

植物育种与生物工程

——现状与展望

河合武 著
伍海柏 译
朝井小太郎 校
张 旭

广东省农业科学院
科技情报研究所

一九八六·十二

译 者 的 话

生物工程是当代十大前沿学科之一，也是与农业生产最密切的领域，它的研究成果及其在生产实践中应用，将对农业现代化带来巨大的影响，所以广大农业科技工作者，对生物工程的进展十分关注。

《植物育种与生物工程》（现状与展望）原文先后发表于1985年《农业技术》（日文）第40卷4、5、7、8、9月号。文章概括了自1980至1985年期间，世界上生物工程在植物育种方面所取得的进展（包括组织培养、远缘杂交、细胞融合、基因重组等方面的最新动态），本译文可供农业科技工作者，特别是从事育种工作的同志参考。

本文还得到华南农业大学钟生泉老师的帮助，表示衷心感谢。

由于本人水平所限译文如有错误，请读者批评指正。

译 者

1986.12

植物育种与生物工程的现状与展望

(一)

生物工程在植物育种领域内具有广阔前景。在Plant Molecular Biology 杂志第二卷1号的Plant biotechnology news and views 栏内, 「Molecular biology vs plant breeding?」可以找到下面这种意思的叙述:“关于基因工程在育种中的作用, 根据可以创造出能固氮的玉米和耐旱性强的番茄。但多数意见却认为这项技术是不能达到在农业上应用的, 仅能在实验室上应用。目前, 对这个问题是受大量宣传材料的影响, 一方面, 一部分分子生物学家被DNA重组的魅力所迷惑(而且这部分人对育成新品种的难度没有充分认识); 另一方面, 有的育种学家对这项技术应用的预测带有很大的怀疑, 由之产生了两个极端的看法。”

对植物体导入异源DNA的研究, 是1960年初由Ledoux, L.及其同事开始的。从这个研究发表以来, 笔者关注这个领域研究的进展, 在欧洲停留三年半时间, 走访了这方面的研究人员, 参加有关学术讨论会议, 并收集情报和交换意见; 回国一年半中又接触了日本的研究情况, 感到上国引用的说法切中了要害。进行这方面研究的成员, 多数是由分子生物学家和组织培养的研究人员组成, 即使同一集团的研究者中, 他们对基因工程和细胞融合等新技术, 在育种上应用的前景的预测也不相同, 给我的印象是: 分子生物学家持乐观态度, 而组织培养学者则持极慎重态度。

基因工程和细胞融合登上科学舞台的现状, 使我想起五十年代后半期以原子能解放为背景, 而产生的突变育种的开

始时期。这里介绍的突变育种成果,是在这30年间全世界先后培育出大约500个新品种的事实(可能比这更多,约有一半是观赏植物新品种)。基因工程和突变相比,前者距育种实践较远,这是多数育种家的共同看法,为了把这项新技术与育种相结合,基因工程的最先端研究人员与育种学家,必须互相理解对方的立场和要求,以及互相提出问题的所在,而进行直率地交换意见,是非常必要的。这个综合记述是从育种上利用的观点出发,对这个领域研究的梗概,它具有的可能性,以及主要问题给予论述。

在任何情况下,对一项新的育种技术,一定要作恰如其份的评价,同时,新的技术必须以育种家并不感觉有多大困难的方式提出,而且要明确提示它的可利用的界限。育种家方面也不应该以太死板的眼光去接受它。

(二)

“生物工程”包括的领域和技术,因使用这个词的人和立场的不同而有很大差别,生物工程根据OECD的定义(1982冈田弥辅译,培风馆刊)是以“生产物质(粮食、饲料、医药、生物化学药品、由细菌冶炼金属)的制造,以及以服务活动(废水、废弃物处理)为目的,应用生物由来因子(指广泛意义上的生物触媒,特别是微生物、酶、动植物细胞)为了加工物质而应用科学技术的原理”,对生物工程作出贡献的科学与技术,OECD的定义举出:微生物学、生物化学、生理学、基因操作(细胞融合、生物体外DNA重组)以及工程学(无菌操作、反应器设计、生产物回收、装置和程序控制)。他还同意生物工程不包括医疗、农业(原有作物

的生产,动物的饲养)的看法。可是OECD的定义还指出供生物工程的生产原料,几乎全是来源以植物,所以对这些特别表示关注。同时生物工程通过微生物杀虫剂的生产,应用最近的基因技术在试管内诱导变异,以及通过对作物赋予固氮能力等等的品种改良,将会给农业带来强烈的影响,如果按上述的定义和解释,虽然植物体就是生物由来因子的供体,但它本身并不是生物由来的因子(或是极稀少时才是这种因子)*,而且不仅是植物细胞的“以物质生产和加工为目的的改良”及“供应这种细胞为目的植物的改良”,应包括在生物工程范畴之内。但是,过去常规的农业(要求太阳为能源的)的植物体遗传改良与生物工程的关系,被认为是间接的。本文论述了依靠生物体外DNA及培养细胞(包括培养组织)的操作的植物体遗传物质的改良(包括增胞和保存),把这种育种方法暂称为“分子·细胞育种法”。

(三)

若把育种划分为五个步骤(I—V)分别表示为分子·细胞的遗传操作①—⑫和它们在育种上可期望的作用,在各操作中又可区分为两类。A.是可以预测在育种上能够利用,但要实现还必须做大量研究工作;B.已在育种实践中应用,或进行了许多研究工作,认为最近可在育种上利用。表中①—④、⑫、⑬的操作能单独使用,但其他应该相互组合作为操作体系而在育种上应用,即⑤—⑥—⑩—⑪为细胞杂种法;⑤—⑦—⑩—⑪为染色体导入法;⑤—⑧—⑬—⑪为基因导入法(基因

*其例子是从细胞培养分化出来的极为年幼植物在试管中培养产生的是生物硷。

重组法)；⑤—⑨—⑩—⑪为细胞突法等把它们相组合，形成各种操作体系。⑤、⑩、⑪是所有操作体系通用的，然而，在愈伤组织细胞和原生质体当中，以哪一个为对象，以及上述四种方法当中，采取哪一种，其操作细节和存在问题略有不同。此外，如果以劣性基因为对象的场合较多的情况时，操作对象的细胞是单倍性，就成为重要关键。与此同时，需要在⑩操作中增加染色体加倍操作，然而用细胞杂交法时按照其适用情况，必须考虑到个别操作，但在其它操作体系中，⑩是细胞、愈伤组织中发现的性状及其选拔，⑪是从去分化细胞再分化植株(个体)的操作。这些(⑩和⑪)在所有操作体系中都有共通性，并在下面论述中的适当部分，还会个别触及到。

表中⑥、⑦、⑧的操作，使过去认为是不可能的遗传质的组合成为可能。由此而获得的杂种，应该认为还要常规育种方法的遗传操作的育种材料，所以这一点上，常规育种方法的重要性仍没有改变。育种家应该以不受原有概念的束缚，而且不是以死板的态度来等待这些育种材料，并考虑适当的育种方法。

(四)

表中I的遗传变异源的①—④操作中，③的组织培养，细胞的冷冻保存方法，可以说理论上已经确立。根据Kantha, K. K. (1982)说：已经进行了33种植物的生长点、花粉、花药、胚、细胞、愈伤组织、原生质体的冷冻保存试验，解冻后的生存率达到100%的很少，按照不同植物，必须个别地研究前处理、冷冻、解冻的温度——时间程序。结冰防止剂等。在液态氮中(-196°C)的保存，一般认为不会发生遗传变异，但研究这方

面的结果报告,目前还没有见到。无性系化(即克隆化,下同)基因与载体一起在寄主细菌里能用常法而被保存。

表中①为期待能够自由地进行基因重组,建议要预先做好基因源的收集和保存。虽然要举出具体的例子较困难,但也可以举出一些,如野生植物具有的产生杀菌、杀虫的物质,特殊化学结构的油脂,以及产生特殊生物碱的基因等。此外,属于不同生物界的生物之间基因的导入和性状表达(或暗示其可能性的)的例子,可以列举出,如玉米、小麦的核酮糖二磷酸羧化酶(Ribulose Biphosphate Carboxylase(RuBPCase))的大亚单位(Largesubunit)基因→大肠杆菌(Gatenby, A. A.等1981),大肠杆菌的卡那霉素抗性基因→矮牵牛(Fraley, R. T.等),菜豆的腰豆蛋白基因→爪蟾属(Larkins, B. A.等1979, Matthews, J. A.等1981, Slightom, J. L.等1983)。育种上感兴趣的报告可举例,如由于对酵母导入小麦 α -淀粉酶基因而培育可以得到在培养基中分泌出 α -淀粉酶的酵母系统。另外,也有些报告说,虽然把固氮基因群导入酵母,但尚未表达有固氮作用(Zamir, A.等1981)。

根据基因的DNA碱基排列鲜明和评价基因的特性(表中②),弄清基因的作用,碱基排列和它们之间的关系是必要的。大麦、玉米、小麦的贮藏蛋白质的基因(各为大麦胶蛋白、玉米谷蛋白、谷蛋白)包含有相同的碱基排列的纵列重复,特定的氨基酸(例如赖氨酸)的相对含量的增加,也推想为困难的。调查RuBPCase的大亚单位(Large subunit)基因的碱基排列与二氧化碳的固定和光呼吸之间的关系后,论述了C₃植物的光呼吸由基因保作受抑制的可能性(D,

von Wettstein, 等1983)。另外, 弄清了小苋 (*Amaranthus hybridus*) 对S—三嗪 (s-triazine) (干涉光合成系) 而起杀草作用的抗性, 是由于这个合成系的多肽中一个氨基酸的变化所导致的。(Hirschberg, J. & McIntosh, L. 1983)。在这种研究当中, 突变起了很大作用。此外, 基因的碱基排列的资料库化, 对这个领域的研究是不可缺少的。

目前, 尚未见到关于植物基因的人工合成 (表中④) 的报告, 可以认为在目前的情况下基因的人工合成, 是利用现存基因的部分的改造上。同时弄清它们的碱基排列和基因支配生物体内的生化反应, 以及它们之间的关系, 才能作成合成基因的设计和合成程序, 因此, 必须积累大量资料。再者, 由于现存的基因, 复制开始点, 末端小粒 (telomere) 和动原体的组合已经作出了“人工染色体” (Murray, A. W. & Szostak, J. W. 1983)。

(五)

表中⑤的操作, 愈伤组织、细胞 (包括少数细胞的集块) 和原生质体 (以下统称为培养细胞) 的产生和培养, 在三者之间有 (植物体) 愈伤组织、细胞、原生质体 (←植物体) 的关系。像已经说过的那样, 在分子、细胞育种中, 培养细胞是单倍性 (培养中心也保持单倍性) 是重要关键。还要指出的是, 培养细胞应该在去分化状态, 这点也是非常重要。去分化、分化的分子结构还不十分清楚, 它的严格定义让今后去确定。这里的去分化细胞的定义: 并不表示分化了的组织、器官的细胞的形态上和机能上的特异性, 但在整个生命 (生活) 周期当中应该表达的机能是已经发挥的

细胞。对培养细胞在表⑥—⑨的操作是可能的或者容易的，只要以植物体的遗传改良为目标，接着连贯这些操作还必须进行，⑩植物体再分化操作，前面已作了叙述。

⑤的操作当中，愈伤组织的诱导和培养，以及通过愈伤组织的振动培养游离细胞(块)等许多植物已获得成功。而研究的重点是愈伤组织、游离细胞块、通过植物组织细胞壁的分解酶处理，而产生生物活性高的原生质体的获得和培养。依据 Keller, W. A. 等(1982), Binding, H. 等(1982), Davey, M. R. (1983) 及 Dale, P. J. (1983) 的综述，这里列举原生质体→植物体及原生物→愈伤组织形成的成功例子。原生质体→植物体有89种植物成功的报告，茄科34种，豆科9种，十字花科6种，禾本科有无芒雀麦、羊草、美国狼尾草、紫色狼尾草(象草)4种(都是最近的报告)。原生质体→愈伤组织形成的例子，加上上述的(89种)还有29种，其中包括禾本科7种，若把最终试验结果不成功而未发表的考虑进去，上述结果并不能认为是直接反映产生健全的原生质体→集落体愈伤组织形成→植物体的再分化的难易。包括称为典型植物的烟草的茄科以外的植物，特别是单子叶植物，尤其在禾本科培养细胞的植物体再分化，是分子·细胞育种上要求解决的基本重要课题。

(六)

表中⑥的原生质体融合，在杂交不亲和的植物之间，使核染色体组(核基因组)、细胞质染色体组(基因组)的组合成为可能的。尤其是细胞质在遗传方面几乎完全是封闭系，即使在可能杂交的组合，也可推测细胞质杂种具有很大的意义。为了得到细胞杂种的原生质体的分离、培养、融合的方法

法，以及与这些有关的主要因素和杂种细胞的判别，选拔方法，由Keller, W. A. 等(1982)进行了简明扼要的述说。报告指出用聚乙烯乙二醇(PEG)等促融剂(Fusogen)的原生质体融合本身没有组合特异性，植物、动物、微生物之间也有融合的事例。根据Senda, M. 等(1979), Zimmermann 等(Zimmermann, U. & V. ienken, J. 1984)研究的电聚合法，由于没有用促融剂可以在显微镜下观察融合和能够选拔融合细胞等有优点，可望积累实验例子(用这种方法产生体细胞杂种个体还没有报告)。采用促融剂时，原生质体的融合率非常高的报告也有，但一般为1—5%，杂种细胞与非杂种细胞(两亲细胞及各亲细胞间的融合细胞)的判别、选拔是非常重要的操作，因而研究了各种各样的办法。由于这样，作为标志基因，要求不影响其他性状(植物体的)表现的，不受遗传背景控制的，而在杂种细胞能稳定地表现性状的互补基因，或者有关不同性状的复数基因。这些基因在突变体中寻求的很多，用硝酸还原酶，生长物质非要求性，抗物质耐性，氨基酸类似物质耐性的等等基因。Potr-ykus, I. 等(1982)报告指出缺乏硝酸还原酶的突变，即使在无刺天仙子(茄科)+烟草的属间(细胞融合)组合中亦显示出互补性，Kleinhofs, A. 等(1982)，对大麦缺乏硝酸还原酶的13个突变基因的作用，进行了生物化学方面的研究，推定了结构基因的变异，研究了作为转化标志的应用。虽然细胞融合标志的产生及杂种细胞选择方法的研究不少，为将来准备满足上述条件的若干标志，利用基因重组方法把适当的标志基因导入到希望融合的两个亲本为宜。

融合细胞的分裂，像水稻和大豆(Niizeki, M. & Kita, F. 1981) 等那样，双亲血缘很远的情况下也开始了，但其后

的分裂和分裂过程中的染色体的行为，由于双亲亲缘的远近关系受到很大的影响。Shepard, J.F.等(1983)曾获得过双亲近缘的情况下，完全保存了双亲染色体的整正杂种(symmetric hybrid)或者失去其一部分的非整正杂种(assymmetrical hybrid)。并且指出，从远缘植物间的杂种细胞，可产生去掉一方亲本的全部染色体的个体，(有时也包括表示这个亲本的一部分性状的个体)，更远缘的植物间的杂种细胞，对细胞分裂的染色体行为难于预测。在体细胞杂种中为了减少单方亲本染色体的作用，在细胞融合之前，对一个亲本的细胞进行辐射处理而有成功的报道，(Aviv, D.等1980 Itoh, K. & Futsuhara, Y. 1983及其他)。为了促进杂种细胞的染色体的减少，试行了异丙炔醛(Isopropynal—N)、3—氯代苯酚(3—chlorophenyl)、二乙二甲基脲(carbamate)处理(Roth, E.J.等1982)，但也研究利用异氟苯丙氨酸(Para-fluorophenyl-alanine)(福井、新关1983及其他)。

根据Harms, C. T.(1983)通过细胞融合获得了10个属间、31个种间、15个种内的体细胞杂种，这些是以茄科为主，并仅限于十字花科及繖形科的部分属、种。对这些体细胞杂种个体的形态性状，生物化学特性(蛋白质、生物碱、同功酶等)及细胞质特性等进行调查，就形态、性状而言，属两亲的中间类型的报道较多。对杂种个体的结实性，过去不能杂交的(杂交不亲和的)种间杂种也能结实，在属间杂种内无刺天仙子+烟草的杂种是结实的(据Potrykus, I. S.等1983, Harms, C. T. 1983的综述)。还有，番茄+马铃薯的体细胞杂种，对双亲是非感染性的病源杂种细胞都是感染性的报道(Shepard, J.F.等1983)引人瞩目。对结实的

体细胞杂种后代的研究还不够充分。

细胞融合期望能产生新的双二倍体,如上所述,融合本身是容易的,但还存在杂种细胞的判别和选拔,杂种细胞分裂中的染色体行为,体细胞杂种的不育,从去分化细胞的植物体再分化,目前只局限于一部分的植物等等问题,所以把细胞杂种法,作为导入基因(群)的一种方法的认识正在不断加强。如果采取这种看法,通过远缘植物染色体间联合的基因重组的可能性等就成为问题了。

细胞融合可能产生细胞质条件(cybrid),这时,为了排除核染色体组(基因组)的影响,通过亲本细胞的一方的原生质体离心处理达到除核(产生胞质体cytoplast)(Maliga, P.等1982,山口等1983)或为了核染色体组(基因组)的不可逆的失活,试行细胞松弛素B(Cytochalasin B)处理(Willin, A等1979)或辐射处理,有获得细胞质杂种的报道。当辐射处理时须考虑是否可以完全除去核DNA,以及对细胞质DNA的射线作用。

细胞质细胞器中,对其发展研究的是叶绿体和线粒体,它们分别具有各自的DNA。但在叶绿体形成中,是与核染色体组(基因组)和叶绿体染色体组(基因组)双方有关。每个细胞内叶绿体及线粒体的平均数目,分别是几个~数十个至数百个。对于在细胞分裂中,这些大量细胞器如何行动等,目前尚缺少有关细胞质遗传的基本知识,但依据杂种细胞、细胞质杂种的产生,可期望叶绿体、线粒体的遗传研究将带来很大进步,可以说细胞质遗传研究迎来了新的时代(Evans, D.A.1984)。

Fluhr, R.(1983)总结了烟草属为主,番茄、番茄、

矮牵牛属的一部分种、属间、体细胞杂种个体的叶绿体基因构成研究的结果，关于体细胞杂种个体和双亲任何一方相同的个体远比双亲混合型(杂交型)多，就前者而言，有分离比为1:1时的例子和表示靠近任何一方亲本的情况。即从细胞融合到植物体再分化之间，发生叶绿体的选别、分裂块(sorting out)。然而，这种研究大部分供试个体数量很小，还必须考虑由于杂种细胞的判别。选拔方法所导致的偏差，以及核和细胞质参予相互作用的干预，因此，为了下结论还要进一步的研究。A. kada, S. & A. Hirai(1983), Hirai, A. (1984) 曾获得叶绿体的选别发生在从愈伤组织发生再分化植物体之时的研究结果(就是说，具有杂种型细胞质的细胞，不发生植物体再分化)。据 Fluhr, R. (1983) 报告，叶绿体是混合型的体细胞杂种个体的有性繁殖后代，能够维持杂种性状。由于细胞质杂种的研究很少，与体细胞杂种的研究相结合，对叶绿体、线粒体在细胞分裂过程中的行为，遗传的分析，遗传变异的检出等在科学研究上很感兴趣。而且在育种上重要的异种细胞质染色体组(基因组)之间的基因重组等方面提供知识。微细胞(micro-cell)、小细胞质体(mini-cytoplasm), 微原生质体(micro-protoplast)的产生和利用，核的分离和注入等提出新的研究手段(Lorz, H.等1976、1981, Wallin, A.等1978、1979, Willmitzer, L & K. G. Wanger, 1981, Steinbiss, H. H & P. Stabel, 1983, Deepesh, N. de & D. Swain, 1983, Lorz, H. 1983)

(七)

染色体的导入 (表⑦) 是由 Hanson, R. (1973) ,

Malberg, R.L. & R. J. Griesbach (1980), Griesbach, R. J. 等 (1981, 1982), Szabados, L. 等 (1983) Dudits, D. (1983) 所研究的。这种方法就是从原生质体将把细胞质及核膜在含有对核酸酶和脲酶有保护物质的溶液中破碎, 通过离心分离, 收集、精选染色体, 制成染色体悬浮液; 与受体的原生质体悬浮液混合, 添加PEG, 使染色体进入受体原生质体。用这种方法的染色体的回收率相当高; 如果染色体分离之前, 进行使原生质体同步分裂的处理的话, 能达到80% (Szabados, L.等1983)。Griesbach, R. J.等 (1982), 通过这种方法, 观察了百合的游离染色体对烟草原生质体的导入; Szabados, L等(1983)燕麦与小麦之间的染色体导入(包括相互正反方面的导入)进行了观察。今后的最大问题是被导入的染色体到受体核染色体组成的插入和从具有异质染色体的植物体的再分化(包括受体染色体组和导入染色体之间的亲和性在内)。此外, 由利用流动式血细胞计数器(Flow Cytometer)按其大小鉴别染色体的方法, 某种程度上分别各个染色体而把它导入的操作也是可能的。

Pandey, K. K. (1983)根据1975年以来的以烟草作为材料的研究结果, 由于辐射过高剂量的花粉的授粉, 可以获得花粉亲本基因当中只有自交不亲和基因的母本类型的2倍体的结论, 并把这种现象进行过相当多的反复试验。但是, 有人支持卵转化, 但也有人不支持。不管结论如何, 这种方法只在通过一次授粉能够得到大量种子的植物才有实用的可能。

(八)

在表⑧用的DNA重组操作的基因重组法, 就是把某生

物（供体）的特定基因（目的基因）的DNA割切出来，与载体的DNA结合，把它重新导入到其他生物（受体）的DNA，在受体中表达性状的。这种操作能够分开为制成无性系和把已经无性系化（即克隆化）的基因插入到基因受体的DNA中这两个阶段。

植物基因的无性系化，过去是用由大肠杆菌和它的质粒形成的寄主——载体系而进行的。质粒是在细胞内和寄主的染色体，独立地、自行地增殖，并经过整个细胞世代稳定地被传递的遗传要素。作为载体应用的是环状双链DNA质粒。被用于无性系化操作的载体（无性系化载体），以不整合到寄主染色体为一个条件。基因无性系化的操作如下：质粒的DNA的抽提和通过限制内切酶的切断、开环供体DNA的抽提和与前者相同的限制内切酶把它切断→开环质体DNA和切断的供体混合，通过连接酶（合成酶）将切断端的融合（已经插入了DNA断片的闭环质粒的形成）→把带有重组DNA的质粒导入大肠杆菌（性状转化）→带有已插入了目的基因DNA的质粒的大肠杆菌的判别、分离和繁殖。限制内切酶识别DNA的特定碱基排列，并在那个部位上导致DNA链的切断的酶，目前约有300种。由相同的限制内切酶产生的DNA切断端部的碱基排列是互补的，因而，具备了由连接酶相结合的条件。如果把相同的DNA以相同的限制内切酶，在相同条件下处理，切断的地方和个数是一定的。由若干种不同限制内切酶切断的式样作比较，可以画出限制内切酶图形，而且可以把已知的基因定位在它的位置上。无性系化载体是为了满足如下条件可以“育种”，具有外来基因的插入部位，由限制内切酶在其部位上产生切断（希望切断一处），

即使插入外源基因,也不降低载体质粒的复制和繁殖能力;载体要保持自身的标志(在寄主中表达);希望具有外来基因到插入部位整合的时候,具有失活的(或发生表现型的变化)一种标志基因;虽然由于被插入的DNA的大小不同而不同,但希望尽可能小的。用这样被“育种”的载体,把供体的DNA节段导入到受体,就必须判别被导入的DNA是否为目的基因。

基因是由密码区段和控制密码区段上所记录的遗传信息到信使DNA的转录的调节区段所构成,在密码区段里有携带遗传情报的外显子和不带遗传情报的内含子,对mRNA进行遗传情报的转录,仅仅是外显子部分进行。为无性系化利用通过mRNA的反转录酶的作用,在试管内所形成的互补DNA(complementary 即cDNA),被应用在cDNA,完全不包含调节区段的信号,或仅包括极少部分。cDNA是单链,因此,插入载体之前,使其成为双链,或者为了插入进行中必要的加工。mRNA是在基因活性高的状态下大量形成。例如贮藏蛋白的基因,在种子发育的前期,mRNA大量形成。这时能够在特定的生育阶段从特定器官,能抽出大量包含目的基因的mRNA。酶mRNA,通过精制它,能够分离得到目的基因的cDNA。这时,利用mRNA在试管显合成蛋白质酶等,如果由目的基因所形成的蛋白质已经能够被抽提并纯化的话,通过与它的相比鉴定,更能准确弄清所获得的mRNA,cDNA,是否目的基因。

从供体通过载体向大肠杆菌输送的DNA,是否目的基因的DNA的最准确判断是根据目的基因在大肠杆菌里表达的表现型而做到的,但为了表现导入过的基因,必须把目的基因的密码区段,与能调节到其密码的转录的调节区段相组合。植

物的叶绿体的调节区段和大肠杆菌的调节区段的结构很相似,如果大肠杆菌的调节区段仍在载体内保存的话,那么当把叶绿体基因密码区段插入到载体时,就能够表现这种基因。这种可能性不存在时,把目的基因的调节区段与密码区段结合,插入到载体就成为必要的了。此外,即使 mRNA 正常形成,继之应该进行的翻译、合成蛋白质等过程能够依靠大肠杆菌所保持的机制进行,也成为表现导入过的基因的条件。目的基因在大肠杆菌没有发现的情况下,对插入载体的 DNA 和已经得到的目的基因的 cDNA 之间的相同性的测定(分子杂种法),或者把用限制内切酶的切断式样的比较等方法,就能够判断或推测目的基因是否已经导入。在任何方法也不适用时,用根据载体具有的标志,已经证实转化的全部细胞,使它们形成集落并对它们进行分析,确定目的基因是否导入,成为必要的了(散弹射击法方式)。这样看来,植物基因的无性系化,具备必要而充分的标志的载体的“育种”,调整区段的无性系化,目的基因的 cDNA 的调制是非常重要的。因而,必须积累研究结果和材料。关于农业上重要而由多数基因所支配的性状,在进行无性系化之前必须分离从各个基因所形成的酶(探明性状表现的过程和其机制及阐明各个过程中起作用的酶)。

现举出到目前为止已经被无性系化的(包括部分的无性系化)植物基因, rRNA、tRNA、核酮糖二磷酸羧化酶的大亚基和小亚基(RuBPCase LS & SS)(相当多数的植物中)与叶绿体(chlorophyll) a/b 相结合的多肽(binding Polypeptide)(矮牵牛),腺苷三磷酸合成酶亚基作用 ATP (synthetase subunit)(小麦、菠菜), β -