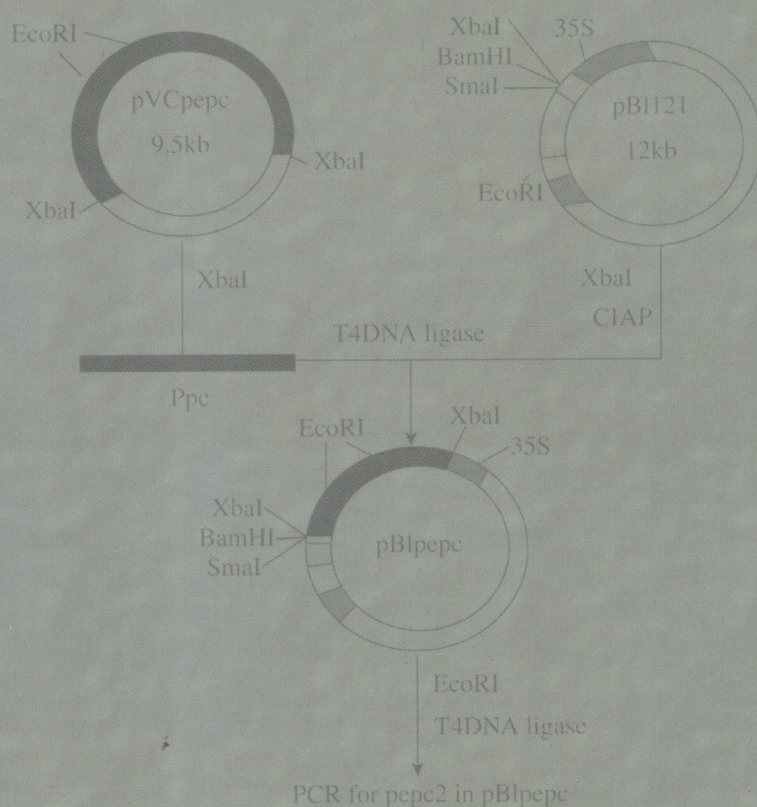


作物生物工程技术

Bioengineering Technology for Crop

陈如凯等 著



中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

作物生物工程技术/陈如凯等著. —北京: 中国农业出版社, 2003.3

ISBN 7-109-08270-9

I. 作… II. 陈… III. 作物育种: 遗传育种—生物技术—文集 IV. S330-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 014360 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 傅玉祥

责任编辑 赵立山

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2003 年 3 月第 1 版 2003 年 3 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 29.25

字数: 679 千字 印数: 1~3 000 册

定价: 58.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

前 言

以生物技术改造和提升传统农业是农业科学的发展方向。作物生物工程技术属于生物技术范畴的中下游技术领域，以其在作物育种和农业生产中的广泛应用前景和潜在的巨大经济价值而成为研究的热点。

农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点实验室是糖料行业惟一的重点实验室，于1995年开始筹建，1996年建成并命名运行，2002年通过农业部第四轮重点实验室评估。七年来，实验室得到国家科技部、农业部、教育部和福建省政府、省计委、科技厅、教育厅、财政厅、农业厅以及福建农林大学的各级领导支持，承担了国家“863”高技术计划、国家“九五”科技攻关项目、“十五”国家攻关引导项目、国家“948”重大项目、国家自然科学基金、国家农业跨越计划、国家糖料良种基地建设和福建省重大项目等多项重大科技项目，取得了一些成果。为了便于加强与国内外同行的交流与合作，现将本实验室作物生物工程技术方面的部分论文汇编成册，以介绍实验室在该领域已取得的部分成果和进展。特别需要说明的是，其中绝大部分研究是所在学科的博士、硕士研究生和博士后参与完成的，一部分研究成果是在本室开放运行管理机制下，由本室同一些来实验室进行科研工作的兄弟单位合作取得的。

《作物生物工程技术》一书，对几年来实验室在基因克隆、基因表达和调控、转基因、组织和细胞培养以及分子标记等领域的研究进行综合，在其中的部分领域，我们还增加了一些综述性的文章，以方便读者了解有关科学领域的发展概况。凡有合作单位的论文，均在作者单位处注明。

由于汇编时间仓促，书中的错漏之处敬请读者谅解和指正，以便改进和提高我们今后的工作。

农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点实验室 陈如凯

2003年3月3日

目 录

前言

1. 甘蔗和花生生物技术研究概况 (1)

- 基因工程甘蔗：潜能、现状和前景 许莉萍 陈如凯 (3)
- 甘蔗遗传转化的研究进展 许莉萍 陈如凯 (10)
- 农杆菌介导的甘蔗遗传转化研究 陈如凯 林俊扬等 (15)
- 甘蔗基因工程及其研究进展 陈平华 陈如凯 (20)
- Application of Biotechnology to Peanut Genetic
Improvement Chen Youqiang et al. (27)

2. 作物基因的分子克隆及其分子生物学研究 (39)

- 聚合酶链式反应扩增甘蔗钙调蛋白基因及其序列分析 林俊芳 陈如凯等 (41)
- 油菜叶片衰老相关基因的分离
——ATP 硫化酶 cDNA 的克隆和序列分析 林俊芳 郭丽琼等 (48)
- 油菜叶片衰老相关基因的分离
——细胞色素 P450 cDNA 的克隆和序列分析 林俊芳 郭丽琼等 (54)
- Cu^{2+} 作用下辣椒膜脂过氧化及倍半萜环化酶基因转录 何水林 陈如凯等 (61)
- 辣椒倍半萜环化酶基因在几种非生物诱发因子
作用下的表达 何水林 郑金贵等 (67)
- 外源水杨酸对辣椒倍半萜环化酶基因表达及
抗氧化酶作用 何水林 林文雄等 (74)
- 辣椒倍半萜植保素代谢的分子生态学研究
——紫外线对辣椒叶片倍半萜环化酶及
鲨烯合成酶的作用 何水林 林文雄等 (81)
- EGTA 和 La^{3+} 对几种逆境诱导辣椒倍半萜环化酶基因
表达的影响 何水林 林文雄等 (88)
- 应用缩减杂交技术分离油菜叶片衰老相关基因 林俊芳 郭丽琼等 (94)
- 植物激素乙烯的分子生物学研究进展 姚瑞亮 关 雄等 (102)
- 植物萜合酶的研究进 陈 惠 陈由强等 (108)

芪合酶基因的研究进展	林建丽 陈由强等 (118)
3. 作物遗传转化研究	(131)
渗透胁迫下外源 DNA 导入甘蔗变异后代的	
抗氧化代谢分析	张木清 李耀平等 (133)
基因枪法转化甘蔗胚性愈伤组织获得转基因甘蔗白化苗	林俊芳 张银东等 (142)
HS1 ^{pro-1} cDNA 单子叶表达载体的构建和	
转化甘蔗研究初报	陈平华 陈如凯等 (149)
甘蔗 C ₄ 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因表达载体构建及	
转化大豆研究	杨荣仲 陈如凯 (154)
农杆菌介导海藻糖合酶基因遗传转化甘蔗研究	王自章 李杨瑞等 (166)
GNA 基因遗传转化甘蔗的研究	罗素兰 陈如凯 (182)
GNA 基因在大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) 中的表达	罗素兰 陈如凯 (195)
甘蔗光合基因遗传转化番茄的初步研究	罗素兰 陈如凯 (203)
人表皮生长因子基因的克隆、表达及其在植物中的	
遗传转化研究	陈廷速 李杨瑞等 (211)
香蕉横切薄层培养 (tTCL) 及植株再生	陈廷速 张 军等 (226)
香蕉农杆菌介导高效转化体系	陈廷速 张 军等 (228)
影响根癌农杆菌介导的香蕉遗传转化因素研究	陈廷速 张 军等 (233)
甘薯抗蔓割病突变体的立体筛选及几丁质酶基因	
导入研究	袁照年 陈如凯 (240)
花生再生和转化体系的初步研究	庄振宏 朱锦魁等 (262)
4. 作物组织培养和细胞培养的研究	(269)
利用愈伤组织和茎尖培养去除甘蔗花叶病毒	许莉萍 陈如凯等 (271)
基因型和聚乙二醇预处理对甘蔗胚性愈伤组织原生质体	
分离的影响	林俊芳 陈如凯等 (276)
甘蔗抗盐细胞变异系的筛选及其特性初步研究	林俊芳 陈如凯等 (282)
甘蔗腋芽快速繁殖培养基及激素配方的筛选	许莉萍 傅华英等 (287)
游离氨基酸对生物大分子及绿苗分化综合效应的	
多元分析	周以飞 潘大仁等 (292)
甘蔗茎尖培养技术的研究	许莉萍 陈如凯等 (299)
组培亚无性系的遗传效应与选择效果	周以飞 潘大仁等 (305)
甘蔗组织培养中培养基的优化	罗素兰 陈如凯等 (311)
甘蔗细胞与分子遗传学研究进展	张 华 林彦铨 (317)
甘蔗组培亚无性系群体的遗传变异评价	陈如凯 李耀平 (324)

甘蔗抗磷酸盐变异系的筛选	许莉萍	林俊芳等 (332)
甘蔗组培苗分化过程中一些生物大分子的变化	潘大仁	周可涌等 (338)
果蔗 Badila 花叶病茎尖脱毒技术的研究	章文水	潘大仁等 (344)
果蔗脱毒对光合作用及产量的效应	潘大仁	许莉萍等 (351)
花生体细胞胚和丛生芽的诱导及扩繁培养	陈由强	朱锦懋等 (356)
蔓茎莖菜细胞悬浮培养的研究	陈由强	戴容春等 (362)
蔓茎莖菜愈伤组织分化再生植株	戴容春	朱锦懋等 (369)
 5. 作物分子标记的研究		
(377)		
甘蔗分子标记的研究现状及展望	廖江雄	陈如凯 (379)
基因芯片技术及其在农业上的应用	徐景升	张木清 陈如凯 (385)
Analysis on Epidemic Parameters and Screening of Indicators for Evaluation of Smut (<i>Ustilago scitaminea</i>) Resistance in Sugarcane	Xu Liping et al.	(392)
Identification of RAPD Marker Linked to Smut Resistance Gene in Sugarcane	Xu Liping et al.	(398)
Isolation of Microsatellites DNA and Research on Polymorphism of Peanut	Gao Guoqing et al.	(406)
甘薯抗线虫病品种的 PCR 检测	郭金平	潘大仁 (424)
花生 DNA 快速简便提取方法的研究	陈由强	叶冰莹等 (429)
花生 RAPD 反应条件的研究	叶冰莹	陈由强等 (433)
长叶榧 RAPD 反应条件的研究	陈由强	叶冰莹等 (437)
应用 RAPD 技术对花生品种遗传变异的分析	叶冰莹	陈由强等 (441)
阔叶榧总 DNA 的提取及其 RAPD 反应条件的研究	叶冰莹	陈由强等 (446)
杉木地理种源遗传变异的 RAPD 分析	陈由强	叶冰莹等 (452)

1 ● 甘蔗和花生生物技术研究概况

基因工程甘蔗：潜能、现状和前景

许莉萍 陈如凯

(农业部甘蔗遗传育种重点开放实验室, 福州 350002)

摘 要 从基因工程在甘蔗上的应用潜能、甘蔗遗传转化的方法及其成效、启动子及选择标记对基因表达和转化体筛选的效应、基因工程甘蔗的成就等几个方面进行综合评述, 并提出了进一步的研究方向。

关键词 甘蔗; 基因工程; 遗传转化

近年迅速发展的基因工程技术可突破物种的界限, 导入有用基因、创造新品种, 为作物育种开辟了新的有效途径。自 20 世纪 80 年代转基因植物进入田间试验, 到 1996 年, 全球已种植转基因作物约 280 多万 hm^2 , 1997 年为 1 280 多万 hm^2 ^[1], 1999 年达 3 900 多万 hm^2 , 约占全球栽培面积的 3%~4%。我国已批准进入商品化生产的转基因植物已有番茄、棉花、青椒和矮牵牛等 4 种, 批准进入中试的已达 13 种。基因工程甘蔗的研究在我国才刚刚起步, 但国外在该领域已取得许多进展, 本文就基因工程甘蔗的潜能、转化技术及转基因甘蔗的现状进行综合评述, 并探讨了进一步研究的方向。

1 基因工程在甘蔗上的应用潜能

基因工程是指在体外将核酸分子插入到载体分子, 构成遗传物质的新组合, 并使之参入到原先没有这类分子的寄主细胞内, 而能持续稳定地繁殖和遗传^[2], 其主要内容包括目的 DNA 片段的分离、表达载体的构建、植物受体的遗传转化及转化子的筛选和鉴定等四个主要步骤, 最终使目的基因在新的遗传背景下实现功能表达。通过基因工程技术培育出的作物称为基因工程作物, 它将成为解决 21 世纪食物保证的重要措施之一。甘蔗是最重要的糖料作物, 约占世界产糖量的 65%^[3], 占我国产糖量的 85% 以上, 同时, 甘蔗也是生产糖醛、葡聚糖和绿色能源乙醇的原料, 一些天然的药用化合物也来自甘蔗^[4]。此外, 蔗糖生产过程的农业和工业副产物正被大量用作动物营养、造纸和燃料等。传统育种从有性杂交到良种的育成约需 10~13 年的选择过程, 而且, 在育种的后期还可能因某一性状缺陷, 如抗病性差而难以在栽培上应用。采用传统育种途径(如回交)改造现有品种的某一不足是不易实现的, 这是由于栽培品种的遗传复杂性以及选择过程的长期性所造成的, 基因工程正可弥补这些方面的不足。基因工程在现有甘蔗品种改良及创造新的育种材

料方面有其不可替代的作用。遗传转化是基因工程作物得以实现的不可缺少的步骤,而植物的组织培养技术及其离体再生系统是遗传转化成功的前提。尽管甘蔗原生质体再生困难且只是局限在个别基因型上^[5,6],但这并未成为基因工程技术在甘蔗上应用的瓶颈,因为甘蔗的组织培养技术及其离体再生系统极其成熟,并且,对于几乎所有的甘蔗基因型都是普遍适用的,加上甘蔗是无性繁殖的作物,因而,特别适用于利用基因工程技术培育转基因甘蔗。现在,已明确任何来源的基因均可加以修饰以便在植物中表达,这使基因工程成为甘蔗改良的一种强有力的辅助手段,包括把优越的有用基因(如抗病虫基因)导入甘蔗;把已知的有害基因灭活(如灭活使纤维含量高的木质化基因);分子启动仅在某种状态所需的基因(如高产而不开花的商业品种在需要时,启动开花诱导基因以便作为亲本);改变现有基因,修饰表达的模式或表达产物(如改变酶的表达模式,减少蔗糖从贮藏组织中再转移出来或改变酶的性质以促进蔗糖合成)。因此,转基因甘蔗将可能重塑甘蔗产业,拓展工业的领域。

2 甘蔗遗传转化方法及成效

2.1 遗传转化方法

甘蔗遗传转化的方法有:电穿孔法、基因枪法和农杆菌介导法。电穿孔法是以原生质体和完整细胞为受体,原生质体虽然是遗传转化过程中外源 DNA 的理想受体^[7],但已证明从原生质体难以再生出转基因甘蔗植株,尽管可以获得外源基因整合及稳定表达的愈伤组织细胞^[8~10]。基因枪法是以完整细胞和组织为受体,克服了原生质体培养和再生困难的障碍,将 DNA 包被的颗粒在真空条件下加速后轰击细胞或组织,直接导入受体细胞或组织,经筛选后存活下来,表达导入的基因。该法操作简便、无基因型专一性,且可同时用几个质粒,是目前甘蔗等单子叶植物遗传转化的首选方法。其关键在于:外源 DNA 被转移进那些有体细胞胚发生能力的细胞,但不能伤害该组织,以避免体细胞胚发生能力的下降。绝大多数基因工程甘蔗的培育是采用该法。

农杆菌介导的转化是以完整细胞、组织或器官为受体,该系统在双子叶植物上的应用极为成功,在甘蔗等单子叶植物上也有成功的应用^[11~13]。采用乙酰丁香酮等酚类化合物处理农杆菌以诱导 Vir 基因的表达、筛选农杆菌菌株,以及从特定的发育时期等途径寻找、诱导或富集感受态细胞等,以提高农杆菌转化的效率,其关键在于对感受态细胞形成机理的认识。

2.2 表达载体构建所需的启动子和选择标记

目的基因在受体细胞中的稳定整合和表达,需借助植物表达载体来实现。启动子是决定外源基因在受体植物中表达与否的关键因子。目前在双子叶植物中广泛采用的强组成型启动子 CaMV35S 在基因工程甘蔗上表达调控强度远低于水稻 Actin1 基因启动子、Emu 基因启动子和玉米 Ubi1 基因启动子^[14,15]。在小麦上还发现不同启动子串联后,也可促进外源基因的表达^[16];此外,在表达载体中加入内含子(Intron)和增强子(Enhancer)也可起到增强外源基因表达的作用^[14,16]。对于有些基因来说,持续的强表达是有利的,这种基因可采用强组成型启动子进行调控;对很多基因来说,外源目的基因的时空特异性高效

表达是人们追求的目标。调控这类基因的启动子应选择组织专一性的或诱导型的, 这样既能达到预期的目的, 又不过分消耗能量。遗憾的是, 目前这类启动子还很缺乏。从甘蔗中发现和分离这类启动子是困难的, 这是由于甘蔗基因组的庞大和高度杂合性所致。在甘蔗上, 已发现几个类似启动子的区域, 但当它与报告基因相连并导入甘蔗后, 未表现活性或沉默^[17], 但是 Tang 等^[18]的研究表明, 甘蔗小亚基 Rubisco 基因的启动子是一种组织专一性启动子, 能启动 GUS 基因在幼嫩植株叶片光合组织中稳定表达。

选择标记是决定转化体筛选效率的关键因子。迄今, 已在甘蔗上采用的选择标记有 NPT II 基因、HPT 基因、GFP 基因和 BAR 基因。由于甘蔗对卡那霉素 (Kanamycin) 有较高的天然抗性 (可高达 350mg/L), 且在 Kan 选择压力下, 易产生白化苗^[15,19,20], 因而, NPT II 基因并非明智的选择; HPT 基因可编码抗潮霉素 (Hygromycin) 的产物, 甘蔗对其较为敏感, 是一种较好的筛选标记; GFP 基因编码的产物呈绿色, 可通过肉眼判定; BAR 基因编码的产物 PAT 可提供对除草剂 Basta 或 PPT (膦丝菌素) 或 bialaphos 的抗性, 甘蔗对其敏感、临界致死浓度为 4mg/L PPT 或 25g/L Basta, 是一种较为理想的筛选标记, 同时, 它又具有抗除草剂的农业用途, 且已建立起一种快速的用于筛选 PPT 抗性的离体叶片检测法^[21]。

3 基因工程甘蔗的成就

自 1987 年以原生质体为受体, 首次进行了甘蔗遗传转化的尝试^[8], 10 多年来, 研究者已培育出许多基因工程甘蔗, 其主要成就见下表 1。由表可知, 目前在甘蔗上应用的有农艺重要性的基因有抗除草剂的 BAR 基因和 CP4 EPSPS 基因、抗甘蔗花叶病毒病的 SCMV-CP 基因、抗甘蔗斐济 (fiji) 病毒病的 fijivirus CP (SCFJV-CP) 基因、抗虫的蛋白酶基因及 Bt 基因等 4 类, 已成功培育出转基因甘蔗的转化方法有电穿孔法、基因枪法和农杆菌介导法等 3 种, 所采用的受体类型包括完整细胞 (悬浮培养细胞)、胚性愈伤组织和分生组织, 以原生质体为受体的甘蔗遗传转化虽已被多次尝试过, 但均未能再生出转基因植株, 仅停留在瞬间表达或稳定表达的抗性细胞系上。

表 1 基因工程甘蔗进展一览表

Gene-transformed	Receptor	Method of transformation	Result	References
GUS	callus, suspension cell	biolistics	transgenic plant	Bower <i>et al.</i> ^[22] ; Bower ^[23]
GUS	cell suspension, embryogenic calli	biolistics	transient expression	Franks ^[24]
GUS	Intact cell	electroporation	transgenic plant	Arencibia ^[25]
SCMV-CP	meristem, embryogenic calli	biolistics	transgenic plant	Smith ^[26] ; Joyce ^[27]
SCMV-CP	protoplast	electroporation	transient expression	Smith ^[28]
BAR	protoplast, cell suspension	electroporation	Stable expression in callus	Chowdhury ^[10]
BAR	embryogenic calli	biolistics	transgenic plant	Gallo-Meagher ^[29] ; Falco ^[30]
BAR	cell suspension	biolistics	transgenic plant	Sun ^[19]
BAR	meristem	<i>Agrobacterium</i> -mediated	transgenic plant	Enriquez-Obregon ^[31]
Bt	Intact cell	electroporation	transgenic plant	Arencibia ^[32]
Bt	embryogenic calli	<i>Agrobacterium</i> -mediated	transgenic plant	Arencibia ^[33]
CryIA (b)	embryogenic calli	electroporation	transgenic plant	Arencibia ^[18]
GFP	embryogenic calli	biolistics	transgenic plant	Bower ^[23]

(续)

Gene-transformed	Receptor	Method of transformation	Result	References
GFP	embryogenic calli	<i>Agrobacterium</i> -mediated	transgenic plant	Elliott ^[12]
Proteinase inhibitor II	embryogenic calli	biolistics	transgenic plant	Nutt ^[34]
CP4-EPSPS	embryogenic calli	biolistics	transgenic plant	Eugenio ^[35]
SCFJV-CP	embryogenic calli	biolistics	no report	Smith ^[36]

4 工程甘蔗的前景

甘蔗是一个复杂的多细胞有机体，是成千上万基因调控表达的产物。目前的遗传转化技术，只允许一次导入1个或少数几个基因，尽管单个主效基因的分离和操作将给甘蔗业带来革新，但是，许多重要农艺性状的遗传是由多基因控制的数量性状，而且，即便是单基因控制的性状，目前对其生理基础的了解也只是初步的，对其调控表达的分子机理更是知之甚少。所以，认识到遗传转化在甘蔗品种改良中不可能替代传统的育种，而只是它的补充，这点是重要的。此外，甘蔗在离体培养的过程中，还可能发生变异，这些变异常常又是不利的，所以，尽可能减少离体培养的时间，对于获得除待改良性状外，其他性状保持与供体相似或相同的个体是有益的。RAPD分析证实来自原生质体的愈伤组织发生显著的遗传变化，但是，愈伤组织的后代几乎没有发生变化，与离体培养的时间和培养条件有关，因此，遗传转化不失为一种甘蔗品种改良的有效途径。同时，该技术还有利于增进对基因表达调控生理基础和分子机理的了解，从而揭示可作为修饰的目的基因。未来的甘蔗基因工程研究或许可从以下几方面进行尝试。

4.1 性状改良

4.1.1 抗病性改良 甘蔗病毒病是甘蔗上的一大类主要病害，采用从病毒本身来源的基因的抗病毒病策略已在多种植物上得以证实，转SCMV-CP基因的甘蔗也证明了这一点。用于抗病毒病的基因包括病毒外壳蛋白基因（正义或反义）、病毒基因组反义序列、卫星RNA、病毒复制酶等^[37]，成功的报道大多是单链RNA病毒。控制细菌和真菌性病害可用的基因包括：①编码抗微生物蛋白的基因如编码几丁质酶、 β -1,3-半乳糖苷酶（ β -1,3-glucanase）^[38,39]，内源性抗菌肽^[40]和核糖体抑制蛋白^[41]，已在多种植物上发现了抗微生物蛋白。②表达产物能使致病因子失活的基因，如编码甘蔗白条病（*Xanthomona albilineans*）病菌毒素 albicidin 降解酶的基因导入甘蔗后，病害症状减轻。③表达产物能杀死植物细胞的基因，其作用原理已在马铃薯中得以证实^[42]。④编码产生抗毒素的基因或能提高其毒性的基因。

4.1.2 抗虫性改良 除Bt基因和胰蛋白酶基因外，还可以尝试其他与抗虫性有关的基因。

4.2 代谢途径改进

甘蔗糖分的提高是糖料甘蔗育种的主要目标之一，迄今，尚无直接针对培育代谢改变以提高糖分积累的基因工程甘蔗。有效的代谢操作首先必须拥有器官或组织细胞专一性表达的启动子，在适当的环境下、在特定的发育时期表达。已克隆测序了甘蔗小亚基Rubisco

(rbcs) 基因, 用该启动子与报告基因相连, 导入甘蔗后, 该启动子使外源基因在叶片中专一性表达, 并优先在维管束鞘细胞中表达, 采用水稻 rbcs 小亚基启动子在转基因甘蔗上也观察到相同的表达模式^[43], 在进一步明了甘蔗糖分积累及代谢中起关键作用的酶后, 构建其反义或正义基因, 通过遗传转化培育出具有反义或正义基因的基因工程甘蔗有可能克服蔗糖积累的生理生化局限。

不论是抗逆性状的改良还是代谢过程的操作, 都必须在对有关基因表达产物进一步了解的基础上, 才有可能对其进行克隆并用于性状的分子改良。此外, 还要进一步加强组织专一性启动子或器官专一性启动子的分离, 只有这样, 方有可能按照人们的意愿对某一性状进行遗传操作。目前, 用于甘蔗转化的具有农艺重要性的基因只有几个。在转化方法上, 应该说已初步建立起利用基因枪法转化甘蔗的技术, 电穿孔法和农杆菌介导的甘蔗转化也有几个成功的事例, 但是, 高效、可重复地稳定表达外源基因的转化体系的建立仍是今后研究的一个方向, 尤其是农杆菌介导的甘蔗转化技术。目前已报道的利用该技术成功培育出基因工程甘蔗的仅有 3 例, 且局限于古巴和澳大利亚。由于农杆菌介导技术设备要求简单、费用低, 且通常只会整合单个或少数拷贝的外源基因, 因而, 很少会有甲基化和基因沉默现象 (Silencing) 发生, 是未来的主要研究方向。由于甘蔗遗传背景的异源多倍性和高度杂合性, 建立高效、稳定的甘蔗遗传转化技术仍是目前最关键的技术。除外, 基因分离技术的进步也是制约基因工程甘蔗培育的主要因素。

参考文献

- [1] QIAN YQ (钱迎倩), WEI W (魏伟), TIAN Y (田彦) *et al.* Application and potential problems of transgenic crops. *Chinese Journal Application Environment Biology* (应用与环境生物学报), 1999, 6: 427~433
- [2] WU N H (吴乃虎). Principle of genetic engineering (基因工程原理), 2nd ed (upper volume), Beijing: Science Press, 1998
- [3] Agra Europe. Sugar cane expected to be main supply of world sugar production in 1994/5, Agra Europe. January 20, p7 (abstracts)
- [4] Menendez R, Fernandez S. I, Del-Rio A *et al.* Policosand inhibits chdesterol biosynthesis and enhances low density lipoprotein processing in cultured human fibroblasts. *Biology Reasarch*, 1994, 27: 199~203
- [5] Srinivasan C, Vasil I K. Plant regeneration from protoplasts of sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Journal Plant Physiology*, 1986, 126: 41~48
- [6] Taylor P W J, Ko H L, Adkins S W *et al.* Establishment of embryogenic callus and high protoplasts yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1992, 28: 69~78
- [7] Malhotra S D. Biotechnology and Sugarcane. *Sugar Cane*, 1994, (3): 2~4
- [8] Chen W H, Cartland K M A. Davey M R *et al.* Transformation of sugarcane protoplasts by direct uptake of a selectable chimaeric gene. *Plant Cell Report*, 1987, 6: 297~301
- [9] Nand L, Lal N. Transforming sugarcane plants through gene delivery. *Bharatiya Sugar*, 1991, 16 (6): 59~60
- [10] Chowdhury M K U, Vasil I K. Stably transformed herbicide resistant callus of sugarcane via microprojec-

- tile bombardment of cell suspension and electroporation of protoplasts. *Plant Cell Report*, 1992, 11: 494~498
- [11] Hiei Y, Ohta S, Komari T *et al.* Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*. 1994. 6: 271~282
- [12] Elliott A R, Campbell J A, Brettel. R I S *et al.* *Agrobacterium* mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. *Plant Physiology*, 1998, 26: 739~743
- [13] Ishida Y, Saito H, Ohta S *et al.* High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology*, 1996, 4: 745~750
- [14] Rathus C, Birch R G. Effects of promoter, intron and enhancer elements on transient gene expression in sugarcane and carrot protoplasts. *Plant Molecular Biology*, 1993, 23: 613~618
- [15] Irvine J E. Genetic transformation of sugarcane and its potentials. *Proceeding ISSCT Congress, Columbia*, 1995, LV-LX VII
- [16] Shigeo T. Effect of six promoter-intron combinations on transient reporter gene expression in Einkorn, emmer and common wheat cells by particle bombardment. *Plant Science*, 1994, 103: 161~166
- [17] Birch P G, Bower R, Elliott A R *et al.* Expression of foreign genes in sugarcane, *proceeding ISSCT X VII Congress, Columbia*, 1995, 2: 368~373
- [18] Arencibia A D, Carmona E R, Comide M T *et al.* Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane plants produced by cell electroporation. *Transgenic Research*, 1999, 8: 349~360
- [19] Sun S S M, Maretzki A, Nagai C *et al.* Transformation of *Saccharum spontaneum* by particle bombardment. *Sugar Cane*, 1993, (5): 1~8
- [20] LIN J H (林俊芳), ZHANG Y D (张银东), CHEN R K (陈如凯) *et al.* Transgenic albino sugarcane seedlings obtained by transformation of embryogenic callus via microprojectile bombardment. *Journal of Fujian Agricultural University* (福建农业大学学报), 1997, 26: 18~23
- [21] Wang M B, Waterhouse P M. A rapid and simple method of assaying plants transformed with Hygromycin or PPT resistance genes. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1997, 16: 209~215
- [22] Bower R, Birch R G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *Plant Journal*, 1992, 2: 409~416
- [23] Bower R, Elliot A R, Potier B A M *et al.* High-efficiency microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane using visible of selectable markers. *Molecular Breeding*, 1996, 2: 239~249
- [24] Franks T, Birch R G. Gene transfer into intact sugarcane cells using microprojectile bombardment. *Australian Journal Plant Physiology*, 1991, 18: 471~480
- [25] Arencibia A, Molina P R, de la Rjva G *et al.* Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum*) plants by intact cell electroporation. *Plant Cell Report*, 1995, 14: 305~309
- [26] Smith G R, Gambley R L. Progress in development of a sugarcane meristem transformation system and production of SCMV-resistant transgenics, *Sugar Cane*, 1994, (6): 22 (Abstracts only)
- [27] Joyce P. Gene Research in targeting mosaic. *Sugar Cane*, 1997, (3): 25
- [28] Smith G R, Ford R, Frenkel M J *et al.* Transient expression of the coat protein of sugarcane mosaic virus in sugarcane protoplasts and expression in *Escherichia coli*. *Archives of Virology*, 1992, 125: 15~23
- [29] Callo-Meagher M, Irvine J M. Herbicide resistant transgenic sugarcane plant containing the bar gene, *Crop Science*, 1996, 36: 1367~1374
- [30] Falco M C. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane, *Plant Cell Reports*, 2000, 19 (12): 301~304

- [31] Enriquez-Obregon G A, Vazquez-Padron R I, Prieto-Samsonov D L *et al.* Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Planta*, 1998, 206: 20~27
- [32] Arencibia A, Vazquez R, Prieto D *et al.* Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. *Molecular Breeding*, 1997, 3: 247~255
- [33] Arencibia A, Carmona E, Tellez P *et al.* An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research*, 1998, 7: 213~222
- [34] Nutt K A, Allsopp P G, McGhie T K *et al.* Transgenic sugarcane with increased resistance to cane-grubs, Proceedings of the 1999 Conference of the Australian Society of Sugar Cane Technologists, 1999, pp. 171~176
- [35] Eugenio C U, Daniella P V B, Paul B L *et al.* Transgenic sugarcane plants for RoundupTM obtained through microprojectile bombardment, Town & Country Hotel, San Diego, CA, 2000, January 9~12
- [36] Smith G R, Joyce P A, Handley J A *et al.* Genetically engineering resistance to sugarcane mosaic and fiji disease viruses in sugarcane, Sugar 2000 Symposium Sugarcane research towards efficient and sustainable production, 1996, pp. 138~140
- [37] Grumet R. Development of virus resistant plants via genetic engineering. *Plant Breeding Reviews*, 1995, 12: 47~49
- [38] Zhu Q, Maher E, Mascud S *et al.* Enhanced protection against fungal attack by constitutive coexpression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio-Technology*, 1994, 12: 807~812
- [39] GAO B D (高必达). Strategy of chitinase gene transfer for plant disease control: progress, problems and prospect. *Progress in Biotechnology* (生物工程进展), 1999, 19 (2): 21~28
- [40] Terras F R G, Eggermont K, Kovaleva V *et al.* Small cysteine-rich antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) their role in defence. *Plant Cell*, 1995, 7: 573~588
- [41] Logemann J, Jach G, Tommerup H *et al.* Expression of a ribosome inactivating protein (RIP) leads to fungal resistance in transgenic tobacco plants. *Bio-Technology*, 1992, 10: 305~308
- [42] Strittmater G, Janssens J, Opsomer C *et al.* Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. *Bio-Technology*, 1995, 13: 1085~1089
- [43] Moore P H, Botha F C, Furbank R. T *et al.* Potential for overcoming physio-biochemical limits to sucrose accumulation, In: Keating BA and Wilson J R edited, Intensive Sugarcane production meeting the challenge beyond 2000, Published in UK, Biddles Ltd, Guildford and King's Lynn, 1997, pp. 141~155

(本文发表于《生物工程学报》2001年17卷4期)

甘蔗遗传转化的研究进展

许莉萍 陈如凯

(福建农业大学作物科学学院, 福州 350002)

摘 要 综述了 10 年来 PEG、电击、基因枪和农杆菌介导的方法应用于甘蔗遗传转化研究取得的进展, 并对影响甘蔗遗传转化效率的因素和今后的研究方向进行评述和探讨。

关键词 甘蔗; 遗传转化; 进展

植物遗传转化是植物基因工程中最关键的步骤之一。它可避免有性过程, 克服任何杂交障碍, 使基因在生物间相互转移成为可能, 也是分子生物技术最终应用于农业生产的手段, 因而成为生命科学研究热点。

传统的甘蔗育种依赖于亲本的有性杂交, 产生大量的实生苗群体, 从中经过长达 10 年以上的选择, 方有望育成 1 个良种(彭绍光, 1990)。同时, 在育种后期常因存在某一缺陷而难以在生产上应用。基因工程正可弥补这方面的不足。甘蔗遗传转化有 2 个目标: 一是导入某一性状以改良现有的品种; 二是把基因导入亲本材料以便在传统育种中应用。与其他禾本科作物相比, 甘蔗遗传转化研究进展缓慢, 除了由于甘蔗属单子叶植物不易被农杆菌侵染外, 更主要是由于甘蔗的高度杂合性、异源多倍性和非整倍体性以及具有的庞大染色体数目所造成的。

有效的体细胞离体培养及植株再生体系的建立是开展遗传转化研究的先决条件之一(Snyman et al, 1996; Taylor et al, 1993)。甘蔗是离体培养最早成功的作物之一, 并有许多有关这方面的报道(许莉萍等, 1997、1993; Faheem et al, 1996; Liu 1994; Chen et al, 1988a、1983; Ho et al, 1983; Heinz et al, 1971), 先后建立了组织和细胞水平的植株再生技术(Faheem et al, 1996; 许莉萍等, 1993; Taylor et al, 1993; Chen et al, 1988b; Ho et al, 1983), 为甘蔗外源 DNA 的导入提供了有效的受体系统; 并已建立起甘蔗原生质体的分离和培养体系(林俊芳等, 1996; Taylor et al, 1992a、1992b; Chen et al, 1983), 但其植株再生仍是困难的, 只局限在个别基因型上, 且不易重复(Taylor et al, 1993、1992b; Srinivasan et al, 1986)。关于甘蔗的遗传转化研究已有一些积累, 本文综述这方面的研究进展, 并对影响甘蔗遗传转化效率的因素进行评述。

1 甘蔗的转化体系及遗传转化

甘蔗遗传转化研究自 1987 年首次报道以来已有 10 年的历史, 所采用的转化方法有聚乙二醇 (PEG) 法、电击法、PEG/电击法、基因枪法和农杆菌介导的方法, 所用的受体系统有原生质体、细胞悬浮培养物、愈伤组织、分生组织和叶片。现分述如下:

1.1 以原生质体为受体的甘蔗遗传转化

原生质体是遗传转化过程中外源 DNA 的理想受体 (Malhotra 1994), 迄今, 甘蔗原生质体的分离和培养技术是成功的 (Malhotra, 1994; Taylor et al, 1992a、1992b; Chen et al, 1983; 何若天等, 1982), 但植株再生仍是困难的 (Taylor et al, 1993、1992b; Chen et al, 1988a)。Chen et al (1987) 首例报道的甘蔗遗传转化研究就是以原生质体为受体, 采用 PEG 法使原生质体直接吸收外源 DNA 而实现转化, 转化子表达 APH (3') 活性, 分子杂交检测到外源 DNA 的存在, 但未能从转化子再生植株。Nand-Lal et al (1991) 报道了 PEG 及电击法转化甘蔗原生质体, 导入 NPT 基因的研究, Southern 杂交和 NPT 酶活性分析证实了外源基因在愈伤组织细胞中的整合及稳定表达。第 1 例具有农艺重要性的基因在甘蔗转化研究上的尝试是由 Chowdhury et al (1992) 进行的, 采用电激法把 GUS 基因和抗除草剂 Basta (glufosinate) 的 bar 基因导入原生质体, Southern 杂交证实 bar 基因在抗性细胞系中的稳定表达。之后, Smith et al (1992) 把 SCMV-CP 基因分别与启动子 Ca MV35S 和 Emu 连接后电击转化甘蔗原生质体, 得到瞬间表达的转化子, 并以 Western 印迹得以证实; Rathus et al (1992b) 对电穿孔转化甘蔗原生质体的条件进行优化, 之后研究增强子、内显子和启动子对外源基因瞬间表达的效应 (Rathus et al, 1993)。尽管以原生质体为受体的遗传转化研究已有 10 年的历史, 并已取得一定的进展, 但由于甘蔗原生质体的再生本来就很难, 转化后的原生质体再生就更加困难, 因而, 迄今未能获得转基因的植株。

1.2 以完整细胞或组织为受体的甘蔗遗传转化

由于原生质体再生的困难及再生时间长的局限, 人们探索发展新的更为有效的转化体系。Klein et al (1987) 率先采用基因枪把外源 DNA 导入细胞, 同年 Sanford et al (1987) 也采用基因枪把外源 DNA 导入细胞和组织, 随着 1990 年商品基因枪 PDS-1000 系统的问世及外源基因转移技术的发展 (安韩冰等, 1992), 以完整细胞或组织为受体进行甘蔗遗传转化研究已成为可能。1990 年, 美国夏威夷的 Maretzki et al (1990) 率先进行基因枪法转化甘蔗的尝试, 把 GUS 基因导入愈伤组织得到瞬时表达。之后, 采用该法 Franks et al (1991) 把 GUS 基因导入甘蔗悬浮细胞和胚性愈伤组织得到瞬时表达; Chowdhury et al (1992) 把 GUS 和 bar 基因导入悬浮培养的细胞, 获得稳定表达的愈伤组织, Southern 杂交和 PAT 酶活性检测证实其存在。第 1 例甘蔗转基因植株的再生是由澳大利亚的 Bower et al (1992) 报道的, 通过基因枪法转化甘蔗品种 Pindar 的胚性愈伤组织, 在 Emu 启动子的调控下把 GUS 基因导入, 轰击后 16 周内获得转基因植株, ELISA 检测及 Southern 杂交证实了外源基因的稳定整合。之后, Smith et al (1994) 采用基因枪法把 GUS 和 SCMV-CP 基因导入甘蔗分生组织和愈伤组织, PCR 检测到再生植株中 SCMV-CP 基因的