

李宗道等 编著

麻类 生物工程 进展



中国农业出版社

麻类生物工程进展

李宗道等 编著

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

麻类生物工程进展/李宗道等编著. -北京: 中国农业出版社, 1999. 8

ISBN 7-109-06022-5

I. 麻… II. 李… III. 麻类作物-生物工程-研究
IV. S563

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 31913 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 沈镇昭

责任编辑 王本利

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

1999 年 10 月第 1 版 1999 年 10 月北京第 1 次印刷

开本: 850mm×1168mm 1/32 印张: 11.625

字数: 292 千字 印数: 1~800 册

定价: 28.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

其他编著人员

张福泉 郑思乡 蒋建雄

前 言

60年代第一次农业革命的兴起，显著地推动世界经济的发展。国内外有关权威专家、学者预言，生物工程革命的风起云涌，又将引起一场新的农业革命。它将为人类作出不可估量的贡献。

本人从事麻类教学、科研工作已半个世纪。我们预见到生物工程的迅速发展和巨大的潜力将对麻类生产和麻纺工业产生积极的影响，因此将20多年来本人指导的硕士、博士研究生有关麻类生物工程方面的毕业论文，以及科研协作单位专家、教授们共同研究的有关这方面的论文，并广泛收集国内外有关麻类生物工程方面公开发表的资料，精选、编辑成册。全书共分四篇，即基因工程、细胞工程、微生物工程和酶工程。

本书可供综合性大学、师范院校、农业院校、科研单位，以及麻纺企业等方面从事有关麻类生物工程、教学、研究工作人员参考。

李宗道

1998年10月 长沙

目 录

第一篇 基因工程

第一章 苎麻	3
第一节 外源基因导入	3
一、材料与方法	3
二、结果与讨论	4
第二节 外源 DNA 导入	5
一、外源 DNA 导入的理论依据	5
二、外源 DNA 导入技术	6
三、外源 DNA 导入后代的遗传变异	15
四、外源 DNA 导入的细胞、分子遗传学验证	15
第二章 亚麻	20
第一节 外源基因导入	20
一、农杆菌介导转移抗“绿黄隆”基因	20
二、影响亚麻植株转化的因素	25
三、亚麻转基因植株的再生及其特性	29
第二节 外源 DNA 导入	35
一、供体与受体的选择	35
二、DNA 的快速提取与纯化	36
三、外源 DNA 导入的时期与方法	38
四、变异后代的筛选与鉴定	40
主要参考文献	42

第二篇 细胞工程

第一章 苎麻	46
第一节 组织培养	46
一、器官培养	46
二、花药培养	66
三、原生质体培养	79
四、体细胞杂交	88
五、人工种子研究	89
六、体细胞无性系变异	105
第二节 染色体工程	109
一、染色体数目、核型与减数分裂	109
二、多倍体与非整倍体	121
三、单倍体	134
第二章 亚麻	151
第一节 组织培养	152
一、器官培养	152
二、花药培养	163
三、原生质体培养	166
四、胚培养及离体子房受精	169
五、体细胞无性系变异	173
第二节 染色体工程	175
一、染色体数目	175
二、单倍体	176
第三章 大麻	177
第一节 组织培养	177
一、器官培养	177
二、单细胞培养	179
第二节 染色体工程	179
一、染色体数目与构型	179

二、多倍体	180
第四章 黄麻	181
第一节 组织培养	181
一、器官培养	181
二、花药培养	182
三、原生质体培养及胚胎发生	183
第二节 染色体工程	188
一、染色体数目与构型	188
二、多倍体与单倍体	189
三、黄麻不同种间的染色体数目和染色体变化	193
四、黄麻杂交的细胞遗传	194
第五章 红麻	196
第一节 组织培养	196
一、器官培养	196
二、花药培养	199
三、原生质体培养	207
第二节 染色体工程	207
一、染色体数目与构型	207
二、花粉母细胞减数分裂	210
三、单倍体与多倍体	211
第六章 苘麻（青麻）与龙舌兰麻	214
第一节 青麻	214
第二节 龙舌兰麻	216
一、组织培养	216
二、染色体工程	218
主要参考文献	219

第三篇 微生物工程

第一章 苕麻	226
---------------------	-----

第一节 微生物脱胶菌株的筛选	227
一、需氧脱胶菌株的筛选	228
二、厌氧脱胶菌株的筛选	231
三、脱胶菌株的诱变育种	235
第二节 脱胶酶活力的测定方法	236
一、次亚碘酸法和比色法	237
二、实效标准管法	238
三、半微量测定法	238
四、透明圈法	240
第三节 微生物脱胶工艺	241
一、微生物脱胶的基本原理	241
二、影响微生物脱胶的因素	242
三、菌种扩大培养	245
四、脱胶工艺	250
五、脱胶效果及其效益	252
第二章 亚麻	256
第一节 微生物脱胶原理	256
一、微生物浸渍发酵的过程	256
二、影响天然浸渍的外界因素	259
三、常见的几种天然浸渍方法	263
第二节 加菌脱胶	264
一、脱胶菌株的筛选	265
二、脱胶方法与效果	268
第三章 大麻	269
第一节 微生物脱胶原理	269
一、物理作用阶段	270
二、生物学预行阶段	270
三、主期发酵阶段	271
第二节 天然浸渍方法	272
第四章 黄麻和红麻	275
第一节 微生物脱胶的基本原理	275

第二节 常用的几种微生物脱胶方法	280
一、整株浸洗	280
二、鲜皮、干皮浸洗	282
第三节 人工培养微生物脱胶	283
一、脱胶菌株的筛选及其适宜的培养条件	284
二、微生物脱胶工艺	289
第五章 微生态增产菌	293
第一节 微生态增产菌作用机理	293
一、植物微生物生态学的产生及其发展	293
二、植物微生物生态学的科学内涵	294
三、植物微生物生态学研究的意义和实用价值	294
第二节 苎麻增产菌	295
一、苎麻增产菌的增产效果	295
二、苎麻增产菌的施用方法	299
第三节 红麻增产菌	300
一、广谱增产菌的增产效果	300
二、广谱增产菌的施用方法	301
第四节 增产菌粉剂发酵机及工艺介绍	301
主要参考文献	302

第四篇 酶 工 程

第一章 苎麻	308
第一节 菌株的筛选、产酶条件和酶反应条件	309
一、产酶菌株的筛选	309
二、产酶条件和酶反应条件	310
第二节 酶脱胶工艺	314
一、脱胶酶类型和作用机理	314
二、酶脱胶工艺及其效果	316
第二章 亚麻	324

第一节 酶反应条件	324
第二节 酶脱胶工艺和脱胶效果	327
第三章 红麻	331
第一节 产酶菌株的筛选	331
一、初筛	331
二、复筛	331
第二节 脱胶菌株的产酶条件	332
一、碳源种类对产酶的影响	332
二、氮源对产酶的影响	333
三、培养基初始 pH 对产酶的影响	333
四、酶活高峰期	334
五、Tween80 对产酶的影响	334
六、通气量对产酶的影响	334
第三节 影响酶脱胶的因素	334
一、酶的最适反应温度	334
二、酶反应最适 pH	335
三、酶的酸碱稳定性	335
四、酶的热稳定性	335
五、酶的抑制与激活	336
六、麻皮预处理	337
七、加酶量	337
第四节 红麻干皮脱胶	337
第四章 麻织物的生物整理	339
第一节 苎麻	339
一、苎麻织物生物整理的原理	340
二、酶反应条件	342
三、酶处理工艺	344
四、酶处理效果	348
五、生物整理的经济效益	351
第二节 大麻	351
一、纤维素酶对大麻织物的作用机理	352

二、影响酶洗效果的因素	352
三、酶处理工艺	353
主要参考文献	355

第一篇 基因工程

培育农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,即基因工程技术和外源 DNA 导入工程技术。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。基因工程无疑地可以实现人工控制分子、定向育种的目的,但由于这一高新技术的复杂性,需要有专业的技术人才,现代化设备和充足的经费,因此目前国内仅限于少数几个国家级实验室进行。中国农业科学院棉花研究所于 1996 年利用基因工程技术育成抗棉铃虫新品种,并进行大面积示范。陈德富、李宗道(1996,湖南农业大学苎麻研究所)以根瘤农杆菌 $C_{58}C_1$ 和发根农杆菌 A_4 为转化菌株,对苎麻叶片进行遗传转化,在国内首次取得成功。

外源 DNA 直接导入植物技术的设想,是周光宇教授(1974,中国科学院上海生物化学研究所)首先提出的。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、水稻上进行研究,他们成功地获得了广泛变异的性状,并筛选出新品种。目前在全国范围内,在水稻、小麦、大麦、棉花、大豆、花生、蔬菜、瓜类等方面的基因转移研究取得了良好的育种效果,在技术上不断完善,并有所发展。

近年来,李宗道考虑到外源 DNA 导入植物技术已广泛地应用于一年生作物的农业分子育种研究方面,卓有成效,但它对多年生、小花作物—苎麻,还没有很好地应用。因此从 1996 年开始,李宗道、张福泉等(湖南农业大学)与周光宇(中国科学院

上海生物化学研究所)、周建林(中国科学院长沙农业现代化研究所)共同协作,对苧麻外源 DNA 导入的分子育种技术进行广泛而深入地试验研究,目前已对供体、受体选择、DNA 提取与检测、外源 DNA 直接导入方法等方面进行广泛的研究与改进,并且获得了明显的变异植株。这些为苧麻品种改良、遗传转化和外源 DNA 导入技术的改进,展现了可喜的前景。

浙江省萧山棉麻研究所于 1997 年成功地提取黄麻、亚麻 DNA,并以改良红麻纤维品质为目的的外源 DNA 导入上已获得了初步成功。

第一章 苧 麻

第一节 外源基因导入

在植物遗传工程研究中,应用最为广泛的是通过农杆菌介导的基因转移系统。据统计,目前已有 60 多种植物获得了转基因植物,其中 80% 以上是由农杆菌介导转移成功的。苧麻是我国特产和重要出口创汇作物,目前通过传统的杂交育种方法选育出一个优良品种至少需要十多年,致使新选育出来的优良苧麻品种寥寥无几。陈德富、李宗道等(1996, 湖南农业大学苧麻研究所)进行了苧麻基因导入研究,为将来开展苧麻目的基因工程育种提供技术基础和理论基础。

一、材料与方方法

1. 苧麻试管苗叶片的获取 苧麻品种材料为“湘苧三号”。采用常规种子消毒及无菌发芽方法。接种地上部到附加 0.05mg/L 的 1/2MS 培养基上,30d 后即可形成试管苗,取顶部三片叶为试验用叶片,叶片切成 1cm×1cm 大小。

2. 菌株及培养

(1) 根癌农杆菌 $C_{58}C_1$ (pBz6111) 该菌携带一个改建过的 Ti 质粒,切除了 3T—DNA 上的致癌基因,仅存在编码异戊烯基转移酶基因,即基因 4.km^r。培养方法为附加 25mg/L km 的 YEP₁₂₁₃ 固体培养基(酵母膏 10g/L,牛肉膏 5g/L,蔗糖 5g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g/L,琼脂 1.2%, pH7.0~7.2)上划线培养至出现明显的单菌落时,挑选一个单菌落转接至除不

含琼脂外,其它成分完全相同的液体培养基上培养至对数生长期。

(2) 发根农杆菌 A_4 该菌携带一个改建过的 T_1 质粒,切除 T-DNA 基因 4, 留下编码色氨酸单加氧酶和吲哚乙酰胺水解酶基因,即基因 1, 2. km^s。培养方法在 YEP₁₂₁₃ 固体培养基上划线培养至出现明显的单菌落时挑选一个单菌落转接至成分相同的液体培养基上培养至对数生长期。

所有菌种培养温度为 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 黑暗条件, 液体培养的摇床转速为 125r/min。

3. 共培 农杆菌液培至 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8 时, 用 MSB 液体培养基稀释 100 倍, 取 5ml 菌液稀释液加入到试管中含菌叶片经 MSB 液体预培养基预培养 48h 的预培养基中, 共培 48h。倒掉培养基, 取出叶片在无菌纱网上用 3% 蔗糖水冲洗 4~5 次, 再用含 750mg/L 先锋霉素 V 的 3% 蔗糖水浸泡几 min。取出无菌滤纸吸干叶片表面水分, 转置含 750mg/L 先锋霉素 V 或不含先锋霉素 V 的 MSB 选择培养基上交替培养。C₅₈C₁ 转化材料的选择培养基中附加 25mg/L km。每 4~6d 转接一次, 至 30d 统计其生长情况。以不经农杆菌介导的叶片为对照培养。培养室温度为 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 16h 光照, 8h 黑暗。

二、结果与讨论

经过 C₅₈C₁ 介导的叶片叶脉处在 12d 时, 有肉眼可见的愈伤组织发生; A_4 转化的叶片在第 21d 时虽然无愈伤组织产生, 但有少量根系发生, 而这时对照材料既不愈伤化, 也不发生不定根, 且叶片黄化, 死亡明显。30d 统计其愈伤状况、发根情况, 见表 1-1。可见对照无根系或愈伤组织产生; C₅₈C₁ 转化的叶片无不定根产生, 但有较高的愈伤率; A_4 转化的叶片无愈伤组织产生, 但有较高的生根率。这说明由于 T-DNA 上基因的介入, 致使苎麻叶片内源激素水平发生变化而出现转化愈伤组织或转化

根。这也说明苎麻叶片内生长素水平较高。吗基因 4 导入, 生长素/细胞分裂素比值降低, 导致愈伤组织产生; 吗基因 1, 2 导入, 生长素/细胞分裂素比值提高, 导致不定根发生。通过这种激素基因工程来改变内源激素水平的方法是否可以为培养难以成功的苎麻体细胞胚胎发生、花药培养等的解决提供新的途径? 由于本试验用的先锋霉素 V 对农杆菌杀菌力低, 大量的农杆菌存活于选择培养基中, 致使所得转化愈伤组织, 转化根无法用于继续研究。

表 1-1 农杆菌对苎麻叶片的转化效果
(陈德富等, 1996)

菌 株	接种叶片数	产生愈伤组织的叶片数	产生不定根的叶片数
对照	80	0	0
C ₅₈ C ₁	80	42	0
A ₄	80	0	17

第二节 外源 DNA 导入

植物外源 DNA 导入技术属于分子水平的遗传工程。植物外源 DNA 导入技术是以植物生长过程中主要世代交替的种胚细胞或茎端分生组织细胞为靶细胞, 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, 培育出新品种的技术。它与基因工程技术相比, 方法简便易行, 经济有效, 无需分离目的基因和专门的载体; 不必离体培养和诱导再生植株; 这个技术已为我国广大育种工作者采用, 并取得了很大的进展。

一、外源 DNA 导入的理论依据

我国自 50 年代开展了广泛的远缘杂交育种, 育成高粱稻、玉米稻、稗草稻、芦苇稻和竹子稻等, 这些远缘杂交种, 除了基本性状与母本水稻相似外, 还出现了一些异源父本或特殊的变异