

禾谷类植物转基因技术研究进展

王启燕¹, 卢铁军²

(1. 哈尔滨动物园, 哈尔滨 150080; 2. 黑龙江省青年医院, 哈尔滨 150001)

摘要: 植物转基因技术作为一种新兴的生物技术手段, 在抗性育种、提高产量和品质以及缩短育种周期等方面有着显著的优势, 也正得到越来越广泛的应用, 本文重点阐述禾本科植物转基因技术的发展历史、存在问题和发展趋势。

关键词: 转基因技术; 原生质体; 基因表达

中图分类号: S 510.353 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2003)05-0037-03

Advance of Cereal Transgenic Technology Development

WANG Qi-yan¹, LU Tie-jun²

(1. Harbin Zoo, Harbin 150080; 2. Youth Hospital of Heilongjiang Province, Harbin. 150001)

Abstract: Plant transgenic technology have been increasingly applied to improve crop products, resistance to disease and shortened breeding period, because it have significant advantages compared to conventional technology. It was reviewed about cereal transgenic technology development, status and existed problem in the future.

Key words: transgenic technology; plasma; gene expression

植物转基因技术始于 80 年代初^[1], 作为传统育种技术的一种有效补充, 它可以解决某些常规手段

* 收稿日期: 2003-06-04

第一作者简介: 王启燕(1971-), 女, 山东掖县人, 园林工程师, 从事园林植物栽培及植物基因工程的研究。

- [3] 夏锦洪, 方中达. 玉米细菌性茎腐病原菌研究[J]. 植物保护学报, 1962, 1(1): 1-14.
- [4] 白金铠, 尹志, 胡吉成. 东北玉米茎腐病原菌的研究[J]. 植物保护学报, 1988, 15(2): 93-98.
- [5] 马秉元, 李亚玲, 段双科. 陕西省关东地区玉米青枯病原菌及其致病性的研究[J]. 植物病理学报, 1985, 15(2): 150-153.
- [6] 张超冲, 贤振华, 韦继光, 等. 玉米青枯病原菌的侵染及发病规律研究[J]. 广西农学院学报, 1983, (1): 52-62.
- [7] 姜晶春, 孙秀华, 张春山, 等. 吉林省玉米茎基腐病原菌种类的分部[J]. 玉米科学, 1995, (增): 59-61.
- [8] 张明智. 河南省茎基腐病原菌研究初报[J]. 河南农业大学学报, 1988, 22(2): 135-147.
- [9] 吴全安, 梁克恭, 朱小阳. 北京和浙江地区玉米青枯病原菌的分离与鉴定[J]. 中国农业科学, 1989, 22(5): 71-75.
- [10] 朱华. 江苏省玉米茎腐病原菌种类鉴定[J]. 植物保护学报, 1997, 24(1): 49-54.
- [11] 杨馨, 郝彦俊, 邱荣芳, 等. 新疆玉米青枯病原菌分离和鉴定[J]. 新疆农业大学学报, 1997, 20(2): 29-36.
- [12] 张培坤, 李石初. 玉米青枯病原分离及防治试验[J]. 植物保护, 1998, (3): 21-25.
- [13] 王晓鸣, 吴全安, 刘晓娟, 等. 寄生玉米的 6 种真菌及其抗病性研究[J]. 植物病理学报, 1994, 24(4): 343-346.
- [14] 徐作廷, 张伟模. 山东玉米茎基腐病原菌的初步研究[J]. 植物病理学报, 1985, 15(2): 103-108.
- [15] 孙秀华, 张春山, 孙亚杰, 等. 吉林省玉米茎腐病为害损失及优势病原菌种类研究[J]. 四平农业科技, 1991, (4): 1-5.
- [16] 晋齐鸣, 潘顺法, 姜晶春, 等. 吉林省玉米茎腐病原菌组成、分布及优势种研究[J]. 玉米科学, 1995, (增): 43-46.
- [17] 宋佐衡, 陈捷, 刘伟成, 等. 辽宁省玉米茎腐病原菌组成及优势种研究[J]. 玉米科学, 1995, [增]: 40-42.
- [18] 梅丽艳, 李莫然, 王芊, 等. 黑龙江省玉米青枯病原菌种类及防治研究[A]. 程登发. 植物保护 21 世纪展望[C]. 北京: 中国科学技术出版社, 1998.
- [19] 高卫东, 戴法超, 林宏旭, 等. 玉米茎腐(青枯)病的病理反应与优质病原菌演替的关系[J]. 植物病理学报, 1996, 26(4): 301-304.
- [20] 孙秀华, 孙亚杰, 张春山, 等. 玉米茎腐病原菌相互作用研究[J]. 沈阳农业大学学报, 1992, 23(2): 93-96.
- [21] 宋佐衡, 陈捷, 咸洪泉, 等. 玉米茎腐优势致病菌在土壤中相互作用研究[J]. 辽宁农业科学, 1994, (6): 24-26.
- [22] 陈沼江, 宁同明, 吴全安. 玉米青枯病原真菌对其伴生镰刀菌的影响[J]. 植物病理学报, 1997, 27(3): 251-256.

不能解决的问题,已经受到全世界育种家的欢迎。用转基因技术提高品种的抗性、品质和产量,已经成为生物技术在农业上应用的一个热点。

禾谷类植物转基因技术随着 DNA 直接转化技术到以基因枪主导地位的确立和传统的农杆菌法转化在单子叶植物上突破而日趋成熟,从而禾谷类植物转基因与双子叶植物一样可以避开原生质体培养的限制,对不同基因型和不同组织都可以高效地进行转化,使转基因技术在很大程度上已经接近或达到应用的水平。

1 禾谷类植物转基因技术研究现状

1.1 单子叶植物直接转化法研究进展

农杆菌介导法在单子叶植物突破之前,人们致力于研究直接转化法。直接转化法是以原生质体为受体的转化方法为突破口,主要有电穿孔法和聚乙二醇介导法^[2]。电穿孔法是利用高压电脉冲提高原生质体的通透性来提高 DNA 的摄入。Frumm 等首先报道了电穿孔法向玉米原生质体导入基因^[3]。与电穿孔法同时,在原生质体融合技术中广泛应用的聚乙二醇(PEG)也应用于直接导入外源基因,发展出聚乙二醇介导法。Hayashimoto 等对 PEG 介导法的条件进行了深入研究^[4],使 PEG 法成为当时最为有效的禾谷类植物转基因方法之一。

PEG 法比较简单,不需要复杂的设备,但 PEG 对植物细胞有毒害作用。电穿孔法则对细胞没有害处,但需要有特殊的设备,对不同的材料需要有严格的参数控制。两者的转化率不相上下。由于对原生质体再生的依赖,两者在应用上都受到了很大的限制。

为了克服原生质体介导法的缺点,基因枪法应运而生。基因枪法是将 DNA 包被在 1 μm 左右直径的金粉或钨粉上,用来轰击植物组织或细胞,从而导入外源基因。第一台用火药爆炸为动力的基因枪首先是由美国康奈尔大学的 Sanford 等人研制,klie 等人用它发展成一种转基因方法^[5]。继第一台基因枪后,又出现了许多不同类型的基因枪,包括高压空气基因枪、高压氦气基因枪等。基因枪法最大的优点是克服了原生质体再生的困难,转化率高,重复性好,不受寄主范围的限制,受体广泛,推出后很快在外源基因直接导入方法中占主导地位,在大豆、玉米、水稻、小麦、黑麦等作物上得到广泛应用。

1.2 农杆菌介导法转化在单子叶植物上的突破

由于农杆菌的天然寄主为双子叶植物,到 80 年代初还没有发现在天然条件下转化禾谷类植物的菌

株。农杆菌转化单子叶植物的真正突破开始于 Raineri 等用野生的广寄主超毒农杆菌菌株 A281 转化水稻成熟胚诱导的愈伤组织,得到瘤状的愈伤组织^[6],可以在没有激素的培养基上生长,并且用 Southern 杂交在植物基因组中检测到 T-DNA。Chan 等用农杆菌转化籼稻“台中本地 4 号”的幼苗,得到了转化的根和愈伤组织,在转化组织中检测到了重组基因和报告基因的表达。Chan 等继而用水稻幼胚为材料,用马铃薯的悬浮培养与农杆菌共培养,提高了转化效率,得到了转基因植株,并能稳定遗传给后代^[7]。Hiei 成功的把影响转化效率的因子做了细致的调节,从而使转化效率提高到了实用的程度,对转基因后代所做的系统的分子遗传学验证十分令人信服^[8]。同时有人把农杆菌扩展到玉米、小麦和大麦等禾本科植物。从此农杆菌转化单子叶植物成为一种公认的方法,为整个科学界所接受。近几年,农杆菌法已用于水稻的品种改良,如用农杆菌法将水稻白叶枯病抗性基因 Xa21 导入水稻两系不育系,提高了对白叶枯病的抗性。

由于农杆菌转化法不需要原生质体培养的过程,适用的植物范围更广,转移的 DNA 片断比较确定,往往单拷贝,比其他转基因方法更具有明显的优势。农杆菌转化法已成为越来越多的实验室转化单子叶植物的首选方法,单子叶植物的农杆菌转化法的建立无疑是转基因史上的一个重要里程碑。

2 禾谷类植物转基因技术存在的问题

植物转基因技术虽然经过近 20 年的发展,已经达到一定的水平,但是真正在生产上发挥较大作用的例子并不多见。迄今为止全世界已分离出 100 多个目的基因,但象 Bt 基因、Xa21、Bar 基因等有明显实用价值的基因寥寥无几。从植物中分离象雄性不育、稻瘟病抗性等重要而产物未知的基因现在还缺乏有效的方法。大部分已克隆的基因在植物中的功能有些尚待验证,或因存在这样或那样的问题不能有效地应用。

目前,虽然已经建立了基因枪和农杆菌两大比较有效植物转基因方法体系,但转化频率不高、重复性差和一定程度上的基因型的局限性等问题还是存在的,有时还非常严重。虽然有籼稻高转化率的报道,但大多数籼稻品种愈伤组织生长速度慢、转化率低、再生困难。随着技术进步,这些问题可能会在不远的将来得到解决。

2.1 外源基因的遗传稳定和表达

绝大部分的基因实例都认为转基因可以在植物

中稳定遗传, Buder 等报道了农杆菌转化的烟草植株中, 大部分植株呈稳定的孟德尔遗传, 但有 4 个转化植株后代中的外源基因丢失。但这种情况很少, 原因不明, 从应用的角度来看不构成大的问题。

近年来比较引人关注的是转基因失活或沉默现象, 即在转基因后代中基因存在不表达或表达量很低。转基因沉默分转录水平的沉默和转录后的沉默。转录水平的基因沉默是由于某种原因使得启动失活, 不能起始转录。转录后的基因沉默发生在转录后, 虽然基因被转录了, 但 mRNA 被降解不能积累。另外基因沉默还可能与转基因本身的重排和变异有关。

另一个与基因失活相关的问题是转基因的位置效应, 即不同的独立转化体可能由于在染色体上插入的位置不同而有不同的表达强度。位置效应可能与插入位点的染色质结构有关。

近年来转基因沉默问题引起人们的普遍关注。但从植物转基因应用来看, 转基因沉默总是少数的, 如果尽量采用农杆菌转化法, 只要转基因效率高, 能得到大量的转基因植株, 可以从中选择表达强而稳定的转化植株。转基因沉默现象的真正意义在于对基因表达的研究提供了非常好的素材。

2.2 转基因植物的遗传变异

转基因植物除了目的基因的表达性状外, 在育性、生育期、株高和其他农艺性状都会经常发生变异。从原因分析不外乎非遗传和遗传的变异, 后者包括外源基因因插入引起的变异和组织培养过程中产生的变异, 这种变异可能会影响到转基因植株的应用价值, 但该问题可以用原品种回交几代的方法来消除。

2.3 转基因植物应用的安全性问题

目前转基因植物已经进入市场, 人们对转基因植物对人类、动物和环境的安全性问题越来越关心。转基因植物的安全性可以由四个方面引起, 即导入基因 DNA 本身的安全性、目的基因表达产物的安全性、筛选标记或报告基因产物的安全性、载体骨架带

来的问题等目前还没有发现转基因 DNA 本身的安全性问题, 主要的目的基因如 Bt 基因也没有对人有直接毒性的证据, 但从食品的角度来看, 作为人类食品的转基因产品的安全性评价并不是十分简单的事。从转基因技术出发, 尽量采用组织特异启动子或诱导型的启动子使目的基因只在需要表达的部位和需要表达的时间表达, 尽量排除筛选标记和报告基因以及载体骨架, 是提高转基因植物安全性的有效途径。

3 禾谷类植物转基因的发展趋势

近年来, 许多有实用价值的目的基因已经转入植物, 一些已经在生产上应用。转基因技术在越来越多的实验室已成为常规手段。随着植物分子生物学研究的进展和植物转基因技术的发展, 通过转基因的方法改良作物的目标向多方向发展, 转基因技术也将向高效及安全性的方向发展。但不管转基因技术怎样发展, 它总是常规育种的一种补充, 它的优势就是常规育种的不足。基因克隆技术的发展将促进植物转基因技术在禾谷类植物育种上得到更广泛的应用。

参考文献:

[1] 李景鹏. 基因工程原理与方法[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2000. 11-17.

[2] 王关林, 方宏筠. 基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 3-11.

[3] 李艳, 李毅, 陈章良. 转基因植物内源基因与外源基因共抑制问题研究进展[J]. 生物工程学报, 1999, 15(1): 1-5.

[4] Hayshimoto, Li Z and Murai N. A polyethylene glycol mediated protoplast transformation system for production of fertile transgenic rice plants[J]. Plant Physiol, 1990. 93: 857-863.

[5] Klien TM, Wolf ED, Wu R and Sanford JC. High-velocity microprojectile for delivering nucleic acids into living cells[J]. Nature, 1987, 327: 70-73.

[6] Raineri DM, Bottino P, Gordon MP and Nester EW. Agrobacterium mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Bio/technology, 1990, 8: 33-38.

[7] Chan MR, Lee TM and Chang HH. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Cell Physiol, 1992. 33(5): 577-583.

[8] Hiei Y, Ohta S, Komari T and Kumashiro T. Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. Plant J, 1994. 6(2): 271-282.

黑龙江省农科院与富裕县、齐齐哈尔市
成为科技合作共建单位