植物学通报 2001，18（3）：283～287
Chinese Bulletin of Botany

基因枪法在水稻工程育种中的应用①

黄大年 高振宇 华志华 汪晓玲 薛 锐
（中国水稻研究所农业部水稻生物学重点实验室 杭州 310006）

摘要 至今，基因枪法以其实用性和有效性应用于水稻工程育种已有十几年。本文阐述了其在水稻工程育种的六个主要领域的应用现状，同时评价了外源基因在转基因水稻中的稳定性和对转基因水稻主要农艺性状的影响。当然，基因枪法的转化效率还有待提高，随着转不同基因的工程水稻的日益增多，进一步的安全性试验显得十分必要，它是转基因水稻商品化的前提。

关键词 基因枪法，水稻工程育种，外源基因，生物安全性

Application of Biolistics in Rice Engineering Breeding

HUANG Da-Nian GAO Zhen-Yu HUA Zhi-Hua WANG Xiao-Ling XUE Rui
（*Key Laboratory for Rice Biology of Agriculture Ministry*，*China National Rice Research Institute*，Hangzhou 310006）

Abstract Biolistics，by virtue of its overwhelming practicality and effectiveness，has been applied in rice engineering breeding for a dozen years. Its application in six major fields of rice engineering breeding is described. The stability and influence of exogenes are evaluated. Certainly transformation systems are to be optimized and further tests for biosafety are required for commercialization of transgenic rice.

Key words Biolistics，Rice engineering breeding，Exogenes，Biosafety

基因枪法又称生物弹法或微粒轰击法，它是现今主要的遗传转化手段之一。自八十年代后期以来，它已在细菌、真菌、藻类、高等植物和动物中得到了广泛应用（Sanford *et al*，1987）。其基本工作原理即包被外源基因的金粉或钨粉颗粒通过基因枪高速轰击组织或细胞，使外源基因整合到细胞基因组内进行复制和表达（Takeuchi *et al*，1992）。基因枪分为火药式、放电式、气动式三类，后两类在目前使用频率较高（Christou，1996）。

1 基因枪法转化水稻的历史

水稻是世界上主要的粮食作物之一，高产优质的工程水稻近年来逐渐为各国政府所重视。基因枪法以其品种局限性小、无需原生质体再生过程、受体材料多样和可重复性等优点，在水稻的遗传转化中具有广泛的应用前景。自 1988 年 Wang 等采用基因枪法成功转化水稻悬浮细胞以来，一系列受体材料的含不同外源基因的转基因工程水稻相继问世（见表 1）。

---

① 作者简介：黄大年，男，1938 年出生，1962 年武汉大学生物系毕业，1962～1983 年中国科学院遗传研究所任助理研究员，1984 年进入中国水稻研究所，现任中国水稻研究所研究员，兼任生物工程系主任。中国生物化学和分子生物学会理事，中国农业生物技术学会理事，浙江省生物化学和分子生物学会副理事长，浙江省生物工程会理事。在国内外一级刊物发表论文数篇。曾应用基因枪将抗菌肽 B 基因导入水稻并进行了转基因水稻植株的鉴定，1997 年成功地将抗除草剂基因转入水稻，从而提高了杂交稻纯度和检测速度。
收稿日期：2000-04-11 接受日期：2000-07-28 责任编辑：刘 晖

2 基因枪法在水稻工程育种中的应用

2.1 抗除草剂

抗除草剂是基因工程最早涉及的领域之一,也是基因枪法成功获得转基因工程水稻报道最多的。用编码草丁膦乙酰转移酶(PAT)的 *bar* 基因和编码 5-烯醇丙酮酰草酸-3-磷酸合成酶(EPSPS)的 *cp4* 基因是基因枪法得到抗除草剂工程水稻的两大主要原料,已将它们分别导入水稻产生了抗两大除草剂草丁膦(phosphinothricin)和草甘膦(glyphosate)的转基因植株(Cao *et al*,1992;Barry *et al*,1992;于志华等,1996)。

表 1 基因枪法转化水稻获得转基因工程植株

受体材料	外源基因	作者	年份
悬浮细胞	*uidA*, *cat*	Wang et al.	1988
未成熟胚	*uidA*, *bar*, *hph*	Christou et al.	1991
悬浮细胞	*bar*	Cao et al.	1992
未成熟胚	*uidA*, *hmr*	Cooley et al.	1995
未成熟胚	*cry IA*(*b*)	Wünn et al.	1996
悬浮细胞	*uidA*, *hph*	Zhang et al.	1996
悬浮细胞	*uidA*, *Pin2*, *lea3*	Jain et al.	1996
悬浮细胞	*HVA1*	Xu et al.	1996
未成熟胚	*bar*, *cecropin B*	黄大年等	1997
未成熟胚,愈伤组织	*GNA*	傅向东等	1997
未成熟胚	*bar*	黄大年等	1998
未成熟胚,成熟胚,愈伤组织	*hph*, *nptII*, *SS*	田文忠等	1998
悬浮细胞	*bar*, *ps9*	薛庆中等	1999

2.2 抗虫

基因枪法对水稻抗虫基因工程的发展起了有力的推动。二化螟和三化螟是水稻生产中的两大害虫,如今,通过基因枪法已将编码鳞翅目昆虫特异-内毒素的 *Bt* 基因转入籼稻品种 IR58,使 R_0,R_1 和 R_2 代植株对两害虫均表现显著的抗性(Wünn *et al*,1996)。马铃薯蛋白酶抑制因子(pinII)基因也被导入粳稻胚性悬浮细胞,据报道已经获得了稳定遗传的抗稻纵卷叶螟的转基因株系(Duan *et al*,1996)。稻飞虱对水稻的危害在我国及东南亚一些国家十分严重,我国科学家运用基因枪法这一基因工程技术已成功地将雪莲凝集素(GNA)基因整合到几个籼稻和粳稻品种的基因组,并得到一定程度的表达(傅向东等,1997)。

2.3 抗病

水稻抗病包括抗病毒、抗细菌和抗真菌病。在抗病毒方面,病毒外壳蛋白基因(cp)起了重要作用。水稻条纹叶枯病毒 cp 和水稻齿裂矮缩病毒 ps9 已相继应用基因枪法导入水稻悬浮细胞,转基因植株表现出一定的抗性(燕义唐等,1992;薛庆中等,1999)。

昆虫蛋白已被广泛用于水稻细菌病抗性的获得。天蚕抗菌肽 B(cecropin B)基因转化水稻幼胚的研究显示,转基因植株对水稻白叶枯病和细条病的抗性有不同程度的提高(黄大年等,1997;简玉瑜等,1997)。野生稻中克隆的 *Xa21* 基因也被用来轰击不同水稻品种

http://www.plantsci.com.cn

以增强它们的白叶枯病抗性。

抗真菌方面，曾用基因枪法转化了水稻 6 个材料的未成熟胚、成熟胚和胚性愈伤组织，转化质粒含有编码芪类合成酶的葡萄抗毒素（Phytoalexin）基因（田文忠等，1998）。初步结果表明，该基因可提高转基因植株及其后代对稻瘟病的抗性。

2.4　抗逆

大麦的胚胎发育后期蛋白（LEA）基因和山菠菜的甜菜碱醛脱氢酶（BADH）基因分别经基因枪法转入粳稻的愈伤组织和幼胚细胞，再生出耐盐转基因植株（Xu *et al*，1996；郭岩等，1997），并且证明了基因表达量与耐盐性存在着正相关。

2.5　米质改良

腺苷二磷酸-葡萄糖焦磷酸化酶（AGP）是植物淀粉合成的关键酶，Okita 领导的实验室已采用基因枪技术将来自细菌和其它植物的 AGP 基因转入水稻，经统计分析转化体种子的重量有显著提高（高振宇和黄大年，1998）。糙米储藏过程中会发生酸败变质现象，研究发现它与水稻种子内的脂氧合酶（LOX）密切相关。该酶可使糠油水解生成不饱和脂肪酸，最终使糙米失去原有香味（Peng *et al*，1994）。通过基因枪法可将该酶的反义基因导入水稻，从而延长种子的保质期。其它如淀粉分支酶（SBE）基因和编码合成必需氨基酸的酶基因都可作为基因枪法的原料用以改善水稻的营养组成和口味（Larsson *et al*，1998）。

2.6　杂交稻制种

在杂交稻制种中，从细菌克隆的 RNA 酶基因 barnase 显示了威力。中科院华南植物所（凌定厚等，1998）将该基因与另一基因以基因枪介导共转化两粳稻品种，得到了工程雄性不育植株。全不育的转基因植株自交结实率为零，因此人工授粉便可获得杂交种子。

bar 基因作为一种遗传标记基因，已成为鉴别真伪杂交稻的良好指示剂。中国水稻研究所（黄大年等，1998；章善庆等，1998）于 1997 年成功地利用基因枪将 *bar* 基因导入两系或三系恢复系品种，并结合常规育种手段选育出具有抗除草剂特性的优良单株作为新恢复系，用此配制杂交组合。在秧苗期喷施除草剂 Basta 后，具有抗性的真杂交稻正常生长，而假杂交稻和杂草因不含 *bar* 基因被杀灭，从而提高了杂交稻制种纯度，检测方法方便快速。

3　外源基因对工程水稻主要农艺性状的影响

对 T_0 代转基因植株农艺性状的观察，外源基因对其影响有截然不同的两种结果。一些实验表明，绝大部分转基因水稻表现可育，结实正常（Zhang *et al*，1996；Jain *et al*，1996；于志华等，1996）。而有实验结果却不尽人意，发现转基因当代植株中存在诸如叶色、分蘖力和育性等的丰富变异。据分析育性丧失部分是由于悬浮细胞建立时间较长，但只要通过连续几代的筛选，完全可以挑选出农艺性状优良的转基因植株（黄大年等，1998）。

4　外源基因在转基因水稻后代中的遗传和表达

在 T_1 代中，外源基因分离比有符合孟德尔遗传规律的（Zhang *et al*，1996），也有不一致的，原因是后者插入了二拷贝或多拷贝基因（田文忠等，1998；朱冰等，1996）。多认为多拷贝插入与基因沉默有关（Dean，1997），但从我们的实验来看，并不尽然。

多数试验证明,外源基因可稳定遗传至高世代并予以表达。对转 *bar* 基因水稻植株的 PCR 和 Southern 杂交显示,T_0 及其后代的基因组中含有 *bar* 基因。田间试验也表明,除草剂抗性可稳定保持到 T_5、T_6 代,并证明了从 T_2 代可筛选得纯系(Huang *et al*,1997)。抗病性状也可在高世代表达,我们已在转基因 T_4 代中得到了抗病性较高的材料,同时观察到抗病性差的株系也能分离到抗病性提高的株系(华志华等,1999)。

5 展望

基因枪法作为工程水稻生产的有效手段,其转化频率还有待提高。这里的转化频率是指再生出转基因植株的受体数与轰击受体数的百分比。籼稻的转化频率一般不到 1%,粳稻高一些,但也只有 20% 左右,因此有必要对基因枪法进行优化。影响基因枪转化的因素较多,如轰击受体的材料和生理状态(Li *et al*,1993;薛锐等,1998;Jain *et al*,1996)、外源基因的纯度和浓度(Wang *et al*,1988;米庆莉等,1998)、质粒的构建(Li *et al*,1997)、微弹的材料(Ratnayaka and Oard,1995)、轰击次数(Wang *et al*,1988)等,找到这些因素的最佳组合,将有助于水稻特别是籼稻的转化效率的提高。当然,这项工作的完成需要大量实验数据和计算机分析系统的结合。

基因枪法转化水稻在生物安全性方面优于农杆菌法,因为它是一种物理学方法,不必担心农杆菌的污染。一些学者认为转基因可通过'基因漂移'传递给野生稻,继而转移到其它作物或杂草中(Keeler,1989;Arrila,1997),这种可能性不能说绝对不存在,但在我国野生稻主要分布在边远偏僻地区,所以这一问题显得不太突出。此外,通过多基因共转化水稻外源基因的分离,也可提高转基因植株的生物安全性(戴胜洪等,1998)。然而,距转基因工程水稻的商品化阶段尚有一段路程,还需进一步开展生化、生态和毒理试验,使之真正走向市场,为人类造福。

参 考 文 献

于志华, 陈敏勇, 顾红雅, 潘乃燧, 陈章良, 李岩, 1996. 抗除草剂旱稻转基因植株的获得. 北京大学学报(自然科学版), **32**:499 ~ 504

田文忠, 丁力, 曹守云, 戴顺洪, 叶松青, 李良才, 1998. 植物抗毒素转化水稻和转基因植株的生物鉴定. 植物学报, **40**: 803 ~ 808

华志华, 汪晓玲, 薛锐, 高振宇, 黄大年, 1999. Cecropin B 转基因水稻及其后代抗白叶枯病研究初报. 中国水稻科学, **13**:114 ~ 116

朱冰, 黄大年, 杨炜, 薛锐, 肖晗, 田文忠, 李良才, 戴顺洪, 1996. 利用基因枪法获得可遗传的抗除草剂转基因水稻植株. 中国农业科学. **29**: 15 ~ 20

米庆莉, 何锶洁, 曹守云, 李良才, 田文忠, 1998. 籼稻及粳稻对基因枪转化反应的差异及提高转化率的研究. 农业生物技术学报, **6**: 263 ~ 268

凌定厚, 陶利珍, 马震荣, Zhang S P, Datta S K, 1998. 以基因枪介导获转 ps1-barnase 基因的工程雄性不育水稻植株. 遗传学报, **25**: 433 ~ 442

郭岩, 张莉, 肖岗, 曹守云, 谷冬梅, 田文忠, 陈受宜, 1997. 甜菜碱醛脱氢酶基因在水稻中的表达及转基因植株的耐盐性研究. 中国科学(C 辑), **27**:151 ~ 155

高振宇, 黄大年, 1998. 植物中合成蔗糖和淀粉的关键酶 I. 腺苷二磷酸-葡萄糖焦磷酸化酶. 生命的化学, **18**: 26 ~ 29

章善庆, 童汉华, 薛锐, 华志华, 谢小波, 汪晓玲, 黄大年, 1998. 利用 *bar* 基因导入恢复系提高杂交稻纯度的尝试. 中国农业科学, **31**:33 ~ 37

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t20-048

黄大年, 朱冰, 杨炜, 薛锐, 肖晗, 田文忠, 李良才, 戴顺洪, 1997. 抗菌肽 B 基因导入水稻及转基因植株的鉴定. 中国科学(C 辑), **27**: 55 ~ 62

黄大年, 李敬阳, 章善庆, 薛锐, 杨炜, 华志华, 谢小波, 汪晓玲, 1998. 用抗除草剂基因快速检测和提高杂交稻纯度

的新技术. 科学通报, **43**: 67 ~ 70
傅向东, **李德葆**, Christou P, 1997. **雪莲凝集素**(GNA)**基因的载体构建及在水稻中的整合表达. 浙江农业大学学报**, **23**:730
简玉瑜, **吴新荣**, **莫豪葵**, 1997. **应用基因枪法将蚕抗菌肽基因导入水稻获得抗白叶枯病株系. 华南农业大学学报**, **18**:132 ~ 141
燕义唐, **王晋芳**, **邱并生**, 1992. **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. 植物学报**, **34**: 899 ~ 906
薛庆中, **张能义**, **赵彬**, **卢雄斌**, **龚祖埙**, 1999. **用基因枪将水稻齿裂矮缩病毒** Spike **蛋白** cDNA **转入水稻. 浙江农业大学学报**, **25**:243 ~ 244
薛锐, **曹守云**, **杨炜**, **田文忠**, **华志华**, **黄大年**, **李良才**, 1998. **基因枪法转化籼稻有关因素的评价. 中国水稻科学**, **12**: 21 ~ 26
戴胜洪, **李良才**, **丁月云**, **何锶洁**, **曹守云**, **田文忠**, 1998. **水稻基因枪法多基因转化研究. 遗传学报**, **25**: 345 ~ 350
Arrila P E, 1997. Risks of escape and spread of engineered genes from transgenic crops to wild relatives. *AgBiotechnol News Info*, **9**: 157 ~ 160
Barry G, Kishore G, Padgette S, Taylor M, Kolacz K, Weldon M, Re D, Eichholtz D, Fincher K, Hallas L, 1992. Inhibitors of amino acid biosynthesis: Strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. In: Singh B K, Flores H E, Shannon J C. (eds) Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants. *Am Soci Plant Physiologists*, 139 ~ 145
Cao J, Duan X, McElory D, Wu R, 1992. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectiles-mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Rep*, **11**: 586 ~ 591
Christou P, 1996. Electric discharge particle acceleration (Accell) technology for the creation of transgenic plants with altered characteristics. *Field Crops Research*, **45**:143 ~ 151
Christou P, Ford T L, Kofrom M, 1991. Production of transgenic rice plants from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology*, **9**: 957 ~ 962
Cooley J, Ford T, Christou P, 1995. Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electric-discharged particle acceleration. *Thear Appl Genet*, **90**: 97 ~ 104
Dean J F D, 1997. Book of abstract: 5th International congress of plant molecular biology. Kluwer Academic Publishers, Singapore
Duan X L, Li X G, Xue Q Z, Abo-Ei-Saad M, Xu D P, Wu R, 1996. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotech*, **14**:494 ~ 498
Huang D N, Li J Y, Xiao H, Zhang S P, Xue R, Wang X L, Yang W, Hua Z H, Xie X B, 1997. Studies on the inheritance of transgenic rice with *bar* gene. *CRR Newsletter*, **5**:2 ~ 3
Jain R K, Jain S, Wang B Y, Wu R, 1996. Optimization of biolistic method for transient gene expression and production of agronomically useful transgenic Basmati rice plants. *Plant Cell Rep*, **15**: 963 ~ 968
Keeler K H, 1989. Can genetically engineered crops become weeds?. *Bio/technology*, **7**:1134 ~ 1139
Larsson C T, Khoshnoodi J, Ek B, Rask L, Larsson H, 1998. Molecular cloning and characterization of starch-branching enzyme II from potato. *Plant Mol Biol*, **37**: 505 ~ 511
Li L C, Qu R D, de Kochko A, Fauquet C, Beachy R N, 1993. An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep*, **12**: 250 ~ 255
Li Z Y, Upadhyaya N M, Meena S, Gibbs A J, Waterhouse P M, 1997. Comparison of promoters and selectable marker genes for use in Indica rice transformation. *Mol Breeding*, **3**: 1 ~ 14
Peng Y L, Shirano Y, Ohta H, Hibino T, Tanaka K, Shibata D, 1994. A novel lipoxygenase from rice. *J Biol Chem*, **269**: 3755 ~ 3761
Ratnayaka I J S, Oard J H, 1995. A rapid method to monitor DNA precipitation onto microcarriers before particle bombardment. *Plant Cell Rep*, **14**: 794 ~ 798
Sanford J C, Klein T M, Wolf E D, Allen N, 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Partic Sci Technol*, **5**: 27 ~ 37
Takeuchi Y, Dotson M, Keen N T, 1992. Plant transformation: A simple particle bombardment device based on flowing helium. *Plant Mol Biol*, **18**: 835 ~ 839
Wang Y C, Klein T M, Fromm M, 1988. Transient expression of foreign genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. *Plant Mol Biol*, **11**: 433 ~ 439
Wünn J, Klti A, Burkhardt P K, Biswas G C G, Launis K, Iglesias V A, Potrykus I, 1996. Transgenic Indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cryIA*(b) gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Bio/Technology*, **14**: 171 ~ 176
Xu D P, Duan X L, Wang B Y, Hong B M, David Ho T H, Wu R, 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Phsiol*, **110**: 249 ~ 257
Zhang S P, Chen L L, Qu R D, Marmey P, Beachy R, Fauquet C, 1996. Regeneration of fertile transgenic Indica (group1) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells. *Plant Cell Rep*, **15**: 465 ~ 469

https://www.sciencine.com/doi/10.3724/CBB-t20-048