

## 讲座

## 植物遗传工程

## 六、植物遗传工程技术的应用

彼得·卡尔逊

(美国密执安州立大学土壤和作物科学系)

关于植物遗传工程技术在植物改良和植物育种方面的应用,花药培养是一个很好的例子,但你们大家对它的了解比我多得多,今天就不讲了。我今天主要谈植物遗传工程技术在植物抗病育种方面的应用,因为在这方面我们有突变体的筛选和获得的很好的实验体系。

我们知道,通过茎尖分生组织培养可以获得马铃薯无病毒苗,这已在生产上得到成功的应用。现在植物原生质体和悬浮细胞培养技术给我们提供了进一步的希望,这就是获得抗病毒突变植株。过去抗病毒植株必须用野生种与栽培品种杂交才能得到。在细菌中很容易得到抗病毒株系,只要用已知的病毒如 T4、T7 去处理大量的细菌就行了。T4、T7 可感染所有的细菌细胞,只有那些抗病毒细胞才能继续生长,这样,从  $10^6$ — $10^7$  个细菌中即可得到抗病毒细胞。如果将上述方法搬到高等植物中,即用植物病毒去感染游离原生质体,我们不会得到期望的结果。因为高等植物和细菌体系间有两个重要区别。第一,不可能使所有的原生质体都受到感染,未受感染的细胞逃避了筛选,仍可继续生长;第二,病毒感染植物细胞后并不一定能杀死植物细胞,因此已感染的细胞还可能继续生长。这样我们就得不到突变体。所以,必须寻求另外的方法。

1. 原位选择系统 采用单倍体烟草 (*Nicotiana glauca*) 和烟草花叶病毒为材料,当烟草感染花叶病毒以后,叶片出现花斑,叶片大部分发黄,但有一些岛状分布的绿点。将这些绿点通过组织培养再生植株,试验证明,这样得到的植株虽然是无病毒的,但并不抗病毒。这就是说,原来的那些绿点并不是抗病毒的细胞。我们选用单倍体 *N. glauca* 植株,经组织培养,再生小植株,在高温高湿条件下,用一烟草花叶病毒的突变体来感染(在这种情况下一般很少出现绿点),再使小植株接受 500 拉德的  $\gamma$  射线照射,照射后令其继续生长一段时间,使发生突变的细胞有所增殖。用这种办法处理后,将植株叶片上的小绿点分离、培养,并再生植株。从 40 株不同植株的 400 片叶,选出 400 个绿点,培养后再生植株,选出了 12 株在整株水平上具有抗病性的植株。经染色体加倍后,观察其后代情况,证明其中 8 株可将抗病性传到下一代。这 8

株可遗传的抗病植株在抗病程度上也有差别,即它们不是同类型的突变。看来抗花叶病毒的突变是隐性的,而且控制这一性状的基因不会超过 3 对,这是核基因突变,而不是细胞质基因突变。值得注意的是,其中 3 株突变体不仅抗烟草花叶病毒,而且表现出对别的病毒如烟草坏死病毒、马铃薯 X 病毒和 Y 病毒也具有抗性。以上突变体正在育种实践中应用。我们努力把这种技术扩展到马铃薯、番茄等作物上。马铃薯抗病毒特性的选育很有价值,因为马铃薯是无性繁殖的。

2. 抗病原毒素的突变体选择 我们举烟草野火病为例,说明当植物细菌病的病原菌分泌毒素时,可以选择出抗病突变体。野火病是由 *Pseudomonas tabacii* 引起的,是烟草苗圃中非常重要的病害。烟草还有一种病害叫细菌性角斑病,是由 *Pseudomonas angularis* 引起的。当烟草叶片被 *P. angularis* 侵染时,产生一黑斑;被 *P. tabacii* 侵染时则产生周围有一黄色环的黑斑。用培养过 *P. tabacii* 的培养基,除去其中的细菌后再处理烟草叶片则黄色环仍然出现;同样的方法用培养过 *P. angularis* 的培养基去处理,则没有反应。由此我们知道, *P. tabacii* 可以产生一种有毒的化学物质,这种物质可引起烟草叶片产生黄色环。有一种商品化合物叫磺氧化亚胺蛋氨酸 (Methionine Sulfoximine, 简称 MSO), 与这种毒素的作用很相似。在细菌中 MSO 抑制谷氨酰胺合成酶(一种与氮代谢有关的酶)。我们将单倍体烟草的原生质体和细胞悬浮培养物用诱变剂处理,洗脱后在没有毒物的条件下在培养皿中植板,细胞即开始生长,并形成小细胞团。经过几次细胞分裂以后,向上述培养皿铺一层薄薄的含有 MSO 的琼脂层,结果从大量的细胞 ( $>10^7$ ) 中发现有 33 个细胞团可继续生长。将它们培养、再生植株,并经染色体加倍,得到 33 株二倍体植株。其中 3 株在整株水平都表现抗毒素性质,而且能将抗性传到下一代。这 3 个突变体正在育种实践中应用。由于很多细菌病害都以产生

Peter S. Carlson: Plant Genetic Engineering VI. Application of Techniques to Plant Genetic Engineering



毒素为主要的攻击和侵害植物的方式,所以上述方法对抗细菌病害突变体的筛选是非常重要的。

但是,这种简便的、直接的正选择系统,由于以下原因还不能解决所有的实际问题,比如,当抗性突变体受到 *P. tabacii* 感染时,会产生象受 *P. angulata* 感染后出现的那样的黑斑(而不是无黄色环的黑斑),*P. tabacii* 仍然可很缓慢地在小叶片中扩展。在这种情况下我们只能减少危害,但并没消灭它。此外,这些抗病突变体产生较高含量的游离蛋氨酸,这对高等植物是有害的,因此这些抗病突变体比野生型植株生长弱。也许有希望通过杂交育种克服这个问题,但现在尚不能肯定。

总之,抗病菌毒素的筛选方法还存在一些问题,但它很有希望,很有前途。这一方法在抗真菌病突变体筛选方面也有很多例子,最著名的就是玉米小斑病的抗性选育。引起小斑病的真菌是 *Helminthosporium maydis*, 它产生一种毒素。用与在筛选抗野火病突变体中所采用的类似的方法,可得到在整株水平上抗病的植株。我们已知对玉米小斑病的敏感性是由叶绿体和线粒体(主要是由线粒体)基因决定的,而得克萨斯(Texas)雄性不育系,即 T-细胞质对这种斑病毒素敏感,正常细胞质则抗这种毒素。这一点非常重要,因为 T-细胞质雄性不育系是美国向大面积生产单位提供杂种玉米种子的种子工业的基础,而它对上述毒素敏感正是美国 1973—1974 年玉米由于斑病严重减产的原因。我们希望选出既保持雄性不育性又抗斑病毒素的品系,这样可以不改变原有种子生产方法而又可抵抗病害。我们曾选出了不少抗毒素的株系,但它们同时也失去了雄性不育性。

另一个例子是烟草褐斑病(Brown spot),病原毒素的性质已经鉴定,并进行了 3 种用于抗毒素突变体的筛选,即单细胞水平的突变体筛选、对单倍体原生质体培养物的筛选和原位选择。通过以上 3 种方法,都获得了抗病突变植株。这些植株生长与野生型植株同样健壮,现在正在日本应用于育种实践,日本存在这种病害问题。

在上面所有的情况中,毒素都是经纯化、鉴定过的,但这并不是最重要的。没有纯净的毒素也可进行突变筛选工作,例如马铃薯晚疫病(*Phytophthora infestans*)。德国科学工作者将 *P. infestans* 培养于试管中,然后将菌原分离出来,这样培养基中已无真菌,但含有很多真菌的代谢产物,其中包括病原毒素。将这种培养基用来处理马铃薯离体培养的愈伤组织,选出抗毒细胞系,再生植株后也表现出了抗毒素性质。

3. 胚培养技术的应用 胚培养技术已在一系列高等植物中发展起来,它可以用于不同种间范围的信息转移。我们举一个绿豆(*Vigna radiata*)的例子。绿豆有很多病害,它的一个近缘种 *Vigna umbellata* 对

这些病害有抗性。用 *V. radiata* 与 *V. umbellata* 杂交,杂种胚在 8 至 9 天内就死亡了。通过对培养技术的改进,已可使杂种胚离体培养成功,得到种间杂种  $F_1$ ,将杂种  $F_1$  植株染色体加倍,即产生双二倍体。将所得到的双二倍体作母本,与 *V. radiata* 回交,就可将抗病性转入 *V. radiata*。这种技术虽然简单,却很有应用价值,因为一方面,上述两个种的原生质体培养都不能再生植株,原生质体融合的方法用不上,另一方面,这两个种的病原物都不产生毒素,一般的抗病原毒素突变筛选方法也不适用。

下面我们再看看大麦的例子。这项工作在我的实验室里已进行多年。

栽培大麦(*Hordeum vulgare*)有很多病害问题,以及其它一些抗性问题,如抗旱、抗盐问题等。大家知道,禾本科植物可以广泛的杂交,大麦属的种也可以和一些野麦属(*Elymus*)及冰草属(*Agropyron*)的种杂交。杂交后代往往不育,但有时可用染色体加倍的方法使其可育。我在密执安州立大学的同事已从芒麦草(*Hordeum jubatum*)分离得到一些个体,它们具有很多重要的、我们希望将之转入到栽培大麦中去的性状。*H. jubatum* 染色体数为  $2n = 28$ , *H. vulgare* 为  $2n = 14$ 。我们的目标是将 *H. jubatum* 的一些基因转入 *H. vulgare* 中去,正如一般的将野生种基因转入栽培种中一样。但 *H. jubatum* 与 *H. vulgare* 杂交非常困难,甚至比野麦属或小麦属中不同的野生种间杂交还困难。我们只有通过特殊的胚培养方法才得到了杂种  $F_1$ 。 $F_1$  有 21 条染色体,长成植株后不育;用秋水仙素处理,将染色体加倍,我们得到不少染色体数为 42 的植株,即双二倍体植株,可是这些植株仍表现雄性或雌性不育。因此,单一的胚培养方法还没有解决问题。我采用了一个较为复杂的方法来达到基因转移的目的。

先用杂种  $F_1$  植株的各个部位作组织培养,发现未成熟子房培养后可产生很好的愈伤组织(已肯定来自子房周围的体细胞),这些愈伤组织继代培养 2—3 年后仍可保持再生植株的能力。我们知道,培养中的细胞的染色体数目、结构都可发生变化,另一方面,培养中的组织再生的植株大多是整倍体而不是非整倍体。我们从 21 条染色体(14 条来自 *H. jubatum*, 7 条来自 *H. vulgare*)的组织出发,不断继代培养,同时不断令其再生植株。这样,从较早时期得到的再生植株很象原来的  $F_1$ 。在继代很多次以后,我们发现了形态上不同的植株。半年以后,我们得到的植株主要有 3 种类型,一种象杂种  $F_1$ ,一种象 *H. jubatum*,另一种则象 *H. vulgare*。我们选出那些象 *H. vulgare* 的小苗,发现它们的染色体数在 7 左右,一般为 7—10 条,并且具有很多正常栽培大麦的特性。可以认为这些个体是由于培养过程中原来细胞丢失了 *H. jubatum* 的大部分



染色体而产生的。但同时，两个种的基因组之间易位的情况可能业已发生。要用细胞学方法分析 *H. vulgare* 的染色体结构是很困难的，但我们所得到的这些个体的染色体有很多比正常个体的染色体大些或小些。经过筛选，从这些个体中发现很多表现出我们所关心的、来自 *H. jubatum* 的特性，如抗盐、抗杂草、抗病等。有一些个体还出现了 *H. jubatum* 特有的、*H. vulgare* 通常没有的同功酶谱带。这样，我们从形态上和生物化学方面都证明了 *H. jubatum* 的特性转入了 *H. vulgare*。这些植株在染色体加倍后即可用于育种实践。我们现在已经得到了 3000 株从杂种 F<sub>1</sub> 组织培养来的、象 *H. vulgare* 的植株，其中一些正在密执安州立大学被用于育种工作中。在上述实验中，我们还可以用一些诱变处理来增加组织培养中细胞的染色体数目及结构的变异，这些诱变因素包括 γ-射线、紫外线、5-溴脱氧尿嘧啶核苷、丝裂霉素 C 等。

4. 其它 我想再介绍一个我的实验室现在刚刚完成的工作，借以说明在病原物不分泌毒素的情况下植物抗病性的选择问题。

用单倍体烟草为材料，有关的病害是烟草黑胥病 (*Phytophthora parasitica*)。由于 *P. parasitica* 不产生毒素，所以普通抗毒素选择方法不适用。我们的办法是从病原物的突变选择入手。我们筛选了很多 *P. para-*  
(上接第 44 页)

所以，我认为对医学院学生而言，遗传学的教学应该有 3 个阶段：(1) 中学阶段，了解生物界遗传变异的现象和基本概念；(2) 医学院校一年级医用生物学中讲授以医学为中心的遗传学内容；(3) 高年级应开设以遗传性疾病为中心的医学遗传学(临床遗传学)。

目前开课是否有困难？综观目前国内各医学院校中从事遗传学教学和研究的教研室并不少，人数虽不很够，但开课还是有条件的。我建议各医学院校，目前可以组织有关教师或临床医师，先以“医学遗传学”讲座的形式讲授十几个专题，每次 2 学时，这样总时数可约为 40 学时左右。妥否，供研究。

附表：美国部分医学院校讲授“医学遗传学”的课时

Arkansas U.	19
Yale U.	18+9*=27
Howard U.	45
U. Georgia	10
Morehead U.	15+10*=25
U. Illinois	16
St. Louis U.	33
Washington U.	36
U. Rochester	31+11*=42
Duke U.	18+11*=29
U. Mississippi	23+ 1*=24

\* 实验课或讨论课时数。

*sitica* 的温度敏感型突变体，它们在较低温度下 (22℃) 可以生长，在较高温度 (28℃) 下不生长。在一般情况下，如果把易感病植株的细胞培养在含有致病真菌孢子或菌丝的培养基中，因病菌生长太快，不久便完全掩盖了植物细胞，这样得不到抗性突变体。我们的做法是：将新鲜植物细胞群体与温度敏感型病菌混在一起，在较低温度 (22℃) 下培养两天半。这期间易感病的细胞将受到侵染并被杀死，抗性细胞则不受感染。此后把温度提高到 28℃，真菌就停止生长了，未感染的细胞活着并继续生长，形成愈伤组织并最终再生植株。这样，我们通过利用温度敏感型病原真菌突变体，较好地控制了培养皿中病原菌的生长，得到了抗病细胞系。用这种方法已选出一些植株，它们对 *P. parasitica* 的抗性增加了。

总之，筛选抗病性的方法很多，但最重要的是要有一个能够选择所需要的细胞的体系。

在植物病理方面有很多利用新技术的例子，在其它方面都不是那么成功，我认为原因之一是，植物对病害的反应是由一个或很少数的基因控制的，而且这种反应的方式很简明：抗病或易感染，或正或负。其它一些重要农业性状，如产量、抗旱性、抗盐性等，就不是这样，因此应用新技术就较困难些。

(陈之征根据 Peter S. Carlson 讲话录音整理)

(上接第 42 页)

采取这种直接表达的方式，可先使细菌产生细菌和人的融合蛋白质，然后再用溴化氰切割这种融合蛋白质，从而获得所需要的人体蛋白，如同胸腺素 α<sub>1</sub> 那样<sup>[4]</sup>。在这种情况下，天然的、氨基末端乙酰化的产物在最后一步是用化学方法得到的<sup>[4]</sup>。然而，其它的修饰，如糖基化，都比较困难，在克隆时需以真核细胞为宿主。蛋白质产物的大小也是一个关键；小的蛋白质常常在细菌中降解，不过这可以借产生一个较大的融合的前体蛋白来解决，这一措施对胸腺素 α<sub>1</sub> 是很有效的<sup>[4]</sup>。如果基因没有内含子顺序，克隆则可以从基因 DNA 的加工开始。这对于干扰素也是适用的，虽然在最初的克隆工作成功以前并未发现它们缺乏内含子。

临床应用新的生物活性肽也会提供新的研究课题。胰岛素及生长激素的使用，显然是根据过去的临床工作，而且由它们的重组 DNA 衍生的物质与天然物质是同样的或者是非常相似的。但很多由重组 DNA 产生的新的治疗药剂则不是这种情况。不过，基因拼接技术将为药理学问题提供解决方法。添加额外的肽的片段是很容易做到的，通过这条途径能将需要的药物性质赋予有生物活性的蛋白质，如阻滞血液对药物的清除能力或使药物趋向于需要的靶组织上。

因此不难看出，基因拼接技术为什么对治疗药剂的生产是很有前途的，它提供了发现新的天然药剂结构的方法，并使之能大量生产。