

生物技术在牧草育种中的应用

李 聪

(中国农业科学院 畜牧研究所, 北京 100094)

摘要:综述了近20年来生物技术在牧草育种中的主要研究进展。包括植物细胞和组织培养在牧草种质资源保存、体细胞杂交和胚胎拯救技术在克服种间杂交障碍、分子标记和转基因技术在牧草品质改良、抗病虫、抗逆性育种和作为生物反应器等方面的应用前景。

关键词:牧草; 育种; 生物技术

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)S2-0073-04

Application of biotechnology to forage plants breeding

LI Cong

(Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: This paper summarized the main research progress of biotechnology on forage plants breeding in the past 20 years. It includes: application prospect of plant cell and tissue culture for germplasm conservation; somatic hybridization and embryo rescue to overcome hybrid barrier between species; technologies of molecular marker and transgenic plant for improvement of forage quality, resistance to disease, pest and abiotic stress; and transgenic plant as a bioreactor.

Key words: forage plants; breeding; biotechnology

牧草在农业的可持续发展、水土保持和生态环境治理等方面正起着越来越重要的作用。因而随着近20年来,以基因工程、细胞工程和酶工程等为代表的生物技术的迅猛发展,牧草的生物技术研究也在不断拓展,并取得了不少可喜的研究成果。可以说,生物技术正在改变着传统的牧草育种方式及饲草生产体系。

1 牧草种质资源保存

目前,全球饲用植物约有近7 000种。由于人力和财力的限制,现被有效研究和利用的仅占其中的约15%,在人为因素和自然环境变化等作用下,物种消失的速度正在加快。

牧草种质保存一般分为原生境(*in situ*)保存和

异生境(*ex situ*)保存两种。前者主要是通过自然保护区的建设和管理来实现。这种保存方式是比较被动的,往往只能延缓物种消亡的速度,而且相对成本较高。同时,随着全球气候变化加剧等因素,许多植物种群还是难以得到安全彻底的保护,其丢失是不可避免的。第二种的异生境保存方式包含:搜集有代表性的种质资源、并将它们的种子、可繁殖组织或器官等安全地保存在种质资源库或植物园中。目前,利用种子保存仍然是饲用植物种质保存中最常用的方法。

植物组织培养方法为有效地进行饲用植物种质保护提供了新途径。植物组织的离体培养正在被用于牧草种质资源的保存,它具有以下优点:(1)可以利用较小的空间保存较多的种质资源;(2)保存方法

收稿日期: 2004-09-18

作者简介: 李 聪(1958-),男,研究员,博士; E-mail: licong0520@sina.com

基金项目: 科技部转基因植物研究与产业化专项(J2002-B-008-02)

相对简单,并且成本较低;(3)无性繁殖的潜力较高;(4)可以完全避免遗传侵染(尤其是种子保存中的大田遗传侵染);(5)可以繁殖无病的植物材料。例如,日本研究人员用紫花苜蓿、红三叶和白三叶的离体组培苗,在2~6℃低温下,保存15~18个月后,其成活率仍保持70%~95%。近年来,有些研究人员正试图利用液氮的极低温(-196℃)来保存苜蓿等饲草的离体茎尖组织、愈伤组织和体细胞胚状体等,以达到长期保存植物种质资源的目的^[1]。

2 牧草育种

通过育种方法,改良牧草的主要目的有:(1)培育高产新品种。(2)提高饲草品种的品质和农艺生产性状。(3)培育抗病虫、抗逆、耐牧等新品种。生物技术的发展为加速牧草育种进程提供了有力的武器。

2.1 体细胞杂交和胚抢救技术,克服种间杂交障碍

在育种中,为了获得特定的遗传性状,有时需要进行种间远缘杂交,但因种间生殖隔离,常因受精前障碍——花粉、雌蕊不亲和性;或受精后障碍——胚败育等问题使远缘杂交失败。体细胞杂交是克服受精前障碍——花粉、雌蕊不亲和性的最有效办法之一。它用酶解去除杂交植物的细胞壁,形成游离的原生质体,在缓冲液中,经电脉冲或化学调渗剂作用,实现双亲原生质体的融合杂交,然后通过细胞培养分化,再生出杂种植株。而胚抢救则是克服受精后障碍——胚败育的主要方法之一。它利用组培方法,在杂交授粉后的特定发育阶段,对杂种胚胎、胚珠和子房进行培养,使其免于败育而形成杂种植株。

在牧草中,苜蓿属种间体细胞杂交是研究最多的。其研究开始于1983年,直到1990年才成功地获得了紫花苜蓿 *M. sativa* 和多变苜蓿 *M. varia* 的体细胞杂种植株。1992年获得了紫花苜蓿 *M. sativa* 和蓝花苜蓿 *M. coerulea* 的体细胞杂种植株,1994年获得了紫花苜蓿 *M. sativa* 和灌木苜蓿 *M. arborea* 的体细胞杂种植株。在三叶草、百脉根、羊茅和黑麦草等属的饲草中,均已有的体细胞杂交成功的研究报导。此外,近十年来,还获得了紫花苜蓿与红豆草 *Onobrychis viciifolia*、百脉根 *Lotus corniculatus*;及百脉根与秣食豆 *Glycine max*、苇状羊茅和黑麦草等属间体细胞融合的杂种植株。在苜蓿、三叶草、百脉根、羊茅和黑麦草等属中,也已有许多胚抢救成功获得种间杂种植株的报导。这些都极大地丰富了杂交育种的手

段。时至今日,尽管基因工程技术有了突飞猛进的发展,但对于多基因控制的诸如产量、抗性性状的遗传转化还存在着许多障碍。因此,用体细胞杂交和胚抢救等技术,进行远缘杂交,仍然是解决问题的有效方法之一^[2]。

2.2 分子标记辅助育种和基因图谱

在育种中,常常选择与重要农艺性状紧密相关的遗传标记来提高选择的效率,这样可以加快育种的进程。DNA分子标记主要有RFLP(限制性片段长度多态性)、RAPD(随机扩增多态DNA)、AFLP(扩增片段长度多态性)、SSR(微卫星或简单重复序列)和SNP(单核苷酸多态性)等5种。这些分子标记已在苜蓿、三叶草、百脉根、羊茅、黑麦草、披碱草、羊草、鸭茅和赖草等牧草上应用。它在基因作图和典型标记性状选择等方面的作用,已初见端倪^[3]。

以基因图谱为核心的基因组学研究正在成为一个研究的热点。它以大规模的DNA测序与计算机识读的生物芯片微矩阵(Microarray)相结合,形成了一门叫做生物信息学(Bioinformatics)的新学科。通过基因组中结构基因和功能基因的分析,可以准确地了解植物生长发育、品质变化、抗病虫、抗逆、固氮等生理生化反应的遗传调控机制,为基因操作提供更有力的工具。牧草中,基因图谱研究进展最快的是苜蓿和百脉根。尤其是对二倍体截形苜蓿(*M. truncatula*)研究最多,欧美合作已完成了约15个万序列的测序。在已报道的苜蓿基因图谱中,有4个是二倍体,1个为四倍体,这是因为异质杂合的四倍体紫花苜蓿自交退化、无偏等位分离估算困难等原因,增加了其遗传分析的复杂性。在苜蓿属的8条染色体上,定位的基因已达数百个^[3,4]。

2.3 牧草的基因工程育种

转基因牧草研究于1986年首次报道,Deak等人用根瘤农杆菌,将报告基因NptⅡ(新霉素磷酸转移酶基因)导入苜蓿,并再生出转基因苜蓿。目前总体来说,豆科牧草方面的研究报导较多,主要集中在苜蓿、百脉根、三叶草等属中,禾本科饲草方面的研究起步较晚,主要集中在高羊茅、黑麦草、鸭茅等草种中。美国用基因工程方法培育的抗Basta除草剂苜蓿品种现已完成田间释放的安全性评估,有望在近期投放市场,它可能成为第一个用于大田生产的转基因牧草品种。目前牧草基因工程育种研究的主要领域涉及品质改良、抗病虫、抗除草剂、抗逆性、固氮和

作为生物反应器等方面^[5]。

2.3.1 改良牧草的品质 构成牧草品质的主要因素有: 干物质消化率、水溶性碳水化合物、蛋白质组成及含量、木质素和生物碱等。通过基因操作, 调控其代谢过程, 就可以改良牧草的品质。

(1) 木质素生物合成的基因操作。牧草在开花进入生殖生长阶段后, 木质化进程加快, 使消化率迅速下降。据试验, 肉牛在饲喂同等日粮条件下, 消化率提高 1%, 就可使活体质量增加 3.2%。目前, 已分离克隆了 4 个与木质素生物合成有关酶的基因, 即: COMT(咖啡酸-O-甲基转移酶)、4CL(香豆素辅酶连接酶)、CCR(肉桂辅酶还原酶)和 CAD(肉桂乙醇脱氢酶)。通过对它们的反义抑制调控, 显著降低了这些酶的生物活性, 改变了木质素的组成和含量。试验中, 转 CCR 基因烟草植株, 其木质素下降了 50%, 而未倒伏, 植株能正常生长发育。已开始在紫花苜蓿、矮柱花草、黑麦草和羊茅中进行相关研究。

(2) 果聚糖代谢的基因操作。在许多禾本科牧草中, 果聚糖是主要的可溶性贮存碳水化合物。增加其含量可以提高瘤胃对饲料和蛋白质的吸收。同时, 果聚糖的积累还有助于提高牧草的抗旱耐寒能力。现已从大麦中分离克隆了 3 个与果聚糖生物合成有关酶(蔗糖-果聚糖转移酶等)的基因, 并正在紫花苜蓿、白三叶、黑麦草和高羊茅中试验, 以期改善饲草的品质和抗逆性。

(3) 特殊蛋白质合成的基因操作。含硫氨基酸-蛋氨酸和半胱氨酸, 是反刍动物的必需氨基酸, 它可以减轻瘤胃微生物对饲料蛋白质的降解, 对动物生长发育, 尤其对羊毛的产量和质量有重要影响。现已分离克隆的含硫氨基酸基因有: 鸡卵清蛋白、豌豆清蛋白、向日葵清蛋白等基因, 并已在苜蓿、百脉根等饲草中试验。但由于转基因是插入到核基因组中, 其表达量较低(不到总蛋白量的 0.01%), 目前还难以在生产上利用。现已开始研究将这些基因插入到叶绿体基因组中表达, 有可能大大地增加其表达量。同时, 由于叶绿体基因组是母性遗传的, 并且具有 DNA 的多拷贝数和特殊细胞结构等优点, 开展其遗传转化研究, 将是植物基因工程的又一个新热点, 必将对今后的转基因植物研究产生重大的影响^[6]。

(4) 浓缩单宁的生物合成。浓缩单宁是通过类黄酮途径合成的, 一般在饲草中, 其含量控制在 1%~3% 为好, 它可以有效地抵御豆科草地放牧引起的臌

胀病和瘤胃寄生虫的影响, 但浓缩单宁含量过高时, 会使动物厌食和有抗营养作用。最近已发现了调控单宁合成的相关酶和基因, 其代谢调控比较复杂, 涉及 10 个以上的基因。正在苜蓿和白三叶中研究, 以期通过改变浓缩单宁的分子结构、组织分布及表达量等, 来培育无臌胀病的苜蓿和白三叶新品种。相反, 通过基因的反义调控, 也试图从高单宁含量的牧草中培育出低单宁含量的品种。

2.3.2 抗病虫、抗除草剂的基因工程育种 病虫和杂草控制已成为集约化饲草生产过程中的关键技术之一。由于植物的抗病虫、抗除草剂特性一般是由单基因或少数基因控制的, 往往转基因的效果比较明显。因此, 在过去的十几年中, 饲草抗病虫、抗除草剂育种方面的研究进展较快。分离研究的主要基因包括: 几丁质酶、葡聚糖酶、植物防御素、植物抗毒素、核糖体失活蛋白、病毒外壳蛋白、病毒复制酶、病毒运动蛋白、Bt 毒素、蛋白酶抑制剂和淀粉酶抑制剂等基因。例如, 在抗苜蓿花叶病毒(AMV)研究中, 通过利用 AMV 外壳蛋白基因的遗传转化, 已获得了抗苜蓿花叶病毒的转基因植株。大麦黄矮病毒(BYDV)和黑麦草花叶病毒(RMV)在黑麦草和羊茅中极易发病, 发病后, 可减产 24%~50%。目前, 已获得转 RMV 外壳蛋白基因的多年生黑麦草植株。用 Bt 毒素基因转化饲草, 以提高其抗虫性的研究也已展开。美国获得的抗除草剂转基因苜蓿, 已通过了大田鉴定, 不久将会在生产上推广应用。

2.3.3 提高抗逆性和固氮能力的基因操作 与农作物相比, 牧草往往种植在自然和栽培管理条件较差的地区。因而提高其抗逆性是牧草育种的主要目标之一。高等植物细胞有多种途径感受外界环境中理化参数的变化, 从而将胞外的信号变为胞内信号, 通过系列的磷酸化级联反应将信号传递给转录因子, 转录因子再作用于功能基因, 启动逆境应答基因的表达, 从而提高植物的耐逆性。植物在受到逆境胁迫时, 通过细胞内小分子有机化合物的代谢合成, 以维持细胞内外的渗透压平衡, 抵御逆境的胁迫。这些小分子有机化合物包括海藻糖、甜菜碱、糖醇、果聚糖、脯氨酸等。例如, 研究表明: 在干旱、寒冷和盐碱等逆境胁迫下, 抗逆性较强的藜科、早熟禾科及大麦、冰草等植物体内甜菜碱的合成积累较快, 而且积累甜菜碱的植物比积累脯氨酸的植物具有更强的耐渗透胁迫能力。因此, 甜菜碱被认为是最有希望的植物渗

调剂之一。甜菜碱由胆碱经两步氧化而成(胆碱→甜菜碱醛→甜菜碱),反应在叶绿体基质中进行。催化第一步反应的是胆碱单氧化酶(CMO);催化第二步反应的是甜菜碱醛脱氢酶(BADH)。本课题组已获得转化这两个基因的苜蓿和百脉根植株,进一步的抗性生理生化鉴定和分子生物学鉴定正在进行中。

目前全球工业生产固氮年总产量约为4 000万 t,而全球生物固氮年产量约为1.75亿 t,其中植物固氮约为4 400万 t(豆科植物占3 500万 t;非豆科植物占900万 t)。由于牧草种植面积在陆地面积中占有举足轻重的地位,因此,牧草的固氮基因工程研究已开始引起了科学家们的兴趣。其基因调控系统相当复杂,涉及到固氮菌和植物的相互作用,有关的基因被不断发现报导,由此产生了一个叫共生基因组学(Symbio-genomics)的研究领域。牧草中研究最多的还是苜蓿。但禾本科牧草的联合固氮研究引人关注,特别是在雀稗固氮方面。本人曾从耐盐的禾本科牧草——双稗草中成功地分离出一株耐盐、且高效固氮的联合固氮菌——肺炎克氏杆菌,通过插入 LacZ 报告基因的表达,研究该菌在根部的定植情况。

3 作为生物反应器的基因操作

利用转基因技术,将牧草、尤其是多年生豆科牧草作为生物反应器,来生产蛋白质、酶制剂、专用药品、疫苗、抗体和生物可降解塑料及其他次生代谢物等产品的研究已经起步。这是因为牧草具有生物量大、多年生、再生快、栽培管理成本低等一系列优点。

传统上,绝大多数工业酶制剂的生产是通过特殊微生物的大规模发酵培养,经收集、提取、加工和纯化而成的。这需要复杂昂贵的设备投资及工艺操作,因而生产成本较高。由于工业、环保等领域快速发展,工业酶制剂的需求量正在剧增。如应用于生物制浆、食品加工、碳水化合物及化学品的合成转化、人和动物的食品添加剂、环境中有毒或污染物的降解去毒等。当前在工业上常用的酶类中,约有20种可以做到比较便宜地大规模生产。但有些酶的生产成本是非常高昂的。

近十年来,随着以基因工程为核心的生物技术的迅猛发展,科学家们通过应用转基因技术,将转基因苜蓿作为一种生物反应器,用来生产特殊的工业酶制剂,开辟了苜蓿开发利用的一个新领域,显示出

其潜在的商业价值。美国 Wisconsin 大学的研究人员正在研究用基因工程方法,从微生物中克隆目的基因转化苜蓿,然后从转基因苜蓿中提取纯化目标酶,从而大大地降低了一些特殊酶的生产成本,提高了苜蓿的附加值。

目前研究较为成功的例子有如下两种酶:第一是 Mn 依赖型的木质素过氧化物酶(Mn-P)。其编码基因是从一种叫 *Phanerochaete chrysosporium* 的微生物基因组中克隆的,它实际上是一种真菌木质素降解酶,在工业上可用于生物制浆和生物漂白。第二种酶为 α -淀粉酶。其编码基因是从 *Bacillus licheniformis* (地衣芽孢杆菌)基因组中克隆的。这种酶被广泛用于淀粉加工工业。上述两种酶已通过转基因苜蓿成功地小规模试验生产。根据初步的试验结果分析,大幅度提高了苜蓿的产值。这为牧草高附加值产品的开发利用提供了思路。此外,利用转基因技术,培育防口蹄疫、霍乱和腹泻疫苗的苜蓿品种的研究也已启动。

参考文献:

- [1] TOSHIHIKO YAMADA, KENJI OKUMURA. Germplasm conservation, biotechnology and the improvement of forage legumes[M]. Cambridge: Cambridge University Press in UK, 1997. 43-60.
- [2] ARCIONI S, DAMIANI F, MARIANI A, et al. Somatic hybridization and embryo rescue for the introduction of wild germplasm, biotechnology and the improvement of forage legumes[M]. Cambridge: Cambridge University Press in UK, 1997. 61-89.
- [3] BROUWER D J. A molecular marker linkage map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. Theor Appl Genet, 1999, 99:1 194-1 200.
- [4] BROUWER D J. Mapping genetic factors associated with winter hardiness, fall growth, and freezing injury in autotetraploid alfalfa[J]. Crop Sci, 2000, 40:1 387-1 396.
- [5] McKERSIE B D, BROWN D C W. Biotechnology and the improvement of forage legumes. Cambridge: Cambridge University Press in UK, 1997.
- [6] HENRY DANIELL, Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(2): 84-91.

【责任编辑 柴 焰】