

植物基因工程进展

程玉忠

(山东农业大学农学系,泰安,271018)

70年代末,科学家通过分子生物学的研究证实,根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)侵染了双子叶植物之后,能把它的质粒(Tumor inducing plasmid,简称Ti质粒)上的一段DNA(Transfer DNA,简称T-DNA)插入到植物染色体中,使植物产生冠瘿瘤(crown gall),T-DNA在冠瘿瘤细胞内能稳定地遗传^[1,2,16,18,23,35]。由此,人们设想用Ti质粒作为载体把目的基因转移到要改良的植物中去。1983年Fraley等人^[19]首次用Ti质粒作为载体把细菌的卡那霉素抗性基因插入到矮牵牛细胞中并成功表达。1985年Horsch^[26]发明了植物组织的叶圆盘(leaf disc)转化法,这一方法简便易行,大大提高了植物遗传转化的效率。此后,植物基因工程迅速发展,在提高农作物产量和抗逆能力、改进作物品质等领域展示了诱人的前景。

植物基因工程的工作内容大致包括:目的基因的分选、植物基因工程载体的构建、植物细胞的遗传转化、转化细胞的筛选和组织培养几个方面。本文讨论植物基因工程在上述几个方面的重要研究进展和在作物育种上取得的最新成就。

目的基因的分选

开展植物基因工程工作,首先要获得一些用来转化植物的基因,即目的基因。一般获取目的基因的方法是先建立植物的基因文库。基因文库有两种,即基因组文库(genomic library)和cDNA文库(cDNA library)。构建基因组文库常用的方法是,先提纯植物的DNA,再用限制性内切酶消化成具有一定长度的DNA片段,然后与 λ 噬菌体DNA载体(或其他载体)连接,经体外包装,成为基因组文库。构建cDNA文库的一般方法是,提纯植物的mRNA,反转录成cDNA,把cDNA与质粒载体连接后转化大肠杆菌,就构成了植物的cDNA文库。有了基因文库之后,就可以用适当的探针,通过分子杂交从基因文库中分离出目的基因来。这种方法应用较早,已经很成熟了。近几年在抗病毒的植物基因工程中,则是把植物病毒的基因组RNA反转录,直接得到目的基因^[39]。

迅速发展起来的多聚酶链式反应(polymerase

chain reaction,简称PCR)技术能把单个目的基因大量扩增,供基因工程工作使用。这种方法的原理是:先使一个基因的5'端与另一个基因的3'端都具有顺序相同的一段DNA序列,然后经变性退火,使这两个不同基因的两条链的同源部分配对,再用DNA多聚酶补成双链,然后用PCR扩增,这种方法称为重叠寡聚核苷酸法^[46]。它为大量获取目的基因提供了方便。

目前国际上已经分离出来可供植物基因工程使用的目的基因已超过80个。这些目的基因的表达产物有的能抵抗病害、虫害或除草剂,有的则能提高植物中蛋白质或必需氨基酸的含量^[1]。大部分目的基因是从植物中分离出来的,有的则是来自动物或微生物,例如从萤火虫中得到荧光酶基因^[39],从苏云金杆中得到抗虫基因^[47]。

把目的基因与合适的启动子连接后,即可导入受体植物中去。目前植物基因工程中使用最多、作用最强的一个启动子是花椰菜花叶病毒(CaMv)的35s启动子^[32],另一个常用的启动子是从Ti质粒的胭脂碱合酶(nopaline synthase,简称Nos)基因中分离出来的Nos启动子^[11]。

植物基因工程载体的构建

有了目的基因,接着便是把目的基因引入受体植物中去,这一步工作大部分是用改造的Ti质粒作为载体完成的。野生型Ti质粒太大(约200kb),很难进行遗传操作,并且它使被转化的植物组织长成瘤,因此它不能直接作为载体使用。针对这些问题,人们对野生型Ti质粒进行改造,去除了Ti质粒上T-DNA区段的致瘤基因,换上选择基因(如Nos基因,卡那霉素抗性基因等),构建了许多植物基因工程载体,如pGV3850、Bin19等等,克服了野生型Ti质粒的缺点^[2,3]。这些载体都是在1985年之前构建的。

植物遗传转化方法

植物细胞、组织的遗传转化方法,从外源DNA供

Cheng Yuzhong: Progress in Plant Genetic Engineering

本文于1990年5月5日收到。

体角度看,一种是用改造的 Ti 质粒或其他载体携带 DNA 转化植物,称“载体法”;另一种则是把裸露的 DNA 直接导入受体植物,称为“DNA 直接导入法”,又叫“非载体法”。

(一) 载体法

目前主要是用改造的 Ti 质粒作载体转化植物,采用的方法是 Horsch 1985 年发明的叶圆盘转化法。把带有新鲜伤口的植物叶圆盘(或其他组织)在带有目的基因的根瘤农杆菌菌液中浸泡几分钟,即可使 T-DNA 和目的基因进入植物细胞,目的基因就能整合到植物染色体上,实现了植物的遗传转化。这种方法的优点是:第一,方法成熟,简单易行,转化的成功率比较高;第二,要改造的植物性状很明确,就是目的基因所控制的性状。大部分的植物遗传转化工作都是用此法完成的,但由于根瘤农杆菌主要侵染双子叶植物,而对于农业上具有重要经济价值的单子叶植物,如玉米、小麦、水稻等却很难侵染,就使该法的应用范围受到一定限制。

载体法中还有其他一些方法,如用脂质体和 CaMV 作为载体转化植物等等,但这些方法还不成熟,应用得也很少。

(二) DNA 直接导入法

其中 PEG 转化法和 DNA 直接注射法应用较早,已有一些成功转化植物的事例^[31,4,29]。近几年发展了下面两种具有巨大发展潜力的 DNA 直接导入法。

1. 电击穿孔法 (electroporation) 其原理是把植物细胞去掉细胞壁之后,放到外源 DNA 的溶液中,然后把这种含有植物原生质体的 DNA 溶液放在电场中,在电场中瞬间通过一个很高的电压,把植物原生质体的细胞膜打穿,外源 DNA 就能通过穿孔进入细胞内部,并能整合到植物染色体上。这种方法始于 1985 年^[20],至今已用它转化了许多植物,其优点是既可用于双子叶植物,又可用于单子叶植物。因此它在主要农作物改良方面是一个很有发展前途的方法。1988 年 Rhodes 等人^[41]利用此法把 NPTII (新霉素磷酸转移酶)基因转移到玉米染色体上,NPTII 基因在成熟的玉米植株中稳定表达。

2. 微弹射击法 (microprojectile bombardment) 这种方法是把直径 1—4 μ m 的钨粉(或金粉)在供体 DNA 溶液中浸泡,然后用粒子枪以 400 米/秒的速度把这些微粒打入植物细胞或组织,微粒穿透细胞壁和细胞膜。微粒上吸附的 DNA 可以整合到植物染色体上。这种方法是 1987 年发展起来的,至今用此法已转化了洋葱表皮组织和玉米盾片组织以及烟草、水稻、小麦、大豆细胞等^[42,28,29,30,49]。这种方法有两个突出的优点:第一,它既适用于双子叶植物,又适用于单子叶植物;第二,用它转化的是完整的植物细胞或组织,转

化体容易再生植株。这种方法在改造主要农作物方面展示了广阔的前景。

转化细胞的筛选和组织培养

植物细胞或组织经过遗传转化之后,就需要把转化了的细胞同未转化的细胞区分开,把转化的细胞进行组织培养,再生出植株。

双子叶植物用叶圆盘法转化后,把表面多余的根瘤农杆菌吸去,放在含有羧苄青霉素和卡那霉素的培养基上培养,羧苄青霉素能杀死残留的根瘤农杆菌,卡那霉素能杀死未转化的植物细胞。经过一段时间的培养之后,被转化的植物细胞长出愈伤组织,再经过诱导就能从愈伤组织中分化出有根茎叶的植株^[26]。这样得到的一棵植株叫转基因植物 (transgenic plant) 又叫基因工程植物。对于单子叶植物目前的转化方法多是用 DNA 直接导入法,所用组织培养方法仍然是把转化后的细胞或组织在适当的培养基上培养出植株^[41]。

当转化细胞或组织形成愈伤组织或长成植株后,如何鉴定外源基因的存在呢?这可用直接鉴定法和间接鉴定法进行鉴定。直接鉴定法多是用目的基因作为探针,与转化体 DNA 进行分子杂交 (Southern blot),以确定转化体中是否有目的基因。间接鉴定的方法比较多,常用的方法是对 Ti 质粒上 Nos 基因的最终产物——胭脂碱进行检测^[9]。许多植物基因工程载体上都有 Nos 基因,它和目的基因一同被转进植物染色体。Nos 基因表达产物是胭脂碱合酶,胭脂碱合酶的催化产物是胭脂碱。因此,只要在愈伤组织或再生的植株中检测到胭脂碱,就间接证明了目的基因进入了植物染色体。另一种间接鉴定法是报道基因 (reporter gene) 法。用的较多的报道基因是 CAT (氯霉素乙酰转移酶) 基因和 GUS (β -葡萄糖苷酸酶) 基因^[14,22]。其中 GUS 基因是 1987 年开始使用的,由于灵敏度高而且具有广泛适用性,目前已广泛用于植物遗传转化。特别是 GUS 基因的短期表达,可用来快速确定和优化各种影响转化效率的因素。

植物基因工程在育种上的进展

在最近短短的四五年之内,植物基因工程在植物育种上取得了巨大进展,获得了一批抗病、抗虫、抗除草剂和改进作物品质的转基因植物。这些植物有的已进入了大田试验阶段,预计在 1995—1997 年这些转基因植物都会逐步投产^[11]。

(一) 培育抗病毒植物的基因工程

植物病毒为害使农业生产遭受很大损失,一直没有很好的防治措施。利用植物基因工程防治病毒在以下几个方面获得了令人瞩目的成就。

1. 向植物转移病毒的外壳蛋白基因防治病毒 这方面的工作首先是由 Beachy 研究小组于 1986 年完成的^[39]。他们把烟草花叶病毒 (TMV) U₁ 株系的 RNA 中编码外壳蛋白 (coat protein, 简称 CP) 的部分反转录成 cDNA, 把 cDNA 插入到带有 CaMV35S 启动子的中间载体中, 然后把这一中间载体引入根癌农杆菌, 再用这种根癌农杆菌叶圆盘法转化烟草。再生的烟草 (转基因烟草) 高水平地表达了 TMV 的 CP 基因, 当用 TMV 的 U₁ 株病毒侵染时, 这些转基因烟草表现出明显的抗病性, 症状的出现被延迟, 有的植株甚至不发病。进一步的研究表明, 这种转基因烟草对 U₁ 外的其它 TMV 烈性株也表现明显的抗性^[36]。继烟草花叶病毒的外壳蛋白基因工程成功之后, 现在已有黄瓜花叶病毒 (CMV)、苜蓿花叶病毒 (ALMV)、马铃薯 X 病毒 (PVX)、马铃薯 Y 病毒 (PVY)、烟草脆裂病毒 (TRV) 的外壳蛋白基因分别在烟草、番茄和马铃薯中表达^[37, 45, 48, 34, 17, 11]。

2. 利用植物病毒的卫星 RNA 基因工程防治病毒 卫星 RNA (satellite RNA) 是存在于某些 RNA 病毒内的小片段 RNA, 它与病毒基因组 RNA 没有同源性, 它能够修饰病毒病症的发展。1986 年英国 Baulcombe 等人把黄瓜花叶病毒的卫星 RNA 反转录成 cDNA, 用改造的 Ti 质粒把该 cDNA 导入烟草基因组中, 得到了抗 CMV 的转基因烟草^[12]。1987 年澳大利亚学者用相似的方法得到了抗烟草环斑病毒 (TobRV) 的转基因烟草^[21]。当病毒侵染这些转基因植物时, 植物开始产生卫星 RNA, 从而干扰了病毒基因组 RNA 的复制, 使植物表现了抵抗相应病毒的能力^[22]。

3. 利用反义 RNA 防治病毒 这种方法是把病毒的基因组反向结合在启动子上, 当把这种基因组引入植物细胞后, 细胞内编码出反义 RNA (antisense RNA), 当外源病毒 RNA 侵入该种植物细胞时, 就和细胞内的反义 RNA 形成互补双链 RNA, 使病毒基因组无法复制, 从而减轻了病毒为害^[17, 22, 40]。

1988 年中国科学院微生物所利用 CMV 卫星 RNA-1 的基因工程, 获得了抗 CMV 的转基因烟草^[6]。1989 年北京大学生物系完成了 CMV 的 CP 基因克隆, 序列测定和转化栽培烟草品种的工作^[7]。

(二) 抗虫植物基因工程进展

农业上防治害虫的主要措施是农药杀虫, 这种方法不但危害人畜, 而且污染环境。现在植物基因工程使植物自身获得抗虫能力, 避免了上述问题。

苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis* Berliner) 细胞内有一种 δ 内毒素, 它能杀死鳞翅目昆虫。1987 年比利时学者把苏云金杆菌的 δ 内毒素基因通过根癌农杆菌的 Ti 质粒转移到烟草中并得到表达, 转基因烟

草能杀死鳞翅目害虫, 例如烟草角虫在这种烟草上一天即停食, 三天内死亡。 δ 内毒素基因在转基因烟草中稳定表达和遗传^[47]。同年美国和瑞士用相似的方法获得了抗虫的番茄和马铃薯^[8]。

同样是在 1987 年, 英国把豇豆编码胰蛋白酶抑制剂的基因引入了烟草, 烟草具备了制造胰蛋白酶抑制剂的能力。当昆虫吃了这种烟草之后, 虫体消化道内的胰蛋白酶活性受到抑制, 蛋白在消化道内不能降解, 害虫因得不到必需的营养而死去。这种方法可以防治各种害虫对植物的侵害。

1988 年中国农科院生物技术中心把 δ 内毒素基因转移到水稻和油菜原生质体中并得到了转基因水稻植株^[9], 但并未表达。

(三) 抗除草剂的植物基因工程

用除草剂可以大大减轻人工除草的劳动, 但各种除草剂 (如草甘膦, 阿特拉津和磷酸麦黄酮类除草剂等) 又不同程度地损害农作物。随着除草剂的广泛使用, 人们越来越迫切地希望作物具有抵抗除草剂的能力。植物基因工程使这一愿望变成了现实。

磷酸麦黄酮是除草剂的有效成分, 是谷氨酸的类似物, 可阻断谷氨酰胺合成酶的正常作用, 从而阻断了氨基酸的生物合成, 并使植物细胞内游离氨迅速积累, 导致植物死亡。有人从链霉菌属的一个菌株中发现了一种乙酰转移酶基因, 它的作用是将磷酸麦黄酮乙酰化, 使之丧失作用^[44]。1987 年比利时 Montagu 研究小组把这个乙酰转移酶基因接上 CaMV 的 35S 启动子, 用根癌农杆菌把它转移进了烟草、番茄和马铃薯, 成功地培育出完全抗除草剂的植物。这些转基因植物对于 10 倍于大田喷洒剂量的磷酸麦黄酮类除草剂表现出稳定抗性, 而且乙酰转移酶基因由于插入了植物染色体而表现稳定遗传^[13]。另外还有抗草甘膦的转基因碧冬茄和抗氯化硫磺的转基因烟草分别于 1986 年和 1988 年建成^[43, 24]。

1989 年我国刘博林等人^[10]把带有龙葵阿特拉津抗性基因的载体 *p*^{5B13} 通过子房注射的方法导入了大豆叶绿体基因组中, 得到了抗阿特拉津的转基因大豆, 其抗性能遗传给后代。

(四) 改进作物品质的植物基因工程

在植物基因工程发展的初期, 人们就期望着利用它改进作物品质。以往的植物基因工程工作在这方面虽然做了大量尝试, 曾经把菜豆种子蛋白基因、玉米醇溶蛋白基因、大豆贮藏蛋白基因等转入受体植物, 但离上述目标还有一定距离。1988 年美国一家公司在改进番茄品质方面获得了成功^[33]。众所周知, 当番茄成熟时, 自身就开始合成多聚半乳糖醛酸酶, 这种酶把细胞壁分解, 使番茄变软。为了解决这个问题, 科学家们把编码这个酶的基因反向接在启动子上, 构成反义

基因,再用 Ti 质粒将其导入番茄中,得到转基因的番茄。反义基因在细胞内合成反义 RNA,当番茄正常的多聚半乳糖醛酸酶基因转录出 mRNA 时,反义 RNA 与 mRNA 互补结合,使 mRNA 失去活性,不能产生多聚半乳糖醛酸酶,番茄不再变软,可长期保存。

总之,近年来植物基因工程的发展日新月异,新的目的基因不断被克隆分离出来,新的植物遗传转化方法不断产生,出现了电击穿孔法和微弹射击法等具有广泛适用性的遗传转化方法,转化细胞的筛选、组织培养和鉴定手段也越来越简便有效,使得植物基因工程能改良的作物种类和作物性状越来越多。通过和其他育种手段相结合,植物基因工程一定会在不久的将来培育出一批高产、优质、抗逆性强的作物新品种。

参 考 文 献

[1] 陈章良等: 1989. 生物工程进展, 9(3): 20—29.
 [2] 朱群等: 1987. 细胞生物学杂志, 9(1): 16—29.
 [3] 朱群等: 1987. 细胞生物学杂志, 9(2): 56—59.
 [4] 段晓岚、陈善葆: 1985. 中国农业科学, (3): 6—9.
 [5] 蒋兴村、邵启全: 1985. 中国科学, B 辑, (11): 1004—1008.
 [6] 吴世宣等: 1988. 科学通报, 33(6): 480.
 [7] 胡天华等: 1989. 科学通报, 34(21): 1652.
 [8] 孟建华: 1989. 生物工程进展, 9(1): 46—47.
 [9] 柯为: 1989. 生物工程进展, 9(2): 40—41.
 [10] 刘博林等: 1989. 中国科学, B 辑, (7): 699—705.
 [11] Andre, H. et al.: 1989. *Bio/Technology*, 7: 273.
 [12] Baulcombe, D. C. et al.: 1986. *Nature*, 321: 446—449.
 [13] Block, M. D. et al.: 1987. *EMBO J.*, 6(9): 2513—2518.
 [14] Chen, Z-L. et al.: 1988. *EMBO J.*, 7(2): 297—302.
 [15] Chilton, M-D. et al.: 1977. *Cell*, 11: 263—271.
 [16] Chilton, M-D. et al.: 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4060—4064.
 [17] Cynthia, H. et al.: 1988. *EMBO J.*, 7: 1273.
 [18] Drummond, M. H. et al.: 1977. *Nature*, 269: 535—536.
 [19] Fraley, R. T. et al.: 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4803—4807.
 [20] Fromm, et al.: 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 5824—5828.

[21] Gerlach, W. L. et al.: 1987. *Nature*, 328: 802—805.
 [22] Giles Courtice: 1987. *Nature*, 328: 758—759
 [23] Burley, W. B. et al.: 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 2828—2832.
 [24] Haughn, G. W. et al.: 1988. *Mol. Gen. Genet.*, 211: 266—271.
 [25] Hilder, V. A. et al.: 1987. *Nature*, 300: 160—163.
 [26] Horsch, R. B. et al.: 1985. *Science*, 327: 1229—1231.
 [27] Jefferson, R. A. et al.: 1987. *EMBO J.*, 6(13): 3901—3907.
 [28] Klein, T. M. et al.: 1987. *Nature*, 327: 70—73.
 [29] Klein, T. M. et al.: 1988. *Bio/Technology*, 6: 559—563.
 [30] Klein, T. M. et al.: 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8502—8505.
 [31] Krens, F. A. et al.: 1982. *Nature*, 296: 72—74.
 [32] Lawton, M. A. et al.: 1987. *Plant Mol. Biol.*, 9: 315—324.
 [33] Leslie, R.: 1988. *Science*, 241: 1290.
 [34] Maria, C. et al.: 1988. *Bio/Technology*, 6: 349.
 [35] Mcpherson, J. C. et al.: 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 2666—2670.
 [36] Nelson, R. S. et al.: 1987. *Virology*, 158: 126.
 [37] Nelson, R. S. et al.: 1988. *Bio/Technology*, 5: 403.
 [38] Ow, D. W. et al.: 1986. *Science*, 234: 856—859.
 [39] Powell, A. P. et al.: 1986. *Science*, 232: 738—743.
 [40] Rezaian, M. A. et al.: 1988. *Plant Mol. Biol.*, 11: 463—467.
 [41] Rhodes, C. A. et al.: 1988. *Science*, 240: 204—206.
 [42] Sanford, J. C. et al.: 1987. *Particulate Sci. Technol.*, 5: 27—37.
 [43] Shan, D. M. et al.: 1986. *Science*, 240: 204—206.
 [44] Thompson, C. J. et al.: 1987. *EMBO J.*, 6(9): 2519—2523.
 [45] Tumer, N. E. et al.: 1987. *EMBO J.*, 6: 1181.
 [46] Uallette, et al.: 1989. *Nucl. Aci. Res.*, 117: 723—733.
 [47] Vaeck, M. et al.: 1987. *Nature*, 328: 33—37.
 [48] Van Dun, C. M. P. et al.: 1987. *Virology*, 159: 299.
 [49] Wang, Y-C. et al.: 1988. *Plant Mol. Biol.* 11: 433—439.
 [50] Zhou, G-Y. et al.: 1983. *Methods In Enzymology*, 101: 433—481.

(上接第44页)

也是一份植物遗传学工作者感兴趣的月刊。《微生物学文摘》(*Microbiology Abstracts*)的B辑(细菌学)和C辑(藻类学、真菌学和原生动物)都有一部份遗传学的内容。《病毒学文摘》(*Virology Abstracts*)每年也有1000条左右遗传学的内容,约占总数10%。《生化文摘》(*Biochemistry Abstracts*)分三部分,其中第二部分是分子遗传学工作者感兴趣的核酸部分。生态遗传学的文献可以在《生态学文摘》(*Ecology Abstracts*)或《昆虫学文摘》(*Entomology Abstracts*)中找到。同样,《免疫学文摘》(*Immunology Abstracts*)和《动物行为文摘》(*Animal Behaviour Abstracts*)分别刊有

免疫遗传学和动物行为遗传学方面的参考文献。遗传工作者往往可以从这些文摘中了解有关的专业期刊。

参 考 文 献

[1] 孙勇如等编: 1989. 遗传学手册, 湖南科学技术出版社, 第607—637页。
 [2] 复旦大学生物系遗传教研组、遗传研究所编译: 1979. 遗传学词典, 科学出版社, III—IV页。
 [3] 张冬生等编: 1989. 植物体细胞遗传学, 复旦大学出版社, 1—2(前言)。
 [4] Davies, J.: 1982. *Nature*, 299(7): 493—496.
 [5] Wyatt, H. V.: 1987. *In: Information Sources in the Life Sciences*, Butterworth & Co.(Publishers) Ltd., 12—13.