

· 热点评 ·

# 突破复杂性状多基因转化技术壁垒，首创胚乳花青素高积累的水稻新种质

朱丽，钱前\*

中国水稻研究所，水稻生物学国家重点实验室，杭州 311401

**摘要** 随着转基因技术的日趋成熟，利用生物工程手段加快改良作物农艺性状，已经越来越显示出其巨大的应用潜力。在改良多基因调控的复杂农艺性状方面，单基因转化收效甚微，而长期以来多基因转化不仅受限于技术因素，而且在协调表达调控、代谢及修饰等一系列相关基因方面更是难于突破。近期，我国科学家首次利用自创的多基因垛叠表达系统，成功在水稻(*Oryza sativa*)胚乳中合成了具有抗氧化活性的花青素，在复杂性状多基因转化领域取得了突破性进展。

**关键词** 花青素，多基因转化，胚乳，无选择标记，水稻

朱丽，钱前 (2017). 突破复杂性状多基因转化技术壁垒，首创胚乳花青素高积累的水稻新种质. 植物学报 52, 539–542.

自从20世纪80年代第1例转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)问世以来(Zambryski et al., 1983)，利用转基因方法加快改良作物诸多农艺性状，一直是广大科研工作者为之奋斗的目标。随着各种农作物基因转化技术日趋成熟以及大量功能基因被发现并推广应用，人们逐渐发现单基因转化在许多复杂性状的改良方面收效甚微(Halpin, 2005)。因此，如何将调控、代谢、修饰及转运等多层次调节基因精确整合，通过生物工程手段完成复杂性状的多基因协同表达是目前植物基因工程面临的重要挑战。华南农业大学刘耀光教授团队首次利用自创的多基因垛叠表达系统(TransGene Stacking II System)，成功在水稻(*Oryza sativa*)中表达了8个与花青素合成及调控相关的外源基因，创制了无选择标记，胚乳高花青素积累的“紫晶米”新种质(Zhu et al., 2017)。该研究成果不仅打破了困扰多年的多基因转化技术壁垒，还巧妙地应用花粉特异启动子启动Cre重组蛋白表达，使转基因植株通过自交完成选择标记的重组切除。更令人兴奋的是，该研究首次成功运用生物工程手段完成了复杂性状的多基因协同表达，为今后更多复杂农艺性状的改良提供了有效途径。

## 1 多基因协同表达，精准创制水稻新种质

花青素属于类黄酮类天然植物色素，除了在植物中行

使多种生理功能外，还具有抗氧化、抗衰老、强效清除自由基、预防和治疗疾病等作用(Wang and Stoner, 2008; Zhang et al., 2014)。因此，长期以来，花青素在功能性食品开发、医疗保健及作物品质改良等方面具有重要的研究价值。多年的研究表明，植物中花青素的合成机制非常复杂，在代谢、修饰及转运过程中涉及许多保守蛋白，同时还需要很多调节蛋白，以调控不同组织和器官中相关基因的时空表达(Holton and Cornish, 1995; Ogata et al., 2005; Grotebold, 2006)。仅转化单个或者部分基因并不能完成花青素在胚乳中的合成(Shin et al., 2006; Ogo et al., 2013)。因此，选择哪些调节、代谢、修饰或转运基因进行转化至关重要。为了解决这个问题，刘耀光教授团队首先分析了普通白米胚乳中花青素合成途径相关基因的功能。研究发现，玉米(*Zea mays*)同源的转录因子OsB1 (Booster 1)、OsB2 (Booster 2)及结构基因OsDFR (*Dihydroflavonol-4-reductase*)在不同的水稻品种中发生缺陷，而调节基因OsC1 (*Colored 1*)和大多数花青素合成途径的基因在水稻胚乳中均发生沉默或者低表达。以此为基础选择目标基因，用于弥补水稻胚乳中花青素的合成。基于植物中花青素合成基因序列的高度保守性，研究者选择了水稻胚乳中不表达或低表达花青素合成结构基因在彩叶草(*Solenostemon scutellarioides*)中的同源基因SsF3H (*Fla-*

收稿日期: 2017-07-03; 接受日期: 2017-08-30

\* 通讯作者。E-mail: qianqian188@hotmail.com

*vanone 3-hydroxylase*)、*SsF3'H* (*Flavonoid 3'-hydroxylase*)、*SsANS* (*Anthocyanidin synthase*)、*SsDFR* (*Dihydroflavonol 4-reductase*)、*SsCHS* (*Chalcone synthase*)和*SsCHI* (*Chalcone isomerase*)。此外,研究人员巧妙地将外源基因与内源基因相结合,利用玉米基因*ZmLc* (*Leaf color*)、*ZmPl* (*Purple leaf*)和水稻内源基因*OsWD40* (WD40型转录因子) 3个基因的表达产物重建了MBW (MYB-bHLH-WD40)复合物,从而使13个在中花11胚乳中发生沉默或低表达的花青素合成相关内源基因的表达量显著提高。大量的基础研究已经基本阐明了植物中花青素合成代谢途径,除了15种合成相关酶外,还有许多调控、修饰及转运相关蛋白参与其中(Holton and Cornish, 1995; Ogata et al., 2005; Grotewold, 2006)。如何在众多基因中少而精地选择用于转化的目标基因,不仅考验着研究团队的总结、分析及实验设计能力,更直接决定着研究的成败。利用该TGSII系统,研究人员通过精准选择,将2个玉米花青素调节基因和6个彩叶草花青素结构基因垛叠并在胚乳中表达,成功培育出在胚乳中高积累花青素的水稻新种质。这一研究成果不仅打破了多基因转化的技术壁垒,还为复杂农艺性状的生物工程改良提供了新的线索和重要依据。

## 2 TGSII: 一个简单、高效的多基因转化系统

多个基因反复转化寄主植物或不同转基因材料杂交,都可以达到多基因垛叠表达的效果。然而前者受制于选择标记的匮乏,而后者的短板主要在于研究周期过长。共转化技术可有效解决这些问题,利用多基因串联的单载体转化、2个或2个以上载体共转化同一受体细胞的方法,均可获得多基因垛叠表达的转基因株系。Farhi等(2011)通过农杆菌介导的单基因转化,将5个外源基因转入烟草生产青蒿素,青蒿素前体(紫穗槐二烯)在转基因烟草中的积累量可高达26–72 ng·g<sup>-1</sup>鲜重。然而,由于标准载体承载上限较低,随着连入基因数目的增加,外源基因表达不稳定以及可选择的酶切位点有限等因素都限制了更多基因的垛叠。虽然细菌人工染色体(BAC)与可转化人工染色体(TAC)等载体系统的开发(Hamilton et al., 1996; Liu et al., 1999),解决了载体容量问题,但多基因转化仍

然困难重重。刘耀光教授团队曾经开发出基于Cre/loxP重组技术的多基因垛叠载体系统,利用该技术可将多个基因连入TAC载体后转化寄主植物。TAC载体可承载大于100 kb的外源基因,然而当外源基因超过5个的时候,基因的表达情况仍不尽如人意(Liu et al., 1999, 2002)。在“紫晶米”的创制过程中,研究团队在原有技术的基础上进一步完善,将Cre/loxP重组技术与归巢内切酶及Gateway重组系统相结合,通过2个供体载体(pYL322d1和pYL322d2)与TAC受体载体(pYLTAC380GW)的轮回重组,将10个外源基因连入受体载体,在水稻胚乳中成功表达了8个花青素合成相关基因,创制了高花青素积累的“紫晶米”。鉴于TAC载体的高承载能力、TGSII系统非常便利的轮回重组方式及其多样的改造潜力,我们可以预见,该系统不仅可为更多基因的垛叠表达提供高效、快捷的平台,而且在其它生物研究领域也将得到广泛应用。

## 3 更便捷的选择标记剔除

众所周知,选择标记的使用大幅提高了外源基因的转化效率,是组织培养过程中必不可少的筛选手段。但是,当转基因阳性株成苗,进入后续应用阶段时,选择标记的继续表达不仅增加了转基因植株的负担,还存在潜在的风险。因此,培育无选择标记的转基因植株势在必行。剔除选择标记的方法有很多种,包括共转化、转座子及位点特异性重组介导剔除等(Miki and McHugh, 2004; Yau and Stewart, 2013)。共转化是将2个单独的载体共转同一个受体细胞,通过2个载体在后代的分离筛选无选择标记的转化单株(陆美芳等, 2005; 朱祯和李旭刚, 2003)。玉米的Ac/Ds系统可以将选择标记基因放置在Ds反向重复序列之间,利用转座子的跳跃,使选择标记基因与目的基因发生分离(Ebinuma et al., 1997)。而位点特异性重组(如Cre/loxP)介导的选择标记剔除,则是将选择标记放置在2个同向位点特异性重组序列的中间,通过重组反应将选择标记基因剔除(Austin et al., 1981; Dale and Ow, 1991)。虽然在剔除效率上3种方法各有所长,但剔除过程均发生在转基因后代中。例如,共转化方法需要在T<sub>1</sub>代中大量筛选分离株系,而共转化效率、转化事件的插入位置和方式等偶然因素,对于能否筛到无选择标记的转基因阳性株均有很大

影响。Ac/Ds和Cre/loxP系统需要二次转化或者有性杂交, 才能将Ac/Cre引入转基因株, 诱发转座或重组。二次转化有可能再次引入新的标记, 而有性杂交则需要提前准备Ac或Cre的纯合转基因株。TGSII系统在2个同向的loxP位点间, 串联表达了筛选标记和花粉特异启动子启动的Cre蛋白, 使转基因材料在愈伤组织筛选时具有筛选抗性, 而在成苗开花后, 通过自交完成重组反应, 只需要1次转化1个载体, 就可以在T<sub>2</sub>代获得无选择标记的转基因种子。使用TGSII系统既提高了转化效率又避免了二次转化或有性杂交, 为选择标记剔除提供了新思路。此外, 该研究团队自主开发的花粉特异启动子也为组织特异表达及基因功能研究等提供了有效抓手。

#### 4 外源基因稳定高表达

多基因转化技术多年来进展缓慢, 除了受限于载体结构和转化系统外, 另一个重要原因是外源基因在寄主植物中不能稳定表达, 进而无法获得预期结果。如果转入的外源载体太大, 载体本身会变得不稳定, 部分基因会发生选择性沉默(Wu et al., 2005; Karunanandaa et al., 2005)。改良多基因控制的复杂农艺性状, 保证外源基因稳定表达是获得预期结果的必要前提。在获得“紫晶米”的过程中, 该团队也发现不是所有的转基因株系都能产生紫色胚乳, 中花11背景的15个和华光1号背景的13个转基因株系中, 8个花青素相关基因全部表达的株系分别有9个和8个。但是对于含有10个外源基因的超级载体来说, 超过60%的全基因表达率显然已经处于一个相当高的水平, 而且在T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>和T<sub>5</sub>代中均可以检测到其稳定表达。

随着分子生物学和测序技术的飞速发展, 不同物种基因功能的挖掘也越来越高效、快捷。更多的研究者正不断从对单个基因的功能分析转向多基因网络整合研究。不难想象, 在不久的将来, 各种复杂农艺性状的调控途径将会日渐清晰。有了这些扎实的基础研究, 再加上多基因转化技术的突破, 利用生物工程手段快速改良各种农艺性状, 培育高产、高抗且优质的新品种将指日可待。

#### 参考文献

陆美芳, 刘巧泉, 于恒秀, 顾铭洪 (2005). 农杆菌介导的水稻

- 双载体共转化法中部分影响因素的研究. *生物技术通报* **5**, 55–62.
- 朱祯, 李旭刚 (2003). 一种利用双T-DNA载体培育无选择标记转基因水稻的方法: 02107429.1. 2003-10-01.
- Austin S, Ziese M, Sternberg N (1981). A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* **25**, 729–736.
- Dale E, Ow D (1991). Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 10558–10562.
- Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Yamakado M (1997). Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 2117–2121.
- Farhi M, Marhevka E, Ben-Ari J, Algamas-Dimantov A, Liang Z, Zeevi V, Edelbaum O, Spitzer-Rimon B, Abeliovich H, Schwartz B, Tzfira T, Vainstein A (2011). Generation of the potent anti-malarial drug artemisinin in tobacco. *Nat Biotechnol* **29**, 1072–1074.
- Grotewold E (2006). The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 761–780.
- Halpin C (2005). Gene stacking in transgenic plants—the challenge for 21st century plant biotechnology. *Plant Biotechnol J* **3**, 141–155.
- Hamilton C, Frary A, Lewis C, Tanksley S (1996). Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 9975–9979.
- Holton T, Cornish E (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1071–1083.
- Karunanandaa B, Qi Q, Hao M, Baszis S, Jensen P, Wong Y, Jiang J, Venkatramesh M, Gruys KJ, Moshiri F, Post-Beittenmiller D, Weiss J, Valentin H (2005). Metabolically engineered oilseed crops with enhanced seed tocopherol. *Metab Eng* **7**, 384–400.
- Liu Y, Liu H, Chen L, Qiu W, Zhang Q, Wu H, Yang C, Su J, Wang Z, Tian D, Mei M (2002). Development of new transformation competent artificial chromosome vectors and rice genomic libraries for efficient gene cloning. *Gene* **282**, 247–255.
- Liu Y, Shirano Y, Fukaki H, Yanai Y, Tasaka M, Tabata S, Shibata D (1999). Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 6535–6540.
- Miki B, McHugh S (2004). Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol* **107**, 193–232.

- Ogata J, Kanno Y, Itoh Y, Tsugawa H, Suzuki M** (2005). Plant biochemistry: anthocyanin biosynthesis in roses. *Nature* **435**, 757–758.
- Ogo Y, Ozawa K, Ishimaru T, Murayama T, Takaiwa F** (2013). Transgenic rice seed synthesizing diverse flavonoids at high levels: a new platform for flavonoid production with associated health benefits. *Plant Biotechnol J* **11**, 734–746.
- Shin Y, Park H, Yim S, Baek N, Lee C, An G, Woo Y** (2006). Transgenic rice lines expressing maize *C1* and *R-S* regulatory genes produce various flavonoids in the endosperm. *Plant Biotechnol J* **4**, 303–315.
- Wang L, Stoner G** (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett* **269**, 281–290.
- Wu G, Truksa M, Datla N, Vrinten P, Bauer J, Zank T, Cirpus P, Heinz E, Qiu X** (2005). Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants. *Nat Biotechnol* **23**, 1013–1017.
- Yau YY, Stewart CN** (2013). Less is more: strategies to remove marker genes from transgenic plants. *BMC Biotechnol* **13**, 36.
- Zambryski P, Joos H, Genetello C, Leemans J, Montagu MV, Schell J** (1983). Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J* **2**, 2143–2150.
- Zhang Y, Butelli E, Martin C** (2014). Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Curr Opin Plant Biol* **19**, 81–90.
- Zhu Q, Yu S, Zeng D, Liu H, Wang H, Yang Z, Xie X, Shen R, Tan J, Li H, Zhao X, Zhang Q, Chen Y, Guo J, Chen L, Liu Y** (2017). Development of “Purple Endosperm Rice” by engineering anthocyanin biosynthesis in the endosperm with a high-efficiency Transgene Stacking System. *Mol Plant* **10**, 918–929.

## Development of “Purple Endosperm Rice” by Engineering Anthocyanin Biosynthesis in Endosperm: Significant Breakthrough in Transgene Stacking System, New Progress in Rice Biofortification

Li Zhu, Qian Qian\*

State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 311401, China

**Abstract** With improved transgenic technology, there is great potential for bio-fortification of crops. For complex agronomic traits controlled by multiple genes, single gene transformation is insufficient, and multi-gene engineering is limited to technical factors. Regulation and expression of metabolic modification and a series of related genes is more difficult to break through. Recently, Chinese scientists successfully engineered sophisticated anthocyanin biosynthesis in rice endosperm, which suggests the potential utility of the TransGene Stacking II System for synthetic biology and improving agronomic traits in crops.

**Key words** anthocyanin, multiple gene transformation, endosperm, marker excision, rice

**Zhu L, Qian Q** (2017). Development of “Purple Endosperm Rice” by engineering anthocyanin biosynthesis in endosperm: significant breakthrough in Transgene Stacking System, new progress in rice biofortification. *Chin Bull Bot* **52**, 539–542.

\* Author for correspondence. E-mail: qianqian188@hotmail.com

(责任编辑: 朱亚娜)