

文章编号: 1003-8701(2000)05-0023-05

植物遗传转化育种技术的研究进展及评价

杜娟, 王萍, 王昱

(中国人民解放军军需大学植物基因工程研究中心, 吉林 长春 130062)

摘要:介绍了全球转基因作物的研究方法、种植面积、推广效益、存在问题及展望。

关键词:遗传转化; 作物育种; 基因枪; 农杆菌

中图分类号: Q 943.2

文献标识码: A

植物的遗传是指用离体培养的植物组织、细胞或原生质体作受体, 通过某种技术和途径转入外源基因, 获得使外源基因稳定地表达的转基因植物体。利用植物遗传转化技术育种具有传统育种无可比拟的优越性, 主要表现在以下几方面: ①植物遗传转化是在基因水平上改造植物的遗传物质, 更具有科学性和精确性; ②定向改造植物遗传性状, 提高了育种的的目的性和可操作性; ③扩展了育种范围, 打破了物种之间生殖隔离障碍, 实现了基因在生物界的公用性, 丰富了基因资源; ④利用高科技如基因导入技术进行育种和品种改良, 使育种途径进入一个崭新的生物技术时代。

1 全球转基因作物的种植面积及效益

1983年首例转基因作物(GMC, Genetically Modified Crops)问世, 1986年转基因作物批准进入田间试验全球仅3例, 1990年达到了120例。1993年Calgene公司研制的延熟保鲜转基因番茄在美国批准上市, 开创了转基因植物商业应用的先河。1996年全球转基因作物的种植面积仅600万 hm^2 , 1998年达到2780万 hm^2 , 1999年猛增到3990万 hm^2 , 较1998年增加了44%。美国农业部已批准3315例转基因植物进入田间试验, 涉及试验点14154个, 已批准50种转基因植物产品商业化, 包括抗螟虫玉米, 抗甲虫马铃薯, 抗除草剂的玉米、棉花和大豆, 抗病毒的西葫芦和番木瓜, 雄性不育的菊苣以及延迟成熟的番茄等。美国1/4的耕地种植的是转基因作物, 其中转基因抗除草剂大豆占美国大豆总面积的55%, 抗虫棉占棉田总面积的近50%, 转基因玉米占玉米总面积的30%, 美国市场上已有近4000种食品来自遗传工程体(GMO, Genetically Modified Organisms)。1998年按转基因植物种植面积的多多少排序: 美国2050万 hm^2 , 占总面积的74%; 阿根廷430万 hm^2 , 占15%; 加拿大280万 hm^2 , 占10%; 澳大利亚10万 hm^2 , 占1%; 墨西哥、西班牙、法国、南非和中国的转基因植物种植面积都在10万 hm^2 以下, 低于1%。5种主要农作物按种植面积的多多少排序依次为: 大豆510万 hm^2 、玉米320万 hm^2 、烟草300万 hm^2 、其次为棉花、油菜和马铃薯。就转基因性状而言, 抗除草剂的农作物种植面积最多690万 hm^2 , 占转基因农作物总面积的77%; 其次为抗虫、抗病农

收稿日期: 2000-06-12

基金项目: 国家植物转基因中试及产业化基地专项基金(J99-B-001)

作者简介: 杜娟(1966-), 女, 长春市人, 学士, 助理研究员, 从事植物分子生物学研究。

作物 400 万 hm^2 , 占转基因农作物总面积的 22%。全球已有一半以上的大豆和三分之一的玉米种植的是抗除草剂或抗病的转基因品种。转基因农作物进入市场后产生了巨大的经济效益, 全球转基因作物销售收入 1995 年为 7 500 万美元, 1996 年为 2.35 亿美元, 1997 年达 6.7 亿美元, 1998 年达 15 亿美元, 4 年间销售收入增加了 20 倍。

我国植物基因工程研究始于 80 年代初期, 并于 80 年代中期将生物技术列入国家‘863’高科技发展计划。据中国农业生物技术学会 1996 年统计, 我国正在研究和开发的转基因植物种类达 47 种, 涉及各类基因 103 个, 其中与病虫害防治有关的基因约 62 种, 即抗病毒病基因 33 种、抗细菌病 8 种、抗真菌病 7 种、抗虫 11 种以及抗除草剂 3 种。目前, 在我国已有 6 种转基因植物被批准进行商品化生产, 分别为华中农业大学的转基因耐贮藏番茄, 北京大学的转查耳酮合成酶(CHS)基因矮牵牛、抗病毒甜椒、抗病毒番茄, 中国农科院的抗虫棉花, 美国 Monsanto 公司的保铃棉。其中国产的抗虫棉已大面积生产, 累计推广 10 万 hm^2 , 1998~1999 年转基因抗虫棉的社会经济效益约为 10 亿元。我国是国际上第一个商品化种植转基因作物(抗黄瓜花叶病毒 CMV 和抗烟草花叶病毒 TMV 双价转基因烟草)的国家。可见, 全球转基因作物的商业化已势不可挡, 转基因农业的新时代已经到来。

2 植物遗传转化方法

2.1 农杆菌介导的转化方法

转化植物细胞的农杆菌有两类, 即根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*)。前者含 Ti 质粒, 后者含 Ri 质粒, 其中对 Ti 质粒的研究比较详细, 而且应用广泛。根癌农杆菌是革兰氏阴性菌, 能够感染大多数双子叶植物的受伤部位, 并使之产生冠瘿瘤 (Grow gall tumor)。50 年代中期, 人们在冠瘿瘤组织中发现了冠瘿碱 (Opine), 冠瘿碱可以为根癌农杆菌的生长提供碳源和氮源。1974 年, 人们发现根癌农杆菌在感染植物时, 可将其环状 Ti 质粒上的一段 DNA 插入到植物基因组中, 并引起植物遗传特性的变化。然而, 由于在载体系统和转化方法研究上的进展, 农杆菌已在转化水稻、玉米、小麦、石刁柏等单子叶植物上取得了成功。农杆菌在三大禾本科作物上转化成功的 3 个典型的试验分别为 Hiei 等 1994 年对水稻的转化, Ishida 等 1996 年对玉米的转化以及 Cheng 等 1997 年对小麦的转化。此外, Tingay 等 1997 年在大麦上获得转化成功, Arencibia 等 1998 年首次利用农杆菌介导甘蔗获得转基因植株。早期的研究认为, 农杆菌侵染的寄主范围主要限于双子叶植物和极少数的单子叶植物。主要是因为以下几方面: ①多数单子叶植物的细胞缺少农杆菌的附着位点, 共培养时加入低浓度的果胶酶、精氨酸或一些表面亲和剂等可以有效提高农杆菌对单子叶植物细胞的附着; ②单子叶植物细胞缺乏诱导 Vir 区活化的因子, 从而限制了 T-DNA 向植物细胞的转移, 目前已发现有 7 种酚类化合物与诱导 Vir 基因的表达有关, 其中乙酰丁香酮 (AS) 和羟基乙酰丁香酮最为有效, 通过添加乙酰丁香酮来诱导 Vir 基因的表达, 已成为禾本科作物转化成功的关键环节; ③单子叶植物伤口处的细胞易木质化或死亡, 不能形成农杆菌的感受态细胞, 但选择生长旺盛的单子叶植物细胞作为受体则利于转化。Cheng 等 1997 年在细菌感染培养基中加入表面亲和剂, 有效地提高了小麦受体的 GUS 基因表达, 以新鲜的幼胚、预培养的幼胚和胚性愈伤组织为受体, 导入 NPT-II 基因, 3 种受体都获得转基因植株。目前在禾本科作物上较常用的菌株有 C58 (小麦)、LBA4404 (玉米、水稻)、EHA101 (水稻) 以及 EHA105 (水稻), 其中 LBA4404 和 C58 对羧苄青霉素较敏感, EHA101 和 EHA105 对头孢霉素较敏感。用农杆菌介导的转化, Ishida 等 1996 年在玉米上获得了 5%

~30%的转化频率, Hiei 等 1994 年在水稻上获得的最高转化频率为 29%, Rashid 等 1996 年获得籼稻 22%的转化频率, 农杆菌转化技术的日渐完善以及应用的日渐增多足以显示出在农杆菌转化禾本科作物方面发展的巨大潜力。

2.2 基因枪转化法

基因枪法(*particle bombardment*, *Particle gun*,)是籍高速度运动的金属微粒将附着于其表面的核酸分子引入到受体细胞中的一种遗传物质导入技术。其原理是利用火药爆炸、高压放电或高压气体作为驱动力加速金属粒子(微弹), 并使其进入带壁细胞。在此过程中质粒 DNA 首先沉淀在微弹(钨粉、金粉等)表面(通常以氯化钙、亚精氨作为沉淀剂来促进 DNA 与微弹的结合), 结合有 DNA 分子的微弹经加速而获得足够的动量, 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。

美国 Cornell 大学 Sanford 等 1987 年最早研制出火药式基因枪, 不久该实验室的 Klein 等 1987 年首次将携带有细菌氯霉素乙酰转移酶(*Cat*)基因的烟草花叶病毒 RNA 用基因枪导入到洋葱表皮细胞中并获得表达。美国杜邦公司 1990 年推出的商品基因枪 PDS-1000 系统以及中科院生物物理研究所研制的 JQ-700 型基因枪即属于火药式基因枪, 利用该种基因枪已成功获得了大豆、番木瓜、玉米、水稻及小麦等多种作物的转化植株。火药式基因枪的装置结构简单, 操作成本低, 但转化效率不高, 轰击过程中弹头产生的碎片和微弹形成的粘液状聚集物都会对受体材料造成伤害。Christou 等 1990 年设计了放电式基因枪, 通过高压放电引起水滴气化产生的冲力, 驱动微弹载体连同微弹加速运动, 轰击靶细胞或组织, 应用该种基因枪已获得了大豆、棉花、菜豆及水稻等转基因植物。Sanford 等 1991 年等在火药式基因枪基础上又设计了气动式基因枪, 如 Bio-Rad 公司出售的 PDS-1000/He 型基因枪。气动式基因枪比较安全、清洁, 通过调节气体压力可以有效地控制粒子的运行速度, 金属颗粒分布比较均匀, 每枪之间差异小, 且转化效率较高。

单子叶植物的基因转化由于转化难度比较大, 虽迟于双子叶植物, 但随着分子生物学技术的飞速发展, 转基因研究进展很快。Vasil 等 1992 年获得了世界上第一株转基因小麦, 利用 PDS-1000/He 型基因枪将 *Gus* 基因和抗除草剂基因(*Bar* 基因)导入到长期培养过的小麦愈伤组织, 第二年又报道直接枪击幼胚, 获得可育的转基因小麦植株; Becker 及 Nehra 等 1994 年分别报道用基因枪法枪击幼胚盾片组织获得转报告基因的小麦植株。小麦的转化除抗除草剂 *Basta* 的 *Bar* 基因外, 大多数是用作模式试验的筛选基因 *NPT II*、*GUS*、*HPT* 及 *Biolaphos* 等。Blechl 及 Altpeter 等 1996 年应用基因枪法分别将含有麦谷蛋白亚基基因的质粒导入小麦, 并获得成功表达。国内的傅荣昭及黄粤等分别用基因枪法将人工雄性不育基因和 *PAT* 酶基因(*Bar* 基因)导入小麦中并获得转基因植株。近来已有将抗病基因转化小麦的报道, Bliffied 等 1999 年将来源于大麦种子抗真菌的几丁质酶基因导入小麦, 获得了对禾白粉菌(*Erysiphe graminis*)侵染具有抗性的转基因植株。基因枪法目前转化小麦的频率还很低, 只有 0.5%~2.5%。梁辉等 1998 年对影响基因枪法转化小麦幼胚的几个因素进行了研究, 认为轰击前 6 小时至轰击后 18 小时, 将愈伤组织保持在附加 0.5 M 甘露醇的渗透培养基中, 将提高外源基因的瞬时表达量, 并提高有效转化率。周森平等 1999 年对小麦基因枪法转化技术进行了改进, 认为轰击时金粉与 DNA 配比是转化的关键因素之一, 金粉用量过大, 则受体材料细胞壁和膜损伤大, 造成细胞质渗漏, 从而影响胚性愈伤的形成, 降低转化率。Christou 等 1991 年首次用放电式基因枪轰击水稻幼胚得到转基因水稻植株。Gordon-Kamm 等 1990 年首次获得转基因玉米, 用基因枪法将 *Gus* 和 *Pat* 基因导入玉米悬浮细胞系

中;Kozziel 等 1993 年培育出了抗虫的转基因玉米,将其构建的一个人工基因 Cry I A(b)用基因枪法导入到一个优良玉米自交系的幼胚中,转基因植物能高水平表达 Cry I A(b),并表现出很强的抗玉米螟的能力;Caimi 等 1996 年将细菌的淀粉化酶 SacB 基因转入玉米,促进玉米合成具有较高经济价值的果聚糖;王国英等 1995 年用基因枪法将 Bt 基因和 hpt 基因转入玉米悬浮细胞、愈伤组织及幼胚中,获得大量转基因植株,但对部分转基因植株的室内玉米螟饲喂试验表明其抗虫性差异较大。

3 对转基因植物的评价

3.1 不同转化方法的遗传特性比较

不同的基因转化方法对整合的外源的结构、稳定性及其传递规律均有明显影响。大量实验证明,根癌农杆菌 Ti 质粒转化系统有许多优点:①该转化系统是天然的转化载体系统,成功率较高;②对该转化系统的研究最清楚,方法最成熟,应用最广泛;③Ti 质粒的 T-DNA 区可以容纳相当大的 DNA 片段插入,目前已把长达 50 kb 的异源 DNA 序列通过 T-DNA 完整地转移到植物细胞中;④T-DNA 上含有引导 DNA 转移和整合的序列,以及能够被高等植物细胞转录系统识别的功能启动子和转录信号,使插入到 T-DNA 区的外源基因能够随同 T-DNA 一起在植物细胞中表达;⑤整合进植物基因组中的 T-DNA 及插入的外源基因可以根据不同的需要,通过连接不同的启动子进行特异表达;⑥外源基因多以单拷贝插入,遗传稳定性好,多数符合孟德尔遗传规律。目前,以农杆菌介导的转化已成为常规技术,在众多转基因植物中约 80%是由农杆菌转化的。

基因枪转化无宿主限制,几乎适用于任何材料,甚至也适用于动物、微生物细胞的转化。其受体类型广泛,迄今为止已转化过的受体包括原生质体、悬浮细胞、根或茎的切段、成熟胚、幼胚、分生组织、愈伤组织、花粉细胞、胚芽鞘等几乎所有具有潜在分生能力的组织或细胞。这种 DNA 直接导入植物受体细胞的方法,使 DNA 有序性和计量性都较差,整合机制也尚未清楚。因此,它与农杆菌转化相比,外源 DNA 的整合位点较多,整合的外源 DNA 易发生结构变化和修饰,整合的外源 DNA 遗传特性多,转基因植株的表型丰富,F₁ 植物的分离比例比较复杂,但也基本符合孟德尔规律,单位点的 3:1 分离比较少,其遗传稳定性与农杆菌相比表现较差。

3.2 植物遗传转化潜在的应用问题

转基因作物存在的潜在风险主要表现在以下几方面:①转基因作物本身可能变为杂草;②转基因作物通过基因流可使近缘种变为杂草;③可能产生新的超级病毒或新的病害;④作为人工制造的转基因作物,可能成为自然界原来不存在的外来品种,若干年后可能对环境造成破坏;⑤对非目标生物可能有伤害,对生物多样性有威胁。另外,人们担心的问题还有转基因作物作为食品的安全性问题,这主要是由于转基因作物在实验室阶段需使用抗生素标记进行筛选,而抗生素标记基因是否会发生基因水平转移(Horizontal gene transfer),如是否水平转移至肠道微生物或上皮细胞而降低抗生素在临床治疗中的有效性,贾士荣 1997 年曾认为这种可能性非常小。随着技术的发展,现已经可以将转基因植物中的标记基因通过定位重组技术删除,或使用更安全的标记基因如甘露糖-6-P-异构酶。也可以不用标记基因,如花粉管通道法即避免了使用抗生素来筛选。转基因作物的安全性是一个重要而复杂的问题,应谨慎对待,不要急于下结论,当前有的转基因食品已上市,应该在货架上对该食品贴标签,让公众对是否愿意购买转基因食品有选择的自由。美国、荷兰、日本、英国等国家于 1999 年

7 月曾声明转基因植物上市应标明,以保证市民对其使用的选择性。虽然我国在国际上首先进行转基因作物商品化,但由于基础、经费及人才等种种原因而造成后劲不足,针对我国国情,加强优质、高产以及提高各种抗逆性的转基因作物研究将成为发展的重点。我国农业部于 1996 年 7 月颁布了《农业生物基因工程安全管理实施办法》,1997 年 3 月底前受理了国内外 26 项安全性评估申请,其中以转基因植物居绝大多数,26 项中批准了 22 项可进行中间试验或环境释放或商品化生产,转基因延熟番茄已被批准进入商业化。由此可见,转基因植物在我国商业化前景光明。

参考文献:

- [1] 贾士荣. 转基因作物的环境及食品安全性[J]. 生物工程进展, 1997(1): 17.
- [2] 贾士荣. 转基因作物的安全性争论及其对策[J]. 生物技术通报, 1999, 6: 1—7.
- [3] 范云六, 等. 迎接 21 世纪农作物生物技术的挑战[J]. 生物技术通报, 1999, 5: 1—6.
- [4] 钱迎倩. 转基因作物的利弊分析[J]. 生物技术通报, 1999, 5: 7—11.
- [5] 黄大方. 基因工程正在开辟植物病虫害防治的新途径[J]. 植物保护, 1999, 25(1): 34—36.
- [6] Hiei Y, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. *The Plant Journal*, 1994, 6(2): 271—282.
- [7] Ishida Y, et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 745—750.
- [8] Cheng M, et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Physiol.*, 1997, 115: 971—980.
- [9] Tingay S, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation[J]. *The Plant Journal*, 1996, 11: 1369—1377.
- [10] Arencibia A D, et al. An efficient protocol for sugarcane (*Seccharum spp.* L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Transgenic Research*, 1998, 7: 213—222.
- [11] 付永彩, 等. 农杆菌介导的禾本科作物遗传转化新进展[J]. 生物技术学报, 1999, 10(3)增刊: 1—5.
- [12] Rashed H, et al. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in India rice[J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15: 727—730.
- [13] Vasil V, et al. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus [J]. *Bio/Technology*, 1992, 10: 667—674.
- [14] Becker D, et al. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue[J]. *The Plant Journal*, 1994, 5(2).
- [15] Nehra N S, et al. Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs[J]. *The Plant Journal*, 1994, 5(2): 285—297.
- [16] Blechl A E, et al. Expression of a novel high-molecular weight glutenin subunit gene in transgenic wheat [J]. *Nature Biotechnology*. 1996, 14(7): 875—879.
- [17] Alpeter F, et al. Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit $1A\alpha 1$ gene into wheat [J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14(9): 1155—1159.
- [18] 傅荣昭, 等. 用基因枪法将工人雄性不育基因导入小麦的研究初报[J]. 遗传学报, 1997, 24(4): 358—361.
- [19] 黄粤, 等. 通过基因枪轰击转化获得转基因小麦植株的研究[J]. 西北植物学报, 1997, 17(2): 142—146.
- [20] Bliffeld M, et al. Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease[J]. *Theor. Appl. Genet*, 1999, 98.
- [21] 梁辉, 等. 影响基因枪法转化小麦胚的几个因素的研究[J]. 遗传学报, 1998, 25(5): 443—448.
- [22] 周森平, 等. 小麦基因枪法转化技术的改进[J]. 江苏农业学报, 1999, 15(1): 62—64.
- [23] Gordon-Ramm W J, et al. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants[J]. *The Plant Cell*, 1990, 2.
- [24] Koziel M G, et al. Field performance of elite transgenic maize plant expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*[J]. *Bio/Technology*, 1993, 11: 194.
- [25] Caimi P G, et al. Fructan accumulation and suckase metabolism in transgenic maize endosperm expressing a *Bacillus amyloliquefaciens* SacB gene[J]. *Plant Physiol*, 1996, 110: 355.
- [26] 王国英, 等. 用基因枪法将 Bt 毒蛋白基因转入玉米及转基因植株再生[J]. 中国科学, 1995, 25(1): 71—76.
- [27] 曹军平, 等. 应用基因工程生产一次性使用的常规种子[J]. 生物技术通报, 1999, 6: 13—16.
- [28] Masood E. Compromise sought on 'Terminator' [J]. *Nature*, 1999, 399: 721.