

玉米醇溶蛋白基因 Z_4 在双子叶植物龙葵 (*Solanum nigrum*) 中的表达

邓万银 邵启全 蒋兴邨

(中国科学院遗传研究所,北京)

摘 要

本文将含有玉米醇溶蛋白基因 Z_4 的玉米基因组克隆插入 Ti 质粒 pTiT₃₇ 的 T-DNA 区。用带有此质粒的根癌农杆菌感染龙葵,得到了能合成胭脂碱的转化愈伤组织和转化植株。DNA 分子杂交和 RNA 点杂交表明, Z_4 基因确实转化并整合进了龙葵的核基因组,并且被转录成 mRNA。但在转化体中,没能检测出玉米醇溶蛋白。实验证明,单子叶植物基因的启动子能够在双子叶植物中发挥功能。文中讨论了 Z_4 基因在双子叶转化植物的种子中受发育调节的可能性。

关键词: 玉米醇溶蛋白基因,植物龙葵,根癌农杆菌, Ti 质粒,基因表达

近几年来,由于分子生物学和组织培养技术的发展,有关植物基因工程方面的研究进展很快。将外源遗传物质导入受体植物的方法很多,目前最为常用的是以土壤根癌农杆菌的 Ti 质粒为载体的基因转移系统。

根癌农杆菌能将其 Ti 质粒上的一段 DNA 序列(即 T-DNA)驱入植物细胞并整合至其核基因组中^[1],这一过程至少受三方面的控制: Ti 质粒上的 V_{ir} 区和 T-DNA 区^[2],以及农杆菌染色体上 $chvA$ 和 $chvB$ 位点^[3],后者控制农杆菌吸附到受伤的植物细胞表面。受伤的植物细胞分泌合成酚类化合物等信号分子^[4],激活了 Ti 质粒上 V_{ir} 区基因的表达^[2],从而使得 T-DNA 的 25bp (碱基对)末端重复序列上产生缺口 (Nick),复制合成单链线性的 T-DNA 分子^[5]。这种 T-DNA 分子被认为是转移至植物细胞中的中间体,其转移过程很可能类似于细菌的接合转移机制^[5]。被 T-DNA 转化的植物细胞由于 T-DNA 上基因的作用而具有瘤性生长的特性,很难分化成完整植株^[6]。有人对 Ti 质粒上 T-DNA 区进行了改建修饰,去除其致瘤基因^[6]。这种改建的 Ti 质粒很适于用作植物基因工程的载体,而且不影响受体植物转化细胞的再生。

早期的工作表明,根癌农杆菌的宿主范围很广,但仅限于裸子植物和双子叶植物^[7]。最近的一些实验证明,农杆菌也能感染很多单子叶植物,如百合科的吊蓝、斑心吊蓝和石刁柏等,石蒜科的水仙和朱顶蓝,鸢尾科的唐菖蒲属植物,薯蓣科的山药,甚至也能感染禾本科的玉米^[8-11]。这些事实说明, Ti 质粒有可能成为双子叶植物和某些单子叶植物基因工程的通用载体。

运用以 Ti 质粒为载体的基因转移系统,除了可将有价值的外源基因,如贮存蛋白基因和各种抗逆基因等,引入受体植物并改良其性状外^[12-15],还可用于研究一些基础理论方面的问题,如研究不同来源的基因如细菌、真菌、动物及其他植物的基因及其调控序列在受体植物中的功能及作用。

玉米醇溶蛋白是玉米种子的主要贮存蛋白,它是由多基因家族编码的^[16],关于其表达的调控机制还远没有搞清楚。玉米醇溶蛋白基因没有内含子,其表达过程中没有 mRNA 的剪接,很适于用来研究其调控序列在异源杂合系统中的功能^[16,17]。本实验的主要目的,是想研究玉米醇溶蛋白基因 Z₄ 在双子叶植物龙葵中的表达情况,以弄清单子叶植物基因的启动子能否在双子叶植物中发挥功能。

一、材料和方法

1. 细菌菌种及其培养

本实验所用农杆菌菌种由美国 Minnesota 大学 Rubenstein 教授惠赠。菌种有两个: A208 (pTiT₃₇) 和 A208 (pTiT₃₇ engineered by Z₄) (简称 A208 (pTiT₃₇Z₄))。后一个菌种在其 Ti 质粒的 T-DNA 区带有编码 23kD 玉米醇溶蛋白的 Z₄ 基因,它的构建及内切酶图谱参见 Matzke 等^[16]。菌种的培养采用 YEP 培养基^[18],培养 A208(pTiT₃₇Z₄)时附加 100 μg/ml 卡那霉素和 50 μg/ml 庆大霉素。

2. 植物材料及其转化与培养方法

受体材料为药用植物龙葵 (*Solanum nigrum*),属茄科。播种于 25°—35°C 的温室中,待苗长出真叶后,用注射器吸取菌液,注射龙葵的下胚轴或茎部。将形成的冠瘿瘤或畸胎瘤切成小块,经 0.1% HgCl₂ 消毒后,接种于不含激素的 MS 培养基 (MSO) 或含 1mg/l 激动素的 MS 培养基 (MSKT) 上,培养基中还附加 1mg/ml 的羧苄青霉素 (Cb) 以杀死残余的农杆菌。形成的愈伤组织置于不同激动素/生长素浓度配比的培养基中诱导分化,分化的芽在 MSO, $\frac{1}{2}$ MSO 或补加低浓度生长素的 MS 培养基上诱导生根。

3. 胭脂碱的定性测定方法

采用改进的微量纸电泳方法^[19]。

4. 植物 DNA 的分离及分子杂交

植物 DNA 的分离采用微量制备法^[20]。探针 DNA 从质粒 pg^{Z₁₉AB1} 制备。质粒 pg^{Z₁₉AB1} 由美国 Purdue 大学 Goldsbrough 博士惠赠,它是将玉米基因组的一个 3kb (千碱基对) 的 EcoRI/HindIII 片段克隆至 p^{BR322} 而构成^[17]。此质粒的一个 1.2kb 的 XbaI 片段被用来作为探针,其上含有 19kD 玉米醇溶蛋白基因的全序列。此基因跟转化实验中所用的 Z₄ 基因同属于一个基因亚族 (A30 subfamily),二者十分相似,有很好的同源性^[16]。这个基因亚族的成员在其 5'-不翻译区的序列有 90—100% 同源^[16,17]。

探针 DNA 采用低熔点琼脂糖回收法制备^[21]。缺口翻译法^[21]被用来标记探针,缺口翻译反应的试剂盒和 ³²P-α-dCTP (3000Ci/mM) 均系 Amersham 公司的产品,反应条件按照厂家的说明书进行,标记后的探针 DNA 用 Sephadex G50 分离回收^[21]。

分子杂交: 约 10 μg 植物 DNA 用 EcoRI 消化,在反应液中补加适量的 RNase 以去除

RNA^[20]。酶解物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 变性处理后吸印转移至硝酸纤维素滤膜上。分子杂交按照 Maniatis 等的方法进行^[21]。

5. 植物总 RNA 的分离及点杂交

总 RNA 的提取 按照 Grierson 等的方法进行^[22]。

RNA 点杂交滤膜的制备: 取 10 μ l RNA 样品 (约 20 μ g RNA), 在经预处理^[23]的硝酸纤维素滤膜上打点之前, 先经下列处理: (1) 不变性, (2) 碱变性^[23]或者 (3) 热变性^[23]。每张滤膜上都有经碱变性处理的质粒 pg^{Z₄AB₄} (1 μ g) 点作为阳性对照。为防止有少量核 DNA 的污染, RNA 样品在变性打点之前, 先用不含 RNase 的 DNaseI 消化, 以去除可能残余的 DNA。

RNA 点杂交 杂交所用的探针跟 DNA 分子杂交的相同。杂交条件参照 Thomas 的方法^[23]。

6. 转化体中玉米醇溶蛋白的检测

转化体中醇溶蛋白的提取仿效 Esen 的方法^[24]。蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳比较分析完全按照 Maniatis 等的方法进行^[21]。

免疫学方法检测 抗原 (W₆₄A zein) 和抗体由 Rubenstein 教授赠送, 抗体系免疫兔子获得^[26]。琼脂双向扩散法和微量免疫电泳法被用于检测表达蛋白质。琼脂板用 0.05% 氨基黑 10B 染色, 5% 冰醋酸脱色后观察实验结果。

二、结果和分析

1. 龙葵转化体的获得

采用注射的方法, 用供试菌种 A208(pTiT₃₇) 和 A208(pTiT₃₇Z₄) 去感染龙葵幼苗, 接种部位 7—10d 内即出现可见的突起, 20—30d 内瘤的直径可达 1—2cm, 致瘤率几乎为 100%, 这些瘤里都能测出大量的胭脂碱。

A208(pTiT₃₇) 使龙葵产生畸胎瘤, 其上分化出大量芽和小植株 (图版 I, 1), 将它们的叶片经消毒在 MSOCb 上培养, 能直接分化出小苗, 或者产生愈伤组织。愈伤组织经继代培养可以分化出大量绿色的芽点。若将芽点下面的愈伤组织切成小块培养, 这些芽点都可长成形态异常的植株。而菌种 A208(pTiT₃₇Z₄) 只能使龙葵形成小的冠瘿瘤, 瘤为绿色, 但不能分化 (图版 I, 2)。

龙葵是农杆菌的敏感宿主, 很多菌种能使它产生畸胎瘤^[25]。因此, A208(pTiT₃₇Z₄) 只能使之形成冠瘿瘤很可能与菌种的特性有关, 因为玉米醇溶蛋白基因的插入破坏了 Ti 质粒 T-DNA 上与细胞分裂素合成有关的基因^[26]。在其它植物上进行了类似的致瘤试验, 结果表明: A208(pTiT₃₇Z₄) 也只能使曼陀罗和番茄产生不分化的冠瘿瘤, 但在落地生根上的感染部位除出现小瘤体外, 还能产生大量的根 (图版 I, 3), 这些根经检测含有大量的胭脂碱。此结果说明, 瘤的分化与否除与菌种和植物材料的年龄及生理状态有关外^[25], 还与植物种类和基因型有关。

将 A208(pTiT₃₇Z₄) 感染所产生的瘤经消毒后切成小块, 放在 MSOCb 上培养, 有两块瘤组织在两周内形成了可见的愈伤组织, 但愈伤组织生长缓慢, 故将它们转移至 MSKTCb 上继代培养。这些愈伤组织在 MSKTCb 上生长良好, 其中有一块在 MSKTCb 上立即分化形成芽, 这些芽可长成形态正常的植株 (图版 I, 4, 5)。

运用叶圆片转化法也得到了 A208(pTiT₃₇) 的转化植株和 A208(pTiT₃₇Z₄) 的转化愈伤

组织。此方法比注射感染获得转化体的方法优越,它需要的时间短得多,一般只需要 2—4 星期即可。

2. 龙葵转化体的特性

(1) 激素自主 A208(pTiT₃₇Z₄) 和 A208(pTiT₃₇) 的转化体,无论是愈伤组织还是芽丛,都能在无激素的 MSO 培养基上生长,这是 T-DNA 转化后赋予植物细胞的特性。但 A208(pTiT₃₇Z₄) 转化体在 MSKT 比在 MSO 上生长旺盛,这是 Z₄ 基因的插入破坏了 T-DNA 上与细胞分裂素合成有关的基因所致。我们的结果与前人的工作^[16]是一致的。

(2) 不能生根 尽管试用了多种生根培养基,仍不能使 A208(pTiT₃₇) 和 A208(pTiT₃₇Z₄) 的转化苗生根。若用其它菌种转化,有些龙葵转化体被证明是可以生根并长成完整植株的^[25]。因此,A208(pTiT₃₇) 和 A208(pTiT₃₇Z₄) 转化体不能长根可能与其内源激素紊乱有关。

(3) 合成胭脂碱 纸电泳结果说明,A208(pTiT₃₇) 和 A208(pTiT₃₇Z₄) 转化愈伤组织和转化植株中,都含有胭脂碱(图版 1,7)。因此,T-DNA 确实进入了植物细胞。

(4) 卡那霉素(km)敏感 普通龙葵对卡那霉素十分敏感,培养基中补加 50 μg/ml km 即致死。用 A208(pTiT₃₇Z₄) 菌种感染龙葵,随同 Z₄ 基因和 T-DNA 一起进入植物细胞的,还有一个大肠杆菌的 km 抗性基因。若将其转化体放在含 50 μg/ml km 的 MSKT 上培养,转化体停止生长,一星期即开始变黄,然后变白,直至死亡(图版 1,6)。这间接说明,T-DNA 转化后整合进了龙葵核基因组;若是转化了其叶绿体或线粒体,转化植株应该对 km 产生抗性,因为 km 抗性基因的启动子是原核性质的,它可以在叶绿体或线粒体中表达^[16]。

(5) A208(pTiT₃₇) 和 A208(pTiT₃₇Z₄) 转化体的形态比较 二者的转化愈伤组织均能分化大量芽点,而且长成的植株均不能诱导生根。从其植株的形态上看,A208(pTiT₃₇) 转化体的叶和茎都不正常,呈畸型生长,而 A208(pTiT₃₇Z₄) 转化植株跟正常的植株相似。用含有类似于 A208(pTiT₃₇Z₄) 的质粒构造的农杆菌去感染烟草,能够再生完全正常且能生根的转化植株^[18],这与我们的结果是部分吻合的。

3. A208(pTiT₃₇Z₄) 转化体的生化鉴定

(1) DNA 分子杂交结果 DNA 分子杂交证明:玉米醇溶蛋白基因确实进入了植物细胞,并整合进了转化龙葵的核基因组(图版 1,8),而且正如所预期的那样^[16],它是存在于一个很大的 EcoRI 片段(约 23kb)里。由于转化体能合成胭脂碱,呈瘤性生长,且继代近 20 次仍能检测出大量的胭脂碱,因此,玉米醇溶蛋白基因是随同 T-DNA 一起进入植物细胞,而且它和 T-DNA 在龙葵基因组中的整合是稳定的,能无性传递。

在实验中,还发现在转化体和非转化体的 DNA 中,都存在另一条杂交阳性带(约 9kb),这说明龙葵的核基因组中存在有与玉米醇溶蛋白基因 Z19 同源的序列。在向日葵中,Matzke 等^[16]发现其基因组中有与 T-DNA 同源的序列,而且还在向日葵组织中,检测出了与玉米醇溶蛋白具有同源性的蛋白质。从照片上可以看出,杂交带较宽,这可能是由于提取的 DNA 有部分降解。

(2) RNA 点杂交结果 由于点杂交技术快速灵敏,操作简便,因此我们在实验中采用了此方法。RNA 点杂交结果表明,在 A208(pTiT₃₇Z₄) 的转化苗和转化愈伤组织中,都存在有与玉米醇溶蛋白基因 Z19 同源的 RNA(图版 1,9)。这种 RNA 应为 mRNA,它应是从

T-DNA 上的 Z₄ 基因转录下来的。对 pTiT₃₇Z₄ 的基因图进行分析可以看出, Z₄ 基因的转录不可能由通读产生,即不是在别的启动子带动下转录。因此,杂交检测出的 mRNA 系由玉米醇溶蛋白基因 Z₄ 在其自身的启动子控制下转录产生的。由于我们没有对其 mRNA 的大小进行分析,尚不能断定 Z₄ 基因是不是正确起始并终止转录的。

Matzke 等用同一菌种感染向日葵,转化愈伤组织中 Z₄ 基因的转录被证明是由其自身的启动子启动的,跟在玉米内一样,而且转录起始位点也相同^[16]。用其它玉米醇溶蛋白基因转化向日葵也得到了类似结果^[17]。他们的工作只是证明,玉米醇溶蛋白基因的启动子在双子叶植物的杂合系统中,在转化瘤^[17]或是转化愈伤组织^[16]中能正常地发挥功能。我们的实验首次证明,玉米醇溶蛋白基因的启动子不但能在双子叶植物的转化愈伤组织中起作用,而且能在分化的转化植株中发挥功能。

RNA 点杂交时,没能在未转化的对照龙葵中检测出有与 Z19 基因同源的 RNA 存在。这说明, DNA 分子杂交中检测出的龙葵基因组中与 Z19 基因同源的 DNA 序列没有表达转录成 mRNA。

实验中还比较了不同的 RNA 变性方法对点杂交效果的影响。RNA 在硝酸纤维素滤膜上打点之前分三种处理:不变性、碱变性和热变性。其中以碱变性的效果最好。其它两种方法失败的原因可能是:不变性的 RNA 由于呈二级结构,不能在滤膜上很好吸附,在杂交预洗过程中即被冲洗下去;而由于所用 RNA 样品太浓,可能含有少量蛋白及多糖,经热变性处理以后,样品很粘,呈胶状,因此 RNA 也很难在滤膜上吸附。

(3) 转化体中 Z₄ 基因表达蛋白的检测 运用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对从 A 208 (pTiT₃₇Z₄) 转化体及其对照植株中提取的醇溶蛋白的比较分析表明:它们的醇溶性蛋白质组分基本上相同,看不出差别。以纯化的玉米醇溶蛋白为标准对照,也没能在 A208(pTiT₃₇Z₄) 转化体中发现有与标准蛋白具有相同迁移距离的蛋白质。这表明,在转化体中没有从玉米醇溶蛋白基因表达的蛋白质。或者是 mRNA 的翻译效率低,我们的检测方法不够灵敏。也有可能玉米醇溶蛋白在龙葵中被降解成了小的肽链,就象菜豆蛋白在转化的向日葵组织中一样^[26]。

因此,我们采用了更灵敏的免疫学检测方法。但运用这些技术得到的都为阴性结果,没能检测出转化体中有玉米醇溶蛋白的存在。

从以上的结果可以看出,虽然 Z₄ 基因在龙葵转化植株和愈伤组织里能够转录成 mRNA,但其 mRNA 由于未知的原因却不能翻译成蛋白质。此结果说明,玉米醇溶蛋白基因在双子叶植物的杂合系统中,无论在转化瘤^[17]或转化愈伤组织^[16],还是在转化植株中,表现都是一样的,它能转录,但其 mRNA 不能翻译成蛋白质。

三、讨 论

由于以 Ti 质粒为载体的植物基因工程技术和其他基因转移技术的进展,现已能比较容易地将外源基因导入植物细胞,因此,研究人员可运用这些技术在转化植物中研究一些基础理论问题,如有关各种来源的基因的启动子、多腺苷酸化和内含子剪接信号等在植物细胞中的识别及功能。对这些问题的研究将有助于把各种来源的有价值的基因导入植物以改良其品质。

早期的工作表明,直接将原核生物如细菌的基因导入植物,这些基因不能表达,其原因是

真核生物和原核生物的基因表达机制如转录调节信号等存在着很大差别。如果给这些抗菌素抗性基因换上能在植物中表达的启动子,它们就能正常地在植物细胞中发挥功能^[6]

真核生物的基因,在其启动子、内含子的剪接信号和前 mRNA 的多腺苷酸化信号的结构方面,存在有很多相似性。但是,如直接将一些真核生物如酵母^[18]和动物的基因^[27]不加改造引入植物细胞,它们都不能表达;即使能表达,其转录也是不正常的^[27]。将人的生长素基因导入植物细胞的结果证明,植物对人的基因的内含子剪接信号和多腺苷酸化信号的利用也是异常和低效的^[27,28]。从以上这些结果可以看出,尽管动植物基因在转录调控信号的结构方面存在着一些相似性,但也存在着一定差别,其调节机制是否一致尚很难断定。

被子植物分双子叶植物纲和单子叶植物纲。在双子叶植物中,运用以 Ti 质粒为载体的基因转移技术证明,至少部分双子叶植物的启动子是通用的,其内含子的剪接机制也是相同的。例如,一些种子贮存蛋白基因如菜豆种蛋白基因^[13]、 β -伴大豆球蛋白基因^[12]等在转移至其他双子叶植物中后,能特异地在种子中表达。另外,光诱导的豌豆的 RuBPCase 小亚基基因和其他一些受特导调节的基因,在转移至其他双子叶受体植物中后,其表达调节方式保持不变^[29]。那么,在双子叶植物和单子叶植物之间,基因表达的调控机制是否存在着差别呢?

由于没有合适的基因载体系统,目前尚缺乏双子叶植物基因在单子叶植物中表达情况的工作,但有不少人对单子叶植物基因在双子叶植物中的行为进行了研究。Lamppa 等证明,小麦的 Cab 基因能在转化烟草植株中正确起始并转录,而且表现出光调节和组织特异性表达特性(参见文献[27])。Rochester 等将玉米的热击蛋白 hsp 70 基因导入矮牵牛,它不仅能在转化植株中正常转录表达,呈热诱导特性,而且还能剪接其内含子^[30]。然而与上面的结果相反,Keith 和 Chua 最近的实验却表明,单子叶植物和双子叶植物基因在内含子的剪接效率,以及转录物的多腺苷酸化方面可能存在着差别^[27]。这反映了单子叶植物和双子叶植物在 RNA 加工信号方面甚至启动子上有可能存在一定的差别。运用玉米醇溶蛋白基因也进行了一系列这方面的实验。Matzke 等证明,玉米的 23kd 醇溶蛋白基因能够在转化的向日葵组织中精确起始并转录^[16]。Goldsbrough 等利用另一与 23kd 玉米醇溶蛋白相似的 19kd 蛋白基因和一个 15kd 玉米醇溶蛋白基因在向日葵上亦得到了类似结果,并且证明它们是正确终止转录的^[27]。但是在他们的实验中,玉米醇溶蛋白基因的 mRNA 都没有翻译成蛋白质。

我们选用龙葵作受体材料,对玉米醇溶蛋白基因的表达进行了研究。龙葵和向日葵属不同的科,我们的目的是想观察玉米醇溶蛋白基因在龙葵中是否能表达,并弄清此基因在双子叶植物的不同科属间,其表达是否有差异。结果证明,玉米醇溶蛋白基因不但能在转化瘤和愈伤组织中,而且能在转化植株中表达转录成 mRNA。这说明,玉米醇溶蛋白基因的启动子能够在双子叶植物中发挥功能,并且能在不同的科(菊科和茄科)中起作用。

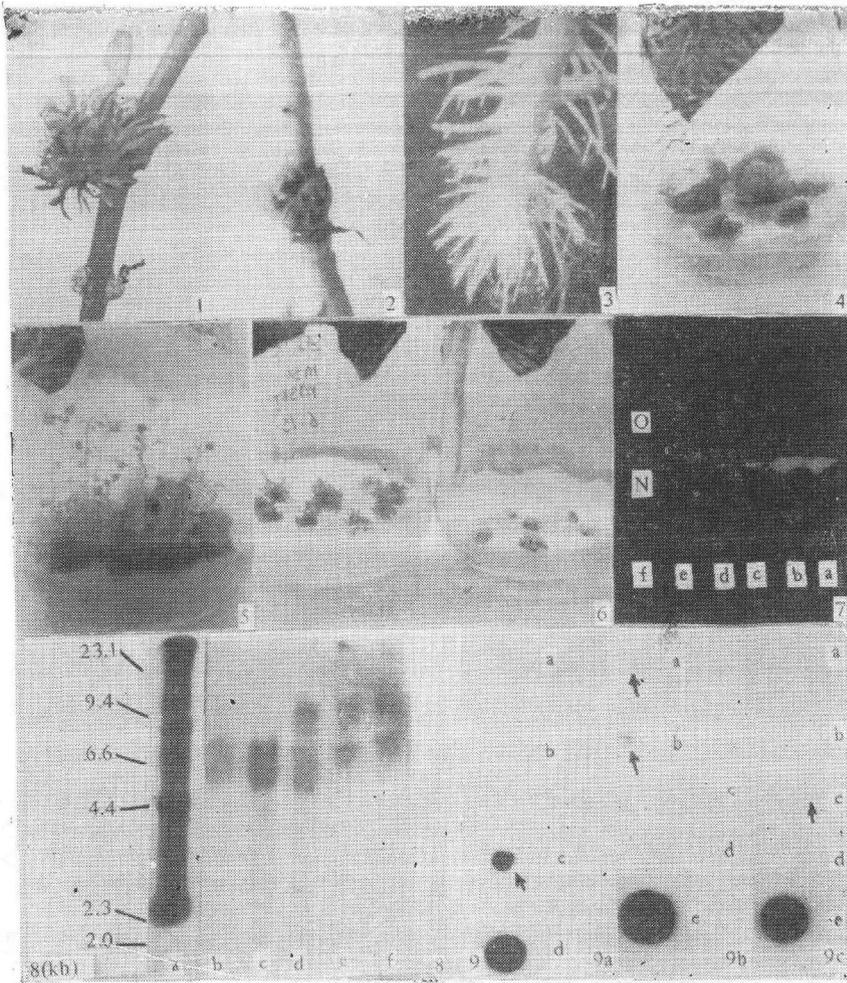
为何受发育调节的玉米醇溶蛋白基因能在其自身的启动子控制下,在分化的龙葵苗和未分化的向日葵瘤组织中转录成 mRNA 呢?其原因尚不清楚。有可能是双子叶植物中缺乏相应的调节分子,或者是受发育调节的玉米醇溶蛋白基因在所有组织中都有低水平的表达。例如在 Murai 等的实验中,受发育调节的菜豆种蛋白基因,能在另一双子叶植物向日葵的转化组织中低水平地正常转录并翻译成蛋白质,而不受发育调节^[26]。在我们的实验中,虽然能从转化龙葵中检测出玉米醇溶蛋白基因特异的 mRNA,却没有发现其翻译产物。在 Matzke 等的实验中,也未能在转化组织中检测到表达蛋白,但从转化组织中分离的 mRNA 却能在体外

麦胚系统中翻译成预期分子量大小的蛋白质^[16]。这说明,转化组织中的 mRNA 是有活性的,它在转化组织中不翻译而在体外麦胚系统中翻译的原因,可能是玉米和小麦同属单子叶植物,小麦胚中具有与玉米相似的发育调节分子,正象双子叶植物中菜豆种蛋白基因能在转化向日葵组织中低水平表达一样^[26]。玉米醇溶蛋白是玉米的贮存蛋白,它主要在胚乳中表达,受发育调节。因此,它的基因很可能只能在转化植株的种子中表达。龙葵是一种再生能力强的植物,我们所用的载体在烟草中是允许转化组织再生的^[18],由于未知的原因,转化的龙葵愈伤组织只能再生芽,而芽不能分化根。因为芽发育而来的植株较小,嫁接没有成功,因此我们无法研究玉米醇溶蛋白基因在龙葵种子中的表达情况。为了研究玉米醇溶蛋白基因在双子叶植物中的表达是否也受发育调节控制,我们将 pg^{Z19AR1} 中的 Z19 基因导入了农杆菌 C58 (pGV3850) 的 Ti 质粒 pGV3850 中,构建了表达载体 pGV3850::Z19km。这个载体去除了 T-DNA 上的致瘤基因,允许转化组织再生完整植株,而且其上还含有一个能在植物细胞中表达以作为选择标记的卡那霉素抗性基因。目前用它转化植物的工作正在进行中。

实验过程中得到本所负压实验室朱立煌、胡乃璧、彭德兴、翟文学、朱荣焕、李小兵、李诺和本实验室的牛德水、李金国、陈永强、李安生、张敬等同志的指导和帮助,作者在此一并表示衷心的感谢。

参 考 文 献

- [1] Chilton, M.-D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**(1980), 4060—4064.
- [2] Stachel, S. E. & Zambryski, P. C., *Cell*, **46**(1986), 325—333.
- [3] Douglas, C. J. et al., *J. Bacteriol.*, **161**(1985), 850—860.
- [4] Stachel, S. E. et al., *Nature*, **318**(1985), 624—629.
- [5] Wang, K. et al., *Science*, **235**(1987), 587—591.
- [6] Caplan, A. et al., *ibid.*, **222**(1983), 815—821.
- [7] DeCleene, M. & DeLey, J., *Bot. Rev.*, **42**(1976), 389—466.
- [8] 冯新华等, 科学通报, **32**(1987), 513—515.
- [9] Graves, A. C. F. & Goldman, S. L., *J. Bacteriol.*, **169**(1987), 1745—1746.
- [10] Feng, X. H. et al., *Genetic Manipulation in Crops Newsletter*, **2**(1986), 52—59.
- [11] Grimsley, N. et al., *Nature*, **325**(1987), 177—179.
- [12] Beachy, R. N. et al., *EMBO J.*, **4**(1985), 3047—3053.
- [13] Sengupta-Gopalan, C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**(1985), 3320—3324.
- [14] Comai, L. et al., *Nature*, **317**(1985), 741—744.
- [15] Shah, D. M. et al., *Science*, **233**(1986), 478—481.
- [16] Matzke, M. A. et al., *EMBO J.*, **3**(1984), 1525—1531.
- [17] Goldsbrough, P. B. et al., *Mol. Gen. Genet.*, **202**(1986), 374—381.
- [18] Barton, K. et al., *Cell*, **32**(1983), 1033—1043.
- [19] 蒋兴邨等, 中国科学 B 辑, 1985, 11: 1004—1008.
- [20] Dellaporta, S. L. et al., *Plant Mol. Biol. Reporter*, **1**(1983), 19—21.
- [21] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [22] Grierson, D. et al., *Planta*, **163**(1985), 263—273.
- [23] Thomas, P. S., *Meth. Enzym.*, **100**(1983), 255—266.
- [24] Esen, A., *Plant Physiol.*, **80**(1986), 623—627.
- [25] 蒋兴邨等, 遗传学报, **10**(1983), 283—290.
- [26] Murai, N. et al., *Science*, **222**(1983), 476—481.
- [27] Gelvin, S. B., *Plant Mol. Biol.*, **8**(1987), 355—359.
- [28] Hunt, A. G. et al., *ibid.*, **8**(1987), 23—25.
- [29] Nagy, F. et al., *EMBO J.*, **4**(1985), 3063—3068.
- [30] Rochester, D. E. et al., *ibid.*, **5**(1986), 451—458.



1. $A_{208}(pTiT_{37})$ 诱导的龙葵畸胎瘤； 2. $A_{208}(pTiT_{37}Z_4)$ 诱导的龙葵冠瘿瘤； 3. $A_{208}(pTiT_{37}Z_4)$ 在落地生根上诱发的根； 4. $A_{208}(pTiT_{37}Z_4)$ 转化的龙葵愈伤组织； 5. $A_{208}(pTiT_{37}Z_4)$ 转化的龙葵芽及植株； 6. $A_{208}(pTiT_{37}Z_4)$ 转化体的卡那霉素抗性检测：左为 MSKT 培养基，右为 MSKTKm(100 μ g/m 2)培养基。 7. 龙葵转化体中胭脂碱的测定：a, b, c 分别为 $A_{208}(pTiT_{37}Z_4)$ 的转化苗、致密型转化愈伤组织和疏松型转化愈伤组织；d. $A_{208}(pTiT_{37})$ 转化苗；e. 正常龙葵叶片(对照)；f. 标准对照：O 为鱒鱼碱，N 为胭脂碱； 8. DNA 分子杂交结果：a. pg^{Z19AB1} 质粒 DNA；b. 正常龙葵叶片；c. 龙葵 $A_{208}(pTiT_{37})$ 转化苗；d. $A_{208}(pTiT_{37}Z_4)$ 疏松型转化愈伤组织；e. $A_{208}(pTiT_{37}Z_4)$ 致密型转化愈伤组织；f. $A_{208}(pTiT_{37}Z_4)$ 转化苗； 9. RNA 点杂交结果：9a. 所有样品均用碱变性。 a. 正常龙葵 RNA；b. $A_{208}(pTiT_{37})$ 转化苗 RNA；c. 龙葵 $A_{208}(pTiT_{37}Z_4)$ 转化苗 RNA；d. pg^{Z19AB1} 质粒 DNA(1 μ g)。 9b. 所用样品均用碱变性。 a. 疏松型 $A_{208}(pTiT_{37}Z_4)$ 转化愈伤组织 RNA；b. 致密型 $A_{208}(pTiT_{37}Z_4)$ 转化愈伤组织 RNA；c. 正常龙葵 RNA；d. $A_{208}(pTiT_{37})$ 转化体 RNA；E. pg^{Z19AB1} DNA。 9c. 所有样品均用热变性。 a. 正常龙葵 RNA；b. $A_{208}(pTiT_{37})$ 转化龙葵 RNA；c. $A_{208}(pTiT_{37}Z_4)$ 转化愈伤组织 RNA；d. $A_{208}(pTiT_{37}Z_4)$ 转化龙葵苗的 RNA；e. pg^{Z19AB1} DNA。

(图中箭头所示为杂交阳性点)