

从生物工程技术认识植物保护研究的发展趋势

朱西儒

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘 要 本文从生物工程技术研究角度讨论了植物保护的发展和应用, 提出了植物病虫害防治方法应多样化, 完善、充实植物保护系统工程。认识到植保工作与植物遗传、生理、生化相结合, 特别是对分子生物学领域的开拓和利用, 多元化的研究。开辟经济、有效、无公害的病虫害管理途径, 为提高农业生产的经济效益和社会效益服务。

关键词 生物工程技术; 植物保护; 病虫害无公害防治

TREND OF DEVELOPMENT ON THE PLANT PROTECTION STUDIED BY BIO—ENGINEERING TECHNOLOGY

Zhu Xiru

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract The development and application of the researches in plant protection were reviewed according to bio—engineering technology in this paper. The control methods of plant pest and disease were provided that should be diversible and complete. Furthermore, the systemic engineering of plant protection was gotten to fill.

The researches in plant protection should be pluralistic to combine with plant genetics, physiology and biochemistry. Specially, The techniques of molecular biology should be exploited and used as rapidly as possible. Economic, efficient and no pollutional environment approaches of integrating management of plant pest and disease were opened in order to promote the economic and social benefits of agricultural production.

Key words Bio—engineering techniques; plant protection; control of the pest and disease in the unpollutional environment

植物病、虫、杂草是发展农业的三大重要障碍, 多少年来困扰着各种农作物(包括果树、林木、蔬菜、花卉和药材等)产量和品质的提高。其中, 有的已在历史上成为举世闻名之例。如: 马铃薯晚疫病导致许多爱尔兰人的饥荒和死亡等。尽管植物保护工作者, 以及育种及化学等科技人员付出了巨大的努力, 病虫害仍间竭流行, 时起时伏。杂草和鼠害更是延绵不断, 难以达到灭除和根治。

1997—01—07 收稿

作者简介: 朱西儒, 男, 1950 年出生, 博士, 副研究员, 从事生物工程技术 and 水果花卉植物病毒等研究工作。

生物工程技术的飞速发展，特别是细胞融合与基因重组成为当今科学上的里程碑^[1]，获得诺贝尔奖金^[2]。植物遗传、生理、生化、细胞和分子生物学的多方位研究^[3]，给农业生产大幅度推进带来了新生力量^[4]，人工创造试管内新物种——基因植株或“超性杂种”已成为现实^[5]。所以，植物保护工作也不再沿着一般传统的防治之路缓步慢行。从而更新“病虫管理”概念，开拓新技术，探索新方法，取得新成果。特别近年来，无公害防治病虫害已被列入议事日程，受到人们的重视。

1 组织培养与植物保护

组织培养技术不论对植物或昆虫学研究有着重要应用价值^[6]，是本世纪发展起来的新技术^[4 2]。它在基础理论和实际应用中存在巨大的潜力，由于其目的不同，方法各异。

1.1 植物的组织培养

最早由Haberlandt (1920) 尝试，后美国 Robbins 进行茎尖培养。三十年代陆续有番茄、小麦的根尖培养 (White 1934; 1935)，法国 Gautheret 培养了玉米、柳树根尖组织。在四十年代末至五十年代初，Skook 和崔 培养了烟草茎段，获得成功。在国内，罗宗洛和罗士韦最先培养了禾谷类作物的根尖组织，李继侗进行了银杏胚培养^[7]。迄今，能培养成完整小植株的材料，包括胚状体的形成等，难以准确统计。从而，使“细胞全能性”理论得以实现。就植物病虫害角度来看，有以下几方面比较重要，值得开发和利用。

1.1.1 茎尖脱毒苗检验和生产 茎尖分生组织细胞分裂旺盛，可离体培养成完整植株，它具有正常种苗的全部遗传信息，在人工培养的条件下，诱导分化的小植株不带病毒（类病毒例外）。其原理有两种解释：其一，认为病毒在体内运转与茎尖分生组织生长存在速度差，来不及转移到它的细胞内。其次，认为由于分生组织发育不健全，胞间连丝未形成，没有病毒运转通道。因此培养的小苗（试管苗）是无毒的。近年来，成功应用于控制病害流行的先例较多，如：马铃薯、草莓、大蒜、柑桔、甘蔗、菊花、水仙、唐菖蒲、苹果、桃等。在美国、新加坡、泰国兰花试管苗年产值分别达到 5 000 ~ 6 000 万、500 万和 650 万美元^[8]。我国马铃薯无毒苗生产曾推广过，最有影响的是香蕉工厂化生产、商品化流通，在华南和福建、云南部分地区盛行。中国科学院华南植物研究所从澳大利亚引入了“威廉斯 (Williams)”新品系，更加促进了香蕉产业的发展。据初步统计，仅广东省就有 100 多个香蕉试管苗工厂，二级营养袋苗基地更是如雨后春笋般掘起，形成了试管苗热。年产上百万苗的厂家有几十个，瓶苗按 0.5 ~ 0.6 元/株计，袋苗以 1.5 元/株计算，其效益可想而知。苹果在北方各省大面积发展，自然形成生产基地，这与改革开放的政策有关。特别是陕西省发展的速度比较快，但花叶病等病毒病是潜在危险。据陕西省铜川市苹果试验中心研究苹果试管苗（红富士），苗圃苗高 1.0 m 左右，售价可达到 7.0 元/株，供不应求。在此同时，病毒检验技术研究，将对试管苗大幅度发展有着直接关系，日趋重要。

1.1.2 人工种子 在植物保护的研究中，如何保持整齐一致的植物材料，作为病原或昆虫生活史研究体系，或者减少播种育苗环节，免受环境因子影响，提高抗病或避免种子带毒和传病可以使用“人工种子”。早在 1958 年，Steward 发现体细胞可形成胚胎，1978 年 Murashige 正式提出了这一概念。迄今，已有 40 多科 100 多种植物成功获得“人工种子”^[8]，包括苜蓿、胡萝卜和芹菜^[9, 10]等。

植物保持健康无病，要求齐苗、壮苗，特别是对土传病害，此作用更为明显。然而，

“人工种子”有胚状体同步,发芽整齐,生长势强等优点。目前使用藻酸钠、钙或海藻酸钠包被所需繁殖的胚状体,若再被一层 Elvax 膜,可以防霉变、防干燥裂痕,效果更佳。它用于快繁良种、固定杂种优势、简化育种程序。若与基因工程和脱病毒技术相结合,具有诱人的前景^[1]。欧洲列入尤里卡计划,我国 1987 年确定为“863”高技术项目。最近,葡萄、杨树、玉米、桉树、花叶芋、百合的“人工种子”获得成功^[10]。对活性炭、低温和液体石蜡的作用,以及发酵罐生产法和滴制仪的研制试用等工艺技术研究也有了新的进展。

1. 1. 3 种质保存 不论植物病或虫害,品种抗性作为防治方案第一条措施。植物胚状体无性繁殖,人工培养解决了这一难题,提供了新的技术^[11]。由于离体培养条件一致,最佳小环境,用非有性结合的体细胞保存优良种质,建立“基因库”保存限量种质是比较理想的。一般在超低温下保存,加有保护剂梯度逐级降温,快速解冻,恢复生长。最近,在中国水稻所报道,证明可离体长期保存原产江苏东海县的水稻、香粳糯栽培稻和普通野生稻(*O. sativa* L. f. *spontanea* Roschev),常温弱光下可保存一年不转移,仍有活力,大田生长正常^[12]。葡萄、大蒜、香蕉和大蕉、苹果、三叶草、多花黑麦草可达 9 年之久,草莓、番薯等也同样成功保存,其后代没有发生变异。

1. 1. 4 快速繁殖特殊材料 远缘杂交是成功选育抗病虫品种的有效途径,但是不孕是一重大障碍。由于核、质差异大,难以孕育结实。用离体培养方法试管授精生产人工种子成为现实。特别对于经济价值高的品种(系),更需快繁。例如西瓜胚乳培养可获无籽新种^[13],桔可以达到无核,满足人们生活的需要。目前,山楂、玉米胚乳、棉花胚珠^[11]培养不论在抗病性或产量提高方面均取得好的进展。

2 细胞培养与植物保护

细胞培养(包括原生质体培养)成为生物工程的重要内容,对防治病虫害、选育新品种、研究病虫生活机制或抗病生理用作必要工具和手段。有的用单胞培养技术,得到完整纯系品种。同时,利用自然、生物或理化诱变,选育出高产,优质抗病虫^[14, 15]、杂草或耐盐突变体^[16, 17, 18]。

2.1 抗病突变体筛选

自从 1973 年 Carlson 离体选育出烟草抗野火菌突变体^[19]以来,不少人做了大量研究工作^[20, 21]。植物病理学家操作更有条件和优势,但实际上几乎多数是遗传、生理、育种学家做工作,包括病原分离、接种、抗性鉴定等,逐渐熟练,走了不少弯路,或者求得病理学者帮助。

近来,成功离体选育体细胞无突变体的事例有:水稻抗胡麻叶斑病菌^[22],属首次报道;抗白叶枯病菌^[23]等。已在生产上推广的品种有“湘矮早 9、红 410、闽晚 6 号、合江 18、关东 51”等。此外,选育抗赤霉病品系^[20, 19]。

2. 1. 1 自发突变(Auto-mutation)在人工培养中,由于外源激素的影响,特别工厂化生产中,频繁的继代培养,遗传物质发生不正常变异。香蕉组织培养事实已得到肯定,国内外有文献报道,但如何从中选出优良突变株有着重要意义。

2. 1. 2 人工诱发突变(Artificial Induce Mutation)为了获得有用突变体,可以诱发变异,已证明人为因素对选择理想突变体是有利的^[20]。用 100 rad/min(剂量率)的 γ 射线物理诱变,以及 0.1%EMS(甲基磺酸乙酯)化学诱变,获得抗赤霉病无性系。

2. 1. 3 选择压力 黄河清(1988)提出了“生物诱变(Bio induce Mutation)”新概念^[24],即病原生物或其代谢产物诱发寄主突变。实际上,早在 1962 年 Alikhamian 发现噬菌体对放线菌有诱导变异作用,国内微生物研究中有记载,但高等植物中无人报道。用此技术选育的

有抗玉米小斑病菌^[25, 26]; 水稻白叶枯^[23]、稻瘟病和黄矮病品系^[27]。然而抗病品种在生产上持久应用与抗病(虫)基因稳定遗传有关, 也与病(虫)的致病性(致害性)分化密切相关^[15, 28], 如水稻白叶枯病和细菌性基腐病, 大麦黄花叶病。

2.2 原生质体培养与细胞融合

原生质体是研究病毒侵染机制的最好体系, 获得可靠的结论。自从 Cooking (1970) 用酶解技术快速、大量、一致地分离出植物原生质体, 大大改进了原来早期使用的机械方法, 给后来广泛使用提供了依据^[29]。例如: 番木瓜原生质体为研究环斑病毒 (PRV) 侵染动力学提供了基础^[30], 证明 Ys 和 Ns 株系间无明显增殖差异, 而环境温度对原生质及病毒生长有较大的影响。

植物原生质体培养有许多报道, 不少已获得完整的小植株。其培养方法^[31], 影响因素等均有较详尽论述^[32, 2, 1, 31]。它不但解决了常规远缘杂交发生败育而不成功的困难, 将“融合胞”培养出“超性杂种 (Hypo-hybridization)”。例如: 烟草×龙葵的杂种生产^[3]; 甚至于将元麦叶绿体转至人的 Hela 细胞, 40 d 有绿色反应; 用融合技术获得产生 δ -内毒素株, 广谱性灭虫^[33]。检验病原病毒细菌等用的单克隆抗体生产中, 脾细胞和鼠骨髓瘤的细胞融合也是如此。在基因转化受体中, 原生质体是比较理想的, 缺点较繁锁, 必须诱导分化, 烟草成功最早^[1, 31]。最近, 有人首次报道^[11], 棉花培养 60 d 成胚。葫芦科中除黄瓜外, 苦瓜、瓠瓜也获成功。苹果^[34]在国内培养成功, 小植株生长率达 33%~35%。现在, 原生质体培养技术不仅对植物而且病原真菌研究中, 也常利用此手段^[32], 了解其病原物侵染、繁衍等机理问题。

3 基因工程与植物保护

植物保护研究深入到分子水平, 不再完全遵循传统的生物学观点去认识各种病虫害问题, 与基因工程技术接轨^[35]。农业分子育种是人们多年来的梦想, 现已成为现实, 也给植物病虫、杂草等^[36]防治带来了希望和曙光。其中, 包括有两个层次的生物工程技术: 1)、将带有目的基因(抗虫、病、杂草基因)供体总 DNA 片段导入受体; 2)、分离出目的基因, 经过重组后再导入受体植物^[37]。从而培育出高产、优质、抗病虫害或杂草的新种, 取得较大的进展和可喜成果, CaMV 作为基因启动子在转化中发挥了重要作用^[38]。

3.1 目的基因分离或合成

能获得理想的基因植株, 首先决定于目的基因。大量事实证明植物与病虫害之间存在着对应基因关系, 因此必需挖掘天然资源, 或者分析其病虫害毒性或其致命基因, 是成功转化的基础。最近, 水稻矮缩病毒 (RDV)^[27]、甜菜坏死黄脉病毒 (BNYVV)^[39]、新疆西瓜花叶病毒 (WMV)^[37]、大豆花叶病毒 (SMV)^[40, 41]及其它病毒^[42, 43]的外壳蛋白基因 (cp) 成功克隆和序列分析^[44]。多聚酶连锁反应 (PCR) 为体外合成目的基因提供了方便条件。

3.2 外源基因的构建

提取供体总 DNA, 用限制性内切酶分割, 利用大肠杆菌 (*E. coli*) 建立基因文库 (Gene Library)^[45], 分子生物学及生物化学为其提供了工具酶等条件和方法。目前, 用精密仪器可简便、快速而准确地分析任何 DNA 序列, 即遗传密码, 包括蛋白产物的氨基酸排列位置^[46], 了解比较其同源性, 从而可用化学合成技术组建 DNA 片段^[39]。例如, 大麦黄矮病毒 (BYDV) 的 DNA 探针的合成^[47], 以 32 p 标记质粒 PGP178 与反转录 BYDV-RNA 结合成双链 c-DNA 探针, 灵敏度高, 特异性强, 有效测定单头蚜虫传毒力, 用 ELISA 法是

测不出的,最低需测 6 头蚜。此外,核酶(Ribozyme)对 TMV-RNA 序列 GUC 位点有专一性切割作用,类似于卫星病毒 STobRV。人工合成 30 kd TMV-RNA,在 37 °C 或 50 °C 下,有 Mg^{++} 存在, pH 8.0, 反应 1 h, 可切靶子 RNA 为二段。将 Ribogyme 的 c-DNA 转入烟草后,证明烟草可抗 TMV 的感染^[48 49]。

3.3 基因转化途径

遗传工程技术, 可借限制性酶剪切、连接酶的连接, 使目的基因与载体 (Vector) 结合, 转移到生物受体细胞中去^[50]。也可以用原生质体加 PEG^[51] 方法或花粉管通道^[52 53 54]、注射子房^[55]、电激法^[56 57, 58, 41] 等, 随着基因操作深入研究, 方法多样。

3.3.1 农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和 Ti 质粒 根癌病生物学及侵染机理, 它以 T-DNA 转化寄主细胞, 使之自行合成生长素和细胞分裂素而导致肿瘤形成。转化细胞无限制生长, 分泌和制造章鱼碱 (Octopine) 和胭脂碱 (Nopaline) 之类氨基酸衍生物^[59], 是 Ti 质粒作用于寄主细胞而发展成癌肿病 (Crown-gall tumor disease)。T-DNA 与外源 DNA 共存、整合复制、表达, 成为基因工程的重要工具^[60]、运载目的基因^[61, 62]。

迄今, 使用农杆菌转化最多, 比较容易, 与叶圆盘共培养就可更方便达到转化的目的。例如: 水稻^[23]、矮牵牛、石刁柏^[2]、马铃薯^[63]、大麦、小麦^[35]、龙葵^[2, 20] 等, 均已获得成功。有人认为 Ti 的毒性基因 (Vir) 的活化受寄主细胞分泌物影响, 但作用量太少。因此, 用化学预处理, 即酚类化合物, 如用对基苯甲酸、烟草细胞培养液处理 24 h, 致病率增高, 冠瘿碱酶活性增强^[64, 65]。有人认为 Ti 的 Vir 有识别寄主能力, 所以, 一般不感染单子叶植物^[66]。根线虫和强磁场提高非寄主细菌感染有成功报道, 菌液直接注射茎节成功感染农杆菌, 首次整株转化马铃薯^[67]。

3.3.2 花粉管通道法 Hess (1980) 最初以花粉萌发时吸收种内、间外源 DNA 后导入矮牵牛, 获得子代花色的变异^[68, 69]。Dewet (1983) 用此技术成功转移了玉米抗小斑病菌 (*Hemistorium maydis*) 基因^[70]。后来 Ohta (1986) 以外源 DNA 与玉米花粉混合授粉转移胚乳基因频率较高^[71]。我国周光宇 1974 年开始广泛调查, 总结远缘杂交染色体水平以下的变异, 提出 DNA 片段杂交的分子育种学说^[52]。事实证明该理论是正确而有效的, 自显影技术可清楚看到外源 DNA 在授粉 24 h 后, 或注射子房 (10⁻⁴ DNA/子房) 30 min 到达胚囊, 2~4 h 80% 以上进入胚囊, 不受花粉影响^[54]。用同工酶技术证明 DNA 片段杂交成功^[72], 高粱稻不同于亲本^[22], 为远缘杂交提供了分子依据^[1]。最近, 小麦^[73]、棉花^[53 74]、黄瓜^[70]、茄子^[53] 均获得转化成功。切去柱头直接滴加 DNA 法, 同样导外源 DNA 入水稻, 引起变异, 转化频率高达 10⁻²~10⁻¹^[67]。

通过花粉管通道导入外源基因, 杂种经 3~4 代就可成稳定遗传的品系^[50]。从而大大缩短了育种周期。海岛棉 7124 的 DNA 导入陆地棉 9101, 其后代 3118 对枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*) 高抗, 耐棉黄萎病菌 (*Verticillium albo-atrum*), 在病圃内表现比对照增产 30%~70%, 达到供体抗病水平, 已大面积推广。此转化技术简便, 减少用原生质体或悬浮细胞人工培养过程, 直接转化整株的卵胞、受精卵或早期胚, 并且所有开花植物均可使用, 不用考虑 Ti 质粒转化时农杆菌感染与否, 单双子叶植物均可利用。

3.3.3 其它途径 电击法^[54]、基因枪法^[2, 1]、PEG 与原生质体共培养^[2]、叶圆盘法和滴 DNA 在去表皮组织上^[12] 再培养成株, 均可达到转化的目的。有人报道甘蓝 (*Brassica oleracea* L.) 是研究基因工程的理想受体^[75]。

3.4 抗虫基因转化的研究

抗虫品种与天敌的结合，可有效控制害虫群体发展。抗虫品种又能提高天敌捕食寄生力，不会因食料匮乏而夭折，相反维持相对平衡控制水平线^[76]。

我国自七十年代开始，抗虫育种做了大量工作，取得不少成果。在水稻上，有效控制了褐飞虱等害虫，减少用药次数和剂量，保护了益虫^[76]。1969 年 IR20 抗螟虫品系推广，不久抗性脱变，害虫生物型变化是其主要原因之一。3 年内褐飞虱繁殖 13~15 代，远远超过了 IR26 的繁衍速度。后来发展多抗（微效基因）品系，如 IR36、46 可抗褐飞虱 I、II、II 型，黑尾叶蝉、二化螟、稻瘿蚊及白叶枯病菌（*Xanthomonas oryza*）和东格鲁病毒。6~7 年后，丧失了对褐飞虱的抗性，该害虫繁衍 23~26 代克服了抗性基因。

因此，抗虫基因工程可加快育种速度，昆虫病毒已有不少报道^[77, 9]，c-DNA 探针也有合成^[27]。研究最多的是苏云金芽孢杆菌（*Bacillus thuringiensis*）的 δ -内毒素基因^[78]，在 *E. coli* 中表达成功^[33]，转化水稻获得基因植株可以抗虫，能够稳定遗传^[29]。 δ -基因改造提高了杀虫毒性，试验表明对 5 令菜青虫成蛹羽化的蝴蝶有高的致死效用^[33]。分子生物学研究清楚活性位点在蛋白 N 端，与 C 端无关，被昆虫肠碱性水解酶活化，杀虫肽为 60—64 KD（占 50%）。 δ -毒素蛋白的单克隆抗体细胞株的建立，对其进一步研究和利用将有重要意义^[78]，尽快开发利用，以便达到商品化生产^[4]。核酸杂交是病毒检验的快速、准确、高灵敏度、强专一性的手段^[16]，生物工程技术促进抗虫性和毒素基因应用的发展。

4 生物农药与植物保护

自二次世界大战 Mullen 发明 DDT 高效杀虫剂而获得诺贝尔奖后，有机氯、有机磷、氨基甲酸酯类农药光辉万丈。它的使用简单。经济、效果立见。然而，四十至六十年代偏极依赖杀虫农药，造成环境污染和非生物之公害。R. Corson (1962) 以题为“《寂静的春天》（《Silent Spring》）”的论说了美国大量破坏生态平衡的事例。美国总统下令 19 所高等学校与政府成立了“Hultaken IPM 工程”的计划，更新了“防治（Control）”为“管理（Management）”观念。原则是：依赖自然力量（天敌和抗性）、预防与清除及包容与纠正，达到最小损失。

生物农药无公害，没有污染，可保护天敌，如昆虫不育剂、性激素、生长素等药物，以及植物性杀虫药剂等，受到人们高度重视。吴尔福（1988）根据植物生长发育和病毒防治的结合，研制了 TA (TS) 在玉米上使用初见成效。他认为，在番茄上对 TNV 和 CMV 防效明显（95.7%），叶绿素 a、b 增加 18.6%，光还原力提高 78.8%。

5 结束语

由于新技术革命与农业现代化的发展，植物保护工作向边缘学科迈进。利用生物工程技术，包括分子生物学、细胞生物学、酶学和基因工程、发酵工程（生物反应器）建立植物病虫害综合治理系统工程，研究和解决其中存在的问题。1990 年前世界生物技术产值达 57 亿美元，预计到 1996 年可超过医学 10 倍^[4]。通过体细胞无性系和远缘杂种、花药（单倍体）、胚乳（三倍体）及细胞“超杂种”选育优质、高产、抗病虫杂草，耐盐碱品种。寻找生物和人工诱变等选择压力，探索分子水平高灵敏度^[79]、强特异性检测技术^[80, 81, 82]，如 ds RNA、c-DNA 探针、PCR 技术等。分离、克隆、转化 cp 基因和抗体基因^[50, 83]，抗病疫苗^[84]和昆虫毒素基因。制订昆虫、防止杂草抗药性产生的合理措施和方案，发展生物制剂^[85]，取得新的成就。

参考文献（略）