

· 大学通识教育教材 ·

转基因植物及其应用

◎ 王永飞 马三梅 编著



ZHUANJIYIN ZHIWU JIQI
YINGYONG

华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

转基因植物及其应用

转基因植物及其应用

李 洪 丁 明 编著



中国农业大学出版社
CHINA UNIVERSITY OF AGRICULTURE PRESS

中国农业大学出版社

CAUP

大学通识教育教材

转基因植物及其应用

王永飞 马三梅 编著

华中科技大学出版社
中国·武汉

图书在版编目(CIP)数据

转基因植物及其应用/王永飞 马三梅 编著. —武汉:华中科技大学出版社,2007 年 7 月

ISBN 978-7-5609-4134-9

I. 转… I. ①王… ②马… II. 基因转变-植物-遗传工程-研究
IV. Q943.2

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第134836号

转基因植物及其应用

王永飞 马三梅 编著

策划编辑:李东明

责任编辑:曹红

责任校对:代晓莺

封面设计:刘卉

责任监印:张正林

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)87557437

录 排:武汉众心设计室

印 刷:武汉市新华印刷有限责任公司

开本:710mm×1000mm 1/16

印张:11

字数:183 000

版次:2007年7月第1版

印次:2007年7月第1次印刷

定价:18.00元

ISBN 978-7-5609-4134-9/Q·27

(本书若有印装质量问题,请向出版社发行部调换)

前 言

自从1983年世界上首次获得转基因植物以来,转基因植物技术已得到了飞速的发展。目前全球转基因植物已达200多种,2006年的种植面积已达1亿公顷。改良的性状涉及抗虫、抗病、抗除草剂、抗胁迫、提高产量和品质等。转基因植物已对全球经济发展和环境变化作出了巨大贡献。

目前国内外虽然有一些转基因植物及植物基因工程方面的教材和专著,但这些教材和专著内容较多,很难作为通识课教材使用;并且这些教材和专著把重点放在转基因植物的原理和技术方面,而对转基因植物的应用只有零星论述或很少论及。有感于此,我们一直想写一本侧重于转基因植物应用且适合教学的教材。

因此,本书作者在多年从事转基因植物教学和研究的基础上,综合近年来国内外新的研究成果,详细论述了转基因植物及其应用。本书共六章,第一章为转基因植物的原理,介绍了植物基因转化的方法,转基因植物的筛选和鉴定方法等;第二章到第五章为转基因植物的应用,详细论述转基因植物在抗虫、抗病、抗除草剂、抗胁迫、提高产量、品质改良等各方面的应用,以及利用转基因植物作为生物反应器来生产糖类物质、可降解生物塑料、动物抗体、疫苗、药用蛋白和工业酶制剂等,利用转基因植物控制果实的成熟期、创造雄性不育系及自交不亲和系,进行生物固氮及环境治理等;第六章为转基因植物存在的问题及新策略,主要包括转基因植物选择标记基因的安全性问题、降低转基因植物外源基因扩散的分子策略和高等植物叶绿体基因组的转化及其应用等内容。每章前有内容提要,后有复习思考题,供学生学习之用。

本教材体系完整,详略得当。通观全书,该详细论述的地方非常详细,娓娓道来;需要简短的地方则一笔带过,前后连接自然流畅。此外,本教材还具有内容通俗易懂,知识丰富多彩,语言精练简洁,结构严谨、完善,论述清晰、流畅,大量引用最新资料等特色 and 优势。

本书的编写得到暨南大学教务处和生物工程学系的指导与关心。本书的出版还得到暨南大学第二批资助出版本科教材项目及广东省“生物技术”名牌

专业经费的资助，华中科技大学出版社对本书的出版也付出了大量的劳动。在此一并表示感谢！作者对本书中所引用的国内外教材、专著及科技期刊的大量资料均尽最大可能一一做了标注，如有遗漏和错误敬请谅解。

限于编者的水平和经验，书中难免有缺点和错误之处，恳请读者批评指正。

编 者

2007 年 5 月

目 录

第一章 转基因植物的原理.....	1
第一节 植物基因转化的方法.....	2
第二节 转基因植物的筛选和鉴定方法	15
复习思考题	20
第二章 具有抗、耐性的转基因植物	22
第一节 抗虫的转基因植物	23
第二节 抗病害的转基因植物	25
第三节 抗除草剂的转基因植物	31
第四节 抗寒的转基因植物	35
第五节 耐旱、耐盐的转基因植物	36
第六节 耐涝的转基因植物	40
第七节 耐热的转基因植物	40
第八节 耐强光和紫外辐射的转基因植物	41
第九节 耐碱性土壤的转基因植物	41
复习思考题	41
第三章 品质改良的转基因植物	43
第一节 营养品质改良	44
第二节 甜味的改良	65
第三节 花卉品质的改良	67
第四节 饲料作物和牧草的品质改良	74
第五节 棉花纤维品质的改良	78
第六节 马铃薯加工性能的改良	81
第七节 树木的木质素品质改良	81
第八节 降低植物中的有害成分	82
复习思考题	83
第四章 转基因植物作为生物反应器	85
第一节 利用转基因植物生产糖类物质	86
第二节 利用转基因植物生产可降解生物塑料	87

2 转基因植物及其应用

第三节 利用转基因植物生产动物抗体	88
第四节 利用转基因植物生产疫苗	91
第五节 利用转基因植物生产药用蛋白	95
第六节 利用转基因植物生产工业酶制剂	97
复习思考题	98
第五章 转基因植物在其他方面的应用	99
第一节 利用转基因植物控制果实的成熟期	100
第二节 利用转基因植物创造雄性不育系	103
第三节 利用转基因植物创造自交不亲和系	109
第四节 利用转基因植物提高光合效率	111
第五节 固氮的基因工程	118
第六节 利用转基因植物进行环境治理	119
复习思考题	119
第六章 转基因植物存在的问题及新策略	121
第一节 转基因植物选择标记基因的安全性问题及对策	122
第二节 降低转基因植物外源基因扩散的分子策略	132
第三节 高等植物叶绿体基因组的转化及其应用	138
复习思考题	149
主要参考文献	151

第一章

转基因植物的原理

本章主要介绍植物基因转化的方法及转基因植物的筛选和鉴定方法。

植物基因转化的方法可分为载体介导的转化方法、基因直接导入法和种质系统法三大类。载体介导的转化方法主要包括根瘤农杆菌介导转化法、发根农杆菌介导转化法和病毒介导转化法等；基因直接导入法主要包括基因枪转化法、聚乙二醇法、脂质体法、电击法、超声波法、激光微束法、显微注射法和碳化硅纤维介导转化法等；种质系统法主要包括花粉管通道法、浸泡转化法、胚囊和子房注射法等。

在转基因植物的筛选和鉴定方法中侧重介绍常用的选择标记基因和报告基因检测法。

第一节 植物基因转化的方法

转基因植物 (transgenic plant) 又称遗传修饰的植物 (genetically modified plant, GMP), 是指把从动物、植物或微生物中分离到的目的基因, 通过各种方法转移到植物基因中, 从而获得的具有特定性状的植物。

经过二十多年的发展, 目前已有许多用于植物基因转化的方法, 这些方法可分为三大类。第一类为载体介导的转化方法, 即将目的基因插入到农杆菌的质粒或病毒的 DNA 等载体分子上, 随着载体 DNA 的转移而将目的基因导入到植物基因组中。第二类为基因直接导入法, 是指通过物理或化学的方法直接将外源目的基因导入植物的基因组中。物理方法包括基因枪转化法、电击法、超声波法、显微注射法、激光微束法和碳化硅纤维介导法等; 化学方法有聚乙二醇法和脂质体法等。第三类为种质系统法, 包括花粉管通道法、浸泡转化法、胚囊和子房注射法等。

一、载体介导的转化方法

(一) 根癌农杆菌介导转化法

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 是普遍存在于土壤中的一种革兰氏阴性细菌。它能在自然条件下感染大多数双子叶植物的受伤部位, 并诱导产生冠瘿瘤 (crown gall tumor)。根癌农杆菌细胞中含有 Ti 质粒 (tumor-inducing plasmid, 瘤诱导质粒)。在 Ti 质粒上有一段 T-DNA, 即转移-DNA 区 (transferred-DNA region), 又称为 T 区 (T region)。根癌农杆菌通过浸染植物伤口进入细胞后, 可将 T-DNA 插入到植物基因组中。因此, 根癌农杆菌是一种天然的植物遗传转化体系, 可以将目的基因插入到经过改造的 T-DNA 区, 借助根癌农杆菌的感染实现外源基因向植物细胞的转移与整合, 然后通过细胞和组织培养技术, 再生出转基因植株。

1. Ti 质粒的结构与功能

Ti 质粒是根癌农杆菌染色体外的遗传物质, 为双链共价闭合的环状 DNA 分子。Ti 质粒在 160 ~ 240 kb 之间, 其中 T-DNA 在 15 ~ 30 kb 之间。根据其诱导的植物冠瘿瘤中所合成的冠瘿碱 (opine) 种类, Ti 质粒可分为四类: 章鱼碱型 (octopine)、胭脂碱型 (nopaline)、农杆菌碱型 (agropine) 和农杆菌素碱型 (agrocinopine)。

Ti 质粒可分为四个功能区域: ① T-DNA 区, T-DNA 区是根癌农杆菌浸染

植物细胞时从 Ti 质粒上切割下来转移到植物细胞中去的一段 DNA；② Vir 区 (virulence region)，Vir 区上的基因能激活 T-DNA 转移，使根癌农杆菌表现出毒性；③ Con 区 (region encoding conjugations，接合转移编码区)，该区段上存在与细菌间接转移的有关基因，调控 Ti 质粒在农杆菌之间的转移；④ Ori 区 (origin of replication，复制起始区)，Ori 区上的基因调控 Ti 质粒的自我复制。

T-DNA 上共含有 *tms*、*tmr* 和 *tmt* 三套基因。其中 *tms* 和 *tmr* 基因分别控制合成植物生长素与分裂素，促使植物创伤组织无限制地生长与分裂，形成冠瘿瘤。*tms* 基因组由 *iaaH* 和 *iaaM* 基因组成，控制由色氨酸生成吲哚乙酸的生物合成途径；*tmr* 基因组中的 *iptZ* 负责由异戊烯焦磷酸和 AMP 合成分裂素的反应；*tmt* 基因组的编码产物可催化合成冠瘿碱。冠瘿碱的代谢产物为氨基酸和糖类，是根癌农杆菌生长必需的物质，供根癌农杆菌作为营养物质使用。

此外，在 T-DNA 的两端还含有左右两个边界，左边界 (left border, LB) 和右边界 (right border, RB) 是长为 25 bp 的末端重复序列，在切除及整合过程中具有重要意义。

2. Ti 质粒的转化机理

根癌农杆菌之所以会感染植物根部，是因为植物根部的损伤部位会分泌出酚类物质，即乙酰丁香酮和羟基乙酰丁香酮，这些酚类物质能诱导 Ti 质粒上的 *vir* 基因以及根癌农杆菌染色体上的一个操纵子表达。*vir* 基因产物将 Ti 质粒上的 T-DNA 单链切下，而根癌农杆菌染色体上的操纵子表达产物则与单链 T-DNA 结合形成复合物，转化植物根部细胞。整个过程大致可分为以下几个步骤：① 根癌农杆菌对植物细胞的识别和附着；② 根癌农杆菌对植物信号物质的感受；③ 根癌农杆菌 Ti 质粒上的 *vir* 基因以及染色体上操纵子的活化；④ T-DNA 复合体的产生；⑤ T-DNA 复合体的转运；⑥ T-DNA 整合到植物基因组中。

3. 野生型 Ti 质粒的改造和中间载体的构建

Ti 质粒是植物基因工程的一种天然载体。但野生型 Ti 质粒不能直接用做克隆外源基因的载体。这主要表现在：① 野生型 Ti 质粒分子过大，在基因工程中操作起来十分麻烦；② 野生型 Ti 质粒上分布着各种限制性核酸内切酶的多个酶切位点，不论用何种限制性核酸内切酶切割，都会切成很多片段，而且即使在 T-DNA 上也很难找到可利用的单一的酶切位点；③ T-DNA 上的 *tms* 和 *tmr* 基因产物将干扰受体植物内源激素的平衡，导致冠瘿瘤的产生，阻碍转基因植物细胞的分化和植株的再生；④ 冠瘿碱的合成过程消耗大量的精氨酸和谷氨酸，直接影响转基因植物细胞的生长代谢；⑤ 野生型 Ti 质粒没有大肠杆

菌 (*Escherichia coli*) 的复制起点和作为转化载体的选择标记基因。因此, 必须对野生型 Ti 质粒进行改造后才能作为转基因植物的载体。

对野生型 Ti 质粒的改造, 主要包括以下几个方面: ① 删除 T-DNA 上的 *tms*、*tmr* 和 *tmt* 基因; ② 加入大肠杆菌复制起点和选择标记基因, 构建根癌农杆菌-大肠杆菌穿梭质粒, 便于重组分子的克隆与扩增; ③ 引入植物细胞的筛选标记基因, 如细菌来源的新霉素磷酸转移酶 II 基因 (neomycin phosphotransferase II, *nptII*) 等, 便于转基因植物细胞的筛选; ④ 引入植物基因的启动子和 polyA 化信号序列; ⑤ 插入人工多克隆位点, 以利于外源基因的克隆; ⑥ 除去 Ti 质粒上的其他非必需序列, 最大限度地缩短载体的长度。

由于大肠杆菌具有能与根癌农杆菌高效接合转移的特征, 因此, 为了使 Ti 质粒成为有效的外源基因导入载体, 科学家们将 T-DNA 片段克隆进大肠杆菌的质粒, 并插入目的基因, 然后通过接合转移将目的基因引入根癌农杆菌的 Ti 质粒。带有重组 T-DNA 的大肠杆菌衍生载体称为中间载体 (intermediate vector), 而接受中间载体的 Ti 质粒则称为受体 Ti 质粒 (acceptor Ti plasmid)。构建中间载体是解决 Ti 质粒不能直接导入目的基因的有效方法之一。中间载体是一种在普通大肠杆菌的克隆载体 (如 pBR322 质粒) 中插入了一段合适的 T-DNA 片段而构成的小型质粒。

4. 中间表达载体的构建

在中间载体中加上能在植物细胞中表达的各种启动子, 可使外源基因在植物细胞中表达; 当启动子与显性选择标记基因及报告基因连接, 构成嵌合基因 (chimeric gene) 时, 这些标记基因同样能表达, 从而提供可用于筛选和鉴定的表型。这类含植物启动子的中间载体称为中间表达载体 (intermediate expression vector)。

目前已从动物、植物、病毒及微生物中分离到许多适用于植物的启动子。根据作用方式及功能的不同, 可将启动子分为三类: 组成型启动子、组织特异型启动子和诱导型启动子。

(1) 组成型启动子。

组成型启动子 (constitutive promoter) 是指在该类启动子控制下, 结构基因的表达大体恒定在一定水平上, 在不同组织、部位表达水平没有明显差异。目前使用最广泛的组成型启动子是花椰菜花叶病毒 (cauliflower mosaic virus, CaMV) 35S 启动子和来自根癌农杆菌 Ti 质粒 T-DNA 区的胭脂碱合成酶基因 *nos* 启动子。后者虽来自细菌, 但具有植物启动子的特性。

(2) 组织特异启动子。

组织特异启动子 (tissue-specific promoter) 又称器官特异性启动子。在这类启动子调控下, 基因往往只在某些特定的器官或组织部位表达, 并表现出发育调节的特性。例如烟草的花粉绒毡层细胞中特异表达基因启动子 TA29、豌豆的豆清蛋白 (legumelin) 基因启动子可在转化植物种子中特异性表达, 马铃薯块茎储藏蛋白基因启动子在块茎中优势表达。

(3) 诱导型启动子。

诱导型启动子 (inducible promoter) 是指在某些特定的物理或化学信号的刺激下, 该种类型的启动子可以大幅度地提高基因的转录水平。目前已经分离了光诱导表达基因启动子、热诱导表达基因启动子、创伤诱导表达基因启动子、真菌诱导表达基因启动子和共生细菌诱导表达基因启动子等。

目前植物基因工程中常采用的终止子是胭脂碱合成酶的 *nos* 终止子和 Rubisco 小亚基基因的 3' 端区域。

5. 植物表达载体的构建

中间表达载体是不能将外源基因转化进植物细胞的。因此, 必须将中间表达载体引入到上述已改造的受体 Ti 质粒中, 并构建成能浸染植物细胞的基因转化载体 (它是由两种以上质粒构成的复合型载体, 故称之为载体系统), 才能在植物基因转化中应用。

为利用根癌农杆菌的 Ti 质粒, 发展了一元载体系统和二元载体系统。一元载体系统是指首先将目的基因插入到中间表达载体上, 筛选出含有目的基因的重组分子; 然后将重组质粒转化到根癌农杆菌中, 重组质粒与 Ti 质粒上的同源序列发生同源重组, 将外源基因整合到 Ti 质粒上, 用于浸染植物细胞, 此时 T-DNA 重组分子就可整合到植物细胞染色体 DNA 上; 最后再利用植物选择标记基因筛选转化细胞的系统。简言之, 一元载体系统就是指含有目的基因的中间表达载体与改造后的受体 Ti 质粒通过同源重组产生的一种复合型载体, 通常又称为共整合载体 (co-integrated vector)。由于该载体的 T-DNA 区与 Ti 质粒 Vir 区连锁, 因而又称为顺式载体 (cis-vector)。

二元载体 (binary vector) 系统是指由两个分别含 T-DNA 和 Vir 区的相容性突变 Ti 质粒构成的系统。其中之一是含有 T-DNA 转移所必需的 Vir 区段质粒, 它缺失或部分缺失 T-DNA 序列。它的主要作用是表达毒蛋白, 激活 T-DNA 的转移, 故称为辅助 Ti 质粒 (helper Ti plasmid)。另一个则是含有 T-DNA 的质粒, 一般作为目的基因的载体, 由于其相对分子质量较小, 故称为微型 Ti 质粒 (mini-Ti plasmid)。它是一种寄主范围广泛的 DNA 转移载体质

粒。它既含有大肠杆菌复制起始位点,又含有根癌农杆菌复制起始位点,实际上是一种大肠杆菌-农杆菌穿梭质粒。这两种质粒在单独存在的情况下,均不能诱导植物产生冠瘿瘤。若根癌农杆菌细胞内同时存在这两种质粒时,便可获得正常诱导肿瘤的能力。因此,含有双元载体的根癌农杆菌细胞浸染植物细胞时,就可以将含有目的基因的 T-DNA 整合进植物基因组中。

目前以 T-DNA 转化植物细胞的标准方法大多采用 Ti 质粒介导的双元载体系统。首先将目的基因插入微型质粒中,含有目的基因的重组微型质粒转化大肠杆菌后,再导入携带辅助 Ti 质粒的根癌农杆菌中,经筛选后直接感染植物细胞。根癌农杆菌浸染植物细胞后,植物的创伤信号启动 Ti 质粒上的 *vir* 基因,随后将微型质粒上的 T-DNA 切割下来,转移到植物细胞中。由于双元载体系统的 T-DNA 和 Vir 区在两个独立的质粒上,通过反式激活 T-DNA 转移,故该载体又称为反式载体 (trans-vector)。

6. Ti 质粒介导的转移转化方法

目前已建立了多种根癌农杆菌 Ti 质粒介导的植物基因转化方法,如叶盘转化法、原生质体共培养转化法、整株感染法等。它们的基本程序包括含重组 Ti 质粒的根癌农杆菌的培养、选择合适的外植体、根癌农杆菌与外植体共培养、外植体脱毒及筛选培养和转化植株再生等步骤。

(1) 叶盘转化法。叶盘转化法 (leaf dish transformation) 是 Monsanto 公司 Morsch 等人于 1985 年建立的一种转化方法。其操作步骤为:首先用打孔器从消毒叶片上取下直径为 2~5 mm 的圆形叶片,即叶盘;再将叶盘放入培养至对数生长期的根癌农杆菌液中浸泡几秒钟,使根癌农杆菌浸染叶盘;然后用滤纸吸干叶盘上多余的菌液,将这种经浸染处理过的叶盘置于培养基上共培养 2~3 d,再转移到含有头孢霉素或羧苄青霉素抑菌剂的培养基中,除去根癌农杆菌,与此同时在该培养基中加入抗生素进行转化体的筛选,使转化细胞再生为植株。对这些再生植物进行分子检测时就可确定它们是否整合有目的基因及其表达情况。

叶盘转化法已在多种双子叶植物上得到成功的应用。实际上,其他的多种外植体,例如茎段、叶柄、胚轴、子叶愈伤组织、萌发的种子均可采用类似的方法进行转化。该方法的优点是适用性广且操作简单,是目前应用最多的方法之一。

(2) 原生质体共培养转化法。原生质体共培养转化法是以原生质体作为受体细胞,通过将根癌农杆菌与原生质体作短暂的共培养,然后洗涤除去残留的根癌农杆菌,置于含抗生素的选择培养基上筛选出转化细胞,进而再生成植株。与叶盘转化法相比,此法得到的转化体不含嵌合体,一次可以处理多个细

胞,得到相对较多的转化体。应用此法进行基因转化时,其先决条件就是要建立起良好的原生质培养和再生植物技术体系。

(3) 整株感染法。此法是模仿根癌农杆菌天然的感染过程,用根癌农杆菌直接感染植物而进行遗传转化的一种简单易行的方法。其做法是:人为地在植株上造成创伤,然后把含有重组质粒的根癌农杆菌接种在创伤面上,或把含有重组质粒的根癌农杆菌注射到植物体内,使根癌农杆菌在植物体内进行浸染并实现转化。为了获得较高的转化效率,一般采用无菌种子的实生苗或试管苗。用去除了致瘤基因的根癌农杆菌进行整株感染后,受伤部位一般不会出现肿瘤。在筛选转化体时,可将感染部位的薄壁组织切下放入选择培养基上及诱发愈伤组织的培养基上进行筛选和愈伤组织诱导。最后将转化的愈伤组织转移至含合适植物激素的培养基上诱导再生植株。

在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 上,将根癌农杆菌涂于植株腋芽处或顶芽,可长出转化的新枝条,新的转化枝条开花结实后,可以获得转基因种子;或者通过真空渗透或农杆菌浸泡拟南芥开花植株,等结实之后,利用筛选萌芽种子的方法,也可以得到转基因植株及种子。

(二) 发根农杆菌介导转化法

发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 是与根癌农杆菌同属的一种病原土壤杆菌。但与根癌农杆菌不同的是,发根农杆菌从植物伤口入侵后,不能诱发植物产生冠瘿瘤,而是诱发植物产生许多不定根。这些不定根生长迅速,不断分支成毛状,故称之为毛状根或发状根 (hairy root)。发状根的形成是由存在于发根农杆菌中的根诱导质粒 (root inducing plasmid, Ri 质粒) 所决定的。

Ri 质粒是发根农杆菌染色体外的遗传物质,属于巨大质粒,其大小为200 ~ 800 kb。Ri 质粒和 Ti 质粒不仅结构、特点相似,而且具有相同的寄主范围和相似的转化机理。与 Ri 质粒转化相关的也主要是 Vir 区和 T-DNA 区两部分。Ri 质粒的 T-DNA 中也存在冠瘿碱合成基因,且这些合成基因只能在被浸染的真核细胞中表达。根据诱导的冠瘿碱的不同,Ri 质粒可分为三种类型:农杆菌型 (agropine)、甘露碱型 (mannopine) 和黄瓜碱型 (cucumopine)。与 Ti 质粒的 T-DNA 不同的是,Ri 质粒的 T-DNA 上的基因不影响植株再生。因此,野生型 Ri 质粒可以直接作转化载体。

与 Ti 质粒相同,Ri 质粒基因转化载体的构建也主要采用共整合载体系统和双元载体系统。由 Ri 质粒诱发产生的不定根组织,经离体培养后,一般可再生完整的植株。因此,利用 Ri 质粒作为转基因植物的载体,同样具有诱人的前景。

(三) 病毒介导转化法

病毒浸染细胞后把它的 DNA 导入寄主细胞, 并且这些病毒 DNA 能在寄主细胞中进行复制和表达, 这本身就是一种潜在的基因转化系统。因此, 病毒可以作为植物转基因的一种载体。随着植物病毒分子生物学及遗传学研究的不断深入, 用病毒基因组作为载体转化植物细胞日益受到人们的重视, 因为病毒载体能将外源基因导入植物的所有组织和细胞中, 而且不受单子叶或双子叶的限制。

在已知的 300 多种植物病毒中, 单链 RNA 病毒占 91% 左右, 双链 DNA 病毒、单链 DNA 病毒各占 3% 左右。RNA 不太适合作为克隆载体, 因为 RNA 的操作非常困难。目前较为成熟的植物病毒载体是 CaMV 和番茄金花叶病毒 (tomato golden mosaic virus, TGMV)。

1. CaMV DNA 载体转化法

CaMV 含有双链 DNA 基因组, 将外源目的基因插入到 CaMV DNA 上, 重组分子在体外包装成有感染力的病毒颗粒, 就可高效转染植物原生质体, 进而通过原生质体培养再生为整株植物。但 CaMV 作为基因转化的载体也存在以下缺点, 从而限制了它的应用: ① CaMV 容纳外源 DNA 的能力非常有限, 即使是切除了非必需序列, 也只能插入很小的片段; ② CaMV 的寄主范围非常窄, 主要是芸薹属 (*Brassica*) 植物如甘蓝和花椰菜等; ③ CaMV 是一种病原体, 它感染后会使得寄主植物患病, 降低产量和品质; ④ 目前还没有发现一种植物病毒 DNA 是可以整合到寄主染色体上的, 因此不可能通过有性过程将插入的外源基因稳定地传递给感染植株的后代; ⑤ 尽管 CaMV DNA 可以感染植物, 而带有外源基因的 CaMV DNA 重组体则不能感染植物, 这就必须通过原生质体予以克服, 但通过原生质体再生植株对有些作物是非常困难的, 并且植物病毒在植物组织中的传播也会受到限制; ⑥ 目前判断 CaMV DNA 感染的唯一办法就是靠“症状”的表现, 因此, 对 CaMV DNA 载体来说, 还需要一个更好的选择标记。

2. TGMV DNA 载体转化法

植物双生病毒 (geminiviruses) 为单链 DNA 病毒, 成熟的双生病毒呈双颗粒状, 每一个颗粒中含有一条不同的 DNA 单链, 其中 A 链能单独在植物细胞中复制, 并含有一部分病毒包装蛋白基因, B 链编码另一部分包衣蛋白基因及感染性基因。A、B 两条链必须同处于一个植物细胞中, 才能形成有感染力的病毒。双生病毒具有广泛的宿主范围, 是一种很有潜力的植物病毒载体。

目前常用的载体是双生病毒家族成员中的 TGMV。利用 TGMV 病毒将外源基因克隆到植物体内的程序是：从成熟的病毒颗粒中分离 A 链 DNA，并在体外复制成双链形式；以外源基因和标记基因（例如 *nptII*）取代 A 链 DNA 上的病毒包装蛋白基因；将重组分子克隆在含有 T-DNA 和农杆菌根瘤菌复制子的载体质粒上，并转化含有 Ti 辅助质粒的农杆菌根瘤菌；将农杆菌根瘤菌注射到已含有 TGMV 的 B 链植物的茎组织中，此时重组 DNA 分子在植物体内被包装成具有活力的病毒颗粒，后者分泌后再感染其他细胞和组织，使外源基因迅速遍布整株植物。在上述工作的基础上，随后又发展了同时含有 A 链 DNA 和 B 链 DNA 两种组分的另外一种双元载体系统。使用这样的载体就不必事先用 B 链 DNA 转化植物，操作起来简单便捷。

此外，由于病毒可引起破坏性的浸染，需要严格的防护，要防止载体从寄主中逃逸出来，并浸染大自然中的植物。所以把 CaMV 和 TGMV 作为克隆载体还需要作进一步的改造。

二、基因直接导入法

农杆菌浸染双子叶植物获得转基因植株是非常成功的。但自然界中的农杆菌只浸染双子叶植物，对单子叶植物不敏感。虽然通过添加乙酰丁香酮类物质可使农杆菌浸染单子叶植物，但单子叶植物的再生比较困难，因而农杆菌转化单子叶植物仍然比较困难。1984 年科学家发现，超螺旋结构的细菌质粒，虽然不能在植物细胞中复制，但可以重组整合到植物染色体内。重组机制并不清楚，因为细菌质粒与植物 DNA 之间没有同源性。事实上整合是随机地发生在植物染色体的任何位点的。受这一现象的启发产生了基因直接转化技术。

（一）基因枪转化法

基因枪（particle gun）转化法又称微弹轰击法（microprojectile bombardment, particle bombardment, biolistic），是指利用火药爆炸、高压气体和高压放电（这一加速设备称为基因枪）作为驱动力，将载有目的基因的金属颗粒加速，高速射入植物组织和细胞中，然后通过细胞和组织培养技术，再生出新的植株。

美国 Cornell 大学最早研制了火药基因枪。1990 年，美国杜邦公司推出了商品基因枪 PDS-1000 系统。此后，高压放电、压缩气体驱动等各种类型的基因枪相继出现，并在实际应用中得到不断改进和发展，使基因枪转化法成为继农杆菌介导转化法之后又一广泛应用的转化技术。根据动力系统的不同，可将基因枪分为三种类型：第一类是利用火药爆炸力作为驱动力；第二类是以高压气体作为驱动力；第三类是以高压放电作为驱动力。