

水稻中的基因转移及其应用

王卫建

(武汉大学生物系, 武汉)

利用重组 DNA 技术和原生质体融合技术, 植物的基因转移已取得了广泛的进展。但是, 直到现在, 禾谷类作物、尤其水稻中的基因转移仍然只能通过有性杂交取得成功。Ti 质粒作为植物基因转移中一种广泛而有效的载体, 可以将外源 DNA 带入并整合到双子叶植物的基因组中, 但对水稻却没有这种作用^[1]。但是, 越来越多的事实证明: 植物的原生质体能直接吸收外源 DNA, 而且转化效果可以和 Ti 质粒对双子叶植物的转化效果相比^[2-4]。不久前, 水稻原生质体的全能性已得到了证实^[5], 水稻原生质体再生成完整植株已成为可能。因此, 利用原生质体摄取外源 DNA 的特性及其全能性, 并与日渐完善的植物基因工程技术结合, 将可能使水稻的基因转移实践产生突破。

水稻中的基因转移

(一) 重组 DNA 技术

1. 优良基因的分离与克隆: 利用一种生物的“有用”基因来转化某一植物, 首先就必须分离和鉴定所需要的基因, 并将它克隆, 以增加其拷贝数。目前, 通过利用 mRNA 的分离和鉴定、cDNA 的制备和重组 DNA 的构建等技术, 已分离和克隆了一些植物的基因, 如: 玉米素基因^[6]、大豆球蛋白基因^[7]等, 但是, 在水稻中, 还没有利用这种技术直接分离到基因的报

道。一方面, 由于对水稻的基因组缺乏足够的了解; 另一方面, 与育种有关的许多农艺性状, 如: 抗稻瘟病^[8]、抗白叶枯病^[9]等, 遗传基础比较复杂, 一般表现为多基因控制, 因而很难分离到特殊的或相关的 mRNA。即使在其他植物中, 要随心所欲地分离到所需要的基因也不可能^[10]。

基因文库的构建和利用, 尽管在某种程度上, 克服了水稻基因分离中的某些困难, 也取得了一定的成功, 如 tRNA 基因^[11]、rRNA 基因^[12, 13]和组蛋白基因^[14-17]等的分离和克隆, 而且有可能从 IR₅₄ 的基因文库中分离得到抗病性基因和育性恢复基因^[18]。但障碍仍然存在, 即: 由于不能分离到相关的 mRNA (无论在哪种植物中), 因而没法有效地制备探针。

水稻的细胞质 DNA (叶绿体和线粒体 DNA), 得到了广泛的研究^[19], 并进行了其部分限制性内切酶片段的基因文库构建^[19], 但仅有少量关于细胞质基因被分离和克隆的报道。

2. 基因导入的方法: 将分离得到的基因转入需要转化的植物中, 一般利用两种主要方法: 一是载体法, 另一种是微注射法。(1) 载体法: 将外源 DNA 与带有某种标记的载体, 在体外重组, 这是载体法的基本内容。在植物基因工程中, 目前

主要采用的载体有两类: Ti质粒和病毒。但是, 尽管利用能显著提高Ti质粒转化活性的化合物, 如: Acetosyringone和 α -hydroxyacetosyringone, Ti质粒也不能对水稻转化^[11]。而且, 也没有关于水稻RNA病毒或DNA病毒的报告, 即使在禾谷类作物中, RNA或DNA病毒也很少见(玉米中发现有单链DNA病毒, 即: 玉米条纹病毒)。不久前, 发现了一种能与单子叶植物(如百合等)建立良好关系的 G^+ 内生菌, 是植物基因工程的良好材料, 可能能用到水稻的基因转移研究中。同样, 研究水稻的根际共生菌, 并结合微生物遗传工程的方法, 能解决水稻基因载体的短缺问题。(2) 显微注射法: 外源基因显微注射法因转基因“巨大老鼠”的获得而闻名, 我国科学院水生生物研究所, 利用这种方法, 成功地获得了转基因鱼。目前, 显微注射法已普遍应用在动物的基因工程中。在水稻中, 利用这种方法直接将外源基因注入雌配子体或花粉管中, 发现外源基因能整合到水稻的基因组中^[20], 并最终导致水稻一系列性状的变异^[20]。而且, 这种方法可以用来将外源DNA直接注入到原生质体的核中, 据报道, 在苜蓿的原生质体中, 转化频率竟高达26%^[21]。

(3) 其他方法: 直接喷施核酸^[22]或利用电场脉冲^[23], 也可能将外源DNA转入到植物细胞中, 如: 据王明全等报道^[22], 在水稻和短牵牛的叶片上, 喷施不同短日照处理的水稻的核酸(DNA或RNA), 可以促进植株的生殖生长, 在短牵牛中的表现尤为明显。

3. 水稻原生质体对外源DNA的摄取: 在植物中, 已有近20例关于原生质体直接摄取外源DNA, 如噬菌体DNA、细菌DNA和细胞器的报道^[10], 并通过显微观察和荧光抗原-抗体的反应证实^[24]。

在水稻中, 也有关于原生质体直接吸收外源DNA, 并产生转化的报道^[8, 41]。如: 据Uchimiya等报道^[41]: 利用pCT2T3质粒(含一个带胭脂碱合成酶的启动区和花椰菜病毒DNA的终止区的氨基糖苷磷酸转移酶II的基因: APH(3')II)直接对水稻原生质体转化, 发现2—3%的原生质体可以发生转化。但是, 裸露的外源基因在被原生质体摄取以前, 容易被DNA酶破坏, 因此有人建议: 利用脂质体将外源基因包裹住。

另外, 单倍体原生质体也是外源基因的理想受体^[10], 它不仅具有二倍体原生质体能摄取外源DNA的特性, 而且还有许多其他优点, 如: 不存在复杂的显隐关系。

4. 外源基因的表达与调控: 外源基因能在转基因植株中正常表达和遗传, 是基因转移的最终目的。10年以前, 有关外源基因在转基因植株的细胞中表达的例子很少^[25], 但近年来这一方面的报道正在迅速增多。主要原因是近年来, 人们对基因的表达与调控了解增多。我们知道, 基因转入到一个新的遗传环境, 表达活性受到影响, 但是在外源基因转入以前, 通过与它连上一个强的启动子或增强子等, 可以比较有效地解决这一问题。目前主要采用的是Ti质粒的胭脂碱合成酶的启动子(Ti-nos)和花椰菜病毒25S转录本的启动子。

在水稻中, 尽管已有外源基因表达的报道^[4, 21, 22], 但是关于这些基因的表达与调控还缺乏研究。

(二) 原生质体融合

1. 水稻原生质体培养: 自从1960年Cocking第一次利用酶解法成功地从蕃茄根尖分离得到原生质体以来, 目前已建立了一套有效的原生质体分离、纯化、培养和再生技术^[26], 并且已在50多种植物中

取得了成功^[10]。在水稻中,原生质体的分离和培养在 70 年代已有大量报道^[27],但直到1984年,还只能将原生质体诱导形成愈伤组织^[27],1985年,水稻原生质体再生获得了成功,并相继在中国和日本等国家的许多实验室得到了证实^[5,28,29],而且还可以从单倍体原生质体获得植株^[28]。水稻原生质体再生获得成功,在水稻基因转移研究史上,树立起了一块里程碑。

2. 原生质体融合:由于高 Ca^{2+} /pH-PEG(聚乙二醇)和电融合方法的建立和发展,原生质体融合已在许多植物种属中获得了成功。目前已获得了包括蕃茄+土豆等属间杂种在内的 100 多个体细胞杂种^[26,30],这些杂种大都集中在茄科、十字花科、散形花科和禾本科等中^[80]。原生质体融合已成为目前植物遗传工程与作物品种改良的主要方法^[26]。

在水稻中,自1981年首次开展细胞质雄性不育水稻的原生质体与大豆的原生质体融合^[31]以来,已先后进行了水稻+大豆^[31,32]、水稻+豌豆^[33]、雄性不育水稻+可育水稻^[34]、水稻+胡萝卜^[26-36]、水稻+土壤杆菌原生质球^[37]和栽培稻+野生稻(未见原文、私人通信)等的原生质体融合。但是,由于原生质体融合体再生能力远远比单独的原生质体低^[26],因而,还没有获得水稻体细胞杂种植株的报道。而且,据Sala等报道:胡萝卜+水稻原生质体的融合体,显著排斥水稻的基因,利用核DNA探针检测,发现水稻的DNA仅占融合体的基因组的7%^[35]。事实上,即使在其他植物中,也只有少量获得了体细胞杂种植株的报道^[26,30]。

尽管如此,由于以下原因:第一,原生质体融合能克服远缘杂交中的不亲和性问题^[26];第二,原生质体融合不仅能产

生核-核杂种,而且还能产生核-细胞质或细胞器杂种^[26,30];第三,原生质体融合实质上是整个基因组的重组,尤其适应于与育种有关的重要农艺性状的遗传操作,而且还可以避免优良基因难于分离,基因难于导入等棘手问题。因此,原生质体融合在水稻的基因转移研究中将有广阔的应用前景。

水稻基因转移的应用

(一) 基因转移系统是研究基因结构的有效工具

利用基因转移系统来研究基因或基因组的结构,是目前分子生物学一个热门的领域。在植物中,通过比较cDNA与其克隆基因的核苷酸序列,不仅发现了内含子的存在,如在云扁豆球蛋白基因^[38]和水稻rRNA基因簇^[10]中,而且还发现了TATA盒子、增强子和缄默序列(Silencer Sequences)等与原核生物基因组相同的特征^[39]。

在水稻中,通过克隆基因技术、限制性内切酶技术和DNA序列分析技术的结合使用,已分析了近10个基因的结构(详见表1),有的基因:如17SrRNA基因等已分析了全序列。水稻的基因组中既有间隔序列和假基因的存在^[10,19],又有双向转录,如在组蛋白H2a、H2b和H₄的基因中^[14]。水稻rRNA基因簇的结构见图1,水稻的rRNA基因簇象其他生物的rRNA基因一样,成簇重复分布在水稻的基因组中,其中17SrRNA基因为1812bp; 5.8S-rRNA基因为164bp; 25SrRNA基因为3380bp。5.8SrRNA基因与17SrRNA基因之间存在一个194bp的间隔序列(IS1),与25SrRNA基因之间存在一个229bp的间隔序列(IS2)^[10,12,31]。

表 1 基因克隆技术在水稻基因研究中的进展

基因	参考文献
tRNA 叶绿体tRNA ^{Val}	Vasavada ^[11] R. Wu ^[19]
H ₂ a H ₂ b H ₄ H ₃	组蛋白基因簇 Thomas ^[14, 15] 蔡以欣等 ^[16] 彭泽国等 ^[17] R. Wu ^[19]
17S rRNA 5.8S rRNA 25S rRNA	rRNA 簇 Takaiwa ^[12, 13] Oono ^[18]
RUBP羧化酶大亚基 ATP酶(叶绿体)β和E亚基 粒体细胞色素氧化酶亚基I, II	R. Wu ^[19] R. Wu ^[19] Kao, R. Wu

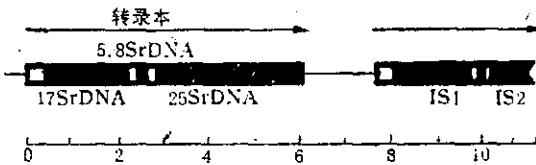


图 1 水稻rRNA基因簇的结构

这种基因转移系统还可以应用在基因组的进化研究中,如Mackay等^[49]比较了小麦和水稻的5.8SrRNA基因发现:从基因的5'端到第91个碱基,两者的序列完全相

同。

同样转基因植株也是研究基因结构及其表达与调控的良好材料^[39]。

(二) 基因转移在水稻品种改良中的应用

由于生态环境的破坏和农业的单一化倾向,种质资源严重减少,常规的育种方法几乎陷入绝境,为了解决人类所面临的粮食危机,人们不得不另辟途径。而目前兴起的生物技术,尤其是基因转移技术,由于是直接对作物的遗传系统进行操作,是一种明显可以利用的有效方法。

在水稻的品种改良中,人们利用生物技术如:组织培养等,已取得了广泛的进展,已有许多品种在生产上得到了应用,如我国育出的花育1号和花育2号。但直接利用基因转移技术来改良水稻品种(基因转移的育种程序见图2),还存在相当长的一段距离。障碍主要来自以下几个方面:(1)对水稻的遗传系统还缺乏深入的了解,如,水稻基因组的结构、基因的表达与调控等。(2)与育种有关的许多农艺性状,如耐盐性、抗病性等的遗传基

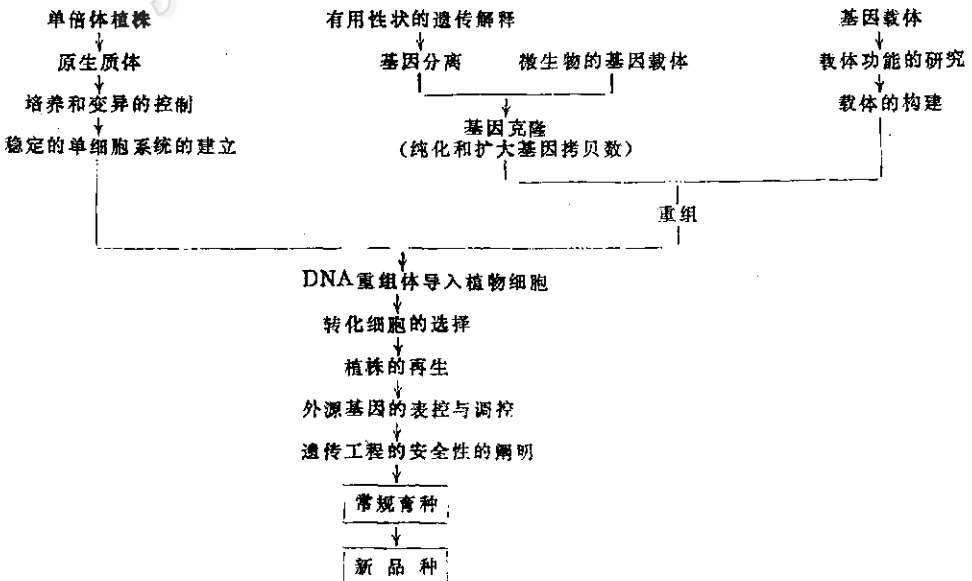


图 2 重组DNA技术的育种程序 (译自K. Oono, 1984)

础还不清楚。(3) 还没有一套成熟的基因转移技术, 原生质体尽管是一种稳定的、高效的基因受体系统, 但其再生植株的表型很不稳定^[26, 30]。

因此, 要想利用基因转移技术来获得

一个优良的水稻品种, 还只是一种美好的愿望。但是, 尽管如此经过人类艰苦、深入、广泛的基础研究, 以常规育种为基础, 并结合其它新的生物技术, 基因转移一定能为最终解决人类的粮食问题做出贡献。

参 考 文 献

- [1] Van Montagu, M., in *Rice Genetics (Proc. Intl. Rice Genet. Symp.)* IRRI (Los Banos, Philippines), pp.839—848, 1986.
- [2] Lurquin, P.F. and Kado, C.I., *Mol. Gen. Genet.*, 154:113, 1977.
- [3] Lori, H. and Gobel, E., in *Rice Genetics (Proc. Intl. Rice Genet. Symp.)*, IRRI (Los Banos, Philippines), pp.849—858, 1986.
- [4] Uchimiya, H. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 204:204, 1986.
- [5] 雷鸣, 李向辉等: 科学通报, 31:1729—1731, 1986.
- [6] Wienand, U. et al., *Nucleic Acids Res.*, 6:2707, 1979.
- [7] Goldberg, R.G. et al., *Dev. Biol.*, 83:218, 1981.
- [8] 王绍坤: 水稻文摘, (4): 1—7 (1984).
- [9] Callow, J.A., *Biotech. Intl. Agri. Res.*, p305—313, 1985.
- [10] Oono, K., in *Biology of Rice (S. Tsunoda and N. Takahashi, eds.)*, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Elsevier, Amsterdam, pp.339—358, 1984.
- [11] Vasavada, H.A. et al., *Cur. Sci.*, 50:887, 1981.
- [12] Takaiwa, F. et al., *Plant Mol. Biol.*, 4:335, 1985.
- [13] Takaiwa, F. et al., *Nucleic Acids Res.*, 12:5441, 1984.
- [14] Thomas, G. et al., *Nature*, 306:82 (1983).
- [15] Thomas, G. et al., *Ind. Biophy. Biochem.*, 11:971, 1984.
- [16] 蔡以欣等: 科学通报, 27:349—350 (1982).
- [17] 彭泽国等: 中国科学, (2): 148—160 (1987).
- [18] Xie, Y. et al., *Adv. Gen. Tech.*, 20:539, 1983.
- [19] Wu, R. et al., in *Rice Genetics (Proc. Intl. Rice Genet. Symp.)*, IRRI (Los Banos, Philippines), pp.825—838, 1986.
- [20] 段晓岚、陈善葆: 中国农业科学, (3): 6—9, 1985.
- [21] Reich, T.J. et al., *Biol. Tech.*, 4:1001, 1986.
- [22] 王明全、王延枝: 中国的遗传学研究, 湖南科技出版社, pp.74—75, 1986.
- [23] Morikawa, H. et al., *Gene*, 41:121, 1986.
- [24] Kado, C.I. and Kleinhofs, A., *Intl. Rev. Cytol.*, (suppl) 11B:47, 1980.
- [25] Cocking, E.C. et al., *Nature*, 293:265, 1981.
- [26] Bravo, J.E. and Evans, D.A., *Plant Breeding Rev.*, AVI Publishing CO. Vol. 3, p.193, 1985.
- [27] Thompson, J.A. and Cocking, E.C., in *Rice Genetics (Proc. Intl. Rice Genet. Symp.)*, IRRI (Los Banos, Philippines), pp.791—798, 1986.
- [28] Toriyama, K. et al., *Theor. Appl. Genet.*, 73:16, 1986.
- [29] Yamada, Y. et al., *Plant Cell Reports*, 5:85, 1986.
- [30] 中田和男 (高必达译): 国外遗传与育种, (3): 1—10 (1985).
- [31] Niizeki, N. et al., *Japan J. Breed.*, 31:161, 1981.
- [32] Niizeki, M. et al., *Japan J. Breed.*, 36:75, 1987.
- [33] Bajaj, Y.P.S., *Indian J. Exp. Biol.*, 21:120, 1983.
- [34] 山田康之 (梁玉梅译): 国外遗传与育种, 1985年第1期, p.25.
- [35] Sala, C. et al., *J. Plant Physiol.*, 118:409, 1985.
- [36] Sala, C. et al., *Genet. Engin. Plant Micro. Impt. Agri.*, p150—115, 1985.
- [37] Baba, A. et al., *Plant Cell Physiol.*, 27:463, 1986.
- [38] Sun, S.M. et al., *Nature*, 289:37, 1981.
- [39] St. Schell, J. Sci., 237:1176, 1987.
- [40] Mackay, R.M. et al., *Eur. J. Biochem.*, 112:561, 1980.