

# 植物遗传转化技术在作物改良中的应用

原亚萍 母秋华 贾玉峰 杜娟 张新生

(中国人民解放军农牧大学植物细胞工程室, 长春 130062)

**提 要** 本文较为系统地介绍了植物遗传转化技术中的各种方法及其特点,同时介绍了利用这种方法在农作物改良中取得的成绩,为进行快速、优质、高产的良种选育提供了一条诱人的全新途径。

**关键词** 遗传转化;作物改良

长期以来,人们一直采用传统的育种方法培育作物新品种,但由于可用于遗传上的基因日益枯竭,常规的育种方法很难使农作物在产量、质量及抗性等方面大幅度提高。近几年来随着生物技术的迅速发展和不断完善,采用基因工程手段进行作物遗传育种和新物种的创造已逐步从设想变为现实。植物遗传转化技术日益显示出其巨大潜力。它是利用重组DNA技术、细胞组织培养技术或种质系统转化技术,将外源基因导入植物细胞或组织,获得转基因植物的技术。随着此项技术的不断创新和改进,在植物抗除草剂、抗虫、抗病及高产优质等方面都已得到了不少转基因植株,为进行快速、优质、稳产 of 良种选育提供一条诱人的全新途径。

## 1 植物的遗传转化技术

### 1.1 根瘤农杆菌介导的基因转移

根瘤农杆菌为一种革兰氏阴性土壤杆菌,对单子叶植物侵染广泛。它的体内含有一些很大的质粒,在Ti质粒上有一段DNA称为T-DNA,在土壤农杆菌侵染植物细胞时,T-DNA能够插入植物细胞的基因组中去并稳定地遗传给以后分裂出来的细胞。T-DNA上含有一些致瘤基因,使得被它侵染的植物产生肿瘤即冠瘿瘤。人们利用T-DNA能够插入细胞的特点,将其中导致植物形成肿瘤的那些基因全部切除,换上我们所需要的目的基因,这就组成一个可将目的基因带进植物细胞中去的载体。遗传和分子分析表明,Ti质粒中含有两套为基因转移到植物所必需的序列,即一段至数段T-DNA(转移DNA)区和Vir(毒性)基因。T-DNA区含有8~13个基因<sup>[1]</sup>,在侵染过程中,农杆菌附着到植物细胞后,只留在细胞间隙中。T-DNA首先在细菌中被加工切下复制,然后转入植物细胞。Vir区大小为30 kb,分VirA、B、C、D、E、G、H 7个操纵子共24个基因<sup>[2]</sup>,起共同调控作用,与T-DNA的加工和转移有关。这种方法是植物基因工程一开始就使用的方法,现在仍相当广泛地应用着。其优点是不需要分离原生质体,用整块的植物组织操作起来比较方便(叶盘法和共培养法),此法插入的基因数目少并且比较稳定,为基因调控的研究提供很有利的条件。缺点是难以转化大多数单子叶植物,特别是具有重要经济价值的禾谷类作物<sup>[2]</sup>。

## 1.2 基因枪转化法

基因枪(Particle gun)是 1987 年美国康奈尔大学 Sanford 等人首先发明的<sup>[3]</sup>,籍高速度运动的金属微粒将附着其表面的核酸分子引入到受体细胞中的一种遗传物质转化技术。基因枪是利用火药爆炸、高压放电或高压气体作为驱动力,加速金属(微弹)使其进入带壁细胞的一种方法。在此过程中,质粒 DNA 首先沉淀并结合在微弹(钨粉、金粉等)表面(通常以氯化钙、亚精胺作为沉淀剂来促进 DNA 与微弹结合),带有 DNA 分子的微弹经加速后获得足够的动量,进而穿透植物细胞壁进入靶细胞,随后释放出 DNA 分子并随机整合到寄主的基因组内<sup>[2]</sup>。自从 Klein 等人用基因枪取得洋葱表皮细胞转化成功后<sup>[4]</sup>,这一技术很快被用于玉米<sup>[5~7]</sup>、大豆<sup>[8]</sup>、水稻<sup>[8]</sup>、小麦<sup>[3,8]</sup>等以前用其他方法难以转化的植物上。由于基因枪技术可以不经原生质体阶段,因而在禾谷类作物的直接转化方面具有很大应用潜力,它将遗传转化推向一个新的高潮。基因枪技术与农杆菌介导法相比,它的不足之处是转化频率还很低。另外基因枪造价高,转化成本也比较高。但总的来说,基因枪转化技术仍是一种具有很好发展前景的遗传转化技术。

## 1.3 PEG 诱导的遗传转化(PEG 法)

借助某些化学药品如聚乙二醇(PEG)等可诱导质粒 DNA 转化植物细胞。应用这一方法可打破农杆菌宿主范围限制,使转化扩展到禾谷类作物中<sup>[10]</sup>。PEG 法是目前应用最为广泛的直接基因转移方法。它的实验成本低廉,结果也较稳定,重复性好,特别是不需要特殊的仪器设备,易于推广。在禾谷类作物中应用这种方法已获得水稻、小麦、玉米的转基因植株<sup>[2]</sup>。此种方法的局限性在于以裸露的原生质体为基因受体,需建立可靠高效的原生质体再生系统,这对大多数重要农作物来说还是一个问题。

还有一些其它转化方法,如电击穿孔转化法(Fromm 等人首先在植物原生质体上运用电击法<sup>[11]</sup>,将 CAT 基因转移到烟草、胡萝卜和玉米原生质体中并得到表达)、激光微束转化法(王兰岚等人利用此法将外源基因导入小麦获得成功<sup>[12]</sup>)、显微注射转化法及超声波转化法<sup>[13]</sup>等。利用上述方法已经在一些植物中获得了瞬间或稳定的基因表达,这些方法的适用范围有待进一步探索。

# 2 在作物改良中的应用

在短短的 10 年内,基因工程已获得了一批转基因植株,其中包括抗除草剂、抗虫、抗病、优质高产等转基因植物。目前,这些成功的植物基因工程有的已进入大田实验阶段。

## 2.1 抗除草剂

将除草剂耐性引入农作物是增加对除草剂选择性及安全性的一条新途径。培育抗除草剂的作物是一种高效、低成本、无公害控制杂草的手段。抗除草剂的基因工程是:①把除草剂作用的酶或蛋白质的基因转进植物,使其拷贝数增加,从而转基因植物中这种酶或蛋白的量大大增加。如果除草剂的浓度不足以破坏植物体内的这种酶或蛋白,那么就不能把植物杀死,而杂草则因为酶和蛋白被除草剂破坏而被杀死。一个成功的例子就是将 EPSP 合成酶基因转入植物抗除草剂。②转移一种能以除草剂为底物的酶的基因到植物中,该基因编码的酶在转基因植物中将除草剂催化掉,从而保住植物不被杀死。这种方法成功的例子是抗磷酸麦黄酮的基因工程。③针对除草剂能识别其作用酶上的一定位点这一特点,人们用基因突变的方法使该位点上的相应氨基酸发生突变,但这种突变并不损坏这个酶的二级结构和酶促功能,只是除草剂不能识别它了,这样转基因植物就表现出对除草剂不敏感。欧美

几家大公司早已成功地转化了抗除草剂基因,从 1983 年以来,国外各大公司已利用转基因技术培育出多种抗除草剂作物,在购买他们的除草剂的同时,还必须买他们生产的种子,构成配套的专利。国内外都在进行这方面的研究,在今后的几年内预期会出现多种抗除草剂的玉米、大豆、水稻、棉花、番茄、烟草及多种蔬菜的转基因品种。1996 年我室与中科院遗传所合作,利用基因枪法将 *bar* 基因转入玉米幼胚、高粱蔗与糜子蔗的愈伤组织,获得了抗除草剂 Basta 的玉米、高粱蔗及糜子蔗的再生植株。总之抗除草剂的转基因植物的出现,将给农业生产带来极大方便。

## 2.2 抗虫

虫害是农业生产一大害,化学药剂杀虫不仅成本高,而且严重污染环境。人们正试图用基因工程的方法来达到控制虫害的目的。早在 1953 年就知道苏云金杆菌能杀死一些昆虫<sup>[14]</sup>。现已弄清其杀虫机制在于这种杆菌体内一种结晶蛋白毒素,即内毒素,它能引起鳞翅目昆虫神经中毒最后死亡<sup>[19]</sup>。现在分离到千万个 Bt 菌种,根据杀虫谱的不同,将杀虫基因分为 7 大类。又根据结构基因中限制性酶切图谱和它们之间同源性不同,将 7 大类基因分成了 29 个亚类,统称 Cry 基因。目前按照植物优化密码子氨基酸序列,人工修饰和合成了 PM CryIA 基因、FM CryIA 基因、FM CryIAⅢ基因和 GFM CryIA 基因等<sup>[15]</sup>,这些改造后的基因可在植物中高效表达杀虫活性。首次报道获得抗虫转基因植株是在 1987 年,比利时的 Veack 等人用 CryIA(b)基因与 NPTⅡ基因融合转化烟草。我国是在 80 年代中后期开展了这方面的研究,1990 年 Perlak 等人<sup>[17]</sup>获得了抗虫的棉花植株,1992 年底中国农科院生物技术研究中心的郭三堆等人在国内首先合成了 CryIA 杀虫晶体蛋白结构基因<sup>[15]</sup>。目前中国农科院与山西棉花研究所等合作,已将合成的 GFM CryIA 基因导入棉花,经分子生物学鉴定已整合到棉花基因组中,获得了高抗虫能力的转基因植株。中科院微生物研究所的丁群星等人用子房注射法将 Bt 毒蛋白基因导入玉米并获得转基因植株<sup>[18]</sup>。北京农业大学的王国英等<sup>[19]</sup>用基因枪法将 Bt 毒蛋白基因导入玉米并获得转基因植株。现国内外利用修饰、改造、部分及全合成以 Cry 基因转化植物,得到的转抗虫基因植物品种已达 25 种以上,取得突破性进展。

## 2.3 抗病

植物的病毒危害是农业生产上损失最大的病害之一,其防治主要靠抗病育种、农药、防治媒介昆虫、脱毒等方法。而常规选育抗病品种时间较长,现代遗传工程技术在农业生产上的应用为培育抗病毒植物新品种开辟了短捷而有效的新途径。目前就以下几方面进行了研究:①向植物中转入病毒的外壳蛋白基因;②向植物中转入病毒的卫星 RNA 基因;③以利用病毒的反义 RNA;④利用植物自己编码的抗病基因;⑤利用 Ribozyme 裂解病毒基因组;⑥利用病毒上的其它基因。其中外壳蛋白介导的保护是转基因植物培育最广泛采用的方法。1986 年美国科学家 Beachy 等<sup>[20]</sup>,将烟草花叶病毒(TMV)U 株的外壳蛋白 cDNA 转入烟草细胞,转基因烟草及其后代都表现出对 TMV 侵染有同于交叉免疫作用中的抗性。1991 年 Hoechse 在德国获得一项“用杂种基因生产转基因植物”的专利,提出新杂种基因可用作生产转基因植物的选择标记,也可用于生产具有改良抗病毒和除草剂特性的转基因植物。我国北京大学植物基因工程实验室现已成功地分离并合成了编码烟草花叶病毒、黄瓜花叶病毒、马铃薯 X 病毒、马铃薯 Y 病毒和另外几种常见的作物病毒的外壳蛋白基因,并对这些基因作了序列等方面的分析。同时还得到了其中一些病毒外壳蛋白基因对我国目前生产上应用的烟草、番茄优良品种的基因转化植株。我室与中科院遗传所合作,用基因枪法将广谱抗性

基因导入玉米愈伤组织,经卡那霉素筛选,现已获得一再生植株。

## 2.4 高产、优质及抗逆性

取自然界植物体内分子量较小富含硫氨基酸的蛋白质基因转入适当受体,往往是改良作物蛋白质品质的捷径。我们知道,大多数双子叶植物中赖氨酸含量较高,缺少蛋氨酸,而单子叶植物中如玉米、小麦等却是赖氨酸不足。如能将双子叶植物的蛋白基因如大豆的贮藏蛋白基因转移到一些重要的禾谷类作物中去,就能够提高它们的赖氨酸含量。我国一些单位在利用贮藏蛋白基因方面得到了转基因植物。日本某些研究所从水稻、松树和梨树中分离到光合作用基因,将其导入光合作用弱的作物,以加大作物的光合作用强度,达到提高作物产量的目的。1991 年 Kubota 在日本获得一项转基因水稻繁殖技术专利,所培育的新型水稻品种营养价值高,味道好,产量也高。另外,将抗性基因如抗盐、抗旱、抗寒等基因转入优质丰产的一些品种中去,就能大大扩大它们的分布地区和种植面积。我国地方性品种十分丰富,抗不良环境条件的种质资源非常多,有待于我们挖掘和利用这些基因。

## 参 考 文 献

- 1 Nester E W, et al. *Annu Rev Plant Physiol*, 1984, 35: 387
- 2 傅英昭等. 植物遗传转化技术手册. 北京: 中国科学出版社, 1994, 5: 97 ~ 123
- 3 Sanford J C, et al. *Particulate Sci. Technol.*, 1987, 5: 27 ~ 37
- 4 Klein T M, et al. High-velocity microprojectiles for delivery of nucleic acid into living cells. *Nature*, 1987, 327: 70 ~ 73
- 5 Klein T M, et al. Factors influencing gene delivery into zea mays cell by high-velocity microprojectiles. *Bio. Technology*, 1988, 6: 559 ~ 563
- 6 Spencer T M, et al. Segregation of transgenes in maize. *Plant Molec Biol.*, 1992, 18: 201 ~ 210
- 7 Fromm M E, et al. Inheritance and expression of chlamydomonas genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio. Technology*, 1990, 8: 833 ~ 839
- 8 Wang Y L, et al. Transient expression of foreign gene in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. *Plant Molec Bio.*, 1988, 11: 433 ~ 439
- 9 Vasil V, et al. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio. Technology*, 1992, 10: 667 ~ 674
- 10 刘世强等. 细胞工程的理论和实践. 沈阳: 辽宁大学出版社, 1996, 235 ~ 256
- 11 Fromm M E, et al. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature*, 1986, 319: 791 ~ 793
- 12 王兰岚等. 利用激光微束穿孔法将外源基因导入小麦的研究. *遗传学报*, 1995, 22(5): 394 ~ 399
- 13 Zhang H, et al. Gene transfer into maize by ultrasonication. *Agricultural Biotechnology*. Beijing: China science and Technology press, 1992, 311 ~ 312
- 14 Hannay C L, et al. *Canadian Journal of Microbiology*, 1995, 1: 674 ~ 710
- 15 陈章良主编. 植物基因工程研究. 北京: 北京大学出版社, 1993, 16 ~ 17
- 16 郭三堆. 植物 Bt 抗虫基因研究进展. *中国农业科学*, 1995, 78(5): 8 ~ 13
- 17 Perlak F J, et al. Insect resistant cotton plants. *Bio. Technology*, 1990, 8: 939 ~ 943
- 18 群丁星等. 用子房注射法将 Bt 毒蛋白基因导入玉米的研究. *中国科学(B 辑)*, 1993, 23(7): 707 ~ 713
- 19 王国英等. 用基因枪将 Bt 毒蛋白基因转入玉米及转基因植株再生. *中国科学(B 辑)*, 1995, 25(1): 71 ~ 76
- 20 Register J C, Beachy R N. *Virology*, 1988, 166: 524

(责任编辑: 张 瑛)