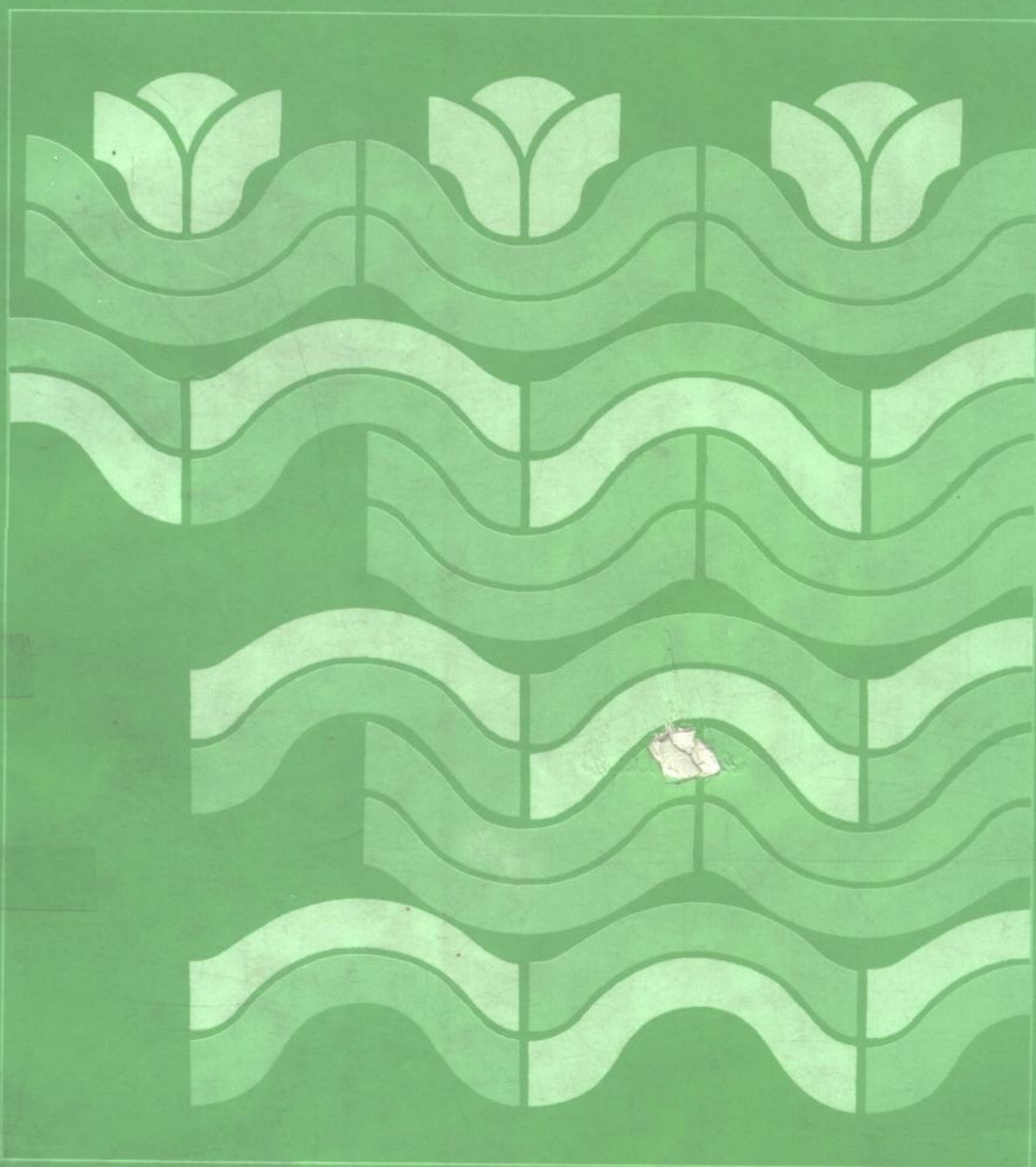


植物分子生物学丛书-1

植物基因工程研究

陈章良 主编



北京大学出版社

植物分子生物学丛书-1

植物基因工程研究

陈章良 主编

北京大学出版社

新登字(京)159号

植物分子生物学丛书·1

植物基因工程研究

陈章良 主编

责任编辑：李宝屏

*

北京大学出版社出版发行

(北京大学校内)

北京大学印刷厂 印刷

新华书店经售

*

787×1092毫米 16开本 26.375印张 650千字

1993年3月第一版 1993年3月第一次印刷

印数：0001—2000册

ISBN 7-301-02127-5/Q·56

定价：42元

内 容 简 介

本书是《植物分子生物学丛书》的第一分册,书中收集了北京大学生物系蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室56篇论文或综述,涉及的内容主要包括6部分:植物基因工程概况、植物基因的分子克隆及其分子生物学研究、植物基因分子调控、抗病毒基因工程、抗细菌及真菌病基因工程研究、转基因植物及组织培养研究,反映了该实验室在植物基因工程研究领域的研究成果和取得的最新进展。本书可供理、工、农、医各领域内相关专业的大学生、研究生和研究人员参考。

《植物分子生物学丛书》是由北京大学生物系蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室组织编写的一套专业性丛书。这套丛书总结归纳了他们自1987年建立以来在植物分子生物学领域所从事的多种有关教学和科研活动中逐渐积累起来的一些研究成果和教学资料，力求从植物分子生物学的基础知识、实验技术、理论发展和最新应用成果等多种角度和层次向读者介绍植物分子生物学的基础性和专业性知识，可供理、工、农、医各领域内相关专业的大学生、研究生和研究人员参考。

主 编 陈章良
副主编 李宝屏*
瞿礼嘉
编 委 潘乃嵚
顾红雅
朱玉贤
明小天

* 为北京大学出版社，其余编委均属于北京大学生物系蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室。

前 言

近年来,生物技术作为一种高技术,在整个科学领域中占据了越来越显著的地位;植物基因工程则以其在农业生产中广泛的应用前景和巨大的经济价值而在众多新崛起的生物技术中格外引人注目。尽管它的历史不长,但随着新技术的出现和发展,植物基因工程研究日新月异,突飞猛进。我国对植物基因工程的研究非常重视,投入了不少科研力量,应该说,在我国科技工作者的共同努力下,我国已在世界植物基因工程的研究中占据了一席之地,而且影响越来越大。

北京大学生物系蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室于1986年开始筹建,得到了国家计委、教委、科委、农业部各级领导和北京大学校内等各方的大力支持,于1990年建成。在短短的五年时间中,实验室承担了“八六三”高技术计划任务、“七五”“八五”攻关计划、中国自然科学基金等多项科研项目,取得了一些成果。为了便于与国内外同行交流,加强合作,现将该实验室植物基因工程方面的部分论文汇编成册,出版了这部植物分子生物学丛书的第一分册,以介绍这个室在植物基因工程研究方面已经取得的部分成果。特别要予以说明,其中不少成果是在国家建立重点实验室的开放政策下,由这个实验室同一些来此实验室工作的兄弟单位实验室合作取得的。我们预见,在我国科学家的共同努力下,我国的植物基因工程研究必然会在不久的将来走向世界前列。

本册中我们综合了几年来这个实验室在基因克隆、基因表达、基因调控,植物基因工程抗细菌、抗真菌、抗病毒病害、基因转移及组织培养技术以及昆虫病毒载体等方面的研究,为使读者便于了解各有关学科领域的发展,在某些部分我们还增添了一些综述性文章。凡有合作单位的论文,均于该篇论文首页的脚注中注明合作单位。

由于汇编过程仓促,书中可能会有疏漏之处,敬请读者原谅。我们衷心希望读者提出宝贵意见,便于今后我们工作的改进和提高。

陈章良

1992年

目 录

植物基因工程概况

植物基因工程的现状、前景及问题	陈章良	潘乃璁	(1)
现代植物基因工程的挑战与希望	陈章良	瞿礼嘉	(13)

植物基因的分子克隆及其分子生物学研究

应用核 DNA 的减法进行分子克隆					朱玉贤	(23)
橡胶树核基因库的构建以及一个编码 rRNA 的基因的分离	潘志强	孔德骞	陈章良			(32)
银合欢基因文库的构建和种子贮藏蛋白基因的 分 离	潘志强	潘乃璁	刘春清	陈章良	(40)	
中药天花粉蛋白的分子生物学研究	张光明	储瑞银	潘乃璁	陈章良	(46)	
中药天花粉蛋白基因的克隆、序列测定及在大肠杆菌和转基因烟草中的表达						
.....	鲍一明	储瑞银	韩晋华	张 会	潘乃璁	顾孝诚 陈章良 (56)
杆状病毒运载的天花粉蛋白基因在家蚕体内的表达	储瑞银	林玉莲	潘乃璁	陈章良	(65)	

植物基因分子调控

高等植物基因表达的调控	陈章良	瞿礼嘉	(75)
植物基因的调控机制探讨	陈章良	瞿礼嘉	(92)
大豆 Bragg 品种对 nts382 “超结瘤” 现象的抑制	朱玉贤	潘乃璁	陈章良 (98)
一个可赋予组成型启动子种子特异性增强表达的 DNA 顺式元件	陈章良	潘乃璁	R.N.毕齐 (104)
转基因植物编码大豆 β -伴大豆球蛋白基因的表达调控	陈章良	Satoshi Naito	Ikuo Nakamura R.N.Beachy (116)
植物钙调蛋白基因的分子生物学研究	刘芝华	陈章良	(138)
水稻钙调蛋白基因的克隆及结构分析	刘芝华	吴相钰	潘乃璁 陈章良 (148)
参与果实成熟过程的基因分子生物学研究	党伟	潘乃璁	陈章良 (153)
番茄多聚半乳糖醛酸酶基因的 cDNA 克隆和全序列测定	党伟	吕万革	潘乃璁 陈章良 (164)
豌豆卷须 cDNA 文库构建及肌动蛋白基因序列分析	曹晓凤	王荣臣	阎隆飞 鲁治滨 潘乃璁 陈章良 (170)
番茄乙烯形成基因的 cDNA 克隆及全序列测定	曹晓凤	鲁治滨	朱玉贤 潘乃璁 陈章良 (177)

抗病毒基因工程

我国流行的植物病毒外壳蛋白基因工程和抗病育种.....	王春香	陈章良	(185)
黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因的 cDNA 克隆和全序列测定及比较	胡天华 吴 琳 刘 玮 米景九 潘乃璁	陈章良	(191)
马铃薯 X 病毒外壳蛋白基因的 cDNA 克隆和全序列测定	王春香 高 谦 潘乃璁	陈章良	(202)
我国发生的一种香石竹斑驳病毒株系的生物化学特性及互补 DNA 合成	于嘉林 刘 仪 陈雪梅	陈章良	(209)

水稻矮缩病毒 (RDV) 基因组第11号片段的 cDNA 克隆及序列分析.....	储瑞银	潘乃璁	陈章良	(215)
利用植物基因工程技术育成抗病优质香料烟 “PK-873”				
.....	陈章良	孙宝俊	潘乃璁	刘春清
			刘 玮	梁晓文 (219)
烟草花叶病毒54kD 基因的 cDNA 克隆及序列分析	任 兵	王春香	潘乃璁	陈章良 (227)
应用聚合酶链式反应扩增大豆花叶病毒外壳蛋白基因及其序列分析				
.....	储瑞银	冷晓红	鲍一明	濮祖芹
			潘乃璁	陈章良 (233)
水稻矮缩病毒基因组第10号片段的克隆及序列分析.....	储瑞银	张 旭	潘乃璁	陈章良 (240)
家蚕核型多角体病毒四方形多角体突变株基因文库的构建及多角体蛋白基因的分离				
.....	储瑞银	王清华	林玉莲	陈长乐
			潘乃璁	陈章良 (246)
家蚕核型多角体病毒四方形多角体突变株多角体蛋白基因的 DNA 序列分析				
.....	储瑞银	王清华	林玉莲	潘乃璁
			潘乃璁	陈章良 (251)
家蚕核型多角体病毒转移载体质粒的构建.....	储瑞银	林玉莲	潘乃璁	陈章良 (256)
马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因的克隆及序列分析	储瑞银	郭 涛	潘乃璁	陈章良 (263)
番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因的 cDNA 克隆、全序列测定及比较				
.....	龚洁敏	郑学勤	潘乃璁	陈章良 (269)

抗细菌及真菌病基因工程研究

植物细菌病害防治的基因工程.....	王雅平	刘伊强	潘乃璁	陈章良 (277)
<i>Bacillus cereus</i> G35和 <i>Bacillus subtilis</i> P11所产抗菌蛋白的生物活性				
.....	刘进元	李德葆	陈章良	(285)
拮抗菌 A014 的筛选及其分泌抗菌蛋白的条件.....	刘进元	刘 玮	潘乃璁	陈章良 (290)
抗菌蛋白 LCⅢ的分离纯化及其部分 特 性	刘进元	李 忠	潘乃璁	陈章良 (295)
抗菌蛋白 LCⅡB 的纯化及其性质研究.....	刘进元	潘乃璁	陈章良	(300)
枯草芽孢杆菌 A014 菌株防治小麦赤霉病的初步研究	王雅平	刘伊强	潘乃璁	陈章良 (307)
抗真菌蛋白 BⅡ的分离纯化及其性质的研究	王雅平	刘伊强	潘乃璁	陈章良 (312)
抗菌蛋白产生菌 TG26 的筛选及其培养条件	王雅平	刘伊强	潘乃璁	陈章良 (319)
枯草芽孢杆菌 A014对烟草青枯病防效的 测定	王雅平	刘伊强	潘乃璁	陈章良 (327)
一种抗水稻白叶枯病的 多肽 LCI 的鉴定	刘进元	潘乃璁	陈章良	(334)
水稻中一种抗真菌蛋白的分离与特性分析.....	刘 虹	顾红雅	陈 新	汤赛君
			潘乃璁	陈章良 (339)
人工合成柞蚕抗菌肽 D 基因转入根癌农杆菌	李丹青	徐 飞	黄自然	陈章良 (345)

转基因植物及组织培养研究

农杆菌介导的植物基因转化.....	杨美珠	陈章良	(351)
通过原生质体的植物基因转化——电击法和 PEG 法	明小天	陈章良	(360)
基因枪转化技术.....	欧阳文军	陈章良	(365)
CAT 和 GUS 基因在水稻、玉米等作物原生质体中的瞬间表达			
.....	明小天	米景九	潘乃璁
			陈章良 (371)
细菌 CAT 基因在转基因番茄植株上的表达			
.....	陈 丹	米景九	谢友菊
			刘春清
			潘乃璁
			陈章良 (377)
甜椒的离体再生及基因转化.....	王玉文	杨美珠	潘乃璁
			陈章良 (381)
高效马铃薯遗传转化体系的建立及甜蛋白基因的导入.....	杨美珠	潘乃璁	陈章良 (389)
根癌土壤杆菌介导的咖啡转化.....	冯 勤	杨美株	郑学勤
			曾宪松
			潘乃璁
			陈章良 (396)
转基因马铃薯人工种子的研究.....	杨美珠	邓荣莲	李修庆
			陈章良 (401)
外源甜蛋白 Thaumatin Ⅱ 基因转入烟草的研究	周 平	潘乃璁	刘春清
			陈章良 (406)

植物基因工程的现状、前景及问题

陈章良 潘乃棧

近几年来植物基因工程的研究进展十分迅速。在植物抗病、抗虫、抗除草剂和改变植物的某些成分方面都已得到了不少转基因植株，有的已经建成了品系，为提高作物的产量、抗逆能力，改进它们的品质，进行快速、优质、稳产的良好选育提供了一条诱人的全新途径。作为生物技术的一个重要部分，植物基因工程的研究和开发利用已被列入我国高技术研究计划之内。目前，植物基因工程技术研究中的首批成果已经接近或初步进入了开发利用阶段。在这一阶段中又会出现一些新的问题。例如，外源基因在转基因植物品系、品种中的遗传稳定性如何，转基因植物可能造成的农业污染等问题，都需要研究。本综述除着重于介绍植物基因工程研究中的一些最新成果外，同时根据本实验室的一些工作经验，提出了在我国植物基因工程研究发展中应予注意的一些问题。

自从70年代末首次从分子水平上证实了有一种细菌，即土壤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 在侵染植物细胞以后，不但能将它的一段 DNA 插入到被侵染的细胞的基因组中，并且还能稳定地随着植物遗传给后代之后，植物基因工程的研究连续取得了一系列重大突破。最近10年内，人们从植物基因的分离、基因工程载体的组建、细胞的基因转化、转化细胞的组织培养和植株再生，直到外源基因表达的检测手段等方面，都取得了相当大的进展。植物基因工程中的几个重要环节都已形成了相当成熟的实验流程，使得不少实验室都能开展这方面的工作。在经济和科学比较发达的一些国家，譬如美国的有些中学里已经开始设置这方面的课程，学生能够实际操作其中某些有关的实验，如将植物的单个细胞培养成完整的植株，以证实植物细胞的全能性。估计在今后的10年之内，这方面的知识和训练会有较大规模的普及。

一、植物基因的分离

要开展植物基因工程的工作，首先必须取得一些有用的基因，通常我们称之为目的基因。根据我们所要达到的某项目的，譬如说，为了防治虫害，我们就要以这个目标来勾取、制作能够达到这一目的基因。目前国际上已经分离出来的可供植物基因工程使用的目的基因，已超过80个。这些基因的表达产物有的能抵抗病毒、细菌和真菌，有的能抗虫害或逆境；有的能抗除草剂等化学药品，有的则能提高植物体中的蛋白质或某种氨基酸的含量。目的基因大部分是从植物中分离出来的，例如从豆科植物的种子中能够分离得到多种的种子贮藏蛋白基因。抗除草剂的基因也是从植物中分离出来的；有些目的基因则取自微生物和动物：由细菌中可以得到抗虫的基因，由病毒中可以得到抗病毒的基因。基因分离出来以后，往往还需经过一些修饰才会好用。譬如说，将病毒基因或细菌基因上的启动子 (promoter) 或者是它们的3'-端非编码区 (3' non-coding region) 换成植物基因的启动子或3'-端非编码区等等。如

果所用的动物基因中还含有内含子(intron),那么还需将这些内含子切除。基因经过修饰的目的是让它们能够或是更好地在转基因植物中进行表达。

这里一个十分需要注意的问题是选用的基因启动子必须适当。因为一个启动子的作用部位及强弱直接关系到它所启动的基因在转基因植物中表达产物的出现部位以及出现数量的多少,从而决定此项工程的成败。目前,植物基因工程上使用得最多的一个启动子,称之为35S启动子,这个启动子是从一种植物的DNA病毒,即花椰菜花叶病毒(CaMV)的基因组里分离出来的。这个启动子属于目前已知的在植物中表达能力最强的一类。从这种病毒中还分离到另一个被称为19S的启动子,这个启动子也曾有不少植物基因工程的实验研究中使用过。但是,后来发现19S启动子的表达能力比35S启动子要弱50倍左右,从而逐渐被淘汰了。另外一个用得比较多的启动子是NOS启动子。这个启动子是从土壤农杆菌的Ti质粒的胭脂碱(Nopaline)合成酶的基因上分离出来的。虽然这个启动子来自细菌,但它具有真核生物启动子的一些特点,能在植物细胞中实现表达,只是它的表达能力比不上35S启动子,比35S启动子要弱一些。

在选择启动子时除考虑到启动子的强弱之外,还有一个需要考虑的问题,就是启动子活动的组织特异性或局限性。组织特异性是指有些基因只在某一特定的植物器官中表达,比如,有些植物的种子贮藏蛋白基因只能在种子中表达,马铃薯薯块中的贮藏蛋白就只在薯块中表达。所以,我们不可能设计一个实验,将大豆种子中的贮藏蛋白基因,带着它原有的启动子,直接转到马铃薯中去,并希望在马铃薯的块茎中得到大豆贮藏蛋白的表达。因此,在设计实验选择启动子时,必须把启动子的组织特异性问题考虑进去,忽略了这一点,就可能达不到实验的目的。目前已经分离出来的一批植物基因中,相当大一部基因的启动子都是具有组织特异性的。除了种子贮藏蛋白基因的启动子使它只在种子中表达之外,还分离到在根、茎、叶、花等不同部位或植物的不同发育阶段的具组织特异性的启动子。在花柱、柱头、花粉等组织中也都分离到了一些具组织特异性的基因。也就是说这些基因只在特定的发育阶段,在特定的组织中才进行活动和表达。当我们需要一个目的基因,并希望它在转基因植物的各个部分都进行表达的时候,就应使用非组织特异性的启动子,例如35S启动子。如果希望目的基因只在某一特定部位,例如根中表达,则应选取具根部表达特异性的启动子。若希望它在花中表达,选用的启动子应具有在花的组织中才活动的特性。必须根据最终需要达到的目的来选用启动子。仍举前面的例子,我们若想在马铃薯的块茎中得到大豆的贮藏蛋白,就应把大豆贮藏蛋白的基因先分离出来,把上面的原有的启动子切掉,换上一个在马铃薯的块茎中能活动的启动子,这样我们才能在转基因马铃薯的块茎中得到大豆的贮藏蛋白。

还有相当一部分植物基因的启动子是受生理条件或外界的环境条件调控的。譬如,受光调控的称光调控或光控基因;有的基因受到温度的控制,如某些植物在高温刺激下会出现热反应蛋白(heat shock protein)就是热反应基因(heat shock gene)表达的结果,而有的基因则在此种温度条件下,停止了表达。缺氧、紫外光等都能诱导某些基因的表达。光所诱导的基因表达,大家都很熟悉。光合作用过程中的几个基因,如核酮糖二磷酸羧化酶/加氧酶(Rubisco)中的一个小亚基(small subunit)是由细胞核的DNA编码和表达的,这个基因的表达就是由光调控的,在有光的情况下此基因表达物的产量明显提高。另一个我们较熟悉的受光调控的基因的例子是Cab基因,这个基因的表达物是一个使叶绿素a和b结合起来的蛋白质。这个基因的启动子在无光的情况下不活动或是活动能力很低。只有在有光的情况下这个基因才

进行表达。当我们作基因的调控研究时，这类基因的启动子会是极因的启动子不宜用于希望整株植物的各个部分以及任一发育阶段都能得到目的基因表达产物的实验。同理，热反应基因的启动子只在某一特定的温度范围之内表达。如果说虫害将在某个较高的气温条件下大量发生，我们可以利用这种启动子与抗虫基因结合，以便植物在外界温度升高时获得抗虫的能力。

取得目的基因，可以说是植物基因工程工作中的一个核心部分。这部分工作十分重要，但是困难程度比起其他部分来也要大些。不但技术要求高，需要投入的经费和工作量很大，而且最终得到有用基因的成功率也并不很高。目前国际上已有的几十个有用的基因，其中相当大的一部分可以通过多种途径由国外引进。但是有些较为重要的基因，也就是说有着巨大的潜在经济价值的基因，基本上都控制在一些公司手里，很难得到。在制取目的基因方面，我国现有的工作基础和技术队伍都还相当薄弱，各有关实验室所用的基因大部分来自国外。从长远来看，要发展我国的植物基因工程，必须自己分离、制作基因。这是一项十分重要和有前途的工作，我们应该给以充分的重视。充分利用我国丰富的种质资源，分离提取各种有价值的基因。目前我国已有几个单位开始了这方面的工作，我们的实验室也已作了一些针对我国特殊资源的基因的分离工作。

二、植物基因工程载体的构建

最早期的植物基因工程实验都是通过土壤农杆菌的 Ti 质粒来完成的。因此组建一个植物基因工程的载体曾是植物基因工程研究中十分重要的一个组成部分。工作发展到现在，国际上已有好几套现成的常用植物基因的载体可供使用，其中大部我国已有引进。美国的孟山都 (Monsanto) 公司，英国的 PBI (植物育种研究所)，美国的 PGEL (植物基因工程实验室) 和比利时的 Gent 实验室，还有德国等都有一批可供使用的植物基因工程的载体。这一方面的工作，在前几年进展得比较迅速，因为几年前基因对植物的转化基本上都是用土壤农杆菌来完成的。但是最近一两年来已发展了一些新的方法，其中有的并不需要通过组建的 Ti 质粒作为中间载体来完成基因工程。另外还有人利用病毒等材料来构建载体。总之，就载体方面的研究来说，一方面已有不少已建成的能有效利用的现成的载体供我们使用；另一方面，这方面的研究也有一些新的发展，但大多数都属于寻找不同种类的新型载体的探索性质的工作。国内进行载体构建工作的实验室不多，因为已有不少现成的载体可以引进，似乎没有太大必要在这方面投入太多的精力。

三、植物基因转移到植物细胞的方法

自从植物基因工程技术发展以来，植物基因工程转移的方法大致可以归纳成两大类。第一大类是直接法，将目的基因直接导入到受体的细胞中去。第二类则是前面已经初步提到过的载体法。

1. DNA 直接导入法

直接导入法与动物基因工程中的导入方法相近似。目前用得比较成功的有 PEG (聚乙二

醇)法和电击穿孔法 (electroporation), 或者二者配合在一起使用。这两种方法在单、双子叶的植物上都可以有效地使用, 使我们有可能得到种类更多的转基因植物。PEG 法使用的时间比较长。电击穿孔法近年来刚用于植物的基因转移, 此法是通过很高的电压, 瞬间将细胞膜的局部打开, 使外源 DNA (基因) 进入原生质体内去。最近两三年还发展起来了一种微弹射击法 (microprojectile bombardment), 这种方法是利用 $1\mu\text{m}$ 的一种小子弹颗粒, 将 DNA 吸附在小子弹粒的表面, 然后以 400 m/s 的速度射进植物细胞。受射击的细胞不必除去细胞壁, 密集的子弹粒穿透了细胞壁和细胞膜, 将外源 DNA 带进植物细胞而实现了基因的细胞转移。还有一种是直接注射法, 就是直接用注射针将 DNA 溶液注射进细胞里去。此外, 还有一些其他的方法, 例如, 先使植物的生长点受伤, 将伤口侵入 DNA 溶液令其吸收; 或将 DNA 注入受精后原胚期的胚囊、胚珠或子房, 若此时幼胚将 DNA 吸入也能实现转化。这些方法中, 目前用得比较多的仍是 PEG、电击穿孔和微弹射击等几种方法。PEG 法和电击穿孔法的实验是用去壁后的原生质体作的, 其缺点是进行 DNA 转化时需将植物的细胞去壁。有些植物的原生质体容易制备, 有的植物的原生质体则不易取得。当然制取处理的原生质体越多, 转化成功的机会就会越大。所以往往原生质体的制备和转化后的原生质体的再生会成为这类转化方法的限制因素。在使用 PEG 处理细胞时应注意 PEG 的质量, 不同厂家的 PEG 的质量可以很不相同, 不好的 PEG 对植物细胞有毒性。也有人把 PEG 法和电击穿孔法结合起来使用。相对来说, 用微弹法对植物进行转化有一定的优点, 因为它将 DNA 导入植物细胞时, 细胞无需去壁, 使得再生植株的培养比较容易。

2. 载体法

第二种方法是用载体法, 这仍是目前最常用的一类方法。最初的载体都是利用土壤农杆菌中的 Ti 质粒。土壤农杆菌是一种能侵染多种双子叶植物的细菌, 它体内含有一些很大的质粒, 统称 Ti 质粒。在 Ti 质粒上有一段 DNA, 这段 DNA 称为 T-DNA, 在土壤农杆菌侵染植物细胞的时候, T-DNA 能够插入植物细胞的基因组中去并稳定地遗传给以后分裂出来的细胞。T-DNA 上含有一些致瘤基因, 使得被它侵染的植物产生肿瘤, 即我们通常所说的冠瘿瘤 (crown gall)。人们利用 T-DNA 能够插入植物细胞的特点, 将其中导致植物形成肿瘤的那些基因全部切除, 换上我们所需要的目的基因, 这就组成了一个可将目的基因带进植物细胞中去的载体。这是植物基因工程一开始就使用的方法, 现在仍相当广泛地应用着。用 Ti 质粒作为载体转移基因到植物细胞中去的优点是不需要分离原生质体, 用整块的植物组织操作起来比较简单、方便。用这种办法插入的基因拷贝数目较少, 并且比较稳定, 能为基因调控的研究提供很有利的条件。它的缺点是土壤农杆菌的主要侵染对象是双子叶植物, 能够侵染的单子叶植物的种类很少, 特别是对禾本科的一些主要粮食作物不侵染或很难侵染, 使工作受到了很大的限制。当然最近也有几个实验室发表了若干篇文章报导可以通过土壤农杆菌侵染单子叶植物, 如禾本科中的玉米、水稻等作物进行基因转化。但可惜的是至今没有更多的实验室能够将他们的实验重复出来。显然, 这一技术尚未成熟。除了土壤农杆菌的 Ti 质粒之外, 人们还尝试利用一些其他的载体。譬如, 利用脂质体、病毒等等。植物病毒可用作载体, 其中用得较多的有花椰菜花叶病毒 (CaMV) 和另种植物的 DNA 病毒。也有人试图将植物的 RNA 病毒反转成 cDNA 之后作为载体使用, 但是这些载体虽然能够进入细胞中去, 但都只作瞬间的基因表达, 还不能成为长久稳定的基因插入基因工程的运载工具。

四、转基因植物细胞的组织培养

植物细胞的全能性，给植物基因工程提供了极大的方便，从一个转化后的植物细胞，即由一个细胞在适当的条件下能够培养成为一株完整的植物体。这种技术，目前在高等动物的细胞培养上还达不到。在高等植物中，多种茄科植物，如烟草、番茄、矮牵牛和马铃薯等的转化细胞都很容易培养成株。一些牧草（如巴西苜蓿）、蔬菜（如甘蓝、油菜）等都已转化基因成功。目前最常用的转化方法称之为叶盘法。就是将植物的叶片或其他的一些组织人为地造成损伤，即切割成段，或用打孔器将叶片打成直径长1—1.5cm的圆盘，也可切成方片。切割处即是伤口，将它们侵入土壤农杆菌培养液中几分钟，然后将组织表面多余的菌液吸去，把这些侵染过的组织放在合适的固体培养基的表面上培养。经过一段时间的培养之后，在这些组织的伤口附近会出现许多愈伤组织。再经过诱导的方法在这些愈伤组织中会分化出芽点，并长出有根有茎的植株，最后将它们移植到土壤中去。这样的一棵植物，我们叫它为转基因植株。这套方法，基本上适用于多种双子叶植物。对于单子叶植物，特别是对于禾本科的一些作物来说，至少目前已见报导的技术并不完善，还不适用。在禾本科作物上，目前用得较多的是DNA的直接转移法。把DNA直接导入到这些农作物的原生质体或细胞中去，所用的组织培养的方法，基本上仍是将这些转化过的原生质体或细胞放在适当的培养基的表面，使其形成愈伤组织，然后诱导出苗并培育成成株。目前已有一些成功的例子，但是重复率还不很高。同时还发现，通过这一过程培养出来的单子叶植物的苗有许多变异。这些问题都有待于进一步研究解决。

进行转基因细胞的组织培养工作，在我国有比较多的有利条件，因为目前我国的组织细胞培养工作处于国际领先地位。特别是一些单子叶植物，如水稻（无论是籼稻还是粳稻）、小麦的原生质体培养都比较困难，但在我国都已获得将原生质体培养成株的结果。我们应继续保持这方面的领先地位，进一步将有用的基因迅速地转进这些植物的原生质体中去，把它们培养成株，将基因工程和组织培养的成果结合起来。这是一件十分需要做，也有条件做到的事情。

五、基因转化后植物细胞的选择与转基因植物的鉴定

植物细胞经过土壤农杆菌或直接DNA转移法的处理之后，就需要进行选择，也就是说需要将那些已经转化后的细胞和那些未经转化的细胞区别开来，将后者淘汰掉。目前对转化细胞的选择，主要采用抗生素选择的方法，即：使转化过的植物细胞能够抵抗某一特定的抗生素，而没有转化过的植物细胞在这种抗生素存在的情况下死去。现在在植物基因工程中最常用的选择抗生素是卡那霉素(kanamycin)。抗这种抗生素的基因是一种细菌的基因，即NPT II (neomycin phosphotransferase II)基因。目前许多双子叶植物的转化细胞，如烟草、番茄、马铃薯等，还有单子叶植物的一些转化细胞都用它来筛选。但是，有一些植物，譬如棉花对卡那霉素不敏感，无法用它来选择，就需选用另外的一些抗生素，如MTX(methotrexate)或HYG(hygromycin)等抗生药物。另外，有些公司也选用一些除草剂来进行选择。就是将有的抗除草剂基因同时转进植物细胞中去，然后就可以用除草剂来选择出转化了的细胞。那么经过选择的转化细胞，当它形成了愈伤组织、植株、株系乃至品系之后，我们又如何对它们进行

鉴定,证明它们在生长发育、传种接代的过程之中没有丢掉那已获得的外源基因呢?这也是有办法的,目前用得较多的是对土壤农杆菌 Ti 质粒上的一个基因的表达产物的生成物进行检测。这个基因称为胭脂碱合成酶基因(nopaline synthase gene),它的表达产物是胭脂碱合成酶(nopaline synthase),而胭脂碱合成酶的催化产物是胭脂碱(nopaline),这种物质通过一定操作在紫外光下可以直接进行检测。在普通的中间载体上全都带有这个基因,可将选择出的转化细胞所形成的愈伤组织或植株上的某一部分取些下来,经过纸上层析,在紫外光下直接鉴定这一外源基因(NOS)表达后的生成物。还有一种用得较多的方法称为报导基因(reporter gene)检测法。植物基因工程中用得较多的一种报导基因,称为CAT(氯霉素乙酰转移酶)基因。这个基因是从细菌中分离出来的,现已换上了植物的启动子,能在转化了的植物细胞里表达,所以我们可以用 ^{14}C 标记的氯霉素(chloramphenicol)和乙酰辅酶A与转化过的植物、植物细胞或愈伤组织的提取物进行反应,然后测定有多少氯霉素被乙酰化了,从而测得CAT基因是否表达。另一个常用的基因是GUS基因,英国的植物育种研究所(PBI)有一个用它作成的很好的载体,转化植物组织或叶片的提取液,通过颜色反应,可在仪器上直接测到该基因是否表达。最近一两年内使用的另一个报导基因是能够引起萤火虫在夜晚发光的荧光素酶(luciferase)的基因。人们将编码这种酶的基因从萤火虫细胞里勾了出来,换上了一个植物的启动子,转移到植物细胞中去,可以使转化的细胞发出微量的光,通过非常敏感的仪器或X-光片可将它直接检测出来。如果我们将目的基因和它连在一起转进植物细胞,那就可以用上述方法查出外源的基因是否已经进入细胞。最近比利时的Gent实验室使用的 β -gal(β -galactosidase gene)是从细菌中分离到的,经过了一定的修饰,现在已能用于鉴定转化过的植物细胞。今后还会有一些新的报导基因出现,这类基因的作用既然是负责报导,就必须具有表达稳定、易于检测等特点。这方面的工作国外有不少实验室在做。国内目前尚无力顾及这类基因的分离,需用时可由国外引进。

六、几项已获成功的植物基因工程的研究

在最近短短的四五年内,植物基因工程已获得了一批转基因植物,其中包括改变植物品质及适应性的转基因植物、抗病毒的转基因植物、抗虫的转基因植物、抗除草剂的转基因植物。这些已经成功的植物基因工程,有的已经进入大田实验的阶段,它们大都在美国、英国、比利时、荷兰等国进行。但是,直到目前为止还没有一项进行正式的商品生产。预计在1995—1997年内,或者在此之前,这些转基因植物都会逐步投产。

1. 改变作物品质和适应性的植物基因工程

改进植物品质的基因工程,目前已有的工作主要着重于提高蛋白质的质量。我们知道,单子叶和双子叶植物的种子中蛋白质中各种氨基酸的成分和比例不完全相同,其中所含必需氨基酸的量也不一样。大多双子叶植物中赖氨酸含量较高,缺少蛋氨酸;而单子叶植物中,例如,小麦、玉米等都是赖氨酸不足。因此,如果我们能将双子叶植物的蛋白基因,如大豆的贮藏蛋白或巴西坚果的蛋白基因转移到一些重要的禾谷类作物中去,就能提高它们的赖氨酸含量,使得必需氨基酸获得平衡,具更高的营养价值。同理,我们也可以将单子叶植物的贮藏蛋白基因,例如玉米的15kb的贮藏蛋白基因转到大豆或其他双子叶植物中去,可以得到

蛋氨酸含量较高的转基因大豆等。此外，我们还可以将必需氨基酸含量高的蛋白质的基因，可以是人工改造和合成的基因，转移到需要改进蛋白质品质的各种植物中去。牧草也能改造，可将赖氨酸含量高的蛋白基因转进苜蓿，令其在植物整体上全面表达，奶牛吃了这种牧草，产出了高赖氨酸含量的牛奶。目前在成功的转基因植物中，在必需氨基酸含量提高的同时，由于外源基因的引入，总蛋白的量也有所提高，外源基因的蛋白积累量可以达到总蛋白量的1%左右。这方面的工作是植物基因工程中研究得最早的一个部分。除了利用自然界现成的多种植物种子贮藏蛋白基因而外，也有实验室在合成编码多种必需氨基酸平衡、密集的人造基因。国内已有一些单位在利用贮藏蛋白基因方面，得到了转基因的植物。在这一方面我国的水平与国际差距不大。我国的野生资源极其丰富，在野生资源中寻找必需氨基酸含量高的蛋白质，勾取编码它们的基因，应是今后我国开展这方面的研究的一个重点。

提高高等植物的抗逆性或适应性是基因工程研究的又一个热点。生长发育中的植物，一旦遇到外界环境的突然变化，或称逆境，就会有一些抵抗逆境的生理反应出现。例如，将在常态下生长的大豆，放到42℃下，它的叶片细胞里很快会出现一些具有在一定温度范围内能够起保护细胞作用的蛋白质，这种蛋白质在常态的生长条件下在细胞里是不表达的。现在已将编码这些蛋白质的基因分离出来了，并通过植物基因工程的方法转移到了烟草中去。把这种烟草，放在42℃下，大豆的这个基因在烟草中进行了表达。用类似的办法，我们还可以将自然界中其他多种适应性基因发掘出来，如与抗盐、抗旱、抗寒、缺氧的适应性状有关的各种基因。如将这类基因转入优质丰产的一些品种中去，就能大大地扩大它们的分布地区和种植面积。这方面的工作，国际上做得不少，国内也正在开展。我国从南到北、从东到西，自然环境千变万化，地方性适应的作物品种十分丰富，抗不良环境条件的种质资源很多，有待我们发掘有用的基因。我们应该在这方面多投些财力和人力，多分离出一些有用的基因来。

2. 培育抗病毒植物的基因工程

植物的病毒为害是农业生产上损失最大的病害之一，到目前为止还没有很有效的方法来防治，通常采用的是用农药来杀死、控制传染病毒的昆虫，保护植物免受病毒侵染。这种方法的缺点是不但化学药品的价格较高，而且往往造成严重的环境污染。另一种方法是组织脱毒法，用于无性繁殖的一些植物。取这类植物的茎尖、芽点等病毒尚未入侵到的组织，通过组培的方法，育出大量的无毒苗，用于田间生产。目前在马铃薯、草莓等生产上已经应用。这个方法的缺点是，组培脱毒育苗不但成本高，工作量大，而且由于病毒的田间再侵染，能维持无毒的有效期不长，两三年后产量又会严重下降。还有一种防病毒的方法叫交叉保护（cross protection）法，当把一种病毒的弱株接种到植物上，同种的强病毒再侵染这些植物时，表现出植株受到保护的现象，此时强病毒的侵染能力和致病能力都大大降低。我国从70年代开始，主要将此法用于防止番茄上的病毒病，80年代在抗木瓜环斑病毒上也曾使用此法。这个经典的、利用病毒的交叉保护特点建立的方法也存在着一一些问题。首先，需要找到一株弱病毒，找到一株适用的这样的病毒，往往需要几年时间；其次，虽然选用的是弱病毒，但仍能在一定程度上降低此种作物的产量；再者，弱病毒株只能与和它相类似的病毒有交叉免疫作用，而对相距较大的病毒种类没有什么作用，有时甚至还能和这些不相关的病毒相互影响，加重病害，使作物遭到更大的损失。加之工作量大，成本高，此法比较难以广泛使用。下面介绍如何利用植物基因工程解决病毒防治，现有5种方法。

第一种方法是向植物转入病毒的外壳蛋白基因。1986年，在美国通过植物基因工程成功地获得抗病毒的转基因植株。他们首次地将烟草花叶病毒（TMV）的外壳蛋白基因转移到了烟草和番茄的细胞里去，并培育成株。在这种番茄和烟草的叶片里都测到了烟草花叶病毒的外壳蛋白，并且发现当用烟草花叶病毒侵染这些植物时，这些植株能在一定程度上有抵抗作用。TMV 外壳蛋白基因在细胞中的存在，能抑制 TMV 在寄主细胞中的复制，并能阻止或降低 TMV 在植株体内的传递。1986 年的实验结果是在温室里得到的，后经美国农业部批准，这种转基因番茄已在美国的几个不同的地区，进行了大田实验。结果表明，它们在大田里的表现和在温室里的表现一致。大田实验的数据说明：有 TMV 外壳蛋白的番茄，在接种 TMV 后，只有 5% 左右的植株得病，而对照植株的发病率是 99%。在产量上与无病株相比，含 TMV 外壳蛋白的番茄几乎不减产，而对照组的产量损失达 26—35%。从此提供了一条通过植物基因工程来抗病毒的十分诱人的途径。继抗烟草花叶病毒的外壳蛋白基因工程成功之后，现在已经完成的还有黄瓜花叶病毒（CMV）、马铃薯X病毒（PVX）、马铃薯Y病毒（PVY）、苜蓿花叶病毒（AIMV）和最近即将报导的大豆花叶病毒（SMV）等的外壳蛋白基因工作。应该说，使用转病毒的外壳蛋白基因方法培育出来的抗病毒植物比较安全。因为外壳蛋白本身并没有毒性，我们平日吃的番茄和马铃薯里就有这些病毒，只是到目前为止我们还没有足够的证据证明这个方法能够解决所有种类的病毒为害。也许这种办法有一定的限度，但是直到目前为止我们还未曾发现它有什么副作用。另一个问题是，如果某种病毒的外壳蛋白能够装配虫传的它种病毒的 RNA 的话，也许会发生危险。但是，直到目前为止并没有提出任何有这种危险存在的迹象和实际根据。

第二种方法是通过病毒的卫星RNA的植物基因工程来防治病毒。不少种类的病毒有卫星 RNA。黄瓜花叶病毒（CMV）的卫星 RNA 是用于植物基因工程方面最早获得成功的一个例子。1986 年英国的科学家把 CMV 的卫星 RNA 转成 cDNA，再将它转进植物中去，第一次得到了抗黄瓜花叶病毒的工程植株（转基因植物）。但是人们普遍地认为，因为病毒的卫星 RNA 存在着不能彻底地抑制它的互补病毒的复制，本身具有很高的突变率，以及与它种病毒互补后会加强被补病毒的为害等几个问题，如果在生产上使用会有一定的潜在危险。因此，目前这方面的研究存在着一些困难，需要设计一些新的实验。如对卫星 RNA 的 cDNA 搞些点突变，作些改造，也许能在农业生产上使用。

第三种方法是利用病毒的反义 RNA。这个方法最早用在动物病毒上，具体的作法是将病毒的基因组反向地结合在启动子后，这样就能在转基因的细胞里编码出反义基因。当外源的病毒 RNA 侵染进入植物细胞之后，和这些细胞里编码出来的反义 RNA 形成互补，构成双链的 RNA，使得病毒无法复制，减轻了病毒的为害。利用植物基因工程的技术，已经成功地将植物的一些病毒基因组反过来接在植物的启动子后面，转到植物细胞里去，出现了能抵抗这些病毒侵染的结果。但是，这个方法也还有一些缺点，主要问题是需要比较大量的反义 RNA 才能彻底抵抗外源病毒的入侵。它的产量起码还要提高 50 倍，而目前的植物启动子都还达不到这个水平。所以，这个方法可以抵抗不太严重的病毒侵染；当入侵病毒的数量大时，它所起的作用就很小了。

第四个方法是利用植物自己编码的抗病基因。有些植物在受病毒侵染时，表现出一定的抵抗能力，最明显的例子是有的番茄品种能抗烟草花叶病毒。育种家们有许多带抗原的材料。我们可以通过克隆这类抗原基因，得到抗某种病毒的转基因植物。这方面的工作的困难

在于分离到能被利用的基因。但是如果这种方法成功，这种转基因植物的危险性应该最小。

第五，利用病毒上的其他基因。前面说到过的是利用病毒中的一个外壳蛋白基因。在病毒基因组中除了外壳蛋白基因外，还有其他一些基因，其中有转移基因、复制酶基因等等，我们有可能用改造基因组的办法得到抗病毒的基因。这个方法目前尚处于探索阶段。

在上述5种方法中，比较成功的还是前三种，在国外都已达到得到转基因植物的阶段，有的甚至已经进入大田实验。我国已经开展这方面的工作，并且已得到了不少成果。针对一些国内广泛流行严重为害的作物病毒，我们实验室开展了它们的外壳蛋白基因分离和转化的工作。现已成功地分离并合成了编码烟草花叶病毒、黄瓜花叶病毒、马铃薯X病毒、马铃薯Y病毒和另外几种常见的作物病毒的外壳蛋白基因，并对这些基因作了序列等方面的分析；同时还得到了其中一些病毒外壳蛋白基因对我国现生产用的烟草、番茄优良品种的基因转化植物。全世界每年由植物病毒为害造成的作物减产，至少以10%计。我们这么大的农业国家，其损失难以计数。植物基因工程这一方面的工作对农业增产会有立竿见影的好处，我国需要大力开展这方面的工作。

3. 抗虫的植物基因工程

除了上面讲的病毒的为害之外，农业生产上的另一大敌是虫害。化学药剂杀虫，不仅提高了生产成本，同时还造成了严重的环境污染和食品中可怕的残毒。人们很早就知道可以利用生物防治的方法来控制虫害。现在我们已可利用生物工程技术，更有效地达到这个目的。

人们早已发现，苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 能够杀死一些昆虫。目前已经弄清它的杀虫机制在于在这种杆菌的体内有一种结晶的蛋白质毒素，这种毒素能够引起某些种类的昆虫的神经中毒和其他的一些生理作用，致使虫子在短期内死亡。苏云金杆菌里编码这种毒素结晶蛋白的基因，有的位于杆菌体内的一个很大的质粒上，有的在它的染色体上。人们已经成功地分离出了许多不同种的苏云金杆菌的毒素基因，并将它们转到了植物上去。已经转进了烟草、番茄和几种蔬菜中。虫子吃了这些转基因植物之后会很快死去。苏云金杆菌的毒素蛋白具一定的特异性，也就是说某种苏云金杆菌的结晶蛋白只对某类或某几类昆虫有毒效。其中有的比较广谱，即对较多类别的昆虫有效；有的作用范围较窄，但它们对人畜却都是安全的，没有害处。目前，苏云金杆菌毒素蛋白基因的植物工程在国际上已进入大田试验，结果表明效果很好，可望在今后的三年之内会在多种作物：烟草、番茄、马铃薯、玉米、大豆、油菜、苜蓿和多种其他蔬菜上进行大规模的试验。在1995—1997年前后，会获得大批的不同种类的转基因植株和株系。

此外，还可利用蛋白酶抑制因子的基因工程防虫。除了苏云金杆菌的毒素蛋白之外，人们还克隆了一种称为蛋白酶抑制因子的基因，并把它转移到植物中去。这种基因的产物，破坏虫子体内的蛋白酶的活动，虫子吃了这种转基因植物的叶子就会死去。这个技术目前还没有苏云金杆菌毒素基因那样用得广泛，它是否会有什么副作用，目前还不很清楚。今后还会有一些新的基因来对付虫子，但是我们必须极为慎重地对待这类基因产物，即必须确保它们对人畜无害，才能付诸使用。

4. 抗除草剂的植物基因工程

抗除草剂的植物基因工程应该说是一项比较成功的植物基因工程。现代农业技术经济比