

生物技术

水稻基因转化技术的研究及主要转化方法可行性分析^{*}

刘丽艳

(黑龙江省农科院生物技术研究中心)

1 引言

随着世界人口的不断增长,粮食、能源、环境等危机日益加重,为了满足人类对粮食和其它农产品的多种需求,利用现代生物技术手段培育高产、稳产、优质、抗病虫、抗逆等植物新品种已成为农业生物技术研究的重要内容^[1~3]。

水稻是人类重要的粮食作物,对其遗传转化的研究一直为科学工作者所关注,而且,水稻一直是我国植物分子遗传学、植物基因工程的主要研究对象。确切地说:水稻已成为分子生物学研究的重要模式植物之一。

近十多年来,对水稻基因转化技术的研究有了突飞猛进的发展,这归功于人类对植物基因的结构、功能和表达有了较为清晰的了解^[1~2]。随着对分子生物学的深入研究和探讨,研究者们更加瞩目把外源基因主动导入、定向改造植物的转基因技术。该技术可以使目的基因(抗病、抗虫、抗冻、抗寒、抗旱、耐盐碱、优质、早熟、高产等)在植物、动物、微生物之间的相互转移,打破了物种间的界限,给研究者们创造和改良物种提供了无限的想象空间。伴随着研究的深入,转化频率的进一步提高,基因转移技术将成为定向培育和改良新品种最有效的方法。

2 水稻转基因技术的发展及主要技术方法

人们通常把植物转基因方法按转化载体的有无划分为两类:一类是没有转化载体的裸露DNA的直接转化方法;二类是以农杆菌介导的转化方法。

2.1 外源DNA直接导入的基因转化技术

80年代中后期,由于原生质体培养技术的迅猛发展,以水稻原生质体为受体的PEG法和电击法占据了主要地位^[2],于1988年获得了第一批转基因水稻(Paszkowski 1988, Zhang等1988)标志着水稻基因工程的成功开端,但原生质体转化系统严重依赖于水稻原生质体的再生能力和受品种基因型的强烈制约,且建立原生质体转化体系的工作量大,直接用于水稻品种改良的实际意义不大。故人们开始尝试了许多其它将外源DNA直接导入带细胞壁的完整植物细胞,乃至完整的植物组织,如花粉管通道导入;完整细胞的电击,碳化硅纤维导入和应用最广、获得转基因植物最多的基因枪转化法等。

2.1.1 基因枪转化法 基因枪转化方法是由美国康奈尔大学生物化学系 John C. Santord等于1987年研制成功^[1~3]。此法为将遗传物质传递至完整细胞和组织提供独特的途径。它将外源DNA或RNA吸附于金粉和钨粉颗粒上,依靠基因枪装置,经动力加速使之穿过转化受体的细胞壁,最终使外源基因整合到植物基因组中。此法的最大优点是可转化多种组织和器官,

* 收稿日期 1999-06-01

转化受体可以是胚性悬浮细胞、愈伤组织、未成熟胚、分生组织,也可以是花粉和茎尖等。基因枪转化法避免了以水稻原生质体为受体而产生的分化再生的困难,且操作简便,对组织培养方面要求的技术和精力相对较少。用此方法,1991年 Christou^[5-11]等人获得了用 *gus* 和 *bar* 或者 *gus* 和 *hph* 转化的转基因植株;1992年 Cao 等获得了对除草剂 Basta 具有抗性的转基因水稻植株。随后的几年中,携带着各种各样目的基因质粒通过基因枪转化系统转入水稻并获得植株的报道大量出现,同时对外源基因的表达和遗传行为也有了一些研究。基因枪技术的建立将水稻遗传转化的研究推向了一个新高潮,有利地促进了水稻生物技术的发展。以至于目前仍有许多人倾向于优先使用基因枪系统来转化水稻。

2.1.2 花粉管通道法 1974年,周光宇先生在观察远缘杂交所生产的染色体水平以下杂交现象后,提出了 DNA 片段杂交的假说,并在此基础上设计了自花受粉后外源基因导入植物的技术,即花粉管通道技术。这种技术以整体植物为受体,可利用两种水平的 DNA 分子进行转移,即能转移目的基因重组分子,又可以转移未分离目的性状基因的总 DNA。该技术的具体依据是:植物受粉后,花粉在柱头上萌发,形成花粉管穿过花柱进入子房,沿子房的内壁继续生长直到胚珠,通常经胚珠孔进入胚囊。采用花粉管通道技术就是在植物受粉后,使外源 DNA 沿着花粉管通道经过珠心通道进入胚囊转化尚不具备正常细胞壁的卵合子或早期胚胎细胞。此法优点是不需要原生质体分离,细胞培养和植株再生的繁杂过程。因此可应用于任何开花植株、任何基因源。目前这一方法已为不少育种工作者研究借鉴,已不只限于作为外源 DNA 直接导入方法,而且形成了育种研究中的一套程序。涉及的技术细节,例如,外源总 DNA 提取方法(纯度大小)、DNA 注射液配制、花期选择、操作方法等都将影响最终效果。

2.2 农杆菌介导的间接基因转化技术

应用农杆菌介导法转化双子叶植物早已为人们认同,并且取得了较大的成功。而对于单子叶植物,以往认为其不是农杆菌的天然寄主,使用农杆菌转化单子叶植株很难取得成功。

2.2.1 根癌农杆菌介导的外源基因转移的原理 整合型的根癌农杆菌 Ti 质粒是最常用的一种载体。研究最多的是章鱼碱型和胭脂碱型 Ti 质粒^[5-10]。在 Ti 质粒上有一段 T 区,T-DNA 能从该质粒转移到敏感植物的核基因组中。T-DNA 边界有 25bp 正向序列可能接受某种酶识别切割,进而形成环状中间体。此外,Ti 质粒上还有一个约 50bp 的 Virulence 区,简称 Vir 区,约有十几个基因,Vir 区不在 T-DNA 内,Vir 基因产物是一种跨膜蛋白。可以接受植物信号的诱导而发生构象的改变,成为活性蛋白。其中 Vir A 基因可能是决定 Ti 宿主范围的基因。根据 Vir 质粒的基本构造,通常认为由根癌农杆菌介导的外源 DNA 转移和转化要具备三个因素:①位于农杆菌染色体上的 *Chra* 和 *Chrb* 基因,这两个基因细菌细胞对植物细胞的识别和吸附有关;② T-DNA 边界序列对于 T-DNA 整合到植物染色体的过程是必要的;③ Vir 基因的活化可以启动 DNA 向植物细胞的转移。农杆菌介导的基因转移是双子叶植物中最为广泛而有效的遗传转化体系^[4-9]。但对单子叶植物,特别是禾谷类作物,1990年以前认为对其转化有很大的困难,研究表明,单子叶植物细胞的确缺乏某种 Vir 基因的激活因子,随后搞清这种 Vir 基因激活因子—酚类信号分子为乙酰丁香酮及其酮系物。从而使根癌农杆菌介导单子叶禾本科水稻的研究近几年有了迅猛的发展。

2.2.2 根癌农杆菌介导水稻的应用研究 此方法应用于水稻始于 90 年代初期:Raineri 等(1990)和 Chan 等(1992)尝试用农杆菌转化水稻,分别获得了转化细胞和转基因植株,但这些报道由于存在着试验设计上的问题和缺乏必要的分子证据可信性难被大家所公认。然而,自 Chan 等^[6](1993)获得了有确凿分子证据的可遗传的农杆菌转化水稻植株及后来 Hiei 等

(1994)利用“超双元”载体和在其培养基中加入乙酰丁香酮 (Acetosyringone)等适宜的转化条件大大提高了农杆菌介导水稻转化频率之后,人们开始改变了农杆菌转化水稻难以成功的片面理解,不少实验室建立了水稻农杆菌转化系统。最近 Dong等(1996)获得了转基因爪哇稻植株; Hamid Rashid等获得了转基因籼稻植株;刘巧泉等(1998)^[4]获得了粳稻转基因植株。他们都有确凿的分子证据来证明外源基因已经整合到水稻基因组的 DNA上。

3 水稻基因转化三种主要方法的可行性比较

3.1 基因枪法

因此法不受植物种类的限制,故特别在禾谷类作物的外源基因导入上倍受青睐,因它省去原生质体再生的困难,且受体取材广泛,几乎可以将外源基因直接导入到包括所有具有潜在分化能力的原生质体、细胞、组织和器官。另外,基因枪可以同时发射多个包有外源 DNA的小粒子,其转化率高^[1-3],但其具有转化的多拷贝性,基因的多拷贝插入容易引起基因失活。基因枪法还存在基因插入的不完整性以及高比例的不育性,仪器设备购置费用昂贵,每次使用的成本费用也较高。

3.2 花粉管通道法

最初虽然人们对外源总 DNA导入存在一点争议,但由于实践者的大胆尝试已在多种作物上不断取得了一些令人鼓舞的成果。虽然外源基因整合入受体植物基因组的机率小,随机性强,且获得的群体大,造成了后期检测困难,但方法简便易行,该方法省去了植株再生的过程,可直接在转化当代获得种子;可不受作物科、属的限制实现某些遗传转化;也不受遗传物质水平的限制,无论是 DNA重组分子还是带有目的性状的总 DNA均可以进行转移;不需要昂贵的仪器等等,已被多数育种者接受。

3.3 农杆菌介导法

农杆菌介导法转化频率高,使用费用低^[4]。此法可以克服花粉管通道的随机性和群体大、检测难等缺点,又比基因枪转化频率高、使用费用低、可用性高。所转 DNA很明确地为 T-DNA左右边界之间的序列,可转移较大的 DNA片段,可直接用不同的植物组织进行基因转移,不需要原生质体培养再生植株的过程。其基因插入的低拷贝性有利于克服转基因失活现象和其转化频率高等诸多优点将成为今后水稻基因转化的首选方法。

参 考 文 献

- 1 李子银. 农杆菌介导的植物遗传转化进展. 生物工程进展, 1998, 18(1): 22~ 26
- 2 邱小辉等. 水稻转基因技术的现状及在育种上的应用. 生物工程进展, 1998, 18(5): 45~ 48
- 3 朱冰等. 利用基因枪法获得可遗传的抗除草剂转基因水稻植株. 中国农业科学, 1996, 19(6): 15~ 20
- 4 刘巧泉等. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立. 植物生理学报, 1998, 24(3): 259~ 271
- 5 Hiei Y et al., Plant J. 1994, 6271~ 6282
- 6 Chan M T et al., Plant Mol. Biol, 1993, 22 491~ 506
- 7 Christou, P. et al., Bio Technology 1991, 9 957~ 962
- 8 Songstad, D. D. et al., Plant Cell Tis and Organ Cul., 1995, 40 1~ 15
- 9 Cao, J. et al., Plant Cell Rep., 1992, 11 586~ 591
- 10 Zhang, S. et al., Plant Cell Rep., 1996, 15 465~ 469
- 11 Christou P et al., Trends in Biotechnol 1992, 10 239~ 246