植物生物技术和作物改良

孙敬三　陈维伦　主编

中国科学技术出版社

内 容 提 要

本书为中国植物学会特邀国内有关植物生物工程专家，就自己研究领域所撰写的综述论文集，内容包括植物生物工程各分支学科近年来国内外的研究进展，发展趋势、主攻方向和存在问题。本书收集资料丰富，引证文献翔实，不仅为各科研单位制订中长期植物生物工程研究规划提供了必要的背景情况和参考资料，也为从事植物生物工程研究工作的科技人员和大专院校开设植物生物工程课程提供了适合的参考书。

前　言

近10年来，植物生物技术在我国有了迅速的发展，各分支领域的科研队伍已初步形成并获得了不少科研成果，如已得到了多种抗病、抗虫的基因工程植株，有的已开始了田间试验；通过花药培养、体细胞无性系变异体的筛选、染色体工程和杂种胚培养等细胞工程手段，已创造出一批优质高产的水稻、小麦等粮食作物和其他经济作物的新品系、新品种；小麦、大豆、玉米、水稻等禾本科、豆科主要作物的原生质体再生植株的相继成功，使我国在这一领域继续保持领先地位；试管苗的工厂化生产达到了相当的规模，各种果树无毒种苗的使用正在产生明显的经济效益；通过细胞悬浮培养生产次生代谢产物的研究也有了良好的开端。

由于植物生物技术本身也正在迅速的发展和逐步完善之中，在各研究领域仍有很多问题有待进一步研究和解决；在植物生物技术的某些领域，我国虽然已达到了较先进的水平，但不少方面和国际水平仍有较大的差距；再加上经费、人才、以及在推广应用中的风险性较大等各种问题，要使植物生物技术真正在我国农业生产上发挥其应有的潜力还需经过长期不懈的努力。

为了更好的总结已有成绩，展望未来，中国植物学会组织了国内部分专家编写了这本著作，希望能对推进这方面的研究和应用以及科研机关制订中长期植物生物工程研究规划有所帮助。

负责本书编辑工作的有李长复、张秀荣、宋美英、陈梦玲、崔郁英。

编　者　1990年3月

植物生物技术和作物改良

目　录

前言……（ii）
应大力加强我国植物生物技术的发展……周永春（1）
植物基因工程进展……莽克强（5）
单子叶植物的基因转移……孙敬三　路铁刚（15）
Ti质粒的应用与发展……林忠平　麻　密（34）
原位杂交技术在植物基因定位上的应用……黄毓文（40）
植物体细胞杂交及其利用……钱迎倩　张士波　邹吉涛（52）
茄属植物原生质体培养和融合……李耿光（59）
禾谷类植物原生质体培养和融合……贾敬芬（71）
禾谷类植物单倍体与作物改良……胡　含（83）
豆科植物生物工程现状……尹光初　周思君（96）
人工种子……郭仲琛　桂耀林（122）
植物染色体工程在品种改良上的应用……方　仁　崔海瑞（128）
植物抗性突变体的发生、选择和应用……缪树华（144）
体细胞无性系变异及其应用……赵成章（176）
高等植物药用次生代谢产物的研究与应用……叶和春　李国凤（181）
药用植物生物工程……丁家宜　向德军　陈　齐（204）
我国植物快速繁殖和无病毒种苗生产的现状和问题……陈维伦（213）
组织培养技术在马铃薯种质保存中的应用……陶国清　章一安　李淑焕　侯林林（243）
组织细胞培养物的超低温保存种质库的建立……简令成（255）

应大力加强我国植物生物技术的发展

周永春

（中国科技促进发展研究中心，北京100038）

解决十几亿中国人的食物问题始终是头等重要的事情。当前，人口不断增加，耕地逐年减少，靠现在还非常落后的农业生产是很难解决的。我国的农业必须加速改造，包括引入先进的组织形式、科学的管理方法以及先进的科学技术。近年来迅速发展的生物技术，它所显示出的最令人鼓舞的前景之一，是在不久的将来人类不再为食物紧缺所困扰。也就是说，生物技术为人类最终解决食物问题提供了可能。其中，植物生物技术是极为重要的一种手段。

（一）植物生物技术推进种植业革命

17年前，重新组合生物遗传物质的工作获得成功之后，人们立刻意识到了它的重要的理论价值和潜在的广泛应用前景。由此，人类开始跨进了可以按照自己的意愿改造生物或设计构建新生物的时代。

1.应用基因工程技术和细胞工程技术，人们可以创造出用传统方法难于或不可能创造的有重要经济价值的植物新种或新品系，从而提高农作物的产量和质量，提高农作物的抗逆性和遗传多样性。

自80年代初，美国科学家用基因工程方法把贮藏蛋白基因转入马铃薯和向日葵，成功地获得富含蛋白质的“肉土豆”和“向日葵豆”之后，基因工程育种工作进展很快。现在，一些研究成果已从实验室转入了田间试验。

全世界每年被病虫草害夺走大约1/3的谷物收成。有人估计，造成的经济损失每年达1,200亿美元以上。为了对付病虫草害，全世界每年还要生产大约200多万吨的农药。因此，培育抗病虫、抗除草剂的农作物新品种受到了极大的重视。目前，用基因工程方法培育成的植物新品种有：（1）可以抗虫害的番茄和棉花。这类品种不但可以避免害虫危害造成的损失，而且将大大减少农药的用量，从而降低生产成本，并减少对环境的污染。（2）可以抗除草剂的番茄、烟草、甜菜和玉米。这类新品种可以减少除草剂的使用次数。例如，欧洲的甜菜种植者用于灭除杂草的费用比种子费用多2—3倍，当抗除草剂的甜菜新品种广泛应用时，只要喷洒1—2次除草剂就可以收到通常喷洒6—7次的效果，因而大大降低了生产成本。此外，还培育成了可以使羊毛快速生长的苜蓿。这是把豌豆种子中的含硫氨基酸基因转入苜蓿中育成的苜蓿新品种。这种苜蓿叶片能生产含硫蛋白质。当用这种苜蓿喂羊时，可使羊毛产量提高5％。

但是，迄今为止，重要粮食作物的基因工程育种工作尚未取得重大突破。美国有人估计，在今后5—7年内，通过基因工程技术将把一些主要生产性状赋予大豆、水稻、玉米、小麦等重要粮食作物。

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

与基因工程育种相比，较为容易的细胞工程育种，特别是花培育种已取得了很大成绩。目前，已培育出了水稻、小麦、草莓、烟草等许多种植物的新品种。例如，美国培育出了蛋白质含量比普通水稻高10％，赖氨酸含量达5—7％的水稻新品种，日本培育成功“大豆米”，使稻米的蛋白质含量提高10％以上。应用细胞融合技术也已培育出了一些新的植物，如日本育成的“千宝菜”、“甜南瓜”等。

2.应用生物技术可以快速繁殖植物，使植物脱毒复壮。病毒给农业生产造成的损失相当严重，例如，可以使葡萄果实成熟期推迟1—2周，产量下降10—50％，含糖量下降20％以上；被病毒侵染的苹果，一般要减产14—45％，而且品质变劣，不耐贮藏；病毒病常使马铃薯减产50％，甚至更高。目前，对病毒病还没有有效的农药可以防治。但是，采用组织培养的方法可以摆脱侵染的病毒，获得无毒种苗，再经快速繁殖，就可以得到大量健康种苗。

采用组织培养技术繁殖植物的速度要比普通无性繁殖快得多。例如非洲紫罗兰，用叶片扦插法，年繁殖量仅3—4倍，而采用组织培养法快速繁殖，年繁殖量可达10万倍以上。现在，这种技术已被广泛应用于名贵花卉、稀有植物和果树蔬菜等多种植物的优良品种的快速繁殖，并形成了庞大的花卉工业和种苗种薯工业，使种植业走向了工厂化。

发展人工种子也是使植物快速繁殖的一种方法。在制造人工种子的过程中还可以利用基因导入的方法创造出带有抗逆性或某种加工工艺性状的人工种子，也可以加入各种生长调节物质。此外它还具有便于包装、运输、贮存等许多优点。现在，胡萝卜、芹菜等植物的人工种子已经应用于生产。由于人工种子有很高的繁殖系数，有可能在短期内实现优化造林，因此对林业生产可能更有价值。

3.值得特别一提的是，现在科学家们正致力于应用生物技术手段使非豆科植物固氮和提高农作物光合作用效率的研究。这是两个很难又是人们极为关注的问题。一旦取得重大突破，粮食和化肥将不再是使人们困扰的问题。

（二）世界各国重视植物生物技术

以上概要地介绍了生物技术已经和可能对种植业产生的重要影响。不难看出，生物技术的潜力是巨大的。而且，生物技术还在不断发展，新技术不断涌现，例如“反义RNA”技术、“基因剪”技术以及各种有效的转基因和细胞融合技术等。将来，这些技术都将广泛应用于农业领域，并产生重要影响。美国一家集团公司最近对美国的农业生物技术市场做了一个较为乐观的预测。据他们预测，到2000年，美国的农业生物技术市场规模可能超过1500亿美元。其中，仅用生物技术改进的农作物的销售额就将达到950亿美元，占总数额的63％以上。此外，观赏植物和工业原料植物的销售额为70亿美元。两项加起来占总销售额的68％。该项预测认为，美国市场上的农业生物技术产品将以平均每年近50％的速度增长。农业生物技术正以比原先预计快得多的速度向前发展着。

正是由于看到了生物技术的巨大威力和它对种植业已经和可能产生的重要影响，世界各国，无论是发达国家，还是发展中国家，都非常重视植物生物技术的研究开发，前者主要是为了争夺世界农产品市场，获取高额利润，后者则是为了解决食物短缺问题。

美国把生物技术看作是其农业技术革新的关键。孟山都、杜邦等许多大公司都把农业生物技术的研究开发作为其战略重点之一。1988年初，美国召开了一次规模巨大的农业生物技术会议。参加会议的包括企业总裁、公司董事长、银行家、风险投资家、研究所领导人、学

校校长和政府部门负责人共计近千人。这其中，几乎所有的生物技术公司都参加了。可以说，这是农业生物技术发展的一个重要里程碑。最近，美国国家科学基金会资助建立了十个新的植物技术中心，平均每年拨款100多万美元，主要研究改良农作物的新方法。

1986年，日本农林水产省采取官民结合的方式专门成立了一个“生物领域粮食产业技术研究推进机构”，目的在于大力促进企业和社会团体在农林牧渔和食品工业领域进行生物技术研究开发。

英国帝国化学工业公司最近兼并了几家种子公司，把玉米、大豆和小麦作为开发重点，年投入研究开发经费2,600万美元。联邦德国的一些大企业也相继兼并种子公司，进行农业生物技术的研究开发。欧洲共同体的尤里卡计划，迄今公布的38个生物技术项目中，与农业有关的有11个，总经费为6,075万欧洲货币单位。

巴西也非常重视植物生物技术。最近，由政府部门成立了一个大型农业研究公司，该公司拥有800名高级研究人员，年度预算为1.5亿美元。

总之，在世界范围内，发展植物生物技术的势头越来越强，其结果必然导致农业生产发生革命性变化，从而为解决人类的食物问题做出重要贡献。

（三）我国发展植物生物技术的优势

1.植物资源种类繁多　人们为了创造优良的作物品种，特别注重收集和利用植物种质资源，特别是具有潜在价值的野生植物资源。我国地域广阔，从北至南地跨寒温热三带，因此植物资源种类繁多，仅高等植物就有27,000种左右。目前，全国栽培的植物大约2300种，还不到总数的十分之一，可以说，还有着巨大的开发利用潜力。在为数众多的野生植物中，又以提供食物、医药、油料、纤维、香精油等具有重要经济价值的植物为多，已查明的就有2,400余种。这些野生植物是从事植物基因工程和细胞工程研究的重要种质资源，是发展我国植物生物技术的宝贵财富。另外，光敏核不育水稻是我国独有的重要粮食作物种质资源，可以说是具有战略意义的资源。

2.植物组织培养技术处于世界领先水平　我国的植物组织培养技术普及程度和技术水平均居世界领先地位。迄今，应用组培技术已培育成功40多种花粉植物，而且主要粮食作物小麦、水稻的花培新品种已大面积推广应用于生产。在我国，凡具备组织培养条件的单位几乎都开展了植物快繁工作，研究对象达数百种。目前，快繁马铃薯无毒种苗种薯已大面积推广，并且已建立了甘蔗、香蕉、马铃薯等植物的种苗工厂，使种苗生产开始走向工业化。特别值得一提的是，我国已成功地将水稻、玉米、小麦、大豆等重要粮食作物的原生质体再生成植株。目前，世界上原生质体再生植株成功的植物已有100多种，但重要禾本科植物和豆类原生质体再生成植株却一直是世界公认的一个难题。我国所获得的成功，标志着我国的科学家已率先掌握了一种非常有效的技术手段。这为通过细胞杂交和导入外源基因等遗传操作方法培育良种甚至创造新的生物提供了有利的基础条件，开辟了广阔的应用前景。

如果我们能充分发挥这两个优势，充分利用各种有效的转基因手段，遗传工程对我国种植业发生重大影响的时间也许会提前，因此，我们绝不要低估自己的力量，亦绝不要贻误时机。

（四）结语

本文强调发展植物生物技术的重要性，并没有丝毫意思说其他方面的生物技术不重要。

在农业领域，发展动物生物技术，培育动物新品种，以及研究和开发防治动植物疾病的药物和手段；在医药卫生领域，应用生物技术研究和开发人类重大疾病的诊断和治疗药物，改造抗生素等医药工业；在轻工食品领域，应用生物技术改造传统的发酵工业和研究开发新产品等都对我国国民经济发展、提高人民的健康和营养水平有着重要意义，都是我国今后二、三十年内生物技术发展的重要任务。

之所以强调加强植物生物技术发展，主要是因为，在这方面，与其他国家相比，我们可能更具有自己的特色和优势。加强植物生物技术发展，不仅在解决食物问题方面将起着重要作用，而且最终能在世界生物技术产品市场中一较高低的，可能主要也是植物生物技术产品。因此，有必要更好地筹划一下发展格局，在现有基础上再采取一些行之有效的措施，创造一个良好的研究开发环境，使我国的植物生物技术发展得更快些。

植物基因工程进展

莽克强

（中国科学院微生物研究所，北京100080）

（一）植物基因工程的回顾和展望

从1974年研究Ti质粒开始至今已15年，这期间植物基因工程取得了比预期要快得多的进展，重要的突破集中在以下两方面：

1.外源基因转入植物体内的方法不断改进

1983年整合型的Ti质粒和双元型T_i质粒转化系统的建立，使外源基因可高频率地整合至受体染色体中并获得高效表达[1]。

1985—1986年，利用PEG或电激法（electroporation），或两者结合将外源基因导入植物原生质体，从而克服了Ti质粒作为载体时狭隘的寄主范围的限制[2]。

1985—1988年，利用基因枪有可能将外源基因不仅导入细胞核，也有可能进入其它细胞器，如叶绿体DNA中[4]。

由于外源基因转化方法的逐步成熟、完善，同时结合利用微生物学、分子生物学、病毒学的基础知识，将有价值的基因相继转入烟草、番茄、马铃薯和棉花等经济作物，已获得一批抗除莠剂、抗病毒、抗虫等的转基因植物，有些已在大田试验中。

2.植物组织培养和植物原生质体再生成完整植株技术的不断突破　单子叶植物，特别是禾谷类大田作物原生质体再生成完整植株一直是国内外有关科学家渴望攻破的难关。近5年来，水稻、玉米、小麦等重要粮食作物在这方面的研究相继在国内外有所突破[5-7]。大豆等豆科作物也已成功[8]。加之多种转化方法已趋成熟，将有价值的外源基因导入重要粮食作物的条件已完全具备，预计今后2—3年内出现一批抗病、抗虫或品质优良的水稻、玉米、小麦等转基因植物是有充分科学根据的。的确，已经出现的一批具有新的遗传稳定性状的转基因经济作物和预见将会问世的有经济价值的转基因粮食作物，大大地鼓舞了人们利用基因工程提高作物抗性和改良品质的信心。利用基因工程较快地培育新品种的新途径已初露曙光。然而，还应冷静地看到利用植物基因工程改良作物性状和品质目前要解决的是如何从丰富的植物基因库中发掘、定位、分离有价值的目的基因；如何控制外源基因在受体中能高效地在某器官或组织中、在特定的发育阶段内表达。目前大多数有价值的目的基因来自细菌、病毒，外源基因在植物体内表达的水平，以及时、空的调控远远没有解决。这两方面问题的解决有待于植物分子生物学、植物生理生化、植物病理学在以下重要领域中积累资料：

1. 植物病原菌与寄主的相互作用；植物抗病毒、细菌或真菌等病原菌的分子机理；
2. 植物抗逆（旱、盐、碱）的分子机理；
3. 植物基因组结构，基因的表达与调控，基因表达的组织特异性与发育阶段的关系；

4. 定位、分离有价值基因技术的改进；

5. 植物细胞分化和脱分化的机理；

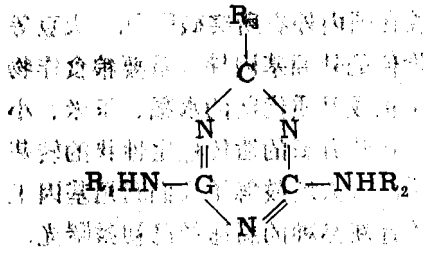
6.光合作用的分子生物学。

只有上述诸问题的突破，植物基因工程方能出现另一次较大飞跃，也只有经过这样的飞跃，植物基因工程才会对农业生产产生较全面的深远影响。这个积累和突破的难度要远远大于1974—1989在转化方法和组培方面所遇到的问题。过去10多年所突破的大多是原核生物，如土壤农杆菌、苏云金杆菌、沙门氏杆菌或各种植物病毒的问题，所探索的组织培养方法大多是实验性或经验性的，而今后所涉及的是基因组至少要大1—2个数量级的高等植物，所要阐明的问题不仅与各种复杂的代谢途径有关，而且与外界光线、温度、营养等调控因子密切相关，它们彼此形成极为复杂的相互调控体系。因此，可以预言，在本世纪末或下世纪初有可能出现人们所向往的另一次更大的飞跃。

（二）抗除莠剂的转基因植物

目前至少有10余类、180多种除莠剂。已推广的多为广谱廉价者。发展更好，成本更低的除莠剂并非容易，且投资较大。若利用基因工程方法增加除莠剂种类、扩大除莠剂的应用范围的策略，所需投资不过是设计新型除莠剂的1—5%。国外各大产家都有各自的传统的除莠剂产品，并占有独特市场，为此各大公司竞相发展与传统产品配套的抗除莠剂作物，如Ciba-Geigy以生产阿特拉津（Atrazine）著称，用于玉米的销售额约占18种除莠剂总量的1/4。玉米虽天然抗此农药，但下茬作物大豆对此药敏感，对玉米有效剂量的残毒足以伤害大豆，使产量下降。假若大豆主要品种是抗药的，则Atrazine的销售额可增加2—3倍，其效益约为1.2亿美元。自1983年以来，国外各大公司已利用植物基因工程方法培育了多种抗除莠作物，分述如下[9]。

1.抗均三氮苯类 Atrazine和Simazine（西玛津）即为此类除莠剂。其化学结构之母核为：



Atrazine R_1: C_2H_5

R_2: C_3H_7

R_3: Cl

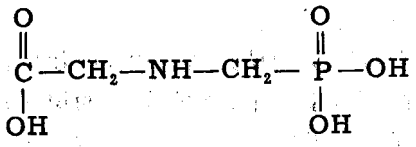
Simazine R_1: C_2H_5

R_2: C_2H_5

R_3: Cl

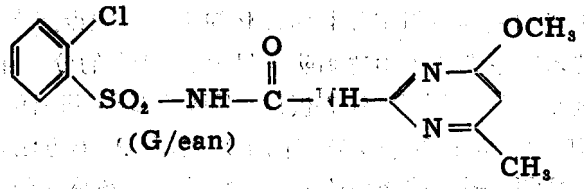
此类除草剂作用机理为特异地与光合系统Ⅱ反应中心内负责电子传递的32kDa蛋白结合，从而阻断电子传递，若将32kDa蛋白与之结合的第264位氨基酸Ser改为Gly则不能与Atrazine结合而表现出抗性。玉米、高粱天然抗此类除莠剂在于含有Glutathione-s-transferase的同工酶，它能迅速地先于32kDa蛋白与Atrazine结合而解毒。Ciba-Geigy公司人工合成与上述同工酶极相似的基因，转入烟草体内而获抗性。国内利用微量注射含有龙葵的抗Atrazine的32kD$_a$蛋白基因（psbA）的中间载体质粒，注入大豆子房而获得抗性植株。

2.抗草甘膦（又名镇草宁Glyphosate），商品名为Round up，结构式为：



是应用最广泛的一种非选择性除莠剂，其作用机制是破坏植物体内三种芳香族氨基酸（Phe、Tyr、Try）生物合成途径中的关键酶EPSP（5-Enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase），据此Calgene公司将*Solmonella typhimurium*在含有草甘膦的培养基上筛选抗性菌株，定位该抗性基因为aroA，即编码421个氨基酸的EPSP酶。突变的EPSP与Wt型比较只有一个氨基酸被替换，且对草甘膦不敏感，与它的亲和力只有Wt型的1/4。将此突变基因通过T_i质粒转化烟草、番茄、大豆、油菜已成功，向棉花、玉米中转化在进行中。Monsanto公司则将EPSP基因经修饰后转至烟草或奶牛体内，被修饰的EPSP基因可过量地被表达，可补赏草甘膦所破坏的EPSP而表现抗性。

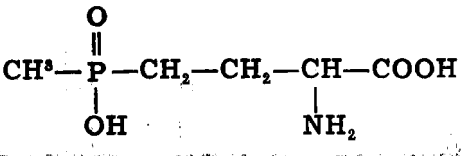
3.抗磺酰脲类（Sulfonylurea）和咪唑啉酮类（Imidazalinone）是应用较广的新型除莠剂，如磺酰脲类的Glean（商品名）即Chlorosulfuron，Oust即Sulfometuro，这两



(G/ean)

大类都是破坏植物三种分枝氨基酸（Val，Leu和Ieu）生物合成途径中的关键酶，乙酰乳酸合成酶（Acetolactate Synthase，ALS）。Du Pont等公司从Solmonella抗性突变体中定位分离出编码ALS基因ilv-G，转入烟草。利用体细胞变异也筛选出具抗性的玉米和甜菜。

4.抗phosphinothricin（ppt）。ppt也是欧洲应用较广的非选择性除莠剂：



它是谷氨酰胺合成酶（Glutamine Sythetase，GS）极强的抑制剂，由于阻断以下反应引起氨的积累而致死。

$$\text{Glutamate} + NH_4 + ATP \xrightarrow{GS} \text{Glutamine} + H_2O\text{-Pi}$$

比利时Plant Genetic system公司从*Streptomyces hygroscopiens*中筛选出编码ppt-乙酰-转移酶（ppt-Acetyl transferase）基因并转入烟草、马铃薯、苜蓿、花椰菜、甜菜等作物。该酶在植物体内可高效地将ppt转换为无毒的乙酰型。1989年转基因的马铃薯大田试验效果良好。

获得抗性工程植株不过是成功的第一步，还必须经受大田试验的考验，因为抗性工程植株的产量往往比原初材料的产量低，这是由于工程植株所含突变基因如32kDa蛋白或EPSP的突变基因往往对植物本身的正常代谢不利；此外这些抗性的遗传稳定性也应通过大田进一

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

步证明。

（三）抗病毒的基因工程植物

长期以来，植物病毒病害的防治主要靠抗病育种、防治媒介昆虫和合理栽培管理。倍受欢迎的抗病品种需长时间的选育、还有退化的危险。病毒分子生物学知识的积累并结合近代植物基因工程技术，为培育抗病毒品种提供了多种颇有希望的新途径，归纳起来，目前有如下几种可能的路线：

1.利用病毒外壳蛋白基因抑制病毒脱壳；

2.利用反意RNA阻断病毒复制；

3.利用卫星RNA干扰病毒复制；

4.利用Ribozyme裂解病毒基因组；

5.利用抗体中病毒复制的关键酶蛋白质。

现重点介绍目前已有明显大田效果的第一种路线。

50多年前就知道植物病毒弱株侵染可保护寄主不受强株的再侵染，对此种保护反应的解释有多种：可能是弱株抢先的复制干扰了后来的强株；也可能寄主体内已有的强株外壳蛋白将后来的强株的基因组RNA重新包壳。将外壳蛋白注入寄主体内或在体外与接种源混合有抑制病毒侵染的作用。因此，当80年代初植物基因工程载体即将问世时，就设想有可能将病毒外壳蛋白基因利用基因工程方法转入寄主染色体中达到防病目的。TMV的分子生物学是比较清楚的，理所当然首先被选作试验材料。TMV-外壳蛋白（TMV-CP）基因位于TMV-RNA，全长6395碱基，近3′-端的第5712—6188碱基位置（图1）利用rDNA方法合成该段基因的cDNA，并克隆、扩增，将该cDNA插入整合型的或双元型的中间载体质粒，通过三亲交配，外壳蛋白cDNA整合至一个被改造过的农杆菌T_i质粒的T-DNA区域中。所谓被改造是该Ti质粒T-DNA区域内有害的致瘤基因已被去掉，该农杆菌感染寄主叶片伤口，进入寄主细胞，TMV-外壳蛋白基因借助T-DNA天然整合能力进入寄主细胞染色体。被转化细

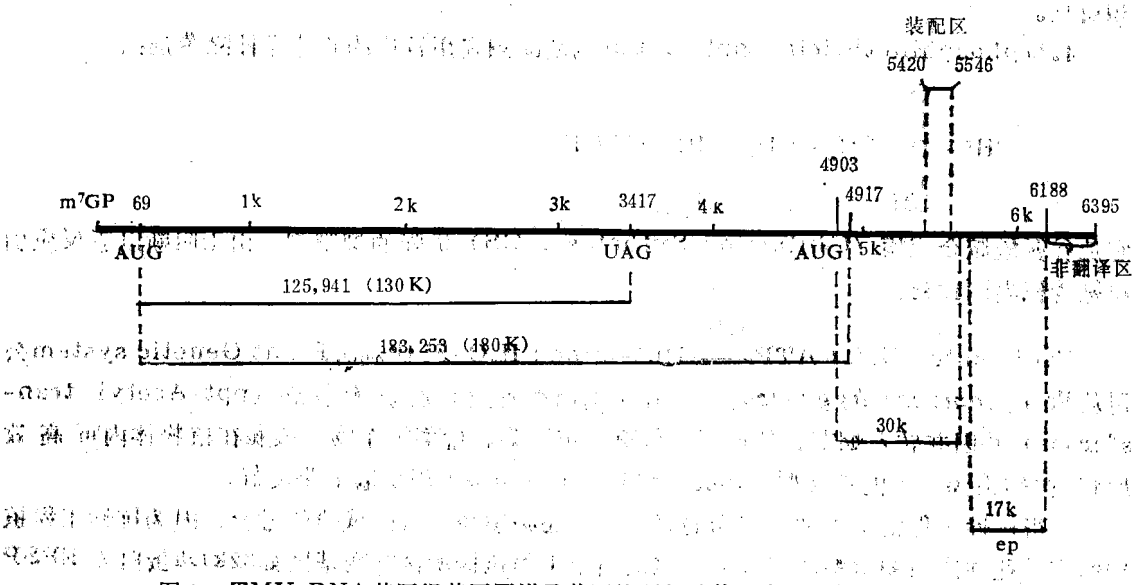


图1 TMV-RNA基因组基因图谱及基因编码的结构蛋白和功能蛋白的ORF

胞进一步形成愈伤组织，最后分化出完整植株。TMV-cDNA在工程植株内被转录，Northern blot法检验，CP-mRNA占烟草总RNA量的0.005—0.01%。最终的外壳蛋白翻译产物用Western blot测定可达烟叶可溶性总蛋白的0.1—0.2%。用0.5μg/ml纯TMV接种测定抗性，所有转基因的工程烟草都有不同程度的耐病或抗病性，不少植株接种后40—50天不显症状；少数在2—3个月后直至花期无任何病状，抗病性往往与cp基因的表达水平成正相关。经遗传分析，TMV-cp基因可通过有性繁殖按孟德尔定律的显性3:1比例分离[10,11]。

采用相同思路和方法，国外已获得TMV(Tobamovirus)的烟草、番茄[12]；抗CMV(Cucumovirus)的烟草、番茄[13]；抗PVX(Potexvirus)或PVY(Potyvirus)的马铃薯，以及抗AMV的苜蓿[14](Alfalfa mosaic Virus Group)等，有的已进入大田试验。中国科学院已获得抗TMV或CMV，或具双抗的烟草。显然，利用类似策略可能获得抗上述5组内的其它病毒成员的植株，并进一步选育出可应用的品种。上述植物病毒都是基因组为ssRNA的正链病毒，至于ssRNA的负链病毒，如植物弹状病毒、dsRNA植物病毒、DNA植物病毒是否用该路线也能奏效有待证实。

为什么病毒外壳蛋白能赋予寄主植物抗性呢？普遍认为是已存在于体内的少量外壳蛋白可抑制致毒的超侵（Superinfection）病毒的脱壳。因为若以TMV-RNA，或预先以PH 8.0缓冲液处理剥去5′-端少量外壳蛋白亚基的不完整病毒颗粒接种，就能克服这种抗性。已知TMV颗粒的脱壳是与翻译同时进行的，即脱壳裸露出RNA后立即与核糖体结合，进行翻译，边脱壳边翻译。因此，很可能抑制发生在核糖体与5′-端前导序列结合之前。工程植株中的外壳蛋白或亚基聚集体的自我聚集、装配的特性改变了脱壳最适的动态平衡条件而使超侵染病毒颗粒保持完整状态而无法进行翻译。

已知有些植物病毒，如CMV、TRSV（烟草环斑病毒）有卫星RNA，某些卫星RNA可干扰同源病毒的复制而减轻症状。CMV的卫星RNA（$CARNA_5$）的cDNA已被合成并转入烟草或番茄获得耐病或抗病性，但至今未见有大田试验报道[15]。该路线最大缺点是：1.卫星RNA在不同寄主上有可能产生使症状严重的反应；2.只有少数几个病毒有卫星RNA。

利用反意RNA片段封闭病毒基因组上重要的片段，如病毒复制酶结合位点、病毒装配位点、核糖体结合位点，从而阻断病毒复制达到防病目的在理论上是完全可能的，国外已利用CMV、PVY探索，尚未见有成功的报道。

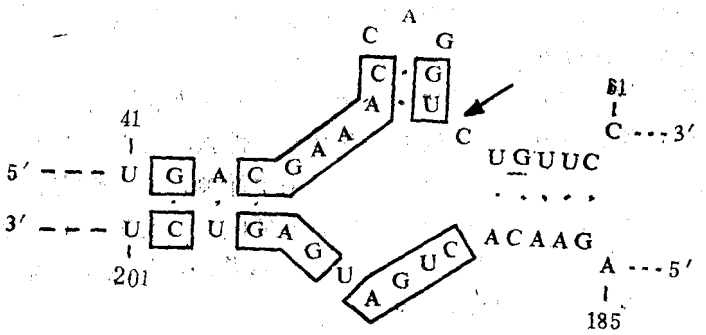


图2　鳄梨日灼病类病毒

类病毒（Viroid）如鳄梨日灼类病毒（*Avocado sunblotch*）（图2）拟病毒(*Virusoid*）如羽扇豆暂时性条纹病毒（*Lucerne transient* streak virus；LTSV）、绒烟斑驳病毒（*Velvet Tobacco* Mottle Virus），以及卫星RNA如烟环斑病毒的卫星RNA，这些碱基只有300多个的小RNA的复制都是滚环式的，先合成一个大链条，然后经自我裂解，断成若干个与原基因组相同的单体分子。自我裂解的机理虽尚未完全阐明，但已知必需形成一个所谓锤头状的二级结构（图3），该结构有13-17个碱基的保守序列。有这种结构，不需要有蛋白的存在，只需Mg^{++}存在其磷酸二酯键的骨架，可在特异位点（箭头所指）被裂解产生5′-OH和2′,-3′-环化磷酸二酯键的末端。最近人工合成13-mer寡核苷酸称之为ribozyme，与LTSV的一个41-mer的寡核苷酸底物恰好配对形成锤头结构，在有Mg^{++}存在下也在相同的特异位点处被裂解[16]。Ribozyme与底物的关系很象是一个裂解性的反意RNA，利用此原理可设计并合成寡核苷酸来裂解病原毒的基因组，目前正在探索、试验阶段，未见成功的报道。

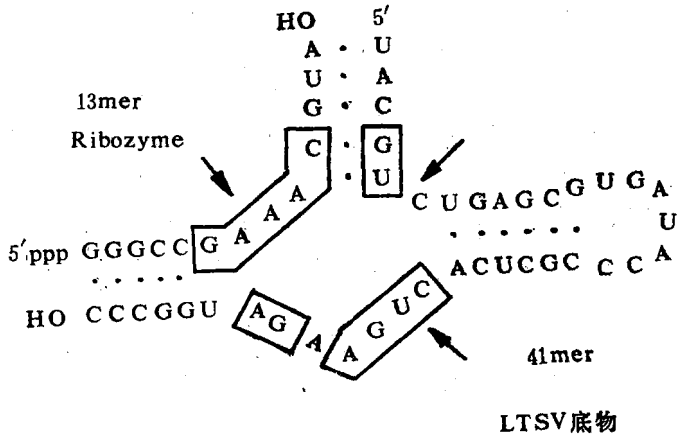


图3 锤头状二级结构

不少植物病毒，尤其是ssRNA病毒的基因组的结构基因产物，甚至其功能均已了解，如TMV的30kDa蛋白负责病毒在体内的运转，利用cDNA重组技术可获得足够量30kDa蛋白作抗原，分离、克隆其抗体基因并转入寄主植物染色体，利用该抗体基因的表达产物中和入侵病毒的有功能的30kDa蛋白达到防治目的，目前处于试验阶段，未见成功报道。

（四）抗虫的基因工程植物

苏云金杆菌（*Bacillus thuringiensis*，BT）作为有效的生物杀虫剂，国内外利用其防治鳞翅目害虫已有20多年的历史，其最大优点是专一性强，对人畜无害，效果好，且可生物降解无残毒。其缺点是在自然界易被阳光钝化、雨水冲掉，成本较高。近10多年BT的分子生物学知识已证明有杀虫作用的是该菌的伴孢晶体蛋白。该蛋白占菌体总蛋白的30%，并由质粒（40—50MDa）或染色体或两者兼有所编码，该基因已被定位、克隆，序列分析为植物基因工程提供了极为有价值的目的基因。

苏云金杆菌是生物学中极为复杂的群体，其分类是首先根据杆菌鞭毛H-抗原的血清学反应，归纳至少为20多种H-血清型。根据血清型以及生理生化性质和杀虫谱的不同，将不

同血清型归类定为变种（Varieties）。如杀鳞翅目害虫*kustaki*变种；杀双翅目*israelensis*变种；杀鞘翅目的*tenebrionis*和San *diego*变种。一般而言，H-血清型与晶体蛋白的血清型有相关性，但也有例外，如*var. kustaki*就有K_1或K-73两种晶体蛋白。不同血清型可能有相同的晶体蛋白。即使具有同一种晶体蛋白，其杀虫谱和相对毒性也可能不同。根据这些差别，变种以下可区分出若干株系，如*var. kustaki*分区分*HD*-1、HD-249……等。这种复杂性充分说明在自然界该菌会频繁发生质粒的交换，甚致不同的晶体蛋白的基因之间发生重组而产生新的株系。

目前国内外BT毒蛋白的基因大都来自广泛应用的商品化的*kustaki*变种。根据几十种株系的分子杂交分析，它们的晶体蛋白基因不外是三种，即特异探针能与之杂交的三类HindⅢ片段：4.5、5.3和6.6kb。如4.5kb型的可编码1156aa，130.69kDa；5.3kb型编码115.5aa，130.53kDa。完整蛋白杀伤昆虫的有效部分在N′-端大约600aa以上，分子量在60kDa。

自1987年以来，美国三大公司Monsanto，Agricetuo和Agrigenetics和欧洲的PGS公司相继将HD_1或Var。berliner1715的毒蛋白基因转入烟草、番茄和棉花而获得抗虫性，正在进行大田试验中。中国科学院于1988年也分离到HD-1 5.3kb和6.6kb两种类型并转入烟草[17-19]。

含BT-毒蛋白的工程植物防虫尚待解决的问题是：表达量尚需进一步提高；解决针对某种特定害虫所需组织特异性表达和昆虫抗毒性产生的问题。

另一类资源也相当丰富的抗虫基因是蛋白酶抑制剂基因。动物包括昆虫以及微生物体内存在着有限的蛋白质裂解，消化是代谢的生理生化过程所必需的。大多数动物和很多微生物所利用的内切蛋白酶和胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶这类丝氨酸蛋白酶却鲜为植物所利用。做为一种自然防御体系，植物组织内贮藏着相当丰富的蛋白酶抑制剂来对付病菌和昆虫的侵袭。植物的大多数贮藏器官，如种子、块茎含总蛋白量1—10%，甚至有些果实含50%的丝氨酸蛋白酶抑制剂。现已从马铃薯、大豆、南瓜、番茄、大麦、红豆等植物中分离、纯化出多种丝氨酸蛋白酶抑制剂的基因或cDNA已被克隆。

蛋白酶抑制剂对昆虫的杀伤不象BT-毒蛋白那样有高度特异的昆虫范围，而是广谱的，对鳞翅目和鞘翅目都有作用。目前利用基因工程方法将蛋白酶抑制剂基因转入植物体内的有：1.豇豆的胰蛋白酶抑制剂的cDNA被转入烟草，其表达量约为叶可溶性蛋白的1%。该工程烟草对烟芽夜蛾有显著抗性（1987）[20]；2.马铃薯蛋白酶抑制-Ⅱ的基因转至烟草，已证明有mRNA的表达，未见有抑制剂的积累（1987）[21]；3.番茄的抑制剂-Ⅰ的基因与CAT基因融合转至烟草或番茄[22]。

（五）作物蛋白质品质的改良

众所周知，人畜的重要蛋白质来源之一是植物蛋白质，它主要来自禾谷类、豆类和块根类作物，来源广泛，价格便宜，但遗憾的是其蛋白质量不尽人意，缺少某些必需氨基酸。一般说禾谷类蛋白缺乏lys和try，而豆类和块根类的含硫氨基酸，如缺少Met和Cys。氨基酸的不平衡大大降低营养价值。再者，食品加工往往要求不同蛋白质品质，如面包生产要求小麦储藏蛋白的麦谷蛋白比例大，以加强面团的弹性。而制造饼干只要求有足够的延展性，不要求更高的弹性。对啤酒用大麦则要求较低的蛋白质含量。过去利用常规育种在这些方面已取得了一定进展，但花费时间多而且在某些方面进展不大，如豆类作物中含硫氨基酸的量经

30年努力收效不大。目前利用基因工程方法解决这类问题的条件已基本具备，并日趋成熟。首先，主要作物贮藏蛋白的生化、遗传学、分子生物学背景材料已有相当积累，如扁豆蛋白（phaseolin）、玉米多种醇溶蛋白、小麦醇溶蛋白和麦谷蛋白，豆类贮藏蛋白的豆球蛋白（legumin）等蛋白的基因或cDNA已被克隆，一级结构已阐明，有的基因也已定位，如小麦的贮藏蛋白，有的已在异源双子叶植物中表达，积累了一些表达调控的规律，如小麦谷蛋白和扁豆蛋白。所有这些知识都为设计插入某种外源基因或如何改造某一结构基因，如何在正确的发育阶段、正确的组织内表达提供了必要的条件。其次，禾本科主要作物，如水稻、小麦、玉米和豆类植物的(如大豆、牧草等)组培技术的突破才使之成为可能。第三，目前有多途径的转化方法可选用，这就大大增加了成功的机率。据此可乐观地预料今后几年内会出现令人鼓舞的突破。

取材自然是植物体内已有的较小分子量且富集高含量含硫氨基酸的蛋白质，转入适当受体往往是改良作物蛋白品质的捷径，如巴西豆（*Brazil nut*；*Beriholletia excela*）种子内含12kDa的小蛋白，占种子总蛋白的30%，含Met 17.9%，cys 8.7%，以1%比例与大豆粉混合饲喂日本鹌鹑，确能增加生长速率。该蛋白的cDNA已合成，与扁豆蛋白基因的启动子和终止子等元件构成嵌合基因，以双元Ti质粒载体转入烟草，通过Km筛选，Southern、Western blol检测，证明该基因在转基因烟草种子中被表达，表达量约为种子总蛋白的5%[2]。另外如玉米醇溶蛋白中的10kDa蛋白含met高达23.5%，该蛋白cDNA已被合成，全序列已搞清楚，该蛋白由129个氨基酸残基组成外，另有21个氨基酸构成信号多肽，可在胚乳中沉积成蛋白小体。显然该蛋白也是值得利用的外源基因。

（六）抗细菌的基因工程

植物抗病性遗传分析的著名理论——基因对基因学说——认为在寄主-寄生物体系中，寄主体内某显性抗性基因的抗性只有当同时存在某生理小种的、与抗性基因互补的显性的无毒力基因（avirulence gene）的表达，才能表现出来。近年来，根据该理论，利用基因工程，结合微生物转座子标记突变技术以及无毒力基因转移后检测其功能的方法，对一些重要的植物病原细菌致病性基因和无毒力基因的分析有较大进展，如[24-26]：

Xanthomonas compestris pv *malyacearum*；*Xanthomonas compestris* pv *oryzae*；*Xanthomonas compestris* pv *Vesicatoria*；*Xanthomonas Compestris* pv *compestris*；*Pseudomonas syringse* pv *glyclnea*；*Pseudomonas syringae* pv *tabaci*；*Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*；*Pseudomonas solanacearum*；*Erwinia carotovora*；*Erwinia chrysanthemi*；*Erwinia amylovora*。

对这些病原菌的致病性基因或无毒力基因的数量、定位、分离、克隆、结构、功能等都有了较多的、不同程度的了解。无疑，这些基本知识有助于进一步在分子水平上了解鉴别小种，阐明致病性的分子机理，病原菌与寄主的相互作用，甚至有可能利用无毒力基因及其产物追踪分离寄主抗性基因（假若不相容的抗性体系中抗性基因产物与互补的无毒力基因产物是直接地识别）。

相比之下，用相似技术路线对寄主抗性基因的研究进展不理想，希望寄托在采用新方法克隆抗性基因。如：1.RFLP法（DNA限制性片段长度多型性）结合染色体步行法（chro-

mosome walking）的基因连锁分析，建立遗传图谱，根据图谱定位、克隆目的基因[27,28]；2.利用植物转座子标记法，分离、克隆植物抗性基因[29]。这些方法不仅工作量大，还需一定的资料和材料的积累，以及基础研究的支持，预计3～5年后可能有所突破。

另一引人注目的途径是利用昆虫体内抗菌肽，已知天蚕（*Hyalophora cecropia*）由于细菌侵染可诱导体液内产生天然防御体系。已知有如下抗菌肽被鉴定[30]：Cecropin 4kDa 57aa，二个相关基因编码，A，B，D三种类型，有高度同源；Attactin 20kDa 168aa，由二个基因编码，至少5种类型，3个碱性，2个酸性，互有约76%同源；Lysozyme ～15kDa 122aa（不包括先导肽）。

表1 病原物的抗病能力

病原物	Cecropjn A的致死浓度（μmol/l）
Escherichia speeies	0.28—0.36
Psendomonas specis（4种）	0.98—1.27
Erwinia speeies（3种）	1.17—5.28
Claribactes michigauensis	5.27
Xanthomonas speeies	1.27—5.77

这三种短肽的基因已被克隆（cDNA），利用成熟的、适当的载体或直接的转化方法，导入重要的禾谷类或双子叶作物是较有把握的，最终筛选出具有抗性的工程植株是令人乐观观的。

以上是近年来进展较快的5个方面，有些将见经济效益，有的在大田试验中，有的颇有希望。此外，从植物自然防御反应探索植物抗病机理也逐步引起注意，如植物受引发子（elicitor），机械损伤以及微生物侵染所诱发的一系列防御反应——木质素、多酚化合物在细胞壁上的沉积，HRGP（富含羟基脯氨酸糖蛋白）的积累，蛋白酶抑制剂、裂解酶（几丁酶、葡萄糖聚合酶）的合成以及PR蛋白（pathogenesis-related protein）的形成等，正在积累这些产物生物合成的代谢途径中关键酶基因结构、功能、及表达调控方面的资料，抗逆、光合、固氮、雄性不育等的分子生物学研究也都在积极的开展。无所置疑，这些基础或应用基础研究将会在本世纪末或下世纪初大大地推动植物基因工程的进一步发展。

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com