

植物, 转基因技术, 物理转化法, 电激法, 超声波

农/科/天/地

三、物理方法

物理转化方法是基于许多物理因素对细胞膜的影响、或通过机械损伤直接将外源 DNA 导入细胞。它不仅能够以原生质体为受体, 还可以直接以植物细胞乃至组织、器官作为靶受体, 因此比化学法更具有广泛性和实用性。常用的物理方法有电激法、超声波法、激光微束导入法、显微注射法、基因枪轰击法以及正在发展中的低能离子束导入法等。

1. 电激法

电激法(也称电击穿孔法)是 80 年代初发展起来的一种遗传转化技术, 主要原理是利用高压电脉冲作用, 在原生质体膜上“电激穿孔”, 细胞膜上会出现短暂可逆性开放小孔, 为外源物质提供了通道, 藉此可以导入外源 DNA、RNA、蛋白质、病毒颗粒等多种生物大分子以及核苷酸和染料等多种小分子。此法在动物细胞中应用较早并取得很好效果。我国科学家李宝健等于 1985 年首次将其应用于植物细胞的转化, 现在这一方法已被广泛应用于各种单、双子叶植物中, 特别是在禾谷类作物中更有发展潜力。电激法除了同样具有 PEG 原生质体转化的优点外, 还具有操作简便, 转化效率较高、特别适于瞬时表达的特点。缺点是造成原生质体的损伤, 且仪器也较昂贵。近年来对电激法的应用又有新发展, 通过电激法直接在带壁的植物组织和细胞上打孔, 然后将外源基因直接导入植物细胞, 现已在水稻上获得转基因植株。使用该技术可以不制备原生质体, 提高了植物细胞的存活率, 而且简便易行。

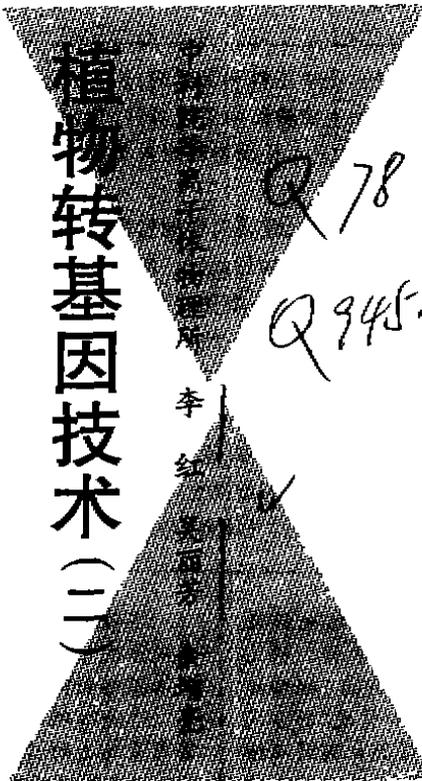
2. 超声波法

超声波法转基因的基本原理是利用低声强脉冲超声波的物理作用, 击穿细胞膜造成通道, 使外源 DNA 进入细胞。此转化途径可以避免脉冲高电压对细胞的损伤作用, 有利于原生质体存活, 目前被认为是一种有潜力的转化途径。超声波所特有的机械作用、热化作用和空化作用、穿透力大、在液体和固体中传播时衰减小、界面反射造成叶片组织受超声波作用的面积较大等特点, 可能是造成

高效短暂表达和稳定转化的重要原因, 这些特点使超声波转化具有下列优点: 操作简单, 设备便宜、不受宿主范围限制, 转化率高。与其它直接转化方法相比具有更大的应用潜力, 但该转化系统尚待进行更深入的研究, 使之完善。

3. 激光微束导入法

激光微束照射是近代科学发展的新兴技术, 并由此建立了激光生物学。激光微束法导入外源 DNA 的基本原理, 是利用激光微束精确的定向性和损伤小的特点, 将激光引入光学显微镜聚焦成微米



级的微束照射培养细胞后, 在细胞膜上可形成能自我愈合的小孔, 使加入细胞培养基里的外源 DNA 流入细胞, 实现基因的转移。激光导入法与其它转化系统相比具有以下特点: (1) 操作简便。整个导入过程能在较短的时间内完成; (2) 转移效率高。每分钟可操作 103 个细胞, 比人工的显微注射法效率提高 20 倍, 比化学法提高多个数量级, 但与电激法、基因枪轰击法相比转化效率还是低的, 在稳定性、安全性等方面也较差; (3) 无宿主限制, 可适用于各种动植物; (4) 对受体细胞正常的生命活动影响小; (5) 受体的

类型广泛; (6) 较常规的显微注射技术定位更准确, 可进行细胞器的基因转化; (7) 穿透力强, 深度方向可作调整。

4. 显微注射技术

显微注射法原理比较简明, 是利用显微注射仪或在显微镜下用特制的超微毛细管, 将少量的外源 DNA 注射到植物细胞或原生质体的细胞质或细胞核中。该技术在动物细胞或卵细胞的基因转化方面应用很多。植物细胞的显微注射近年来发展很快, 已经成为当今一个重要的植物基因工程的新途径。已发展出一套完整的技术, 在烟草、油菜、苜蓿等植物的原生质体转化率达 60% 以上。缺点是操作麻烦, 工作效率低, 每一次只注射一个细胞, 并依赖于原生质体或细胞的低密度培养技术, 对操作人员的操作经验要求较高, 转化过程中仍然有许多因素影响转化率, 多数实验的表达频率不稳定。

5. 基因枪轰击法

基因枪法又称微弹轰击法, 是用高速度的金属微粒将核酸分子引入活细胞中的一种遗传转化技术。它是继农杆菌介导转化法之后又一个最广泛应用的遗传转化技术。1987 年研制成功火药基因枪。此后, 研究人员从基因枪的转化效率和成本等方面考虑, 又相继推出了放电基因枪以及用其它动力驱动核酸分子与金属微粒的基因枪。基因枪技术的基本原理是利用火药爆炸、高压放电或高压气体作驱动力, 将载有外源 DNA 的钨(或金)等金属颗粒加速, 射击真空室中的靶细胞或组织, 从而达到将外源 DNA 分子导入靶细胞中的目的。基因枪转化技术将遗传转化技术推向了一个新高潮, 它具有的优点是: (1) 无宿主限制, 在许多农杆菌介导法难以成功的单子叶禾本科农作物中取得了一系列突破性进展; (2) 靶受体材料的类型广泛, PEG 介导法、脂质体介导法、电激法等都需要以原生质体作为受体材料, 不易培养再生, 培养周期长, 对植物基因型依赖性较强, 基因枪法可以选用易于再生的受体, 绕过了原生质体再生的困难; (3) 操作简便快速。基因枪转化技术也有其不足之处, 与

农作物, 耐热白菜, 选种, 育种
体细胞无性系变异, 科天, 地

体细胞无性系变异选育农作物新品种及耐热白菜的选育

33

安徽省农业科学院园艺研究所 袁华玲

S188
S330

一、体细胞无性系变异育种技术

植物组织与细胞培养技术的发展, 已能使近千种植物的组织、细胞或原生质体, 经过离体培养再生成完整植株。80年代以来, 大量的试验研究资料表明, 由组织培养物再生出的植株中存在着广泛的变异, 在甘蔗、马铃薯、水稻、小麦、大麦、大豆等重要经济作物中都观察到这种现象, 这种组织培养再生植株中出现的变异被称为体细胞无性系变异。无性系变异是多种多样的, 在再生植株中可以找到常规诱变育种和杂交育种中所观察到的各种变异或重组类型, 为育种家的选择提供了各种可能性。近年来, 体细胞无性系变异现象已用于多种植物的改良, 发展成为一种细胞工程育种的新方法——体细胞无性系变异育种。这种育

6. 低能离子束介导法

这种技术的原理是利用离子束对植物细胞壁的溅射和刻蚀作用, 造成受体植物细胞表面可修复的损伤和穿孔, 形成许多微通道, 为外源基因进入细胞提供了路径; 离子束带有正电荷, 引起细胞膜透性和跨膜电场的改变, 并在微通道内形成正电性, 有利于吸引带负电的 DNA 分子进入细胞; 离子束对细胞内遗传物质造成可修复的损伤, 增加了外源基因连接到细胞染色体中去的机率。离子束介导转基因的主要优点是成熟胚为材料, 不受季节限制, 不需要复杂的原生质体培养技术; 操作方便, 可同时大批量处理; 离子束具有高度集束性和方向性, 能量和射程可控性强。缺点是转化效率较低, 外源基因进入细胞不稳定性较高。

种方法和其它育种方法相比, 有如下一些特点: (1) 体细胞无性系变异育种可以在保持优良品种基本特性不变的情况下改进个别的农艺性状, 实现良种改良的目标。(2) 体细胞无性系变异具有稳定快的特点, 使得体细胞无性系变异育种比常规育种时间短。(3) 利用体细胞无性系变异现象可以在培养过程中加入选择压力, 筛选出特定的细胞突变体及再生植株, 这是细胞工程育种研究中一个十分活跃的领域。安徽省农科院园艺研究所的科研人员, 在耐热白菜新品种的选育过程中, 利用体细胞无性系变异育种的这些特点, 达到了预期目标。

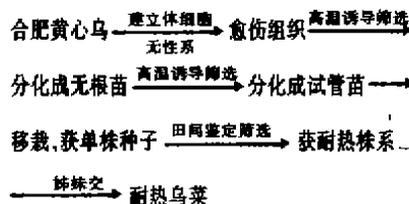
二、耐热白菜选育的主要程序

1. 白菜体细胞无性系的建立

以白菜优良地方品种合肥黄心乌为材料, 种子消毒后播于 1/2MS 培养基上, 生成无菌苗后切取无菌苗下胚轴置于含 2, 4-D 的培养基上诱导生成浅绿色愈伤组织, 愈伤组织在不含 2, 4-D 的分化培养基上诱导生成芽丛, 2 周左右继代培养一次, 无根苗在含有 IAA 的生根培养基中分化成完整植株。

2. 诱导和筛选白菜耐热突变体

下胚轴培养过程中, 出现浅绿色愈伤组织即将其移入温度为 30~32℃ 的培养环境中, 很多愈伤组织一周内颜色发暗, 绿苗分化率很低。分化出的无根苗继续高温筛选, 在 35~40℃ 条件下, 经不同时间的连续和间歇处理, 恢复至适宜培养温度 26±2℃。经高温诱导和筛选生成的无根苗诱导生根后, 炼苗移栽, 观察其性状, 单株收获种子。其整个选育程序为:



3. 耐热株系的田间鉴定和筛选

将实验室筛选的耐热单株在田间进行连续鉴定和筛选, 得到 4 个典型株系, 生产用种为 4 个株系姊妹系间杂交, 有明显的杂交优势, 表现为耐热、生长快、抗性强。夏秋反季节栽培能形成“棵菜”, 而原亲本合肥黄心乌在高温下大批夭折死亡。

三、耐热白菜选育的意义

环境因子胁迫是造成蔬菜产量和品质下降的重要因素, 其中以温度逆境的影响最大。由于近年来塑料大棚、日光温室等保护地栽培生产的发展, 冬季蔬菜的供需矛盾趋于缓和, 高温胁迫对蔬菜生产的影响, 造成蔬菜产量和品质下降愈加显著, 从而使夏淡蔬菜供需矛盾日益突出。鉴于上述情况, 亚太地区的育种家率先开展耐热白菜品种的选育工作, 取得了初步成效, 选育了以“夏阳”为代表的耐热大白菜系列品种。

白菜是不结球白菜类中的一个特殊品种群, 为江淮地区的特产蔬菜, 也是江淮地区冬春季的当家蔬菜, 性喜冷凉, 对温度较敏感, 遇高温品质劣变生长受阻, 从而限制了白菜的种植季节和区域。随着人民生活水平的提高, 人们对蔬菜提出了“周年生产, 均衡供应”的需求, 希望白菜的种植区域更广泛, 供应时间更长, 为此我们通过定向诱导和筛选, 经体细胞无性系变异途径选育了耐热白菜新品种, 该品种生长快, 株型大、抗性强, 能提前至夏秋栽培, 已于 1996 年通过省品种审定委员会认定推广。

安徽省农科院园艺研究所进行的此项研究系生物技术和常规育种相结合, 为国内首例利用体细胞无性系变异定向选育的耐热蔬菜品种, 不仅在理论研究上具有一定的学术价值, 而且育成的品种对填补夏秋叶菜类蔬菜市场供应短缺具有实际意义。