

综 述

生物技术在我国烟草研究领域的应用^{*}杨铁钊¹ 鲁黎明¹ 王瑞华²

(1 河南农业大学农学院 河南郑州 450002; 2 郑州烟草研究院 河南郑州 450001)

摘 要: 烟草是重要的经济作物,也是研究植物生命活动的模式植物。随着分子生物学研究的不断深入,分子生物学的研究手段在烟草基础理论研究领域得到了越来越多的应用,并且取得了重大进展。本文综述了生物技术在我国烟草研究领域的应用及取得的成就,并对以后的发展趋势进行了展望。

关键词: 烟草; 转基因; 分子生物学; 生物技术

中图分类号: S572 **文献标识码:** C **文章编号:** 1004—5708(2006)03—0039—07

Application of biotechnology in tobacco research in China

YANG Tie-zhao¹ LU Li-ming¹ WANG Rui-hua²

(1 Agronomy College of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002;

2 Zhengzhou Tobacco Research Institute of CNTC, Zhengzhou 450001)

Abstract: Tobacco is a very important economic crop and also a model plant in plant science research. With the development of molecular biology research, tobacco science research has made great progress with the aid of molecular biotechnology. In this paper, the application and achievements of biotechnology in tobacco research in China and are reviewed and the prospects for development are discussed.

Key words: tobacco; gene transformation; molecular biology; biotechnology

栽培烟草在植物分类上属于茄科烟属的红花烟草及黄花烟草种。它是一个重要的经济作物,在我国的国民经济中扮演着重要的角色。同时,作为一个模式植物,烟草在植物生命科学研究中发挥着十分重要的作用。随着分子生物学研究的快速发展,生物技术在烟草基础研究方面得到了广泛的应用。1995年,利用分子标记技术,首先发现了抗烟草根黑腐病相关的烟草基因型。随后,在病原菌的同源性分析、病毒的序列及分子进化分析、病原菌及病毒的检测方面,运用生物信息学及分子生物学的研究手段,也取得了重大成就。作为模式植物,烟草在生物功能基因组研究中,占有举足轻重的地位。运用基因工程手段,先后将生物

的一些与抗病、抗虫、抗旱、抗盐、抗冷、抗热、抗除草剂以及光合作用、营养元素的吸收利用等相关的转录因子或功能蛋白转入烟草,并获得了这些性状得到改善的转基因烟草。本文对生物技术在烟草抗病、抗虫、抗逆及光合作用、营养元素利用等研究方面的应用进行了综述,并对以后的发展趋势进行了展望。

1 优质与高光效研究

近年来,生物技术在作物遗传育种领域的应用,使得传统的作物育种发生了重大的变化。人们利用基因工程手段来改良作物品种,获得了巨大的成功。生物技术在烟草育种的应用,同样取得了很大的成效。江豪等^[1],利用花粉管通道法,直接将外源紫云英基因组DNA导入烤烟品种Coker319。然后,通过与常规育种手段相结合,选育出了优质(特别是香气质好,香气量大)、适产、抗病、适应性广、抗逆性强的烤烟新品系金烟6号。金烟6号的上等烟比例最高达38.58%,均

作者简介: 杨铁钊(1958—)河南临颖人,教授、博士生导师,主要从事烟草遗传育种研究。E-mail: yangtiezhao@sina.com.

收稿日期: 2005-09-30

价达 3.02 元/kg。其内在化学成分协调, 叶片含钾量最高可达 3.02%。

烟草的光合作用是烟叶产量及品质形成的前提和基础。因此, 提高烟草的光合效率是提高烟叶产量和品质的重要措施。周玮等 (2003)^[4] 对 Mn-SOD 高表达转基因烟草品系进行了 CO₂、光强对烟草光合作用及蒸腾作用的影响及不同叶位叶片的光合差异的研究。结果表明, 转基因烟草 CO₂ 补偿点最高 (105 μmol·mol⁻¹), CO₂ 浓度对非转基因烟草蒸腾作用的影响比对转基因品系的影响要强; 转基因烟草的光补偿点最低 (25 μmol·m⁻²·s⁻¹), 并且强光对非转基因烟草的光合作用抑制大, 转基因品系对强光具有较强的耐受力; 相同叶位的叶片相比, 转基因烟草的光合速率、蒸腾速率比对照更具优势。

2 提高营养元素利用效率的研究

我国是一个资源相对贫乏的国家。在农业生产中, 肥料利用效率低是制约生产发展的重要因素之一。因此, 提高农业资源的利用效率, 是实现我国农业可持续发展的重要前提。基因工程在作物遗传育种领域的应用, 将为这一问题的解决, 开辟一条崭新的途径。

2.1 钾

烟草是对钾需求量较大的作物, 而我国耕地土壤中缺钾则是一个普遍存在的问题。因此, 如何提高烟草对钾的利用效率, 是摆在烟草科技工作者面前的重大课题。郭兆奎等 (2005)^[3], 利用农杆菌介导的遗传转化法, 将拟南芥的钾转运体基因 AtKUP1 转入烟草, 经 PCR 及 Southern 杂交分子检测, 证实 AtKUP1 已经整合到烟草基因组中。荧光定量 PCR 分析的结果表明, AtKUP1 基因已经在烟草中成功进行转录。对转基因阳性植株后代的分析表明, 其叶片含钾量达 2.63%, 比对照提高了近 45%。

2.2 磷

磷是植物生长发育所必需的三大营养元素之一。在农业生产中, 虽然每年都要施用大量的磷肥, 然而, 据估计当季磷的利用率仅有 10%~20%, 其余的部分则在土壤中被固定。因此, 提高土壤中磷的利用率, 也是迫切需要解决的问题之一。在利用基因工程手段改善作物对磷的利用效率方面, 我国的烟草科技工作者进行了有益的尝试。孔凡利等 (2005)^[4], 将枯草芽孢杆菌植酸酶基因转入烟草, 然后, 检测转植酸酶基因烟草对植酸磷的吸收和利用与对照的差异。试验在无菌培养基、砂培和土培中进行。研究的结果表明, 在无菌

培养条件下, 与对照相比, 转基因烟草的生物量提高了 3.6~10.7 倍, 总磷吸收量提高了 2.2~4.6 倍, 说明转植酸酶基因烟草对植酸磷的吸收利用能力有了显著提高。而在砂培和土培试验中, 两者在生物量和总磷吸收量方面的差异不显著。因此, 他们认为在无菌条件下, 转植酸酶基因可以提高植物吸收利用植酸磷的能力, 而在自然条件下, 转基因植物不能充分发挥作用。

3 烟草抗逆研究

在农业生产中, 干旱、盐碱及冷害是常见的自然灾害。烟叶生产中, 干旱常常限制烟叶产量的提高和品质的改善。开展农作物的抗逆性研究, 对于农作物提高产量、改善品质具有十分重要的意义。

3.1 抗旱

赵恢武等 (2000)^[5] 将拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的干旱诱导性启动子 Prd29A 及酿酒酵母的海藻糖-6-磷酸合酶基因 (*TPS*) 克隆出来, 然后构建到植物表达载体上, 利用根瘤农杆菌, 将外源基因转入烟草。对转基因烟草进行 Southern 及 Northern 检测, 结果表明, *TPS* 基因已经整合到烟草的基因组中, 并且其表达受到干旱胁迫的诱导。转基因烟草的形态也发生了变化, 其株高变矮、茎秆变细、叶片变成柳叶状, 抗旱性明显增强。

3.2 抗盐

甜菜碱是广泛存在于生物体内的一种重要的渗透调节物质, 它广泛参与生物体内的渗透调节。李秋莉等 (2003)^[7] 将胆碱单加氧酶 (Choline monooxygenase, CMO) cDNA 从盐生植物辽宁碱蓬 (*Suaeda liaotungensis* Kitag) 中分离出来。然后, 构建植物表达载体 pBI121-CMO, 并利用根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导转化烟草 (*Nicotiana tabacum* L. cv. 89), 最后, 获得了具有卡那霉素抗性的阳性植株。耐盐性鉴定试验证明, 转基因烟草能在含 250 mmol/L NaCl 的培养基中正常生长, 表现出一定的耐盐性。生理指标的测定表明, 转基因烟草膜的相对电导率明显低于对照, 其甜菜碱含量则明显高于对照。

ERF 是一类与逆境胁迫相关的转录因子。OPBP1 即属 ERF 类转录因子。刘文奇等 (2002)^[8] 将烟草的 OPBP1 基因对烟草进行转化, 获得了该基因超表达的植株。转基因阳性植株的耐盐能力明显增加。在含 200 mmol/L NaCl 的 1/2MS 培养基上, 非转基因烟草的种子不能萌发, 而转基因烟草种子的萌发率都在 60% 以上。在进行 Northern 杂交后, 他们发现 OPBP1 基因

表达的程度有所不同,其表达的丰度与其耐盐性表现呈一定的正相关。

何培民等(2001)^[9]将土壤细菌(*A. globiformis*)的乙酰胆碱氧化酶(COD)基因(*codA*)利用农杆菌介导法转入到烟草中,并成功获得了阳性植株。通过 Western 印迹鉴定及金标免疫分子定位分析,证明 *codA* 在转基因烟草中得到表达,并将表达产物(COD)定位在叶绿体中。对转基因植株的抗盐能力的分析结果表明,转基因植株比对照植株具有更高的抗盐性,其中 1.0~1.5 cm 的幼小植株可在含 400 mmol/L NaCl 的培养基上存活 30 天以上,6~8 cm 的较大的植株也能在该浓度下较好生长。

周涵韬等(2004)^[10]将从红树植物白骨壤(*Avicennia marina*)分离出的耐盐基因 CSRG1 转入烟草,获得了 11 个转基因阳性品系。分子检测的结果表明,CSRG1 基因在转基因阳性植株中得到表达。耐盐性鉴定结果显示,在含 NaCl 2% 及由全海水(盐度为 24)配制的 MS 培养基上,转基因植株的成活率仍能保持在 80%~90%,株高比对照增加 20%~40%。

AtNHX1 是鉴定出的第一个高等植物 Na⁺/H⁺ 反向转运蛋白。它的过量表达,可使拟南芥在含 200mmol/L NaCl 的介质中正常生长。王先艳等(2003)^[11]将 AtNHX1 从拟南芥中克隆出来并转入烟草。结果发现,转基因阳性烟草植株的耐盐能力得到极大提高。在含 NaCl 3% 的 MS 培养基上,转基因烟草叶盘的存活率为 61%,而对照叶盘则全部死亡。

3.3 抗热

刘明求等(2005)^[6]通过对高表达 Mn-SOD 及 POD 的转基因烟草品系的研究表明,与对照相比,转基因烟草品系的 SOD 活性更强、丙二醛含量更低,其生物量受到的影响变小。其中,转基因 POD 高表达品系耐 38℃ 高温的能力最强。由此,他们认为,通过转基因的方法可以提高植物的抗热性。

3.4 抗冷

冷害是在农业生产上常见的一种造成农作物减产甚至绝收的自然灾害。基因工程技术为抗冷品种的培育开辟了一条新的途径。甄伟等(2000)^[12]将拟南芥的冷诱导基因的转录因子 CBF1 (C-repeat binding factor)转入烟草中。然后,对经 PCR 及 Southern 检测阳性的转基因植株用电质渗透法检测其抗寒性。结果表明,转基因烟草的电导率较阴性对照低,表明其抗寒性有了一定程度的提高。

4 抗病虫研究

4.1 病原菌及病毒分子生物学特征分析

4.1.1 分子标记的应用

作为一种特殊的遗传标记,分子标记是二十世纪八十年代后期发展起来的。它在基因组水平上反映了生物的遗传多样性,广泛应用于遗传育种与种质资源的研究。在植物上应用较多的 DNA 分子标记有 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, 限制性片段长度多态性), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNAs, 随机扩增多态性 DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, 扩增片段长度多态性) 及 SSR (Simple Sequence Repeat, 简单重复序列) 等。目前,在烟草研究中应用较多的是 RAPD 分子标记。

RAPD 的原理是以随机排列的长度约为 10bp 的寡核苷酸序列为引物,对植物的基因组 DNA 进行随机扩增,经琼脂糖凝胶电泳后,最后通过凝胶成像显示出基因组 DNA 序列的多态性。

早在二十世纪九十年代,国外学者就已经发现了 2 个与烟草根黑腐病抗性基因紧密连锁及 5 个与烟草野火病抗性基因连锁的 RAPD 标记^{[13]、[14]}。

张修国等^[13](2001)利用 RAPD 标记对烟草黑胫病菌全基因组 DNA 遗传多态性进行了研究,并对其与来源不同的烟草黑胫病菌株的亲缘关系、致病性强弱的关系进行了分析。结果表明,烟草黑胫病菌具有稳定的遗传多态性,来源不同的菌株亲缘关系相近,不同年份黑胫病菌株的遗传分化与黑胫病发生危害程度呈正相关。

4.1.2 序列分析与分子进化分析

烟草丛顶病是发生在云南西部烟草种植区的一种严重病害。导致烟草丛顶病的病毒有烟草脉扭病毒(*Tobacco vein distorting virus*, TVDV)及烟草丛顶病毒(*Tobacco brushy top virus*, TBTv)。一般把 TVDV 作为黄症病毒科的成员。莫笑晗等(2003)^[16]通过分析黄症病毒科及马铃薯卷叶病毒属成员的核酸序列,设计出简并引物。然后,利用 RT-PCR 的方法,从烟草丛顶病植株总 RNA 中扩增得到了长度为 1654bp 的片段。通过序列分析及对所编码蛋白的分子进化树分析,证实 TVDV 为黄症病毒科的确定成员,同时,他们推测 TVDV 还应当是马铃薯卷叶病毒属的一个新成员。这是 TVDV 的分子生物学特征的首次报道。此外,他们还获得了 TBTv 的核苷酸全长序列,这是国际上完成的首个烟草丛顶病毒全序列测定^{[17]、[18]}。

4.2 利用基因工程的手段提高烟草抗病性

张凯等(2005)^[19]将烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)的部分运动蛋白基因(Δ MP)构建成反向重复结构,构建到植物表达载体pBin438上,然后,通过农杆菌介导法转化烟草(*Nicotiana tabacum*)品种云烟87,并获得了50株转基因烟草。对转基因烟草进行的TMV接种实验显示,转基因烟草对TMV的抗性包括3种类型:免疫型(10%),抗病型(4%)及感病型(86%)。Northern印迹分析表明,目标基因mRNA在不同抗病类型植株中的积累量存在明显差异,其积累量与抗病性呈负相关。

李为民等(2004)^[20]对海岛棉(*Gossypium barbadense*)GbRac1基因的研究发现,该基因受棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)的诱导。将其从海岛棉中克隆出来后转化烟草,然后对转基因烟草的离体叶片进行抗赤星病(*Alternaria alternata*)鉴定。结果表明,转基因烟草对烟草赤星病的抗性有了明显的提高。因此,他们认为,GbRac1基因在植物抗病基因工程中具有一定的应用前景。

Ah-AMP是属于橡胶素类的抗菌肽,在体外具有很强的抗真菌和细菌的特性,而且对植物细胞和哺乳动物细胞无害。陈艳等(2003)^[21]将该基因从苋属植物千穗谷(*Amaranthus hypochondriacus*)中克隆出来,通过根癌农杆菌介导方法对烟草进行了遗传转化,最后筛选出两株抗性较强的T₀植株。对T₁代植株的抗青枯病分析表明,其抗病性比对照分别提高了2.24和1.62个级别;其病情指数分别降低了49.6%和37.3%,同时,转基因烟草对黑胫病也表现出一定的抗性。

隐地蛋白(cryptogein)是一种隐地疫霉(*P. cryptogein*)所特有的蛋白类激发子,分子量约为10kD,由98个氨基酸组成。研究发现,用低浓度的激发素(elicitin)处理茄科、十字花科等非寄主植物时,可诱导植物产生免疫反应,并使其获得对病原物的系统抗病性。根据激发素诱导产生免疫反应的能力差异,它又可分为 α -激发素及 β -激发素,隐地蛋白就属 β -激发素^[22]。蒋冬花等(2002)^[23]将c_{ry}基因的13位赖氨酸突变成缬氨酸,从而获得突变基因CryK13V。将此突变基因转入烟草,并对其阳性植株进行接种试验,结果表明,转基因阳性植株对黑胫病菌、赤星病菌和野火病菌等的抗性均有提高。对该基因表达的分子检测还证明,它表达的丰度与转基因植株的抗病性正相关。

β -1,3-葡聚糖酶及几丁质酶是两个近年来研究较

多的与抗真菌有关的蛋白,它们在体外能水解几丁质与葡聚糖这两种真菌细胞壁的主要成分^[23]。蓝海燕等(2000)^[23]将这两个基因转入烟草,分子检测后,对转基因阳性植株进行了活体接种试验。结果表明,与对照相比,转基因植株具有较强的抵御赤星病菌侵袭的能力。

4.3 抗虫研究

在农业生产中,因害虫危害所造成的产量损失可达收获总量的20%~30%^[24]。生物抗虫基因的发现以及在烟草等作物中的成功转化,为农作物的害虫防治提供了一种新的选择。

外源抗虫基因的种类:

苏芸金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)毒蛋白基因Bt内毒素基因是发现最早的生物抗虫基因,其有效成分是c_{ry}IA。然而,天然的Bt内毒素基因在转入植物后,其杀虫活性较低。经过人工改造或合成的Bt内毒素基因,由于增加了植物偏好的密码子G、C,其杀虫活性可以提高10倍左右^[25]。1987年,比利时科学家首次将Bt毒蛋白基因导入烟草,在烟草内成功表达,并获得能够有效地抵抗1龄烟草夜蛾(*Manduca sexta*)幼虫侵害的转基因烟草^[25]。

从生物安全角度来看,叶绿体转化的优点在于它能防止基因的漂移。张中林等^{[26]、[27]}将c_{ry}IAc基因与水稻叶绿体psbA基因的启动子和终止子一起构建成烟草叶绿体转化载体pTRS8,对烟草进行了成功转化,并获得了其对谷实夜蛾(*Heliothis zea*)3龄幼虫具有较强的毒杀作用,并能显著抑制幼虫蜕皮及发育的转基因阳性植株。

同时,通过改变与优化启动子,石春林等获得了c_{ry}IA的表达量提高2.44倍的转基因烟草^[24]。

雪花莲凝集素(*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA)植物外源凝集素(lectin)是广泛存在于植物中的一类植物蛋白,其中,以雪花莲凝集素的抗虫效果最好。其特点是,对刺吸式口器害虫如蚜虫、褐飞虱、叶蝉等的抑制效果较好,对鳞翅目害虫具有中等抗性,并且对动物几乎无害。转基因的实践证明,转GNA的烟草,对烟蚜(*Myzus persica*)及烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)的幼虫具有明显的抑制作用^[24, 28, 29]。

植物蛋白酶抑制剂(Protease inhibitor, PI)植物蛋白酶抑制剂是一类含量比较丰富的小分子蛋白,能抑制昆虫消化道的特异蛋白消化酶的活性,所以,当昆虫摄食了PI后,外来蛋白的消化就会受到影响,最终造成昆虫的正常发育受到阻断,导致其死亡。在植物蛋

白酶抑制剂中,丝氨酸蛋白酶抑制剂的研究最深入。作为丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的一个亚家族,蛋白酶抑制剂 II(PI-II)具有 2 个活性位点,能够分别抑制胰蛋白酶(trypsin)和胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)的活性。由于丝氨酸蛋白酶是鳞翅目和双翅目昆虫的主要消化酶,所以丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的导入,可使植物获得对这两类昆虫的抗性^[30]。

在转基因实践中,豇豆胰蛋白酶抑制剂(cowpea trypsin inhibitor, CpTI)基因、番茄的 PI-II 和 PI-I(仅能抑制胰凝乳蛋白酶)、甘薯(*Ipomoea batatas*)、芥菜(mustard trypsin inhibitor, MTI)以及大豆的 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因被分别转入烟草,结果表明,转基因烟草可使烟芽夜蛾幼虫、谷实夜蛾、烟草天蛾(*Manduca sexta*)、棉铃虫、斜纹夜蛾幼虫、海灰翅夜蛾(*Spodoptera littoralis*)幼虫的生长显著受阻^[24]。

谢先芝等(2002)^[30]的试验首次揭示了内含子在转基因植物中外源抗虫基因表达中的作用。他们分别将番茄 PI-II 基因的 cDNA tin2 和含有一个 109 bp 内含子的基因组 DNA tin2i 转化烟草,获得了两类转基因植株。抗虫活性检测显示,转 tin2i 的烟草对棉铃虫幼虫的抗性高于转 tin2 基因的烟草。因而,他们推测这可能与 tin2i 序列中内含子的存在有关。同时,该研究还表明,抑制鳞翅目幼虫生长的是胰蛋白酶抑制剂而不是胰凝乳蛋白酶抑制剂。

双价抗虫基因 转基因抗虫作物在生产实践中的应用,产生了巨大的社会效益。然而,随着转基因抗虫作物推广面积的不断扩大,靶标害虫对抗虫基因的抵御能力也不断增加,由此而造成的生态风险也逐步加大。因此,如何扩大转基因抗虫作物的抗虫谱,减缓其抗虫能力的丧失,是摆在科学家面前的重大课题。双抗虫基因或多抗虫基因共同在植物中表达策略的提出,为这一问题的解决提供了一种有益的选择。

运用不同的转化策略,先后获得了 cryIAb 和 cry-IC、人工合成的 GFM cryIA 基因和经过修饰的 CpTI 基因、人工合成的 GFM cryIA 基因和密码子优化后的 GNA 基因共表达的转基因烟草。这类转基因烟草对棉铃虫、蚜虫、烟芽夜蛾以及小地老虎(*Agrotis ypsilon*)各龄幼虫的抑制效果明显增强^[24]。

4.4 病原菌及病毒的检测

在分子生物学研究中,PCR 技术常用来对目的基因进行特异性的扩增。它的优点是模板需要量小,扩增的效率。因此,利用 PCR 的这种特点,可以对病原菌及病毒进行特异性扩增,从而达到快速检测的目的。

4.4.1 烟草黑胫病菌的快速检测技术

谢勇等(2000)^[31]根据疫霉属真菌(*Phytophthora* spp.)rDNA ITS 区段的 DNA 序列设计了 1 对 17bp 的特异寡核苷酸引物,对不同来源(病原菌、病组织及感病土壤)的烟草黑胫病菌进行了特异性扩增试验。结果发现,从这些不同来源的烟草黑胫病菌中都扩增到了长度为 879bp 的特异目的片段,而其它病原菌则无此扩增产物。

4.4.2 烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)的检测

在植物病毒病的防治中,病毒的鉴定和检测起着十分关键的作用。刘凌凤等(2003)^[32]设计了一种新型的荧光探针,即分子信标,来对烟草花叶病毒进行检测。相对于 RT-PCR 的方法而言,这种方法简便、快捷,无须对病毒进行严格的分离和纯化,为植物病毒分子生物学的研究提供了新的手段。

4.4.3 烟草丛顶病的分子检测

云南烟草研究所^[18]根据烟草丛顶病毒的复制酶基因的序列、似卫星 RNA(Satellite-like RNA)的部分序列及烟草脉扭病毒的外壳蛋白基因的部分序列,设计了特异的寡核苷酸引物,其扩增长度分别为 471 bp、622 bp 及 372 bp。利用这些引物,应用 RT-PCR 的方法,可从病烟和带毒蚜虫中特异灵敏地检测出烟草丛顶病毒。

5 除草剂研究

亮氨酸、异亮氨酸以及缬氨酸合成途径中,第一个共同的酶就是乙酰乳酸合成酶(ALS)。磺酰脲类除草剂(chlorosulfuron sulfometuron methyl)通过抑制乙酰乳酸合成酶的活性,阻断氨基酸合成途径,从而达到除草的目的。拟南芥中 ALS 第 197 位点的 Pro 突变为 Ser 后,ALS 不再受磺酰脲类除草剂的抑制,从而使该拟南芥突变系表现出抗磺酰脲类除草剂的作用^[11]。王先艳等(2003)^[11]将突变基因 *als* 分离出来,并转入烟草。结果发现,转基因阳性烟草植株的抗除草剂能力提高了近 1000 倍。

6 抗重金属污染

重金属污染是环境污染的重要组成部分。修复被重金属污染的环境,是一项投入巨大的系统工程。在环境修复的措施当中,植物修复具有无二次污染、效率高、操作简便易行、费用低廉的优点,因而在环境修复

中发挥着十分重要的作用。

6.1 汞

汞是土壤水重金属污染的主要污染源之一。汞在环境中以单质汞、离子汞和有机汞(如甲基汞)3种形态存在。其中,甲基汞的生理毒性最高,单质汞的毒性最小。人们发现,在受汞污染的土壤中存在一种细菌,可以把甲基汞转变为离子汞,再把离子汞转变为单质汞,并将其排出。在这个过程中有两个关键的基因,即 *merA* 和 *merB*, 其中 *merA* 基因编码汞还原酶,能将离子汞转变为单质汞, *merB* 基因编码的酶则催化甲基汞转变为离子汞。^[30] 田吉林等(2002)^[33] 将 *merB* 基因进行序列改造后,利用农杆菌介导法转入烟草。结果显示,在水培条件下,转基因株系最高可抗 2.5 mmol/L 的醋酸苯汞(PMA),而对照非转基因烟草的幼苗在 0.1 mmol/L 的 PMA 下即死亡。由此可见,转基因阳性植株对有机汞表现出了较强的抗性。

6.2 镉

镉是污染空气、水体以及土壤的另一个重要的污染源,在耕作土壤中,镉是主要的重金属污染元素。在土壤中,镉具有容易流动、并且易于被植物吸收的特点,所以,在治理被镉污染的土壤时,植物修复是首要的选择。

金属硫蛋白是一类金属结合蛋白,其分子量较小,含有 α 、 β 两个结构域。研究发现,它与细胞内重金属的浓度调节有关。张晓钰等(2000)^[34] 将其中的 β 结构域用 α 结构域来取代,从而得到了突变体 $\alpha\alpha$ 。将此 $\alpha\alpha$ -cDNA 转入烟草,并获得了 Cd^{2+} 抗性得到提高的转基因阳性烟草植株。 Cd^{2+} 抗性鉴定试验的结果显示,转基因植株在 200 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 的条件下能够正常生长,在含有 400 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 的培养基上也可以存活。相比之下,阴性对照在 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 时,其生长发育即受到严重阻碍,甚至死亡。

7 问题与展望

近年来,随着分子生物学研究的快速发展,烟草作为一种模式植物,在分子生物学的研究领域发挥着越来越大的作用。同时,作为一种重要的经济作物,人们在烟草的生长发育、抗逆、抗病虫等基础理论研究方面,也越来越多地采用了分子生物学研究的手段与方法,并取得了明显成效。然而,与水稻、玉米、小麦等作物相比,烟草在分子水平的研究上,还存在着相当大的差距。具体表现在:对烟草基因组信息缺乏了解;对一些控制烟草重要经济与农艺性状(如抗病性、品质等)

的功能基因所知不多,功能基因定位比较缺乏;分子标记辅助育种工作尚未完全展开等等。同时,还应该看到,与国外相比,在运用分子生物学的理论与方法进行烟草基础理论研究方面,还存在着比较大的差距。烟草在国外更多地是作为一个模式植物,在分子水平上就有关生长、发育、光合及代谢等重大基础问题来开展研究。而在国内,烟草则主要是作为植物功能基因组研究的载体来发挥作用的。此外,在对转基因作物安全性的认识上,人们存在着两类截然不同的看法。一种意见认为,只要不能证明转基因作物是安全的,那么它就是不能食用的;另外一种看法则认为,只要不能证明它对人类健康是有害的,那么转基因作物就是安全的。在我国的农业生产中,烟草主要是作为一个供人们吸食的特殊作物。鉴于人们对转基因作物安全性的顾虑,在育种实践中,利用基因工程的方法对烟草进行农艺、经济性状及品质的改良,一直被视为一个禁区。然而,从世界范围内粮食作物的种植状况来看,转基因的大豆及玉米已经在生产上推广多年,并且已经在人们的日常食物的构成中,占有一定的比例。实践证明,转基因作物的安全性还是具有相当大的保障的。所以,转基因水稻很可能是下一个获准在田间释放的粮食作物。因此,在人们对转基因作物的安全性进行重新认识后,转基因烟草将成为人们所关注的对象。所以,无论从遗传转化,还是从生物安全角度而言,应加强无筛选标记基因、外源基因的特定时空表达,以及更高效、安全的转化手段等方面的研究。同时,还应当深入挖掘烟草自身的基因资源,加强烟草野生种种质资源的研究,建立烟草核心种质库。尽快启动烟草全基因组测序计划,加快烟草功能基因组研究进程,最终将烟草自身优异的功能基因转化到烟草中,以获得优质、抗病、适产的烟草新品种。

可以预见,随着烟草基础研究的不断深入,烟草基因组的测序工作将很快完成,烟草主要农艺经济性状的基因定位将成为研究工作的重点,烟草功能基因组研究将全面展开,分子生物学手段与方法将在烟草基础研究领域中得到全面的应用。

参考文献

- [1] 江豪,陈璋,魏晓文. 应用外源 DNA 直接导入法选育烤烟新品系金烟 6 号. 福建农业大学学报, 1999, 28(2): 147-151.
- [2] 周玮,刘飞虎,刘小莉,曾淑华,覃鹏. 转 SOD 基因烟草的光合特性初探. 云南大学学报(自然科学版), 2003, 25

- (1): 69-72
- [3] 郭兆奎, 杨谦, 姚泉洪, 万秀清, 颜培强. 转拟南芥 AtKUP1 基因高含钾量烟草获得. 中国生物工程杂志, 2005, 25 (12): 24-28
 - [4] 孔凡利, 林文量, 严小龙, 廖红. 转枯草芽孢杆菌植酸酶基因烟草对不同介质中植酸磷的吸收利用. 应用生态学报, 2005, 16(12): 2389-2393
 - [5] 赵恢武, 陈杨坚, 胡鸢雷, 高音, 林忠平. 干旱诱导性启动子驱动的海藻糖-6-磷酸合酶基因载体的构建及转基因烟草的耐旱性. 植物学报, 2000, 42(6): 616-619
 - [6] 刘明求, 刘齐元, 丁小维, 侯思名, 刘飞虎. 转基因 SOD, POD 高表达烟草幼苗抗热性研究. 云南农业大学学报, 2005, 20(5): 620-623
 - [7] 李秋莉, 刘大伟, 高晓蓉, 苏乔, 安利佳. 辽宁碱蓬胆碱单加氧酶基因克隆及转基因烟草的耐盐性. 植物学报, 2003, 45(2): 242-247
 - [8] 刘文奇, 陈旭君, 徐晓晖, 凌建群, 郭泽建. ERF 类转录因子 OBP1 基因的超表达提高烟草的耐盐能力. 2002, 28 (6): 473-478
 - [9] 何培民, 张大兵, 梁婉琪, 姚全红, 张荣铄. 细菌乙酰胆碱氧化酶基因 (*CODA*) 在烟草的表达与抗盐能力的分析. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33(5): 519-524
 - [10] 周涵韬, 林庆同, 潘文, 高媛媛, 陈攀, 等. 红树植物耐盐基因转化烟草及耐盐品系的培育. 科学通报, 2004, 49 (2): 167-172
 - [11] 王先艳, 单晓映, 杨爱芳, 张举仁. 植物表达载体构建和转基因烟草抗除草剂及耐盐性的分析. 农业生物技术学报, 2003, 11(6): 554-560
 - [12] 甄伟, 陈溪, 孙思洋, 胡鸢雷, 林忠平. 冷诱导基因的转录因子 CBF1 转化油菜和烟草及抗寒性鉴定. 自然科学进展, 2000, 10(12): 1104-1108
 - [13] Bai D, Reeleder R, Brandle E. Identification of two RAPD markers tightly linked with the *Nicotiana glauca* for resistance to black root rot of tobacco [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91(8): 1184-1189.
 - [14] Yi Y H, Rufty R C, Wemsman E A. Identification of RAPD markers linked to the wildfire resistance gene of tobacco using bulked segregant analysis[J]. Tobacco Science, 1998, 42(3): 52-57
 - [15] 张修国, 罗文富, 苏宁, 等. 烟草黑胫病发生动态与黑胫病菌全基因组 (DNA) 遗传分化关系的研究. 中国农业科学, 2001, 34(4): 379-384
 - [16] 莫笑晗, 秦西云, 杨程, 段玉琪, 吴娟, 李天飞, 吴建宇, 陈海如. 烟草脉扭病毒基因组 F71S 分序列的克隆和分析. 中国病毒学, 2003, 18(1): 58-62
 - [17] Mo, X. H., Qin, X. Y., Yang, C., et al. Complete nucleotide sequence and genome organization of a Chinese isolate of Tobacco bushy top virus. Archives of Virology, 2003, 148, 389-347.
 - [18] 秦西云. 烟草丛顶病在中国的发现及研究进展. 中国烟草科学, 2005, (3): 45-48
 - [19] 张凯, 牛颜冰, 周雪平. 表达 dsRNA 的转基因烟草能阻止烟草花叶病毒的侵染. 农业生物技术学报, 2005, 13 (2): 226-229.
 - [20] 李为民, 王志兴, 贾士荣. 海岛棉 GbRac1 基因过量表达提高转基因烟草离体叶片对赤星病的抗性. 农业生物技术学报, 2004, 12(4): 353-356
 - [21] 陈艳, 郭洪年, 姜瑛, 李常青, 赵文明, 田颖川. 表达千穗谷 *Ah-AMP* 基因的转基因烟草抗病性研究. 自然科学进展, 2003, 13(4): 412-416
 - [22] 蒋冬花, 郭泽建, 郑重. 隐地蛋白 (cryptogein) 基因定点突变及其广谱抗病烟草转化植株的获得. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28(5): 399-406
 - [23] 蓝海燕, 田颖川, 王长海, 刘桂珍, 张丽华, 王兰岚, 陈正华. 表达 β -1, 3-葡聚糖酶及几丁质酶基因的转基因烟草及其抗真菌病的研究. 遗传学报, 2000, 27(1): 70-77.
 - [24] 郭线茹, 蒋金炜, 罗梅浩, 马继盛. 转基因抗虫烟草研究进展. 昆虫知识, 2005, 42(4): 358-363
 - [25] 赵百东. 生物技术与我国烟草农业. 中国烟草学报, 2000, 6(2): 37-42
 - [26] 张中林, 陈曦, 钱凯先, 沈桂芳. Bt 叶绿体转基因植株的抗虫性及后代表型分析. 植物学报, 1999, 41(9): 94-951.
 - [27] 张中林, 任延国, 沈燕新, 山松等. 苏云金芽孢杆菌 (Bt) 晶体毒蛋白基因在烟草叶绿体中的表达. 遗传学报, 2000, 27(3): 270-277.
 - [28] 周岩, 田颖川, 吴标, 莽克强. 转雪花莲外源凝集素基因烟草对桃蚜的抑制作用. 生物工程学报, 1998, 14(1): 13-19.
 - [29] 袁正强, 赵存友, 周岩, 田颖川. 雪花莲凝集素基因 (gna) 的改造及其抗蚜性. 植物学报, 2001, 43(6): 592-597.
 - [30] 谢先芝, 黄美娟, 吴乃虎. 转番茄蛋白酶抑制剂 II 基因烟草植株的培育及其抗虫特性分析. 自然科学进展, 2002, 12(2): 145-150
 - [31] 谢勇, 王云月, 陈建兵, 等. 烟草黑胫病菌分子检测. 云南农业大学学报, 2000, 15(2): 38
 - [32] 刘凌凤, 王柯敏, 谭蔚泓, 李军, 等. 一种基于分子信标荧光探针快速检测烟草花叶病毒的新方法. 分析化学, 2003, 31(9): 1030-1035.
 - [33] 田吉林, 沈瑞娟, 何玉科. *merB* 基因的序列修饰及转基因烟草对有机汞的高抗作用. 科学通报, 2002, 47(23): 1815-1819.
 - [34] 张晓钰, 左晓峰, 肖传英, 单龙, 茹炳根. 小鼠金属硫蛋白突变体 α -cDNA 在烟草中的表达及转基因烟草对 Cd^{2+} 抗性的提高. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16(5): 631-636