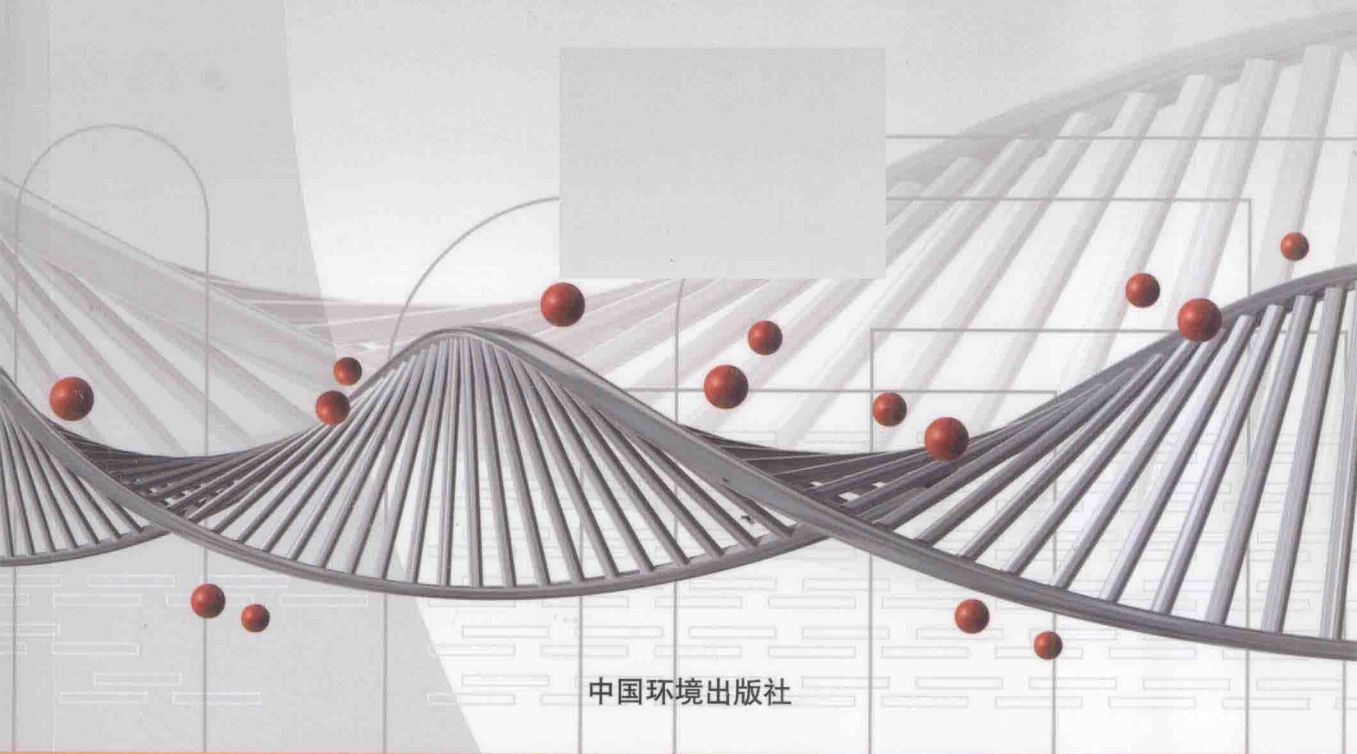


抗虫转基因植物 环境风险评价和监测

ASSESSMENT AND MONITORING ON
ENVIRONMENTAL RISKS OF TRANSGENIC
INSECT-RESISTANT PLANTS

刘 标 等 著



中国环境出版社

抗虫转基因植物环境风险评价和监测

刘 标 等 著

中国环境出版社·北京

图书在版编目 (CIP) 数据

抗虫转基因植物环境风险评价和监测/刘标等著. —北京:
中国环境出版社, 2014.12
ISBN 978-7-5111-2125-7

I. ①抗… II. ①刘… III. ①抗虫性—转基因植物—
环境质量评价—风险评价②抗虫性—转基因植物—环境监
测 IV. ①X8

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 256378 号

出 版 人 王新程
责任编辑 张维平
封面设计 宋 瑞

出版发行 中国环境出版社
(100062 北京市东城区广渠门内大街 16 号)
网 址: <http://www.cesp.com.cn>
电子邮箱: bjgl@cesp.com.cn
联系电话: 010-67112765 (编辑管理部)
010-67112738 (管理图书出版中心)
发行热线: 010-67125803, 010-67113405 (传真)

印 刷 北京中科印刷有限公司
经 销 各地新华书店
版 次 2014 年 12 月第 1 版
印 次 2014 年 12 月第 1 次印刷
开 本 787×1092 1/16
印 张 29.25
字 数 686 千字
定 价 115.00 元

【版权所有。未经许可, 请勿翻印、转载, 违者必究。】
如有缺页、破损、倒装等印装质量问题, 请寄回本社更换

《抗虫转基因植物环境风险评价和监测》

编委会

主 编 刘 标

副主编 方志翔 胡文军 李孝刚 韩 娟 路兴波

编著者 (按汉语拼音排序)

陈良燕 (南京大学环境学院)

方志翔 (环境保护部南京环境科学研究所)

郭汝清 (南京大学生命科学院)

韩 娟 (农业部食物与营养发展研究所)

胡文军 (中国药科大学生命科学与技术学院)

李 凡 (山东省农业科学院植物保护研究所)

李孝刚 (中国科学院南京土壤研究所)

刘 标 (环境保护部南京环境科学研究所)

路兴波 (山东省农业科学院植物保护研究所)

孟 军 (环境保护部南京环境科学研究所)

浦海清 (南京大学环境学院)

孙书存 (南京大学生命科学院)

徐文华 (盐城市农业科学院)

薛 堃 (中央民族大学生命与环境科学学院)

郑央萍 (环境保护部南京环境科学研究所)

统 稿 刘 标

前 言

转基因技术目前已经在世界范围内广泛用于农业、制药、食品、环保等产业，产生了巨大的经济效益和社会效益。在农业领域，2013 年全球转基因作物的种植面积是 1996 年的 100 多倍，转基因抗虫棉也已经在我国进行了近 20 年的大规模生产。总之，转基因技术、转基因生物已经在国内外的社会经济发展中产生了显著的效益。

但是，转基因生物安全性问题一直是转基因产业发展的最主要制约因素。转基因生物安全性问题主要包括食品安全和环境安全两个方面，很多国际组织（如联合国环境规划署、联合国粮农组织）和国家（如美国、日本、欧盟成员国）颁布了转基因生物安全管理的法律法规或指南、规范，实施了以转基因生物的风险评估和风险管理为主要内容的管理措施。科学界也开展了大量的基础研究和调查，积累了丰富的数据。在公益性环保科研专项“转基因大宗农作物环境风险评价技术研究”课题的资助下，我们针对抗虫性状转基因植物环境安全性开展了一些基础研究和调查，本书的内容主要是该课题的阶段性研究成果。

虽然目前科学界已经开展了转基因生物的食品安全、环境安全方面的研究、评价，增进了人类对于转基因生物安全问题的认识，但是，很多人对于转基因生物的安全问题仍然疑虑重重，转基因产品的社会接受程度仍然还有很大的提升空间。我们认为应该从以下 3 个方面看待这个问题。首先，零风险的事物是不存在的，期待某个技术或者产品没有一点点风险是不现实的，转基因技术、转基因产品存在某些风险是一种正常现象。其次，转基因作物替代的是常规的农业生产技术和常规作物，只要前者所产生的效益高于后者、风险低于后者，

而且这些风险可以通过采取管理措施加以克服、解决，我们就应该接受转基因技术和转基因作物。最后，转基因植物的大规模应用历史不足 20 年，其食品安全和环境安全都是需要进行长期的研究和跟踪的。所以，片面地强调转基因技术的安全性与片面地突出转基因生物的不安全性都不是科学的态度。我们的阶段性研究结果也表明，与常规的非转基因作物相比，抗虫转基因植物在某些方面表现出更好的环境效益，也会产生一些环境风险。

本课题立项和研究过程中，得到了环境保护部科技标准司、生态司有关领导的大力支持，课题实施过程中也得到了环境保护部南京环境科学研究所有关领导的鼓励和支持，在此表示衷心感谢。

本书前言由刘标编写，各章的作者分别在每章末尾处注明，全书由刘标统稿。受水平、时间所限，错误之处在所难免，敬请读者不吝指正。

编者

目 录

第一篇 转基因抗虫植物的环境风险评价

第 1 章 植物转基因技术	3
1.1 植物基因转化受体系统	3
1.2 植物外源基因的转化方法	6
1.3 植物基因工程载体上的基因种类及其安全性分析	22
1.4 安全转基因技术	60
参考文献	67
第 2 章 转 <i>Wsa</i> 基因抗蚜棉花的环境风险评价	77
2.1 绪言	77
2.2 转 <i>Wsa</i> 基因抗蚜棉花环境风险评价	77
2.3 讨论	92
参考文献	93
第 3 章 抗虫转 <i>Cry1Ac+Cry2Ab</i> 双价基因棉环境风险评价研究	94
3.1 绪言	94
3.2 转 <i>Cry1Ac+Cry2Ab</i> 双价基因抗虫棉的生存竞争能力研究	95
3.3 转 <i>Cry1Ac+Cry2Ab</i> 双价基因抗虫棉对靶标和非靶标害虫的影响	100
3.4 对捕食性天敌和寄生性天敌的影响	107
3.5 花粉漂移情况调查	109
3.6 对非靶标经济昆虫的影响	110
3.7 对土壤微生物多样性的影响	120
参考文献	131
第 4 章 转基因玉米的环境风险评价	133
4.1 材料与方法	133
4.2 结果与分析	137
4.3 讨论	154
参考文献	157

第 5 章 转 *Bt* 基因棉对棉蚜取食行为和生长发育的影响..... 158

5.1 转 *Bt* 基因棉对棉蚜生长发育的影响..... 160

5.2 转 *Bt* 基因棉对棉蚜取食的影响..... 162

5.3 转 *Bt* 基因棉叶表面特性与棉蚜取食行为的关系..... 173

参考文献..... 181

第 6 章 抗虫转 *Bt* 与转 *Bt/CpTI* 基因棉在不同田间条件下的适合度效应 188

6.1 绪言..... 188

6.2 转 *Bt* 基因与转 *Bt/CpTI* 基因抗虫棉在不同选择压条件下的适合度效应研究 190

参考文献..... 226

附录 抗虫转基因植物生态环境安全检测导则 228

参考文献..... 264

第二篇 转 *Bt* 基因抗虫植物对农业生产方式的影响

第 7 章 抗虫转 *Bt* 基因水稻对营养物质需求和耗水量的影响..... 269

7.1 绪言..... 269

7.2 材料与方法..... 270

7.3 结果与分析..... 271

7.4 结论与讨论..... 279

参考文献..... 283

第 8 章 抗虫转 *Bt* 基因棉花对营养物质需求和耗水量的影响..... 284

8.1 绪言..... 284

8.2 材料与方法..... 285

8.3 结果与分析..... 286

8.4 讨论与结论..... 293

参考文献..... 297

第 9 章 转 *Bt* 基因抗虫棉抗病性下降及其机理研究..... 299

9.1 绪言..... 299

9.2 转基因抗虫棉的根系分泌物成分及其对病原菌的影响 300

9.3 枯萎病菌诱导下转基因抗虫棉抗病相关基因的表达及其功能分析 308

参考文献..... 322

第 10 章 盐城棉区转 *Bt* 基因抗虫棉对棉田生物多样性的影响..... 326

10.1 绪言..... 326

10.2 转基因抗虫棉对棉田节肢动物群落的影响 326

10.3 转基因抗虫棉对棉田主要病害的影响 331

10.4	转基因抗虫棉对主要棉田草害的影响	333
10.5	对转基因抗虫棉生产性状的评估	333

第三篇 转 *Bt* 基因抗虫植物环境风险监测和管理

第 11 章	转基因抗虫棉大规模种植后土壤残留 <i>Bt</i> 蛋白动态检测	337
11.1	一种基于 SDS 溶液高效提取土壤残留 <i>Bt</i> 蛋白的方法	337
11.2	转基因抗虫棉大规模种植后土壤残留 <i>Bt</i> 蛋白动态检测	341
	参考文献	349
第 12 章	转基因玉米 Cry1Ab 蛋白田间残留及降解规律的研究	351
12.1	材料与方法	352
12.2	结果与分析	354
12.3	讨论	356
	参考文献	358
第 13 章	抗虫转 <i>Bt</i> 基因棉花对土壤生态系统的影响	360
13.1	转基因抗虫棉对土壤微生物群落影响的研究	360
13.2	抗虫转基因棉花对土壤生态系统影响的监测	375
13.3	抗生素抗性标记基因向土壤细菌发生水平基因转移的监测	401
	参考文献	414
第 14 章	棉铃虫对抗虫转 <i>Bt</i> 基因棉花产生抗性的监测	417
14.1	转 <i>Bt</i> 基因棉花的生理生化性质	417
14.2	转基因作物对棉铃虫生长发育影响的研究	424
14.3	棉铃虫田间种群对 <i>Bt</i> 毒素抗性基因频率的估算和监测	431
	参考文献	435
第 15 章	中国转基因作物环境风险管理规划	439
15.1	转基因植物安全管理现状	439
15.2	指导思想、基本原则与目标	444
15.3	重点领域与主要任务	447
15.4	保障措施	455

第一篇

转基因抗虫植物的环境风险评价

第1章 植物转基因技术

1.1 植物基因转化受体系统

一般情况下，外源基因不能主动转移到植物细胞中，外源基因的成功转化必须依赖于一个良好的植物基因受体系统。植物的基因转化受体系统就是指用于转化的外植体通过组织培养等途径，能高效、稳定地再生无性系，并接受外源基因整合的一种再生系统。在进行基因转化前，首先必须建立起一个高效的植物基因转化受体系统。

1.1.1 植物基因转化受体系统应具备的基本条件

(1) 高效稳定的再生能力

从理论上说植物体细胞都具有全能性，但实践中发现并非所有的体细胞都能再生出完整植株。细胞的分化程度不同，去分化的能力也不同。用于植物基因转化的外植体必须易于再生、有高的再生频率，并且有良好的稳定性和重复性；同时具备成熟的组织培养条件，保证外源基因转化过的细胞能继续分化成完整的植株，才能作为基因转化的受体系统。

(2) 较高的遗传稳定性

植物受体系统接受外源 DNA 后应不影响自身的分裂和分化，并能稳定地将外源基因遗传给后代，同时保持遗传的稳定性，减少变异。已发现在组织培养中，体细胞无性系常常会发生变异，这种变异与组织培养的方法、再生途径及外植体的基因型等因素密切相关，因此在建立基因转化受体系统时应充分考虑到这些方面的因素。

(3) 具有稳定的外植体来源

由于基因转化的频率很低，需多次反复实验，故需消耗大量的外植体。因此外植体必须容易得到并且可以大量获得。外植体一般采用无菌实生苗的子叶、胚轴、幼叶等。

(4) 对选择抗生素敏感

由于外源基因的转化率低，外源基因转化后需对细胞和植株进行筛选。目前采取的方法多是检查转化细胞或植株是否对某抗生素产生抗性。表达载体上已具有能分解某抗生素的蛋白质分子的基因，该基因就是筛选转化细胞的标记基因。在添加抗生素的培养基上能够生长发育的转化细胞基本可判定为外源基因已经成功转入，同时非转化细胞的生长发育会受阻而最终死亡。受体系统中使用的受体材料要对选择抗生素有一定的敏感性，但该抗生素对受体植物的毒性又不能很大，不能很快杀死细胞，否则即使转化了的细胞也无法存活长大。

此外，植物基因转化的受体系统还应该满足其他的一些要求，如除拟南芥等模式植物外，是否具有经济价值或具有潜在的生产应用价值等。

(5) 能够被农杆菌侵染

如果是利用农杆菌质粒为载体进行植物转化, 还要求植物受体材料能够被农杆菌侵染, 这样才能接受外源基因(王关林, 方宏筠, 2002)。

1.1.2 植物基因转化受体系统的类型及特性

1.1.2.1 愈伤组织再生系统

愈伤组织再生系统是指外植体经诱导产生去分化的愈伤组织, 然后通过分化培养获得再生植株的受体系统。本系统具有以下特点: ①外植体细胞易于接受外源基因, 转化率高; ②获得的转化愈伤组织通过继代扩繁培养, 短时间内就可以得到大量的转化植株; ③外植体来源广泛, 多种组织、器官均可产生愈伤组织; ④适用范围广, 几乎可以适用于每一种通过离体培养途径能再生植株的植物。⑤再生植株无性系常会发生变异, 转化的外源基因遗传稳定性较差; ⑥后代植株中纯合体少, 嵌合体多, 为获得纯合转基因植株, 还需从嵌合体后代中再次筛选。

1.1.2.2 直接分化再生系统

本系统是指外植体细胞不经过产生愈伤组织而直接分化出不定芽获得再生植株。叶片、幼茎、子叶、胚轴等外植体, 均可以直接分化出芽而再生成植株。本系统的特点有: ①获得再生植株的周期短, 操作简单; ②体细胞无性系变异少, 遗传稳定, 外源基因也能稳定遗传; ③对可以通过无性繁殖的园艺植物, 如果树、花卉及某些木本植物来说, 本系统效率很高。④由于外植体直接分化芽比诱导愈伤组织困难, 因此本系统的转化频率低于愈伤组织再生系统; ⑤由于不定芽的再生常起源于多细胞, 因此后代中也会出现较多的嵌合体。

1.1.2.3 原生质体再生系统

原生质体是没有细胞壁的细胞, 它同样能在适当的培养条件下诱导出再生植株。本系统的特点有: ①原生质体无细胞壁, 摄取外源 DNA 的效率; ②通过原生质体培养形成的细胞群体基因型一致, 因此获得的转基因植株嵌合体少; ③原生质体转化受体系统的条件相对稳定和易于控制; ④原生质体培养要经过再生细胞壁、诱导愈伤组织及分化芽等过程, 细胞无性系的变异程度大, 遗传稳定性差。⑤原生质体培养周期长、难度大、再生频率低, 很多植物的原生质体培养系统尚未建立, 因此本系统的使用范围有限。

1.1.2.4 胚状体再生系统

自然条件下有些植物的珠心组织或助细胞可以形成体细胞胚, 这些胚状体可以发育成完整的植物。这种体细胞不经过类似性细胞结合的过程就发育成一个新个体的过程称为体细胞的胚胎发生。在组织培养下任何的体细胞或单倍体细胞都可以产生胚胎细胞, 从而可以进一步培育成完整的植株。该系统是最为理想的基因转化受体系统, 特点如下: ①胚状体由胚性细胞发育而来, 而胚性细胞接受外源 DNA 的能力很强, 故本系统转化率很高。②胚状体的发生多数是单细胞起源, 因此获得的转基因植株嵌合体少。③胚状体具有两极

性,在发育过程中同时可分化出芽和根,形成完整植株,没有一般组织培养过程中较难的生根步骤。④体细胞胚个体间遗传背景一致、无性系变异小、胚的结构完整、成苗快、数量大等许多优点都有利于转基因植株的大面积生产和推广。本系统还是研究体细胞胚胎发生及转化基因表达调控的最佳实验系统。

1.1.2.5 生殖细胞受体系统

生殖细胞受体系统是以花粉粒、卵细胞等生殖细胞为受体进行基因转化的系统,又称种质系统。主要有两种方法:一是单倍体转化系统:将单倍体细胞(如小孢子和卵细胞)进行组织培养,诱导出胚性或愈伤组织,再发育成植株;二是直接利用花粉和卵细胞受精过程进行基因转化,如花粉管导入法、花粉粒浸泡法、子房微注射法等。本系统的特点有:①生殖细胞有很强的接受外源 DNA 的能力,故本方法转化效率非常高;②受体细胞是单倍体,有利于转化后的性状筛选,通过人工加倍即成为纯合的二倍体,极大加快选育进程;③利用植物自身的授粉过程进行,操作方便简单。④该受体系统要受到季节的限制,只能在短暂的开花期内进行,无性繁殖的植物无法采用。

1.1.2.6 叶绿体转化系统

叶绿体转化系统就是将外源基因转入叶绿体基因组中,并使外源基因得到表达。本系统具有如下特点:①外源基因转化效率高,后代表达稳定,有利于多基因的转化。②每个植物细胞都含有多个叶绿体,外源基因导入叶绿体基因组中会使外源基因在细胞中的拷贝数大大增加,与外源基因转入核基因组相比,可大幅提高转化基因的表达效率。③叶绿体的遗传方式不遵循孟德尔遗传规律,是母系遗传,外源基因可在子代中稳定遗传和表达。④目前多种农作物的叶绿体基因组序列仍未知,因此无法将外源基因准确插入叶绿体基因组中。⑤多数禾谷类作物是从胚性细胞发育而来,而这些胚性细胞中只含前质体或未成熟的叶绿体,不适于基因转化。⑥许多农作物的组织培养及筛选技术不完备,难以满足叶绿体转化的需要。因此虽然目前可以成功将外源基因转入部分植物的叶绿体中,但难以广泛推及其他植物(肖尊安,2005)。

1.1.3 植物基因转化受体系统的建立程序

受体系统的建立包括外植体的选择制备、高频再生系统的建立、抗生素的敏感性试验及农杆菌的敏感性试验(以农杆菌介导转化的植物)等,与植物组织培养技术密切相关,但又比一般的组织培养过程更为复杂且要求更高。

1.1.3.1 外植体选择及高频再生系统的建立

在建立高频再生系统中要注意两个方面的问题:一是外植体的选择。要注意到不同类型的外植体在离体培养条件下的反应差异很大,培养的效果也不同。一般外植体主要选择胚、幼穗、顶端分生组织、幼叶、幼茎等。二是最佳培养基成分的确立。培养基是组织培养中最关键的成分,为了获得最佳再生效果,选择合适的培养基是预实验中的一项重要重要的内容。

高频再生系统必须至少具备以下条件:①外植体的组织细胞有再生愈伤组织和完整植

株的能力；②芽的分化率在90%以上；③易于离体培养，重复性高；④体细胞无性系变异小等。

1.1.3.2 抗生素敏感性试验

使用农杆菌转化外源基因时，需将农杆菌与外植体在无抗生素的培养基上共培养一段时间，让农杆菌将外源基因送入外植体。共培养结束后，需将农杆菌杀死或抑制其生长，因为过度生长的农杆菌会妨碍幼嫩的外植体生长，这一步需加入抑制农杆菌生长的抗生素。这类抗生素要能有效抑制农杆菌的生长，又不影响植物的正常生长。外植体形成愈伤组织并分化后，又需要对分化出的组织进行检查，筛选出已被转化的愈伤或组织，这时也需加入抗生素。因此在预实验中需要对抗生素进行试验，确定正式实验中使用的抗生素种类和浓度。

1.1.3.3 农杆菌的敏感性试验及菌种的选择

通过农杆菌转化外源基因是目前使用最多的，也是最成功的转化系统，但不同植物或同一植物的不同组织对菌株的敏感性都大不相同。因此在预实验中需通过试验找到最合适的菌株（周鹏，2008）。

1.2 植物外源基因的转化方法

目前转基因的系统和方法主要可分为三类：一是利用载体系统的转化。先将外源基因与载体在体外连接成重组分子，再通过农杆菌和/或病毒将重组分子转入植物细胞。这是目前使用最多的方法。二是直接导入法。外源基因可不必先与载体连接，可直接以“裸露”状态被送入植物内。这类方法又可分为物理和化学方法两类，物理方法如电击法、基因枪法、超声波法等；化学方法如聚乙二醇法、脂质体法等。三是利用种质进行转化的系统，即通过植物的花粉、卵细胞、子房、幼胚等种质细胞将外源基因转入植物细胞内，也称为生物媒体转化系统。

目前使用的植物转化的表达载体有两类，即以农杆菌质粒为基础的质粒载体系统和病毒载体系统，实际使用中还是以前者为主，故这里只介绍农杆菌质粒载体系统。目前以病毒作载体的表达系统均为瞬时表达系统，一般不能把外源基因整合到植物基因组中，因此目前病毒载体目前应用不广，多数还处在研究阶段。

1.2.1 根癌农杆菌 Ti 质粒介导的转化法

1.2.1.1 根癌农杆菌的生物学特性

在目前各种植物转基因方法中，利用根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）的 Ti 质粒进行的转化系统是目前研究最多、理论机理最清楚、技术方法最成熟的。第一批能表达外源基因的转基因植物就是用根癌农杆菌介导转化获得的，至今为止所获得的几百种转基因植物中也大多数是利用此系统产生的，如大豆、番茄、棉花、水稻等。

根癌农杆菌是革兰氏阴性菌，属根瘤菌科（*Rhizobiaceae*）、土壤杆菌属（*Agrobacterium*）。

土壤杆菌属还包括毛根（发根）农杆菌、放射形农杆菌和悬钩子农杆菌 3 种。土壤杆菌属都是土壤习居菌，农杆菌细胞呈杆状，大小 $0.8\ \mu\text{m} \times (1.5 \sim 3.0)\ \mu\text{m}$ ，以 1~4 根周生鞭毛进行运动，主要生活在植物生长过的土壤中，好氧，最适温度 $25 \sim 30^\circ\text{C}$ ，pH 4.3~12.0，最适 pH 6.0~9.0。农杆菌侵染植物是通过植物本身具有的病斑或伤口进入的，但细菌本身不进入植物细胞，只将 Ti 质粒中的一段 DNA 序列插入植物细胞的基因组中。根癌农杆菌可以侵染双子叶植物、单子叶植物和裸子植物。

自然条件下根癌农杆菌通过植物靠近地表的受伤部位侵染植物。根癌农杆菌中含有致瘤质粒（tumor inducing plasmid），简称 Ti 质粒（pTi），农杆菌丢失 Ti 质粒后则无致瘤能力，Ti 上含有的基因还具有控制冠瘿碱合成及其他功能。农杆菌侵染植物后能诱导植物产生冠瘿瘤，冠瘿瘤中的植物细胞能合成一些特殊的氨基酸衍生物，常见的是章鱼碱（octopine）和胭脂碱（nopaline），总称为冠瘿碱（opines）。冠瘿碱是由侵染了植物细胞的农杆菌基因产物利用植物细胞中的原材料而合成的，不同的菌株合成不同种类的冠瘿碱。近年来人们通过对农杆菌和 Ti 质粒的研究，进一步了解了 Ti 质粒的特征及农杆菌入侵植物的过程，并已将 Ti 质粒改造成为植物基因工程载体。

1.2.1.2 Ti 质粒的结构和功能

Ti 质粒为双链共价闭合环状的 DNA 分子，大小约 200 kb。目前已分离得到多种不同的 Ti 质粒，它们的大小和致瘤能力等各不相同。根据植物冠瘿瘤中含有的冠瘿碱种类不同，将 Ti 质粒分成四种类型：章鱼碱型、胭脂碱型、农杆菌型和农杆菌素碱型（agrocinopine）或称琥珀碱型（succinamopine）。

Ti 质粒的主要功能总结如下：①为农杆菌提供附着植物细胞壁的能力；②参与寄主细胞合成植物激素吲哚乙酸和细胞分裂素；③诱导植物产生冠瘿瘤；④决定农杆菌合成并利用冠瘿碱的能力；⑤决定农杆菌对土壤杆菌产生的细菌素的反应性；⑥决定农杆菌能侵染植物的种类等。

各种 Ti 质粒结构类似，都可分为四个区：①T-DNA 区（transferred DNA region）：这是农杆菌侵染植物细胞时从 Ti 质粒上切割下来并转移到植物细胞内的一段 DNA。②Vir 区（virulence region）：又叫毒性区，该区基因负责激活 T-DNA 的转移，使农杆菌表现出植物的毒性。T-DNA 区与 Vir 区相邻，合起来占 Ti 质粒 DNA 的 1/3，是 Ti 质粒上最重要的两个区。③Con 区（regions encoding conjugations）：此区段上存在与细菌间接合转移有关的基因，故称接合转移编码区。④Ori 区（origin of replication）：该区段是 Ti 质粒自我复制的起始区。以上几个区中，T-DNA 区和毒性区在基因转移中最为重要。

T-DNA 长约 23 kb，含有激发和保持肿瘤状态所必需的若干基因，其中含有一段长 8~9 kb 的保守区，不同来源的 Ti 质粒中的 T-DNA 结构和拷贝数略有不同。T-DNA 的两端左右边界各为 25 bp 的同向重复序列，称为边界序列（border sequence），分别称为左边界（LB 或 TL）和右边界（RB 或 TR），两边界序列之间是生长素和细胞分裂素合成基因（致瘤基因）及冠瘿碱合成基因等。该 25 bp 边界序列为保守序列，左边界（TL）缺失突变仍能致瘤，但右边界缺失则不再能致瘤，这时几乎完全没有 T-DNA 的转移，这说明右边界（RB）在 T-DNA 转移中更为重要。但两边界序列之间有什么基因完全不妨碍 T-DNA 的转移。这也是将 Ti 质粒改造成植物基因工程载体的理论基础。

另外,在章鱼碱型 T-DNA 的右边界的右边约 17 bp 处有一个 24 bp 的超驱动序列,称为 OD 序列 (overdrive sequence),是有效转移 TL、TR、T-DNA 所必需的,起增强子作用。OD 序列与农杆菌转化效率有关,除去 OD 序列导致农杆菌诱导肿瘤能力降低。

Ti 质粒上的 Vir 区也是农杆菌侵染植物所必需的, Vir 区位于 T-DNA 左侧,两者之间的间隔距离随 Ti 质粒类型不同而异。章鱼碱型农杆菌 Ti 质粒的 Vir 区大小 40 kb,含 8 个操纵子,分别称为 *virA*、*virB*、*virC*、*virD*、*virE*、*virF*、*virG* 和 *virH*,每个操纵子中含有 1 至多个基因,共 24 个基因,组成一个调节子 (regulon)。这些基因编码的蛋白是 T-DNA 加工和转移的主要介导因子。T-DNA 转移与 T-DNA 区域的其他基因和序列无关。

1.2.1.3 农杆菌侵染植物细胞的机制

根癌农杆菌侵染植物时首先要通过植物表面的伤口附着在细胞的表面,随后产生细微的纤丝将自身束缚在细胞壁的表面。实验发现只有在创伤部位生存了 16 h 之后的农杆菌才能诱发肿瘤,这一段时间称为“细胞调节期”。在调节期内农杆菌 Ti 质粒上的基因被激活开始表达,随后 Ti 质粒上的 T-DNA 被送入细胞并插入染色体中,T-DNA 区上的基因表达导致正常的植物细胞形成肿瘤细胞并形成冠瘿瘤。要注意的是,农杆菌本身并不会进入植物细胞内。

根癌农杆菌侵染植物细胞的过程很复杂,包括农杆菌和植物合成和释放化学信号分子以及基因的表达和相互作用。一开始受伤的植物细胞分泌一些酚类化学物质,农杆菌被这些化学物质所吸引,向植物的伤口位置迁移。农杆菌 Ti 质粒上的一些基因受这些化学物质的诱导而表达,从而开启侵染植物的过程。整个侵染过程可以分为以下步骤:

(1) 受伤植物的细胞分泌酚类等化合物,如乙酰丁香酮 (AS) 和羟基乙酰丁香酮 (OH-AS) 等,这些创伤部位分泌的物质可当做信号分子吸引农杆菌向植物受伤部位移动并附着在伤口表面。

(2) 创伤信号分子被 Ti 质粒编码的蛋白因子 VirA 和 VirG 识别,并诱导其他 *vir* 基因表达,其中基因产物 VirD1 和 VirD2 可对 T-DNA 进行加工剪切。由 T-DNA 右边界开始,向左边界切割,产生一条 T-DNA 单链 (SS T-DNA),简称 T-链。

(3) T-链 5'末端与 VirD2 共价结合,组成 T 复合体。

(4) *virB* 基因产物是跨膜蛋白或膜结合蛋白,在植物细胞的质膜上形成类似接合孔的结构,通过类似细菌接合转导的方式,将 T-复合体和 VirE2 蛋白从农杆菌转入植物细胞。

(5) 在植物细胞内 T-复合体被 VirE2 蛋白包裹并和多种植物蛋白结合,这些植物蛋白有利于 T-DNA 的运输和整合。

(6) VirD2 和 VirE2 蛋白带有核定位信号,引导 T-复合体经核孔复合物进入细胞核内,并整合到植物染色体上,完成 T-DNA 由农杆菌向植物细胞转移。

T-DNA 进入细胞核后优先整合到染色体的转录活跃区,在 T-DNA 的同源区和 DNA 富含 AT 碱基对的高度重复区中 T-DNA 的整合率也较高。研究发现 T-DNA 整合进入植物的染色体是通过植物 DNA 和 T-DNA 间短的同源区段发生重组而完成的,同时在接口附近有 DNA 顺序的转换和重复。T-DNA 右末端在靶序列的识别及连接中是必需的,T-DNA 左末端和两个靶 DNA 末端则参与部分配对和 DNA 的修复。整合进植物基因组的 T-DNA 会有一定程度的缺失、重复和超界现象发生,说明 T-DNA 的整合也与植物的重组系统有关。