

我国农业生物工程的进展

莽克强

(中国科学院微生物所 植物生物工程实验室 北京 100080)

早在 1984 年组织落实第七个五年规划攻关项目时就充分意识到作为用粮大户的我国应对农业生物工程给予足够重视,以及在 1986 年实行的“863”长远高技术规划均列为优先发展项目。当时较强的领域应属植物组织培养技术已有 10 多年的经验,如利用花药培养单倍体已培养出一批水稻,小麦,烟草等新品种;茎尖脱毒快繁已应用于防治马铃薯退化和一些花卉植物。从原生质体或愈伤组织再生完整植株已在烟草,胡萝卜,油菜等获得成功。相比之下转基因植物刚刚起步,技术上能否走通成功,还有待证明,而转基动物完全空白^[1]。

1990 年七五计划结束时,农业生物工程各方面都取得了明显可喜的进步,利用花药单倍体选育抗逆性,适应性强的高产水稻中花 10# 和 11#,小麦 3# 并推广几十万亩至 100 多万亩(几千到几万公顷);茎尖脱毒快繁技术进一步扩大应用于果树如香蕉,苹果,葡萄并形成几十万到几百万亩的生产规模。从禾穀类或豆科作物原生质体再生植株一直认为难以克服,但在此期间水稻,玉米,小麦,粟和大豆都已成功,为转基因作物奠定了基础。经过 5 年的努力,转基因植物的全套技术包括目标基因的分离,克隆, Ti 质粒所介导的表达载体的构件,三亲交配转化以及目标基因表达的检测,都通过获得抗 TMV 烟草,抗 CMV 蕃茄,抗虫烟草等转基因植物而熟练掌握^[2]。

1995 年即八五规划结束时,农业生物工程不论在应用基础研究或是应用研究方面都取得了较全面的成功获得了显著的进步。

1 利用花药培养单倍体或染色体工程和无性系变异等方法培育并审定了小麦,水稻,油菜,甘蔗新品种 18 个,累积种植面积达 1700 多万亩(约 120 万公顷),其中单倍体育种有:水稻中花 12 号,京花 101 等;小麦京花 5 号, CA8685;染色体工程的有:小麦小偃 168,小偃 264,无性系变异的双低油菜 H166, H155(未发表资料)。

2 植物快繁的生产不论在规模或植物种类都大幅度增加

2.1 香蕉:南方沿海各省已年生产两千多万株的快繁苗供广东,广西,福建,云南,海南等省。中国有 200 万至 250 万亩蕉田(约 140000~170000 公顷)。目前不过 15%~20%的蕉田种植组培苗,随着蕉农科学意识的增加,香蕉组培苗的需求将会不断增长。香蕉组培苗的脱毒工作也有较大的改进,生产量较大的厂家广东东莞石龙德星公司(SHILONG AGISTAR DEXING)设有病毒检测部门,建立 PAS-ELISA 检测 CMV, TMV, BBTV 以及 BBTB-BLO 等病原以保证种芽无毒。由于限制 6BA 使用浓度和繁殖代数,在生产过程中剔除不正常芽使大棚变异率在 2.6%,大田 1.1%^[3-5]。

2.2 苹果:无毒矮化优良品种的苹果苗每年在北方约有 20~30 万亩的市场,有些生产者如河北昌黎果树所已利用 ELISA 检测苹果叶斑病毒,苹果茎沟病毒和茎痘病毒以保证种苗无毒。

2.3 葡萄:已成功建立 ELISA 盒检测葡萄扇叶病毒,卷叶病毒,因此已能保证生产无毒种苗。每年约 5 万株的市场。

2.4 花卉:南方荫生观叶植物如 *Spathiphyllum* sp,喜林芋属,万年青类,红掌等国内至少 200 万亩市

场。另外 *Spathiphyllum*, *Syngonium*, *Alpinia*, *Alocasia*, 卡特兰, 蝴蝶兰出口 300 至 400 万苗。国内切花组培苗如红掌, 石竹, 满天星, 百合, 马蹄莲等也有几万至几十万苗的市场^[3]。

3 转基因植物

1990 年至 1995 年期间转基因植物比 1985 至 1990 得到很大的发展, 可从以下几个方面证实。首先转基因植物的目的涉及到抗病毒, 抗细菌, 抗盐碱, 抗虫, 抗除草剂, 在改良品质方面包括抗软化, 雄性不育, 改良营养品质等; 其次, 转化手段如农杆菌 Ti 和 Ri, 基因枪, 激光, 电激, 花粉管通道, 子房注射等多种转化方法已建立; 第三, 受体植物已从模式植物烟草扩展到重要粮食和经济作物, 水稻, 玉米, 棉花, 番茄, 辣椒, 木瓜, 甜菜, 大豆甚至木本的杨树。表 1 尽可能的列出我国已成功的转基因植物, 现仅详细介绍一些较为突出的成果。

3.1 抗病毒

3.1.1 抗 CMV/TMV 的转基因烟草和辣椒: CMV 和 TMV 在自然界中混合感染在我国较普遍发生于烟草, 辣椒, 香蕉等重要作物, 造成严重病害。经过 6 年努力将合成的 CMV 和 TMV 外壳蛋白基因用 Ti 质粒介导引入国内烟草良种 NC89, 经攻毒, Southern, Northern, Western 印渍分子杂交选出抗 TMV/CMV 感染的转基因 NC89 纯合系在大试验田中又进一步检测抗性及其遗传稳定性。结果证明目前至少稳定到第 6 代。在自然感染条件下转栽后 75d 统计保护率为 60%~70%。转基因 NC89 的化学组分和品质评价与非转化的基本一致, 现已推广 37000 公顷, 抗 TMV 的转基因 NC89 在自然感染或攻毒条件下保护率可高达 90%~95%, 已推广 13000 公顷, 仅以推广面积而论似为世界之冠^[6,7]。

3.1.2 利用植物弹状病毒的 N 蛋白基因获得抗病转基因水稻: 目前国内外大多利用 Tobamovirus, Cucumovirus, Potyvirus 或 Potexvirus 等裸露的外壳蛋白基因获得抗病毒转基因植物, 带外膜的番茄斑萎病毒组 (tomato spotted wilt V. group) 的 N 蛋白基因也已成功的转入蕃茄。利用同样策略来防治植物弹状性病毒却无人问津。我国籼稻或杂交稻区的一个重要病毒是水稻黄矮病, 就是由植物弹状病毒组的水稻黄矮病毒所引起。其 N 蛋白 (Nucleocapsid protein) 基因已被克隆并利用基因枪方法转入水稻获得抗该病毒的株系, 这是第一个报道利用植物弹状病毒核衣壳蛋白基因达到抗病毒目的^[8]。

3.2 抗细菌

抗水稻白叶枯病的基因 Xa21 定位及其转基因水稻: Xa21 是利用分子克隆技术从水稻分离的第一个抗白叶枯的基因, 已知水稻 Indica line IRBB21 的 Xa21 基因与 RG103 标记探针连锁。RG103 可与 I-BRR21 的 7~8 个基因组片段杂交并与 Xa21 共分离。RG103 的氨基酸序列与已知的植物抗性基因特异片段 1.RR (Leucine-rich repeat) 有 20%~33% 的相同性 (Identity), 因此认为与 RG103 杂交的基因组片段可能含有 Xa21 基因。利用染色体着陆法以 RG103 为探针, 直接从 IRBB21 基因文库中分离克隆。将所得到的克隆片段用基因枪转化至感病品种台北 309。用 X00 (race 6) 小种攻毒, 测抗性。抗性株比对照病斑长度大大缩小, 体内细菌浓度 (CFU) 也减少 10~100 倍。所有抗性株系中都含有 9.6kb-Kpn I 片段。用其相互重叠的片段转化水稻, 测抗性进一步证明 9.6kb 上的 2.3kb (Hind III/Hind III) 是抗性所需片段。该片段含 3075bp 的 ORF, 编码 1025aa。该基因与已知蕃茄的抗细菌基因 *pto* 和 *cf 9* 很相似。该基因已转入中花 9 号。上述工作是中科院遗传所与加州大学 Davis 分校, Scripps Res. Inst. 合作完成的。

3.3 抗虫

3.3.1 很有希望走向商品化的是抗虫的欧洲黑杨。Bt 杀虫蛋白 cryIA(c) 的 N' 端 1.8kb 引入欧洲黑杨 (*Populus nigra*) 经分子杂交和抗性筛选最终获得 4 株转基因黑杨对舞毒蛾 (*Lymantria dispar*) 和尺蠖 (*Apocheimia cinerarius*) 的较正死亡率在 85%~100%, 在进行大田试验中^[9]。

3.3.2 近年来中国大陆棉花棉铃虫危害猖獗, 使收成减半, 由于抗药性的产生化学农药已基本失灵, 因此寄厚望于生物防治。Bt 杀虫蛋白 CryIA(c) 和 (b) 经修饰改造后使更适于在双子叶植物中稳定地表达, 已利用农杆菌, 花粉管通道, 基因枪等方法转入泗棉 3#, 中棉 12# 等。室内测定可获得 80% 左右的

杀虫率,正在进行大田试验中(未发资料)。

3.3.3 抗盐:已知植物体内糖醇类化合物是渗透保护剂的一种。外界非生物型逆境可诱使这类化合物在体内积累。将编码甘露醇-1-磷酸脱氢酶基因 *mt1D* 转入烟草 SR1 可使甘露醇在体内积累,在 250mmol/L NaCl 条件下 30d 后转基因植物无论植株高度,鲜重和根系均比对照表现出明显耐盐性。我们发现编码山梨醇-6-磷酸脱氢酶的基因 *gutD* 也有类似现象。若同时用农杆菌将 *mtiD* 和 *gutD* 导入并在 35s 启动子驱动下在烟草黄苗榆体内表达,气相色谱分析表明,甘露醇可不同程度积累(0.71~2.41mmol/g 鲜叶)而对照植物体内未见甘露醇产生,山梨醇与葡萄糖的摩尔比值比对照大数倍甚至数十倍,这个比值较 *gutD* 单价转基因植物的比值要高出很多,双价转基因烟草黄苗榆在 2.0% NaCl 下(=340mmol)可长根,转载后可 100% 成活^[10]。将同样的农杆菌转化美洲黑杨(*Populus deltoides*)已筛选到可耐 0.45% NaCl(-77mmol)而 CK 在 0.3% (-50mmol)下即显现黄枯(个人通讯)。

4 应用基础

八五期间除以上应用研究外在基础研究方面也有可喜的进展为生物工程在农业生产方面的应用奠定基础,拓宽道路。

4.1 植物体内目标基因的标记,分离和克隆

1985~1993 年期间我国转基因几乎完全来自病毒或细菌的基因或基因片段。几乎都是单基因所控制的遗传性状,而且往往引来转基因植物释放后的生物安全性问题。如病毒外壳蛋白基因和 Bt 杀虫蛋白基因所引起的。实际上农业生产上很多是多基因控制的数量遗传(QTL)性状的问题如产量,品质,生长期等。因此必须充分利用自然界生物多样性扩大基因来源,检测分离 QTL,最大限度减少生物安全性的问题。因此中科院在 90 年代初即有意识地开始了 RFLP 和 RAPD 标记目的基因的工作。前边提到的抗稻白叶枯病基因 *Xa21* 的定位就是与美国科学家合作的这方面重要成果之一。利用基因池和 RAPD 方法,从高抗稻瘟病菌小种中-10-8-14 品种窄叶青和高感品种京系 17 号杂交后得到 DHF2 群体,利用 RAPD 分析 150 个引物所扩增的 PCR 带与抗性的关系,最终发现引物 127 号所扩增的带长 0.6kb 与抗性共分离,命名该带为 BP127。RFLP 的进一步分析该抗性基因定位在第 8 号染色体上并与其他标记 RG28 RG1034 RG18 1B RG136 等连锁,定名为 *Pizh*,与 BP127A 间的遗传图距为 14.9cM^[11]。

用常规法选育的耐盐(0.5 NaCl W/V)水稻突变株 M20 已遗传稳定 8 代以上。M20 与对盐敏感的原亲本 77~170 杂交的 F2 群体抗盐性状的分离比例为敏感:中度:高耐=1:2:1。据此认为是主效基因突变所引起的耐盐性,利用 130 个 RFLP 探针,其中 RG4 表现出 M20 和 77~170 之间的多型性,该标记定位在 7 号染色体,与耐盐基因距离为 $7.0 \pm 2.9\text{cM}$ (43)。用类似方法从新贵矮水稻品种找到新的半矮化基因 *sdg* 与已有的矮化基因 *sd 1* 不是等位的,*sdg* 与 5 号染色体上的单拷贝 DNA 克隆 RZ182 连锁,相距 4.3cM^[12]。

4.2 植物和植物病毒基因结构,功能和表达调控的研究

利用分子生物学方法研究基因的结构功能和表达调控无疑会为转基因植物提供新策略,新目标基因,提高表达水平从而会大大扩展转基因植物在农业生产上的应用。近年来中国在这方面的工作有所加强。

4.2.1 植物色氨酸生物合成反馈调控的分子机理:色氨酸的生物合成是植物体内最重要的代谢途径之一。它为人类提供必需氨基酸,为植物产生 IAA,植保素,生物碱等重要化合物。该途径的第一个关键酶即氨基苯甲酸合成酶(AS)受产物色氨酸的反馈抑制。拟南芥突变体的 AS 对反馈抑制不敏感,序例分析证明其 α 亚基的第 341 位的 Asp 突变为 Asn,并导致突变体内游离的 try 比野生型高出 3 倍。这些结果对提高农作物玉米的 try 含量或改良作物品质有潜在重要意义^[13~15]。

4.2.2 植物弹性病毒基因组结构功能:水稻黄矮病毒是我国南方籼稻和杂交稻患黄矮病的毒原,是一种由稻飞虱传播的植物弹状病毒,目前尚无人探讨如何利用植物基因工程防治这类病变。RYSV 是负链 RNA 病毒基因组,约为 1.2kb 左右,编码 G, M, N, NS 和 L 五种蛋白。比其它植物病毒结构复杂,基

基因组较大。从纯化的病毒 RNA 所构建的基因文库中筛选五种蛋白克隆,并获得除 G 蛋白外的全部序列;先导序列 203nt, N-1714nt, NS-1211nt, M-1070nt, L-5579, Pseudogene-568;令人感兴趣的是将 N 蛋白基因及其缺失四个核苷酸的 N 基因移码突变体分别转入水稻后,抗 RYSV 的保护率分别为 93-100% 和 83%。这说明 N 基因的保护作用很可能是由转录体 RNA 水平所介导。RYSV 全部基因组的结构与功能的分析将为探讨利用基因工程防治弹状病毒的新策略奠定基础^[16, 17]。

4.2.3 水稻蜡质基因的表达和调控: 蜡质基因编码结合在淀粉粒上的淀粉合成酶,负责直链淀粉的合成,是只在花粉,胚乳和胚囊中特异表达的基因。利用引物延伸反应和 S1 制图分析发现在该基因 5' 非翻译区有长 1126bp 的第一个内含子。用蜡质基因启动子, GUS, 和/不 和该内含子的构建转入水稻和烟草原生质体。有内含子存在时 GUS 的表达比对照分别高出 26~44 倍和 18~40 倍,因此证明该内含子是起强化功能的顺式调控元件。利用 5' 缺失大小不同的片段和 GUS 在水稻原生质体中表达证明在 (-361) - (-640)nt 间存在着另一个可增强表达调控元件。显然这两个控制高表达的元件是时,空专一性的表达,它们对水稻基因工程的研究是有重要应用价值的^[18]。

Northern 杂交分析直链淀粉含量不同的水稻的 RNA,发现高含直链淀粉 20% 以上的籼稻其蜡质基因转录体全部被加工,即所有内含子被剪切掉为成熟的 mRNA。中等含量在 6~16% 的籼稻或粳稻只部分转录体被加工,但还有一部分,它们的第一个内含子未被剪除,因此淀粉合成酶含量不高。在糯稻中所有前体 RNA 的第一个内含子均被保留,因此根本无淀粉合成酶的形成。这一结果可用来改进水稻品质。通过凝胶滞后试验和竞争性测试已初步确定了调控蜡质基因组织特异性表达的反式激活因子的结合位点及其核心序列^[19]。

4.3 主要农作物的基因转化系统的研究

过去 5 年中,国内转基因植物所以发展的较快的原因之一是建立了可靠而稳定的几种主要农作物的转化系统如以下个人通讯或内部资料所获材料:

4.3.1 大豆: 用含 NPTII 和 GUS 嵌合 Ti 质粒的农杆菌转化大豆主栽品种“中豆 II[#]”和吉林 21[#] 的未成熟的完整子叶,在诱导培养基上可高频率地产生胚状体,在含 Kan 的 MS 培养基上使胚状体进一步发育成苗。经检测 NPTII 和 GUS 的表达后证实已获得转基因大豆,频率可高达 60%~70%。转化来自未成熟子叶的原生质体其转化再生率达 3×10^{-3} 以上,如此高频率未见报导。

4.3.2 油菜: 来自甘兰型油菜主栽品种“云北 2[#]”的带极短叶柄的完整子叶,用含 NPT II 或 HPT 和 GUS 嵌合的 Ti 质粒农杆菌转化,形成愈伤组织进而分化出丛状不定芽,获得转基因植株的转化频率达 27%。用 PEG 法导入下胚轴原生质体而获得转基因植物的频率为 2×10^{-3} (NPT II 为标记基因),如用 HPT 可高达 13×10^{-3} 可见对芸苔属作物 NPT II 不是好的标记基因。

4.3.3 甘兰: 利用上述含同样嵌合质粒的农杆菌转化“夏光甘兰”和“黑叶小平头”的带柄完整子叶或下胚轴可获得转基因植物频率为 20% 以上。以 PEG 转化下胚轴原生质体获得转基因植物的频率在 3×10^{-3} 以上。

4.3.4 水稻: 利用基因枪转化水稻品种(包括籼稻)的未成熟幼胚,有些粳稻品种转化频率可在 10%~20%,籼稻仅有 2%~5% 左右,但不同基因型仍有差别。利用农杆菌转化原生质体也得到 GUS 的瞬时表达和再生植株。利用基因枪方法已成功地将 Bt CryIA(c), RYSV-N 蛋白基因,抗菌肽基因, BADH 基因, Tungro 病毒外壳蛋白基因转入水稻。

4.3.5 棉花,小麦,玉米: 将这三种作物归类在一起讨论是因为用人工注射法都已有较好的数据如 Southern 分子杂交,报告基因的表达或生物活性测定等,证明已达到转基因之目的。尽管各实验室称法不同,有的叫花粉管通道,有的称子房注射,从原理讲是一样的,即掌握在雄配子进入子房胚囊后,受精卵开始分裂前,将 DNA 导入。利用此法首先将 Bt Cry IA(b)和(c)转入泗棉 3[#],所得近 3500 多株幼苗种子用 GUS 表达否来筛选阳性率为 1.5%,同法,中棉 12[#] 136 株苗的阳性率为 12.5%,进一步虫试筛出高抗株系,室内测定杀虫率均达 80% 左右,(未发表资料)。将 Bt Cry IA(c)也导入玉米,不过显微注

射的部位可能是子房的中部。用玉米自交系品种在 136 粒发芽成苗的植株中只有一株为阳性,转化率为 0.37%,以农大 60 为材料,所得 22 粒种子中,3 粒成苗,一株为阳性。Southern Blot 和虫试都证明确为转基因玉米^[20-22]。利用类似方法将大麦黄矮病毒的外壳蛋白基因转入小麦品种。

自 1988 年周光宇先生首次发表花粉管通道导入外源 DNA 方法后,持异论者认为证据不足,当时导入的是植物总 DNA^[23]。八年后的今天,上述成功的实例则有力的证明花粉管通道法是可以将外源 DNA 导入植物而获得转基因植物,是事实,是可行的。不过这个方法要求较高技巧,其具体操作因植物种类不同而异,也往往因人而异,难以重复。又因需在大田进行人工逐个操作,需大量劳动力和辛苦劳动。

利用基因枪法将雄性不育基因 TA29 转入豫麦 18 号开花 15 后的幼胚。处理 170 幼胚,得到 6 株绿色小苗,其中生长良好的 3 株,转化率为 1.76%~3.53%。Southern 杂交证明确为转基因小麦,但是否造成雄性不育。是否人工授粉后可结实有待观察^[24]。

5 对我国农业生物工程的几点建议

5.1 加强应用基础研究,大力发掘有价值的基因和表达调控元件

植物基因工程已发展十多年,从宏观分析,将外源基因导入受体的方法不断花样翻新,80 年代初农杆菌 Ti 质粒系统之后相继出现电激穿孔,PEG 法,80 年代后期的花粉管通道,末期出现基因枪,激光束。根据不同植物最佳外植体不同可选择合适的转入方法。从外植体再生成完整植株的组培技术也在不断改进,因此获得的转基因植物包括单子叶,双子叶,草木,木本,主要粮食作物,蔬菜和经济作物,已至少 70 多种,预测今后这方面大部分工作将是选择最佳条件,扩大受体范围,提高转化率,再生率,以提供更多的转基因株系以选育表型理想的后代。相比之下,目标基因,基因表达的启动子和调控元件来源狭,种类少。目前使用的目标基因大多来自病毒,细菌,少数来自高等植物,自然界丰富的生物多样性的基因宝库有待开发利用,为达到某种目的所采取的基因工程策略也显得不够丰富多彩。当今是市场经济,专利保护,竞争意识极强的时代,为此我国必须在这方面占有相当的一席之地,这就应当大力开展诸如象 RFLP, RAPD, 转座子标记这类定位,分离,纯化高等植物基因的工作;还应重点支持在分子水平上探讨病理生理,植物自然保护物质代谢途径以及基因结构功能,表达调控包括质,量,时,空的调控等方面的工作。如无这些应用基础研究为后盾则难以推陈出新,独树一帜。

5.2 结合国情发扬优势

在选择研究领域和课题时;国力有限,如能结合国情扬长避短,有可能事半功倍。我国生物资源丰富多样,加之有一支勤劳优秀的良种专家队伍,几十年来为国家培育了大批的良种的同时也积累了丰富的有价值的亲体材料。因此在考虑植物基因组工程或利用 RFLP 和 RAPD 方法制作基因图谱时必须利用这一优势。否则完全追踪西方步调,无论从财力,人力和起步时间都难以与美,日的水稻,英国的小麦等基因组工程抗衡,本文前面例举的利用我国已有理想的杂交后代 DH F2 群体,并利用西方已有的遗传图谱和标记探针寻找并定位抗病毒和抗盐基因;又如利用已有的图谱和探针采用“染色体着陆”法,分离出抗白叶枯病图的 Xb21 都是成功的实例,分子育种与传统育种互尊,互补,互作必能结出硕果。

利用杂交优势增产尽管机理至今不明,但已为国内外所公认。利用基因工程培育雄性不育和恢复系的烟草,油菜已成功,虽处于起步阶段但路已走通,如能重点投入,尽快向纵深发展,并结合我国已有的育种方面的优势,定能为我国农业增产作出可观的贡献。

我国土地如以 400 毫米年降水量等值线为界划分,西北部一半国土为半干旱,干旱区,我国耕地中一半以上是无灌溉条件的旱地,产量低而不稳,加之近年华北,西北旱情加重已成为全面增产的重要限制因素。

近年来,分子生物学,生物化学对植物耐盐,耐旱的机理有了较深的了解,从植物体对逆境反应而积累的物质如糖醇,脯氨酸, SOD/过氧化氢酶,三甲基甘氨酸,二甲基丙磺酸,肌醇甲醚等来分析,耐盐,旱机理肯定是多基因所调控,很可能与植物体内渗透调节,肌醇合成代谢,甲基化反应,氧自由基的清除等

中国目前的转基因植物
Current transgenic plants in China

Applica- tion	Transgenes	Promotor and se- lection marker	Transformation techniques	Targets	Transgenic pls	Stage of de- velopment		
1. Virus- resistant	(1) Coat protein gen. (cDNA)	35s. NPT II	Ti-mediated leaf disk	TMV or/ and CMV	N. tabacum CV Nc89	field test [5, 6] completed		
		35s. NPT II	Ti-mediated Hypocotyle	TMV and CMV	Capsicum annuum CV. Longunt 8212	field test		
		35s. NPT II	Ti-mediated Cotyledons	TMV/ CMV	Lycopersicnm esculentum CV. Lichung	field test		
		35s. NPT II	Ti-mediated ste fragments	PVY	potato, cv Favorita	field test [25]		
		35s. NPT II	idem	idem	PVX	potato, cv, Bintje	greenhouse	
		35s. NPT II	idem	idem	PLRV	potato, cv. Favorita	greenhouse	
		35s. NPT II	idem	idem	PVY + PLRV	potato, cv. Huto	greenhouse [26]	
		35s. NPT II	idem	idem	PVY + PVX	cv. favorita	greenhouse [27, 28]	
		35s. NPT II	idem	idem	PVY + PVX + PLRV	idem	greenhouse [29, 30]	
		35s. NPT II	idem	Ti-plasmid petiole of cotyledon	TUMV	H166 Zhong- shung 821	greenhouse	
		35s. HPT	idem	PEG- protoplast	SMV	Glycine max cv. Jilin 21 # Zhongdou 5 #	field test	
		35s. NPT II	idem	Ti-mediated Em- bryoid calli	PRSV	Papaya cv. Sui Zhong Hong	greenhouse	
			Nucleocapsid N protein	Actin HPT	Microprojectile bombardment im- matured embryo	RYSV	Rice Xuishui 11 Bing 88	greenhouse [8, 16]
			Coat protein gene(cDNA)	Actin 35s	pollen tube pathway Microprojectile bombardment	BYDV	wheat	field test
	Structure pro- tein gene S5, S7, S8	Actin, HPT	Microprojectile bombardment immatured embryos	RDV	Rice Yuefu Zhonghua 8 # Danjing 5 # IR 36	greenhouse		

续表

	coat protein gene	actin HPT	idem	Tungo V	Rice Beta vulgaris cv. monohari	greenhouse
	coat protein	35s. NPT II	Ti-plasmid	BNYVV		greenhouse [31, 32]
	(2) Genes of Viral replicase CMV-deleted RNA2-cDNA	35s. NPT II	Ti-mediated leaf disk	CMV	<i>N. tabacum</i> cv. NC 89	greenhouse
	TMV-54KD	35s. NPT II	Ti-mediated leaf disk	TMV	<i>N. tabacum</i> cv. NC 89 K326	greenhouse
	BNYVV-54KD	35s. NPT II	Ti-mediated leaf disk	BNYVV	Beta vulgaris cv. mono hari	greenhouse [31]
	PVY-NIB PRSV-NIB	35s. NPT II	Ti-mediated leaf disk	PVY, PRSV	<i>N. tabacum</i> papaya. cv. Sui Zhong Hong	greenhouse [10, 33~55]
2. Bacterium-resistant	(1) Shiva 1, shiva A, shiva A/m-Cecropin B (2) shival/T ₇ lysozyme (3) idem	MA's NPT II 35s 35s NPT II idem	Ti-or Ri-mediated leaf disk tuber slice	<i>pseudomonas</i> <i>solanacearum</i> idem	potato cv. mi- ra tobacco Nc89 potato cv. Mi- ra	greenhouse greenhouse greenhouse
	(4) Thionin (barley)	35s NPT II	Ti-plasmid leaf disk	<i>pseudomonas</i> sy- ringae pv. tabaci	tobacco	greenhouse [36]
	(5) Xa21 (Rice)	Xa21 HPT	microprojectile bombardment immatured embryo cell suspension	Xanthomonas oryzae pv. o- ryzae race 6	Taipei 309 ZhongHua9 #	greenhouse [37]
3. Insect-resistant	(1) Bt. toxin cry 1A(c)	35s NPT II	Ti-plasmid leaf disk	tobacco bud- worm. <i>H. as-</i> <i>sulta</i>	<i>N. tabacum</i> Nc89	greenhouse [38]
	(2) Bt. toxin cry 1A(c)	35s NPT II	Ti-plasmid stem fragments, leaf disk	gipsy moth looper	populus nigra	field test [9]
	(3) Bt. toxin cry 1A(c)(b)	35s NPT II	Ti-plasmid hypocotyl; e pollen tube pathway	bollworm	Cotton: Si mi- an 3 #, Zhong mian 12 #, Jin main 7 #	field test
	(4) Bt. toxin cry 1A(c)	35s HPT	microprojectile bombardment: corn k3 cell suspension, Ovary injection corn, hybrid Nong- da 60	Corn stem borer	Corn k3 Nongda 60	greenhouse [20~22]

(续表)

	(5) cowpea trypsin inhibitor	35s NPT II	Ti-plasmid leaf disk	H. assulta	<i>N. tabacum</i>	greenhouse
	(6) pea-lectin	35s NPT II	Ti-plasmid leaf disk	Aphid	<i>N. tabacum</i>	greenhouse
4. stress- resistant	(1) Ecoli mt1D& gut D	35s NPT II	Ti-plasmid leaf disk	tolerance to 2% NaCl	<i>N. tabacum</i> cv. Huang- Miao Yu	greenhouse [39, 40]
	idem	idem	idem	0.45% NaCl	<i>Populus del-</i> <i>toides</i>	greenhouse
	(2) mt1D& gutD	Actin HpT	microprojectile bombardment em- bryo calli	in testing	Hybrid corn Zhong 31 #	greenhouse
	(3) BADH	35s NPT II	Ti-plasmid leaf disk	2% NaCl 0.4% - 0.8% Na- Cl 0.5% NaCl	tobacco straw- berry Rice: Zhonghua 8 # Zhongyuan 1 #	greenhouse [41]
5. herbi- cide-re- sisten	Antiatrazine gene from psbA mutant	promoter of psbA- mutnt	ovary mjection	tolerant to 6×10^{-4} m Atrazine	<i>Glycim max</i> s3117	field test[42]
6. Crop impr-Ove- ment	(1) Antiripen- ing Antisense ACC-syn-thase RNA	35s NPT II	Ti-plasmid: cotyle- dons	shelf-life prolonged for 2 months block	tomato cv. Lichun	field test[43]
	(2) Male steril- ity Barnase and barstat from bacillus amy- loliique-faciens	TA29. Bar	Ti-plasmid petiole of cotyledons	tapetum and pollen develop- ment	<i>Brassica napus</i> Zhongshuang 821 shuangdi 5-4	greenhouse [44, 45]
	(3) Rice seek storage protein 10K gene	35s NPT II, patatin I	Ti-plasmid potato tuber slice soybean cotyledons	cys-and met-rich protein- 27%	potato soy- bean	greenhouse
	(4) High-sal- fur-containing genes, HNP I HNP II	35s NPT II	Ri-plasmid young cotyledons	Suffur- containing Amino acid raised- 20%	<i>Lotus corni-</i> <i>culatus</i> , <i>Med-</i> <i>icago sativa</i>	greenhouse

注:表中未引文献的均系内部资料或个人通信。

多种反应有关,是一个复杂的信号传导系统。利用转基因植物研究这些物质的表达,调控和功能是极有力的方法,已有实例为证。再者,利用分子标记和遗传图谱定位抗逆基因也

初见成效,两条路线必将相辅相成,最终使耐盐和/耐旱的转多基因植物为农业增产做出贡献。

5.3 对动、植物新品种的专利保护

至今不论植物传统育种还是分子育种所得新品种在我国是不受专利保护的(只对微生物新品种有保护)这在市场经济的今天对新品种的推广和激励科技人员是相当不利的。

致谢:感谢中科院高技术研究开发局袁萍同志,中国农业科学院贾士荣教授提供宝贵的未发表资料。

参 考 文 献

- [1] Mang K Q, Lui Y H. *Bio/Technology*, 1986, **4**(4):285.
- [2] Mang K Q. *Bio/Technology*, 1991, **9**(8):705.
- [3] Mang K Q, Jiang X H *et al.* Proceeding of 2nd. Asia-Pacific Cinfrence on plant Cell and Tissue Culture, China Beijing, 1996, p. 33.
- [4] Huang M Q, Liao Z S. *Chin J Biotechnol*, 1996, **12**(3):335~339.
- [5] 徐 华, 蔡文启等. *微生物学报*, 1993, **33**:58.
- [6] Zhou R T, Fang R X *et al.* Proceeding of the 3rd. Inte. Symposium on the Biorafety Results of Field test of Genetically Modified Plant and Microorganidms, 1994, pp. 49~55.
- [7] 方荣祥, 田颖川等. *中国科学 B 辑*, 1993, **23**:481.
- [8] Fang R X, Third Inte. Rice Genetics Surmposium, Manila, Philipine, 1995, pp. 16~20
- [9] 田颖川等. *生物工程学报*. 1993, **9**(3):231.
- [10] 刘俊均, 彭学贤等. *生物工程学的了*, 1994, **10**(3):283.
- [11] 朱立煌, 徐吉呈等. *中国科学 B 辑*, 1994, **24**(10):1048.
- [12] Liang E Z, Gu M H. *Theor Appl Genetics*, 1994, **88**:898.
- [13] Li J Y, Last R L. *Plantphysiol*, 1995, In press.
- [14] Li J Y, Zhao J *et al.* *Plant Cell*, 1995, **7**:447.
- [15] Li J Y, Chen S *et al.* *Plant Physiol*, 1995, **108**:877.
- [16] Fang R X, Wang Q *et al.* *Virology*, 1994, **104**:367.
- [17] 方荣祥等. *病毒学报*. 1992, **8**:62.
- [18] Li Y Z, Hong M M *et al.* *Plant Science*, 1995, **108**:181.
- [19] Wang Z Y, Zheng F Q *et al.* *The Plat Journal*, 1995, **7**(4):613.
- [20] 丁群星, 谢友菊等. *中国科学 B 辑*, 1992, **22**(2):142.
- [21] 丁群星, 谢友菊等. *中国科学 B 辑*, 1993, **23**(7):707.
- [22] 王国英, 林天兵等. *中国科学 B 辑*, 1995, **25**(1):86.
- [23] 秦藜藜, 沈尉芳等. *中国科学 B 辑*, 1988, **6**:611.
- [24] 傅荣昭, 曹光诚等. *遗传学报*, 印刷中.
- [25] 宋艳如, 彭学贤等. *植物学报*, 印刷中.
- [26] 张鹤龄, 宋艳和等. *植物学报*, 印刷中.
- [27] 张鹤龄, 彭学贤等. *病毒学报*, 印刷中.
- [28] 宋艳如, 彭学贤等. *植物学报*, 1994, **36**:842.
- [29] 崔晓江, 彭学贤等. *科学通报*, 1994, **39**:1992.
- [30] 崔晓江, 彭学贤等. *生物工程学报*, 1994, **10**(1):7~10.
- [31] 于嘉林, 李大伟等. *生物工程学报*, 1995, **11**(1):6.
- [32] 姚建华, 于嘉林等. *病毒学报*, 1994, **10**(1):39.
- [33] 刘俊均, 彭学贤等. *中国科学*, 1994, **24**:265.
- [34] 刘俊均, 彭学贤等. *生物工程学报*, 1994, **10**(3):283.
- [34] 项 瑜, 彭学贤等. *病毒学报*, 1995, **11**:279.
- [35] 彭学贤, 项 瑜等. *生物多样性*, 1995, **2**:35~37.
- [36] 杨红华, 方荣祥等. *科学通报*, 1994, **38**(17):1610.
- [37] Song W Y, Wang G L *et al.* *Science*, 1995, **270**:1804.
- [38] 李太原, 田颖川等. *中国科学*, 1994, **24**:276~282.
- [39] 刘俊均, 彭学贤等. *生物工程学报*, 1995, **11**(2):157.
- [40] 刘俊均等. *生物工程学报*, 1995, **11**(4):381.
- [41] 肖 岗, 张耕耘等. *科学通报*, 1995, **40**(8):741.
- [42] 傅骏华, 李连威等. *作物学报*, 1993, **19**(6):497.
- [43] 鞠 戎, 田颖川等. *生物工程学报*, 1994, **10**(1):96.
- [44] 彭仁旺. 中国科学院微生物所植物生物工程实验室博士论文 1995.
- [45] 彭仁旺, 周雪荣等. *遗传学报*, 1996, **23**(1):84.