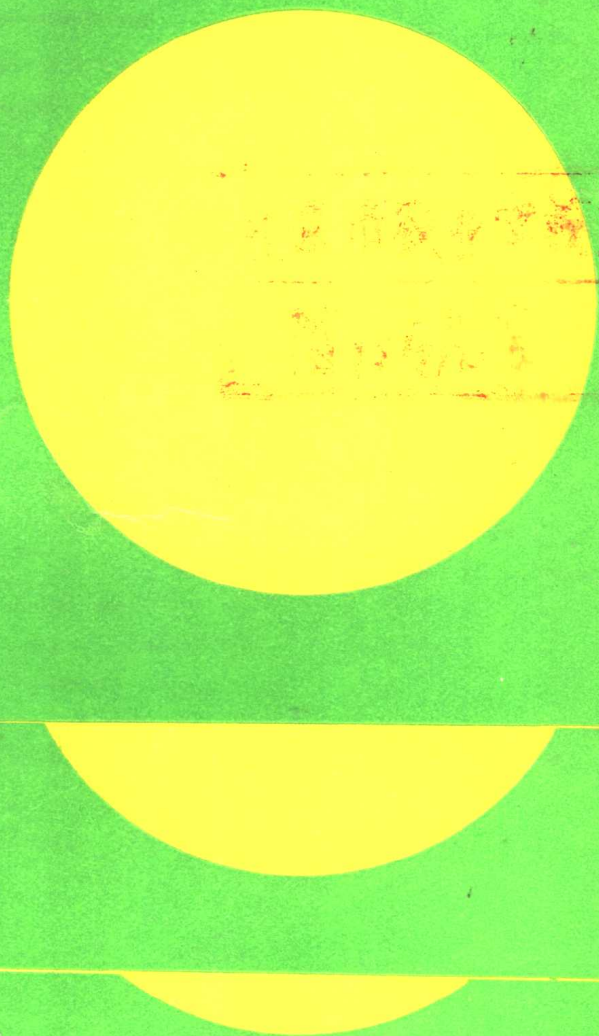


农业高新技术论

魏建昆 主编

农业高新技术论



科学技术文献出版社

科学技术



农业高新技术论

主 编 史振英
副主编 晏士伟 王志尧 肇贵勤
编 委 史振英 杨金深 焦惠生

科学技术文献出版社

(京) 新登字 130 号

内 容 简 介

本书详细介绍了农业高新技术的发展领域、国际最新研究动态与成果、前景预测以及目前乃至未来需要解决的问题, 内容包括花粉植物的染色体工程、植物基因工程、植物遗传转化、原生质体培养、人工种子的制作、体细胞无性系变异等, 同时还介绍了农业高新技术与常规技术的联系。本书内容翔实, 广泛性与新颖性、基础性与应用性紧密结合, 是一本具有很高学术价值的专著。

本书可供农业院校师生、农业科技管理人员及生物技术研究人員阅读。

农业高新技术论

魏建昆 主编

科学技术文献出版社出版

(北京复兴路 15 号 邮政编码 100038)

中国科学技术情报研究所印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

787×1092 毫米 16 开本 14.875 印张 342 千字

1993 年 8 月第 1 版 1993 年 8 月第 1 次印刷

印数: 1—5000 册

科技新书目: 293—111

ISBN 7-5023-1956-5/S·188

定 价: 12.50 元

序

高新技术是科学技术的尖端和前沿。有人预言，谁掌握了高新技术，谁就掌握了发展经济、军事的主动权。我国政府非常重视高新技术的研究与开发，制定并实施“863 计划”和“火炬计划”，在推进高新技术实用化、产业化和国际化方面取得了可喜进展。

农业高新技术有丰富的内涵。从产业角度讲，包括种植业、林业、畜牧业、水产业等；从技术角度讲，包括生物技术、遥感技术、核技术、信息技术等。就种植业的生物技术而言，应该说这是目前世界范围内研究最活跃、最深入的领域之一，也是开发应用前景最为广阔的领域之一。我国的农业生物技术研究已跻身于国际先进行列，一些方面已处于领先地位。为了进一步增强全社会的高新技术意识，帮助农业科技人员学习高新技术的基本理论与技能，促进这一领域的研究与开发，追踪世界农业高新技术发展的前沿，河北省农林科学院把近年来邀请国内知名专家、学者所作的学术报告编辑出版，为全国农业科技界做了一件很有意义的工作，谨向他们致以谢忱！

通览全书，本书内容有三个鲜明的特点：一、广泛性与新颖性相结合。就其广泛性而言，涉及到生物技术的方方面面，包括植物遗传转化、体细胞无性系变异筛选、原生质体植株再生、组织培养、人工种子等，还收入了对常规育种及抗病育种具有广泛指导意义的育种策略和作物遗传、细胞生理方面的重要论著；就其新颖性而言，由于这些专家大都来自国家级权威性研究机构，在国际学术界享有盛名，因此撰写的内容展示了国际范围内最新的研究动态与成果，通过这些信息，可以追踪世界农业高新技术研究的前沿，使人耳目一新。二、基础性与实用性相结合。不仅介绍了各研究领域的基本知识和基础理论，而且介绍了具体的实验步骤与操作方法，使科研人员能从理论上得到充实，技术上得到提高。其中每位专家反映出的独特的技术路线与思维方法，对于指导这些方面的研究工作，具有重要意义。三、高新技术与常规技术相结合。高新技术不是独立的技术体系，而是与常规技术密切联系的。常规技术是高新技术的基础，高新技术是常规技术的延伸，二者是互相渗透、互相交叉的。本书内容充分地体现了这种渗透与交叉，反映了不同技术环节的衔接与结合，这也正是高新技术研究要遵循的重要技术原则之一。归纳这些特点，可以说，这本文集是以生物技术研究为主体的优秀著述荟萃，基本上反映和代表了国内外的研究水平，具有较强的权威性。在此，特向全国农业科技界推荐这部好书。

“发展高科技，实现产业化”，这已是我国科技发展的一条既定方针。由于高新技术对高技术（知识）、高投资强度的要求和研究与开发中的风险性，我国的高科技研究应该走“突出重点、有限目标、适当集中”的路子，切忌一哄而起，一哄而散。相信在本世纪末，我国的农业高科技将有一个蓬勃的发展，同时也相信，这本书的出版发行将为我国的农业科研事业做出有益贡献。

胡 含

一九九二年五月二十日

目 录

植物生物工程国内外动态及我国进一步发展的设想 孙敬三	(1)
植物的快速繁殖和无毒苗生产.....	(2)
花药培养和单倍体育种.....	(2)
原生质体培养和细胞融合.....	(4)
植物细胞的大量培养和次生代谢产物的生产.....	(6)
植物基因工程.....	(7)
植物基因工程的研究及发展趋势 陈章良	(8)
概述.....	(8)
已经获得成功的植物基因工程的几个方面.....	(9)
植物基因工程的发展趋势	(10)
花粉植株的染色体工程	胡 含 (12)
遗传的(染色体的)稳定性和变异性	(12)
配子基因型在植株水平上较充分地表达	(13)
创造新类型	(14)
新种质的鉴定	(16)
植物抗虫基因工程	范云六 (19)
植物基因工程的基本概念、内容、特点以及与常规育种的关系	(19)
植物抗虫基因工程	(19)
水稻抗虫基因工程	(20)
植物基因及其表达	赵微平 (23)
叶绿体基因组	(23)
线粒体基因组	(34)
核基因组	(38)
植物遗传转化的研究进展 贾士荣	(121)
技术程序和影响因子.....	(121)
近年来的进展.....	(126)
存在问题.....	(128)
体细胞无性系变异与植物改良 朱至清	(129)
无性系变异的普遍性.....	(129)

无性系变异与诱发突变的比较·····	(132)
影响无性系变异频率的因素·····	(133)
无性系变异可能的机理·····	(133)
无性系变异在育种上的应用·····	(135)
禾谷类作物原生质体培养····· 王海波	(136)
愈伤组织的诱导、继代及质量改进·····	(136)
松脆型愈伤组织的诱导与选择·····	(138)
悬浮体系的建立与保持·····	(139)
原生质体的游离与培养·····	(139)
原生质体植株的再生·····	(141)
讨论·····	(141)
玉米原生质体的植株再生····· 蔡起贵	(142)
材料与方法·····	(142)
结果与讨论·····	(143)
体细胞组织培养在植物育种中的应用····· 李浚明	(146)
体细胞无性系变异在植物育种中的利用潜力·····	(146)
体细胞组织培养在远缘杂交中的应用·····	(149)
体细胞突变体的离体选择·····	(152)
植物细胞、组织培养应用技术····· 王 培	(156)
供体植株的生理状态·····	(156)
培养基·····	(158)
培养条件·····	(159)
染色体工程在小麦育种中的应用····· 方 仁等	(162)
小麦染色体工程的研究进展·····	(162)
染色体工程在小麦育种中的应用·····	(165)
植物人工种子及离体培养后的遗传变异规律····· 李修庆	(168)
植物人工种子概论·····	(168)
离体培养后的遗传变异规律·····	(176)
利用近缘种属创造小麦抗病新种质····· 庄家骏等	(182)
白粉病抗性的导入·····	(182)
黄矮病抗性的导入·····	(183)
赤霉病抗性的导入·····	(184)

植物杂交育种亲本选配研究进展·····	张爱民 (190)
杂交育种中亲本选配研究的意义·····	(190)
亲本选配研究进展·····	(190)
亲本选配研究应考虑的几个方面·····	(193)
几种亲本选配方法介绍·····	(194)
作物育种策略与育种效率——作物育种系统工程初探·····	孙其信 (209)
作物育种工作的系统框架及特征分析·····	(209)
育种程序(子)系统的特征分析·····	(211)
作物育种工作是一项系统工程·····	(213)
育种策略与育种效率和效果·····	(215)
结语·····	(218)
从植物遗传育种、生理与病理的角度论述我国玉米细胞质雄性不育杂交种的应用·····	魏建昆等 (219)
遗传育种方面的研究·····	(219)
植物生理方面的研究·····	(220)
植物病理方面的研究·····	(225)
讨论·····	(227)
后记·····	(229)

植物生物工程国内外动态

及我国进一步发展的设想

孙敬三

尽管通过育种工作者的努力,在小麦、玉米、水稻以及其他经济作物的品种改良上取得了很大成绩,如不断培育出高产、优良、抗病的新品种,然而,面对世界人口日益增加的强大压力,粮食问题仍是困扰许多国家的重大问题,特别是对发展中的第三世界国家。在这些国家,高产、稳产仍然是育种家追求的首要目标。在发达国家,如美国和西欧,农产品过剩也带来了新的问题,即在保持高水平产量的同时,如何降低成本和减少对环境的“压力”,如土地和水资源的利用,减少化学污染。这些问题的解决靠传统方法已深感不够,而植物生物技术对解决上述问题具有特别重要的意义。据美国一家集团公司最近对美国农业生物技术市场的预测,到2000年,美国农业生物技术市场规模可能超过1500亿美元,其中,仅用生物技术改进的农作物的销售额就将达到950亿美元,占总数额的63%以上;此外,观赏植物和工业原料植物的销售额为70亿美元,两项相加占总销售额的68%。

正是由于生物技术的巨大威力和它对种植业已经和可能产生的重要影响,世界各国,无论是发达国家,还是发展中国家,都非常重视植物生物技术的研究开发。前者主要是为了夺取世界农产品市场,获取高额利润,后者则是为了解决食物短缺问题。美国把生物技术看作是农业技术革命的关键,孟山都、杜邦等许多大公司都把农业生物技术的研究开发作为其战略重点之一。1988年初,美国召开了一次规模巨大的农业生物技术会议,参加会议的包括企业总裁、公司董事长、银行家、风险投资家、研究所领导人、学校校长和政府部门负责人共计近千人,几乎所有的生物技术公司都参加了。最近,美国国家科学基金会资助建立了一个新的植物技术中心,平均每年拨款100多万美元,主要用于研究改良农作物的新方法。1986年,日本农林水产省专门成立“生物领域特定产业技术研究推进机构”,目的在于大力促进企业和社会团体在农林牧渔和食品工业领域进行生物技术研究开发。英国帝国化学工业公司兼并几家种子公司,把玉米、大豆和小麦作为开发重点,年投入研究开发经费2600万美元。前联邦德国的一些大企业也相继兼并种子公司,进行农业生物技术的研究开发。欧洲共同体的尤里卡计划在已公布的38个生物技术项目中,与农业有关的有11个,总经费6075万欧洲货币单位。第三世界的巴西也非常重视植物生物技术,已经由政府部门成立一个大望农业研究公司,该公司拥有800名高级研究人员,年度预算为1.5亿美元。

我国从“六五”开始就拨专款发展生物技术,经过“七五”的大规模投资和“863”高新科技生物技术课题的高强度资助,我国在生物技术的各个领域都有了长足的进步,个别领域如花药培养、禾谷类作物原生质体培养和水稻杂种优势的利用等还走在了世界的前列。可以乐观地预计,“八五”期间我国将有一批生物技术产品投放市场,在基础研究方面也会有一批具有国际水平的成果问世。

下面分几个专题进行讨论:

植物的快速繁殖和无毒苗生产

植物的快速繁殖和无毒苗生产在国内外是一项比较成熟的简便技术,对设备和人员要求较低而经济效益较大。目前,欧美等国家年产试管苗在数千万以上,主要品种以花卉、切花为主,近几年出口量每年以10%的速度增加。据外国专家预测,未来10年的需要量将以每年7—8%的速度递增。

我国在快繁和脱毒方面,“六五”期间做了一些准备工作,有了一个比较好的基础,但除了土豆和甘蔗外,大部分停留在实验室阶段。“七五”期间有了较大的发展,1986年,中国科学院广东华南植物所和新会、顺德县合作进行香蕉试管苗生产,年生产和出口400万株。福建果树所通过茎尖微型嫁接和指示植物鉴定,得到了15个优良无黄疣病和裂皮病的柑桔品种的无毒种苗,在宁德县建立了示范果园1300亩,生产无病种苗2000余亩,年出口12万株。中国农科院兴城果树所等单位通过茎尖培养得到10个苹果品种的去毒种苗,种植果园面积达1000亩,推广20000多亩,已具有一定规模。延边农学院两年生产山葡萄种苗近百万株,甘肃农大试管快繁的葡萄苗,长势好,根系发达。在花卉方面,主要切花品种如菊花、香石竹、唐菖蒲等无毒苗生产技术已趋完善。在其他经济作物方面,中国科学院昆明植物所快速繁殖香英兰,取代进口,也具有一定的规模。据估计,如果快繁香英兰在我国南方种植,仅海南省每年就可收入2000万元。

目前,国际上主要将快速繁殖用于观赏植物如兰花、非洲菊、菊花、香石竹、火鹤花等切花品种的无毒苗的种苗生产。“八五”期间,我国在脱毒结合快繁方面主要以果树为主,兼顾花卉、林木、蔬菜、药材等,应扩大研究对象。在热带和亚热带果树中,除香蕉、柑桔等外,应扩展到荔枝、龙眼、柚子、芒果、菠萝等。在温带水果中,除苹果、葡萄、草莓等外,还应重视梨、樱桃、枣、核桃、山楂、柿子、猕猴桃等。尤其是猕猴桃,在我国有丰富的资源,全世界58个种中,我国有57个种(另一个种在日本),而世界猕猴桃市场主要被新西兰占领,他们选育的Hayward品种被认为是世界上最好的品种,而我国的“中华猕猴桃”风味优于Hayward,但由于不耐贮藏而影响了出口,如能充分利用我国丰富的资源,培育新的优质、耐贮藏的品种,占领国际市场是大有希望的,在国内销售收入也很可观。在花卉和观赏植物方面,主要应考虑用于城市绿化的行道树、花灌木和宿根花卉,以及解决大城市节日、大型活动用的优质切花供应,减少进口,扩大出口。我国造林任务很大,林木快繁难度也大,除目前已开展工作的杨树、桉树和杉树等速生树种外,其他优质针叶木材用树种以及油茶、油桐、樟树等经济林木的研究也需加强工作。

此外,“八五”期间,我国还应重点抓好病毒快速检测鉴定技术,保证出口要求。要及时掌握信息和世界行情,建立有我国特色的试管苗工厂,加强协作,解决出口苗包装、运输等方面的问题。

花药培养和单倍体育种

到1987年为止,我国用花药培养方法培育出水稻新品种(系)60个,小麦20多个。胡道芬(1986)培育出京花1号、京花3号等小麦,李梅芳培育出水稻中花8号、9号、10

号和11号，京花1号小麦、中花9号水稻在生产上大面积推广。京花1号小麦1984年种植面积达100万亩。在小麦、水稻花药培养和单倍体育种方面，我国居世界领先地位。

在选育新品种的同时，我国科学家还通过花药培养技术创制新的种质资源用于育种工作。如薛庆中等（1986）育成的单209水稻具有抗稻瘟病和抗白叶枯病的特性，因而已作为抗病亲本应用于晚粳稻育种中。据1984年统计，具有该种质血缘的新品种已推广100万亩左右。此外，从单209水稻群体中还发现了矮秆突变型（单209矮），除抗病外，还是一种矮秆种质资源。除水稻、小麦外，蒋仲仁等（1987）将甜（辣）椒花药培养完善为一个具有很高实用价值的技术，一年内可获得800余株发育正常的甜椒单倍体幼苗，已育成7个甜（辣）椒品种和6个甜椒杂交种，其中3个品种和2个杂交种已在全国广泛种植。据不完全统计，1987年全国种植他们培育的甜椒面积在2500公顷左右，收到明显的经济效益，1988年种植面积达5000公顷以上。

在细胞工程领域中，虽然花药培养在新品种培育方面成绩最为突出，但是阻碍花药培养广泛应用于育种实践的培养效率低的问题一直没彻底解决。近年来国内外科学家围绕提高花药培养的诱导频率，对培养基的成分，供体植株的生理状态和培养条件，培养方式与方法等方面进行了研究，取得了很好的效果。进展比较大的是大麦（表1），以Igri冬大麦为材料，经过培养基的改良和培养方式的改进，成百上千倍地提高了绿苗诱导率。下面就几个方面进行阐述。

表1 大麦和小麦花粉绿苗的诱导率（%）

作物	频率	年代	作者
大麦 (Igri)	2.4	1984	B.Foroughi-Wehr 等
	460.0	1987	F.L.Olsen 等
	2700.0	1988	C.P.Hunter
小麦 (Orofen)	0.023	1985	G.Wenzel 等
	> 20	1987	S.K.Datta 等

1. 培养基的改进

在水稻、小麦的花药培养中，采用N₆、C₁₇培养基比MS培养基收到更好的效果。在大麦花药培养中，用麦芽糖代替蔗糖，用大麦淀粉代替琼脂，以及用蜜二糖代替蔗糖，都大大提高了诱导频率。朱至清在小麦花药培养中用葡萄糖代替蔗糖也收到了明显的效果。此外，培养基中加入谷氨酰胺等氨基酸，采用液体培养、浅层培养和过滤灭菌对提高诱导率也起了一定作用。

2. 供体植株的生长条件

李梅芳在水稻花药培养中注意到，来源于大田和温室中主茎与分蘖的材料，以及低温预处理时稻穗是否保留旗叶，对诱导率有显著的影响。Lyne R.L.等（1984）比较了生长在12℃与15℃条件下大麦植株花药培养的效果，发现12℃条件下生长的植株的分化率、绿苗分化率都高于15℃条件下生长的植株。Keller在油菜花药培养工作中发现，在10℃条件下生长的植株花药培养的效果最好。

3. 培养方式

早在 70 年代末 80 年代初期, Kao K.N. (1981) 即在大麦花药培养时附加聚蔗糖 (Ficoll) 以改善培养 (液体) 时花药的通气条件, Hunter 和 Mark 分别发现大麦花药培养 (固体培养基) 有定位效应, 即显露于空气中的药室容易诱导胚状体或花粉愈伤组织, 因此, 将花药定向地置放在培养基上可提高花粉的诱导频率。但这种做法需人工操作, 费时费事, 难于推广。近年来, (液体) 漂浮培养愈来愈为人们所重视。应用 Ficoll 作漂浮剂可解决人工操作问题, 花药的两个花室可以同时接触培养基, 而另外两个花室又同样暴露于空气中, 从而促进胚状体的形成。小麦的花药培养也采用了这种方法。刘成华 (1989) 应用 3—5% 的 Ficoll 漂浮培养时有效地提高了有反应的花药率, 尤其是反应花药平均出愈率和改善了愈伤组织的质量, 可使绿/白苗比提高 10 倍以上, 愈伤组织在 Ficoll 培养基上发育好, 生长快, 并可直接诱导再生绿苗。玉米花药培养 Ficoll 的效果也很好。双层培养基即浅层培养是在固体培养基上加一薄层液体培养基, 这种培养方法的优点是既可以满足液体培养的密度效应, 又可保证培养物的通气条件, 因而也获得较好的培养效果。

4. 远缘杂交染色体消失获得单倍体的新方法

小麦花药培养诱导单倍体受基因型影响很大, 对于那些对花药培养不敏感的基因型小麦, 采用小麦与玉米或高粱杂交的方法可以获得单倍体。由表 2 可以看出, 小麦与玉米或高粱杂交都有比较高的受精率, 但在杂种胚发育过程中胚乳退化, 同时玉米和高粱的染色体丢失, 利用幼胚培养可获得植株, 但植株是全部为只具小麦染色体的单倍体。

表 2 小麦×玉米及高粱的受精率 (授粉后 48 小时)

受精情况	单 胚	单胚乳	胚及胚乳	花粉管进入胚囊	无花粉管	观察数
小麦×玉米 ⁽¹⁾ (中国春×Seneca)	23%	2%	3%	32%	40%	343
小麦×高粱 ⁽²⁾ (中国春×高粱 598)	57%	2%	10%	3%	28%	100

(1) 引自 Laurie and Bennett, 1987.

(2) 引自 Laurie and Bennett, 1988.

原生质体培养和细胞融合

到目前为止, 重要禾谷类作物水稻、玉米、小麦、大麦、甘蔗、谷子等原生质体培养再生植株都已成功。原生质体培养不是目的, 只是一种手段, 其目的在于进行体细胞融合, 作为基因转移的受体和体细胞无性系变异的来源, 为育种服务。

关于原生质体培养及细胞融合已专门有报告, 这里主要谈以下几个方面的问题:

1. 体细胞融合的方法

有化学方法 (即 PEG 法) 和电融合两种方法。目前行之有效的化学方法是 70 年代

Kao K.N.等 (1974) 创立的 PEG 与高 Ca^{++} 高 pH 结合使用的方法, 此法经过不断修改, 融合率已达 10—15%。这种方法的优点是: 系统简单, 不受种属的限制。电融合也是目前使用较多的一种方法。电融合分为两个步骤, 首先将原生质体置于低导电介质的溶液中 (如 0.4M 甘露醇, 1—10mM MgCl_2 或 CaCl_2), 在电极间施加高频交流电场 (0.4—1.5MHz, 100—250V/cm), 使原生质体偶极化, 并沿电场线方向泳动, 原生质体迁移时会与其他原生质体的异电荷相互吸引接触, 形成与电场线平行的原生质体链。电融合的第二步是用一次或数次高压直流电脉冲 ($3 \times 10\mu\text{sec}$, 1—3kV/cm) 引起膜的可逆性破裂而导致融合。

2. 异核体的筛选

筛选方法可分为两大类, 即互补筛选法和机械分离法。

互补筛选法简便易行, 但要求亲本为营养缺陷型而杂合体为缺陷型互补, 或对特殊化学物质具抗性等。应用基本培养基或培养基中加一定的附加物进行培养, 根据异核体生理性状互补的原则选出融合细胞。机械分离法则只是根据亲本细胞的表型性状, 用人工选择逐一选出融合细胞。对于肉眼难以观察到差别的原生质体, 可用一些对原生质体无毒害的染料 (如罗丹明 B、异硫氰酸荧光素等) 进行染色, 在荧光下进行分离。机械分离法虽然准确度高, 但繁琐、费事。

3. 融合体在农业上的利用

异核体杂种的培育: 作物的优良性状往往受多基因控制, 基因工程很难实现多基因转移, 而体细胞杂交为一次性多基因性状的改良提供了途径。加拿大已将烟草的体细胞杂种用于烟草品质改良中。马铃薯抗卷叶病及抗晚疫病、Y 病毒等特性都通过体细胞杂交而由野生种转移到栽培种中。Brassica 属中的种间细胞融合得到了可育的杂种。试图通过豆科牧草的体细胞杂交转移 Lotus 属的抗旱、抗虫的优良性状, 培育高产、抗性强的新品种, 目前虽还无体细胞杂种, 但种间和属间的杂交已得到愈伤组织。在花卉方面, 利用体细胞融合培育奇花异草可能很有前途, 但目前尚未引起重视。

胞质杂种及雄性不育系的培育: 体细胞融合不仅包括核基因组, 还涉及到核外遗传系统, 即线粒体和叶绿体的重组。重新组合的细胞器或其中部分基因, 在农业生产上是十分有价值的。体细胞杂种很多是不育的, 因此体细胞融合也用于胞质雄性不育基因转移和抗除草剂的研究。抗除草剂 Atrazine 及雄性不育是分别由叶绿体及线粒体控制的胞质性状。体细胞杂交可以使双亲的胞质性状得到组合, 并重组产生胞质杂种。雄性不育性状与抗除草剂性状集于一身的亲本, 对商业上生产杂交种是非常重要的。Pelletier G.等 (1983) 最先获得具有雄性不育与抗 Atrazine 的油菜胞质杂种。Chuong P.V.等 (1988) 将单倍体油菜的原生质体融合, 获得了抗 Atrazine 的雄性不育品种, 该品种与保持系授粉能正常结实, 其叶绿体 DNA 限制性内切酶谱与抗 Atrazine 的亲本一致, 而线粒体 DNA 的内切酶谱与雄性不育亲本一致。此外, 抗性胞质杂种的烟草、土豆、萝卜、番茄也有报道。

体细胞杂交已成功地用于水稻雄性不育胞质杂种的培育工作。Akagi H.等 (1989) 和 Yang Z.Q.等 (1989) 用体细胞杂交技术得到了胞质杂种的再生植株, 并从线粒体 DNA 内切酶谱上发现了序列的重组。Kyojuka J.等 (1989) 将不育系供体的原生质体用 X 射线处理, 抑制了核的活性, 而作为受体的栽培品种——日本春 (Nipponbare) 用碘乙酰胺 (iodoacetamide) 处理, 抑制胞质活性, 体细胞杂交获得了所期望的含有雄性不育性的双倍

体胞质杂种，并成功地再生了植株。该胞质杂种用保持系授粉时能够正常结实，除雄性不育性状外，其他性状基本上保持了受体品种（日本春）的优良性状。

我国在原生质体培养及体细胞融合方面取得了令人瞩目的成绩，先后在水稻、玉米、小麦、谷子原生质体培养再生植株，水稻杂种优势的利用及胞质核不育的研究等方面都取得了明显进展。目前，光敏核不育水稻的研究工作正在进行。利用体细胞融合和无融合生殖来固定杂种优势的课题已经引起科学家们的重视。

植物细胞的大量培养和次生代谢产物的生产

经济的发展和社会的进步使人们对医药、香料、化妆品的需求也随之增加，而且由于化学合成物对人体难以言清的危害使人们对人工合成的食品添加剂、防腐剂、香料以及大量合成药物产生了越来越大的抗拒心理，而对天然植物产品需求量日增，这在国内国外都是一样的。植物组织培养特别是细胞培养的兴起，为利用细胞大量培养生产人们所需要的各种次生代谢产物提供了可能。

通过植物细胞的大量培养获得某些代谢产物有如下优点：①实现工业化生产，产品稳定，不受自然条件限制；②节省农田，避免了药粮争田、工业原料占地的问题；③解决资源贫乏植物的原料问题；④解决热带或高寒地区植物的引种困难，使特种植物可以在原产地之外生产；⑤通过诱变、细胞杂交、遗传转化筛选出高产细胞株，可望大幅度提高有效物质的含量。

植物细胞的大量培养和次生代谢产物的生产研究现状及发展趋势：

通过细胞悬浮培养或发酵培养已可生产各种生物碱、黄酮类、蒽醌类及各种色素，如紫草、三七、黄连、长春花、欧亚唐松草、海巴戟、毛地黄等。目前，做得最多最好的是紫草。日本用紫草细胞培养生产的紫草宁已经用于商品化生产，我国已从紫草细胞培养物中提取出两个抗癌单体。

为了尽快实现工业化生产的目标，目前着重研究两个问题，即降低成本，提高产量。其主要内容有：高产细胞株的筛选；培养技术的改进；大型新型生物反应器的研制。

(1) 高产细胞株的筛选。高产细胞株的选择和克隆是解决细胞培养中有效成分生产稳定性和高产性的重要有效途径。但是筛选高产细胞株的首要前提是发展一种对少量细胞培养物以至单细胞水平的检测方法，也就是要开发出超微量分析技术，这一技术一旦建立起来，特别是对活体细胞能够快速检测的话，高产细胞系的筛选就有了可能。目前用放射免疫测定法成功地检测了培养的长春花单细胞中西萝芙木碱和蛇根碱的含量，为高产细胞系的筛选创造了条件。

(2) 在培养技术和新型反应器的研制方面，目前比较成功的是细胞固定化培养技术。细胞固定化培养比悬浮培养细胞生长速度慢，有利于次生物质积累，易于得到高密度的细胞群体，建立细胞间的联系，有利于细胞组织化。Liadsey 和 Yeoman (1984) 把辣椒培养细胞装入氨基甲酸乙酯泡沫中进行固定化培养，不仅能维持较长时间的生命力，而且在一般条件下能形成比悬浮培养细胞多达 1000 倍的辣椒素。海巴戟、毛地黄、欧亚唐松草等的固定化培养也明显地提高了产量。在新型生物反应器研制方面，国内也取得进展，如大连化物所研制生产的空心纤维培养器等。

(3) Ri 质粒转化。利用发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 能够诱导毛状根 (hair

root) 的 Ri 质粒转化植物, 使之产生大量的根。因为很多次级产物是在根中合成的, 这种毛状根可以在无激素的培养基中进行大量扩增, 培养这种快速扩增的根毛可以生产次生代谢物质, 如色素和生物碱等。从发表报道看, 用 Ri 质粒转化的毛状根可生产东莨菪碱、阿托平、尼古丁、甜菜碱。中国医科院用 Ri 质粒转化人参, 使培养物的人参皂甙明显提高。国外用 Ri 质粒转化的天仙子比对照根生长快, 其生物碱产量达到了原植物的水平。这种根经 3 年多的继代培养, 仍保持着快速生长和产生生物碱的特性。Ri 质粒转化的颠茄毛状根培养物的生物碱含量已达到或超过了田间生长的植株。

(4) 改进培养技术。紫草培养细胞应用两步法大大提高了紫草宁的生产。第一步在 MS、LS 培养基上快速增殖, 但不产生紫草宁, 换到 White 或改良 N_6 培养基上大大提高紫草宁的产量。同时发现紫草宁的生产与培养基中 NH_4^+ 关系密切, 当 NH_4^+ 为 0 时, 紫草宁为 130mg/L; 为 1% 时, 紫草宁为 60mg/L; 为 2% 时, 紫草宁为 0。

植物基因工程

自 70 年代初重组 DNA 的工作发表之后, 人们立即意识到它的重要理论价值和广泛的应用前景, 并开始了有目的地改造生物的意义深远的工作。

据统计, 全世界因病虫害的危害, 每年大约损失谷物收成的 1/3, 造成的经济损失高达 1200 亿美元以上。为了对付病虫害, 全世界每年大约要生产 2000 多万吨农药, 不但花费大量投资, 而且对土地、水源造成了很大污染。因此基因工程的首要目标就放在了培育抗病、抗虫、抗除草剂的工程植株上。

目前用基因工程的方法培育成的转基因植物有: ①抗病毒的烟草和番茄; ②抗除草剂的番茄、烟草、甜菜和玉米; ③抗虫害的番茄、烟草和棉花; ④培育成了可以使羊毛快速生长的苜蓿。除此之外, 还有许多转基因植物的工作正在进行中, 特别是基因工程在植物的营养改良方面具有广阔的前景。

尽管植物基因工程取得了令人瞩目的进展, 但是, 迄今为止, 重要粮食作物的基因工程育种工作尚未取得重大突破。预计在今后几年内, 通过基因工程技术将把一些主要生产性状赋予大豆、水稻、玉米、小麦等重要粮食作物。

(本文资料主要来源于即将出版的《植物生物技术和作物改良》(孙敬三、陈维伦主编))

植物基因工程的研究及发展趋势

陈章良

概 述

生物技术是 10 多年来迅速发展起来的高技术、新技术,具有十分明显的社会效益和经济效益。在所有生物技术领域中,农业生物技术,特别是有关作物生物技术的 Research 和发展,被认为是最有现实意义的技术之一,将在下一世纪出现的“绿色革命”中发挥巨大的作用。农业生物技术研究的内容有植物基因的操作,植物细胞和植物组织的培养,转基因植物和转基因鱼类、家畜家禽的获得等。农作物生物技术方面主要研究方向是提高蛋白质含量,改良氨基酸组成,提高作物抗逆境、细菌、真菌和病毒病以及抗虫的能力等,并在植物固氮的固氮基因研究、固氮菌与寄主的关系、联合固氮以及植物光合作用的光吸收系统、二氧化碳固定等方面都取得很大突破。

在农业生物技术发展中,利用植物基因工程技术所获得的一系列成果最引人注目,植物基因工程技术是克隆编码一些特有性状的基因,并通过生物、物理和化学等方法,导入到受体植物细胞,通过组织培养培育出转基因植物。80 年代初首次从细菌中分离出来的一些分解抗生素的基因,并转移到植物细胞中获得能在抗生素培养基上生长的植株。此后,迅速出现了一系列转基因植物,从大豆、菜豆等植物中分离出种子蛋白基因在烟草等植物种子中获得表达,从而在这种非豆科植物种子中出现豆科植物种子蛋白质;转移植物病毒的一部分基因组到植物基因组中获得抗病毒的转基因植物。将编码苏云金杆菌的毒蛋白基因转移到番茄等植物中,获得抗虫植物。人们甚至从萤火虫中分离荧光素酶基因,通过改造后转移到烟草等植物,发现这些转基因植物在有荧光素底物存在下能发出非常微弱的光。最近人们还利用植物基因工程这一新技术,在转基因植物中生产多肽药物。总之,植物基因工程技术给农业育种提供了一条十分有用的途径。人们可以在一定范围内开始根据意愿来改造植物的一些性状,从而获得高产、稳产、优质和抗逆性强的品种。一般认为到 2000 年,在价值 200 亿美元的种子中,有很大一部分是通过组织培养或是通过重组 DNA 技术将一些新的性状引入到植物中得到的。目前人们已经具备了将外源基因导入到一些植物细胞中并将这些细胞通过组织培养而育成转基因植物的技术,而且越来越多的控制植物性状的一些基因被分离鉴定。这两三年来,随着抗虫、抗病毒、抗除草剂等转基因植物大田实验的成功,许多大型种子公司已经估算了这项技术能够创益的时间表,即一般认为,到 1995 年左右就可望这些转基因植物进入生产使用。由于植物基因工程技术是能在已有的作物品种上增加一个或多个基因从而增加优良性状,所以种子公司比较容易估算这种技术的价值。

植物基因工程的一个特点是比较容易获得社会的认可。目前对转基因动物,很多人还保

持着相当小心的态度，但对转基因植物，似乎因为植物在整个生长过程中的位置比较固定，没有太多的移动（当然花粉也会被风或昆虫传播得很远），而且一般农作物是一年生，所以相对来说植物基因工程技术被认为是比较安全的，这就在很大程度上加快了这项研究及其成果的推广。从第一株转基因植物的获得到现在还没有超过 10 年，已经有近 30 种转基因植物，这些植物有烟草、番茄、马铃薯、矮牵牛、胡萝卜、向日葵、油菜、苜蓿、亚麻、甜菜、棉花、芹菜、荷花、黄瓜、拟南芥、大白菜、大豆、水稻、玉米、莴苣、豇豆以及裸麦等等。

已经获得成功的植物基因工程的几个方面

抗病毒的植物基因工程 这是 1986 年首次获得成功的一项工程，也是目前应用较广的一种生物技术。植物病毒病害一直是农业生产上最主要的病害之一，到目前为止还没有十分有效的途径防治病毒病害。利用植物基因工程技术，已成功地获得抗病毒的植物，其原理是利用生物技术，将编码植物病毒的外壳蛋白基因导入到植物细胞中，并获得转基因植株。这些植株叶片细胞中有病毒外壳蛋白（但不是病毒粒子）的积累，能够抑制侵染进来的病毒的复制，从而减轻病毒的症状，或推迟病害的发生时间，这样就有效地保护了植物。后来利用转移病毒的卫星 RNA 基因组或者转移病毒的反义 RNA 也获得抗病毒的植株。这些转基因植物（烟草、番茄等）在大田试验中都一定程度地表现出抗病毒的性状，从而提高了产量。植物病毒病害给我国经济作物和粮食作物造成了很大的损失，我国仅烟草和蔬菜每年因病毒侵染造成的损失就超过亿元以上，还有马铃薯、水稻、小麦、玉米等。所以抗病毒植物基因工程的成功给农业增产带来了希望。在这短短的几年时间里，现已获得抗病毒的烟草、马铃薯、苜蓿以及一些蔬菜、粮食作物的抗病毒工作也在开展。

抗虫的植物基因工程 生物防治害虫的工作已经开展多年，主要是利用苏云金杆菌中的毒蛋白（结晶蛋白）对害虫有毒害作用，从而使用这些杆菌来控制害虫。人们通过克隆编码这些毒蛋白的基因，并把这些基因转移到植物细胞中，从而获得能抗虫的转基因植株，即害虫侵害了这些植物后，在很短的时间内就会死亡。由于这些毒蛋白具有很强的杀虫专一性，已经有证据表明这些苏云金杆菌对一些益虫、还有动物及人没有毒害作用。近几年还使用了一些蛋白酶抑制剂的基因，也获得抗虫的植物。这项技术的成功将会在一定程度上减少杀虫剂农药的使用，从而降低农业生产成本，并可减少由于使用农药而造成的环境污染。

抗除草剂的植物基因工程 除草剂的使用，对大规模机械化耕作、减少劳力开支和提高产量有着极为重要的作用。但一般的除草剂的选择性比较差，即除了杀虫以外还会将作物杀死。现在利用生物技术，将能抵抗除草剂的基因（包括编码能分解除草剂的酶、扩增会被除草剂破坏的酶以及通过替换氨基酸而不被除草剂识别的酶）转移到植物中，获得抗除草剂植物，如现在已获得能抗特定除草剂的一些蔬菜、油菜、大豆、棉花、烟草等。这些转基因植物在大田生产中如混有一些杂草，可以通过使用除草剂，就能有选择性地在将杂草杀死而不影响转基因植物的生长，从而大大减少了劳动力，并且提高了粮食产量。

获得植物雄性不育的植物基因工程 雄性不育的植株在杂交育种上有着十分重要的位置。植物基因工程技术的发展已经可以在一些转基因成功的植株上获得雄性不育的特性，人们从花药发育和花粉形成过程中分离到特异的基因启动子，与核糖核酸酶基因联结，导入到油菜等植物中，发现在转基因的油菜中花粉形成不正常，出现败育，成为不育症，而使用核

糖核酸酶抑制因子的基因导入到油菜中，成为恢复系。同样，目前还用其它一些毒性基因导入到植物中，使其在花药或花粉发育过程中表达，从而获得不育株。目前很多实验室都在水稻、小麦、玉米等方面进行研究。雄性不育的转基因油菜已进入大田试验，估计 1995 年左右会进入大田生产。

使植物产生抗体的基因工程 植物界到目前为止仍未发现和动物一样能产生抗体的免疫功能组织。为了提高植物的抗细菌、真菌以及病毒病的能力，美国科学家成功地将动物中分离的抗体基因导入到植物中，并能使植物产生有活性的抗体。这一成果使人们开始一系列研究工作，从动物中分离出植物病原菌的抗体基因，导入到植物后获得抗这些重要病害的转基因植物。

其它一些植物基因工程 其中包括通过转移含有较多的必需氨基酸的蛋白基因，提高一些植物种子中必需氨基酸的含量；利用 PG 酶的反义 RNA 基因使成熟后的番茄果实变硬，以便于运输和储藏；利用 CHS 反义 RNA 基因获得能在一定条件下改变花卉的颜色。最近还有一些工作表现在转基因植物中可以生产一些医药上有用的肽。在抗寒、抗热、抗盐碱以及抗病等提高抗性的植物基因工程方面也有很大的进展。

以上简述了最近几年植物基因工程所获得的成果，大部分成果都已进入小试或中试阶段，一般估计 4 至 5 年后即可以进入生产使用。在国外，抗除草剂的转基因作物可能将是第一批进入生产使用的植物基因工程产品。作为农业大国，我国从开始就注意到植物基因工程这一新技术的发展，“七五”计划、“863”计划、自然科学基金以及其它一些基金都有这方面的资助项目，这方面的研究已取得了一些很显著的成果，有些已经接近国外已有的最好水平。如抗病毒的植物基因工程方面，据已报道的和还未报道的结果表明，我们已基本上能自己分离侵染我国蔬菜、烟草以及其它一些经济作物和粮食作物的病毒外壳蛋白基因，并获得了许多转基因的抗病毒植株。在抗虫以及抗除草剂方面也获得了一些抗性基因和转基因植株。但是由于这些新技术的发展历史很短，我国目前的水平基本上属于跟踪国际发展的阶段，所采用的研究技术路线和方法基本上与国外的相同，还未能有新的重大突破。不过当我们积累了足够的经验，并有一定的研究人员以及设备和实验室后，就有可能在较大范围内取得突破，走出自己的路。目前我国有几个实验室已初步具备了这样的条件，并已开始注意寻求新的途径。

植物基因工程的发展趋势

展望本世纪最后的 10 年，将是植物基因工程技术迅速发展的 10 年，也是这种高技术开始显示出巨大生产力的 10 年。除了这些已获得的有重大价值的转基因植物进入生产使用外，还将在以下几个方面有重大突破：

转基因技术的突破 80 年代初最早获得转基因植物是利用一种土壤细菌即土壤农杆菌做为载体来导入基因的，这种细菌在侵染植物细胞后能将细菌所带的 Ti-质粒上的一段 DNA 插入到植物细胞器基因组中而引起植物产生冠瘿瘤。利用这一特点，人们重建了植物基因工程载体，并获得了一系列转基因植株。但是，由于土壤农杆菌只能侵染大部分的双子叶植物和少数单子叶植物，使农作物的基因工程受到很大限制。近几年来人们不断地在探索转化农作物的新途径，这些包括使用电击法、微弹射击法、PEG 法以及其它一些直接将 DNA 导入的方法。今后的 10 年内，这些新技术将不断完善，同时还会有一些新的基因导