

文章编号: 1003-8701(2002)02-0017-05

水稻基因枪转化的研究

张新春^{1,2}, 庄炳昌¹, 李自超²

(1. 吉林省农科院农业生物技术重点开放实验室, 吉林 公主岭 136100;

2. 中国农业大学作物学院植物遗传育种系, 北京 100094)

摘要:自 1987 年以来, 基因枪转化被广泛应用于水稻转化, 转化系统得到了优化, 在水稻抗病虫、抗逆、品质改良方面取得了长足的进展。

关键词:水稻; 基因枪; 遗传转化

中图分类号:S511.035.3

文献标识码:A

水稻是世界上最重要的粮食作物之一。近年来, 水稻遗传转化、外源基因检测和育种利用等方面已取得了显著进展。自从 1983 年 Zambryski 等人用根癌农杆菌法获得首例转基因植株, 植物的遗传转化已取得了很大进展, 迄今为止, 已获得 60 多种植物的转基因植株。目前水稻遗传转化的方法有基因枪法、农杆菌介导法、PEG 法、电融合法、花粉管通道法、激光介导法和 DNA 吸收法等。近年来水稻转化以农杆菌介导法和基因枪法为主, 并已形成了较稳定的转化体系, 逐渐进入了实用化阶段。本文就基因枪法在水稻转化方面的研究进行简要综述。

1 水稻基因枪转化的发展

基因枪方法由康奈尔大学的 Sanford 提出, 基因枪导入技术又称粒子轰击技术, 原理是在一定压力作用下, 外源 DNA 被金属微粒吸附在其表面, 被带入受体细胞中, 并随机整合到受体基因组中。基因枪法优点是不受外植体限制, 不必经过复杂的原生质体的制备和培养阶段; 基因枪转化也不受基因型的限制, 可以适用于不同的物种以及同一物种的不同品种。细胞、组织、器官等均可作为受体用以转化, 还可用于酵母、细菌及动物的转基因中。该方法的另一大优点是可以转化线粒体、叶绿体等植物的不同细胞器。用基因枪法转化获得转基因植株的成功例子几乎包括了所有禾谷类作物, 如小麦、玉米、水稻、大麦等。基因枪法与其他方法一样有其弱点: 转化效率不高、基因插入往往是多拷贝的、常造成转基因的失活或沉默(kohli, 1999)、轰击过程中可能造成外源基因的断裂并使插入的基因成为没有活性的片段、出现非转化体或嵌合体的可能性较高等。根据基因枪的不同动力系统, 基因枪分为 3 种类型: 第一类火药爆炸为驱动力, 其离子速度主要是通过火药的数量及速度调节器控制, 不能做到无级调整, 可控度较低; 第二类是高压放电力基因枪, 可无级调速, 通过变化电压,

收稿日期:2001-09-25

基金项目:国家自然科学基金(项目编号:39730330)和转基因植物中试及产业化专项资助项目

作者简介:张新春(1976-), 女, 山东省肥城市人, 硕士, 主要从事水稻遗传转化研究。

离子速度和射入浓度可准确控制;第三类是高压气体动力基因枪,靶范围可精确控制到 0.15 mm,可用于分生组织及胚胎的转化。

1986 年 Uchimiya 等首先获得了水稻卡那霉素抗性的愈伤组织。1987 年 Klein 等人首次用基因枪在洋葱中获得外源基因的瞬时表达。Oard(1990)首先应用基因枪法得到了转基因水稻愈伤组织,并检测了 GUS 基因的瞬间表达。1991 年 Christou 等率先应用基因枪法将 bar 基因转入水稻幼胚,获得可育的转基因植株。Li 等(1993)通过对转化两周后的幼胚连续施加选择压力后,大大提高了转化效率。

2 水稻基因枪转化系统的优化

影响基因枪法转化效率的因素主要有:受体种类、基因枪参数、受体的处理以及外源 DNA 等。

2.1 受体种类

水稻基因枪转化受体主要有:幼胚、成熟胚、由其诱导的胚性愈伤和悬浮细胞及根尖等。不同受体的转化效率不同,根尖和发芽 5 d 的叶片均得到了 GUS 瞬间表达。Park 等以芽尖为受体得到了 2.8% 的转化效率。花药、幼胚、成熟胚形成的胚性愈伤组织的转化效率在 10%~30% 之间,以幼胚为受体的转化效率较高在 5%~40% 之间,以成熟胚为受体得到较高的转化效率。成熟胚与幼胚相比,取材不受季节的限制,材料获取简单没有诱导胚性愈伤组织及建立悬浮细胞系的过程。

2.2 轰击前后的培养条件和受体细胞的生理状态

Jeon(1994)轰击前用 0.5 M 的高渗培养基处理愈伤组织,使 GUS 瞬间表达强度提高 20 倍。Zhang(1996)用高渗培养基轰击前 4~6 h 与轰击后 16~20 h 处理水稻细胞悬浮系,提高了水稻转化效率。高渗透压处理使水稻细胞产生质壁分离,减少轰击粒子对原生质体的破坏作用,利于细胞的存活,微粒在细胞质粘度大的环境中不易穿出,提高了外源基因的表达频率。

2.3 微弹速度

不同的受体材料对微弹的速度要求不同,应根据受体材料的特点采用不同的轰击速度。

2.4 射程(阻挡板与靶细胞间的距离)

影响微弹速度和轰击范围,在驱动力固定的情况下,射程越大,穿透力越小,对细胞的损伤越小。R·K·Jain 等证明 9 cm 射程比 12 cm 射程的转化效率高。

2.5 轰击次数

实验证明,水稻多数需连续轰击两次,随着轰击次数的增加转化效率增加,但超过 3 次造成对细胞的损伤,反而会降低转化频率。

2.6 微弹载体

DNA 吸附于微弹表面进入植物细胞后再释放外源 DNA,钨粉与 DNA 结合时间长会引起 DNA 的降低,它对靶细胞的毒性会影响转化细胞的再生。金粉作为微弹无上述缺点,且粉粒形状均一,惰性好。

2.7 DNA 纯度

DNA 纯度越高,转化效果越好,浓度一般采用 0.5~1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,DNA 浓度过高可能与微弹凝结。

2.8 DNA 沉淀剂

Klain 等试验(1988)表明,氯化钙的最适浓度 1.9~2.4 M,亚精胺的最适浓度 7.69~76.9 mM,水稻一般采用氯化钙 2.5 M,亚精胺 100 mM。

3 启动子和选择标记基因对水稻基因枪转化的影响

3.1 启动子

为了使外源基因能在植物细胞中有效而稳定的表达,必须使其整合到受体细胞染色体组中并复制。通过将分离的基因与来自植物、病毒或细菌的启动子相连接,然后转移到受体细胞并顺利表达。花椰菜花叶病毒(CaMV)35SRNA 启动子可引导外源基因在双子叶植物中高效表达,但在单子叶植物中的表达水平却很低。此外,玉米 ubiquitin I 启动子(Christensen, 1992; Cornejo, 1993; Taylor, 1993)和水稻 Act1 启动子(McElroy, 1990)被成功的应用于水稻、小麦、大麦和玉米等单子叶植物中,大大提高了目的基因在单子叶植物受体中的表达。一些基因的内含子,如玉米 Adh1 基因的内含子 1 和水稻 Actin 基因的内含子 1,插入到外源基因和启动子之间,可使外源基因在植物中的表达效率提高(Luehrsen, 1991)。E-mU 启动子(Last, 1991)是经修饰的来源于玉米启动子,在禾谷类作物中也能高效表达。

3.2 选择标记基因

为了尽快在转化产物中筛选到具有外源基因特性的转化子,一般除了使外源基因与启动子连接以外,还加有筛选基因,如带有抗菌素的标记等。增强选择标记基因的表达可以使转化受体克服更高的选择压,有助于淘汰非转化体,并缩短筛选周期。在早期水稻直接转化的实验中,NPT II (新霉素磷酸转移酶)基因,该基因具有抗氨基糖苷类抗生素卡那霉素的功能,用 G418 作选择基因选择比卡那霉素更有效,而且再生频率更高。Hpt (潮霉素磷酸转移酶)基因具有抗氨基糖苷类抗生素的能力,是水稻转化的高效标记基因。另外,Bar 基因已被成功的应用于选择转基因水稻的抗性愈伤组织和植株。

4 基因枪法在水稻改良方面的应用

4.1 抗病虫性改良

利用转基因方法进行水稻抗病虫改良具有巨大潜在经济效益和生态效益。目前应用于水稻抗虫性改良的外源基因主要有编码苏云金杆菌毒蛋白的基因(Bt)、蛋白酶抑制剂基因和某些植物凝集素基因等。Wunn 等利用基因枪法成功地将 cryIA(b)基因导入籼稻中获得转基因植株,Chareyazie 等也利用基因枪法将 cryIA(b)基因导入香稻中获得转基因植株,Wu 等利用基因枪法成功地将 cryIA(b)基因导入台北 309 中获得转基因植株,Datta 等利用基因枪法成功地将 cryIA(b)基因导入各种籼稻和粳稻中获得一系列转基因植株,Nayak 等利用基因枪法成功地将 cryIA(c)基因导入 IR64 籼稻中获得转基因植株。以上实验结果经抗虫性测试表明,转基因植物的抗虫性明显高于对照。Vain 等用基因枪法将半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因导入水稻中获得转基因植株,经 PCR 和 Southern blotting 检测证明,半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因已整合进水稻基因组中。燕义唐等用基因枪法转化水稻悬浮培养系获得转基因条纹叶枯病毒外壳蛋白基因(RSVCP)植株,经 Southern blotting 检测证明,RSVCP 基因已整合进水稻基因组中。Western blotting 结果表明,转基因植株有 CP 的表达。Hodges 和 Kouassi 分别将大麦黄矮病毒外壳蛋白基因(BYSVCP)和水稻黄矮病毒外壳蛋白基因(RYSVCP)导入水稻中都获得了转基因植株。Tu 等利用基因枪法成功地将 Xa21 基因导入 IR72 中获得转基因植株,接种试验表明,转基因植株对白叶枯病具有一定抗性。吴家道等用基因枪转基因技术将

高抗白叶枯病的 Xa21 基因导入中国三系杂交稻恢复系(明恢 63)和保持系(皖 B)中,获得转基因水稻系,用转基因水稻配制两系杂交稻。

4.2 抗逆性改良

随着现代分子生物学的飞速发展,一些与水稻抗逆能力有关的基因也逐渐被分离克隆,并应用于水稻抗逆改良。Hossan 等已分离克隆出 3 个与水稻耐淹能力有关的基因 *pdc1*、*pdc11* 和 *pdc111*, 并采用不同的启动子转入水稻基因组中获得部分转基因植株。Rathinasabathi 等将烟草中的 CMO 基因导入水稻中,CMO 基因是合成乙酰-甜菜碱的第一步反应酶基因,具有很强的抗旱性。许德平等则将大麦后期胚胎发生富蛋白基因 HVA1 导入水稻,以求提高水稻抗旱能力。Yokoi (1998)将拟南芥菜的 3-磷酸甘油酯转移酶基因(GPAT)转入水稻后,使水稻叶片的不饱和脂肪酸增加 25%,显著提高了水稻叶片的抗低温能力;Matsuo-ka (1994)将高光效 G₄ 植物玉米的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)和二磷酸核酮糖羧化酶基因(RuBpC)导入水稻(C₃ 植物)中,在水稻叶片的叶绿体中得到表达。Waxy 基因转入水稻后降低了稻谷中直链淀粉的含量(Shimada, 1993)。Meijer 等也将脯氨酸基因转入水稻,获得转基因植株。Reddy (1998)研究了豆科植物的根瘤菌固氮基因在转基因水稻中的表达,可望使水稻产生固氮能力。Bar 基因导入水稻使转基因水稻产生除草剂抗性(黄大年, 1998; Kim, 1999)。王慧中(2000)、WANG Huizhong (2000)分别将 *mt1D/gutD* (1-磷酸甘露醇脱氢酶/6-磷酸山梨醇脱氢酶)双价基因转入了水稻,郭岩(1997)将 BADH(甜菜碱脱氢酶)基因转入了水稻, XuDP (1996)将 HVA1(Lea 蛋白)基因转入了水稻, Sakamoto (1998)将 *codA* (胆碱脱氢酶)基因转入了水稻, Hoshida (2000)将 GS2(叶绿体谷氨酰胺合成酶)基因转入了水稻, 以上转化均不同程度的提高了水稻的耐盐性。

4.3 品质性状改良

与大豆、玉米、小麦等相比,稻谷蛋白质的含量并不高,而且水稻蛋白质中必需氨基酸(如甲硫氨酸、赖氨酸等)的含量也较低。利用遗传工程将自然界植物体内分子量较小且富含硫氨基酸的蛋白质基因导入水稻,并使其稳定的遗传和表达,这是一条改良水稻营养品质可行的途径。Meijer 等将分离克隆出的富脯氨酸基因成功地导入水稻基因组中获得转基因植株。Eunpyo 将人工改造的水稻储藏蛋白基因 Glutelin(富含甲硫氨酸和赖氨酸)导入水稻中获得再生植株,并发现其能表达 Glutelin 蛋白。另外, Barkharddt 等将单子叶植物中八氢番茄红素合成酶及其脱氢酶基因导入水稻基因组中,获得富含类胡萝卜素的再生植株。

参考文献:

- [1] Wunnj, et al. Transgenic indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic cryIA(b) gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Biotechnology*, 1996, 14(2): 171—176.
- [2] Ghareyazie B, et al. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a sythetic cryIA(b) gene. *Molecular Breeding*. 1997, (3): 401—414.
- [3] Wu C, et al. Transgenic fertile japonica rice plants expressing a modified cryIA(b) gene resistant to yellow stem borer. *Plant Cell Reports*, 1997, (17): 129—132.
- [4] Datta K, et al. Constitutive and tissue-specific differential expression of the cryIA(b) gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Thero Appl Genet*, 1998, 97: 20—30.
- [5] Nayak, et al. Transgenic elite indica rice plants expressing CryIAC δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against Yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 97: 2111—2116.
- [6] IRRI. Abstracts of the third international rice genetics symposium, 1995, 27.

- [7] Tu J. et al. Transgenic rice variety IR72 with xa²¹ is resistant to bacterial blight. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 31—36.
- [8] Kim J. K. et al. Molecular and genetic analysis of transgenic rice plants expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32 gene and the herbicide resistance bar gene. *Molecular Breeding* 1999, 5: 85—94.
- [9] Zhang S. P., Wen-Yuan Song, Chen L. L. et al. Transgenic elite indica rice varieties, resistant to *Xanthomonas oryzae* PV. *oryzae*. *Molecular Breeding* 1998, 4: 551—558.
- [10] Tang K. X. et al. Particle-bombardment-mediated co-transformation of elite Chinese rice cultivars with genes conferring resistance to bacterial blight and sap-sucking insect pests. *Planta*, 1999, 208: 552—563.
- [11] Cao J. et al. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Reports*, 1982, 11: 568—591.
- [12] Datta K. et al. Constitutive and tissue-specific differential expression of the cryIA(b) gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 20—30.
- [13] Uchimiya H. et al. Expression of a foreign gene in callus derived from DNA-treated protoplast of rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet*, 1986, 204: 204—207.
- [14] Kohli A. et al. Transgene expression in rice engineered through particle bombardment; molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta*, 1999, 208: 88—97.
- [15] Jeon J. S. et al. Introduction and expression of foreign genes in rice cells by particle bombardment. *Journal of Plant Biology*, 1994, 37 (1): 27—36.
- [16] Zhang S. P. et al. Regeneration of fertile transgenic indica (group 1) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells. *Plant Cell Reports*, 1996, 15: 465—469.
- [17] Jain. et al. Optimization of biolistic method for transient gene expression and production of agronomically useful transgenic Basmati rice plants. *Plant Cell Reports*, 1996, 15: 963—968.
- [18] 田文忠, 等. 植物抗毒素转化水稻和转基因植株的生物鉴定[J]. *植物学报*, 1998, 40(9): 803—808.
- [19] 燕义唐, 等. 水稻条纹叶枯病毒外壳蛋白基因在工程水稻植株中的表达[J]. *植物学报*, 1992, 34(12): 899—906.

(上接第 16 页)

不同 2, 4-D 浓度对体胚诱导差异明显, 并对体胚的发生影响很大, 除了基因型外, 一般来说, 过低过高的 2, 4-D 浓度对体胚发生率都有抑制作用, 发生率曲线基本呈抛物线状, 有 2, 4-D 浓度的最适区域。

不同诱导时间对体胚发生的影响十分明显, 实验结果表明, 2, 4-D 诱导时间对体胚发生的影响, 不同基因型差异很大。在本实验条件下培养 5~10 d 表现最佳。苏汉、沈农这两个品种, 从总的体胚发生率和对 2, 4-D 的敏感程度都要较其它品种好。

参考文献:

- [1] 汪清, 等. 紫花苜蓿外植体胚状体和植株高频再生的研究[R]. 中国科学院遗传所研究工作年报, 1991, 76—77.
- [2] 黄绍兴, 等. 紫花苜蓿原生质体转基因植株再生[J]. *科学通报*, 1991, 36: 1345—1348.
- [3] Hossainadeh A. N. et al. Effects of genotype, medium and explant on callus induction and plant regeneration in alfalfa. *Inarian Journal Agricultural Science*, 1998, 29(3): 491—499.
- [4] 曹学远, 等. 紫花苜蓿外源基因共转化植株再生[J]. *中国科学*, 2000, 30(4): 342—348.
- [5] Santarem E. R. et al. Effect of explant orientation, PH-solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Development Biology plant*, 1997, 33: 13—19.
- [6] Lv Deyang. et al. Regeneration of foreign genes co-transformed plants of *Medicago sativa* L. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Science in China (Series C.)* 2000, 43: 387—394.