

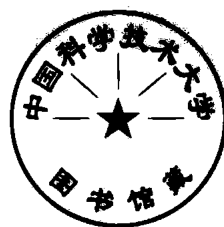
植物基因工程

主 编 田 波 许智宏 叶 寅
主编助理 李传昭

山东科学技术出版社

植物基因工程

主 编 田 波 许智宏 叶 寅
主编助理 李传昭



山东科学技术出版社

鲁新登字 05 号

植物基因工程

主编 田 波 许智宏 叶 寅

主编助理 李传昭

*

山东科学技术出版社出版

(济南市玉函路 邮政编码 250002)

山东省新华书店发行

山东新华印刷厂印刷

787×1092 毫米 16 开本 20.25 印张 5 插页 450 千字

1996 年 1 月第 1 版 1996 年 1 月第 1 次印刷

印数:1—1000

ISBN7—5331—1495—7

Q·14 定价 45.00 元

山东省泰山科技专著出版基金会

名誉会长 赵志浩 宋木文 陆懋曾 伍 杰

卢鸣谷 董凤基 宋法棠

会 长 陈光林 石洪印

副 会 长 宋桂植 何宗贵 吕可英 车吉心

孙肇琨 王为珍(常务副会长)

秘 书 长 王为珍(兼)

副 秘 书 长 尹兆长

理 事 (以姓氏笔画为序)

王为珍 王凤起 尹兆长 刘韶明

李道生 李德泉 张传礼 陈 刚

蒋玉凤

评审委员会 (以姓氏笔画为序)

卢良恕 吴阶平 杨 乐 何祚庥

罗沛霖 高景德 唐敖庆 蔡景峰

戴念慈

山东省泰山科技专著出版基金会赞助单位

山东省财政厅

山东省出版总社

山东省科学技术委员会

山东科学技术出版社

山东泰山酿酒饮料集团总公司

董事长兼总经理张传礼

山东金泰集团股份有限公司

董事长兼总裁刘黎明

我们的希望

进行现代化建设必须依靠科学技术。作为科学技术载体的专著,正肩负着这一伟大的历史使命。科技专著面向社会,广泛传播科学技术知识,培养专业人才,推动科学技术进步,对促进我国现代化建设具有重大意义。它所产生的巨大社会效益和潜在的经济效益是难以估量的。

基于这种使命感,自 1988 年起,山东科学技术出版社设“泰山科技专著出版基金”,成立科技专著评审委员会,在国内广泛征求科技专著,每年补贴出版一批经评选的科技著作。这一创举已在社会上引起了很大反响。

1992 年,在山东省委、省政府的支持下,在原“泰山科技专著出版基金”的基础上,由山东省出版总社、山东省科学技术委员会和山东科学技术出版社共同成立了“山东省泰山科技专著出版基金会”,并得到企业界的热情赞助,为资助学术专著的出版提供了更加可靠的保证。

但是,设基金补助科技专著出版毕竟是一件新生事物,也是出版事业的一项改革。它不仅需要在实践中不断总结经验,逐步予以完善;同时,也更需要社会上有关方面的大力扶植,以及学术界和广大读者的热情支持。

我们希望,通过这一工作,高水平的科技专著能够及早问世,充分显示它们的价值,发挥科学技术作为生产力的作用,不断推动社会主义现代化建设的发展。愿基金会支持出版的著作如泰山一样,耸立于当代学术之林。

泰山科技专著评审委员会

1992 年 12 月

序

当代的生命科学正在发生日新月异的变化,从分子生物学中发展出来的概念和技术不断地向植物科学中渗透和应用,大大加深了人们对植物生命活动基本规律的认识。很多与植物各种生理过程有关的基因相继克隆,对这些基因的表达调控也已有了不少研究。加上在植物组织培养的基础上发展出来的一系列将外源基因导入植物的遗传转化技术,在植物基因工程经过了 70 年代中期到 80 年代中期一段初试阶段后,已进入了一个蓬勃发展的时期。至今,除了在抗病毒病、抗虫、抗除草剂、延迟果实成熟、创造新的雄性不育材料等方面已取得不少令人鼓舞的成果外,人们还在不断地根据已经探明的植物生理生化知识,构思一些新的基因工程的蓝图,尝试通过基因操作来调控植物的生长发育、提高作物的抗逆性、改良作物的品质等等。同时,结合反义 RNA 技术和抗体基因工程,各种转基因植物的获得,为植物生理学家研究一些特定的基因产物在有关的生理生化过程中的确切功能,提供了十分有用的工具。植物基因工程的一套思路和技术使得对于研究诸如植物发育(开花、形态建成、胚胎发生等)这一类十分复杂的生命现象成为可能,这无疑将对推动整个植物科学的发展作出重大的贡献。因此,植物基因工程已成为当今生物工程中的一个十分活跃和诱人的领域,在国内外引起越来越多的注意。在我国,无论在 863 高技术计划的生物工程领域的项目中,还是“七五”、“八五”的国家攻关项目中,植物基因工程的研究和应用均受到了很大的重视,得到了支持。在国家有关部门的支持下,国内同行这些年来努力工作,不少研究者在困难的条件下仍做出了出色的工作,为我国植物基因工程的发展奠定了基础。正是在这种情况下,中科院微生物所田波教授发起,并得到山东科学技术出版社的支持,组织编写这部《植物基因工程》,十分及时,也很有必要。

本书在第一篇中介绍了植物基因工程研究的概况(第一、二章)。在第二篇中系统地介绍了涉及植物基因工程的一些基本的植物分子遗传学知识(第三、四、八章),以及植物基因载体的构建和细胞遗传转化技术(第四、五、六、七章)。第三篇各章详细介绍了当前所进行的各类植物基因工程的研究进展和问题。全书既有系统,各章又有自我独立的结构,以便读者阅读时各取所需。更为

可喜的是一批青年科学家参与了本书不少章节的撰写,其中有仍在国外实验室工作的出色的青年科学家,也有长期坚持在国内实验室工作的优秀青年科学家。本书不少章节也包括了撰写作者自己多年的工作经验和成果。我相信,本书的出版将为希望了解植物基因工程的人们提供足够的背景,为正在从事植物基因工程的科研人员也可以提供不少宝贵的资料,因为据我所知,至今国内还没有一本系统地介绍植物基因工程原理、进展和问题的书籍。

应该说,植物基因工程还是一个新生儿,将植物基因工程技术运用于农作物的改良,也仍有一个探索的过程。这首先是因为我们对植物的很多生命活动的了解还很少,很多生理生化过程的分子机理尚有待阐明,我们手头上可以操作的基因也还不多;而由模式植物上得到的不少知识要应用到重要的农作物上去,也还需要进行不少研究;很多重要农作物的遗传转化技术也并不能说已经过关,仍有待完善和改进,同时,由基因工程获得的转基因植物的遗传稳定性、对环境生态的影响也还需要进行长期的观察和研究。基因工程植物最终能否成为有用的品种也仍需经受常规育种程序的考验。所以,只有分子生物学家与植物生物学家、遗传育种专家密切合作,才能使植物基因工程在我国建立一个扎实的基础,使之真正在我国的农业生产上发挥它应有的作用。

许智宏

一九九五年二月于北京

目 录

第一篇 概 论

第一章 植物基因工程——机会和问题	(2)
第一节 植物基因工程的定义.....	(2)
第二节 植物基因工程的应用.....	(2)
第三节 植物基因工程研究内容.....	(4)
第四节 植物基因工程危险性的估计和检测.....	(5)
第二章 植物基因工程——现状和前景	(8)
第一节 植物细胞的遗传转化和基因工程的发展.....	(8)
第二节 植物基因工程的进展	(10)
第三节 植物基因工程的展望	(16)

第二篇 总 论

第三章 植物的基因结构与表达调控	(20)
第一节 植物的基因组	(20)
第二节 植物基因的分离	(26)
第三节 植物基因的结构	(33)
第四节 研究植物基因表达和调控的分子生物学方法	(39)
第五节 植物基因表达的基本调控机制	(44)
第六节 植物发育过程中基因的表达和调控	(49)
第四章 根癌农杆菌转化植物细胞的分子机理	(62)
第一节 根癌农杆菌的一般性质	(62)
第二节 根癌农杆菌——Ti 质粒的致瘤原理	(65)
第三节 Ti 质粒基因运载体的构建	(72)
第五章 植物遗传转化(I)	(81)
第一节 概述	(81)
第二节 农杆菌介导的基因转移	(84)
第三节 基因枪转化系统	(86)
第四节 转化体的鉴定和分析	(91)

第六章 植物遗传转化(I)	(98)
第一节 引言	(98)
第二节 DNA 直接转化法	(99)
第三节 种质系统的基因转移法	(104)
第四节 结束语	(106)
第七章 植物病毒来源的基因工程载体和基因表达与调控元件	(109)
第一节 引言	(109)
第二节 植物基因工程的病毒载体	(110)
第三节 植物病毒启动子	(121)
第四节 植物病毒基因组非翻译前导序列	(123)
第五节 植物病毒的其他功能序列	(129)
第八章 植物 RFLP 作图的原理、方法和进展	(134)
第一节 RFLP 技术与 RFLP 标记	(135)
第二节 RFLP 图谱的构建	(135)
第三节 RFLP 图谱的意义	(138)
第四节 用于基因组研究的 RFLP 作图	(139)
第五节 基于图谱的基因克隆战略	(141)

第三篇 各 论

第九章 抗虫植物基因工程	(145)
第一节 苏芸金杆菌毒蛋白基因	(145)
第二节 蛋白酶抑制剂基因	(150)
第三节 淀粉酶抑制剂基因	(158)
第四节 外源凝集素基因	(159)
第十章 抗病毒植物基因工程	(165)
第一节 引言	(165)
第二节 病毒基因组结构与表达策略	(167)
第三节 CP 介导的基因工程抗性	(178)
第四节 非结构蛋白介导的基因工程抗性	(182)
第五节 卫星 RNA 策略及其作用机制	(186)</

第四节	杀菌肽的杀菌机制·····	(205)
第五节	杀菌肽植物基因工程的研究进展·····	(206)
第六节	杀菌肽基因的应用前景及问题讨论·····	(209)
第十二章	植物病虫害防治新策略——信号基因介导的广谱抗病策略·····	(214)
第一节	引言·····	(214)
第二节	信号基因的选择·····	(215)
第三节	用于表达信号基因的启动子的选择·····	(216)
第四节	无毒基因在转化植物中的生物学效应·····	(218)
第五节	无毒基因介导广谱抗病机理初探·····	(219)
第六节	无毒基因介导的广谱抗病策略的意义和展望·····	(221)
第十三章	植物与病原真菌相互作用的分子机制以及植物抗真菌基因工程·····	(223)
第一节	病原真菌致病性的分子基础·····	(223)
第二节	植物防卫反应的分子基础·····	(225)
第三节	植物抗真菌病害基因的克隆策略·····	(228)
第十四章	水稻种子贮存蛋白基因遗传操作基础·····	(232)
第一节	水稻种子贮存蛋白基因的结构与性质·····	(232)
第二节	水稻种子贮存蛋白基因的结构及其表达调控·····	(234)
第三节	水稻种子贮存蛋白的基因工程研究与应用·····	(238)
第十五章	植物抗除草剂的基因工程·····	(242)
第一节	引言·····	(242)
第二节	植物抗除草剂的分子机理及基因工程·····	(243)
第三节	抗除草剂作物培育途径的评估·····	(250)
第四节	展望·····	(251)

第二节	植物耐旱耐盐分子机制的研究.....	(294)
第三节	用基因工程手段培育耐旱耐盐作物的探讨.....	(298)
第二十章	植物抗寒基因工程.....	(300)
第一节	植物抗寒相关基因及其基因工程.....	(300)
第二节	鱼抗冻蛋白及其在植物抗寒基因工程中的应用.....	(304)

第一篇

概 论

第一章 植物基因工程——机会和问题

第一节 植物基因工程的定义

近 10 年来,由于植物分子遗传学的发展,特别是基因的分离和结构的研究、基因及其产物蛋白质的序列分析、基因表达与调控、基因表达载体的研究以及植物转化技术的发展,实现了基因遗传转化,获得了转基因植物(Transgenic plant),植物分子遗传学出现了一个新的分支——植物基因工程(Plant genetic engineering)。其意义是利用分子生物学的技术,把经过分离或人工构建的基因,通过适当的基因转化方法插入到植物基因组中,得到基因产物和生物活性的表达,并能遗传至后代。与基因工程相近的一个名词是植物分子生物技术(Plant molecular bio-technology)。

工程和技术系指有商业价值的应用科学,但基因工程和生物技术除具有应用科学意义外,还可用于生命过程及其遗传性的基础研究。

第二节 植物基因工程的应用

一、人类食物供应与植物育种

食物供应是人类面临的主要挑战之一,世界上 90%以上的人口的食物依赖于 15 种主要栽培植物(水稻、小麦、玉米、高粱、谷子、黑麦、大麦、香蕉、蚕豆、大豆、花生、木薯、甘薯、马铃薯和椰子)和 5 种饲养动物(牛、羊、猪、鸡与鸭)。动物的饲养也依赖于植物产品,每公顷土地在适宜气候、栽培和作物种类条件下能提供 4~5 个人的肉、素混合食物的需要或 12 个素食者的需要(Hillman, 1992)。由于人口压力的不断增长,这一威胁不断加深,根据统计(Sadik, 1990),85%以上的人口增长发生于发展中国家,自 1980 年以来其人口增加了 30%。在热带发展中国家,每人耕种面积从 1971 年的 0.28 公顷,减少到 1986 年的 0.22 公顷。由于森林砍伐和水土流失等原因进一步使耕地面积减少。发达国家也由于污染、工业建筑、住房、机场和道路占地等原因也不断使耕地面积减少。要在有限的耕地面积上解决人类日益增长的食物需求,只有依靠科学技术提高单位面积产量,而农业科学中植物育种是最有力的措施。

二、植物传统育种与基因工程育种

根据 Durick(1986)报导,在发达国家由于作物品种的改良,平均每年增产 1%以上。例如美国的主要作物玉米、小麦、高粱和大豆在过去的 50 年中产量增加了 5%。发展中国

家通过推广高产水稻(Dalrymple, 1986b)、小麦(Dalrymple, 1986a)和玉米(Timothy 等, 1988),形成所谓“绿色革命”,使亚洲的人均食物占有量,自 1970 年至 1987 年增加了 1.2%。我国杂交水稻、优良小麦品种、杂交优势玉米和其他作物良种大幅度增产的事实是众所周知的,但传统的育种方法也存在许多局限性。

1. 有性杂交和拟有性过程

传统育种是利用有性杂交(Sexual hybridization)过程,因此它依赖于亲本材料,如果缺少具有某种特性的亲本或具有所需特性的遗传材料便不能进行有效的有性杂交,就不能发挥传统育种的作用。基因工程所进行的基因转移,可称谓拟有性过程(Parasexual processes)(Hillman, 1992),插入植物核染色体的基因,其后代也按孟德尔规律进行性状分离。但它不受杂交亲合性的限制。在植物表达系统的调控下,不但各种植物来源的基因,而且微生物和动物来源的基因也可在植物中表达并遗传,为优良品种的选育提供了新的可能性。

2. 遗传资源和遗传多样性的利用

基因工程在保存和利用自然界的遗传资源(Genetic resources)和遗传多样性(Genetic diversity)方面具有特殊的作用。植物遗传资源的收集已引起多方面的注意。基因库(Gene bank)和种质资源(Germplasm collection)在原产地和非原产地的保存广泛建立。仅谷类、豆类、块根类、蔬菜、饲草和经济作物已达 250 万份,为基因工程提供了大量的基因来源。

在现代农业的发展中,随着有限数量的优良品种的超量推广而替代了当地原有的具有丰富多样性的地方品种,使生态环境中遗传多样性严重丧失。遗传多样性的丧失引起生态巨变,使人类赖以生存的农业面临环境和病虫害的威胁。此外,近代气候条件的改变,都要求人们从基因库和种质资源的多样性基因中通过常规和基因工程育种获得能维持生态平衡的、具有遗传多样性的栽培植物群落。

3. 植物育种技术和程序的改进

虽然植物常规育种至今仍然是培育新品种的主要途径,然而它也存在着技术和程序上的局限性。首先常规育种通过有性杂交和回交等进行的有用基因的转移需要长久的时间及繁杂的程序,也要求有人力和物力的消耗。常规育种面临的另一挑战是难于在性状分离的群体中选择理想的重组表型(Recombinant phenotype)(Powell, 1990)。

压力下,选择出少数高度抗病的植株,用秋水仙素处理使染色体加倍,获得种子。种子当年到海南岛进行繁育和抗病性田间测定,其后代植株的抗病性和其他性状都有均一的表现。海南岛繁育收获的种子即可在第二年作较大规模的田间抗病性鉴定并参加区域性品种鉴定,大大缩短了基因工程育种的时间。

由花药培养获得的单倍体植株

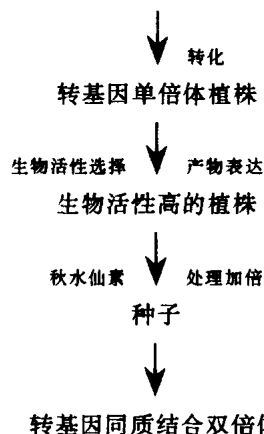


图 1-1 转基因植物的快速同质结合程序

第三节 植物基因工程研究内容

一、基因工程育种

向农业、园艺、森林和药用等植物优良品种导入单一基因或多基因决定的性状,使其经济特性得到改善。本书第三篇中将提供一些较为成功的例子,当然其应用范围更加广泛。育种目标可归结为三大类(Hillman,1992):

1. 对病、虫、杂草等危害的抵抗性

通过各种来源的基因的导入使植物获得对病虫害抗性。如免疫性、抗性和耐受性等及对除草剂的抗性以达到防治杂草的目的。

2. 品质的改良

如营养价值;加工品质;颜色和形状的外观;消除或引入酸、辣、芳香或苦的成分;生化成分的改变;干物质含量;纤维素、木质素的产生等。

3. 生理性状的改善

如高产性;土壤矿物元素的吸收;氮素固定;水分经济利用;耐盐性;耐温极限;光周期和温周期的敏感性或不敏感性;茎和根系统的配比;促进或抑制生长速度;发芽的均一性;可预

1. 植物基因组的研究

基因的测定、分离、特性和结构的研究;基因功能及其相互间的作用;基因型(Genotype)和表型(Phenotype)的关系;基因诱变;倍性操作及基因重组等。

2. 基因表达与调控研究

即基因表达的时间、位置 and 期间的组分的调控;顺式作用因子(Cis-acting elements)与反式作用因子(Trans-acting elements);超敏位点以及甲基化与基因表达的关系;基因表达的组织特异性和环境因子的影响;基因的转录后加工等的研究。

3. 基因转移系统的研究

基因转移技术仍然处于发展时期。广泛应用于双子叶植物的根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的转化仍受其侵染寄主范围和植物再生能力的限制,我们对转化过程的控制仍然有限。基因枪、基因直接引入、原生质体、花粉管和胚等方法虽已开始试用于单子叶植物,但达实用化还有很大距离,然而基因直接引入为质体转化(Plastid transformation)提供了新的可能性。

4. 抗病虫害的机理

对病原物和害虫基因组的了解,对微生物基因进入真核植物基因组后的影响的研究以及植物对病虫害的抗性机理的研究,是植物抗性基因工程的基础。

第四节 植物基因工程危险性的估计和检测

由于植物基因工程的产品——转基因品种是在开放的大田中大量种植,因此其危险性比转基因微生物在控制条件下的应用要大得多,后者只是偶然而少量释放到自然界中。携带有自然界不存在的重组基因的生物可能导致的危险性,必须给予科学的估计和测定(Berlinger 等,1992)。

一、自然界重组基因释放的可能性

虽然还没有关于自然界基因转移到其他植物中的现象的报道,但是通过植物的异花授粉,可产生野生近缘种之间的杂交。在一个种内基因的各种可能的杂交是存在的,之所以不易看到其危害性,可能是由于这种杂交所得后代的选择压力太弱了。基因工程构建的各种抗除草剂和抗病虫害的基因是否会被比较强的压力所选择呢?应当强调,一种基因被引入植物染色体中,与自然基因的重组合是没有什么不同的。除非导入的基因成为一种可移动的 DNA 因子,如转座子。即使如此