

# 无性基因转移在作物改良中的应用

张开旺 尹光初

(黑龙江省农业科学院大豆研究所)

一个世纪来,基因转移一直在作物改良中起着极其重要的作用,为农业生产带来了巨大的经济效益。一些有意义的农艺性状,如抗病,抗虫害和抗逆基因,已从非栽培植物转移到某些作物品种中。基因转移包括有性基因转移和无性基因转移。有性基因转移主要是指通过杂交授粉等有性过程将某些基因转入受体中,达到改良作物的目的。这方面的研究已经取得了卓著的成效。无性基因转移主要是指采用细胞工程,基因工程等现代生物技术将单个有用基因或基因群导入受体系统,产生新的品种或物种。这方面的研究已经取得或将要取得令人振奋的成就。本文主要介绍无性基因转移。它为作物改良开辟新的途径,克服常规育种难以解决的障碍,缩短植物育种进程,并提供广泛的基因源,丰富基因库。可以预料,现代植物基因操作技术和传统的植物育种方法结合应用必将大大加速作物改良的深度和广度。

由于植物细胞,器官和组织能在体外培养,通过无性方法在植物间进行基因转移已成为可能。胚一直是有性杂交成功的中心点,也是遗传操作例子中的一个。当前,我们能从无性组织和器官经过再生过程培养出完全分化了的植株,这就为无性基因转移提供了广阔的前景。再生的起始材料可以是一片小叶或茎块,也可是不同的未分化的细胞团。在玉米、大豆等某些品种中,甚至可从单个体细胞再生成植株<sup>[36]</sup>。目前在大豆上,通过成熟胚、幼胚、初生叶和原生质体都能高频率地再生成植株<sup>[2,8,13,36]</sup>,为大豆的基因工程提供了可能性。

无性基因转移法是近年来发展起来的新型技术,包括细胞融合法,以农杆菌为媒介的基因转移法,DNA直接摄取法,显微注射法及以病毒为媒介的基因转移法。

1986年,利用DNA基因重组转移获得的植株第一次在大田实验中得到了检验<sup>[15]</sup>,因此,用无性基因转移法对农作物进行改良已进入了初期阶段。目前,在水稻、玉米和大豆等重要农作物中,基因转移已获得成功<sup>[32,9]</sup>,经检测,一些外源抗性基因在再生植株中已充分表达。

## 一. 细胞融合

60年代发展了细胞除壁方法,从而得到了原生质体,以来自不同品系的原生质体在

一定的化学方法处理或电流作用下可以融合在一起。应用这种方法可将原本不配对的不同种的染色体融合到一个细胞中,或者,将一个种的染色体组与另一个种的细胞质液结合起来,组成一个整体,产生体细胞杂种,这种体细胞杂种在体外培养,产生愈伤组织,并再生成植株。这样,两种不同来源的优良性状可集中到一个植株中,通过筛选、选择出具有优良性状的植株,然后应用到农业生产中去,用这种方法可以解决有性杂交育种不能解决的问题。

细胞融合最大的潜力在于创造具有新的物种材料,一个种的细胞里含有另一个种的染色体组(核转移),或者,两个种的细胞质融合在一起(细胞质杂体)。由于细胞质和细胞核基因的相互作用可以产生很有价值的农艺性状。例如,雄性不育在农业生产上具有很重要的意义,它即是由细胞核和线粒体相互作用产生的,而自然界中并不存在细胞质雄性不育<sup>[23]</sup>。因此,生物学家们可通过人工控制的方法将细胞核和细胞质基因组的作用结合起来,创造这样的不育系,如在烟草,葡萄籽核与一种小萝卜(*Raphanus Sativus*)融合中已获得成功。

## 二. 直接操作 DNA 的基因转移

直接将基因从一个生物体转移到另一个生物体起始于 40 年代。在 1973 年体内基因重组成功之前,对于在细菌中通过有性因子(质粒),病毒(诱导噬菌体)或 DNA 直接吸收进行染色体片段或基因转移已有了较好的认识。以病毒为媒介的基因转移,DNA 的直接摄取和显微注射法已成功地应用于动物细胞。同时,所有这些方法正用于植物操作。大量试验显示出以细菌为媒介的 DNA 转移系统看来是最适宜植物操作。

这些技术具有广泛的优越性和适用性,并远远超出了植物育种和细胞融合的技能。因为,1)基因来源广泛、可以从植物、动物、细菌甚至病毒获得;2)控制基因表达的 DNA 片段经过修饰后在新的受体中具有适当的功能;3)转化时间,组织的特殊性和转移的基因表达水平在转化过程中可得到人为的控制;4)新的工程基因的导入可能会导致植物内源基因重新编制程序,同时扩大了作物改良的变异源,并可通过操作控制基因表达;5)化学合成的 DNA 或自然界变异基因可充分被利用。

### 1. 以农杆菌为媒介的基因转移

以农杆菌为媒介的基因转移利用了农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)侵染植物伤口的天然本能<sup>[21]</sup>,将其质粒上的某些基因(T-DNA)转入植物受伤处的细胞染色体中,而产生冠瘿瘤(Crown gall),这是因转化了的植株由于细菌基因的表达而影响植物激素的平衡而造成的。

农杆菌是生活在土壤中的一种植物病菌,这种病菌在高等植物中有很大范围的受体,包括双子叶植物。农杆菌拥有一个致瘤质粒(Ti-plasmid),在 Ti 质粒上,一段叫 T-DNA 的基因片段在另一段 Vir 基因的作用下,具有转化的功能。如利用分子生物技术将 Ti 质粒上的 T-DNA 切割开来,除去上面的致瘤基因,重新组入新的外源基因,并插入选择标记基因,如抗卡那霉素基因或者 Gus 基因,再经过末端粘合,组成新的质粒,从而对植物组织、器官或者细胞进行转化,并再生成植株。因为卡那霉素抑制正常植株的生长,而转化了的植株在卡那霉素的存在下能生长良好,通过卡那霉素的抑制作用而选择转化了的植株。

组入 T-DNA 的外源基因,可以是单一性状基因,也可是数量性状基因。如果此系统在一定作物中建立起来,很多好的农艺性状都可集中到某一作物中。

在很多实验室中,用农杆菌工程菌株进行植物基因转化已是一种较为通用的方法。烟草、西红柿和牵牛花等的植株转化已获得成功。在一些有重要价值的农作物中仍有一定的难度,但已获得很多转化了的培养细胞<sup>[20]</sup>。尹光初等<sup>[33]</sup>已在大豆上为大豆遗传工程建立了很好的受体系统,通过对大豆幼苗的致瘤实验,他们已筛选出很多较好的受体植株,1988年,美国孟山多公司的研究人员用农杆菌作载体已获得转化了的抗某种除草剂的大豆植株<sup>[9]</sup>。虽然有报道说,农杆菌能将 T-DNA 转入到单子叶植物受体(芦笋),但还未获得再生植株。因为农杆菌不能使单子叶植物(如水稻、玉米、小麦)产生冠瘿瘤,在理论上,单子叶植物不能作为农杆菌的受体。然而,Rodes 等<sup>[32]</sup>在 1988 年用玉米原生质体与重组有 NPT II 基因的农杆菌质粒 DNA 处理在一起,在外界电脉冲的作用下,玉米原生质体被转化,并再生成植株。关于这些重要作物的基因转移的其它方法目前正在研究中。

## 2. 农杆菌基因转移在农业上的应用

在过去的 4 年中,利用农杆菌转移一些有意义的农艺性状基因已获得很大的进展,包括抗病,抗虫害和抗除草剂基因,当前,这是唯一在农业上得到应用的无性基因转移法。

利用重组 DNA 改良作物的早期目的之一就是操作细菌或植物基因,使作物对除草剂具有安全内的忍耐性。一个成功的例子是,有人将一个有关的细菌基因转入植物,由于这种基因的表达,产生一种补充植物体本身被除草剂抑制的酶,从而使植株提高对除草剂的抗性<sup>[15]</sup>。另外,我们可以设想操作植物基因本身,提高某些基因的表达水平,植物就会产生大量的自身酶,使之在除草剂存在下能成活下来;另一方案是,操作植物使之表达分解除草剂毒性的基因。目前,美国很多农药及种子公司对抗除草剂基因转移十分感兴趣,其原因是,使用一定的除草剂,杀死野草而不使作物受害,既可节省劳力,又可增加产量,从而使农药公司销售很多除草剂,种子公司能卖出专利种子。中国科学院遗传研究所和中国农业科学院生物技术研究中心的一些研究人员也正在着手进行这方面的工作。

将芽孢杆菌的昆虫致死蛋白基因组入到植物中已获得令人满意的结果,当某种昆虫吃这种植物的叶片时,植物组织中的微生物毒素会将昆虫杀死<sup>[11]</sup>。这种蛋白质具有特殊的毒性,对哺乳动物、植物和很多种其它的昆虫无毒。多年来,从芽孢杆菌制得的干粉一直得到广泛的应用。

现在,已将烟草花叶病毒外衣蛋白基因通过遗传工程方法组入植物基因组中,这种基因在烟草和西红柿中的表达对于这种病毒的感染具有很强的抵抗力<sup>[10]</sup>。虽然对这种抗性机理了解得还不十分清楚,但我们可用这种新颖的遗传途径来控制植物中病毒的影响。因为,到目前为止,还没有任何一种化学处理方法能控制病毒的感染。

很多实验表明,以农杆菌为媒介转移的基因具有稳定的遗传性。同时,受体植物品种除产生新转入基因的表达性状外,其它性状无变化。有时,非期望的性状也可能发生,但可通过严格的基因转移和植株再生过程选择,从而清除这种不需要的性状。

## 3. 直接的基因转移

通过 DNA 的直接被摄取或显微注射,纯化的 DNA 可直接用来进行植物的基因转移。

DNA 的直接摄取涉及到生理生化反应使 DNA 移动到原生质体。显微注射是用显微移液管机械性地将 DNA 植入细胞中。直接基因转移法不象农杆菌转移系统那样局限于受体范围,但难于将靶细胞或组织再生成植株。

植物原生质体可直接从培养基中摄取核苷酸。第一个成功的实验是,原生质体从培养基中吸收了病毒 RNAs。外源 DNA 通过原生质体的吸收反应而插入植物染色体中,相对来说,是极少发生的事件,但经过一定的处理,利用聚乙烯乙二醇(PEG)和电脉冲效应等,可提高细胞膜的渗透性,将转化频率提高到一个原生质体中有一个原生质体被转化<sup>[26]</sup>。如果将几种处理方法结合起来,就会使转化频率增加到每百个原生质体中有一个被转化<sup>[34]</sup>。

由于转化频率近 1%,DNA 直接摄取法具有很大的吸引力,特别是那些不能被农杆菌感染或转化频率很低的植物可用 DNA 直接吸收法而得到转化。到目前为止,植物细胞或组织直接吸收 DNA 转化的成功仅局限于原生质体。因此,DNA 直接吸收法在谷类上的应用仍受到限制,因为大多数谷类作物的原生质体还不能再生成植株。但前景是光明的,因为水稻原生质体已能再生成植株,并有报道说,通过电融合处理,外源基因转入水稻原生质体中并已获得表达<sup>[16]</sup>,同时,也有其它几处报道,玉米细胞系通过 DNA 直接吸收获得了转化。Rodes 等<sup>[32]</sup>利用玉米原生质体通过电脉冲效应已获得转化了的玉米再生植株。

#### 4. 显微注射

显微注射是近年发展的新方法,用显微吸移管在一定的压力下将 DNA 溶剂注入植物原生质体中,成功的关键是注射时细胞的固定性和随后的培养方法<sup>[17]</sup>。注射后的烟草原生质体培养表明,外源 DNA 已插入受体植物 DNA 中。转化频率取决于核内注射(14%)或细胞质内注射。另一例子是苜蓿的原生质体注射,转化频率从 15%到 26%,取决于注射位置。到目前为止,显微注射转化法只在原生质体上获得再生植株的成功。

因为显微注射法是一种物理方法,目前虽然只在原生质体上取得成功,但将来可用整体细胞作材料,用于所有的植物品系中。

#### 5. 以病毒为媒介的基因转移

动物中的病毒基因表达系统已建立起来,并在实践及治疗上获得应用。植物病毒的基因转移载体已着手建立。虽然有的基因通过病毒作载体已转入到植物中,但还未发现病毒基因能稳定地插入植物染色体中。结果是工程病毒扩散于整体植株中,因为病毒基因的表达有严格的要求,且病毒颗粒的包装需要特殊的载体。但最近的研究表明,用农杆菌运载玉米病毒进行病毒为媒介的基因转移是可能的<sup>[14]</sup>。此法在农业上的运用还有很长的路要走。

植物遗传工程无论采取何种系统,都必须使外源基因组入受体细胞中,并使转化了的细胞再生成植株。在上述各种方法中,我们比较了每种方法的捷径及所存在的问题。虽然用农杆菌 Ti 质粒作载体对受体细胞进行转化已取得了很大成就,但转化频率低,有的转化植株是嵌合体,同时,还没有一种更简便易行的方法对转化了的细胞进行有效的选择。另外,农杆菌感染的受体范围也是有限的。由于一些重要农作物的单细胞或原生质体仍不能再生成植株或再生频率很低,DNA 直接摄取法还不能在这些作物上运用,虽然有的原

生质体再生植株频率很高,但转化频率低,或者还没有筛选出正确的转化系统。对于细胞融合来说,需要找出正确的选择系统,融合后的细胞还需进一步再生成植株,这方面在农作物上的运用目前看来较难。

尽管存在一些问题,但植物遗传工程近年发展迅速,有的已接近生产实际应用。近 3 至 4 年来,一些重要农作物如小麦、水稻、玉米、大豆等的高频率再生获得成功,为农业遗传工程奠定了基础。1988 年,利用农杆菌系统已成功地对大豆成熟胚细胞及玉米的原生质体进行了转化<sup>[9,32]</sup>,并获得了外源基因表达的再生植株。中国农业科学院生物技术研究中心的杨泓等,已成功地在水稻中转化了苏云金芽孢杆菌的毒蛋白基因,使转化的水稻对虫害具有一定的抗性。我们相信,在不远的将来,植物遗传工程一定能在细胞和分子水平上定向改造农作物,同时,我们需要重视植株再生和基因转移的遗传背景等基础理论方面的研究。

当今,中国农业及世界农业面临着许多问题,诸如如何提高产量,进化品质,提高作物的抗性等。如何加强中国农业的后劲,除政府正确的农业政策外,还应增加投资,开发和利用植物现有资源,包括新技术的开发,以尽快提高加快作物改良的进度。

### 参 考 文 献

- [1] 朱至清,1986,中国科学院刊,创刊号:51—56。
- [2] 冯新华等,1988,中国科学,B 辑,第 9 期:939—943。
- [3] 杜杰等,1988,生物工程学报,4(2):110—118。
- [4] 杜杰等,1988,生物工程学报,4(3):171—174。
- [5] 王卫建,1988,生物工程学报,4(4):249—253。
- [6] 卫志明等,1988,植物生理学通讯,2:53—54。
- [7] 卫志明等,1988,植物生理学通讯,3:17—20。
- [8] 周恩君,尹光初等,1989,大豆科学,8(1):39—44。
- [9] 1988 年全美第二次大豆分子和细胞学术讨论会论文集。
- [10] Abel, P. P. et al., Science 232,738(1986)
- [11] Adang, M. J. et al. in Six International Congress on Plant Tissue Cell Culture, University of Minnesota, Minneapolis, 3 to 8 August 1986. pp. 404
- [12] Allard, R. W., Principles of Plant Breeding (Wiley, New York, 1960)
- [13] Barwale, U. B., et al., 1986, Planta, 167:473—487
- [14] Brisson, N. et al., Nature(London)310,511(1984)
- [15] Comai, L., et al., Nature(London)317,741(1984)
- [16] Coulibaly, M. Y. and Demarly, Y., Z. Pflanzenzuecht, 96, 79 (1986)
- [17] For review see Crossway, A. et al., Biotechniques 4, 320(1986)
- [18] Crossway, A., et al., M. I. Gen. Genet. 202, 179(1986)
- [19] Evans, D. A. Sharp, W. R. Bravo, J. E. in Crop Sciencs, Vol. 2 of Handbook of Plant Cell Culture, (Macmillan, New York, 1984), pp. 47—68
- [20] Facciotti, J. K. O' Neal, S. Lec, C. K. Shewmaker, Bio—Technology (New York)3, 241(1985)
- [21] Fraley R. T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., (U. S. A. 80), 4803(1983)
- [22] Galun, E. and Aviv, D., in Techniques for Propagation and Breeding, Vol. 1 of Handbook of Plant Cell Culture, (Macmillan, New York, 1983). pp. 358—392

- [23] Goodman, R. M. et al., Science, Vol. 236, 4(1987), pp. 48—53
- [24] Grimsley, N., Hohn, T. et al, Nature(London)(1987), 325, 177
- [25] Gynheung, A. N. et al., Plant Physiology(1986), 81, 301—305
- [26] Krens, F. A. and Schiperoort, R. A., in Laboratory Procedures and Their Application, Vol. 1 of Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, (Academic Press, New York, 1984), pp. 522—534
- [27] Man-Si Wang et al., Plant Cell Reports(1987), 6, 294—296
- [28] McClintock, B., Science 226, 792(1984)
- [29] Nester, E. W., Ann. Rev. Plant Physiol., 1984, 35, 387—413
- [30] Newell, G. C. and Hymowitz, R., Crop Science 22, 1062(1982)
- [31] Poehlman, J. M., Breeding Field Crops (AVI Publishing Company Inc., 1987)
- [32] Rodes, et al., Science, 240, 204—207
- [33] Shao Qiquan, Yin Guangchu et al., 1988, Recipient System for Genetic Engineering of Soybean, Heilongjiang Science and Technology Publishing House.
- [34] Shillito, R. D. et al., Bio—Technology(New York)3, 1099(1985)
- [35] Sollar, M. et al., Theor. Appl. Genet. 67, 25 (1984)
- [36] Zhiming Wei and Zhihong Xu, Plant Cell Reports(1987)7, 348—351

## 花生 DNA 导入大豆引起性状变异简报

花生具有许多大豆所没有的优良性状,将其引入大豆,对大豆的品种改良很有意义,但目前国内外还没这方面的成功报道。我们自 1987 年开始研究利用大豆自花授粉后的花粉管通道导入花生 DNA 技术,在  $D_2$  代获得多种类型的变异,为大豆种质创新开辟了一条新途径,现简报如下:

实验用花生品种“鲁花 4 号”作 DNA 供体提取全 DNA,以大豆品种(系)“鲁豆 4 号”、8734036 为 DNA 受体,利用液滴法和子房注射法导入花生 DNA。提取的 DNA 片段大小为 50—70kb,浓度 300—500 $\mu$ g/ml。经过三年的研究,确定了在本地区适宜的导入时间,探索出一套以大豆为受体的外源 DNA 导入技术方法。三年共注射大豆子房 1388 个,结荚 693 个,总结荚率 49.93%,用液滴法处理大豆子房 883 个,结荚 479 个,结荚率 54.25%。

经处理后获得的后代中, $D_1$  代未发现变异, $D_2$  代出现多种类型的变异,其中包括生长及结荚习性变异<sup>(1)</sup>、早熟性变异<sup>(2)</sup>、细小株型变异<sup>(3)</sup>、粒色变异及感染花生焦叶病变异<sup>(4)</sup>。焦叶病是 DNA 供体花生的易发病害,但不能侵害大豆,本实验却发现了感染焦叶病的大豆变异株。目前我们已获得变异单株 38 个,变异株系 2 个。

赵经荣 战明奎 黄承参 颜庭进

(山东农科院作物研究所)

周同度 栗翼玫 赵双宜

(山东大学生物系)