



生命科学实验指南系列

Transgenic Wheat, Barley and Oats  
Production and Characterization Protocols

# 麦类作物转基因技术与 田间鉴定实验指南

〔英〕H.D.琼斯 P.R.休里 主编  
王建军 等 译  
孙宗修 校



科学出版社

生命科学实验指南系列

# 麦类作物转基因技术 与田间鉴定实验指南

**Transgenic Wheat, Barley and Oats**  
Production and Characterization Protocols

[英] H. D. 琼斯 P. R. 休里 主编

王建军 等 译

孙宗修 校

科学出版社

北 京

图字：01-2013-6031 号

## 内 容 简 介

转基因技术目前已成为植物遗传改良的重要手段，并在棉花、大豆、油菜、玉米等作物上成功应用，转基因作物已在部分国家大面积推广应用。本书共分为五篇 20 章，第一篇概述了麦类作物转基因研究的现状。第二篇以小麦、大麦和燕麦为例，介绍了基因枪法和农杆菌介导法的遗传转化与再生技术。第三篇涉及基因的表达与基因沉默技术。第四篇详述了转基因植株的鉴定技术，如荧光原位杂交技术、转录组学、蛋白质组学、代谢组学和环境风险评估等。第五篇展望了麦类作物转基因研究的未来前景。

本书深入浅出、图文并茂，对生物学、农学、环境科学和食品科学等领域的高等院校或科研单位的学生和研究人员是很好的参考书和实验操作指南，也有助于植物生物技术产业或环境部门公务员制定相关政策。

Translation from the English language edition:

*Transgenic Wheat, Barley and Oats* edited by Huw D. Jones; Peter R. Shewry

Copyright© 2009 Humana Press, Inc.

Humana Press Inc. is part of Springer Science+Business Media. LLC

All Rights Reserved

### 图书在版编目 (CIP) 数据

麦类作物转基因技术与田间鉴定实验指南/(英)琼斯(Jones, H. D.)等主编;王建军等译. —北京:科学出版社, 2013. 11

(生命科学实验指南系列)

书名原文: *Transgenic Wheat, Barley and Oats Production and Characterization Protocols*

ISBN 978-7-03-039056-1

I. ①麦… II. ①琼…②王… III. ①麦类作物-转基因技术-鉴定-指南 IV. ①S512.03-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 260745 号

责任编辑:夏 梁 刘 晶 / 责任校对:郭瑞芝

责任印制:赵德静 / 封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2013 年 11 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013 年 11 月第一次印刷 印张:18 3/4 插页:4

字数:424 000

定价:128.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

## 序

1983年，世界上第一例转基因植物——一种含有抗生素药类抗体的烟草在美国成功培植。当时有人惊叹：“人类开始有了一双创造新生物的‘上帝之手’！”几十年后，转基因技术得到了迅猛发展，继水稻之后，主要农作物如小麦、玉米、大豆等全基因组测序都已完成或正在进行中，这为小麦等主要农作物的转基因研究提供了极大的方便。转基因研究正在农业领域越来越广泛地开发与应用，转基因技术也将成为全世界农业科技发展的必经之路。

转基因技术是将人工分离和修饰过的基因导入到生物体基因组中，由于导入基因的表达，引起生物体性状的遗传修饰。在原理上，转基因技术是传统育种方法的延伸，因此在健康、环保等问题方面，并不比传统作物有更高的风险。世界卫生组织等权威机构都曾表示转基因食品是安全的，可以放心食用。应该坚信中国的未来离不开转基因技术，但对于转基因的研究和应用，仍然必须强调积极、慎重，要科学地借鉴与学习国外成熟的研究技术和先进的管理经验。

英国洛桑研究所（Rothamsted Research）是一所世界著名的农业科研中心，其前身为由 John Bennet Lawes 于 1843 年建立的洛桑实验站，至今已有 170 年的历史，是世界上最古老的农业研究站之一。该研究所拥有多名英国皇家学会成员，是全英国最大的农业研究中心之一。该研究所拥有全英国小麦育种与小麦转基因研究的领军团队，其抗病虫害转基因小麦获得了政府部门的田间试验许可。由洛桑研究所资深科学家 Huw D. Jones 和 Peter R. Shewry 两位学者主编的《麦类作物转基因技术与田间鉴定实验指南》是作物转基因技术研究的优秀专著。全书由 44 位在相应的研究领域有一定学术成就的专家、学者组成的 20 个小组编写完成，对转基因研究的主要环节与技术都有详尽的叙述。该专著结构严谨、层次清晰、文笔流畅、通俗易懂，适于从事转基因研究的各方面人员阅读与参考。

浙江省农业科学院省部共建国家重点实验室培育基地“浙江省植物有害生物防控重点实验室”的王建军等 25 位科技人员，历经一年多的辛勤劳动，完成了该书的翻译工作。他们始终贯以严谨、求实、敬业的精神，几经修改与校对，今天，中译本终于可以奉献给读者了，在此，对他们取得的成绩表示祝贺。

21 世纪是科学知识飞速发展的时代，转基因研究也不例外，一些研究前沿和新技术开发更是日新月异。2009 年出版的该书，在某些热点技术上，可能会有更新或改进。他山之石，可以攻玉，期望这本译著能为读者提供某些启发与借鉴，为我国转基因研究提供规范的操作指导。



中国工程院院士  
发展中国家科学院院士  
浙江省农业科学院院长

2013 年 6 月

## 译者序

本书由英国洛桑研究所的 Huw D. Jones 和 Peter R. Shewry 两位学者，组织国际上一批研究精英所著。经过 20 多位编译人员历时一年多的努力，中译本终于可以与读者见面了。

为什么我们要组织人员对本书进行翻译呢？这还得从我国转基因研究说起。农业部农业转基因生物安全委员会于 1997 年开始批准番茄、甜椒、黄瓜、棉花及矮牵牛等植物的中间试验、环境释放和转基因商品化生产。据 Clive James 报道，2012 年中国种植转基因作物面积超过 500 万公顷（应全部是棉花——译者注），列全球第四位（<http://www.isaaa.org/purchasepublications/itemdescription.asp?ItemType=BRIEFS&Control=IB044-2012>）。作物的转基因研究涉及转基因实验室试验、生物试验、生产评价试验以及转基因产品无害化处理等内容，技术环节严谨，监管要求严格。与国内相比，在转基因研究技术与管理经验方面，欧美国家有着独特的领先优势，而国内可参考的技术与管理书籍不多。2009 年，在撰写转基因项目申请书时，我们急需一本可参考的权威性著作，而本书既详尽地介绍了植物转基因实验的原理与操作技术，又涉及了转基因植株的功能鉴定、田间试验管理、安全性评价等领域，是一本全面而详尽、实用而严谨，有很强技术指导意义的植物转基因研究的最新参考书。在孙宗修老师的提议下，我们设想组织翻译中文版。经与原著作者联系及向 Humana 出版社申请，2011 年获得了翻译中文版的许可。

本书共分为 5 篇、20 章，内容从转基因植株和报告基因的选择、基因枪转化、农杆菌介导转化、转基因表达鉴定、插入位点和整合片段的检测、转录组学和蛋白质组学鉴定，到田间试验的设计与管理及转基因风险评估，涵盖了转基因研究的各个环节与各个层面的内容，既有原理的阐述，又有实际操作例子，是一本作物转基因研究的实验指导书。本书适合于高年级本科生和研究生使用，对于从事植物分子遗传学或分子育种学研究人员也是十分有用的参考书。

参加本书翻译的人员中，多数是有相关工作经历的研究骨干或有国外留学经历的研究人员。各章节译者分别是：张恒木、王建军（第 1 章）；祁永斌（第 2 章）；赵建华、瞿绍洪（第 3 章）；徐恒、朱英（第 4 章）；张礼霞、范宏环（第 5 章）；李付振（第 6 章）；徐磊、易可可（第 7 章）；周洁、严成其（第 8 章）；周洁、严成其（第 9 章）；徐磊、易可可（第 10 章）；张礼霞（第 11 章）；陈蕾（第 12 章）；张华、朱英（第 13 章）；董波、周波（第 14 章）；鲍坚东、周波（第 15 章）；楚璞、邓志平（第 16 章）；楚璞、邓志平（第 17 章）；王建军（第 18 章）；徐俊锋（第 19 章）；王美兴、王建军（第 20 章）。

在翻译的过程中，有幸邀请到原书第 5 章的第一作者吴晖霞作为中译本部分章节的校阅人，她的工作认真仔细，解决了许多技术层面的难题。孙宗修老师参与了翻译的全

程工作，对全书的翻译与校阅付出了大量的心血。郑怡女士对部分章节的译文进行了润色，对翻译的技巧提出了十分有益的建议，对于这些帮助我们万分感谢。对于原书的一些技术和书写上的欠妥之处，我们在尽可能忠于原著的基础上予以了改正。虽然我们尽心尽力并多次修改与校阅，但译本中错误与疏漏难免存在，对此我们恳请读者朋友谅解并不吝指正。

本书的翻译得到了浙江省农业科学院“浙江省植物有害生物防控重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地”和浙江省高校“重中之重学科”——“现代农业生物技术与作物病害防控”的大力支持。感谢所有参与翻译和校阅，以及为我们的工作提供方便和帮助的老师与同学；感谢科学出版社的夏梁先生，作为本书的责任编辑，在合作过程中得到了他的大力帮助与支持。

另外值得一提的是，在全书的翻译、校阅和通读过程中，我们也从中学习并领悟了许多知识与写作技巧，希望读者朋友在阅读本书时，获得同样的享受！

王建军

2013年春于杭州

## 前 言

了解禾谷类作物基因组的物理结构和遗传结构,探索基因的编码区和非编码区是如何与环境互动而决定某一性状,上述知识对未来的植物育种与农业生产具有重要的作用。转基因植物的获得与鉴定是一种非常有用的反向遗传学研究方法。在禾谷类作物中,越来越多地运用这一技术,将性状或功能精确地定位到 DNA 序列中。然而,迄今为止,对小麦、大麦和燕麦等麦类作物而言,科学家一直缺乏开展这项研究所需的技术和资料,有的甚至是完全空白。本书汇集了适宜于麦类作物的基因枪法和农杆菌介导法、转基因植株再生和筛选等步骤的最新实验操作技术,包括体外农杆菌共培养,以及一种新的不需组培再生的活体转化(germ line transformation)技术。此外,还有几章着重讲述了基因表达的实验操作、重组位点和转基因植株的鉴定。最后,本书还涉及了转基因风险评估、田间试验设计,以及转录组学、蛋白质组学、代谢组学的实质等同性等知识。虽然本书主要是针对小麦、大麦和燕麦等温带小粒作物,但是所介绍的许多技术稍加改进后也可以用于其他禾谷类作物或植物的研究。

感谢所有章节的作者为本书提供新颖而翔实的资料,感谢 Humana 出版社的全体成员,尤其是 John Walker 的指导工作, Helen Jenkins 的校对、文字处理和组织工作。

## 作者名单

SUJATA AGARWAL · 田纳西大学 植物科学系, *Knoxville, TN, USA*

SILVIA C. ALVES · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *JohColney, Norwich, UK*

JOHN M. BAKER · 洛桑研究所 植物与微生物代谢组学国家中心, *Harpenden, Hertfordshire, UK*

TINA BARSBY · 英国国家农业植物研究所, *Cambridge, UK*

JOANNE G. BARTLETT · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *Colney, Norwich, UK*

MARÍA MARCELA BAUDO · 洛桑研究所 植物科学系 作物遗传改良中心, *Harpenden, Hertfordshire, UK*

MICHAEL H. BEALE · 洛桑研究所 植物与微生物代谢组学国家中心, *Harpenden, Hertfordshire, UK*

ZOLTÁN BEDÖ · 匈牙利科学院 农业研究所, *Hungary*

SARAH BOWDEN · 英国国家农业植物研究所, *Cambridge, UK*

MELANIE CRAZE · 英国国家农业植物研究所, *Cambridge, UK*

ANGELA DOHERTY · 洛桑研究所 植物科学系 作物遗传改良中心, *Harpenden, Hertfordshire, UK*

JIM M. DUNWELL · 雷丁大学 生物科学学院, *Reading, Berkshire, UK*

WENDY A. HARWOOD · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *Colney, Norwich, UK*

ALISON HUTTLY · 洛桑研究所 植物科学系 作物遗传改良中心, *Harpenden, Hertfordshire, UK*

HUW D. JONES · 洛桑研究所 植物科学系 作物遗传改良中心, *Harpenden, Hertfordshire, UK*

BEAT KELLER · 苏黎世大学 植物生物学研究所, *Zürich, Switzerland*

LÁSZLÓ LÁNG · 匈牙利科学院 农业研究所, *Hungary*

PAUL A. LAZZERI · Agrasys S. L. 公司, *Barcelona, Spain*

NICOLA LEYLAND · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *Colney, Norwich, UK*

STAR LOAR · 田纳西大学 植物科学系, *Knoxville, TN, USA*

ALISON LOVEGROVE · 洛桑研究所 植物科学系 作物遗传改良中心, *Harpenden, Hertfordshire, UK*

SHAHINA B. MAQBOOL · 雪城大学 生物学系, *Syracuse, NY, USA*

ROWAN A. C. MITCHELL · 洛桑研究所 植物科学系 作物遗传改良中心, *Harpenden, Hertfordshire, UK*

HESHAM F. ORABY · 密歇根州立大学 园艺学系, *East Lansing, MI, USA*

WYATT PAUL · Biogemma 公司, *Clermont-Ferrand Cedex 2, France*

MATTHEW PERRY · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *Colney, Norwich, UK*

STEPHEN J. POWERS · 洛桑研究所 生物数学与生物信息学系 生物数学与计算生物学中心, *Harpenden, Hertfordshire, UK*

MARIANN RAKSZEGI · 匈牙利科学院 农业研究所, *Hungary*

THIERRY RISACHER · Biogemma 公司 *Clermont-Ferrand Cedex 2, France*

LOUISE SALT · 食品研究所 构建健康食品研究小组, *Colney, Norwich, UK*

TRUDE SCHWARZACHER · 莱斯特大学 生物学系, *Leicester, UK*

PETER R. SHEWRY · 洛桑研究所 植物科学系 作物遗传改良中心, *Harpenden, Hertfordshire, UK*

MARK A. SMEDLEY · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *Colney, Norwich, UK*

JOHN W. SNAPE · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *Colney, Norwich, UK*

CAROLINE A. SPARKS · 洛桑研究所 植物科学系 作物遗传改良中心, *Harpenden, Hertfordshire, UK*

PENELOPE A. C. SPARROW · 约翰英纳斯研究中心, *Colney, Norwich, UK*

CAMILLE STEBER · USDA/ARS 小麦遗传、品质、生理与植病研究组, *Pullman, WA, USA*

MARIAM B. STICKLEN · 密歇根州立大学 作物与土壤科学系, *East Lansing, MI, USA*

VERA THOLE · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *Colney, Norwich, UK*

SILVIA TRAVELLA · 苏黎世大学 植物生物学研究所, *Zürich, Switzerland*

PHILIPPE VAIN · 约翰英纳斯研究中心 作物遗传学系, *Colney, Norwich, UK*

JANE L. WARD · 洛桑研究所 植物与微生物代谢组学国家中心, *Harpenden, Hertfordshire, UK*

HUIXIA WU · CIMMYT 遗传资源与改进研究组, *Mexico DF, Mexico*

JANICE ZALE · 田纳西大学 植物科学系, *Knoxville, TN, USA*

HENG ZHONG · SABRI, 三角研究园, *NC, USA*

# 目 录

序  
译者序  
前言

## 第一篇 引 言

|                              |   |
|------------------------------|---|
| 第 1 章 麦类作物转基因操作与鉴定 .....     | 3 |
| Paul A. Lazzeri Huw D. Jones |   |

## 第二篇 转化与再生

|                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 第 2 章 转基因植株的选择 .....                                                                                           | 21  |
| Huw D. Jones Caroline A. Sparks                                                                                |     |
| 第 3 章 报告基因 .....                                                                                               | 35  |
| Alison Huttly                                                                                                  |     |
| 第 4 章 基因枪法转化小麦 .....                                                                                           | 59  |
| Caroline A. Sparks Huw D. Jones                                                                                |     |
| 第 5 章 农杆菌介导的小麦新鲜离体幼胚的转化 .....                                                                                  | 77  |
| Huixia Wu Angela Doherty Huw D. Jones                                                                          |     |
| 第 6 章 小麦花器官转化 .....                                                                                            | 85  |
| Sujata Agarwal Star Loar Camille Steber Janice Zale                                                            |     |
| 第 7 章 植物原位接种介导的小麦高效农杆菌转化方法 .....                                                                               | 93  |
| Thierry Risacher Melanie Craze Sarah Bowden Wyatt Paul Tina Barsby                                             |     |
| 第 8 章 基因枪法转化大麦 .....                                                                                           | 101 |
| Wendy A. Harwood Mark A. Smedley                                                                               |     |
| 第 9 章 农杆菌介导的大麦转化方法 .....                                                                                       | 110 |
| Wendy A. Harwood Joanne G. Bartlett Silvia C. Alves Matthew Perry<br>Mark A. Smedley Nicola Leyl John W. Snape |     |
| 第 10 章 燕麦转基因及其在提高渗透胁迫耐受中的应用 .....                                                                              | 119 |
| Shahina B. Maqbool Heng Zhong Hesham F. Oraby<br>Mariam B. Sticklen                                            |     |

### 第三篇 基因与蛋白质的表达

|        |                                 |     |
|--------|---------------------------------|-----|
| 第 11 章 | 决定转基因表达的启动子序列 .....             | 139 |
|        | Huw D. Jones Caroline A. Sparks |     |
| 第 12 章 | RNA 介导的基因沉默 .....               | 153 |
|        | Silvia Travella Beat Keller     |     |

### 第四篇 转基因植株的鉴定

|        |                                                                               |     |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 第 13 章 | 基因插入位点和模式 .....                                                               | 169 |
|        | Philippe Vain Vera Thole                                                      |     |
| 第 14 章 | 荧光原位杂交技术检测植物基因组中整合的转基因片段 .....                                                | 188 |
|        | Trude Schwarzacher                                                            |     |
| 第 15 章 | 实质等同性: 转录组学 .....                                                             | 204 |
|        | María Marcela Baudo Stephen J. Powers Rowan A. C. Mitchell<br>Peter R. Shewry |     |
| 第 16 章 | 实质等同性: 蛋白质组学 .....                                                            | 223 |
|        | Alison Lovegrove Louise Salt Peter R. Shewry                                  |     |
| 第 17 章 | 实质等同性: 代谢组学 .....                                                             | 237 |
|        | Michael H. Beale Jane L. Ward John M. Baker                                   |     |
| 第 18 章 | 转基因作物田间试验的设计与管理 .....                                                         | 248 |
|        | Zoltán Bedő Mariann Rakszegi László Láng                                      |     |
| 第 19 章 | 遗传修饰 (转基因) 风险评估 .....                                                         | 256 |
|        | Penny A. C. Sparrow                                                           |     |

### 第五篇 总 结

|        |                     |     |
|--------|---------------------|-----|
| 第 20 章 | 转基因麦类作物: 未来前景 ..... | 271 |
|        | Jim M. Dunwell      |     |

|          |     |
|----------|-----|
| 索引 ..... | 283 |
| 图版       |     |

# 第一篇 引 言



# 第 1 章 麦类作物转基因操作与鉴定

Paul A. Lazzeri    Huw D. Jones

**摘 要：**自 20 世纪 80 年代初期首次利用模式植物研究植物基因转化技术以来，许多植物科学家致力于改进这项技术，以使其能适用于作物遗传转化研究。对某些农作物，这项技术得到较快的发展；但对另一些作物，如小粒作物，由于其自身并不适合体外组织培养，也不是农杆菌的天然寄主等原因，科学家们花费了近二十年的时间，才研发出可靠、稳定的遗传转化技术。

在本书后续的章节，将为读者展示小粒作物遗传转化的操作步骤，以及转基因植物鉴定、基因和蛋白质表达的研究方法。本章为全书的引言部分，为后续章节的叙述作铺垫，并全面回顾了小粒作物遗传转化技术的发展历程，探讨了转基因技术的利与弊，同时指出了当前该技术发展仍面临的技术瓶颈。

**关键词：**小粒作物，遗传转化，基因枪，农杆菌，组织培养，再生，筛选，启动子，报告基因

## 1. 基因枪转化技术的发展及其在小粒作物中的应用

20 世纪 80 年代后期，基因枪转化技术首次被应用于植物研究，该方法先将 DNA 包被在微粒的表面，随后将这些微粒射入活体组织细胞内 [1]。1989 年，首次报道采用基因枪法获得了可育的转基因玉米 [2]（图 1.1）。正如 20 世纪 80 年代初期，农杆菌被证实可使易感染作物获得遗传稳定的转基因植物，基因枪转化技术的成功无疑是谷类作物转基因研究的重大突破 [3]。

一般认为，禾谷类作物极难被农杆菌浸染，T-DNA 插入也不易发生 [4]。经过十多年的努力，采用农杆菌转化禾谷类作物并没有获得转化植株。在这种情况下，基因枪转化技术的出现对当时的禾谷类作物转基因研究具有非常重要的意义。之后的研究表明，农作物对农杆菌并不存在不亲和性，并针对所有主要谷类作物建立了农杆菌介导法遗传转化方案（图 1.1）（将在本章第 3 节、第 5~7 章及第 9 章中讨论）。但是，20 世纪 90 年代初期，转基因技术应用于谷类作物的主要瓶颈是缺乏有效的遗传转化技术 [5]。由于在农杆菌转化禾谷类作物方面的研究未取得成功，促进了其他一系列直接基因转化法（DGT）的研发，包括 DNA 浸润法、DNA 宏量和微量注射法、电激法、电泳法、超声和激光介导的 DNA 吸入法、使用碳化硅微纤维和原生质体的转化法。使用这些方法都证实了外源 DNA 可以导入受体细胞，尤其是电激法、碳化硅微纤维和原生质体的转化法已在水稻与玉米中获得大量的转基因植株，但这些技术依赖于特定的细胞培

养体系，且对技术的要求较高 [6]。

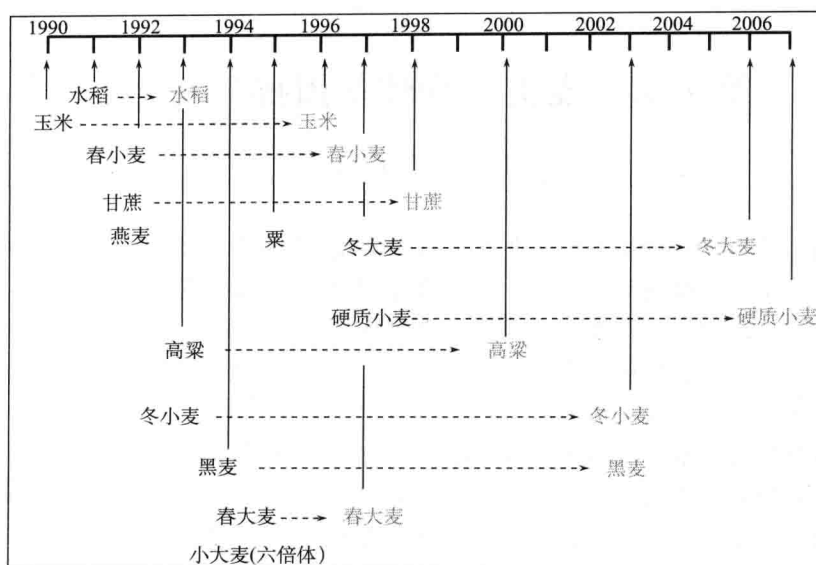


图 1.1 主要谷类作物遗传转化首次报道的时间线。

基因枪法（黑色）和农杆菌介导法（灰）

相比之下，人们马上意识到基因枪转化法有潜力为许多不同类型的细胞传送 DNA，包括直接取自植株的外植体和离体培养的细胞。这就有可能把基因转入可再生植株的细胞中，包括转入胚性愈伤组织或盾片等胚性组织中。这对大麦、小麦和燕麦等小粒作物尤为重要，因为建立这类作物的可再生细胞悬浮培养体系是非常困难的，而该类细胞又是其他直接基因转化法（DGT）首选的受体材料。

基因枪转化法被迅速地认可还归因于其另一特性，即它非常适合于基因瞬时表达的比较研究。通过轰击平行培养材料，随后可通过生化实验或通过统计如  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶（GUS）等可视化标记基因的表达斑点的定量分析评估标记基因的表达，从而很容易地比较不同载体基因的表达水平。在早期研发稳定的禾谷类遗传转化实验方案过程中，瞬时表达分析是一项重要的工具，因为它能用于优化 DNA 转入受体组织的各项参数并用于鉴定使基因高水平表达的启动子序列。

在基因枪转化法刚开始使用的时期，测试了许多不同的粒子加速系统，包括一些用于测试炸药、氮气、氦气或空气的高压脉冲，或静电放电装置 [7]。多数装置是无法在市场上购置而由私人作坊制作的，因此，不同研究组之间所获得的实验结果很难比较和重复。然而，Bio-Rad 公司的 DPS-1000/He 基因枪一经商业化，就被认为是最通用且高效的仪器，很快成为公认的标准装置 [8]。

在基因枪轰击玉米胚性悬浮细胞获得成功之后 [2]，小粒禾谷类作物基因枪转化的早期实验一般以愈伤组织为受体组织。在这些试验中，通过基因瞬时表达评估，分

析了影响基因导入的参数 [9, 10], 并获得了一些稳定的转基因愈伤组织和转基因植株 [11, 12], 但普遍认为愈伤组织并不是理想的受体材料, 其再生潜力不高且随着连续继代培养而下降。因此, 几个实验室试验转而使用幼胚或盾片替代愈伤组织作为受体材料。在 20 世纪 90 年代初, 尽管首批燕麦转基因植株是由基因枪轰击愈伤组织获得的 [19] (图 1.1), 但同时几个研究组以小麦 [13~15] 和大麦 [16~18] 初级胚性组织为受体材料也获得了可育的转基因植株。在基因枪法转化小麦和大麦的研究中, 幼胚和盾片至今仍是首选的受体材料, 这很大程度上是因为二者在各种组培系统中具有最高的再生能力。但它们也存在缺陷, 供体材料必须持续提供从开花至种子发育初期所需的外植体材料, 这一缺点促进了寻找其他受体材料的研究。利用基因枪轰击, 尝试了大量其他外植体和组培材料, 包括来自小孢子 [19, 20]、幼穗 [21, 22]、成熟种子 [23, 24]、叶基 [25] 和分生组织 [26] 的组培材料, 并已成功获得了转基因植株。其中一些受体材料, 如种子或分生组织的组培材料, 尽管使用起来比幼胚和盾片更为方便, 但其转化效率较低, 因此至今尚未被广泛使用。

自从最初使用基因枪法获得转基因小麦、大麦和燕麦植株以来, 在以下两个主要领域的研究提高了基因枪法转化系统的效率, 从而获得了可靠的、高通量的、实用的遗传转化方案, 该方案适用于更广范围的基因型, 包括一些优良的品系。第一个领域是对各种实验参数, 如组培和再生的步骤 [27, 28]、轰击的条件 [29, 30] 和筛选方案 [31, 32] 的分析及优化取得了重大进展。第二个领域是研发了适用于优良品种的转化方案, 该方案使得作物种质的遗传转化无需通过预筛选 [33, 34]。但对于作物遗传转化效率而言, 基因型限制仍然是一个主要因素。这一方面的内容将在第 6 节中进行讨论。

基因枪法是小粒作物首次获得转基因植株的方法。十多年来, 该方法已广泛用于基础研究和应用研究。如今, 该方法已成为实验室开展禾谷类生物技术研究的一个标准技能。与农杆菌介导的遗传转化法相比, 在以商业化品种为目标的转基因植株的生产能力上, 基因枪法有一定的劣势, 因为它易产生更复杂的转基因整合模式 (将在第 4 节中讨论), 这可能导致基因表达及遗传的不稳定, 但它仍然是一种重要的研究工具。

## 2. 小粒作物中农杆菌遗传转化法的发展与应用

部分农杆菌属细菌能转移基因并引发冠瘿瘤, 这一现象启发了植物遗传工程的思路, 设想可否利用农杆菌属细菌导入一定长度外源基因。明确冠瘿瘤病原菌是土壤细菌虽已有百年历史 [35], 但其不同生物界之间基因转移的分子机理则晚了 70 年才得以阐明 [36]。冠瘿瘤是由于部分 Ti 质粒 (T-DNA) 转入宿主组织细胞引发的, 这段 T-DNA 上含有编码生长素、细胞分裂素, 以及指导氨基酸或糖衍生物合成的蛋白酶基因, 这些基因的表达导致植物细胞增生而形成瘤 [37~40]。除了 T-DNA 本身外, 另外两个遗传区域也是成功形成根瘤所必需的: 一个区域是位于农杆菌染色体上的 *chv* 基因和 *att* 基因, 其功能是识别并结合易感染的植物细胞; 另一个是 Ti 质粒携带的毒性基因——*vir* 基因, 它是 T-DNA 加工和转化所必需的。随着 T-DNA 与其他必需的遗传成分之间无

物理连锁等特点的发现,应用根癌农杆菌作为遗传工程工具也取得了突破性进展 [41, 42]。由此开发出了双元载体系统,在该系统中,去掉植物激素合成基因的 Ti 质粒丧失了致瘤性,又称为卸甲质粒。较小的质粒或双元质粒,既能在大肠杆菌中 (*E. coli*) 复制,也能在农杆菌 (*Agrobacterium*) 中复制,其上的 T-DNA 设计带有多克隆位点,便于外源 DNA 插入 [43~47]。然而, T-DNA 致瘤基因的缺失会导致可见表型的丢失,而这至今仍是鉴别细菌基因成功转化和表达的标记 [48, 49]。因此,为了筛选使用二元载体和卸甲农杆菌菌株,需要开发新的标记基因,为筛选转化成功与否提供标记。第一个使用的是 *neo* 基因 (*npt II* 基因),编码新霉素磷酸转移酶 II,能使植物细胞在含有氨基糖苷类抗生素 G418 的培养基中生长 [50, 51]。随后相继开发出了其他的标记基因,包括抗潮霉素基因、抗氨甲蝶呤基因、抗双丙氨磷除草剂基因等 [40] (见第 2 章)。

早期植物转化试验,试图将分离的 Ti 质粒直接转入原生质体,或利用植物启动子表达冠瘿碱或抗生素抗性基因来标记体外转化培养细胞或根瘤 [50, 52~54]。1984 年报道了首例含重组 T-DNA 的转基因植株,重组的 T-DNA 不仅能够表达,而且能遗传给子代 [55, 56]。5 年以后,有 25 种植物利用农杆菌获得转化植株 [57],然而,报道的单子叶植物只有芦笋 [58],禾谷类作物被普遍认为在农杆菌宿主范围之外。因而对影响禾谷类作物转化的重要因素,如辅助质粒或双元质粒 *vir* 基因、外植体类型、*vir* 基因诱导子等开展了分析与优化。至 1995 年,相继成功获得了利用农杆菌转化的水稻 [59、60] 和玉米 [61],而且还报道了其他 20 多种单子叶植物转基因表达或形成根瘤 [62]。十年来,经过对(关键)因素,如农杆菌菌株/双元载体的组合、接种和共培养条件等进一步优化,已成功地进行粳稻、籼稻和爪哇稻、小麦和大麦的冬性及春性品种、杂交玉米、高粱、黑麦及几种牧草和草坪草等物种的农杆菌转化 [63],然而,迄今为止,还未见农杆菌成功转化燕麦和小米的任何报道(图 1.1)。

### 3. 直接 DNA 导入与农杆菌介导 DNA 导入的优缺点

比较农杆菌介导与物理/直接导入 DNA 方法的优点和局限性时,可分为两类因素来考虑:首先,也是比较重要的,是要考虑所获得的转基因植物所表现的分子遗传特性;其次,是根据所需的专业设备和专业技术人员、基因型依赖性、转化效率和总量等因素考虑实验方案本身的不同要求。

尽管一些 T-DNA 的整合与 DNA 间的微同源性有关 [64],并且许多数据表明(T-DNA 整合)对基因组转录活跃区存在偏好性 [65~67],但普遍认为:不论是哪种 DNA 导入方法,所转基因均是通过非常规重组方式整合入植物核基因组,在一定程度上细胞自身的 DNA 修复机制起了辅助作用。许多学者开展了转基因分子整合模式的研究并发现这种整合存在一些共同的趋势。由于所转化的植物物种、使用的农杆菌菌株/双元载体组合、轰击参数和组培方案等实验条件之间的差异,使得不同实验之间难以直接比较。比较清楚的是两种 DNA 导入方法所获得的转化植株都可具有多拷贝、重排目的基因。但是,就一般更简单的整合方式而言,多数学者注重农杆菌介导法的优势 [65~67]。例如,通过对农杆菌介导法和基因枪法分别获得的水稻转化株进行比较,发现两