

植物基因工程

J. H. 多兹 主编

科学出版社

2.6

内 容 简 介

本书由 12 位世界著名的植物分子生物学家介绍了植物基因工程的新技术,如原生质体的分离、培养和融合;农杆菌和病毒作为植物基因载体的应用;利用基因工程进行大豆、小麦等重要作物的遗传改良,随着这些技术逐步得到实际应用,农业和工业将得到极大的发展。

本书可供综合性大学生物系和农林院校师生,从事植物学、遗传学、生物化学和农学工作的科研人员、技术人员参考。

Edited by J.H.Dodds

PLANT GENETIC ENGINEERING

Cambridge University Press

植 物 基 因 工 程

J. H. 多兹 主编

马素卿 王爱琳 等译
曾建飞 吴铁双 刘 安

赵甘泉 王 奇 校

责任编辑 吴瑰琦

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

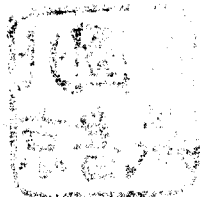
1989 年 3 月第 一 版 开本: 787×1092 1/32

1989 年 3 月第一次印刷 印张: 10

印数: 0001—2,050 字数: 230,000

ISBN 7-03-000845-6/Q · 132

定 价: 8.60 元



目 录

第1章	引言.....	J. H. Dodds (1)
第2章	植物原生质体的分离和培养...	J. H. Dodds (4)
第3章	植物原生质体的融合	J. H. Dodds (14)
第4章	离体细胞器和亚原生质体及其在体细胞遗传学中的作用.....	H. Lörz (22)
第5章	把基因引入植物的载体系统——农杆菌..... ... L. Herrera- Estrella, M. De Block, P. Zambryski, M. Van Montagu 和 J. Schell (50)	
第6章	植物基因的载体——病毒.....	R. Hull (77)
第7章	二磷酸核酮糖羧化酶基因工程的可能性.....	H. J. Newbury (92)
第8章	种子蛋白的基因工程: 当前和潜在的应用...	R. R. D. Croy 和 J. A. Gatehouse (118)
第9章	基因工程在农业中的应用...	M. G. K. Jones (236)
英汉名词对照.....		(261)
参考文献.....		(266)

第1章 引言

J. H. Dodds

很多世纪以来，人类一直试图通过传统的育种和选择的程序，改进栽培植物的质量和产量。不应低估这些努力所产生的效果，因为它们为促进众所周知的“绿色革命”的到来指明了方向。

虽然植物组织培养的历史可追溯到本世纪初 (Haberlandt, 1902), 但从50年代起才得到实际应用。在植物组织培养中采用的各种不同技术，其中有一些在农业和园艺科学中应用已经很久了。应用分生组织顶芽培养和其后的微繁殖来根除病毒的感染就是一个很好的例子。例如马铃薯和果树的微繁殖现在已成为一种常规方法。在合适的培养基上进行分生组织顶芽或苗尖的温育，以诱发腋生分生组织的赘疣，然后将它切出并再进行传代培养。这些系统的繁殖如此之快，以致很容易在一年之内从单个来源育成百万株植物。

植物组织培养的其他领域仍处于实验阶段。原生质体的分离、培养和融合过程就属于这一范畴。在植物的很多属中，分离出的原生质体可再生成完整的植株；然而，成功率仍很低，例如在谷类作物中得到的结果就使人感到失望。

不过，似乎就是这些实验领域给作物改良带来极大的生机。在过去的十年里，我们已经看到把组织培养方法和分子科学结合起来，研究植物基因组的基本结构和作用并分析修饰植物基因组的成功可能性。

对植物分子生物学领域这一新的成功可能性，不仅使大学和政府研究中心的科学家，而且使很多工业和农业化肥公司的人愈来愈感兴趣。很明显，任何新的发展、任何“新奇”的植物或带有诸如抗杀虫剂或高光合效率等新特性的转化植物都可能具有重大的经济价值。这些新植物将取得专利，生产者将得到收益。

植物遗传操作和基因工程领域中的一个重要的未知因素是投入生产的时间。也许只需几年，商业公司就能获得大规模生产这些新植物的重要成就；也许达到这一步需要几十年。

最近出版的刊物指出，诸如烟草类植物的模式系统，现在有可能插入和转译新的遗传信息（Chilton 等，1978，1980；Herrera-Estrella 等，1983a，1983b，在印刷中）。我们目前面临着两个直接的问题。第一，这些模式系统所采用的技术现在必须转移到重要的经济作物中。对马铃薯来说，这一点是相当肯定的，它是一种在栽培中呈现高度可塑性的茄科植物。但是，对另一些，诸如谷类植物来说，这种情况就更为困难得多，必须进行更多的基础研究。第二，生产改良植物需要包括哪些基因，农学家、生理学家和分子工程学家必须取得一致意见。目前正对许多想法开展讨论。由于明显的经济原因，农业化肥公司为了生产带有特殊抗性因子的作物品种，对含有赋予抗特异除草剂的基因这种可能性非常感兴趣。

通过改进植物的光合作用效率（参阅第7章），抑或改变食物成分的质量，也就是说改进它们的贮藏蛋白质量（参阅第8章），从而增进作物的营养价值也是可能的。但是，植物改良工作错综复杂，使问题难于解决。假若我们认为只通过加入或修饰几个基因就能改进植物，这种可能性似乎是很小的。

在本书中，我们试图从两个主要方面来说明这些技术的前景。第一部分是讨论组织培养，或者更准确地说，是原生质体培养工作。描述与这项研究有关的问题，介绍有关将来这些技术潜在应用的想法。第二部分讨论所涉及的是分子生物学，重点放在两个模式系统：其一着眼于总的光合作用效率，其二考虑重要贮藏蛋白的特异修饰。第9章综述农业科学基因工程的潜在意义。

本书的目的是期待能进一步激发人们对植物基因工程的兴趣。我们所面临的问题是可观的，但是如果能达到所预期的突破，它们的应用前途无量。我们希望本书能鼓励更多的人加入这些研究的行列。

(赵甘泉 译)

第2章 植物原生质体的分离和培养

J. H. Dodds

离体的原生质体是用物理方法或酶去掉外壁的植物细胞。细胞壁去掉以后，原生质膜成为细胞质和外界环境之间仅有的屏障。植物原生质体的分离并不是一种新技术。早在1893年就已经实现了原生质体的机械分离 (Rechinger, 1893)。当时学术界感兴趣的主要是原生质体的分离和观察，能释放出的原生质体的数量是很少的，约每小时几百个。本世纪60年代初，许多工作者对植物细胞的合成和结构发生了兴趣；作为研究细胞组成的一种手段，有关能促使细胞壁溶解的真菌酶活力的研究得到了开展。这些酶的纯化，开辟了用酶促方法分离植物原生质体的可能性。适当选择酶的混合物，在几小时内能够释放出无数的原生质体 (Cocking, 1960, 1972, 1973)。这一点将在后面叙述。

在本章，我们将着眼于原生质体的分离和培养，以及最终完整植株再生所要求的培养条件和技术。证明某一单个原生质体再生为一棵完整植株的能力 (Raveh 和 Galun, 1975; Takebe 等, 1971)，是对植物细胞全能性假说的极好说明 (Haberlandt, 1902)。在这一章里，将分析培养过程的每一阶段，并指出一般情况下所遇到的有关问题。植物组织培养的基本问题之一，即对一属植物起作用，而对另一属植物将不起作用，这个问题在其他领域也会出现。一般地说，茄科 (Solanacea) 为原生质体的分离和培养提供了一个极好的模

型系统。这个科的重要作物包括马铃薯和番茄 (Melchers, 1978, 1982; Melchers 等, 1978; Shepard, 1982; Thomas, 1981)。遗憾的是,谷类作物原生质体的分离和培养,至今取得的成功是很有限的 (Vasil, 1982)。

植物的生理状态

对于原生质体的分离,所用植物材料的生理状态明显地影响着原生质体的产量和存活。通常,材料应种在一个环境条件能严格控制的房间里,要避免使用除莠剂或农药 (D. Roscoe, 私人通信)。如有可能,最好用无菌苗开始培养。无菌苗培养物有一层很薄的表皮,酶混合物容易通过;又由于它们原来无菌,材料避免了由于表面消毒可能导致的破坏作用。

有证据表明,在分离前两小时,使植物材料处于轻度干旱,以致引起叶的萎蔫,有助于改进分离过程。另一种可供采用的方法,是在酶处理前于 13% (w/v) 甘露糖醇溶液中处理几分钟,使离脱的叶产生质壁分离。

酶学和渗透剂

原生质体一旦被分离,无论是用机械方法还是酶法分离的,它的质膜便成为内含物和外界环境之间仅有的界面。因而,细胞壁的渗透保护作用不复存在。对于这种作用的补偿,须在培养基中加一种渗透剂,以维持细胞处于等渗状态。可采用的渗透剂是多种多样的,甘露糖醇是最普通的一种渗透糖醇,常用的浓度约为 12—14% (w/v)。也可选用山梨糖醇或蔗糖作为渗透剂。但是使用一般的糖将带来的问题是,它为细胞质所代谢,其浓度和渗透值会不断下降。

近几年所用的许多酶，它们有范围广泛的细胞壁降解特性和不同的纯度。表 2.1 列举了一些可用的酶。酶的纯度可能是一种关键的因素。例如，如果酶制剂含有蛋白酶或脂肪酶杂质，它们将作用于原生质体的质膜，并使其破裂。重要的是，酶消化的混合物应当包括渗透剂在内，通常是甘露糖醇。酶在标准培养基中溶解以后（Murashige 和 Skoog, 1962），其混合物消毒的常规方法是，使其通过一种孔眼 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜进行超滤。

表 2.1 可用于分离单细胞和原生质体的酶类型

酶	来 源
纤维素酶 R-10	Kinki Yakult Biochemical, Nishinomiya, Japan
纤维素酶 (Cellulysin)	Calbiochemicals, San Diego, California
纤维素酶(干燥酶)	Kyowa Hukko Co., Tokyo, Japan
果胶酶(分解酶) R-10	Kinki Yakult Biochemical, Nishinomiya Japan
果胶酶	Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri
半纤维素酶 HP-150 rhozyme	Rohm and Hans Co., Philadelphia, Pennsylvania

注意：并不意味着表中所列公司的商品有优先权，其他供应厂商的产品也可选用。

原生质体分离的方法

许多研究工作者已对分离的基本技术作过叙述（Cocking, 1972; Dodds 和 Roberts, 1982; Camborg 等, 1981; Yeoman 和 Reinert, 1983）。图 2.1 是分离的典型步骤图解。表面消毒以后(对于无菌苗无需消毒),冲洗叶片，在 13% 甘露糖醇中经历一小时，使其产生质壁分离。然后小心地撕掉下

表皮以使酶混合物能透过。如果下表皮的去除存在技术上的问题,可简单地用针或解剖刀刮叶片,破坏表皮层和角质层的表面,渗透作用便能完成。

温育适当时间以后,叶片将出现溶解现象。培养时间的长短不等,从 30 分钟到过夜不等,这取决于材料的类型和生理状态。在有些情况下,培养期间以 40 次/分的频率轻摇培养皿,可促进分离。

培养结束后,原生质体释放出来漂浮在含酶的介质中。下一步是去掉酶混合物并纯化原生质体制剂。

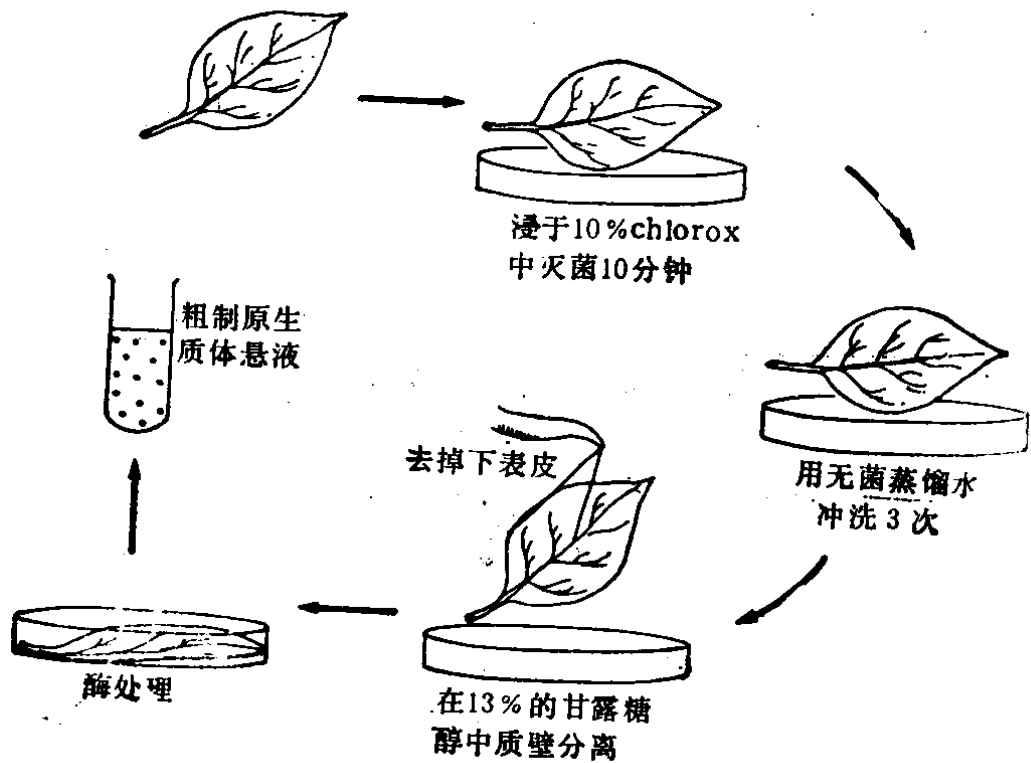


图 2.1 粗制原生质体分离的图解

原生质体制剂的纯化

有几种方法可用于纯化粗制原生质体。图 2.2 示出一种离心沉降技术 (Dodds 和 Robert, 1982), 当然也可选用漂浮法 (Gamborg 等, 1981)。沉淀技术十分简单,即让原生质

体温和地沉降到离心管底部，然后弃去上清液。这时的上清液是酶和细胞壁碎片的混合物。在各个不同阶段，要用新配制的没有酶的等渗缓冲介质重新悬浮原生质体。适当冲洗几次，一般为 2 或 3 次，便可得到如同图 2.3 所示的原生质体。

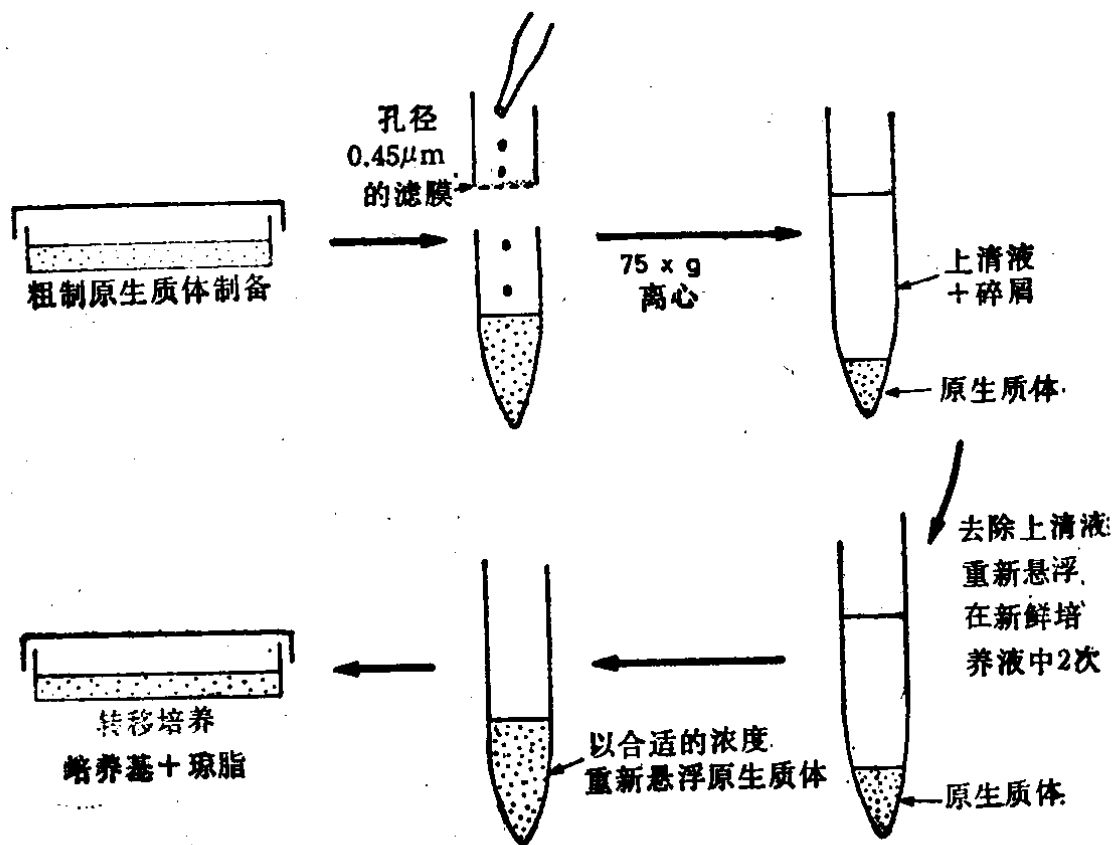


图 2.2 粗制原生质体纯化的图解

种植密度和活力测定

纯化的悬浮液可能含有能活的和不能活的（受了损伤但有活力）原生质体。为了便于估算有多少原生质体能接种，以达到最低种植密度（m. p. d.），测定细胞存活的百分率是很重要的，这一点将在后面介绍。通常应用的两种方法不用伊文斯蓝染色（Dodds 和 Roberts, 1982）和荧光素双乙酸

• • •

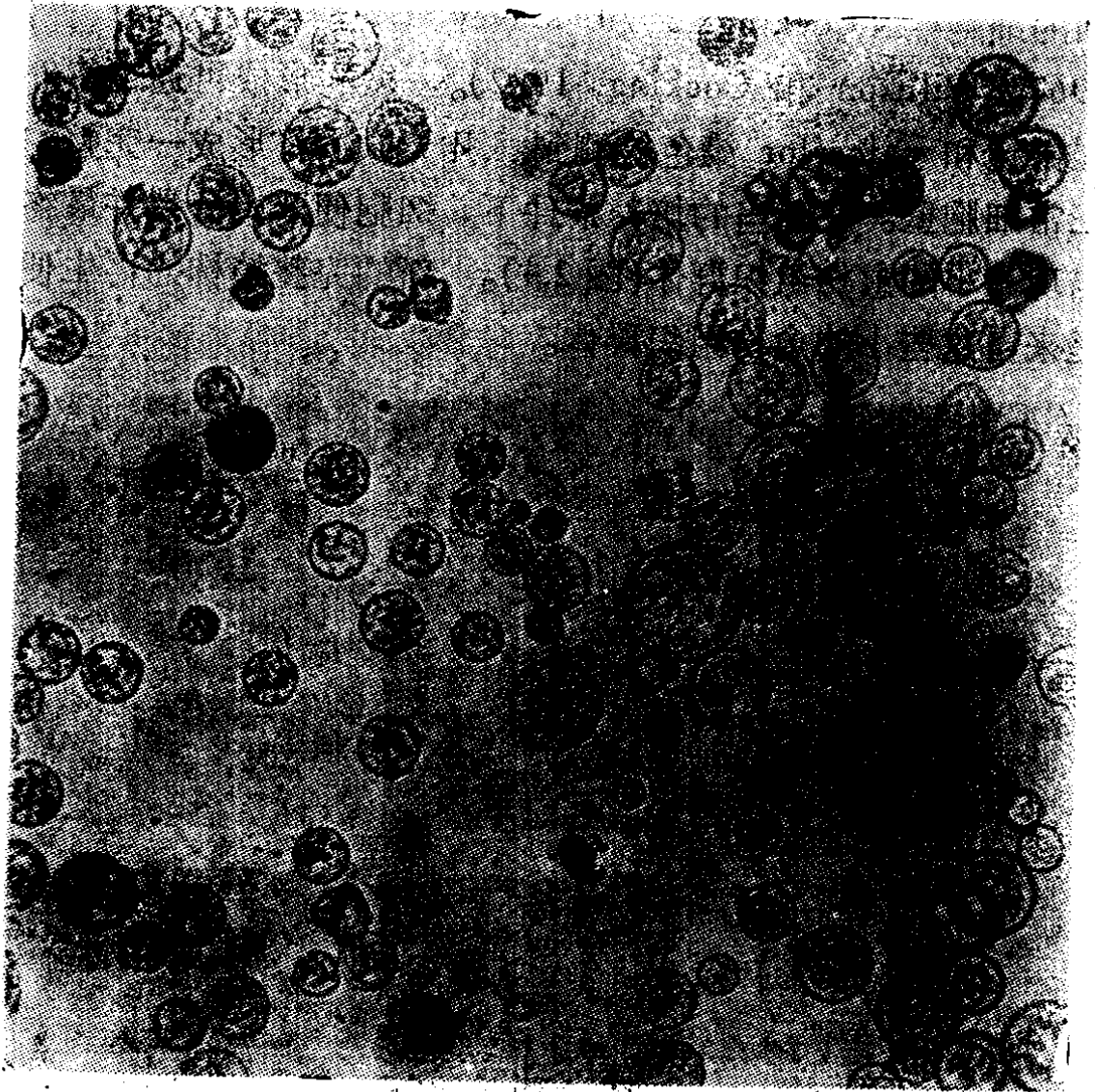


图 2.3 离体的马铃薯叶肉原生质体

盐 (FDA) 染色。因为不管原生质膜是否完整, 这两种染色方法都将同样显示 (Widholm, 1972)。

为使离体的原生质体获得良好生长, 原生质体有足够的量(浓度)是很重要的。例如, 烟草的最低种植密度为 $1 \times 10^4 / \text{cm}^3$ 。如果所培养的原生质体低于这个浓度, 那么壁的再生和细胞分裂就不能发生。

细胞壁的再生和细胞分裂

离体的原生质体在培养基培养几小时以后, 便开始形成

新的细胞壁 (Cocking, 1970; Davey 等, 1974; Pojnar 等, 1967; Willison 和 Cocking, 1972)。壁的形成可通过紫外显微镜和 calcaflor 染色检测到。几天以后将形成一完整的正常细胞壁。在适当的培养条件下, 细胞便开始分裂并最终出现一小的愈伤组织群体(图 2.4)。新的完整植株的再生便是来自这些小的愈伤组织群体。

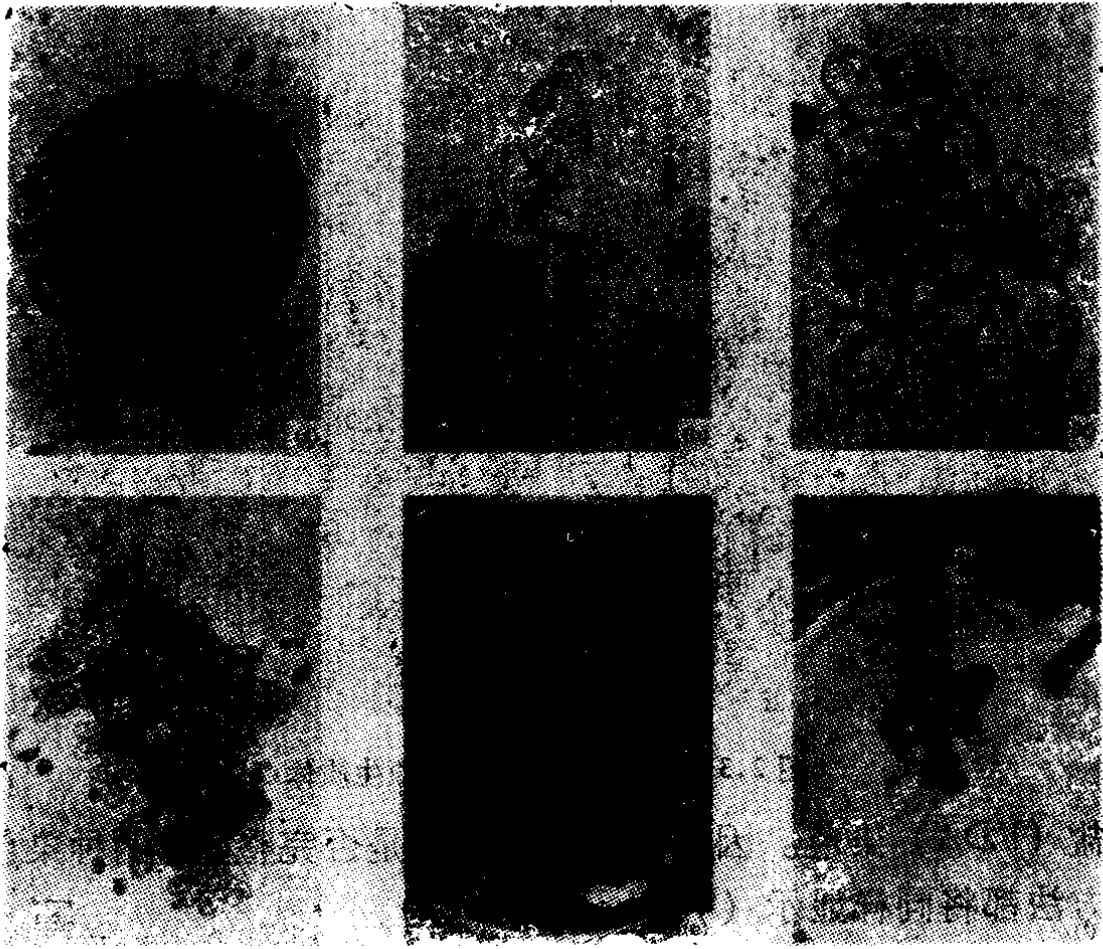


图 2.4 来自单个离体原生质体的完整植株再生的照片顺序。

(a) 刚分离的原生质体; (b) 细胞分裂; (c) 形成细胞小团块;
(d) 小愈伤组织群体形成; (e) 苗的形成; (f) 小植株

(Courtesy H. Lörz.)。

器官形成和完整植株再生

通过改变培养基的成分验证诱导愈伤组织群体形成器官

的能力，是一种植物组织培养的经典的研究。图 2.5 示出各种各样的激素组合对愈伤组织切片的作用，从而促进苗或根的诱导 (Skoog 和 Miller, 1957)。通过控制培养基，能够使原生质体衍生的愈伤组织形成苗 (Camborg 等, 1981; Raveh 和 Galun, 1975)。再生的苗接着能分离和生根, 把它转移到无菌的土壤, 然后长成正常植株。植株在生根和转移到土壤这个阶段非常纤弱; 植物从受到高度保护的无菌环境移到非无菌的和比较粗糙的土壤环境。根诱发以后, 小植物应移入无菌的小花盆, 继续在一个能控制湿度的房间里生长。在玻璃容器里的小植物只能发育不完全的表皮, 因此必须控制湿度, 以免水分丢失而枯萎。以后湿度逐渐减小, 待植物慢慢适应, 直到它能移植到花盆, 最后移至田野。

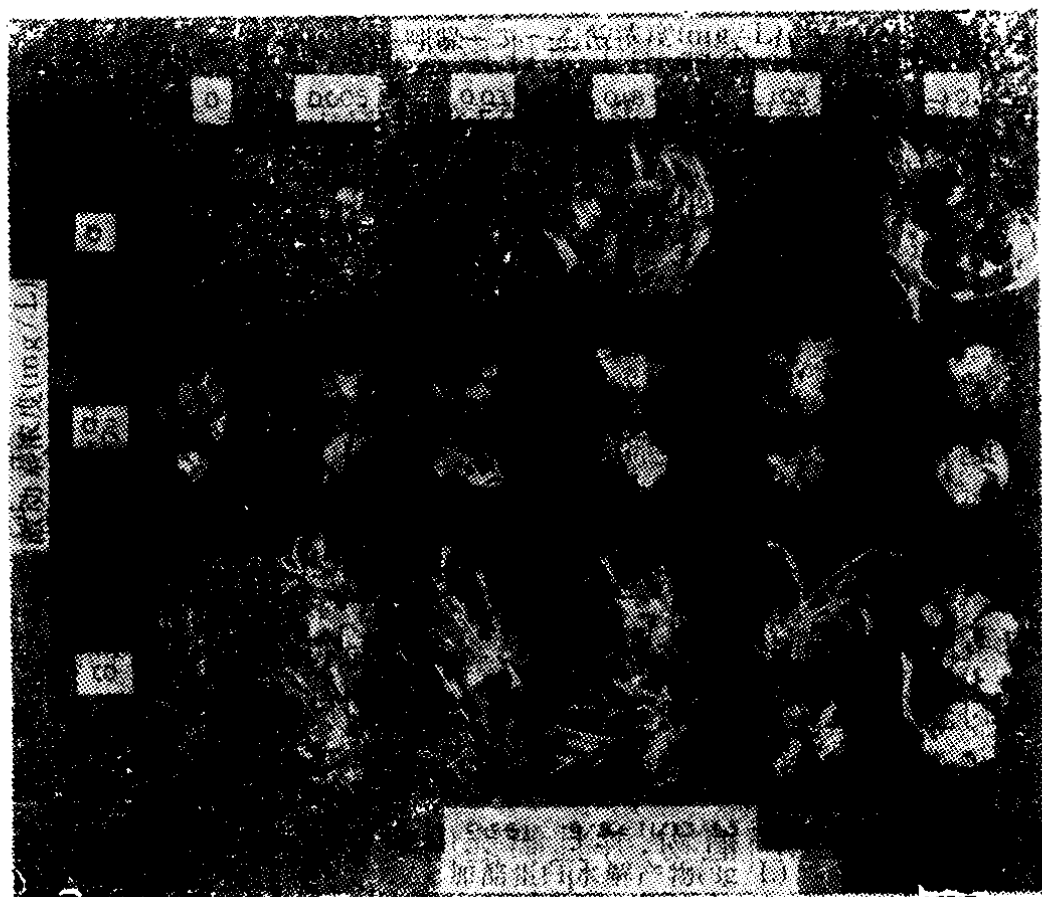


图 2.5 烟草愈伤组织切片的根和苗的诱导

遗传变异问题

在原生质体和单细胞研究的早期,人们期待从这些材料再生完整植株,能获得有高度经济价值的无性系植物。然而近几年已经清楚,愈伤组织和单细胞系的有丝分裂和细胞分裂是不稳定的(D' Amato, 1978, 1983)。由离体原生质体繁殖的材料是高度可变的,并且不是原有亲本植物的克隆。这种变异性的一个很好的例子,是由 Thomas (1981) 通过对马铃薯原生质体再生植株的研究而提供的。用分生组织出芽繁殖的植物,表型性状和染色体图与亲本植物能保持一致;但是来自原生质体的材料是高度可变的,叶片的形态以及块茎的产量、大小和颜色都有变化。虽然这是很不利的一方面(也就是说,原生质体不能用于无性系繁殖),但是另一方面,它对遗传变异性的诱导和需求特征的变种的可能选择,可提供一种有价值的方法。

应激耐受系的选择

选择耐受某一特定应激(如高盐或重金属浓度)的一种传统方法是筛选大量籽苗,从存活的苗中挑选出来。这种方法需要大量的场地和劳动力,因此花费是极大的。原生质体-单细胞系的利用提供了一种新方法。在一个含有应激物的培养器皿的基质里,就能很容易地筛选几百万细胞。对应激具有抗性的原生质体会分裂并形成愈伤组织群落。从这些愈伤组织群落可再生出植物,并且筛选出对应激抗性的植物(Boulware 和 Campter, 1972; Carlson, 1973)。这种研究可以为抗性植物的选择提供一种更有利于成本-效果分析的方法。

结 束 语

本章叙述了植物原生质体分离和培养的技术。应该强调的是,并未证实这些技术对所有植物都适用,在开始这方面工作之前,查阅更多的有关文献是必要的。

细胞外壁的去除了使得一系列技术都能适于被分离的原生质体,而当细胞壁完整时这是不可能的。这些技术包括植物细胞吸收外界物质(见第4章)以及不同细胞融合的能力。植物细胞融合的可能性为植物育种开辟了全新的前景,这也正是下一章的论题。

(吴铁双 译)

第3章 植物原生质体的融合

J. H. Dodds

细胞外壁一旦被去掉，就释放出原生质体。不同的原生质体有可能融合在一起，形成体细胞杂种。植物原生质体融合并不是新的发现，早在1909年，Kuster就描述过用机械方法分离的原生质体的自发融合。现已清楚，原生质体的自发融合是一种严格的种内事件，更可能发生在从嫩叶而不是从成熟叶所分离的原生质体。

动物细胞生物学家，不像植物细胞生物学家那样受细胞壁的约束，他们在60年代就开始利用细胞融合来研究各种发育和分化的问题（Barski等，1960；Ephruss和Weiss，1965）。直到20世纪70年代初，植物细胞生物学家才开始认真研究利用原生质体产生新的杂种植物的可能性。

方 法

原生质体首先必须被分离，这一点在前一章已经叙述了。下面有几种对形成杂种有效的融合实验方法。

硝酸钠处理

通过进一步发展Kuster（1909）最初的研究，Power及其同事探讨了种内融合和种间融合。一般是在10%的蔗糖中加5.5%硝酸钠作为一种聚集混合物，当融合发生时，原生