子生物学)已同意分子育种工作者加入该学会,这对分子育种发展的第二阶段,将分子学科技术与农业育种的理论与技术更好更紧密地结合,促进共同发展,是很有必要的,通过学会可以更好地和国内外交流,使我国的分子育种工作能不断地立于新的前沿。

为了使读者更清楚地了解分子育种的发展过程,文后特附笔者早先发表的两篇短文和有关文献目录,供参阅。

附录 I

也谈玉米稻^{*}

Join Also the Discussion of Maize-rice

自从李贞生同志培育成功玉米稻以来,引起了人们的广泛兴趣、重视和讨论。

玉米稻和母本长丰水稻相比,有明显的变异,它秆高、穗大、粒大、抗旱、抗寒。从杂交第一代选育出来以后,这些性状已稳定地保持了十余代。但是玉米稻看上去仍然是水稻,没有玉米的外观特性。它的染色体在光学显微镜下也和水稻相同。因此有人认为它不可能是杂交种,它的变异只能是自发的或来源于母本不纯,根本与玉米无关。可是上海青浦县徐行公社用不同品种和不同去雄条件进行玉米和水稻的杂交,后代疯狂分离,极不稳定。这是远缘杂交中常见的现象。说明远缘的遗传物质是进入母本了。可是就是这样的后代,

* 本文系作者 1974 年调查远缘杂交之后,提出 DNA 片段杂交,开展分子育种的首篇文章,因当时出现强烈的不同意见,延至 1977 年发表于《遗传与育种》第 5 期,现重印供参阅。

外观也是水稻,同样看不见玉米的外观性状。以后李贞生同志的重复试验和其他玉米与水稻的杂交结果也大体如此。因此玉米稻的杂交性质是一个值得深入探讨的问题。

经典的遗传学认为,只有精卵结合或染色体加倍才算远缘杂交。这样的杂交后代为中间型或有明显的双亲外观性状。不过,从大量的农业科学研究单位和贫下中农进行的粮食作物的远缘杂交成果,以及近代分子生物学的观点来看,非同源精卵结合即部分遗传物质的远缘杂交应是大量的。因此象玉米稻这样的杂交种的出现,不是不可能的。我们可以从远缘间遗传分子DNA的整体排斥性和局部亲和性加以说明。

生物的种类不同,各自的遗传信息不同,DNA分子也不相同。生物的差异愈大,DNA分子的大小、一级结构和高级结构包括染色体的结构、数目和形状的差异也愈大。这样即使能克服远缘间整体的和细胞的杂交障碍,也往往会遭遇到整体DNA分子差异性的排斥而使它们达不到精卵结合。特别是DNA分子所携带的遗传信息,表现为代谢及其调节控制功能,那末大多数的远缘杂交更难使精卵协调,共处在同一个细胞内。因此就广泛的远缘生物来说,能够达到精卵结合或染色体加倍的杂交只能是少数。

但是整体DNA分子间的不亲和性不等于局部分子无亲和性。遗传的功能单位即基因,它是DNA分子上一段核苷酸排列顺序。一般讲来,从细菌到高等生物的核DNA的分子量是 10^6-10^{12} 道尔顿。上面可以排列成千上万或更多的基因。这些基因储存的是些什么样的遗传信息呢?我们知道,生命物质和生物活动都是通过代谢产生的。代谢是由酶来催化的,酶的本质是蛋白质。这就不难理解基因所储存的大部分遗传信息都是与蛋白质的生物合成有关的。它包括蛋白质的结构,合成蛋白质所需要的RNA分子的结构,以及调节控制蛋白质合成的信息。生物尽管千变万化,但同出于一源,它们都是在遗传保守的基础上变异进化而来的。因此,从不同生物体中可以找到结构极为相似的蛋白质。例如染色体上的组蛋白,从豌豆的到牛的差异只有2个氨基酸。生物的基础代谢如糖酵解,能量代谢以及生物大小分子的合成与分解代谢等,从细菌到人基本上是相同的。因为代谢相同,催化代谢的酶就有相同性。由于这些异源的酶所作的工作(酶反应)是一样的,就可以把它们叫做同工酶。这类同工酶的结构在进化中虽然也在变异,但仍可能存在不同程度的保守部分,而使它们的基因在远缘杂交中表现一定的结构与功能的亲和性。再说,DNA分子基本上都是四种核苷酸组成的。在成百万到十亿以上的核苷酸排列顺序中,应不难遇到长短不一的相同顺序,这就提供了分子局部亲和的可能性。因此玉米和水稻的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片断DNA杂交。

近代的生化技术已经能够将基因从DNA分子上切下来;可以分析它的核苷酸顺序;也可能人工合成它;并能在试管中将不同生物来源的基因进行重组,再将这样的人工重组DNA分子送到异源细胞中去,发挥基因的遗传作用。这就是近几年兴起的基因工程。例如把海胆的组蛋白基因,瓜子的rRNA基因转移到大肠杆菌。虽说目前的技术离实际育种的应用还有很大的距离。但已清楚地告诉我们具有遗传活性的DNA分子是可以分割的。部分遗传信息可以通过片段DNA进行杂交。

其实,远在1944年艾弗里所进行的DNA转化试验,使有荚膜的肺炎球菌的性状转移给无荚膜的肺炎球菌,就已说明片段DNA可能起的作用。以后主要在微生物中利用转化或转导的方式成功地做过大量转移基因的工作是众所周知的。有兴趣的工作是如将固氮菌的固氮基因转移到非固氮细菌;将细菌的DNA转给变异的拟南芥植物,使后代获得细菌的合成维生素 B_1 的能力等。

片断DNA的杂交在人与鼠的细胞杂交中也可以看到。人与鼠的细胞融合后,人的染色体被全部排斥。但分析基因产物酶的活性证明,鼠染色体可能从人染色体获得了基因;并在光学显微镜下看不出这种带有二个入染色体基因的鼠染色体和原来鼠染色体的差别。

在整体杂交中,普通大麦和球茎大麦杂交,尽管球茎大麦的染色体也被全部排斥,并证明子代是孤雌生殖的结果,但发现具有球茎大麦的部分性状。这种宏观上染色体没有变异而子代发生变异的现象,在大麦与小麦的杂交后代大小麦中,以及甘蔗与高粱杂交的后代高粱蔗中都有发现。前者有明显的大麦和小麦的中间性状。后者已变成既产粮又产糖的新种,看上去虽然仍象高粱,但节间曾出现甘蔗的根点和饱满的芽。后代的性状主要为母体,又有远缘特性的杂交种,在我国广泛的群众性远缘杂交成果中是屡见不鲜的。单从以水稻为母本的杂交来说,各种高粱稻以及稗稻、竹稻、芦苇稻等都是如此。不论是杂交一代开始稳定或疯狂分

离后稳定的后代，看来都只保留了或多或少的部分远缘遗传信息。

上面提及的杂交后代都或多或少地能找到远缘的外观性状，可是玉米稻却没有。那么还能把它作为可能的杂交种来考虑吗？在讨论中，有人说：“如果能培育出生长玉米棒子的水稻来，才能承认它是真正的玉米稻。”从调查的客观事实和代谢调控理论来分析，这种玉米稻是不存在的。因为玉米棒子和谷穗是两种完全不同的性状。决定的基因多而差异大。加之它们都是主流代谢的产物，需要消耗大量的原料和能量。不难想象，即使做到两种性状的基因同时存在植株中，单就原料和能量的供给问题来看就要发生极大的矛盾，而玉米或水稻都没有调节这两个性状同时获得表现的遗传信息。因此并存是不可能的。在以水稻为母本的杂交种中，玉米棒子的性状必被排除。这和高粱蔗不同。高粱虽是产粮作物，但它本来就有在秆中储存糖的性质，不过一般量很低。即高粱具有合成和储存粮和糖的两条代谢通路，以及调节这两条通路的叉道控制体系，表现一定的粮糖比例调节水平。与甘蔗杂交后，引进了甘蔗的基因，增加了糖的合成，这只不过是使高粱原有的粮糖合成调节被改变了。因此看上去好象高粱蔗获得甘蔗产糖的质量遗传信息。实际上是甘蔗影响了高粱原有的粮糖数量遗传。这就是为什么在高粱品种中也能培育出产糖很高的高粱。这种数量遗传的改变在远缘杂交中是广泛存在的。选育出来的玉米稻、高粱稻、稗稻、芦苇稻以及豌豆麦等都有比母本增产的效果。为什么部分遗传物质的杂交会影响增产这样的多基因性状呢？这可以从前面谈过的远缘间 DNA 分子的局部亲和性以及同工酶的概念来分析。如果说母本的产量水平在一定的栽培条件下有一定的限度，这往往是错综复杂的代谢体系中一个或几个慢步骤决定的。这种慢步骤往往表现在一些关键的调控酶催化的反应上。如果能把这样的反应水平提高，整个代谢体系都可能提高。不同的生物具有的这类同工酶的调节水平不一样，因此从远缘获得调控水平较高的同工酶的 DNA 片段，来改变数量遗传的代谢水平是可能的。这种远缘同工酶的基因可以作为类似等位基因看待，当它与母本 DNA 结合或交换，可能不影响染色体的宏观结构，并在数量遗传上起作用而不表现远缘的外观性状。

目前群众性的远缘杂交是以花粉为材料授与母本。那么，片段 DNA 的杂交是怎样发生的呢？看来有三种可能。一是精卵结合后，子代疯狂分离，染色体排斥后残留的片段 DNA。二是精核进入卵细胞后即被分解，在孤雌生殖过程中带入片段 DNA。三是花粉在柱头上破裂，DNA 裂解成片段，在去雄不完全的条件下，随着自花授粉的过程带入卵细胞。因为 DNA 在体内或体外被裂解的程度不一样，进入杂交完全是随机的。所以当个性状所需的基因不能整套杂交时，这个性状就不能形成。所以相对的说，一些基因较少的质量遗传性状如颜色、芒、抗病性等比牵涉基因较多的质量性状杂交的机率大一些。

此外，前面谈到的调节基因是值得注意的。生物愈进化，DNA 分子上起调节作用的顺序也就愈多。有人认为，高等植物的 DNA 分子中，75% 以上是调控顺序。这些顺序是结构基因表达的组织管理者，在植物发育的过程中，调控基因的组合适配的数量决定个体性状。如果外来 DNA 片段插入母本 DNA，改变了母本 DNA 对蛋白质生物合成的调节作用，而使杂交子代发生不同于母本的变异。这种变异当然与远缘外观性状无关。

总之，李贞生同志培育的玉米稻的杂交性质需要过细的科学实验数据的论证。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，并应用近代分子生物学、分子遗传学的理论和技术，就可能把我国特有的这种广泛的群众性的远缘杂交工作往高里提，克服当前远缘杂交中的随机性（同样可以应用于近缘），更广泛地扩大基因库，分离选择基因，为分子定向育种开辟途径，向本世纪末完成农业现代化进军。

周光宇