

# 土壤生物工程

## ——土壤学与分子生物学的交叉学科

曹志洪 施卫明 朱永官  
(中国科学院南京土壤研究所, 210008)

### 摘 要

土壤生物工程学是土壤学与分子生物学、遗传工程学相结合交叉的分支学科,是土壤科学新的生长点之一。它以土壤学的研究成果为基础,利用分子生物学的理论和转基因工程为手段,企图从改造植物本身来解决土壤的问题。土壤生物工程学的主要研究内容为从分子水平上来研究土壤植物营养和土壤微生物过程及植物对土壤逆境的生理生化反应,揭示其分子机制、基因控制,创造出预定目标的转基因植物。因此主要包括土壤植物营养生物工程、土壤微生物生物工程及土壤资源生物工程三个方面。本文简要介绍了这些领域的进展,讨论了今后的发展。

**关键词** 土壤生物工程,分子生物学,基因工程

### 一、前 言

70年代以来分子生物学及基因工程的飞速发展,不仅在理论上极大的丰富了人们在分子水平上对生命活动的认识,而且在生物品种的定向改良方面,如导入高产优质基因大幅度提高产品的品质和产量;培育抗病毒、抗虫害、抗逆境的新品种;以及在新药开发、环境污染整治等方面都有诱人的前景。

近十年来在植物基因的分离、基因工程载体的组建、细胞的基因转导、转基因细胞的组织培养、外源基因表达的检测等都相继取得了重大突破。不少发达国家的实验室都已有成熟的实验流程而都能开展这方面的工作。因此分子生物学和转基因工程向其它学科的渗透已很普遍<sup>[2,3]</sup>。

应当承认,不论是国际上还是国内,与其它学科比较,分子生物学的原理和技术导入土壤科学的速度是相当滞后的。其原因之一是土壤生态系统本身的复杂性和多样性增加了分子生物学直接导入土壤学的困难。

从历史上看,无论是微生物学、物理学、化学、植物营养化学、生物化学的导入土壤学,还是近代的数学、计算机与信息科学、生态学与遥感技术的导入土壤学都曾极大地推动了土壤科学的发展。

土壤中每时每刻都存在着生命活动,例如每平方米的草原土壤里除了盘根错节的根系外,还含有约1210万头土壤小动物;在每克肥沃的农田土壤中,除了数以万计的根毛及其脱落物外还有25亿个细菌、40万个真菌、5万个藻类生物、3万个原生动物门<sup>[4]</sup>,所以

土壤是活的有生命的自然体。因此土壤学与分子生物学及基因工程之间必然有紧密结合的领域,土壤学家、分子生物学家和遗传工程科学家的合作必将培育出土壤生物工程灿烂的明天。

## 二、土壤生物工程的定义与内容

英国的 Lynch 教授(1983)<sup>[4]</sup>最早给出了狭义的土壤生物工程概念,美国加州大学戴维斯分校的 Lauchli 教授(1987)则进一步扩大了土壤生物工程的内涵。我们认为土壤生物工程(Soil Biotechnology)的定义是:研究和应用土壤学、分子生物学和基因工程的理论、技术和方法,通过遗传改良的手段来解决所面临的土壤学问题的学科,是土壤学与分子生物学及遗传工程学的交叉。据此,应包括下列三方面内容:(1)土壤植物营养生物工程,研究植物营养的遗传特性及其利用,建立相关的生物技术,为进一步合理使用和提高土壤肥力提供依据,揭示植物吸收及利用土壤养分的分子基础,分离和转导高效养分吸收基因,创制养分利用高效型新品种,减少肥料投入。实现高产优质高效低成本的农业生产目标,防治因过量施肥导致的环境污染等问题。(2)土壤微生物生物工程,土壤微生物在土壤生态系统中参与物质循环的分子机制,应用转基因工程改变微生物的种群,使物质交换及反应向着有益于人类的发展方向进行;土传病虫害的遗传学控制,使现代农业生产中化学农药的使用及其残留降到最低程度。(3)土壤资源生物工程,土壤的酸、盐、湿、旱及重金属污染等不良因素(逆境胁迫)是造成农业低产的障碍因子,发掘和利用抗酸、抗盐、抗湿、抗旱及抗(耐)某些重金属毒害的野生或栽培的种质资源,剖析其分子机制,和分离其抗(耐)性基因,培育既有高抗(耐)性又是优质高产的新品种,将为有问题(低产)土壤资源的合理开发做出新贡献。

下面将就上述三方面所取得的进展做一个简要介绍。

## 三、土壤植物营养生物工程

土壤植物营养生物工程是土壤植物营养化学与现代分子生物学及基因工程相互交叉的研究领域。传统的土壤植物营养化学是研究土壤-植物-肥料等三者间的关系,调节养分缺乏的土壤环境,例如施用大量的肥料或其它土壤改良剂,把土壤肥力环境改良成适于某些植物生长的最适条件以获得高产优质的目的。这当然是一种重要的农业经营策略,但也已有成本高或过量施肥导致环境恶化的问题,而且资源潜力也有限制。某些野生植物可在某种养分胁迫条件下富集该养分而健康生长及作物品种或品系间营养效率差异的事实证明矿质营养特性也是受基因控制的遗传特性之一。因此利用转基因技术改造植物本身,创造养分吸收高效型新品种以便在养分缺乏的土壤条件下获得高产优质高效的收成,这是土壤植物营养生物工程的出发点。它以研究植物生理生化过程的遗传特性,植物养分吸收的分子机制,植物营养性状的遗传改良为主要内容,包括:植物营养性状的基因型差异,根系生理学及生态学特征,根细胞质膜的分子生物学,根系分泌物与养分吸收及迁移,高效吸收基因的分离及克隆,转基因细胞的组织培养及植株再生等等。

### (一) 植物营养特性基因型差异的生理学和形态学特征

植物营养特性基因型差异必然会表现在植物形态学和生理学上的不同特性, 根据这些特异性去寻找该性状的控制基因, 然后才有可能对该性状进行遗传学改良。

形态学及生理学上的特性主要包括根/冠比, 根毛和根系的伸展及空间几何分布; 养分在植物体内的分配、利用及其代谢过程; 根系分泌物及其在养分吸收上的作用等等。禾本科植物在缺铁胁迫下能分泌一类高铁载体——麦根酸类物质, 它不仅能螯合三价铁使之成为可溶态螯合物, 而且还能通过原生质膜上的特殊通道进入到根细胞内<sup>[14,15]</sup>。研究证明麦根酸类物质主要在根尖合成和分泌的, 其中烟碱酰胺合成酶和脱氧麦根酸合成酶是关键酶系统。人们正企图提纯分离这两种酶, 确定其氨基酸序列结构, 构建缺铁大麦根的 cDNA 文库, 克隆对应的基因, 转移到没有这种能力的其它植物中去, 以便提高非豆科作物耐铁贫瘠的能力<sup>[16-17,21]</sup>。

### (二) 植物营养特性的遗传学和分子生物学基础

植物营养特性的遗传控制即基因的数目和作用方式的研究是遗传学改良的前提。下面以铜和钾为例介绍营养性状的遗传学及分子生物学的一般情况。

1. 铜营养 在缺铜的土壤环境下, 黑麦对低铜的抗性比小麦强, 黑麦对铜高效的特性可以转移到小麦上。通过对小麦的黑麦加系 (分别以黑麦的不同染色体替换小麦的某一染色体) 及小麦的黑麦染色体的易位系 (分别以黑麦不同染色体的长臂替换小麦某一染色体的长臂) 的深入研究, 发现携带铜高效基因的是黑麦的第 5 条染色体 (5R), 而铜高效基因具体位于黑麦 5R 染色体的长臂一端<sup>[9,10]</sup>。

2. 钾营养 植物钾营养的分子生物学基础报道很多, Glass 等 (1992)<sup>[8]</sup> 发现大麦在低钾胁迫下<sup>35</sup>S-甲硫胺主要掺入到 43KD 的多肽中, 43KD 多肽的消长恰与 K<sup>+</sup> 内流的变化相吻合。表明该多肽可能是组成高亲和力 K<sup>+</sup> 运载系统的主要成分。目前他们正致力于该多肽的纯化、测序和抗体繁殖, 希望能分离到与高亲和力 K<sup>+</sup> 运载系统有关的基因。

### (三) 植物营养性状的遗传学改良

植物营养性状的遗传学改良国内外都处于起步阶段, 常用的改良措施有:

1. 常规育种 包括引种、群体筛选、杂交与谱系选择、轮回选择等, 这方面已获得不少成功的经验。例如通过谱系选择获得了铁高效燕麦品种, 轮回选择获得了铁高效高粱品种<sup>[20]</sup>。

2. 细胞遗传学方法 常规的杂交育种主要是选择近缘的亲本进行的, 而细胞遗传学方法人工创造多倍体是进行植物远缘杂交的重要手段之一。如既有小麦的优良性状又有黑麦的高抗逆性和铜高效吸收基因的小黑麦 (Tricale) 的育成便是一个成功的例子。

3. 植物细胞工程和组织培养 植物细胞的全能性使植物离体培养成为可能。离体培养不仅可以大大地提高选择和繁殖的效率, 而且还可以极大地提高细胞遗传变异的概率。我国在离体组织培养和细胞工程方面居国际领先水平, 特别是一些单子叶植物的原生质体培养成株的结果<sup>[3]</sup>。

4. 植物基因工程 通过导入有用的外源基因获得转基因植物以改良植物性状是植物基因工程的目的<sup>[2]</sup>, 在植物营养性状的改良方面也已取得了令人鼓舞的成就。1992 年 Anderson 等<sup>[7]</sup>、Schachtman 等<sup>[22]</sup> 和 Sentenac<sup>[23]</sup> 等人分别通过钾吸收缺陷型酵母突变

体的互补实验,从拟南芥组织中成功地克隆了 $K^+$ 通道: cDNA  $AKT_1$  和 cDNA  $KAT_1$ 。这两种通道的结构很接近但不是等位的,显然是属于 $K^+$ 通道基因家属的两个成员。 $AKT_1$  cDNA 较长,含 2650 对核苷酸,在 58~2574 区域为开放阅读框,编码 838 个氨基酸。 $KAT_1$  cDNA 略短,含 2200 对核苷酸,也只有一个长 2031 对核苷酸的开放阅读框,编码 677 个氨基酸组成的蛋白质。在序列结构上  $AKT_1$  和  $KAT_1$  都与动物细胞中的 Shaker 型  $K^+$  通道基因有很高的同源性,即在蛋白质的氨基末端分布着 6 个过膜的螺旋结构体,电压信号响应区和高度保守的形成通道孔的肽链段。但是 Shaker 型  $K^+$  通道是外流型通道,而  $AKT_1$  和  $KAT_1$  编码的  $K^+$  通道都属于  $K^+$  吸收控制型通道。当  $AKT_1$  cDNA 表达于酵母细胞后,其富集  $K^+$  能力显著提高。由于该项突破,人们企图将  $AKT_1$  或  $KAT_1$  基因转导到其它植物中,以增强后者的吸钾能力,提高钾肥的利用率。

#### 四、土壤微生物生物工程

实际上,分子生物学和基因工程与土壤学的结合首先是从土壤微生物和生物化学开始的。例如利用转基因技术控制和改变土壤微生物种群,防治和消除土传病虫害;豆科作物共生根瘤固氮的分子机制,固 N 基因的克隆及向非豆科作物的转导等等都具有十分诱人的前景。下面是几个成功的例子:

在土壤微生物研究中要有合适的技术来跟踪研究对象在自然条件下的数量变化与分布。核酸杂交和标记基因技术都是微生物个体生态学研究的理想技术。后者是指在细菌基因组中装入某个或某几个特殊基因,使之产生容易检测的性状。在荧光假单胞菌和铜绿假单胞菌中装入编码  $\beta$ -半乳糖苷酶和透性酶结构基因 LacZY 后,能够在加乳糖的基本培养基上水解 X-gal,使之呈现靛蓝,成为被检测细菌的标记。

土壤微生物之间(细胞与细胞,群体与群体)有益的、有害的相互作用(物质、能量和遗传的交换)是经常发生的。有报道说豌豆根瘤菌  $T_{83}K_3$  菌株的质粒 PJB<sub>5</sub>JI 能够在苜蓿根际转移到失去结瘤能力的苜蓿根瘤菌菌株 WL<sub>113</sub> 中,转移结合子可使苜蓿植株有效结瘤。

基因的转移也能在土壤中不同属的细菌之间进行,李阜棣报道(1991)<sup>[4]</sup>真养产碱菌 JMP<sub>134</sub> 菌株的 2,4-D 降解质粒 PJP<sub>4</sub> 在土壤条件下可转移到菜豆根瘤菌 3622-15 菌株中。

人们很早就知道苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 能够杀死一些昆虫,其杀虫机制是体内一种结晶的蛋白毒素:  $\delta$  内毒素。它能引起鳞翅目昆虫神经中毒致死。1987 年成功地分离出这种毒素基因,并将其转入烟草、蕃茄、马铃薯,使转基因的植株具有杀虫效力,而且毒素基因能稳定地遗传,对人畜无毒无害<sup>[5]</sup>。

#### 五、土壤资源生物工程

植物的盐害及土壤盐渍化;铝毒及土壤酸化;湿害及土壤潜育化;旱害及土壤沙漠化;重金属毒害及土壤的污染等等环境胁迫既是当前农业生产上导致低产高成本的原因,又是地球上不少未垦土地开发利用所遇到的主要障碍。植物对逆境条件的生理反应存在着极大的差异,那些抗性或耐性特高的植物在恶劣环境中能够正常生长,另一些具有优良品

质和高产的栽培植物因不能忍耐而导致生长不良。现代分子生物学的成果揭示出这些生理反应也是一种受基因控制的遗传特性。将抗性基因分离和克隆,通过转基因工程,培育和筛选对各种逆境具有高抗(或耐)性的品质优良的植物新品种,对于抗御各种自然灾害和大规模开发利用有问题的土壤资源无疑是具有巨大吸引力的。

盐对植物的危害是基于渗透胁迫、离子效应或干扰营养物质的吸收。而植物则可以从离子泵的活动、膜的选择性来避免或减轻盐分的危害;或者通过离子的调节吸收、渗透调节和渗透物质的合成来增加耐盐性。

植物的耐盐性具有一个或几个非专一的机制,如转变碳固定的途径,从  $C_3$  转向  $C_4$  或 CAM 进行光合作用;又如盐的区隔化、平衡渗透物质的合成与积累等<sup>[5]</sup>。

Gulick 等(1987)<sup>[6]</sup>报道高冰草的耐盐性在它与中国春小麦杂交后得到表达,从杂交后代中选出了一个耐盐性的双二倍体,发现高冰草的耐盐性是同位于不同染色体上的多基因控制的。近十年来人们从盐胁迫蛋白、盐胁迫 mRNA 及盐胁迫诱导的某些酶的合成等方面进行了很多研究,以期弄清植物耐盐基因表达的调控机理,为进一步创作耐盐作物品种建立了分子理论基础。

土壤酸化是世界范围内农业的障碍因子之一,我国酸性土壤面积约占全国耕地的 1/5。在低 pH 土壤中铝的毒害一直被认为是限制植物生长的原因。提高酸性土壤肥力和作物的生产力的传统办法是施用石灰和肥料对土壤条件加以改良,创造植物适宜的生长环境;但是我们也可从另一方面着手,即从基因转导、遗传改良作物的耐铝性、为酸性土壤的开发利用提供更加适宜的作物品种。我国酸性土壤资源数量大、分布广,在不同的生态环境条件下有众多的野生和栽培的耐铝毒抗酸性植物的种质资源可供利用,在土壤学家、分子生物学家的合作下,生物工程创造耐铝抗酸优质高产的作物新品种一定会获得成功的<sup>[6]</sup>。

最近在华盛顿大学生命中心工作的华人科学家 David Ho 博士从大麦类植物中发现和分离出一种控制植物抗旱、成熟、株高和茎秆强度(抗倒伏)的基因,并成功地转导到烟草植株,获得了抗旱、矮秆的新品种<sup>[7]</sup>。

又如耐高温植物的生理反应也是一个基因控制的遗传特性,有人从大豆叶细胞中发现和分离了在突然高温条件下产生保护细胞的蛋白质及编码这些蛋白质的基因,并成功地将这种基因转移到烟草植株中。转基因烟草在 42℃ 高温时,大豆的具有保护细胞作用的蛋白质的基因得到了表达。

我们有理由认为,对土壤和水体系中有毒物的降解及抗性;对污水灌溉中重金属元素的解毒或耐性;土地的复垦及城市和农村废弃物的利用等与资源的再度开发有关的研究中,生物工程也将发挥其重要的作用<sup>[12]</sup>。

## 六、土壤生物工程与其它土壤学科的关系

四十年前,华生和克里克在《自然》杂志上发表了题为“核酸的分子结构——脱氧核糖

1) Record, Washington University in St. Louis, Vol.17 No. 19, 1993: Genetically engineered plants, Biologists finds gene that controls height, strength, drought resistance.

核酸的结构”的论文,公布了“DNA”分子的双螺旋结构模型,谱写了分子遗传学的历史。以 DNA 重组(克隆)技术为基础的生物工程改变了全世界的工、农、医学的面貌,形成了造福于人类社会的巨大力量<sup>[4]</sup>。

生物科学正面临着大发展的时代,所有以生物为研究对象或实验材料的学科和交叉学科都属于“大生物学”的范畴。从这个意义上讲生物学是自然科学的领头学科,21 世纪将是生物科学的世纪。

土壤生物工程学在我国还刚刚起步,对于从事这一学科的土壤科学工作者,我们首先要强调学习和研究植物营养、肥料利用率的生理生化过程及其分子生物学基础;学习和研究植物在逆境条件下生理反应的分子机制和基因控制;学习和研究土壤微生物在根际微生态系统进行物质的、能量的交互作用的基因遗传特性。其次则要学习和掌握基因的分离、克隆、转导及表达,转基因植物细胞的组织培养、转基因植物的鉴定等一整套生物工程的基本技能,向着为解决面临的土壤问题而进行植物遗传改良的目标前进。

同时,必须强调指出的一点是决不能也不应该在任何意义上轻视或放松土壤微生物学、土壤植物营养化学、土壤酶及相关的生物化学、土壤生态学、土壤化学和土壤物理学、土壤环境化学、土壤地理及系统分类等分支学科的基础研究。土壤生物工程的成功是建立在这些学科更加深入的现代研究成果之上的,因为这样才能准确地选择最适宜和最有效的应用生物工程学的突破点<sup>[12]</sup>。

事物的发展是无穷无尽的,科学研究也决不能停止在一个水平上。作为土壤科学新的生长点之一的土壤生物工程学必将在生物科学的 21 世纪取得其应有的成功。

### 参 考 文 献

1. 谈家桢、赵寿元,1993: 遗传学发展史上的又一里程碑——DNA 双螺旋结构的发现。中国科学报, 557 期(1993. 12.10)。
2. 许智宏、刘春明,1992: 植物细胞的遗传转化和基因工程。于《植物生理和分子生物学》(余叔文主编),科学出版社。
3. 陈章良,潘乃镗,1993: 植物基因工程的现状、前景及问题。于《植物基因工程研究》(陈章良主编),北京大学出版社。
4. 李阜隸,1991: 分子生物学对微生物生态学的渗透。于《中国土壤科学的现代与展望》(中国土壤学会主编),江苏科技出版社。
5. 张福锁、崔海瑞、李大伟,1993: 盐胁迫诱导的植物基因表达。于《环境胁迫与植物营养》(张福锁主编),北京农业大学出版社。
6. 王建林、林咸永,1993: 植物对铝毒胁迫的适应机制。于《植物营养—生理生态学和遗传学》(张福锁主编),中国科学技术出版社。
7. Anderson, J. A. et al., 1992: Functional expression of a probable Arabidopsis thalian potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3736—3740.
8. Glass, A. D. M., M. Fernando, 1992: Homeostatic processes for the maintenance of the K content of plant cells: A model, Israel J. of Botany, 41: 145—166.
9. Graham, R. D. 1984: Breeding for nutritional characteristics in cereals, Advances Plant Nutrition, 1:57—102.
10. Graham, R. D. et al., 1987: Transfer to wheat of the copper efficiency factor carried on rye chromosome arm 5RL, Plant and Soil, 99: 107—114.
11. Gulick, P., J. Dvorak, 1987: Gene induction and repression by salt treatment in roots of the salinity-sensitive Chinese spring wheat and the salinity-tolerant Chinese spring x *Elytrigia elongata* amphiploid, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 99—103.
12. Lauchli, A., 1987: Soil science in the next twenty-five years: Does biotechnology play a role? Soil Sci. Am. J., 51: 1405—1409.

13. Lynch, J. M., 1987: Soil Biology: Accomplishments and potential, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 51: 1409—1412.
14. Marschner, H. et al., 1986: Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutrition*, 9(3—7): 695—713.
15. Marschner, H. et al., 1987: Localization of phytosiderophore release and iron uptake along intact barley roots, *Physiol. Plant*, 71:157—162.
16. Mori, S., N. Nishizawa, 1989: Identification of barley chromosome No. 4, possible encoder of genes of mugineic acid synthesis from 2'-deoxymugineic acid using wheat-barley addition-lines, *Plant Cell Physiology*, 30:1057—1061.
17. Mori, S. et al., 1990: Identification of rye chromosome 5R as a carrier of the genes for mugineic acid synthetase using wheatrye addition lines, *Jpn. J. Genet.*, 65:343—352.
18. Okumara, N. et al., 1991: An iron deficiency-specific cDNA from barley roots having two homologous cysteine-rich MT domains, *Plant Mole. Biol.*, 17: 531—533.
19. Paul, R. E. and A. H. Ehrlich. 1992: The value of biodiversity. *World Environment*, 4: 42—47.
20. Rodriguez de Cianzio, S. R., 1991: Recent advances in breeding for improving iron utilization by plants, *Plant and soil*, 130:63—68.
21. Shoiima, S. et al., 1990: Biosynthesis of photosiderophores, *Plant Physiology*, 1497—1503.
22. Schachtman, D. P. et al., 1992: Expression of an inwardrectifying potassium channel by the *Arabidopsis* KAT1 cDNA, *Science*, 258: 1654—1656.
23. Sentenac, H. et al., 1992: Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system, *Science*, 256: 663—665.

## SOIL BIOTECHNOLOGY

### —CROSS DISCIPLINE OF SOIL SCIENCE AND MOLECULAR BIOLOGY

Cao Zhihong, Shi Weiming and Zhu Yongguan

(*Institute of Soil Science, Academia Sinica, Nanjing, 210008*)

#### Summary

Soil biotechnology, as a result of combination of soil science with molecular biology and genetical engineering, is one of the new research areas and growth points of soil science. Based on the research fruits of soil science, this cross discipline uses the theories of molecular biology and the techniques of genetical engineering to study molecular mechanisms and genetical control of plant mineral nutrition, plant resistance to adverse soil conditions and soil microbiological processes, with the aim of creating genetically manipulated plants to solve such problems as low efficiency of plant nutrition and poor productivities of soils due to infertility, salinity, acidity, the pollution and toxicity of aluminum and other heavy metals, etc. Also, some achievements in these fields are briefly introduced and the future development is discussed in this paper.

**Key words** Soil biotechnology, Molecular biology, Genetical engineering