

转基因作物

OECD共识文件

(卷二)

经济合作与发展组织 (OECD)
农业部科技发展中心 编译



转基因作物 OECD 共识文件

(卷二)

经济合作与发展组织(OECD)

农业部科技发展中心 编译

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

转基因作物 OECD 共识文件 . 2 / 经济合作与发展组织 (OECD), 农业部科技发展中心编译. —北京: 中国农业出版社, 2011. 12

ISBN 978-7-109-16254-9

I. ①转… II. ①经…②农… III. ①基因转移—作物—安全性—文件 IV. ①S336

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 231557 号

© 2011 Development Centre for Science and Technology, Ministry of Agriculture for this Chinese edition. Published by arrangement with the OECD, Paris. The quality of the Chinese translation and its coherence with the original text is the responsibility of Development Centre for Science and Technology, Ministry of Agriculture.

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100125)

责任编辑 闫保荣

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行
2015 年 2 月第 1 版 2015 年 2 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 17.25

字数: 400 千字

定价: 45.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

《转基因作物 OECD 共识文件（卷二）》

编译委员会

主任 杨雄年
副主任 叶纪明 周云龙
委员 李 宁 段留生 翟 勇 宋贵文 汪其怀
付仲文 刘培磊 刘 刚

编 译 组

主 编 李 宁 刘培磊
副主编 徐琳杰 陈 琰 刘 刚
编 译 （按姓名笔画排序）
王赞文 卢孟柱 付仲文 朱永红
任海丽 刘 刚 刘培磊 孙卓婧
李 宁 杨汉春 杨佑明 张英俊
陈 琰 武国干 范在丰 林文力
赵永国 柳 俊 姜 斌 徐琳杰
黄昆仑 焦 悦 解超杰 熊 鹏

列出了《重组 DNA 安全性考虑》和《生物技术安全性考虑》两个技术指南，帮助读者用最初的科学考虑去思考转基因生物的安全性。由于知识的更新，共识文件可能会在将来更新，鼓励用户跟踪最新版本，共识文件英文版可在 OECD 网页 (<http://www.oecd.org/biotrack>) 免费获取。

最后，衷心感谢中国农业大学和河北农业大学的老师和研究生对本书编译给予的大力支持和帮助。

编者

2015 年 1 月

第一章



转基因植物分子特征共识文件*

第一节 背景

1. 分子特征和安全评价

分子特征是建立在科学基础上的一种综合学科研究方法，该方法可用于转基因植物的食品、饲料和环境安全评价。分子特征能使人们理解转基因植物中导入并表达的遗传物质。本文件旨在解释将分子特征应用于转基因植物食品、饲料和环境安全评价的科学基础。

本文件旨在使安全评价人员了解如何应用分子特征数据和信息，这些数据和信息是安全评价整体的组成部分。本文件没有讨论主管部门进行安全评价时应当考虑的具体数据和信息，因为数据和信息的应用取决于安全评价的类型和产品的特征。本文件没有详尽列出分子特征鉴定的分析技术。就所列举的分析技术事例而言，只是为了说明分子特征的某一方面，并不意味着推荐使用该技术。

根据生物安全卡塔赫纳协定书（Cartagena Protocol on Biosafety）（SCBD，2000）和食品法典委员会（Codex Alimentarius Commission）（Codex，2003a）的定义，现代生物技术是指：“应用 a）体外核酸技术，包括重组 DNA 技术以及直接将核酸注射到细胞或细胞器中；或 b）超越分类学上的科进行的细胞融合技术，该技术克服了自然的生殖障碍或重组屏障，并且在常规育种和选择中不使用该技术”。

尽管所有技术（包括常规育种）培育的植物品种都存在风险，本文件的范围只限于应用重组 DNA 技术以及将核酸直接注射到细胞或细胞器中产生的植物，即指重组 DNA 植物^①。确切地说，本文件将检测转化程序转化载体遗传物质向受体的转移以及重组 DNA 植物中遗传物质的鉴定、遗传和表达。

本文件主要针对开放条件下拟进行商业化应用的重组 DNA 植物，该植物需要进行安全评价。

本文中需要进行法规评估的重组 DNA 植物通常已进行了转化后的筛选和选择。重组 DNA 植物的开发从产生大量转化体开始（Padgett et al，1995；Zhou et al，2003；Heck

* Originally published by the OECD in English under the title: “Consensus Document on Molecular Characterisation of Plants Derived from Modern Biotechnology” © 2010 OECD. All rights reserved.

① 其他称谓 [如遗传改良植物、基因工程植物、转基因植物和转化植物] 经常与重组 DNA 植物（recombinant-DNA plant）交换使用。本文中，重组 DNA 植物特指第 4 段的定义。

et al., 2005)。最初的转化体经过几个繁殖周期鉴定，以得到能稳定表达和遗传预期表型^①、并保留理想农艺性状（如生长性状、育性和产量）的植株。这一筛选和选择过程有助于研发者鉴定转化过程对植物的影响。随着繁殖周期的推进，开发者将淘汰具有非预期性状和不理想性状的植株。这一过程最终选择出开放条件下拟进行商业化应用的重组 DNA 植株，安全评价就是针对这些重组 DNA 植株。

2. 各国和国际经验

在生物技术产品管理方面具有长久历史的很多国家已经制定了重组 DNA 植物及其产品的评估标准和程序。各国的评估技术和经验已经为很多政府间组织 [如经济合作组织 (OECD)、世界卫生组织 (WHO)、粮食和农业组织 (FAO)] 共享。通过国际协商确定的安全评价的科学原则和科学方法目前正被世界各地的行政机构应用。本文件补充了国家机构和国际组织在本领域内建立的指南。

就环境安全而言，已经建立了几个指南文件，着重于环境安全评价的方法，如 1993 年 OECD 发布的《生物技术的安全性考虑：农作物的环境释放试验》(Safety Considerations for Biotechnology: Scale-up of Crop Plants)。此外，通过成员国共识形成的很多其他 OECD 文件为重组 DNA 植物的环境安全评价奠定了基础。

就食品安全而言，在 FAO/WHO 食品标准项目的资助下，食品法典委员会生物技术食品政府间特别工作组 (Codex Ad Hoc Intergovernmental Task Force on Foods Derived from Biotechnology) 制定了几个文件，包括《现代生物技术食品的风险分析原则》(Codex, 2003a)，《重组 DNA 植物食品的食品安全评价指南》(Codex, 2003b)。就饲料安全性而言，OECD 发布了《来源于转基因植物的动物饲料安全评价考虑》(OECD, 2003)。此外，通过成员国共识形成的很多其他 OECD 文件为重组 DNA 植物食品和饲料安全评价奠定了基础。

3. 分子特征鉴定的目的

分子特征为转基因植物的安全评价提供信息。分子特征在分子水平提供的信息包括植物基因组^②内插入的 DNA、插入位点和表达物质 [核糖核酸 (RNA) 和蛋白质]，以及转化所产生的预期效应和可能的非预期效应。基因型^③的分子特征信息有助于评价转化对重组 DNA 植物食品、饲料和环境安全的潜在影响，并可协助预测表型，表型将最终决定重组 DNA 植物是否存在相关的安全性问题。

分子特征有很多特定的考虑事项，这通常是管理机构考虑的内容，也是建立国际共识中关注的内容，包括：

- 转化方法

转化方法的描述，同时对可能插入到植物基因组中的 DNA 序列进行详细的描述；

- 插入 DNA、插入位点和表达物质

① 表型是指某一生物中可以观察到的特征或性状，由生物基因型和环境间的相互作用决定，包括但不限于物理、形态、生理和生化性质。

② 基因组包括细胞核和细胞器中的遗传物质。

③ 基因型是指某一生物的遗传组成。

插入 DNA 的描述，包括由于转化而可能引起的遗传重组、缺失或截短，以及在不同发育阶段插入 DNA 在植物不同组织不同时期的表达（蛋白水平和/或 RNA 水平）。

- 遗传特征和遗传稳定性

不仅包括插入 DNA 的遗传特征，而且包含经过多个繁殖周期后插入 DNA 的稳定性（如翻译和转录）。

插入 DNA 的分子特征可能和转基因植物安全性的非预期效应预测相关，但通常不是测定该非预期效应的主要方法。安全评价的其他内容包括：新物质（如蛋白质，代谢物）的致敏性和毒性评价，营养素和抗营养成分含量的变化，内源毒素和过敏源含量的变化以及植物适合度的变化等，这些都与转基因植物安全性的非预期效应测定相关。

重组 DNA 植物的食品、饲料和环境安全评价中的分子特征鉴定建立在针对特定序列和表达产物的检测方法基础上。新的图谱技术可以提供许多成分在特定生化/分子水平（如转录组学——RNA；蛋白质组学——蛋白质）的信息。由于许多新的图谱技术还处在发展阶段，因而管理机构在重组 DNA 植物安全评价中尚未应用该技术。如果这类技术得到充分的发展和验证，它们有望在将来的安全评价中作为补充手段。图谱技术在安全评价中的应用前景及可能带来的挑战已在多个综述中进行了讨论（如 Kuiper et al, 2003; Chassy et al, 2004），本文件没有深入阐述。

任何植物育种都能产生非预期效应。对重组 DNA 植物来说，非预期效应可能是由于基因组序列遭到破坏或新性状导致的多重影响引起的。基因插入或转化导致的基因组缺失和重排（包括插入基因的缺失和重排）都能破坏基因组序列。非预期效应产生的变异株要在转化后的筛选和选择中去除。尽管重组 DNA 植物和常规育种植物（包括应用突变技术产生的植物）都需进行农艺和形态性状的评价和选择，但大多数常规育种植物没有经过和重组 DNA 植物相同安全评价。

总之，分子特征是安全评价的一个重要内容，不过它只是全部安全评价方法的一个组成部分。分子特征是安全评价其他内容的补充，如重组 DNA 植物与其适合对照物在环境、化学、营养、致敏性和毒理学数据的比较。安全评价的侧重点是转化是否会无意间增加受体植物的潜在毒性或致敏性，是否改变其营养品质，是否对环境产生负面影响，以及是否产生了其他不想要的性状。全面的安全性信息将帮助管理机构确定重组 DNA 植物是否满足适合的安全标准。

第二节 转化方法

1. 引言

转化是将目的 DNA 序列插入到植物基因组的过程。现在已有不同的转化方法，每一转化方法都有相应特点，并会影响整合到植物基因组中的外源 DNA 序列。例如，整合过程可引起重排、缺失或多拷贝插入以及来源于质粒（载体）或染色体 DNA 的“其他”序列的插入。如果这类“其他”序列可引起重组 DNA 植物中新物质的出现，或导致 RNA 和蛋白质水平的改变，则这些“其他”序列就与安全评价有关。本节将重点介绍特定转化方法产生的 DNA 整合。

现已有很多方法可将 DNA 导入到植物基因组中（Hansen and Wright 的综述，1999）。卸甲农杆菌在细菌介导的转化方法中最常用。农杆菌以外的其他植物细菌在植物转化中可能也会变的重要（Broothaerts et al, 2005）。直接转化方法包括粒子轰击（基因枪）和电穿孔。其他方法（如微注射、电泳）经特别设计后主要应用于难以转化的植物种或组织（Hansen and Chilton, 1996；Rakoczy-Trojanowska, 2002 的综述）。本节将重点介绍广泛应用的转化方法。

2. 农杆菌介导转化

在农杆菌介导转化过程中，一段带有特定较短侧翼序列（即 T-DNA 边界序列）的 DNA 区域（称之为 T-DNA）被转移整合到基因组中（见 Gelvin 的综述，2003）。除 T-DNA 边界序列外，毒力基因（*vir*）在 T-DNA 加工、运输和整合过程中起着关键作用。Vir 蛋白不仅具有顺式作用功能，还能以反式的方式起作用。根据后一发现，建立了二元载体系统，该系统包括：i) 带有 T-DNA 区和边界序列的质粒；ii) 具有 *vir* 基因功能并去除了 T-DNA 区的辅助质粒。二元载体系统频繁地应用于农杆菌介导的转化中（Hel-lens et al, 2000）。

转化中使用的农杆菌菌株和辅助质粒必须是已知的，如果之前未鉴定过，应提供对它们的介绍。还应提供辅助质粒是如何被卸甲的信息。此外，还要描述含有 T-DNA 区的质粒，该信息说明了可能转移的 DNA 序列。

对农杆菌介导转化通常可在单一插入位点上整合低拷贝的 DNA 构件^①。已在一些正在商业化的重组 DNA 植物品种中发现，在单一位点上 T-DNA 作为串联重复序列插入（结构上正向插入或反向插入）（Smith et al 的综述，2001）。有时也可见到不完整 T-DNA 序列的整合。整合中 DNA 构件可能同时出现几种类型的重排（复制、倒位或在植物 DNA 中散布），以及植物基因组在插入位点处出现 DNA 的重排（复制、倒位和易位）。有时也观察到 T-DNA 边界以外的质粒骨架序列的插入（Smith et al 的综述，2001），质粒骨架序列要么与右边界 T-DNA 序列一起插入，要么与左边界 T-DNA 序列一起插入，要么作为与 T-DNA 不相连的独立单元插入（Kononov et al, 1997）。第三节将考虑这些现象的安全评价。

3. 直接转化

植物细胞的直接转化是利用各种可将外源物质通过细胞壁和细胞膜的技术（如粒子轰击、电穿孔）而将目的 DNA 序列直接导入到植物细胞中。该方法可能会导入其他未打算转移的 DNA 序列（如细菌染色体 DNA），这取决于转化所用 DNA 的纯度。应提供关于载体 DNA 及其制备方法和纯度的描述，以表明可能转移的 DNA 序列。

对于不适宜用农杆菌介导转化法成功导入新性状的植物来说，可应用直接转化法（见 Taylor and Fauquet, 2002）。如果使用最小表达盒（启动子、开放阅读框、终止子）可获得单个整合体（Fu et al, 2000）。粒子轰击可能使 DNA 构件在一个或多个位点多拷贝插入（以正向或反向重复结构插入）（Jackson et al, 2001；Smith et al 的综述，2001）。植物基因组 DNA 片段可能散布在单位点插入的多拷贝 DNA 构件中。某些情况下，导入的

① 本文件中构件指拟插入到植物基因组中的 DNA。

DNA 可能出现缺失或重排, 如串联体 (见 Smith et al 的综述, 2001)。如果在转化时使用完整的质粒或未充分纯化的表达盒, 则重组 DNA 植物中可能存在载体骨架序列。

4. 结论

转化方法的描述有助于了解可能转移到植物基因组的 DNA 序列信息, 这对于鉴定受体植物的变化, 全力开展安全评价工作十分重要。

第三节 插入 DNA、插入位点和表达物质

1. 插入 DNA 和插入位点

在安全评价中, 对插入 DNA 进行的分析可用于鉴定转化体的基因型。DNA 构件中或插入位点处 DNA 片段缺失和重排的数据, 可用于确定是否产生非预期的其他效应。本节对插入 DNA 的信息以及插入位点的变化进行了讨论。

应当指出的是, 当插入 DNA 在开放条件下拟商业化应用的重组 DNA 植物中稳定遗传时, 对插入 DNA 进行分析是安全评价内容的一部分。

整合和拷贝数

DNA 构件可插入到植物核基因组或细胞器 (如叶绿体) 基因组中。插入 DNA 存在于核内还是细胞器内与重组 DNA 植物的繁殖生物学密切相关, 该信息有助于在环境安全评价中评估目的基因扩散的潜在风险。如果插入 DNA 位于叶绿体中, 则其最可能的是母体遗传 [大多数高等植物 (主要) 通过母本而不是花粉转移其叶绿体 DNA (Bock, 2007)]。如果插入 DNA 位于核内, 将同时通过母本和父本遗传。分子分析和遗传学研究可提供插入 DNA 位点的信息 (见第四节)。

根据所用的转化方法, 插入位点的数目可能不同。并且, 每一插入位点可能存在多拷贝的 DNA 构件 (见第二节)。尽管人们通常选择单拷贝 DNA 构件的植株, 但在有些情况下, 多拷贝的植株由于表达水平高可能更为有效。拷贝数虽然可以影响基因沉默, 但其相关性不如导入 DNA 与内源基因的同源性 (Flavell, 1994)。

选用合适的对照和试验数据 (如 Southern 杂交分析) 可以获得重组 DNA 植物的插入位点数目、各位点拷贝数以及插入元件 (如启动子、增强子) 的信息。

质粒骨架序列的存在

农杆菌介导转化法和直接转化方法都可能出现载体骨架序列在植物基因组的整合 (见第二节)。如果载体骨架序列的插入会导致其他蛋白质的表达 (33) 或改变内源基因的表达, 则载体骨架序列的整合就很重要。用载体骨架的 DNA 序列为探针对基因组 DNA 进行 Southern 杂交, 以确定是否插入了载体骨架的元件。

转化的组织和插入位点

外源基因整合到植物基因组的过程中, 可能会出现 DNA 的重排。通过序列分析、插入 DNA 的 PCR 扩增和 Southern 杂交技术可以鉴定 DNA 重排。如果试验结果表明插入较复杂, 如存在重排或缺失, 则可能需要对插入 DNA 进行进一步的分析, 以确定与植物表型相关的新物质是否存在于植物中。这些重排对于食品、饲料和环境安全评价而言并不一定有意义。

T-DNA 整合到内源基因的编码序列或调节序列，以及插入位点处植物基因组 DNA 缺失或重排都可能引起内源基因功能的丧失或改变其表达。这可能会导致植物发生变化，这些变化对安全而言可能有意义，也可能无意义。对插入 DNA 的旁侧区域进行分析可用于确定 DNA 构件是否插入到内源基因的编码序列或调节序列，不仅如此，旁侧区域分析可用于鉴定对植物基因功能潜在的影响。不过，由于不了解大多数植物基因的功能对插入位点变化引起基因功能丧失的分析经常难以进行。插入位点的鉴定能可用于分析重组 DNA 植物的非预期效应，这是植物农艺性状评价、表型性状评价和组成成分评价的一部分。

转化可能形成新的开放阅读框，从而产生新蛋白质。对插入 DNA 和基因组 DNA 接合区之间的序列进行分析可用于说明是否存在新的开放阅读框，以及新开放阅读框的上游或下游是否存在调节序列。

2. 表达物质

为评价新基因产物的食品、饲料和环境安全，需要分析插入 DNA 的表达。除此之外，可能还需要考虑载体骨架序列和新开放阅读框的表达。通过分子分析获得的数据应当能够表明插入的载体 DNA 是否可以转录和翻译。如果发现潜在的新开放阅读框，则通过生物信息学手段确定其形成 RNA 的可能性，转录和翻译的可能性以及新蛋白推导的氨基酸序列。如果发现可能产生新蛋白质，应当全面鉴定其对安全的潜在影响。对新蛋白进行的安全评价不在本文件范围之内。

一些情况下，插入 DNA 构件的目的是抑制或下调内源靶基因的转录。该情况下，内源靶基因在蛋白质水平表达可能会降低或受到抑制。在一些情况下，作为非预期效应基因沉默构件可能影响其他具有明显序列相似性的内源基因的转录或翻译。

转录和翻译

将 DNA 构件成功转入到一个新的植物品种中，并不表示该构件就会表达 (Gelvin, 2003)。一些因素可影响插入 DNA 的表达水平和表达稳定性。研究表明，插入 DNA 的拷贝数、结构（如反向重复序列）和插入位点均影响转录 (Flavell, 1994; Gelvin, 1998; Matzke and Matzke, 1998)。此外，插入 DNA 在哪里转录以及什么时候转录，在一定范围内取决于所用的启动子（如组织特异性启动子可将表达限制在期望的组织中）、植株发育阶段（如开花、结子）和重组 DNA 植物的生长环境 (Bregitzer and Tonks, 2003; Zhu et al., 2004)。

应用 Northern 杂交等核酸技术，或 Western 杂交等基于抗体的方法，可测定插入 DNA 在 RNA 或蛋白水平的表达。在分析插入 DNA 的表达特征时，应确保分析所用的条件（如检测的组织 and 生长条件）与安全评价相关。一旦确认表达，就可以鉴定插入 DNA 的表达产物并评价其安全性。

在评价表达产物的暴露量时，应当考虑插入 DNA 在相关组织中以及相关环境条件下的表达，并将其作为安全评价的一部分。在植物基因组中稳定整合并不意味着插入 DNA 能够在重组 DNA 植物的整个生活周期中将要或一定以稳定的水平表达。在关键发育阶段分析植物组织中插入基因的编码蛋白，将揭示该发育阶段的蛋白表达量与安全评价的相关性，例如蛋白质是否存在于食品和饲料中，在哪个发育阶段的环境暴露量最大（如花粉中

蛋白质的表达)。

翻译后修饰

蛋白质在翻译后要经过进一步的修饰。鉴定插入基因编码蛋白的特征将有助于研发者确认新物质是否为期望的表达产物。这些蛋白质的特征能够建立与其安全应用历史的关联性，其相关性可通过植物体中表达的蛋白质与天然寄主中表达的蛋白质没有实质不同来说明。为了在重组 DNA 植物的安全评价中引用天然寄主中蛋白质的数据和信息，上述相关性分析是必须的。目前已经建立了识别潜在翻译后修饰系统，例如 N-糖基化位点、O-糖基化位点、Ser/Thr/Tyr 磷酸化位点和异戊二烯化的算法 (Blom et al, 2004; Maurer-Stroh and Eisenhaber, 2005)。应用特异染色方法、放射性标记研究或基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS)，可以证明是否存在预计的与安全评价相关的翻译后修饰 (Jensen, 2000)。一些翻译后的修饰可能影响蛋白质的安全性，虽然这已经超出了分子鉴定的范围，但是应将其作为整个安全评价的组成部分进行考虑。

3. 结论

插入 DNA 的分析有助于鉴定转化体的基因型。在 DNA 构件中或插入位点处出现的缺失和/或重排可能会导致非预期的影响。表达产物分析在表型评价中具有重要作用，不过这应当在整体的安全评价中考虑。

第四节 遗传和遗传稳定性

1. 引言

插入 DNA 遗传和遗传稳定性的信息可以将特定重组 DNA 植物的安全评价结论扩展到其后代中。因此，插入 DNA 的遗传和遗传稳定性信息对于食品、饲料和环境安全评价十分重要而且是必须的。

遗传指基因型和表现型传递到后代的代谱。遗传修饰的稳定性指经过不同时间和世代后，遗传修饰的结构和功能的完整性。在重组 DNA 植物生产和繁殖过程中，通过插入位点的基因型分析或/和期望性状的表现型分析，可以鉴定遗传稳定性。

2. 安全评价中的遗传和遗传稳定性

世代内和不同世代中导入性状的遗传稳定性与遗传是安全评价的组成部分。遗传分析包括插入 DNA 是位于植物核染色体上还是细胞器上，是通过母本还是父本传递到后代中。如果插入 DNA 已经稳定整合到基因组中，就可一定程度上确认植物在早期世代进行的安全评价可应用于以后的世代。当选择植株在开放条件下商业化应用时，研发者通常寻找那些插入 DNA 已经稳定整合到基因组的植株。

遗传谱

对于 DNA 构件插入到细胞核的情况，通常用孟德尔规律中基因型和表现型的分离比预计遗传谱。不符合孟德尔遗传表明遗传存在潜在的不稳定性，特别是对二倍体有性繁殖植物核基因组染色体的遗传修饰，管理人员遇到的新植物通常属于这种类型。不过，特定植物的遗传谱取决于该物种的遗传机制，例如繁殖方式、倍体性以核基因组还是细胞器基因组遗传。

对于无性繁殖、营养繁殖和一些多倍体的植物以及所有质体或线粒体基因组的遗传修饰而言，预期将不会出现孟德尔遗传。这些非孟德尔遗传的事例并不能表示遗传不稳定。

遗传稳定性因素

所有植物在有丝分裂或减数分裂过程中以及在将基因传递到后代的过程中，可能会发生基因型的改变。在 DNA 复制和有丝分裂前染色体加倍过程中，由于碱基对插入错误，可能会出现自发突变。在减数分裂中同源染色体的配对会引起基因交换，从而引发基因重组出现新的基因组群。插入 DNA 的稳定性一定程度上也取决于导入或改良基因的序列与结构以及插入位点的特征。

遗传修饰稳定性的测定方法

遗传修饰的稳定性可以在表现型和/或基因型水平上进行分析。通过性状鉴定或通过对足量样本的适合的 RNA 或蛋白表达进行分析可以确定表型表达的稳定性的稳定性。一些表型性状（如抗性）可在试验条件下在完整的植株中进行定量。和其他植物基因一样，插入 DNA 的表达会受环境的影响，因此在考虑表型稳定性时，应当考虑这一点。通过酶或抗体介导的生化反应可以测定表达谱的变化或表达量（如 ELISA，Western 杂交）。

应用 Southern 杂交、PCR 或其他类型的遗传分析方法对世代内和世代间多个植株进行遗传分析，可以在基因水平上测定遗传修饰的稳定性。应当在植物育种会发生正常变异的背景下，考虑重组 DNA 植物世代间基因型的变化。

3. 结论

遗传和遗传稳定性可为食品、饲料和环境安全评价提供信息。该信息在将特定世代重组 DNA 植物的安全评价结果扩展到后代中起着重要作用。

第五节 总 结

分子特征包括对转化方法，插入 DNA 和表达物质，以及插入 DNA 遗传与遗传稳定性的考虑。分子特征本身不是一个充分预测重组 DNA 植物安全性的方法。不过，分子特征有助于重点考虑安全评价中的其他要素，植物表型评价中，如营养物、抗营养因子、内源毒素的水平或致敏源的特征或植物适合度的变化。迄今为止，在重组 DNA 植物的分子特征鉴定中已经应用了目前最合适的科学程序和技术。这些程序和技术应用的经验形成了本文件的基础。按照目前技术进步的步伐，预计新的方法将会应用于重组 DNA 植物的分子特征鉴定，不过应当证明这些方法在食品、饲料和环境安全评价的危害鉴定机理中具有附加价值。

◆ 参考文献

- Blom, N., T. Sicheritz-Pontén, R. Gupta, S. Gammeltoft and S. Brunak. 2004. Prediction of Post-Translational Glycosylation and Phosphorylation of Proteins from the Amino Acid Sequence. *Proteomics* Vol. 4, pp. 1633-1649.

- Bock, R. 2007. Structure, Function, and Inheritance of Plastid Genomes. In R. Bock, ed., Cell and Molecular Biology of Plastids. Topics in Current Genetics Vol. 19, pp. 29-63, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Bregitzer, P. and D. Tonks. 2003. Inheritance and Expression of Transgenes in Barley. Crop Science Vol. 43, pp. 4-12.
- Broothaerts, W., H. J. Mitchell, B. Weir, S. Kaines, L. M. A. Smith, W. Yang, J. E. Mayer, C. Roa-Rodriguez and R. A. Jefferson. 2005. Gene Transfer to Plants by Diverse Species of Bacteria. Nature Vol. 433, pp. 629-633.
- Chassy, B., J. J. Hlywka, G. A. Kleter, E. J. Kok, H. A. Kuiper, M. McGloughlin, I. C. Munro, R. H. Phipps and J. E. Reid. 2004. Nutritional and Safety Assessments of Foods and Feeds Nutritionally Improved Through Biotechnology. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Vol. 3, pp. 35-104.
- Codex Alimentarius Commission (Codex) (2003a, with amendment in 2008). Principles for the Risk Analysis of Foods Derived from Modern Biotechnology. CAC/GL 44-2003. available online at http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10007/CXG_044e.pdf.
- Codex (2003b; with Annexes II and III adopted in 2008). Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Plants. CAC/GL 45-2003. available online at http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10021/CXG_045e.pdf.
- Flavell, R. B. 1994. Inactivation of Gene Expression in Plants as a Consequence of Specific Sequence duplication. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Vol. 91, pp. 3490-3496.
- Fu, X., L. T. Duc, S. Fontana, B. B. Bong, P. Tinjuangjun, D. Sudhakar, R. M. Twyman, P. Christou and A. Kohli. 2000. Linear Transgene Constructs Lacking Vector Backbone Sequences Generate Low-Copy-Number Transgenic Plants with Simple Integration Patterns. Transgenic Research Vol. 9, pp. 11-19.
- Gelvin, S. B. 1998. The Introduction and Expression of Transgenes in Plants. Current Opinion in Biotechnology Vol. 9, pp. 227-232.
- Gelvin, S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated Plant Transformation; the Biology behind the 'Genejockeying' Tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews Vol. 67, pp. 16-37.
- Hansen, G. and M. D. Chilton. 1996. "Agrolistic" Transformation of Plant Cells: Integration of T-Strands Generated in Planta. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Vol. 93, pp. 14978-14983.
- Hansen, G. and M. S. Wright. 1999. Recent Advances in the Transformation of Plants. Trends in Plant Science Vol. 4, pp. 226-231.
- Heck, G. R., C. L. Armstrong, J. D. Astwood, C. F. Behr, J. T. Bookout, S. M. Brown, T. A. Cavato, D. L. DeBoer, M. Y. Deng, C. George, J. R. Hillyard, C. M. Hironaka, A. R. Howe, E. H. Jakse, B. E. Ledesma, T. C. Lee, R. P. Lirette, M. L. Mangano, J. N. Mutz, Y. Qi, R. E. Rodriguez, S. R. Sidhu, A. Silvanovich, M. A. Stoecker, R. A. Yingling and J. You. 2005. Development and Characterization of a CP4 EPSPS-Based Glyphosate-Tolerant Corn Event. Crop Science Vol. 44, pp. 329-339.
- Hellens, R., P. Mullineaux and H. Klee. 2000. A Guide to *Agrobacterium* Binary Ti Vectors. Trends in Plant Science Vol. 5, pp. 446-451.
- Horvath, H., L. G. Jensen, O. T. Wong, E. Kohl, S. E. Ullrich, J. Cochran, C. G. Kannangara and D. von Wettstein. 2001. Stability of Transgene Expression, Field Performance and Recombination

- Breeding of Transformed Barley Lines. *Theoretical and Applied Genetics* Vol. 102, pp. 1-11.
- Jackson, S. A., P. Zhang, W. P. Chen, R. L. Philips, B. Friebe, S. Muthukrishnan and B. S. Gill. 2001. High-Resolution Structural Analysis of Biolistic Transgene Integration into the Genome of Wheat. *Theoretical and Applied Genetics* Vol. 103, pp. 56-62.
- Jensen, O. N. 2000. Modification-Specific Proteomics; Systematic Strategies for Analysing Post-Translationally Modified Proteins. *Trends in Biotechnology* Vol. 18, Supplement 1, pp. 36-42.
- Kononov, M. E., B. Bassuner and S. B. Gelvin. 1997. Integration of T-DNA Binary Vector "Backbone" Sequences into the Tobacco Genome; Evidence for Multiple Complex Patterns of Integration. *The Plant Journal* Vol. 11, pp. 945-957.
- Kuiper, H. A., E. J. Kok and K. -H. Engel. 2003. Exploitation of Molecular Profiling Techniques for GM Food Safety Assessment. *Current Opinion in Biotechnology* Vol. 14, pp. 238-243.
- Matzke, A. J. M. and M. A. Matzke. 1998. Position Effects and Epigenetic Silencing of Plant Transgenes. *Current Opinion in Plant Biology* Vol. 1, pp. 142-148.
- Maurer-Stroh, S. and F. Eisenhaber. 2005. Refinement and Prediction of Protein Prenylation Motifs. *Genome Biology* Vol. 6, R55.
- Muskens, M. W. M., A. P. A. Vissers, J. N. M. Mol and J. M. Kooter. 2000. Role of Inverted DNA Repeats in Transcriptional and Post-transcriptional Gene Silencing. *Plant Molecular Biology* Vol. 43, pp. 243-260.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 1993. *Safety Considerations for Biotechnology; Scale-Up of Crop Plants*, OECD, Paris.
- OECD. 2003. *Considerations for the Safety Assessment of Animal Feedstuffs Derived from Genetically Modified Plants. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 9*, OECD Environment Directorate, Paris.
- Padgett, S. R., K. H. Kolacz, X. Delannay, D. B. Re, B. J. LaVallee, C. N. Tinius, W. K. Rhodes, Y. I. Otero, G. F. Barry, D. A. Eichholtz, V. M. Peschke, D. L. Nida, N. B. Taylor and G. M. Kishore. 1995. Development, Identification, and Characterization of a Glyphosate-Tolerant Soybean Line. *Crop Science* Vol. 35, pp. 1451-1461.
- Rakoczy-Trojanowska, M. 2002. Alternative Methods of Plant Transformation-a Short Review. *Cellular & Molecular Biology Letters* Vol. 7, pp. 849-858.
- SCBD (Secretariat of the Convention on Biological Diversity). 2000. *Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity; Text and Annexes*, Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, Canada.
- Smith, N., J. B. Kilpatrick and G. C. Whitlam. 2001. Superfluous Transgene Integration in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* Vol. 20, pp. 215-249.
- Tang, J., R. Scarth and P. B. E. McVetty. 2004. Stability of the Expression of Acyl-ACP Thioesterase Transgenes in Oilseed Rape Doubled Haploid Lines. *Crop Science* Vol. 44, pp. 732-740.
- Taylor, N. J. and C. M. Fauquet. 2002. Microparticle Bombardment as a Tool in Plant Science and Agricultural Biotechnology. *DNA and Cell Biology* Vol. 21, pp. 963-977.
- Yin, Z., M. Szwacka, R. Malinowski and S. Malepszy. 2004. Differences in the Inheritance Stability of Kanamycin Resistance between Transgenic Cucumbers (*Cucumis sativus* L.) Containing two Constructs. *Journal of Applied Genetics* Vol. 45, pp. 307-313.
- Zhang, Y., X. Yin, A. Yang, G. Li and J. Zhang. 2005. Stability of Inheritance of Transgenes in Maize (*Zea mays* L.) Lines Produced using Different Transformation Methods. *Euphytica* Vol. 144, pp. 11-22.

- Zhou, H. , J. D. Berg, S. E. Blank, C. A. Chay, G. Chen, S. R. Eskelsen, J. E. Fry, S. Hoi, T. Hu, P. J. Isakson, M. B. Lawton, S. G. Metz, C. B. Rempel, D. K. Ryerson, A. P. Sansone, A. L. Shook, R. J. Starke, J. M. Tichota and S. A. Valenti. 2003. Field Efficacy Assessment of Transgenic Roundup Ready Wheat. *Crop Science* Vol. 43, pp. 1072-1075.
- Zhu, B. , J. R. Lawrence, S. I. Warwick, P. Mason, L. Braun, M. D. Halfhill and C. N. Stewart Jr. 2004. “*Stable Bacillus thuringiensis* (Bt) Toxin Content in Interspecific F₁ and Backcross Populations of Wild *Brassica rapa* after Bt Gene Transfer. *Molecular Ecology* Vol. 13, pp. 237-241.

第二章

通过衣壳蛋白基因介导的抗病毒作物 生物安全信息的共识文件*

第一节 总体介绍

以下文件由生物技术法规监督协调工作组完成，该文件为系列文件之一，期望为行政官员、生物技术新产品研发者以及其他相关团体提供信息。

本文并不是对应用病毒衣壳蛋白基因介导的抗病毒植物的科学试验进行定义性或百科全书式的综述，也不是指使任何国家的管理机构如何审查这类植物的田间试验申请、解除管制或商品化生产。（抗病毒转基因植物的其他信息，见 Hull, 1990、1994；de Zoeten, 1991；Mansky 和 Hill, 1993；Falk 和 Bruening, 1994；Palukaitis, 1991；Tepfer, 1993、1995；Wilson, 1993）。本文件主要是介绍各成员国在应用衣壳蛋白基因介导的抗病毒作物方面，目前对一系列特定问题的经验。本文件应用了各种来源的信息，不仅包括来自科学文献，也包括成员国的风险评估报告、研讨会和科学会议。为了跟随当前的“技术发展水平”，本文件也含有尚未得到科学界全面细致评价的初步信息。在出现这类信息时，将用“初步”加以标示。

本文件讨论的问题是行政官员在审查通过衣壳蛋白基因介导的抗病毒作物时可能考虑的问题。本文只限于所讨论的问题，不涉及转基因生物引进的特定环境。因此，与抗病毒植物栽培的有关问题，或基因从抗病毒植物转移到另一作物或野生近缘种的潜力或潜在影响都不在本文件的范围之内，不过，在任何国家 these 问题是管理机构需要认真考虑的问题。本文件既没有包括对农艺性状的潜在影响，也未涉及潜在的国际贸易问题。

本文件重点讨论该类转基因植物对一些自然病毒种群的潜在影响，或对病毒侵染严重程度的影响。尤其是，本文件中专家组确定了通过病毒衣壳蛋白基因获得抗性的转基因植物需要考虑的 3 个问题，其中两个问题，衣壳转移（transcapsidation）和重组（recombination）是可能导致新病毒出现的已知分子机制；第 3 个问题是导入的特定病毒基因可能与其他病毒侵染发生专一性协生作用。这些问题都是复杂的生物学现象，有时可能至少涉及 4 种不同的生物：2 种病毒、1 种病毒传播介体和 1 种寄主植物。对于所有病毒，我们并未完全详细地理解这些现象，成员国中仍有大量的研究致力于阐释这些理解不多的问题。某些情况下，本文件着重讨论特定类群的植物病毒，这是因为这些病毒大部分情况已知，

* Originally published by the OECD in English under the title: “Consensus Document on General Information concerning the Biosafety of Crop Plants Made Virus Resistant through Coat Protein Gene-Mediated Protection” © 1996 OECD. All rights reserved.

或其风险问题可得以清晰地确定。

本文件代表了成员国对衣壳蛋白基因介导的抗病毒作物的生物安全问题的共识意见，该意见是在考虑抗病毒作物对病毒种群和植物病毒影响的 3 种确定的分子机制时提出的。目前关于这些问题的科学信息可能足以对目前开发的品种进行个案、科学的风险评估和生物安全评价。这将促使一些国家的主管部门在经过上述问题的考虑和审查后批准特定品种的释放或商品化。本文件并不是想为这类考虑的结果提供详细的、明确的或概括性的结论，也不是想建议某些国家如何对这类考虑作出结论。成员国认为，这类考虑应当以个案分析为基础。对于特定问题的特定评价结果，由于与抗病毒作物个体有关，因此将分别加以说明。

第二节 植物病毒简介

病毒病可导致农业产生重大的经济损失。病毒侵染可危害很多重要农作物的果实、叶片、种子、花、茎秆和根。在自然条件下，某些植物病毒几乎总是出现在某些特定的作物或杂草上。病毒病在某一特定植物上产生的症状类型取决于病毒、病毒的特定株系、植物是否受另一种病毒或其他病毒的侵染、寄主植物的品系以及环境条件。某一特定病毒侵染的严重度因地方与季节不同而异，反映了环境对症状发展和病毒介体传毒率的重要性。一些病毒爆发的后果十分严重，能够造成特定地区中靶标作物（如甜菜、柑橘和水稻）的整个植株都受到破坏。大多数农作物通常都受几种不同病毒的侵染。美国植物病理学会（American Phytopathology Society）出版的《植物病害概览》（Compendium of Plant Disease）中列出了影响世界主要作物的重要病毒。Brunt 等（1990）编写的《热带植物病毒》（Viruses of Tropical Plants）是关于热带植物病毒病的宝贵资源。

植物病毒可以不同的方式传播，具体取决于病毒的类型。病毒传播的方式包括：生物介体传播、种子或花粉传播以及机械传播（包括通过植物汁液传播和通过受侵染寄主植物组织的营养繁殖传播）。病毒介体可以是线虫、螨类、真菌或昆虫。某些情况下针对特定的病毒病，需要应用杀虫剂防治引起严重病毒病的特定生物介体（通常为昆虫）。虽然昆虫本身对靶标农作物并不产生严重的破坏，或者可以用生物方法防治这些昆虫，防治生物介体不一定总是能够彻底或有效地控制病毒病。此外，在某些环境条件下，由于受侵染植株和潜在介体种群的持续存在，某些作物的种植很难获利。土传（线虫或真菌传播）病毒的情况可能更为可怕。如果感染的生物介体在某一地点定殖，要根除它甚至有效地防治通常是不可能的，或在环境保护的角度不可行。除非有抗性品种，否则不得不在该地放弃栽培感病作物。相关事例包括印度部分地区发生的花生丛簇病毒病，和英国发生的甜菜丛根病 [由甜菜坏死黄脉病毒（BNYVV）导致]。

植物病毒是相对简单的病原物，实际上是周围包裹着蛋白质外壳（衣壳）的 DNA 或 RNA 基因组。一些衣壳可能也含有碳水化合物和（或）脂类。病毒基因组至少编码其核酸复制酶、病毒在植物体内运动所需的蛋白、病毒衣壳蛋白以及其他必需的蛋白。病毒颗粒体进入寄主植物细胞后，脱去外壳，并复制基因组；用其衣壳蛋白基因来翻译合成病毒衣壳的蛋白质亚基，然后装配成新的病毒颗粒体。这些新的病毒颗粒体或侵染介体可扩散到相邻

细胞中或通过介体生物传播到其他寄主植物中。

植物病毒通常根据其首先被发现的侵染植物类型及其症状而命名。每一植物病毒的基因组由特定的 DNA 或 RNA 组成，根据病毒类型可能为单链或双链。一些植物病毒中，每一病毒粒体中含有一个以上的核酸分子。其他病毒的基因组含有分段的核酸分子，每一核酸分子各自包裹于分离的病毒粒体中（多分体病毒）。一些病毒侵染与卫星 RNA 或卫星病毒的产生有关。卫星 RNA 的复制依赖于特定病毒（称为辅助病毒）的复制酶，卫星 RNA 的基因组通常小于辅助病毒基因组，他与辅助病毒基因组没有显著的序列相似性，能够影响某些寄主的发病症状（Matthews, 1991）。卫星病毒编码自身的衣壳蛋白，而卫星 RNA 却包裹在辅助病毒的衣壳蛋白中。植物病毒一般根据病毒粒体的核酸组成和其他物理性质进行分类。对数百种动植物病毒基因组进行的核苷酸测序，已经揭示了很多病毒的进化关系。国际病毒分类委员会发表的 Murphy 等（1995）的分类系统是关于病毒分类的重要参考文献。

在农业上，植物病毒不同的控制策略具有不同的效果：在分类鉴定的基础上（一般应用分类检索法），清除国界或州界上受污染的材料；去除受侵染的作物；必要时采用植株根除措施；确认不含病毒的砧木/原种或种子（如防治果树上的李痘病毒和马铃薯中的许多病毒）；应用农艺措施最大限度地减少病毒的扩散或定殖（如在某一特定地点、某一特定时间内不种植某种特定的作物）；通过常规育种培育抗病毒品种；利用交互保护法（即用病毒的弱株进行预接种，而保护植物不受同一病毒的另一株系的严重侵染）（在欧洲和日本主要用于控制番茄花叶病毒、在巴西用于控制柑橘速衰病毒）。对于某些病毒而言，传统的交互保护法尽管在某些地点对于某些作物具有重要的经济意义，但是只对特定的病毒有效。该法是用合适的近缘弱毒株系有意侵染作物，前提是可以获得这类弱毒株系。应用常规杂交方法开发抗病毒作物主要涉及两个问题：①鉴定含有合适的抗性性状/基因的种质；②抗病毒性状的渗入和作物其他重要农艺性状之间的平衡。

在 1994 年 Whitham 等克隆并测序抗烟草花叶病毒的烟草 N 基因之前，没有人对植物源的常规抗病毒基因进行克隆或测序。尽管有证据认为 N 基因参与了一般病原抗性的普通信号转导机制（Staskawicz et al, 1995），但是尚不清楚其确切的功能。不过，尽管将传统抗性基因导入到具有理想农艺性状的栽培品种的作用方式尚不清楚，但数十年来一直用这种方式来保护植物免受病毒的侵染。虽然对传统抗性基因的机制或传统的交互保护措施机制缺乏了解但并未阻碍它们的应用。

保护植物免受病毒病侵染的另一类策略是将病毒衣壳蛋白基因导入到植物基因组中并表达。这类策略称为“衣壳蛋白基因介导的保护”，Powell Abel 等（1986）在烟草花叶病毒侵染烟草的研究中首次描述了其有效性。该策略能够为受体植物提供对靶标病毒稳定遗传的保护，并且可保护植物免受近缘病毒株系的侵染。迄今为止实验室或田间试验表明这一策略至少可有效保护植物免受 50 种不同病毒的侵染。此后，已经证明，衣壳蛋白之外的病毒基因 [专化性移动蛋白、复制酶（聚合酶）、改良后含有核酶的病毒基因、卫星 RNA 和缺损干扰 RNA] 也可使受体植物具有抗病毒的表型。靶标病毒中日益增多的抗性基因，使其比所侵染的植物具有更丰富的多样性。不过，本文件只介绍通过病毒衣壳蛋白基因介导的抗病毒转基因植物的生物安全性，以及改良的受体植物与环境中其他植物病毒

之间发生相互作用的生物安全性。

第三节 病毒鉴定的基本信息

一个生物安全性审查的相关信息包括该生物身份鉴定的信息和该生物应用环境的信息。与受体植物发生相互作用的生物，存在和通过衣壳蛋白基因介导抗病毒转基因植物在相同环境下发生潜在相互作用的可能性。基因供体病毒的信息包括病毒的生物学、分类地位、遗传学以及与已知病毒在环境中的相互作用。这些必要的信息包括：

①病毒的分类地位与名称，包括科、属，以及株系的命名，包括任何异名；

②病毒的核酸类型；

③是系统侵染还是局部侵染；

④病毒是否只限于特定的组织（如限于韧皮部中）；

⑤病毒是否与卫星病毒或辅助病毒相关；

⑥病毒的天然寄主范围；

⑦病毒是如何传播的；

⑧病毒是否通过介体传播，介体的特性，包括传播方式（如持久性传播或非持久性传播），传播介体中病毒基因（如果已知的话）的性质；

⑨在文献中是否已经报道在田间条件下与其他病毒发生的共生作用或衣壳转移。

为了评价病毒基因应用潜在的生物安全问题，转入到植物中病毒序列的特征应当十分清楚，基因供体病毒的特征和株系的生物学特性应当清楚。基因供体的株系的鉴定可以确定该株系是否与其他国家发现的相同或近乎相同。例如，在日本、英国、荷兰和欧洲其他地区广泛流行的甜菜坏死黄脉病毒 A 株系几乎与美国发现的相同（Kruse et al, 1994）。科学文献和公共数据库中有大量关于病毒株系的资料。

植物病毒命名的官方分类机构是国际病毒分类委员会（International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV），该机构已经发表了大多数植物病毒的分类学名称（Murphy et al, 1995）。病毒描述的相关信息类型包括病毒（包括异名）的全称、科名和属名、株系名称、引发病害的名称、该株系首次分离的地点。植物病毒侵染最重要的分子特征是核酸的类型，RNA 还是 DNA，核酸是单链还是双链（Murphy et al, 1995）。病毒复制特性的描述十分重要，即病毒是在所有细胞中复制（如烟草花叶病毒）还是只在特定的细胞中复制（如黄化病毒只在韧皮部细胞中复制）。

但是一些文献和互联网已经提供了相当多的有用信息：尽管到目前为止还没有权威的所有病毒寄主范围的简明表。

①联邦真菌研究所/应用生物学家协会（The Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists）发表的《植物病毒志》（Description of Plant Viruses）是包括数百集的一系列手册，详细介绍了数百种植物病毒的生物学特征。

②美国农业部（USDA）的“植物有害生物对北美农业的重要性，植物病毒病索引（Agriculture Handbook No. 307, 1966）”列出了所涉及的植物以及侵染这些植物的病毒。

③美国植物病理学协会 (American Phytopathology Society) 的农作物的植物病害系列迄今已经列出了主要农作物的病毒病。该协会也列出了美国的植物病害及致病原。

④澳大利亚病毒鉴定数据交换库 (Australian Virus Identification Data Exchange, VIDE) 在 ICTV 的推动下目前正在建立植物病毒的全球数据库。数据库网址为: <http://life.anu.edu.au/viruses/lctv/index.html>。

⑤英国植物病理学学会 (British Society for Plant Pathology) 1984 年发表的“英国植物病害的名称及其致病原”, 按寄主植物排列列出了病害的英国名称和欧洲名称, 以及致病原的学名。

⑥Smith 等 (1988) 编写的《欧洲植物病害手册》描述了欧洲植物的病毒、细菌和真菌病原物。

⑦美国 Tulane 大学的 Garry 研究室的网页列出了全球关于病毒网页的网址。在 <http://www.tulane.edu/~dmsander/garryfavweb.html> 上可访问到该网址。已经建立了一个镜像网站以便于在欧洲通过英国莱斯特大学的网页 (<http://www-micro.msb.le.ac.uk/335/garryfavweb.html>) 访问到该网站。

很多发表的文献描述了特定病毒的寄主范围。不过, 他们大多数没有描述特定病毒株系的寄主范围。寄主范围是本文重点考虑的 3 个问题之一。由于特定病毒存在不同的株系, 因此相比于文献检索, 植物基因工程操作人员更易于提供供体病毒株系的天然寄主范围的信息。一个病毒株系在管理的生态系统和未管理生态系统中的天然寄主范围信息可能比其“人工”寄主范围的信息更具有相关性。病毒的天然寄主范围列出了在管理或未管理的生态系统中通常受到病毒侵染的植物。人工寄主范围包括在控制条件下通过人工接种而有意侵染的植物, 但是这些植物在自然条件下不一定会受到侵染。人工寄主范围比天然寄主范围所含的植物种类要多 (Matthews, 1991)。

迄今世界范围内还没有权威的植物病毒地理分布表。不过, 很多植物病毒的一些地理分布信息可以在上文所列的参考文献中查到。美国农业部在其网页 (<http://www.usda.gov/bbep/bp>) 上按州的分类方式列出了流行病毒的发生情况。

病毒可以通过很多介体传播, 包括粉虱、螨类、线虫、蚜虫、飞虱、叶蝉、甲虫、蓟马和真菌。病毒也可通过机械以及种子或花粉传播。对于介体传播的病毒而言, 某一种病毒在田间条件下通过某一类介体传播。例如, 马铃薯 Y 病毒科 (*Potyviridae*) 3 个不同属的 3 种病毒, 马铃薯 Y 病毒 (PVY) (*Potyvirus* 属)、黑麦草花叶病毒 (*Rymovirus* 属) 和大麦黄花叶病毒 (*Bymovirus* 属) 由不相关的 3 类介体传播。在这个例子中, 蚜虫传播第 1 种病毒, 瘿螨 (*Aceria tulipae*) 传播第 2 种病毒, 禾谷多粘菌 (*Polymyxa graminis*) 传播第 3 种病毒。每一类群的介体在世界范围内传播特定的病毒 (Murphy et al, 1995)。

尽管这 3 类病毒都属于同一个科, 但是它们只能由特定的一类介体传播。这种病毒与介体相互作用的高度特异性, 是介体编码的特定受体与病毒编码的特定病毒蛋白之间相互作用的结果 (Murphy et al, 1995; Murrant et al, 1988b)。鉴定田间重要的介体类型 (包括学名和通用名) 是鉴定病毒及其生存环境工作的一部分。此外, 如果确认某些病毒基因是介体传播所必需的, 则应当提供这些基因的特征信息, 并简要描述它们是如何参与病毒传播的。

第四节 衣壳蛋白在转基因植物中的表达导致了抗病毒表型

Powell-Abel 等 (1986) 研究表明, 表达烟草花叶病毒 (TMV) 衣壳蛋白的转基因植物具有对烟草花叶病毒的抗性。此后, 已经通过基因工程技术对 30 多种植物 (包括双子叶植物和单子叶植物) 进行基因转化, 表达了 10 个病毒组群的 50 多种衣壳蛋白基因。其中很多转基因植株都进行了田间测试。推动这一研究的科学因素之一是交互保护现象, 即受弱病毒株侵染的植物经常受到保护而不再受同一病毒强毒株系的侵染。尽管交互保护的确切机制尚不清楚, 但是有证据表明, 衣壳蛋白参与了一些病毒的交互保护 (Matthews, 1991)。

交互保护已在世界农业中应用多年。在日本, 目前有 50 万株以上的番茄 (包括鲜食和加工用的番茄) 由于交互保护而不受黄瓜花叶病毒 (含起源于日本的卫星 RNA) 的侵染 (Sayama et al, 1993; Sayama, 未发表数据)。因交互保护而不受番茄花叶病毒 (ToMV) 侵染的番茄已经或正在在欧洲和日本销售 (传统的抗性品种也在广泛应用), 巴西的柑橘树因此而不受柑橘衰退病毒 (CTV) 的侵染 (Fulton, 1986), 番木瓜树因此受到保护, 使其不受番木瓜环斑病毒 (PRSV) 的侵染 (见 Yeh et al, 1988 的综述); 西葫芦由于交互保护而不受西葫芦黄花叶病毒 (ZYMV) 的侵染。在实施系统措施去除病毒之前, 很多马铃薯种薯已受到常见病毒弱株系的侵染, 包括马铃薯卷叶病毒 (PLRV)、马铃薯 X 病毒 (PVX) 和马铃薯 Y 病毒 (PVY) (Hooker, 1981), 因此常规技术已使马铃薯受到交互保护。目前这些方法仍然应用于很多营养繁殖的植物, 如草莓, 以及花圃和苗圃中的作物。

烟草花叶病毒和烟草是解释衣壳蛋白基因介导的保护作用的最好案例。现将该系统的研究情况简述如下。为了有效地保护烟草, 需要积累烟草花叶病毒的衣壳蛋白。保护作用的建立似乎并不涉及植物天然抗病系统的诱导。抗性保护作用主要是由于阻断了入侵的烟草花叶病毒衣壳蛋白的脱壳过程。不过, 有证据表明, 侵染后期的一个步骤也受到影响 (Reimann-Phillip and Beachy, 1993)。已经发现, 当衣壳蛋白来源于在自然界寄主植物的病毒株系时, 其保护作用好于另一寄主植物的近缘株系中的蛋白。表达番茄花叶病毒 (与烟草花叶病毒亲缘关系最近的病毒) 衣壳蛋白的番茄植株与表达烟草花叶病毒衣壳蛋白的番茄植株相比, 它在田间对番茄花叶病毒的保护作用更好 (Sanders et al, 1992)。其他病毒衣壳蛋白基因介导的抗性可能与烟草花叶病毒的作用方式不同。

田间测试表明, 衣壳蛋白基因能够成功介导保护作用, 这使大多数病毒学家相信, 很多 (但并非全部) 单链、正义 RNA 病毒 (约占植物病毒的 75%) (Beachy, 1993), 可成功地应用衣壳蛋白基因介导对病毒的抗性 (Ploeg et al, 1993)。美国开展的抗病毒植物田间测试多于其他经合组织 (OECD) 成员国。在美国, 大多数 (但非全部) 衣壳蛋白来源于通常侵染的寄主植物病毒。迄今为止, 导入到转基因植物中并进行了田间测试的大部分病毒序列均是亲本病毒的原始序列, 只进行了基因克隆相关的修饰。通过对一些衣壳蛋白基因改造, 使介体传播病毒的能力显著降低; 还有一些衣壳蛋白基因来源于自然条件下不

能被介体传播的病毒株系。某些情况下，自然条件下非侵染病毒株系中衣壳蛋白的表达可使转基因植物对近缘病毒具有抗性，该近缘病毒在自然条件下可能侵染、也可能不侵染这些植物（Stark and Beachy, 1989; Namba et al, 1992）。

另一个方法是通过去除一些核苷酸序列对衣壳蛋白基因进行改造，产生截短的衣壳蛋白（Lindbo and Dougherty, 1992a、1992b）。根据基因缺失的程度，截短的衣壳蛋白可能在病毒装配中起作用，也可能不起作用（Lindbo et al, 1993）。Dougherty 实验室的研究（Smith et al, 1994; Lindbo and Dougherty, 1992a、1992b）表明，非翻译衣壳蛋白 mRNA 的转基因也可以提供保护。尽管寄主因子可在这种抗性中发挥作用，这种抗性可能是由转基因的 RNA 和病毒 RNA 之间的直接相互作用产生的，通常称之为 RNA 介导的抗性（Smith et al, 1995）。

尽管有一些明显的例外，衣壳蛋白基因的反义表达（产生某一基因互补的、非编码转录体）在保护植物不受病毒侵染方面的效果不如正义表达，（Hammond and Kamo, 1995; Kawchuk et al, 1991; Lindbo and Dougherty, 1992a、1992b）。反义表达的成功率低于正义表达是可预见的，因为反义策略在细胞核中的基因表达水平上起作用，而大多数植物病毒在细胞质中增殖（Beachy, 1993）。衣壳蛋白的反义表达、截短形式的正义表达、或非翻译的正义表达所介导的抗性，是否与田间条件下正义表达所介导的保护一样有效，还需要进一步的调查研究。如果转基因植物表达的衣壳蛋白不能包裹病毒核酸，或不产生衣壳蛋白，则这将使第五节中提到的问题（异壳化/衣壳转移和协生作用）出现的概率降至最小。

衣壳蛋白介导的抗性可能对具有卫星 RNA 的病毒株系不是完全有效。这类小 RNA 经常可以改变受侵染植物的症状。根据寄主植物的基因型、卫星 RNA 的序列、辅助病毒和环境条件的不同，症状可能会减轻或加重（Matthews, 1991）。尽管在一些病毒中检测到卫星 RNA 和缺损干扰 RNA（defective-interfering RNA），但是尚不清楚这些 RNA 在自然条件下对病害发生所起的作用。对于已经检测到卫星 RNA 的大部分病毒而言，很少在田间受病毒侵染的植物中发现卫星 RNA，也未引起严重的病害流行。但是，有 2 个例外。在过去的十年中，黄瓜花叶病毒的卫星 RNA 在中国、意大利、日本和西班牙引起了严重的病害流行（Tien and Wu, 1991; Kaper et al, 1990）。另一个例子是花生丛簇病毒（groundnut rosette virus），引起丛簇症状的所有分离物均含有卫星 RNA（Murant et al, 1988a）。如果病毒含有卫星 RNA，则仅靠衣壳蛋白基因介导并不能保护植物不受侵染，可能还需要其他的基因工程措施（Yie and Tien, 1993）。

在国际病毒分类委员会（International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV）第 6 次报告中，建立了以胡萝卜花叶病毒作为模式种的幽影病毒属（*Umbravirus*）（Murphy et al, 1995）。幽影病毒在世界上分布广泛，但是只存在于同时受黄症病毒（luteovirus）侵染的植株中。幽影病毒通过人工机械传播，而黄症病毒只通过蚜虫传播，因此可区分上述两种病毒。然而，在田间条件下，幽影病毒的基因组通常被黄症病毒的衣壳蛋白所包裹，因此可以通过蚜虫传播。国际病毒分类委员会根据病毒的生物学特性正式确认了 4 种幽影病毒，此外，还提议了其他 4 个幽影病毒暂定种。迄今尚没有通过转基因生物技术生产抗幽影病毒转基因植物的报道，含有非衣壳蛋白的基因作为抗性表型来源的抗黄症病

毒植物可能在未来几年内商品化（见第五节）。欲了解详细情况，请参阅第一节第2段中引用的文章。

第五节 衣壳蛋白基因介导的病毒抗性对 病毒侵染潜在影响的相关问题

迄今为止，已经对应用衣壳蛋白基因介导的50多种抗病毒植物进行了田间试验，但是可能只有少数植物可在未来的几年中得到商业化种植。未来几年，在经合组织成员国中认为可进行商业化种植的抗病毒植物可能有：抗甜菜坏死黄脉病毒的甜菜；抗烟草花叶病毒的烟草；抗马铃薯卷叶病毒的马铃薯^①；抗马铃薯X病毒的马铃薯；抗黄瓜花叶病毒的番茄、辣椒和葫芦科植物；抗小西葫芦黄花叶病毒、西瓜花叶病毒2号、番木瓜环斑病毒的葫芦科植物；抗马铃薯Y病毒的马铃薯；抗马铃薯Y病毒的烟草；抗黄瓜花叶病毒的番茄和番木瓜环斑病毒的番木瓜。

一些可能进行商业化种植的植物可能含有以上多个抗性基因。本文试图重点介绍与以上所列病毒特别相关的信息或数据。

两种植物病毒（或同一病毒的两个不同株系）同时侵染某一细胞时，可观察到3种不同的相互作用，即异壳化（衣壳转移）、协生作用和重组。对各种相互作用进行了简单介绍，并分析了每种作用在应用衣壳蛋白基因介导的抗病毒转基因植物中可能起到的作用。

1. 异壳化（衣壳转移）

当植物细胞同时受某种病毒的两个不同株系（或两种病毒）侵染时，一种病毒的基因组可能会被另一种病毒的衣壳蛋白包裹。病毒被两个株系的衣壳蛋白包裹的现象称为表型混合 [衣壳混合 (mixed encapsidation)]。病毒只被其中一种衣壳蛋白包裹则称为基因组掩饰 (genomic masking)（或异壳化/衣壳转移）（简单地说，可以认为衣壳转移和基因组掩饰包括了表型混合现象，因为其中涉及的问题都是一样的）。据报道，尽管田间种植的植物和树木可受到多种病毒的侵染 (Abdalla et al, 1985; Falk and Bruening, 1994)，但是在田间条件下衣壳转移只在几种昆虫传播的病毒中情况下较为重要 (Falk et al, 1995)。

用大麦黄矮病毒的不同株系进行侵染最适于研究衣壳转移，衣壳蛋白可决定传播病毒的蚜虫类型 (Matthews, 1991) 使得这一现象在田间条件下具有重要意义，马铃薯Y病毒属病毒 (Bourdin and Lecoq, 1991; Lecoq et al, 1993) 和番茄丛矮病毒属病毒 (tomoviruses) (Dalmay et al, 1992) 也有这种现象 [同样的，有报道表明线虫传多面体病毒属病毒 (nepoviruses) 也有该现象 (Hiriart, 1995)]。衣壳转移的结果是产生伪装病毒，它的错配衣壳，有可能足以使病毒基因组转移到另一种寄主植物中。在之后伪病毒侵染中，基因组中携带的病毒衣壳蛋白基因直接翻译产生衣壳蛋白亚基，错配的（即异源的）病毒衣壳不被保留。因此，衣壳转移事件的发生是瞬时的，则任何潜在的影响只出现

^① 在北美、欧洲和日本，应用非衣壳蛋白基因作为抗性表型的来源，抗马铃薯卷叶病毒的品系可能要商业化种植。衣壳蛋白介导的对马铃薯卷叶病毒的抗性也已在很多国家进行了田间试验。

在伪装病毒 (masked virus) 对敏感寄主植物的第一轮侵染中。

对于一些病毒类群而言,衣壳蛋白以外的某种蛋白是决定特定生物是否可成功传播病毒的主要因子。这些病毒包括马铃薯 Y 病毒科病毒、花椰菜花叶病毒科病毒和矮化病毒属病毒 (Murphy et al, 1995)。这种介体传播蛋白在马铃薯 Y 病毒科病毒中被称为“辅助因子”(helper component),在花椰菜花叶病毒中被称为“蚜虫辅助传播因子”(aphid helper transmission factor) (Murphy et al, 1995)。来源于介体可传播株系的衣壳蛋白装配的异壳化病毒作物依靠合适且有功能的介体传播蛋白,才能通过异源昆虫介体进行有效传播 (Berger et al, 1989; Atreya et al, 1990)。相反,双生病毒 (geminiviruses) 和黄瓜花叶病毒属病毒 (cucumoviruses) 病毒衣壳蛋白即可决定是否可通过昆虫传播 (Matthews, 1991)。在真菌传播的棒状属病毒 (furoviruses) 和蚜虫传播的黄症病毒中,介体传播蛋白是由于衣壳蛋白终止密码子的通读而形成的 (Zaccomer et al, 1995; Schmitt et al, 1992; Wang et al, 1995)。水稻东格鲁球状病毒 (RTSV) 是蚜虫传播水稻东格鲁杆状病毒 (RTBV) 所必需的,因此可能编码一种蚜虫传播蛋白 (Dasgupta et al, 1991)。而另一些类群的病毒,我们对其参与介体传播的蛋白质的性质了解甚少。

考虑转基因植物中衣壳转移的可能性和重要性时,有两个问题需引起注意。如前所述,如果抗性植株中转入基因不产生衣壳蛋白,或不能在病毒装配中发挥作用,则不必考虑这些问题:

①转基因植物是否产生了足量的衣壳蛋白用于形成伪装病毒 (masked virus)? 非转基因植株中,与检测到病毒相同或不同的组织中是否有衣壳蛋白存在?

②如果产生伪装病毒,则是否具有新的生物学特性(介体传播和寄主范围),是否可测定到因衣壳转移而产生的任何效应,其效应是否显著?

各类植物病毒的混合侵染是自然界常见的现象 (Zink and Duffus, 1972; Davis and Mizuki, 1987; Duffus, 1963),因此很多关于植物病毒间发生异源衣壳转移的例子可能还未鉴定。不过,迄今研究表明,异源衣壳转移的互作只在大多数混合侵染的特定相互作用中发生。有证据表明,对于常规植物和抗病毒的转基因植物,均可能发生衣壳转移 (Rochow, 1972; Matthews, 1991; Farnelli et al, 1992; Osbourn et al, 1990; Dalmay et al, 1992; Holt and Beachy, 1992; Lecoq et al, 1993; Maiss et al, 1994; Candelier and Hull, 1993)。

由于抗病毒转基因植物即将商品化,一个重要的考虑因素是表达病毒衣壳蛋白的转基因植物是否会增加异源衣壳转移的可能性;如果这种可能性增加,是否会带来显著的风险。科学家评价抗病毒转基因植物中衣壳转移频率的一个方法是,比较转基因植物与类似的易感非转基因植物(见以上第1条)中衣壳蛋白的表达量。一种假设是:若衣壳蛋白的量相当或更少则可预测衣壳转移发生的频率与自然发生的混合侵染情况下的频率相当或更低。

另一个考虑因素是,转基因衣壳蛋白是否在天然受病毒侵染的非转基因植物的同一组织中合成。如果衣壳蛋白的合成是在同一组织,则不可能与只在其他植物组织中存在的病毒发生新的相互作用。如果植物受近缘病毒侵染,则转基因植物中可检测到的衣壳蛋白量可能会增加 (Farnelli et al, 1992)。衣壳蛋白量的增加可能是由于其被稳定在伪装病毒

(masked virus) 颗粒中, 与转基因 mRNA 的增加无关。若转基因植物接种了某些常见病毒而在田间条件下接种这种病毒后该植物通常会受到侵染, 则明智的做法是明确转基因植物中可检测到的转基因衣壳蛋白和 mRNA 的量。

这些考虑事项中已进入经合组织成员国行政评价过程的一个例子是 Asgrow 种子公司的 ZW20 南瓜; 这种南瓜通过转基因技术进行了改良, 通过表达各自的衣壳蛋白基因对西葫芦黄花叶病毒 (ZYMV) 和西瓜花叶病毒 2 号 (WMV-2) 具有抗性。美国对 ZW20 进行了审批。在撰写这一共识文件时, 它是唯一一种已经完成了必要审批、允许在一个经合组织成员国农业生产中应用的抗病毒植物。审批文件中的结论是, 衣壳蛋白在通常可测定到相应病毒的同一种植物组织中表达, 且产生的衣壳蛋白量小于或等于自然条件下受侵染植物中的量。接种番木瓜环斑病毒后, ZW20 中测定到的转基因衣壳蛋白量增加, 但转基因 RNA 的浓度没有增加。在番木瓜环斑病毒侵染的 ZW20 中测定到的转基因衣壳蛋白量仍然低于该病毒侵染的非转基因南瓜中的量。在对 Asgrow 公司下一个南瓜品系 (CZW-3) (抗黄瓜花叶病毒、ZYMV 和 WMV-2) 的评审中发现, 当该转基因植物受到番木瓜环斑病毒 (PRSV) 接种时, 转基因衣壳蛋白的量未增加。

已经证明, 在表达病毒衣壳蛋白的转基因植物中能发生异源衣壳转移 (Osborn et al, 1990; Dalmay et al, 1992; Holt and Beachy, 1992)。Lecoq 等 (1993) 表明, 转基因植物表达由蚜虫传播的病毒株系的衣壳蛋白, 且用非蚜虫传播的病毒株系 (衣壳蛋白有缺损, 蚜虫传播因子正常) 接种时, 检测到一种异源的、蚜虫可传播的病毒株系。另一个重要的问题是, 用亲缘关系较远的病毒接种时, 是否会发生衣壳转移。Candelier-Harvey 和 Hull (1993) 表明, 表达苜蓿花叶病毒衣壳蛋白的植物用黄瓜花叶病毒 [两者都是雀麦花叶病毒科 (*Bromoviridae*) 的成员] 接种时, 黄瓜花叶病毒基因组包裹在含有苜蓿花叶病毒衣壳蛋白的病毒颗粒中。由于苜蓿花叶病毒没有已知的昆虫介体, 因此不可评价其介体特异性的改变。

如果这些植物在田间由于病毒侵染而发生异源衣壳转移, 则至少应考虑两个重要的生物学结果。即: ①转基因植物中的异源衣壳转移可改变或有利于新的子代病毒颗粒 (由于异源衣壳转移而产生) 的介体传播能力; ②如果它们属于某一植物种, 而“正常的”病毒 (不是由于异源衣壳转移而产生的) 不易在其体内进行系统移动, 则转基因植物中的异源衣壳转移有利于所得子代病毒颗粒在体内的系统移动。如果发生第一种情况, 且病毒通过异源衣壳转移获得介体传播性, 则在转基因作物中或其他植物中新病害发生的可能性是否会增加? 由于耕作情况、地理位置、介体类型和丰度以及当地的作物类型和其他因素在不同国家会存在很大差异, 因此我们不可能预测所有情况的答案 (Falk et al, 1995)。我们随后将上述两种情况进行讨论。

情况 1A 转基因作物中病毒介体传播和病害发展的改变

如果由于表达衣壳蛋白的转基因植物受病毒侵染而引起异源衣壳转移, 由此而改变或有利于介体对某一植物病毒的传播, 不知是否会导致转基因作物更显著的病毒扩散和病害发展。在这种情况下, 由于异源衣壳转移向新的转基因植物扩散的病毒都含有来自原转基因植物中的衣壳蛋白。如果在同一田块这些伪装病毒 (masked virus) 再通过介体传播到另一表达衣壳蛋白的植物中 (二次扩散), 则它们可能会侵染这类植物,

也可能不侵染。在一个试验中, Osbourn 等 (1990) 用只以非包裹 RNA (unencapsidated RNA) 形式存在的烟草花叶病毒的一个株系 (DT1) 接种表达 U1 株系的功能衣壳蛋白的转基因烟草 (该株系的衣壳蛋白为缺陷型), 结果产生了 U1 衣壳蛋白包裹 DT1 RNA 的病毒颗粒。如果将伪装病毒颗粒接种到表达 U1 株系衣壳蛋白的转基因烟草中, 植物对该侵染具有抗性, 而非转基因的对照植株表现出预期的症状。这支持了在转基因作物中伪装病毒颗粒不可能发生二次扩散的观点, 因为转基因植物对伪装病毒颗粒具有抗性。

尽管在实验室条件下可检测到衣壳转移, 但是自然条件下的田间测试才能说明是否可能存在异源衣壳转移病毒颗粒 (heterologous transcapsidated virions) 的二次扩散。Gonsalves 博士及其同事已经试图在田间条件下测定衣壳转移的潜在生物学影响, 作为多年试验研究的一部分 (Gonsalves et al, 1994; Fuchs and Gonsalves, 1995)。已经开发出表达蚜虫高效传播的黄瓜花叶病毒 WL 株系中衣壳蛋白的甜瓜、南瓜和葫芦科植物 (已知衣壳蛋白是蚜虫传播黄瓜花叶病毒属病毒的唯一决定因子)。因所用植物品系的不同, 衣壳蛋白转基因的表达浓度有高有低。在 1993 和 1994 年的生长季, 将这些植物种植于田间, 并接种一个非蚜虫传播的黄瓜花叶病毒株系 (株系 C)。研究者调查了接种的转基因植物以及健康、未接种的对照植物中的异壳化的蚜虫传播黄瓜花叶病毒。这种异壳化的黄瓜花叶病毒含有来自于 C 株系的 RNA, 以及来源于转基因植物的 WL 株系衣壳蛋白。迄今尚未检测到黄瓜花叶病毒 C 株系从接种的转基因植物扩散到健康的非转化植物的现象 [1995 年的田间试验 (Fuchus, 未发表数据) 也出现了类似现象]。这些试验是在通常种植作物的地点进行, 蚜虫介体丰富, 且黄瓜花叶病毒是这些植物中的一种严重病原。对于其他病毒——植物系统和环境条件而言, 用其他病毒——作物系统进行的进一步研究将有助于证实这些研究结果 (情况 1A)。

情况 1B 在另一植物中病毒介体传播和病害发展的改变

如果在表达衣壳蛋白的转基因植物中发生异源衣壳转移现象, 则所得伪装病毒颗粒也可能被“新的”介体传播到另一非转基因的植物或作物中。在这种情况下, 转基因作物将作为新的病毒库 (就异源衣壳转移的病毒而言), 使病毒扩散到新的植物中。不过, 异源衣壳转移病毒颗粒向第二种植物的扩散只是初级扩散, 即从异壳化发生的转基因植物扩散至另一种不同的植物中。一旦异壳化的嵌合病毒颗粒侵染新的非转基因寄主, 它们将再次依靠由病毒核酸决定的表型, 因为该植物中衣壳蛋白的唯一来源是病毒基因组。对于通过非转基因植物群体进行二次传播的病毒而言, 它们不得不通过原来的介体进行扩散, 而这种介体在当地可能存在, 也可能不存在 (Falk et al, 1995)。对于很多植物病毒尤其是一年生作物的病毒而言, 考虑到初级扩散的潜在影响, 最常见且经济上最重要的扩散形式是二次扩散 (Simons, 1959; Alderz, 1978)。初级扩散通常只涉及少数几种或有限数量的植物, 且大多数情况下不引起重大的经济损失。相反, 二次扩散的速度快, 可以从最初侵染的植物中扩散到大量的其他健康植物中 (Matthews, 1991)。因此, 在以上的例子中, 如果转基因植物作为异壳化的嵌合病毒颗粒初级扩散到另一作物的源头, 则由于初级扩散引起的病害和病毒发生的范围可能是有限的。在非转基因植物中, 只有野生型病毒的天然介体存在, 才可能发生二次扩散。然而如果已经存在天然介体, 则其可能会引起初级传播

也可引起二次传播，两者都会导致野生型病毒发生扩散 (Falk et al, 1995)。当然，这种涉及病毒扩散流行病学的情况大部分取决于病毒、介体和各地特定的条件，这可能需要逐个进行调查。

情况 2 转基因植物内发生新的系统扩散而引起的病害发展

病毒从最初的侵染位点到整个植株中的移动称为系统侵染，它需要表达一个或多个病毒基因（专用的移动蛋白、衣壳蛋白和/或其他病毒蛋白）以及适宜的寄主植物（permissible host plant）（Hull, 1989; Maule, 1991; Dawson et al, 1988; Marchoux et al, 1993; Dolja et al, 1995; Cronin et al, 1995; Valkonen and Somersalo, 1995）。如果某一病毒不能离开最初的侵染位点进行系统移动，则这种侵染称为阈下侵染。在某些情况下，如果寄主受到另一种病毒的侵染，则原来只能引起阈下侵染（subliminal infections）的病毒可能不再受限。在大量的这类研究中（Atebekov and Talinsky, 1990），没有确定衣壳蛋白是否单独负责这种依赖于辅助因子的病毒移动，但是对于尚未发现专用移动蛋白的病毒类群而言，应当考虑衣壳蛋白是决定病毒移动的主要因子。

如果转基因植物中表达的衣壳蛋白有助于那些导致阈下侵染（subliminal infections）的病毒的移动，而它们又来源于很少或几乎不侵染受体寄主植物的病毒，那么这将是一个需要重点关注的问题。如果衣壳蛋白来源于在受体植物中广为流行的病毒，则与导致阈下侵染的病毒（subliminally-infecting viruses）不发生新的相互作用。这种情况对于在未来几年中将要商品化的转基因植物而言（见第五节）确实如此，它基于转基因与病毒在相同细胞中表达的假设。以下几种情况中出现的这类相互作用需要进一步研究。

①尽管提供转基因的病毒可能在大多数国家广泛流行，但是在不同国家可能存在不同的株系。转基因衣壳蛋白的生物学属性是否与另一国家存在的病毒株中的衣壳蛋白相同，还需要进行综合评价。

②如果提供衣壳蛋白转基因的病毒在某一国家不存在，那么转基因衣壳蛋白与导致阈下侵染的病毒之间可能存在新的相互作用。不过，如果病毒并非在经济上具有重要意义的病原物，则不可能（但是并非不可想象）要求某一国家的行政机构来审批抗这种病毒植物。

③如果提供转基因衣壳蛋白的病毒存在于某一国家，但是通常见于不同于受体转基因植物的物种中，则转基因衣壳蛋白与阈下侵染的病毒之间可能存在新的相互作用。

在所有这些情况下，如果引起受体植物阈下侵染的病毒已知，则易于通过试验来确定衣壳蛋白是否有利于其系统移动。病毒在转基因植物中的运动是否引起显著的危害损失取决于不同的病毒、不同的植物和各地不同的环境条件。病毒是否能够离开转基因植物移动取决于病毒的传播方式，尤其是病毒介体是否存在以及介体是否在转基因植物上取食。

尽管并未完成所有有关异源衣壳转移潜在影响的试验，但是两个经合组织成员国发表报道已经对异源衣壳转移可能带来潜在风险的问题得出了一些结论。这两个国家得出的结论可能不一定适应于所有成员。在向英国农业、渔业和食品业部（United Kingdom's Ministry of Agriculture, Fisheries and Food）提交的、题为“目前通过转基因技术开发抗病毒植物的策略对农业环境的风险”的报告中，Henry 等（1995）指出：“由于衣壳转移只是单次转移，即某一异壳化的病毒基因组被导入到新的寄主中时，它转而应用自己本

身的衣壳蛋白，因此总的来看衣壳转移不是问题”。在美国农业部生物科学研究所（American Institute of Biological Sciences (AIBS) for the U. S. Department of Agriculture）提交的抗病毒专题报告中，也得出了类似的结论（AIBS, 1995）：“转基因植物产生的衣壳蛋白引起的病毒 RNA 异壳化应当不会产生长期效应，因为侵染病毒的基因组没有改变”。

总之，在受病毒衣壳蛋白基因保护的植物中，异壳化病毒所产生的潜在影响通常不会比敏感植物受多种病毒侵染时所受到的影响更严重。不过，也有几个例子表明某些特定病毒类群仍然存在问题（there are a few cases with certain viral taxa where questions remain）。这些问题大部分可通过目前资助的研究课题或在品种开发过程中得以解决。

2. 共生作用

自然界中两种病毒同时侵染某一植物，偶尔会出现症状比其中一种病毒单独侵染该植物的症状更严重的现象，称之为共生作用（Matthews, 1991）。共生侵染通常可使植物严重感病，无法在市场上销售。马铃薯 X 病毒和马铃薯 Y 病毒的共生作用首次被报道，并研究得最为细致。大部分发生共生作用的病毒组合中都含有一种马铃薯 Y 病毒属病毒（见表 2-1，列出部分共生相互作用，该表由美国南加州大学的 V. Vance 博士制作）[这里只讨论影响症状发展的病毒间相互作用。其他特定的相互作用不在讨论之列，如在雀麦草花叶病毒存在时，烟草花叶病毒具有在大麦中系统移动的能力（Hamilton and Nichols, 1977），这可能是由于移动蛋白互补而引起的]。

如果抗性植株受到其他植物病毒的侵染，则衣壳蛋白介导的抗性是否会出现非预期的共生症状的表达？由于马铃薯 Y 病毒属病毒的衣壳蛋白不参与共生作用，因此其他病毒侵染了抗马铃薯 Y 病毒属病毒的转基因植物后不可能产生共生作用。也应当指出，参与共生作用的马铃薯 Y 病毒属病毒的特定基因可能将在未来几年中得到鉴定。研究重点已经集中到基因组 5' 末端 3 个可能的候选基因上，即 N-蛋白酶、辅助因子/蛋白酶和 50 kD 的未知功能蛋白（Vance et al, 1995）[初步的研究结果表明，导致共生症状的单个基因是马铃薯 Y 病毒和马铃薯 X 病毒中的辅助因子-蛋白酶（HC-Pro）基因，且该基因还能引起马铃薯 Y 病毒和番茄花叶病毒间的另一共生症状（Vance, 未发表数据）]。

与重组和衣壳转移不同，共生作用与产生新病毒的潜力无关，因此，可在农学方面而非环境方面考虑其影响。这种相互作用的潜力将是评价某一转基因农作物农艺性状的一个重要部分，同时，品种培育过程所用的评价标准中也可能包含潜在的相互作用。

3. 重组

重组的定义是两个核酸分子间核苷酸序列的交换。病毒基因组之间的重组产生可遗传、永久性的改变。重组病毒基因组的持久性取决于它在原来的寄主细胞中复制的适合度，它在亲本病毒存在时进行复制的能力，在寄主细胞内系统扩散的能力，或成功转移到其他寄主植物的能力。

影响重组率和可存活重组体检测的因素包括：核酸分子间的序列相似性和结构相似性、核酸的亚细胞定位和浓度、形成可存活重组病毒基因组所需的重组事件的数目（Lai, 1992）。无选择压力时田间种植的植物中天然存在的两种病毒或两种病毒株系间的重组频率尚未确定（Henry et al, 1995），并且难以或不可能有意义测定。重组被认为是在进化

的时间框架 (evolutionary time frames) 内病毒发生改变的一种重要机制, 发生非常频繁 (Simon and Bujarski, 1994)。

近来, 已经公布了很多已知病毒属中大量病毒株系的核苷酸序列。测序数据表明, 不同类群中的某些基因可能产生重组事件。在另外一些情况下, 某种病毒的单个株系含有明显来源于另一不同类群病毒的序列, 而所有其他近缘株系均不含有这些序列 [列出所有这些事件不在本文件的范围之内。不过, 数篇参考文献可为读者提供相应的补充信息 (Koonin and Dolja, 1993; Murphy et al, 1995; Sano et al, 1992; Edwards et al, 1992; LeGall et al, 1995; Pappu et al, 1994; Goulden et al, 1991; Mayo and Jolly, 1991; Revers et al, 1995; Gibbs and Cooper, 1995)]。目前, 还不可能确定例如自现代农业耕作措施发展以来或在更长的时间框架内是否发生过这些重组事件。然而, 有证据表明, 病毒基因组在更短的时间框架内 (即自从植物病毒学作为一门科学建立起来至今) 保持稳定。首先, 在过去的一个世纪中, 烟草花叶病毒的生物学特性十分稳定 (Ford and Tolin, 1983; Dawson, 1992); 其次, 在各国近 20 年的实验室利用过程中, 苜蓿花叶病毒 425 株系中的荷兰和美国 Wisconsin 亚株系已经有几个核苷酸的改变引起 5 个氨基酸发生改变, 而其生物学特性并未发生显著改变 (Jaspars, 1985)。

评估抗病毒转基因植物在农业中的应用潜力时应重视下列利用转基因植物时关于重组的问题:

①种植这些转基因植物时, 由于发生重组的机会增加, 那么自然界中病毒重组的总频率是否会增加?

②可能影响重组率的因素有什么, 重组率是否与亲本分子的浓度成正比?

③由此形成的重组体在与亲本病毒的竞争中能获胜吗?

近期可能获得的大多数转基因植物利用的衣壳蛋白基因来自时常侵染寄主植物的病毒, 因为这些病毒的危害给作物带来了持续时间最长的潜在损失。与受体植物中天然存在的混合侵染相比, 只要下述的某些条件满足, 这些病毒序列在重组时不太可能产生新的重组体 (不经常侵染寄主植物的病毒的基因可能有时会因试验或其他目的而被转入受体植物, 此处的论点未必适用于该情况)。迄今为止在试验中通过基因工程手段获得的大多数抗病毒植物中, 对靶标病毒产生有效抗性的转基因的表达水平与受病毒侵染的植物中相比, 通常较低。例如, 在 Asgrow 公司的 ZW20 南瓜中, 受病毒侵染的非转基因南瓜中病毒 RNA 的浓度比相应的转衣壳蛋白基因 ZW20 植株中高 100 倍。

尽管并非完全不可能, 但是很难说服科学家或育种学家来培育高水平表达转基因产物的植物新品种, 原因是低水平的表达似乎即可有效地使植物具有抗性。关于这一问题, AIBS 报告指出: “这些低水平表达对于重组的意义尚不清楚。即使假定转基因 RNA 的浓度越高, 重组的机会越大, 但我们不清楚有意义的浓度范围是多少, 相对于不可接受的重组率 (unacceptable recombination rates) 而言, 低浓度和高浓度的转基因转录本分别是多少? 目前这一信息 (转基因 RNA 的浓度) 对于行政机构而言没有意义” 因为无法以有意义的方式将 RNA 或蛋白质浓度纳入风险评估中 (AIBS, 1995)。尽管存在数量的不确定性, 以上第 III 节中关于病毒的特性、环境和病害压力确定等背景信息仍然是有帮助的。

衣壳蛋白基因介导的抗性的应用可能会使组织特异性病毒和其他病毒之间发生新的相

互作用。如果植物受到系统侵染（即在所有细胞类型中都存在病毒），则转基因的细胞定位可能不是一个主要问题。相反，如果将韧皮部特异性病毒的衣壳蛋白转基因应用于抗性中，则可能增加转基因转录本或基因产物与只在非韧皮部组织中复制的其他病毒之间发生新的相互作用的可能性。这些新的相互作用可能引起症状的改变，昆虫传播侵染病毒的改变，或侵染病毒在转基因植物体内移动的改变。不过，除非转基因和侵染病毒之间发生重组事件，且形成的重组病毒具有竞争性，否则这一影响将受到限制，只限于转基因作物。如果已知在这一作物中出现导致阈下侵染的病毒侵染，则可通过试验来评价转基因与这些病毒之间相互作用的一些重要参数（移动、症状和昆虫传播）。

表 2-1 已报道的病毒的协生作用

马铃薯 Y 病毒属 病毒引起的协生作用		参考文献
马铃薯 Y 病毒 (PVY)	马铃薯 X 病毒 (PVX)	Rochow, W. F., Ross, A. F. 1955. <i>Plant Disease (Reporter)</i> 52: 344-358.
烟草脉斑驳病毒	PVX	Vance, V., B. Berger, P. H., Carrington, J. C., Hunt, A. G., Shi, X. M. 1995. <i>Virology</i> 206: 583-590.
烟草蚀纹病毒 (TEV)	PVX	同上
辣椒斑驳病毒	PVX	同上
豇豆花叶病毒	黄瓜花叶病毒 (CMV)	Pio-Ribeiro, G., Wyatt, S. D., Kuhn, C. W. 1978. <i>Phytopathology</i> 68: 1260-1265.
豇豆蚜传病毒	CMV	Fisher, H. U., Lockhart, B. E. 1976. <i>Phytopathology Z.</i> 85: 132-138.
菜豆黄花叶病毒	CMV	Harrison, A. N., Gudauskas, R. T. 1968. <i>Plant Disease (Reporter)</i> 52: 509-511.
小西葫芦黄花叶病毒	CMV	Poolpol, P., Inouye, T. 1968. <i>Annals of Phytopathological Society of Japan</i> 52: 22-30.
大豆花叶病毒	菜豆荚斑驳病毒	Calvert, L. A., Ghabrial, S. A. 1983. <i>Phytopathology</i> 73: 992-997. Les, Y-S., Ross, J. P. 1968. <i>Phytopathology</i> 62: 839-845. Quiniones, S. S., Dunleavy, J. M. 1971. <i>Phytopathology</i> 763766. Ross, J. P. 1968. <i>Plant Disease (Reporter)</i> 52: 344-348.
SMV	豇豆花叶病毒	Anjos, J. R., Jarlfors, U., Ghabrial, S. A. 1992. <i>Phytopathology</i> 82: 17-23.
玉米矮花叶病毒 (MDMV)	玉米褪绿斑驳病毒 (MCMV)	Goldberg, K-B., Brakke, M. K. 1987. <i>Phytopathology</i> 77: 162-177. Niblett, C. I., Claflin, L. E. 1977. <i>Plant Disease (Reporter)</i> 62: 15-19. Uyemoto, J. K., Claflin, L. E., Wilson, D. L., Raney, R. J. 1981. <i>Plant Disease</i> 65: 39-41.
小麦线条花叶病毒	MCMV	同上
PVY	TMV	Clark, R. L., Hill, J. H., Ellis, M. D. 1980. <i>Phytopathology</i> 70: 131-134.
芜菁花叶病毒	花椰菜花叶病毒	Kahn, M. A., Demski, J. W. 1982. <i>Plant Disease</i> 66: 253-256.

(续)

马铃薯 Y 病毒属病毒引起的共生作用		参考文献
MDMV	大麦黄矮病毒	Belli, G., Cinquanta, S., Soneini, C. 1980. <i>Rivista Pathol. Veg.</i> 16: 83-86.
TEV	菟丝子潜隐花叶病毒	Bennett, C. W. 1949. <i>Phytopathology</i> 39: 637-646.
非马铃薯 Y 病毒属病毒引起的共生作用		
TMV	PVX	Vanterpool, T. C. 1926. <i>Phytopathology</i> 16: 311-331.
TMV	CMV	Garces-Orejuela, C., Pound, G. S. 1957. <i>Phytopathology</i> 47: 232-239.
TMV	烟草环斑病毒	同上
TMV	番茄不孕病毒	Holmes, F. O. 1956. <i>Virology</i> 611-617.
豇豆褪绿斑驳病毒	南方菜豆花叶病毒	Kuhn, C. W., Dawson, W. O. 1973. <i>Phytopathology</i> 63: 1380-1385.
苜蓿花叶病毒	马铃薯奥古巴花叶病毒	Kassanis, B. 1963. <i>Advances in Virus Research</i> 66: 253-256.

有人已经尝试在试验中应用转基因植物来评价转基因 mRNA 和竞争病毒基因组之间发生重组的潜在频率，并测定两种病毒（或两个病毒株系）之间的重组率。一些试验已经表明在表达来源于 DNA 病毒（Scholz and Wintermantel, 1993）或 RNA 病毒（Greene and Allison, 1994）序列的转基因植物中，病毒转基因和接种的缺陷型竞争病毒之间发生的重组可在高选择压下使其恢复成有功能的侵染性病毒。这些结果表明，如果接种缺陷型病毒，则表达病毒序列的植物中最终可发生重组事件。由于人们对这一领域非常感兴趣，因此可预期在接下来的几年中对重组影响因素的其他信息将有更深的理解。任何单一的试验设计都不能很好地概括所有可能的环境条件和病毒类群，且某些假设和条件只是某一试验设计的部分内容，因此在得出结论前，应当仔细解释关于重组的所有试验结果。在解释这些试验时，应当考虑的一些要点如下：

①转基因植物对病毒侵染敏感还是具有抗性？一些科学家已经建立了试验系统来研究重组，使用的表达病毒序列的转基因植物对提供转基因的病毒侵染敏感。在敏感性转基因植物中，来自侵染病毒的 RNA 量比抗性植物高；因此，在试验系统中，RNA 浓度高可增加重组的可能性。大多数（如果并非所有）含有衣壳蛋白基因的商品化转基因植物可能对提供转基因序列的病毒（或株系）的侵染具有抗性。

②试验中的选择压（selection pressure）是什么？AIBS 报告（1995）给出了如下定义：“高选择压的定义是有利于重组病毒的条件，例如，除非发生重组事件，否则病毒无法存活的条件。低选择压指的是在试验条件下新的表型不能使重组具有竞争优势的情况。”清楚了解病毒转基因和侵染病毒之间试验的选择压很重要，重组率应与两病毒（或两个病毒株系）间的天然重组率相比才能得出有意义的比较结果。在自然条件下，两种病毒（或病毒株系）之间的重组率可能高，也可能低。

③试验是在病毒的自然寄主中进行的吗？如果形成重组病毒，则它是否可与野生型病

毒竞争？重组率可能受到寄主生物的影响（Dawson, 1992）。寄主植物也影响侵染病毒的突变率（Dawson, 1992）。病毒学家经常用烟草属（*Nicotiana*）物种作为试验寄主，因为它们易于转化和生长，尽管烟草并不是所研究病毒的天然寄主。例如，花椰菜花叶病毒的自然寄主范围只限于芸薹属（*Brassica*）植物（Matthews, 1991），但已经有科学家在茄科植物中对这一病毒进行了试验（Takahashi et al, 1989; Baughman et al, 1989; Schoelz and Shepherd, 1988）。不过，在模式寄主植物中经常可观察到重组病毒的毒力增加（即出现更严重的症状），这种模式寄主植物不是病毒亲本（侵染病毒或提供转基因的病毒）的天然寄主。如果产生了重组病毒，则需要确定它与侵染病毒的自然寄主中的野生型病毒以及提供转基因序列的病毒之间是否存在竞争。

④与室内试验或温室试验相比，田间条件下进行的试验是否可带来另外的好处？相对于封闭条件下进行的测试，田间试验是否具有逻辑或概念上的优势取决于不同的试验。不过，在田间试验中，植物种植于商品化作物经常会遇到的自然胁迫条件下，包括植物可能通过含有当地流行病毒株系的介体接种，存在其他病害和有害生物（包括其他病毒）等。

如果重组病毒形成于（转基因植物或混合侵染期间）某一细胞中，则该细胞中参与复制过程的重组体是否可在植物中系统移动？或引起新的病害？大部分子代病毒显然在复制过程中不起作用。对于很多病毒而言，RNA 被衣壳蛋白包裹，细胞中的病毒 RNA 合成停止或降低至无法测定的水平。当植物细胞死亡时，根据不同的病毒以及是否传播到另一植株等情况，RNA 发生不同程度的降解（Matthews, 1991）。重组病毒定殖的可能性取决于很多因素，包括它与侵染病毒以及在自然条件下其他侵染该植物的病毒的竞争力，以及可能影响选择压力的所有其他因素（如气温、介体、寄主植物）。因此，为了预测两种病毒重组或病毒与来源于病毒的转基因之间重组而导致的新病毒病的发生可能性，需要详细了解细胞中病毒的种群生物学以及病毒在植株内的移动，并更好地理解病毒引起病害的机制。

很多关于重组病毒形成或新的病毒株系检测的讨论可能认为，病毒株系在诱导植物发生症状或核苷酸序列方面具有同质性。现已发现，经检测的所有单链 RNA 基因组均不是以唯一的核苷酸序列存在，而是以围绕保守序列的相近序列变体（related sequence variants）的集合形式存在。这种序列微异质性（microheterogeneity）总是存在于自然种群中（Holland et al, 1982; Domingo et al, 1985; Morch et al, 1988），已经形成了一些病毒的“准种（quasi-species）”概念（Eigen, 1993）。上述现象是由于病毒复制酶缺乏阅读校正功能（proof-reading function），且每一细胞中产生大量的病毒 RNA 而导致的。

已知一些病毒（如土传小麦花叶病毒）的某些基因中存在大的缺失（Matthews, 1991），但是大多数变体只发生一个或两个核苷酸的改变。通过症状的改变也可检测到变种。一个在烟草植株上引起局部褪绿斑的马铃薯 X 病毒株系经常可导致环斑局部枯斑的产生（Matthews, 1949）。一个使豇豆产生白色枯斑的烟草坏死病毒株系经常引起红色枯斑（Fulton, 1952）。因此，病毒 RNA 的微异质性可能导致序列变异，伴随从不明显的差异到明显的症状改变。当然，在某一类病毒中甚至会在序列及诱导植物产生症状方面发

生更大的变化, 因为许多病毒都有特性十分清楚且稳定的株系, 这些株系都被赋予了特有的标识 (Matthews, 1991)。

尽管关于病毒重组的其他研究目前正获得资助, 但是两个经合组织成员的报告已经对新病毒出现可能带来的潜在风险得出了结论。这两个国家得出的结论可能不一定适用于所有成员。在一份提交到加拿大农业和农业食品部 (Agricultural and Agri-Food Canada) 的报告中, Rochon 等 (1995) 认为: “加拿大目前用于测定和控制新病害的方法或可以充分控制转基因与另一病毒之间重组产生的新病毒”。提交到美国农业部 (USDA) 的 AIBS 报告 (1995) 认为: “不论是否应用转基因植物, 新的植物病毒病终将会发生, 这需要引起注意。”

毫无疑问, 需要培育很多作物新品种来抵御新出现的病毒或现有病毒的新株系。适当地应用科学分析来确保新品种的生物安全性, 将有助于有效地控制这些病害, 同时保护农业持续生产力和环境。

◆ 参考文献

- Abdalla, O. A., Desjardins, P. R., Dodds, J. A. 1985. Survey of pepper viruses in California by the ELISA technique. *Phytopathology* 75: 1311.
- Alderz, W. C. 1978. Secondary spread of watermelon mosaic virus 2 by *Anuraphis middletonii*. *Journal of Economic Entomology* 71: 531-533.
- American Institute of Biological Sciences (AIBS). 1995. Transgenic virus resistant plants and new plant viruses. Meeting report from AIBS workshop sponsored by U. S. Department of Agriculture. 47pp.
- American Phytopathological Society. Compendium of Plant Diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota. (A series of books on diseases of specific plants).
- Atebekov, J. R., Taliansky, M. E. 1990. Expression of a plant-virus encoded-transport function by different viral genomes. *Advances in Virus Research* 38: 201-248.
- Atreya, C. D., Raccach, C. D., Pirone, T. P. 1990. Amino acid substitutions in the coat protein results in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proceedings of National Academy of Sciences (USA)* 88: 7887-7891.
- Baughman, G. A., Jacobs, J. D., Howell, S. H. 1989. Cauliflower mosaic virus gene VI produces a symptomatic phenotype in transgenic tobacco plants. *Proceedings of National Academy of Sciences (USA)* 85: 733-737.
- Beachy, R. N. 1993. Transgenic resistance to plant viruses. *Seminars in Virology* 4: 327-328.
- Berger, P. H., Hunt, A. G., Domier, L. L., Hellman, G. M., Stram, Y., Thornbury, D. W., Pirone, T. P. 1989. Expression in transgenic plants of a viral gene product that mediates insect transmission of potyviruses. *Proceedings of National Academy of Sciences (USA)* 86: 8402-8406.
- Bourdin, D., Lecoq, H. 1991. Evidence that heteroencapsidation between two potyviruses is involved in aphid transmission of a nonaphid transmissible isolate from mixed infection. *Phytopathology* 28: 81: 1459-1464.
- British Society for Plant Pathology. 1984. Names of British plant diseases and their causes. *Phytopathological paper number 28*. 76pp.
- Brunt, A., Crabtree, K., Gibbs, A. 1990. Viruses of tropical plants: description and lists from the VIDE database. CAB International. 707pp.
- Candelier, H. P., Hull, R. 1993. Cucumber mosaic virus genome is encapsidated in alfalfa mosaic virus

- coat protein expressed in transgenic tobacco plants. *Transgenic Research* 2: 227-285.
- Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists (CMI/AAB). Description of Plant Viruses. (A series of pamphlets describing biology and biochemistry of specific viruses).
- Cronin, S. , Verchot, J. , Halderman-Cahill, R. , Schaad, M. C. , Carrington, J. C. 1995. Long-distance movement factor: A transport function of the potyvirus helper component. *The Plant Cell* 7: 549-559.
- Dalmay, T. , Rubino, L. , Burgyan, J. , Russo, M. 1992. Replication and movement of a coat protein mutant of cymbidium ringspot tobravirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5: 379-383.
- Dasgupta, I. , Hull, R. , Eastop, S. , Poggi-Pollini, C. , Blakebrough, M. , Boulton, M. I. , Davies, J. W. 1991.
- Rice tungro bacilliform virus DNA independently infects rice after *Agrobacterium*-mediated transfer. *Journal of General Virology* 72: 1215-1221.
- Davis, R. F. , Mizuki, M. K. 1987. Detection of cucurbit viruses in New Jersey. *Plant Disease* 71: 40-44.
- Dawson, W. O. 1992. Tobamovirus-plant interactions. *Virology* 186: 359-367.
- Dawson, W. O. , Bubrick, P. , Grantham, G. L. 1988. Modification of tobacco mosaic virus coat protein gene affecting replication, movement, and symptomatology. *Phytopathology* 78: 783-789.
- de Zoeten, G. 1991. Risk Assessment; Do we let history repeat itself. *Phytopathology* 81: 585-586.
- Dolja, V. V. , Haldeman-Cahil, R. , Montgomery, A. E. , Vandenbosch, K. A. , Carrington, J. C. 1995. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* 206: 1007-1016.
- Domingo, E. , Martinez-Salas, E. , Sobrino, F. , de la Torre, J. C. , Portela, A. , Ortin, J. , Lopez-Galindez, C. , Perez-Brena, P. , Villanueva, N. , Najera, R. , VandePol, S. , Steinhauer, D. , DePolo, N. , and Holland, J. 1985. The quasispecies (extremely heterogenous) nature of viral RNA genome populations; Biologicalrelevance-A review. *Gene* 40: 1-8
- Duffus, J. E. 1963. Incidence of beet viruses in relation to overwintering beet fields. *Plant Disease (Reporter)* 47: 428-431.
- Edwards, M. C. , Petty, I. T. D. , Jackson, A. O. 1992. RNA recombination in the genome of barley stripe mosaic virus. *Virology* 189: 389-392.
- Eigen, M. 1993. Viral quasispecies. *Scientific American* 269: 42-49.
- Falk, B. W. , Bruening, G. 1994. Will transgenic crops generate new viruses and new diseases. *Science* 263: 1395-1396.
- Falk, B. W. , Passmore, B. K. , Watson, M. T. , Chin, L. -S. 1995. The specificity and significance of heterologous encapsidation of virus and virus-like RNA's. In: *Biotechnology and Plant Protection: Viral pathogenesis and disease resistance*. Bills, D. D. and Kung, S. -D. (eds.). World Scientific, Singapore, pp. 391-415.
- Farnelli, L. , Malone, P. , Collet, G. F. 1992. Heterologous encapsidation of potato virus Y strain O (PVYO) with the transgenic coat protein of PVY strain N (PVY-N) in *Solanum tuberosum* cv Bintje. *Bio/Technology* 10: 1020-1025.
- Ford, R. , Tolin, S. A. 1983. Genetic stability of tobacco mosaic virus in nature. *Tobacco Science* 27: 14-17.
- Fuchs, M. , Gonsalves, D. 1995. Risk assessment of virus spread and gene introgression using transgenic vegetable crops expressing viral coat protein genes. Abstracts of the Annual Meeting of American Phytopathological Society. p. 186.
- Fulton, R. W. 1986. Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. *Annual Review of Phytopathology* 24: 67-81.

- Fulton, R. W. 1952. Mutation in a tobacco necrosis virus strain. *Phytopathology* 42: 156-158.
- Gibbs, M. J. , Cooper, J. I. 1995. A recombination event in the history of luteoviruses probably induced by base-pairing between the genomes of two distinct viruses. *Virology* 206: 1129-1132.
- Gonsalves, D. , Fuchs, M. , Klas, F. , Tennet, P. 1994. Field Assessment of risks using papaya, cucurbits, and tomatoes expressing novel coat protein genes. In: Proceedings of the 3rd International Symposium on " The biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms. Monterey, California, pp. 117-127.
- Goulden, M. G. , Lomonosoff, G. P. , Wood, K. R. , Davies, J. W. 1991. A model for the generation of tobacco rattle (TRV) anomalous isolates: pea early bowing RNA-2 acquires TRV sequences from both RNA-1 and RNA-2. *Journal of General Virology* 72: 1751-1754.
- Greene, A. E. , Allison, R. F. 1994. Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science* 263: 1423-1425.
- Hamilton, R. I. , Nichols, C. 1977. The influence of bromegrass mosaic virus on the replication of tobacco mosaic virus in *Hordeum vulgare*. *Phytopathology* 55: 1039-1040.
- Hammond, J. , Kamo, K. K. 1995. Effective resistance to potyvirus infection conferred by expression of antisense RNA in transgenic plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 674-682.
- Henry, C. M. , Barker, I. , Pratt, M. , Pemberton, A. W. , Farmer, M. J. , Cotten, J. , Ebbels, D. , Coates, D. , Stratford, R. 1995. Risks associated with the use of genetically modified virus tolerant plants. A report to the Ministry of Agriculture Fisheries and Food (MAFF), United Kingdom.
- Hiriart, 1995. Etudes des mécanismes moléculaires mis en jeu dans la résistance à l'infection de plantes transgéniques exprimant la protéine capsidique du virus de la mosaïque chromée de la vigne. Ph. D. thesis, University of Bordeaux. 137pp.
- Holland, J. , Spindler, K. , Horodyski, F. , Grabau, E. , Nichol, S. , Vande Pol, S. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215: 1577-1585.
- Holt, C. A. , Beachy, R. N. 1992. *In vivo* complementation of infectious transcripts from mutant tobacco mosaic virus cDNA's in transgenic plants. *Virology* 181: 109-117.
- Hooker, W. J. 1981. Compendium of potato diseases. American Society of Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 125pp.
- Hull, R. 1990. The use and misuse of viruses in cloning and expression in plants. In: Recognition and Response in Plant-Virus Interactions. NATO ASI, Vol 41, R. S. S. Fraser, ed. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, pp. 443-457.
- Hull, R. 1989. The movement of viruses in plants. *Annual Review of Phytopathology* 27: 213-240.
- Hull, R. 1994. Resistance to plant viruses: Obtaining genes by non-conventional approaches. *Euphytica* 75: 195-205.
- Jaspars, E. M. J. 1985. Interaction of alfalfa mosaic virus nucleic acids and protein. In: *Molecular Plant Virology*, vol. 1. Davies, J. W. (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 155-221.
- Kaper, J. M. , Gallitelli, D. , Tousignant, M. E. 1990. Identification of a 334-ribonucleotide viral satellite as principal aetiological agent in a tomato necrosis epidemic. *Research in Virology* 141: 81-95.
- Kawchuk, I. M. , Martin, R. R. , McPherson, J. 1991. Sense and antisense RNA-mediated resistance to potato leafroll virus in Russet Burbank potato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 427-453.
- Koonin, E. V. , Dolja, V. V. 1993. Evolution and taxonomy of positive-stranded RNA viruses: Implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 28: 375-430.
- Kruse, M. , Koenig, R. , Hoffman, A. , Kaufmann, A. , Commandeur, U. , Solovyev, A. G. , Savenk-

- ov, I., Burgermeister, W. 1994. Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strains groups of beet necrotic yellow vein virus. *Journal of General Virology* 75: 1835-1842.
- Lai, M. M. C. 1992. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiological Reviews* 56: 61-79.
- Lecoq, H., Ravelonandr, M., Wipf-Scheibel, Monision, M., Raccach, B., Dunez, J. 1993. Aphid transmission of a non-aphid transmissible strain of zucchini yellow mosaic potyvirus from transgenic plants expressing the capsid protein of plum poxvirus. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 3: 301-307.
- LeGall, O., Lanneau, M., Candresse, T., Dunez, J. 1995. The nucleotide sequence of the RNA-2 of an isolate of the English serotype of tomato black ring virus; RNA recombination in the history of nepoviruses. *Journal of General Virology* 76: 1279-1283.
- Lindbo, J. A., Dougherty, W. G. 1992a. Pathogen-derived resistance to a potyvirus: Immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5: 144-153.
- Lindbo, J. A., Dougherty, W. G. 1992b. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189: 725-733.
- Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Dougherty, W. G. 1993. Pathogen derived resistance to potyviruses: Working, but why? *Seminars in Virology* 4: 369-379.
- Maiss, E., Koenig, R., Lesemann, D. -E. 1994. Heterologous encapsidation of viruses in transgenic plants and in mixed infections. In: *Proceedings of the 3rd International Symposium on "The biosafety results of field tests of genetically modified plants and micro-organisms.* Monterey, California, pp. 129-139.
- Mansky, L. M., Hill, J. H. 1993. Molecular basis for virus disease resistance in plants. *Archives of Virology* 131: 1-16.
- Marchoux, 1993. Systemic infection of tobacco by peeper veinal mottle virus (PVMV) depends on the presence of potato virus Y. *Journal of Phytopathology* 137: 283-292.
- Matthews, R. E. F. 1991. *Plant Virology.* Academic Press, New York, 835pp.
- Matthews, R. E. F. 1949. Studies on potato virus X. I. Types of changes in potato virus X infections. *Annals of Applied Biology* 36: 448-459.
- Maule, A. J. 1991. Virus movement in infected plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 9: 457-473.
- Mayo, M. A., and Jolly, C. A. 1991. The 5'-terminal sequence of potato leafroll virus RNA; evidence of recombination between virus and host RNA. *Journal of General Virology* 72: 2591-2595.
- Morch, M. D., Boyer, J. -C., Haenni, A. -L. 1988. Overlapping open reading frames revealed by complete nucleotide sequence of turnip yellow mosaic virus genomic RNA. *Nucleic Acids Research* 16: 6157-6173.
- Murant, A. F., Raccach, B., Pirone, T. 1988b. Transmission by Vectors. In: *The Plant Viruses. The Filamentous viruses, vol. 4.* Milne, R. G. (ed.). Plenum Press, New York, pp. 237-273.
- Murant, A. F., Rajeshwari, R., Robinson, D. J., Raschke, J. H. 1988a. A satellite RNA of groundnut rosette virus that is largely responsible for symptoms of groundnut rosette disease. *Journal of General Virology* 69: 1479-1486.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghgabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., Summers, M. D. 1995. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses.* Springer-Verlag Wien, New York.

- Namba, S. , Ling, K. , Gonsalves, C. , Slightom, J. L. , Gonsalves, D. 1992. Protection of transgenic plants expressing the coat protein gene of watermelon mosaic virus 2 or zucchini yellow mosaic virus against six potyviruses. *Phytopathology* 82: 940-945.
- Osburn, J. K. , Sarkar, S. , Wilson, T. M. A. 1990. Complementation of coat protein-defective TMV mutants in transgenic plants expressing coat protein. *Virology* 179: 921-925.
- Palukaitis, P. 1991. Virus-mediated genetic transfer in plants. In: Risk assessment in genetic engineering. M. Levin and H. Strauss, eds. , McGraw-Hill New York, pp 140-162.
- Pappu, H. R. , Karasev, A. V. , Anderson, E. J. , Pappu, S. S. , Hilf, M. E. , Febres, V. J. , Eckloff, R. M. G. , McCaffery, M. , Boyko, V. , Gowda, S. , Dolja, V. V. , Koonin, E. V. , Gumpf, D. J. , Cline, K. C. , Garnsey, S. M. , Dawson, W. O. , Lee, R. F. , Niblett, C. L. 1994. Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology* 199: 35-46.
- Ploeg, A. T. , Mathis, A. , Bol, J. F. , Brown, D. J. F. , Robinson, D. J. 1993. Susceptibility of transgenic tobacco plants expressing tobacco rattle virus coat protein to nematode-transmitted and mechanically inoculated tobacco rattle virus. *Journal of General Virology* 74: 2709-2715.
- Powell Abel, P. , Nelson, R. S. , De, B. , Hoffmann, N. , Rogers, S. G. , Fraley, R. T. , Beachy, R. N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743.
- Reimann-Phillip, U. , Beachy, R. N. 1993. The mechanism (s) of coat protein-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Seminars in Virology* 4: 349-356.
- Revers, F. , Candresse, T. , Le Gall, O. , Dunez, J. 1995. Evidence for the frequent occurrence of recombinant potato virus Y isolates. *Annals du Tubac* 27: 65-71.
- Rochon, D. M. , Ellis, P. E. , Martin, R. R. , Sanforn, H. 1995. Transgenic plants expressing viral genes: Issues related to field releases. A report to Agricultural and Agri-Food Canada. 24pp.
- Rochow, W. F. 1972. The role of mixed infections in the transmission of plant viruses by aphids. *Annual Review of Phytopathology* 10: 101-1124.
- Sanders, P. R. , Sammons, B. , Kaniewski, W. , Haley, L. , Layton, J. , LaVallee, Delannay, X. , Tumer, N. E. 1992. Field resistance of transgenic tomatoes expressing the tobacco mosaic virus or tomato mosaic virus coat protein genes. *Phytopathology* 82: 683-690.
- Sano, Y. , Van der Vlugt, R. , deHaan, P. , Takahashi, P. , Goldbach, R. , Kojima, M. 1992. On the variability of the 3'-terminal sequence of turnip mosaic virus genome. *Archive of Virology* 126: 231-238.
- Sayama, H. , Sato, T. , Kominato, M. , Natusuaki, T. , Kaper, J. M. 1993. Field testing of a satellite-containing attenuated strain of cucumber mosaic virus for tomato protection in Japan. *Phytopathology* 83: 405-410.
- Schmitt, C. , Balmori, E. , Jonard, G. , Richards, K. E. , Guilley, H. 1992. In vitro mutagenesis of biologically active transcripts of beet necrotic yellow vein virus RNA 2: evidence that a domain of the 75-kDa readthrough protein is important for efficient virus assembly. *Proceedings of National Academy of Sciences (USA)* 89: 5715-5719.
- Schoelz, J. E. , Shepherd, R. J. 1988. Host range control of cauliflower mosaic virus. *Virology* 162: 30-37.
- Schoelz, J. A. , Wintermantel, W. M. 1993. Expansion of viral host range through complementation and recombination in transgenic plants. *Plant Cell* 5: 1685-1692.
- Simon, A. E. , Bujarski, J. J. 1994. RNA-RNA recombination and evolution in virus-infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 32: 337-362.

- Simons, J. N. 1959. Factors affecting secondary spread of nonpersistent aphid-borne viruses. *Proceedings of Florida State Horticultural Society*, pp. 136-139.
- Smith, H. A. , Powers, H. , Swaney, S. , Brown, C. , Doughery, W. G. 1995. Transgenic potato virus Y resistance in potato; Evidence for an RNA-mediated cellular response. *Phytopathology* 85: 864-870.
- Smith, H. A. , Swaney, S. L. , Parks, T. D. , Wernsman, E. A. , Dougherty, W. G. 1994. Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs; Expression, regulation, and fate of non-essential RNAs. *Plant Cell* 6: 1441-1453.
- Smith, I. M. , Dunez, J. , Phillips, D. H. , Lelliott, R. A. , Archer, S. A. 1988. *European Handbook of Plant Disease*. Blackwell Science, 583pp.
- Stark, D. M. , Beachy, R. N. 1989. Protection against potyvirus infection in transgenic plants; evidence for broad spectrum resistance. *Bio/Technology* 8: 127-134.
- Staskawicz, B. J. , Ausubel, F. M. , Baker, B. J. , Ellis, J. G. , Jones, J. D. G. 1995. *Molecular Genetics of Plant Disease Resistance*. *Science* 268: 661-667.
- Takahashi, H. , Shimamoto, K. , Ehara, Y. 1989. Cauliflower mosaic virus gene VI causes growth suppression, development of necrotic spots and expression of defence-related genes in transgenic tobacco plants. *Molecular General Genetics* 216: 188-194.
- Tepfer, M. 1993. Viral genes and transgenic plants. What are the potential environmental risks? *Bio/Technology* 11: 1125-1132.
- Tepfer, M. 1995. Potential ecological risks in transgenic plants expressing viral genes. In: *Unanswered Safety Questions when employing GMO' s*. Workshop Proceedings Leeuwenhorst Congress Centre Noordwijerhout, the Netherlands, pp. 41-45.
- Tien, P. , Wu, G. S. 1991. Satellite RNA for the biocontrol of plant disease. In: *Advances in Virus Research*, Maramorosch, K. , Murphy, F. A. , Shatkin, A. J. (eds.). Academic Press, London, vol. 39. pp. 321-339.
- US Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Biotechnology, Biologics, and Environmental Protection. List of Widely Prevalent Viruses by State. 4700 River Road, Riverdale, MD 20737 USA. [The list is available on the Internet at: <http://www.aphis.usda.gov/bbep/bp/>]
- USDA. 1966. *Plant Pest of Importance to North American Agriculture*. Index of Plant Virus Disease. *Agriculture Handbook No. 307*.
- Valkonen, J. P. T. , and Somersalo, S. 1995. Patterns and barriers of cell-to-cell movement and lack of systemic spread of tobacco etch potyvirus (TEV-GUS). *Plant Science* 113: 221-228.
- Vance, V. B. , Berger, P. H. , Carrington, J. C. , Hunt, A. G. , Shi, X. M. 1995. 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic plants. *Virology* 206: 583-590.
- Wang, J. Y. , Chay, C. , Gildow, F. E. , Gary, S. M. 1995. Readthrough protein associated with virions of barley yellow dwarf luteovirus and its potential role in regulating the efficiency of aphid transmission. *Virology* 206: 954-962.
- Wilson, T. M. A. 1993. Strategies to protect crop plants against viruses; pathogen derived resistance blooms. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 90: 3134-3141.
- Whitman, S. , DineshKumar, S. P. , Choi, D. , Hehl, R. , Corr, C. , Baker, B. 1994. The product of tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to Toll and the interleukin1 receptor. *Cell* 78: 1101-1115.
- Yeh, S. -D. , Gonsalves, D. , Wang, H. -l. , Namba, R. , Chiu, R. -J. 1988. Control of papaya ring-spot virus by cross protection. *Plant Disease* 72: 375-380.

- Yie, Y. , Tien, P. 1993. Plant virus satellite RNAs and their role in engineering resistance to virus diseases. *Seminars in Virology* 4: 363-368.
- Zaccomer, B. , Haemmi, A-L. , Macaya, G. 1995. The remarkable variety of plant RNA virus genomes. *Journal of General Virology* 76: 231-247.
- Zink, F. W. , Duffus, J. E. 1972. Association of beet western yellows and lettuce mosaic viruses with internal rib necrosis of lettuce. *Phytopathology* 62: 1141-1144.

第三章

抗草甘膦基因及其酶的一般信息共识文件*

第一节 除草剂抗性

很多除草剂通过干扰植物中酶的功能杀死植物。这些除草剂大多数只对植物中催化关键代谢反应的一种酶产生作用。通常植物对农业中应用的除草剂表现的敏感性程度不同；有些物种对某一除草剂可表现相当强的抗性。植物抗除草剂的机制有多种：①植物产生某种酶，使除草剂失去毒性；②植物产生的靶标酶发生了改变，这种靶标酶不受除草剂的影响；③植物产生物理或生理屏障，阻止除草剂被吸收到植物组织和细胞中(Devine et al, 1993)。

第二节 草甘膦除草剂

草甘膦广泛用作广谱性杂草的防治，并在很多国家进行了登记 (Duke, 1996; Shah et al, 1986)。尽管草甘膦是磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 合成中 5-烯醇式丙酮酰-3-磷酸莽草酸合酶 (EPSPS) 的可逆型竞争性抑制剂，但是它不抑制其他依赖于磷酸烯醇式丙酮酸的酶反应。草甘膦是 3-磷酸莽草酸合成中 5-烯醇式-3-磷酸莽草酸合酶的非竞争性抑制剂 (Steinrucken et al, 1984)。草甘膦是通过化学合成而产生的，它不是一种天然产物。草甘膦的化学名称为 N-磷酰甲基-甘氨酸 (见图 1)。草甘膦是除草剂 Roundup[®] (Monsanto) 的有效成分。

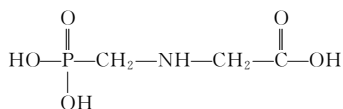


图 3-1 草甘膦的结构

作物对草甘膦的高度敏感性使草甘膦仅能在免耕管理措施中作为苗前除草剂以及作物收获前作为除草剂和作物干燥剂应用。随着抗草甘膦转基因作物的开发，该除草剂可在作物和杂草出苗后施用，且只对作物产生很小的破坏甚至不产生破坏。

草甘膦通过抑制 5-烯醇式丙酮酰-3-磷酸莽草酸合酶 (EPSPS) 干扰植物的正常代谢。在植物和微生物中，EPSPS 参与芳香族氨基酸、维生素和很多次级代谢产物的生物合成，

* Originally published by the OECD in English under the title: "Consensus Document on General Information Concerning the Genes and Their Enzymes that Confer Tolerance to Glyphosate Herbicide" © 1999 OECD. All rights reserved.

动物中不存在 EPSPS (Levin and Sprinson, 1964, Steinrucken and Amrhein, 1980)。EPSPS 位于植物的质体中, 这种酶将磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 和 3-磷酸莽草酸转变成 5-烯醇式丙酮酰-3-磷酸莽草酸 (5-enolpyruvyl-3-phosphoshikimic acid)。由于草甘膦使芳香族氨基酸的生物合成受到抑制, 从而干扰蛋白质的合成, 导致植物死亡 (Kishore and Shah, 1988)。EPSPS 反应的一些下游产物氨基酸和维生素是所有生物体生长所必需的, 而且莽草酸途径中产生的一些次生代谢物对于生物的存活可能具有特殊的作用 (Malik, 1986)。EPSPS 具有严格的底物专一性, 其底物为 3-磷酸莽草酸和磷酸烯醇式丙酮酸 (Anderson and Johnson, 1990)。EPSPS 的反应产物 5-烯醇式丙酮酰-3-磷酸莽草酸 (EP-SP) 在其他酶的进一步作用下产生分支酸, 分支酸可产生邻氨基苯甲酸 (色氨酸的前体), 并且可通过重排产生预苯酸 (苯丙氨酸和酪氨酸的前体)。

根据草甘膦的作用方式, 有多个开发抗除草剂植物的策略。两个成功产生抗草甘膦植物的策略是引入抗草甘膦的 EPSPS 和引入使草甘膦失活的酶——草甘膦氧化还原酶 (GOX)。人们已经应用重组 DNA 技术在敏感植物中单独表达抗草甘膦的 EPSPS, 或同时表达 EPSPS 和 GOX (Nida et al, 1996; Padgett et al, 1995, 1996)。

第三节 抗草甘膦植物的开发

科学家应用传统技术没有成功生产出抗草甘膦的植物。迄今为止, 传统的突变和选择技术无法使作物达到有效的抗性水平, 尽管这些方法可使除草剂抗性基因发生突变并保留催化功能。通过对种子进行化学处理或辐射处理等使植物基因组发生突变的标准技术, 育种人员也无法育出抗草甘膦的作物。如果要获得抗除草剂表型, 有时可在生长箱中或田间对幼苗进行除草剂喷雾处理, 从数百万突变的植株中成功选择出抗性植株。尽管这一方法已经用于抗咪唑啉酮类除草剂玉米和大豆品种的商业开发中, 但是该方法没有成功开发出抗草甘膦的植物。这是因为突变的 EPSPS 在产生草甘膦抗性的同时, 降低了对磷酸烯醇式丙酮酸的亲和性。这就使抗草甘膦植物总是表现出芳香族氨基酸生物合成的下降。

人们已经应用重组 DNA 技术生产出对草甘膦具有抗性的多种作物。该方法向植物中转化编码抗草甘膦酶的基因, 这种抗草甘膦的酶不受草甘膦的抑制, 还能提供氨基酸生物合成的底物。在一些情况下, 通过表达草甘膦氧化还原酶 (GOX) 的基因而使草甘膦失去毒性, 可进一步增强对草甘膦的抗性。

第四节 抗草甘膦的基因和酶

已经在商业栽培品种中引入了 3 个基因, 使植物在田间具有对草甘膦 (Roundup 除草剂有效成分) 的抗性。第一个抗草甘膦的 EPSPS 基因分离自土壤农杆菌 *Agrobacterium* (Barry et al, 1994; Duke, 1996)。农杆菌的 EPSPS 合成酶对草甘膦具有高度的抗性。农杆菌基因编码的 EPSPS 酶在转基因植物中表达, 能够满足植物在草甘膦存在的条件下对芳香族氨基酸的需求, 而植物中的该酶 (在自然界普遍存在) 对草甘膦敏感。农杆菌属各菌株对人或动物不具有致病性, 但是一些菌株对植物具有致病性 (Croon, 1996;

Holt, 1984)。

最近, 已经将玉米中的 EPSPS 基因进行体外突变来获得抗草甘膦的酶。该玉米基因产生的抗性酶与亲本植物的酶具有 99.3% 的相似性 (Monsanto, 1997)。

此外, 从自然界中广泛存在的土壤无色菌 *Achromobacter* 菌株 LBAA 中分离出一个编码草甘膦降解酶的基因, 称之为草甘膦氧化还原酶 (Barry et al, 1994)。该酶使草甘膦失去除草效果。草甘膦氧化还原酶催化草甘膦转变成氨甲基磷酸 (AMPA) 和乙醛酸。草甘膦氧化还原酶的活性需要黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 和镁, 因此该酶实际上是一种脱辅基酶蛋白。

草甘膦作用的靶标酶 EPSPS 在细胞质中合成, 然后被运输到叶绿体中 (Kishore and Shah, 1988)。蛋白质运输到叶绿体中需要叶绿体转运肽 (CTP) 的 N-末端蛋白质序列的作用。叶绿体转运肽运输到质体后从成熟蛋白中切割下来并降解 (Della-Cioppa et al, 1986)。植物的叶绿体转运肽的编码序列经常与植物抗草甘膦性状的各基因连锁。转运肽将新翻译的酶运输到叶绿体中, 叶绿体既是莽草酸途径的场所也是草甘膦作用的位点。

应用转基因手段在植物中进行转基因的表达现在已是常规技术。为了使细菌基因在植物中高效表达, 在将来源于细菌的基因导入到植物中之前, 研究人员通常对这些基因的密码子偏爱性进行修饰。通过化学合成来源于农杆菌 *Agrobacterium* 的 EPSPS 基因和来源于无色菌 *Achromobacter* 的草甘膦氧化酶基因来改变密码子的偏爱性, 使密码子在植物中最有效地表达, 而所得酶的氨基酸序列没有改变。带有转运肽编码序列的基因通常与其他调节序列如启动子、终止子、增强子和内含子连接, 这些调节序列通常不编码蛋白质 (Croon, 1996)。

通过基因工程手段已经将这些基因以单个或组合的形式转入到多种植物中, 用于以开发抗草甘膦的性状, 或用作选择性标记鉴定转化植株。转入基因进行田间测试的植物有: 甜菜 *Beta vulgaris*、玉米 *Zea mays*、棉花 *Gossypium hirsutum*、莴苣 *Lactuca sativa*、白杨树 *Populus*、马铃薯 *Solanum tuberosum*、油菜 *Brassica napus*、大豆 *Glycine max*、烟草 *Nicotiana tabacum*、西红柿 *Lycopersicon esculentum*、小麦 *Triticum aestivum*。

OECD 成员国已经成立政府机构, 负责管理转基因植物的田间测试和生产应用, 并在各成员国中共享这些信息。OECD 启用了—个电子版的数据库用于该信息交流。同时, 定期对数据库进行更新, 以提供最新、最准确的信息 (www.oecd.org/ehs/service.htm)。

第五节 转基因在植物中表达的影响

在抗除草剂植物的生活史中, 植物很少接触除草剂。除了产生抗草甘膦的酶之外, 植物应当不发生其他代谢方面的改变。施用草甘膦之后, 转基因表达的酶活性使植物在接触除草剂之后仍然存活。就转入的 EPSPS 而言, 由于它与天然酶的唯一差异是对草甘膦不敏感, 因此没有产生新的代谢产物。不过, 如果转基因插入后引起很高水平的基因表达, 下游代谢产物的含量可能会发生改变。相反, 草甘膦氧化还原酶在应用草甘膦除草剂时将使草甘膦转变成氨甲基磷酸 (AMPA) 和乙醛酸 (Torstensson, 1985)。由于乙醛酸是植

物中天然存在的参与碳循环的代谢物，其可被进一步代谢为三羧酸循环的中间产物。由于草甘膦氧化还原酶具有高度的底物专一性，即只对草甘膦起作用，因此不存在草甘膦时没有代谢产物产生。美国环境保护局规定只对植物和动物商品中草甘膦的残留进行管理，其主要的代谢产物氨甲基磷酸不具有毒理学方面的问题（US EPA, 1997）。关于抗草甘膦除草剂植物的决议可见网页：

<http://www.olis.oecd.org/bioproduct.nsf>

http://www.cfia-acia.agr.ca/english/plant/pbo/home_e.html (Canada)

<http://ss.s.affrc.go.jp/docs/sentan/eguide/commerc.htm> (Japan)

<http://www.aphis.usda.gov/biotech/petday.html> (USA)

http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scp/outcome_en.html (European Commission)

Western 免疫印迹和酶活性分析表明，来源于农杆菌 *Agrobacterium* 菌株 CP4 的 EPSPS 蛋白在模拟胃液中培养不到 2 分钟就发生降解。在模拟肠液中，酶活性和免疫反应性持续时间长一些，在培养 10 分钟时仍然可测定到，但在培养 270 分钟时就测定不到了。草甘膦氧化还原酶在模拟胃液和模拟肠液中快速降解。Western 免疫印迹分析表明，在胃液中培养 15 秒草甘膦氧化还原酶的蛋白质抗原决定簇只有最初的不到 90%，在胃液中培养 1 分钟酶活性损失了 90% 以上。在模拟肠液中也得到类似结果（US EPA, 1996、1997）。

由于表达草甘膦氧化还原酶和 EPSPS 植物的农艺性状与亲本相似，因此草甘膦氧化还原酶和 EPSPS 的表达对于植物的生长不产生有害作用。很多国家的管理机构，如美国农业部（US Department of Agriculture, 1994、1995、1997）、加拿大农业部（Agriculture and Agrifood Canada, 1995、1996）、日本农林水产省（Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 1996）和欧盟（European Commission, 1998a、1998b）都认为，EPSPS 和草甘膦氧化还原酶蛋白在植物中的存在不会对环境造成危害。多个证据表明这些酶对哺乳动物有较低的毒性：①这些酶与已知过敏源或哺乳动物毒素不具有氨基酸序列同源性（Burke and Fuchs, 1996）；②口服急性毒性测试数据表明，这些酶在高浓度下不具有毒性（Harrison et al, 1996）。在对来源于细菌的 CP4 EPSPS 蛋白的急性口服毒性测试中，受试动物在 572mg/kg 剂量下未见不良影响。对来源于细菌的草甘膦氧化还原酶的急性毒性测试结果表明，在 91.3mg/kg 剂量下未见不良影响；③在热或温和的酸性条件下，这两种酶均容易失活，且在体外消化试验中容易降解，这与不存在口服毒性的结果一致（US EPA, 1996、1997）。这两种酶毒性很小的情况符合前人关于大多数酶对脊椎动物无毒的观察结果（Kessler et al, 1992）。白喉毒素和蛇毒中的某些酶则是例外，这些酶与哺乳动物的接触情况很特别（因而对哺乳动物有毒）。

美国、加拿大、日本和欧盟的管理机构认为，植物中存在的 EPSPS 和 GOX 蛋白释放到环境中后不会产生明显的致敏性风险。两方面的证据证明了这些酶不是潜在的过敏原：①目前的科学知识表明，通常的食品过敏原能抗热、酸和蛋白酶的降解，可发生糖基化，并在食品中以高浓度存在。EPSPS 和 GOX 蛋白能被体外胃液快速降解，不发生糖基化。因此这些蛋白质成为食品过敏原的可能性很小（Astwood et al, 1996, Burke and

Fuchs, 1996); ②利用国际基因数据库可对某一蛋白质的基因序列与其他编码已知过敏原的基因进行比对。序列中8个相同的连续氨基酸比对结果表明, 已知毒蛋白和过敏原的氨基酸序列与EPSPS或GOX蛋白不具有相似性。同样的, 以引起乳糜泻的已知毒蛋白和过敏原的氨基酸序列与GOX蛋白不具有相似性(US EPA, 1997)。

◆ 参考文献

- Agriculture and Agri-food Canada (as of 1 April 1997, the Canadian Food Inspection Agency). 1995. Monsanto Canada Inc.'s Glyphosate-tolerant soybean (*Glycine max* L.) Line GTS 40-3-2. DD95-05. (Available electronically at <http://www.cfia-acia.ca/english/food/pbo/bhome.html>)
- Agriculture and Agri-food Canada, Food Production and Inspection Branch (as of 1 April 1997, the Canadian Food Inspection Agency). 1996. Monsanto Canada Inc.'s Roundup Herbicide-Tolerant Brassica napus Canola line GT200. DD96-07. (Available electronically at <http://www.cfia-acia.ca/english/food/pbo/bhome.html>)
- Anderson, K. S. and Johnson, K. A. 1990. Kinetic and structural analysis of enzyme intermediates; lessons from EPSP synthase. *Chem. Rev.* 90: 1131-1149.
- Astwood, J. D., Leach, J. N. and Fuchs, R. L. 1996. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnology* 14: 1269-1273.
- Barry, G., Kishore, G., Padgett, S., Taylor, M., Kolacz, K., Weldon, M., Re, D., Eichholtz, D., Fincher, K. and Hallas, L. 1992. In: Singh, B. K., Flores, H. E. and Shannon, J. C. (eds.), *Bio-synthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants*. American Society of Plant Physiologists, Madison, Wisconsin, pp. 139-145.
- Barry, G. F., Taylor, M. L., Padgett, S. R., Kolacz, K. H., Hallas, L. E., Della-Cioppa, G. and Kishore, G. M. 1994. Cloning and Expression in *Escherichia coli* of the Glyphosate-to-Aminomethylphosphonic Acid Degrading Activity from *Achromobacter* sp. strain LBAA. Monsanto Technical Report MSLB13245, St. Louis.
- Burke, A. W. and Fuchs, R. L. 1996. Assessment of the endogenous allergens in glyphosate-tolerant and commercial soybean varieties. *J. Allergy and Clinical Immunology* 96: 1008-1010.
- Croon, K. S. 1996. Petition for Determination of Nonregulated Status; Insect-protected Roundup Ready Corn Line MON 802. USDA Petition No. 96-317-01P.
- Della-Cioppa, G., Bauer, S. C., Klein, B. K., Shah, D. M., Fraley, R. T. and Kishore, G. 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83: 6873-6877.
- Della-Cioppa, G., Bauer, S. C., Taylor, M. T., Rochester, D. E., Klein, B. K., Shah, D. M., Fraley, R. T. and Kishore, G. M. 1987. Targeting a herbicide-resistant enzyme from *Escherichia coli* to chloroplasts of higher plants. *Bio/Technology* 5: 579-584.
- Devine, M., Duke, S. O. and Fedtke, C. 1993. *Physiology of Herbicide Action*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp. 251-294.
- Duke, S. O. 1996. *Herbicide resistant crops*. CRC Press, New York.
- European Commission, Directorate General XXIV, Policy and Consumer Health Protection; Scientific Committee on Plants. 1998a. Opinion of the Scientific Committee on Plants regarding submission for placing on the market of fodder beet tolerant to glyphosate notified by DLF-Trifolium, Monsanto and Danisco Seed (notification C/K/97/01) (Opinion expressed by SCP on 23 June 1998). (See: http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scp/out16_en.htm)

- European Commission, Directorate General XXIV, Policy and Consumer Health Protection; Scientific Committee on Plants. 1998b. Opinion of the Scientific Committee on Plants regarding the genetically modified cotton tolerant to glyphosate herbicide notified by the Monsanto Company (notification C/ES/97/01) (Opinion expressed by the SCP on 14 July 1998). (See: http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scp/out17_en.htm)
- Hallas, L. E., Hahn, E. M. and Korndorfer, C. 1988. Characterization of microbial traits associated with glyphosate biodegradation in industrial activated sludge. *J. Ind. Microbiol.* 3: 377-385.
- Harrison, L. A., Bailey, M. R., Naylor, M. W., Ream, J. E., Hammond, B. G., Nida, D. L., Burnette, B. L., Nickson, T. E. and Mitsky, T. A. 1996. Recombinant 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in glyphosate-tolerant soybeans is digestible. *J. Nutr.* 126 (3): 728-40.
- Holt, J. G., editor-in-chief. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. William and Wilkins, Baltimore.
- Japan, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. 1996. Current Status of Commercialization of Transgenic Crop Plants in Japan. (Available electronically at <http://ss.s.affrc.go.jp/docs/sentan/index.htm>)
- Kessler, D. A., Taylor, M. R., Maryanski, J. H., Flamm, E. L. and Kahl, L. S. 1992. The safety of foods developed by biotechnology. *Science* 256: 1747-1732.
- Kishore, G. and Shah, D. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 627-663.
- Levin, J. G. and Sprinson, D. B. 1964. The enzymatic formation and isolation of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate. *J. Biol. Chem.* 239: 1142B1150.
- Malik, V. S. 1979. Genetics of applied microbiology. *Advances in Genetics* 20, 37-126.
- Malik, V. S. 1986. Genetics of Secondary Metabolism in Biotechnology, Vol. 4, pp. 39-68. H. -J. Rehm and G. Reed (eds.), Springer-Verlag, New York, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Metcalf, D. D., Astwood, J. D., Townsend, R., Sampson, H. A., Taylor, S. L. and Fuchs, R. A. 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36 (S): S165-186.
- Monsanto. 1995. Petition for Determination of Nonregulated Status; Insect-protected Roundup Ready Corn Line MON 802. (Submitted to United States Department of Agriculture, Petition No. 96B317B01P.)
- Monsanto. 1997. Petition for determination of nonregulated status; Roundup Ready Corn Line GA21 (Submitted to United States Department of Agriculture, Petition No. 97-099-01P.) (Copies of the documents are available from USDA-APHIS, Unit 147, 4700 River Road, Riverdale, Maryland 20737.)
- Nida, D. L., Kolacz, K. H., Buehler, R. E., Deaton, W. R., Schuler, W. R., Armstrong, T. A., Taylor, M. L., Ebert, C. C. and Rogan, G. J. 1996. Glyphosate-tolerant cotton: Genetic characterization and protein expression. *J. Agric. Food Chem.* 44 (7) : 1960-1966.
- Organisation for Economic Cooperation and Development. 1992. Good Developmental Principles (GDP): Guidance for the Design of Small-Scale Research with Genetically Modified Plants and Micro-organisms. In: *Safety Considerations for Biotechnology*. OECD Publications, pp. 27-50.
- Organisation for Economic Cooperation and Development. 1993. *Safety Considerations for Biotechnology: Scale-up of Crop Plants*. OECD Publications, 40pp.
- Padgett, S. R., Kolacz, K. H., Delannay, X., Re, D. B., La Vallee, B. J., Tinius, C. N., Rhodes, W. K., Otero, Y. I., Barry, G. F., Eichholtz, D. A., Peschke, V. M., Nida, D. L., Taylor, N. B. and Kishore, G. M. 1995. Development, identification, and characterization of a

- glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Science* 35 (5) 1451-1461.
- Padgett, S. R., Re, D. B., Barry, G. F., Eichholtz, D. E., Delannay, X., Fuchs, R. L., Kishore, G. M. and Fraley, R. T. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready gene. In: Duke, S. O. (ed.), *Herbicide-resistant crops: Agricultural, environmental, economic, regulatory, and technical aspects*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, and London, England, pp. 53-84.
- Shah, D., Horsch, R., Klee, H., Kishore, G., Winter, J., Tumer, N., Hironaka, C., Sanders, P., Gasser, C., Aykent, S., Siegel, N., Rogers, S. and Fraley, R. 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233: 478-481.
- Steinrucken, H. C. and Amrhein, N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 94: 1207-1212.
- Steinrucken, H. C. and Amrhein, N. 1984a. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae*: inhibition by glyphosate [N-(phosphonomethyl)-glycine]. *Eur. J. Biochem.* 143:351-357.
- Steinrucken, H. C. and Amrhein, N. 1984b. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae*. I. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 143: 341-349.
- Torstensson, L. 1985. Behavior of glyphosate and its degradation. In: Grossbard, E. and Atkinson, D. (eds.), *The Herbicide Glyphosate*. Butterworths, Boston, pp. 137-150.
- United States Department of Agriculture. 1994. Petition under 7CFR Part 340. Petition Number 93-258-01p, Monsanto, Soybean, Herbicide Tolerance, Glyphosate-tolerant. Approved 5/19/94. (See: <http://www.aphis.usda.gov/bbep/bp/petday.html>)
- United States Department of Agriculture. 1995. Petition under 7CFR Part 340. Petition Number 95-045-01p, Monsanto, Cotton, Herbicide Tolerance, Glyphosate-tolerant. Approved 7/11/95. (See: <http://www.aphis.usda.gov/bbep/bp/petday.html>)
- United States Department of Agriculture. 1997. Petition under 7CFR Part 340. Petition Number 96-317-01p, Monsanto, Cotton, Herbicide Tolerance, Glyphosate-tolerant. Approved 5/27/97. (See: <http://www.aphis.usda.gov/bbep/bp/petday.html>)
- United States Environmental Protection Agency. 1996. Plant pesticide inert ingredient CP4 enolpyruvylshikimate-3-3 and the genetic material necessary for its production in all plants. *Federal Register*, Vol. 61, No. 150, pp. 40338-40340. (Available electronically at <http://www.access.gpo.gov>)
- United States Environmental Protection Agency. 1997. Glyphosate oxidoreductase and the genetic material necessary for its production in all plants; exemption from tolerance requirements on all raw agricultural commodities. *Federal Register*, Vol. 62, No. 195, pp. 52505-52509). (Available electronically at <http://www.access.gpo.gov>)
- United States Food and Drug Administration. 1996. FDA Evaluation of Bioengineered Soybean & Corn Varieties. (Available electronically at <http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/biotechm.html>)

第四章

抗草铵磷基因及其酶的一般信息共识文件*

第一节 除草剂抗性

很多除草剂通过干扰植物中酶的功能杀死植物。酶是催化植物代谢过程中不同反应的蛋白质。一些除草剂只对植物中催化关键代谢反应的一种酶产生作用。通常，植物对农业中应用的除草剂表现的敏感性程度不同，有些植物种对某一除草剂可表现相当强的抗性。植物抗除草剂的机制有多种：①植物产生某种酶，使除草剂失去毒性；②植物产生的靶标酶发生了改变，这种靶标酶不受除草剂的影响；③植物产生物理屏障或生理屏障，阻止除草剂被吸收到植物组织和细胞中 (Devine et al, 1993)。

通过重组 DNA 技术将两个细菌基因 (*pat* 或 *bar*) 中的一个转移到植物中，而产生一种酶 (草铵磷乙酰转移酶, PAT)，使很多种植物具有了对草铵磷的抗性 (见第五节)。草铵磷乙酰转移酶在植物细胞中的表达使除草剂 L-PPT (草铵磷 L-异构体) 失去毒性，从而使植物抗 L-PPT。本文总结了抗草铵磷基因的来源、基因所编码的酶的特征以及转基因在植物中表达的结果。最后，建议读者访问 OECD BioTrack 在线网页，了解小规模田间试验条件下抗草铵磷植物的现状 (<http://www.olis.oecd.org/biotrack.nsf>)，以及获准进行商品化释放的抗草铵磷植物的现状 (<http://www.olis.oecd.org/bio-prod.nsf>)。

第二节 草铵磷磷丝菌素除草剂

磷丝菌素除草剂

磷丝菌素是一种氨基酸，即 4- (羟基 (甲基) 膦酰基) -DL-高丙氨酸 (4- [hydroxy-(methyl) phosphinoyl] -D, L-homoalanine)。磷丝菌素的 L 型异构体 (L-PPT) 被用作广谱杂草防治药剂，在很多国家获得登记，用作除草剂。磷丝菌素的 D 型异构体 (D-PPT) 不表现除草活性。L-PPT 是除草剂草铵磷的有效成分。草铵磷是一种 D-PPT 和 L-PPT 以等摩尔分子组成的外消旋混合物。尽管 D-PPT 不具有除草活性，但是 L-PPT 可抑

* Originally published by the OECD in English under the title: "Consensus Document on General Information Concerning the Genes and Their Enzymes that Confer Tolerance to Phosphinothricin Herbicide" © 1999 OECD. All rights reserved.

制敏感植物的谷氨酰胺合成酶,使其积累致死剂量的氨。由于 L-PPT 对多种植物具有除草活性,因此被认为是一种广谱除草剂。一些物种对 L-PPT 的敏感性大于其他物种。关于草铵膦除草剂的性质和草铵膦除草剂应用方面的更多信息可从管理该除草剂的政府机构获得。例如,美国环境保护局管理除草剂的应用,在其网页 (<http://www.epa.gov/ngispgm3/subst/irisbak/0247.htm>) 上保留了草铵膦的健康评价信息。

微生物产生的 L-PPT

链霉菌属 *Streptomyces* 和北里孢菌属 *Kitasatosporia* 是据报道唯一合成氨基酸 L-PPT 的生物。这两个属的菌株均为革兰氏阳性、产孢子的土壤微生物,通常称之为放线菌 (Cross, 1989; Locci, 1989)。

L-PPT 是两个三肽即双丙氨膦 (bialaphos) 和磷丙氨菌素 (phosalacine) 的组成成分 (Wild and Ziegler, 1989, Omura et al, 1984)。双丙氨膦是吸水链霉菌 *Streptomyces hygroscopicus* 和绿产色链霉菌 *S. viridochromogenes* 天然产生的三肽: 膦酰基-L-丙氨酰基-L-丙氨酸 (phosphinothricyl-L-alanyl-L-alanine)。每个双丙氨膦分子由 L-PPT 和两个丙氨酸残基构成。磷丙氨菌素是光燧北里孢菌 *Kitasatosporia phosalacinea* 产生的三肽: 膦酰基-L-丙氨酰基-L-亮氨酸 (phosphinothricyl-L-alanyl-L-leucine) (Takahashi et al, 1984)。肽酶的活性易于打断肽键,从双丙氨膦或磷丙氨菌素中释放 L-PPT (Thompson et al, 1987, Wild and Ziegler, 1989, Omura et al, 1984)。

L-PPT 是许多商品化除草剂制剂的有效成分。L-PPT 可从发酵培养产生的双丙氨膦中得到,也可通过化学合成得到。草铵膦是 L-PPT 和 D-PPT 的等摩尔外消旋混合物。目前没有商品化的除草剂使用磷丙氨菌素。

L-PPT 的作用模式

以 L-PPT 为有效成分的除草剂具有广谱杀草谱。L-PPT 是谷氨酸盐的结构类似物,谷氨酸盐是谷氨酰胺合成酶的底物 (见图 4-1, L-PPT 和谷氨酸盐的比较)。L-PPT 通过抑制谷氨酰胺合成酶表现除草效应 (Bayer et al, 1972)。在 ATP 存在时, L-PPT 通过不可逆地抑制谷氨酰胺合成酶 (Devine et al, 1993), 在植物中积累对植物具有毒性的氨 (Mifflin and Lea, 1976; Tachibana et al, 1986)。

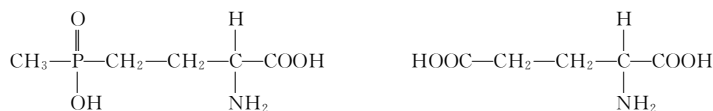


图 4-1 膦丝菌素 L-异构体 (左) 和谷氨酰胺 (右) 的比较

谷氨酰胺合成酶在真核生物和原核生物中催化谷氨酸和氨合成谷氨酰胺。这是将氮同化为有机化合物途径中的第一个反应。植物中的谷氨酰胺合成酶存在多个异构酶,它们可位于细胞质和质体中。并且,谷氨酰胺合成酶的各种异构酶主要位于特定的植物组织或器官中 (McNally et al, 1983)。在植物根中,谷氨酰胺合成酶的主要作用是同化氨。而叶片中的谷氨酰胺合成酶主要是使氨再同化和解毒 (Shah et al, 1986; Kishore and Shah, 1988)。谷氨酰胺合成酶是植物在光呼吸、硝酸盐还原和氨基酸降解过程中唯一释放的氨解毒酶。

随着科学家对 L-PPT 作用模式理解的增进, 已经出现了多个开发抗除草剂植物的策略。两个最显著的策略是: ① 鉴定对 L-PPT 抑制作用不敏感的谷氨酰胺合成酶突变体; ② 引入一个基因, 该基因编码的酶可使 L-PPT 失去除草活性。尽管有人尝试应用第一个策略 (AgrEvo, 1994), 但是迄今为止只有第二个策略能够使植物抗 L-PPT。

第三节 抗 L-PPT 植物的研发

传统植物育种技术。 迄今为止, 育种人员还没有成功应用“传统的”植物技术来获得抗 L-PPT 作物。在研发抗 L-PPT 作物的过程中, 育种人员试图从作物本身的种质或近缘物种中鉴定出理想的性状。然后通过有性杂交将理想的性状转入作物, 一些有性杂交可能需要通过人为干预才可成功。

另一方面, 在不存在理想性状的种质中, 育种人员应用化学或辐射诱导突变的方法产生突变体, 然后评价其效果和农艺表现。这一技术依赖于作为除草剂靶标的植物酶 (即受除草剂抑制的酶) 的微修饰。突变使靶标酶仍然可以发挥作用, 但是失去了对除草剂的敏感性。这一方法已经成功用于玉米和大豆品种的开发, 产生不再对咪唑啉酮类除草剂和磺酰脲除草剂敏感的乙酰乳酸合成酶 (Saari and Mauvais, 1996; Shaner et al, 1996)。读者如对抗除草剂植物的开发感兴趣, 可查阅 Dyer (1996) 的综述。

但是这类突变和选择技术没能在农作物中产生对 L-PPT 的抗性。其中就包括试图获得具有不受 L-PPT 抑制的谷氨酰胺合成酶玉米的失败经历 (AgrEvo, 1994)。

重组 DNA 技术。 过去的十年中, 人已经成功应用重组 DNA 技术使各种农作物获得对 L-PPT 的抗性 (见下面的介绍)。采用这一方法, 用两个细菌基因 (*pat* 或 *bar*) 中的一个对植物进行了转化, 这两个基因编码膦丝菌素乙酰转移酶, 可以使 L-PPT 失去毒性。膦丝菌素乙酰转移酶在转基因植物中的表达已经应用于 3 个方面: ① 为农作物生产提供有效的 L-PPT 抗性水平; ② 作为实验室或田间选择的标记; ③ 结合雄性不育系统, 提供选择性遗传标记。

农业上应用的 L-PPT 抗性。 一些表达膦丝菌素乙酰转移酶的转基因植物, 种植者将植物对 L-PPT 的抗性用于农业生产。例如, 抗 L-PPT 的转基因植物油菜 HCN92 (甘蓝型油菜 *Brassica napus* L.), 它是政府机构批准的第一个抗 L-PPT 植物。HCN92 于 1995 年获得加拿大政府机构授权, 允许生产种植, 以及用作食品和饲料 (Agriculture and Agri-Food Canada, 1995a、1995b、1996a、1996b)。此后, 其他抗 L-PPT 的转基因作物相继通过相关政府机构的审批。

OECD “Biotrack On-line” 数据库 (<http://www.olis.oecd.org/bioprod.nsf>) 登载了关于这类审批的最新列表。

L-PPT 作为选择标记。 在一些具有 *pat* 基因或 *bar* 基因的转基因植物中, 该基因用作选择标记。这类植物不需要表达对农业生产中有用的 L-PPT 抗性水平。标记基因可使研究人员在实验室内选择转化体, 因此经常应用于转基因植物的研发。此外, L-PPT 的抗性可用作田间的选择标记。Vasil (1996) 指出, 在一些植物中, L-PPT 抗性标记比卡那霉素抗性更为有用, 卡那霉素抗性是自植物重组 DNA 研究以来就应用的选择标记。应用

L-PPT 抗性 (由 *bar* 基因赋予) 作为选择标记的第一个转基因植物已经于 1995 年在美国获得批准 (USDA, 1995)。

L-PPT 抗性选择作为雄性不育系统的一部分。用 L-PPT 进行的转化可单独应用, 也可与其他基因共同应用。例如, 将 PAT 表达作为转基因雄性不育系统的一部分, 用于产生 F1 代杂交种 (Mariani et al, 1990)。在这一系统中, 把阻断花粉产生的基因和 PAT 选择标记基因一起构建重组体转化植物。PAT 在转化植物中的表达可以使 L-PPT 成为生产体系的一部分, 供植物育种人员生产杂交种子。1996 年, 美国用该雄性不育系统获得的转基因玉米品系获得了批准 (见 U. S. Department of Agriculture 网页: <http://www.aphis.usda.gov/biotech>)。这类雄性不育系统目前正应用于油菜、菊苣和玉米品种的开发和种子生产中。

多种植物已经进行了 *pat* 基因或 *bar* 基因的遗传转化; 一些植物已经进行小规模田间试验, 以评价其在田间条件下的表现。截至 1997 年, 这类植物有: *Agrostis palustris* (匍匐剪股颖)、*Avena sativa* (燕麦)、*Arachis hypogaea* (花生)、*Beta vulgaris* (甜菜)、*Brassica oleracea* (结球甘蓝)、*Chichorium intybus* (菊苣)、*Daucus carota* (胡萝卜)、*Festuca arundinacea* (高羊茅)、*Gossypium hirsutum* (棉花)、*Hordeum vulgare* (大麦)、*Lycopersicon esculentum* (西红柿)、*Medicago sativa* (苜蓿)、*Gladiolus* sp. (剑兰)、*Cucumis melo* (甜瓜)、*Populus* spp. (白杨树)、*Solanum tuberosum* (马铃薯)、*Brassica napus* (油菜)、*Oryza sativa* (rice)、*Glycine max* (大豆)、*Sorghum bicolor* (高粱)、*Saccharum officinarum* (甘蔗)、*Nicotiana tabacum* (烟草)、*Triticum aestivum* (小麦) 和 *Zea mays* (玉米)。

许多国家已经建立了转基因植物田间试验和生产应用的管理机构。感兴趣的读者可通过 OECD 成员国了解这些植物的信息。网上的数据库定期进行更新, 将提供最新、最准确的信息 (<http://www.oecd.org/ehs/service.htm>)。

第四节 抗 L-PPT 的基因和酶

基因的供体生物

两种放线菌即绿色产色链霉菌 *Streptomyces viridochromogenes* 和吸水链霉菌 *S. hygroscopicus* 是使植物具有 L-PPT 抗性的基因的来源 (Thompson et al, 1987, Kumada et al, 1988; Hara et al, 1991)。链霉菌属 *Streptomyces* 为腐生性、土传微生物, 它不是植物、人类或其他动物的病原菌 (Locci, 1989; Cross, 1989)。

已经从绿色产色链霉菌 *S. viridochromogenes* 和吸水链霉菌 *S. hygroscopicus* 中分离出编码 PAT 酶的基因。在吸水链霉菌 *S. hygroscopicus* 中, PAT 由 *bar* (即抗双丙胺磷, bialaphos-resistance) 基因编码, 在绿色产色链霉菌 *S. viridochromogenes* 中, PAT 由 *pat* 基因编码 (一些研究人员将由 *bar* 基因编码的 PAT 称为 BAR)。*pat* 基因和 *bar* 基因十分相似, 在核苷酸序列上具有 87% 的同源性 (Wohlleben et al, 1988、1992)。*pat* 基因和 *bar* 基因编码的 PAT 酶也十分相似, 在氨基酸水平上具有 85% 的同源性 (Wohlleben et al, 1988、1992)。Wehrmann 及其同事 (1996) 发表了 *bar* 基因和 *pat* 基因编码

PAT 酶的详细特征鉴定结果。他们认为 *pat* 基因和 *bar* 基因编码的 PAT 酶十分相似，具有等同的 L-PPT 抗性功能。

对天然基因进行改良使其在植物中高效表达

为了使 *pat* 基因和 *bar* 基因在植物中高效表达，科学家通常的做法是在将其转入到植物之前，改变来源于细菌基因的密码子使用模式。来自链霉菌 *Streptomyces* spp. 的 *bar* 基因和 *pat* 基因的 GC 含量相对高于植物基因，因此天然的微生物基因在植物中不能有效表达。这种情况下，在将天然的链霉菌 *Streptomyces* 基因导入到植物之前，首先进行改良以增加表达量，而所得 PAT 酶的氨基酸序列没有改变 (Eckes et al, 1989; USDA, 1995)。

来源于细菌的基因需要加上合适的可在植物中表达的调控序列 (如启动子、增强子、内含子和终止子)。这些调控序列不编码氨基酸，因此不影响 PAT 酶的编码区。有关转基因在植物中表达应用调控序列的进一步讨论不在本文件范围之列。

PAT 酶的特异性

bar 基因和 *pat* 基因编码的 PAT 酶都表现出：①具有相同的 L-PPT 抗性功能；②对其底物具有高度的特异性 (Wehrmann et al, 1996)。在乙酰辅酶 A 存在时 (作为共同底物)，PAT 酶催化 L-PPT 的游离氨基发生乙酰化，产生 N-乙酰-L-PPT，该化合物不会使谷氨酰胺合成酶失活。两种 PAT 酶都对 L-PPT 具有高度特异性，不能催化其他 L-氨基酸发生乙酰化，也不能催化 D-PPT 发生乙酰化 (Wehrmann et al, 1996; AgrEvo, 1994)。在过量 L-氨基酸存在时，两种 PAT 酶催化 L-PPT 乙酰化的能力不受影响。

在 PAT 表达量相对较高的抗 L-PPT 植物中，L-PPT 代谢的主要残留物是 N-乙酰-L-膦丝菌素 (Droege-Laser et al, 1994)。当 PAT 表达量低时，L-PPT 的降解途径可导致 L-PPT 敏感植物中存在残留代谢物，即 4-甲基-膦酰基-2-羟基-丁酸和 3-甲基膦丝菌素-丙酸 (4-methyl-phosphinico-2-hydroxy-butanoic acid and 3-methylphosphinico-propionic acid) (Droege-Laser et al, 1994)。

第五节 转基因在植物中表达的影响

在抗除草剂植物的生活史中，植物很少接触除草剂。当除草剂 L-PPT 施用到抗除草剂植物上时，植物中的膦丝菌素乙酰转移酶 (PAT) 使 L-PPT 对植物无毒。PAT 酶将膦丝菌素 (L-PPT) 乙酰化形成无活性的化合物，从而使 L-PPT 解毒。转基因油菜 (甘蓝型油菜 *Brassica napus* L.) 的代谢研究表明，L-PPT 快速转变为无毒的代谢物，N-乙酰草铵磷 (European Commission, 1998)。有人报道 PAT 对 L-PPT 和二甲基膦丝菌素 (demethylphosphinothricin, DMPT) 具有极高的底物特异性 (Thompson et al, 1987)，试验数据表明，它不能使 L-PPT 的类似物 L-谷氨酸、D-PPT 乙酰化，也不能使任何蛋白或氨基酸乙酰化 (Wehrmann et al, 1996, Agriculture and Agri-Food Canada, 1995a、1995b)。

用 *pat* 基因或 *bar* 基因进行遗传转化时，作物的农艺表现与其亲本相似，PAT 的表达对植物生长无害。这一结论在抗 L-PPT 菊苣 *Chichorium intybus*、甘蓝型油菜 *Brassica*

napus 和玉米 *Zea mays* 商品化之前, 已经在加拿大、欧盟和美国管理机构在公布的决议文件中进行了介绍。有关抗草铵磷植物的决议可见网页:

<http://www.olis.oecd.org/bioprod.nsf>

http://www.cfia-acia.agr.ca/english/plant/pbo/home_e.html (加拿大)

<http://ss.s.affrc.go.jp/docs/sentan/eguide/commerc.htm> (日本)

<http://www.aphis.usda.gov/biotech/petday.html> (美国)

http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scp/outcome_en.html (欧盟)

近年来, 已经对大量的植物致敏成分进行了鉴定。过敏源具有许多共同特征, 包括: ①它们是蛋白质; ②它们的分子量在 10~70 kDa 之间; ③它们通常 (但不绝对) 被糖基化; ④它们对消化作用 (哺乳动物消化系统的胃蛋白酶和胰蛋白酶) 稳定; ⑤它们对加工过程稳定; ⑥它们是特殊食品中的主要蛋白质组分 (Metcalf et al, 1996, FAO/WHO 1996, Fuchs and Atwood, 1996)。PAT 蛋白不是已知过敏原。SDS-PAGE 分析表明, *pat* 基因和 *bar* 基因产物的分子量为 22~23 kD, 略高于推算的分子量 (20.6 kD)。凝胶过滤层析表明其 43 kD 的峰 (同源二聚体) 具有活性 (Wehrmann et al, 1996)。研究还发现, 在模拟胃液条件时, *pat* 基因和 *bar* 基因产生的 PAT 蛋白和 BAR 蛋白都在数秒内降解, 且在 5~15 秒内酶活性降为 0。

其他研究表明, 把 PAT 酶置于典型的哺乳动物胃环境时, 它在 1 分钟内失活; 在油菜种子 (表达 PAT 的转基因甘蓝型油菜 *Brassica napus* 种子) 加工成饲料过程中, PAT 酶失活 (European Commission, 1998)。据 USEPA (1997) 报道, PAT 蛋白在胃环境中快速降解, 且容易经热或低 pH 变性。很多食品过敏原的生化特征已经鉴定, 相关数据库可以使我们将某一蛋白质的氨基酸序列与数据库中已知过敏原进行比较。GeneBank DNA 数据库 (Agriculture and Agri-Food Canada, 1995a) 和 FASTDB 多肽数据库 (Agriculture and Agri-Food Canada, 1995b) 比对结果表明, PAT 酶除了与来源于不同生物的其他膦丝菌素乙酰转移酶具有氨基酸序列同源性之外, 与数据库的其他蛋白不具有显著的氨基酸序列同源性。没有发现 PAT 酶与潜在的毒素或过敏原具有相似之处。USEPA (1997a) 认为, “PAT 蛋白成为食品过敏原的可能性极小”。

当蛋白质具有毒性时, 它们可通过急性机制并在极低的剂量下起作用 (Sjobald et al, 1992)。没有证据表明 PAT 蛋白对人或动物有毒。在用细菌产生的纯化 PAT 酶对小鼠进行的 14 天饲喂试验中, 小鼠经口服用高剂量蛋白 (5 050 mg/kg 体重) 后, 未产生相关的显著毒性效应 (USEPA, 1995)。有人报道用取食种子的金丝雀 *Serinus canaria domestica* 进行鸟类日粮毒性试验 (avian dietary test), 以及用家兔 *Oryctolagus cuniculus* 进行饲喂试验。这些研究表明, 取食表达 PAT 酶的转基因油菜 (甘蓝型油菜 *Brassica napus* L.) 和对应的非转基因油菜之间, 未发现金丝雀和家兔的取食量、行为和体重存在差异 (Agriculture and Agri-Food Canada, 1995b)。

就 PAT 的毒性而言, 美国环境保护局 (USEPA) 认为, “提交的急性口服毒性数据支持了 PAT 蛋白对人类无毒这一预测结果”。美国环境保护局根据提交的毒理学数据, 决定免除植物中的膦丝菌素乙酰转移酶 (PAT) 及其表达该酶遗传物质的残留限量 (USEPA, 1997b)。

美国、加拿大、日本和欧盟的管理机构确定，植物中存在的食用或饲用 PAT 蛋白不会使人或动物受到威胁（见上面的介绍）。关于食品安全标准的更多信息，可参见各政府机构公布的法规、指南和政策声明。

◆ 参考文献

- AgrEvo USA. 1994. Petition for a determination of non-regulated status for glufosinate resistant corn (submitted to United States Department of Agriculture, Petition No. 94-357-01P).
[Available from USDA-APHIS, Unit 147, 4700 River Road, Riverdale, MD 20737]
- Agriculture and Agri-Food Canada, Food Production and Inspection Branch (as of April 1, 1997 the Canadian Food Inspection Agency):
- 1995a. Decision Document DD95-01: Determination of Environmental Safety of Agrevo Canada Inc.'s Glufosinate Ammonium-Tolerant Canola.
- 1995b. Decision Document DD95-04: Determination of Environmental Safety of Plant Genetic Systems Inc.'s (PGS) Novel Hybridization System for Canola (*Brassica napus* L.).
- 1996a. Decision Document DD96-11: Determination of Environmental Safety of Agrevo Canada Inc.'s Glufosinate Ammonium-Tolerant Canola Line HCN28.
- 1996b. Decision Document DD96-15: Determination of Environmental Safety of Dekalb Canada Inc.'s Glufosinate Ammonium-Tolerant Corn Line DLL25.
- Bayer, E., Gugel, K. H., Hagele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., König, W. A. and Zäner, H. 1972. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Phosphinothricin und Phosphinothricin-alanyl-alanin. *Helvetica Chimica Acta* 55: 224-239.
- Cross, T. 1989. Other genera. Pages 2586-2615 in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. S. T. Williams, ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Devine, M., Duke, S. O. and Fedtke, C. 1993. Physiology of Herbicide Action. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp. 251-294.
- Droege, W., Broer, I. and Püler, A. 1992. Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta* 187: 142-151.
- Droege-Laser, W., Siemeling, U., Piehler, A. and Broer, I. 1994. The metabolites of the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate). *Plant Physiology* 105: 159-166.
- Dyer, W. E. 1996. Techniques for producing herbicide-resistant crops. Pages 37-52 in: *Herbicide-Resistant Crops*. S. O. Duke, ed. CRC Press, New York.
- European Commission, Directorate General XXIV, Policy and Consumer Health Protection; Scientific Committee on Plants. 1998b. Opinion of the Scientific Committee on Plants Regarding Genetically Modified, Glufosinate-Tolerant Rape Notified by the Agrevo Company (NOTIFICATION/UK/95/M5/1) (Opinion expressed by the SCP on 14 July 1998).
[Available electronically at http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scp/out03_en.html]
- FAO/WHO. 1996. Biotechnology and Food Safety. Rome, Italy, 30 September to 4 October 1996.
[Available electronically at <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/economic/esn/biotech/tabconts.htm>]
- Fuchs, R. L. and Astwood, J. D. 1996. Allergenicity assessment of foods derived from genetically

- modified plants. *Food Technology* 50: 83.
- Hara, O., Murakami, T., Imai, S., Anzai, H., Itoh, R., Kumada, Y., Takano, E., Satoh, E., Satoh, A., Nagaoka, K. and Thompson, C. (1991) The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces viridochromogenes*: cloning, heterospecific expression, and comparison with the genes of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of General Microbiology* 137: 351-359.
- Kishore, G. M. and Shah, D. M. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annual Review of Biochemistry* 57: 627-663.
- Kumada, Y., Anzai, H., Takano, E., Murakami, T., Hara, O., Itoh, R., Imai, S., Satoh, A. and Nagaoka, K. (1988) The bialaphos resistance gene (*bar*) plays a role in both self-defence and bialaphos biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Antibiotics* 41: 1838-1845.
- Locci, R. 1989. Streptomycetes and Related Genera. Pages 2451-2508 in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Mariani, C., De Beuckeler, M., Truettner, J., Leemans, J. and Goldberg, R. B. 1990. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347: 737-741.
- Mariani, C., Gossele, V., De Beuckeleer, M., De Block, M., Goldberg, R. B., De Greef, W. and Leemans, J. 1992. A chimeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* 357: 384.
- McNally, S. F., Hirel, B., Gadal, P., Mann, A. F. and Stewart, G. R. (1983) Glutamine synthetases of higher plants. *Plant Physiology* 72: 22-25.
- Metcalf, D. D., Astwood, J. D., Townsend, R., Sampson, H. A., Taylor, S. L. and Fuchs, R. L. 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. Pages S165-S186 in: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition (special supplement)*, F. M. Clydesdale, ed., vol. 36.
- Mifflin, B. J. and Lea, P. J. (1976) The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry* 15: 873-885.
- Shah, D., Horsch, R., Klee, H., Kishore, G., Winter, J., Tumer, N., Hironaka, C., Sanders, P., Gasser, C., Aykent, S., Siegel, N., Rogers, S. and Fraley, R. 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233: 478-481.
- Shaner, D. L., Bascomb, N. F. and Smith, W. 1996. Pages 143-158 in: *Herbicide-Resistant Crops*. S. O. Duke, ed. CRC Press, New York.
- Sjoblad, Roy D., et al 1992. Toxicological Considerations for Protein Components of Biological Pesticide Products. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 15, 3-9.
- Tachibana, K., Watanabe, T., Sekizawa, Y. and Takematsu, T. (1986) Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *Journal of Pesticide Science* 11: 33-37.
- Takahashi, Y., Iwai, Y. and Omura, S. 1984. Two new species of the genus *Kitasatosporia*, *Kitasatosporia phosalacinea*, sp. nov. and *Kitasatosporia griseola*, sp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30: 377-387.
- Thompson, C. J., Movva, N. R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J. E., Lauwereys, M. and Botterman, J. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO Journal* 6: 2519-2523.
- United States Department of Agriculture. 1995. Environmental Assessment and Determination of Nonregulated Status - Petition Number 94-357-01P (for glufosinate resistant corn).

[Available from USDA-APHIS, Unit 147, 4700 River Road, Riverdale, Maryland 20737, orelectronically at <http://www.aphis.usda.gov/bbep/bp/>]

United States Environmental Protection Agency. 1997a. Phosphinothricin Acetyltransferase and the Genetic Material Necessary for Its Production in All Plants - Exemption From the Requirement of a Tolerance on All Raw Agricultural Commodities. Federal Register; April 11, 1997, Volume 62, No. 70, pp. 17717-17720.

[Available electronically at <http://www.wais.access.gpo.gov>]

United States Environmental Protection Agency. 1997b. Glufosinate Ammonium - Tolerances for Residues. Federal Register; February 5, 1997, Volume 62, No. 24, pp. 5333-5338.

[Available electronically at <http://www.wais.access.gpo.gov> (DOCID: fr05fe97-10)]

Vasil, I. K. 1996. Phosphinothricin-resistant crops. Pages 85-92 in: *Herbicide-Resistant Crops*. S. O. Duke, ed. CRC Press, New York.

Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J. and Schulz, A. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology* 14: 1274-1278.

Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillermann, D., Strauch, E. and Pühler, A. 1988. Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70: 25-37.

Wohlleben, W., Alijah, R., Dorendorf, J., Hillerman, D., Nussbaumer, B. and Pelzer, S. 1992. Identification and characterization of phosphinothricin-tripeptide biosynthetic genes in *Streptomyces viridochromogenes*. *Gene* 115: 127-132.

第五章

马铃薯 *Solanum tuberosum* Subsp. *tuberosum* 生物学特性的共识文件*

第一节 总体介绍

本共识文件介绍了马铃薯 (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) 生物学特性的相关内容。它包含了在风险评估过程中该物种的分类学、形态学和多样性中心的一般信息 (例如, 繁殖生物学、杂交可能性和生态学方面的信息)。在种内和种间杂交方面, 重点介绍实现杂交的条件, 而没有列出所有成功进行的杂交组合。因为这一列表将非常长而且需频繁改动。本文涉及不需人为干预的杂交。

荷兰作为牵头国与英国合作共同起草了本共识文件。

第二节 分类地位

茄科 (*Solanaceae*) 包括多种人们熟知的栽培作物, 如番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、茄子 (*Solanum melogena*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、辣椒 (*Capsicum annuum*) 和马铃薯 (*Solanum tuberosum*)。马铃薯是世界第四大生产淀粉的粮食作物, 产量约为 300 000 吨 (FAO, 1985)。大约有 95 个国家生产马铃薯, 总价值约 130 亿美元 (Horton et al, 1985)。

茄属 (*Solanum*) 已经鉴定出 1 000 多个物种, 据 Burton (1989) 报道, “有 2 000 多个物种”。茄属 (*Solanum*) 分为几个亚组, *potatoe* 亚组包括了所有块茎类马铃薯。*Potatoe* 亚组又分为几个系, 其中 *tuberosa* 系与本文件相关。*tuberosa* 系大约有 54 个物种 (包括野生种和栽培种), 马铃薯 *S. tuberosum* 是其中的一个种 (Hawkes, 1990)。

马铃薯 *S. tuberosum* 分为两个亚种: *tuberosum* 亚种和 *andigena* 亚种。*tuberosum* 亚种 (表 5-1) 是在北美和欧洲等地广泛种植的栽培马铃薯。*andigena* 亚种也是一个栽培种, 仅在中美和南美地区栽培 (Hawkes, 1990; Hanneman, 1994)。

* Originally published by the OECD in English under the title: “Consensus Document on the Biology of *Solanum tuberosum* subsp. *Tuberosum* (Potato)” © 1997 OECD. All rights reserved.

表 5-1 马铃薯 *S. tuberosum* 亚种 *tuberosum* 的分类地位

分类地位	拉丁学名
科	Solanaceae
属	<i>Solanum</i>
组	<i>petota</i>
亚组	<i>potatoe</i>
系	<i>tuberosa</i>
种	<i>Solanum tuberosum</i>
亚种	<i>tuberosum</i>

第三节 多样性中心

拉丁美洲是野生型结薯马铃薯 (potatoe 亚组) 的多样性中心, 同时也是起源中心。tuberise 系 (包含 *S. tuberosum* 属) 和 potaroe 亚组中其他大部分系的物种都有两个多样性中心。一个位于委内瑞拉、哥伦比亚、厄瓜多尔、秘鲁、玻利维亚和阿根廷境内狭长的安第斯山区, 另一个位于墨西哥中部。野生型马铃薯的分布范围非常广, 从美国西南部延伸到阿根廷和智利南部 (Child, 1990; Hawkes, 1990)。

在野生型马铃薯多样性中心, 通常也可发现茄属 *Solanum* 的栽培种。但马铃薯 *Solanum tuberosum* Susp. *tuberosum* 的二倍体栽培种例外, 它只在智利西南部地区有发现。

马铃薯 *tuberosum* 亚种的四倍体栽培种分布在欧洲和世界大部分地区, 被认为是从哥伦比亚和秘鲁引入的 *andigena* 亚种经选择而来的, 因此具有很窄的遗传基础。这一观点的证据是, 最初引进到欧洲的植株开花晚、块茎形成慢, 其形态特征与 *andigena* 亚种相符 (Howard, 1970)。通过选择, 引进的马铃薯适应了欧洲的长日照和环境条件。Simmonds (1966) 指出这一转变是在较短的时间内 (大约 10 年) 经选择形成的。这种新型的马铃薯作为栽培作物从欧洲传播到世界各地。另一种观点认为, 马铃薯晚疫病在欧洲爆发之后, 起源于智利的马铃薯 *tuberosum* 亚种作为新种质被引入欧洲 (Hawkes, 1990)。

第四节 鉴定方法

1. 形态学和无性系变异

茄属内 *potatoe* 亚组与其他亚组的不同之处是, “真正的马铃薯块茎发生在地下的匍匐枝上, 匍匐枝是真正的茎而不是根” (Hawkes, 1994)。

Tuberosa 系的特征为具有奇数羽状叶或单叶、分支花梗、圆形至五角形花冠和圆形浆果 (Hawkes, 1990)。马铃薯 *S. tuberosum* 的特征是花梗节位于中部 1/3 处, 花萼裂片短而排列规则、叶片通常呈轻微弓形、小叶一般呈卵形至批针形、叶长约为宽的 2 倍、块茎具有明显的休眠期 (Hawkes, 1990)。

马铃薯 *S. tuberosum* 两个亚种间的差异极小, 最大的差异是 *andigena* 亚种需要短日照条件。表 5-2 列出了两个亚种的差异。

表 5-2 马铃薯 *S. tuberosum* 亚种 *tuberosum* 和 *andigena* 的差异 (Hawkes, 1990)

特 征	<i>tuberosum</i>	<i>andigena</i>
叶片	分裂少	分裂多
小叶	宽	窄
叶缘	弓形	锐角
茎	在顶点处变厚	在顶点处未变厚
块茎的形成	长日照或短日照, 大部分在中等海拔的地区	短日照, 高海拔地区

马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 的一般形态特征如下: 多年生草本、茎秆较弱、最高 3 英尺、具有长的羽状叶片、椭圆形小叶、较小的小叶靠近中脉; 花成簇, 花色为白色、紫色、略带粉红色或略带蓝色, 花冠通常 5 裂、雄蕊突出并具有极短的花丝; 果实呈黄色或呈绿色、球状, 直径不到 1 英寸; 有些果实无种子, 有些能结几百粒种子; 果实中含有毒素因而不能食用; (Anonymous, 1996; Hawkes, 1990)。块茎生长于地下匍匐茎的末端, 呈圆形至长椭圆形; 果肉通常为白色或乳白色至黄色, 表皮颜色呈浅褐色至红色; 块茎中茄碱 (一种有毒的生物碱) 含量高。

马铃薯易于通过离体组织培养技术再生。这种营养繁殖形式通常产生遗传上一致的个体; 但由于愈伤组织阶段的存在, 组织培养后通常出现异质性。这种变异通常称之为无性系变异。与所有马铃薯一样, 马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 容易发生这种变异 (Cutter, 1992; Hawkes, 1990)。

2. 分子鉴定

分子技术可以区分与茄属 *Solanum* 中的部分物种。应用 8 个核酸内切酶进行叶绿体 DNA 的限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析 (Hosaka et al, 1984), 结果表明可以区分 33 个结薯的茄属 (*Solanum*) 种和杂交种以及两个番茄属 (*Lycopersicon*) 种。而马铃薯 *Solanum tuberosum* Susp. *tuberosum* 中 4 个不同遗传材料具有相同的图谱。

对基因组 DNA 进行 RFLP 分析也可以鉴定茄属 *Solanum* 的不同物种。Debener 等 (1990) 应用 70 个探针/酶组合 (探针来自于马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum*) 可以区分茄属 *Solanum* 的 12 个种和一个杂交种的 38 份材料。来自马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 的两份材料不具有同一性, 其中一个才是真正的马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 栽培种 *Bintje*, 另一个则是含有安第斯亚种 *S. andigena*、野生落果薯 (*S. demissum*) 和野生无茎薯 (*S. acaule*) 血缘的选育品系。该结果表明, RFLP 指纹图谱不仅可以区分不同的种, 还可以区分不同的栽培种或育种品系 (Weising et al, 1992)。用来自于茄属 *Solanum* 其他物种的探针 (大部分是重复序列) 进行检测, 也可区分不同的物种和栽培种 (Schweizer et al, 1993)。此外, RAPD 标记也能用于马铃薯栽培种和无性系的指纹鉴定 (Powell et al, 1991; Quiros et al, 1993)。

此外, 试验证实, 扩增片段长度多态性 (AFLP) 技术也可区分茄属 *Solanum* 的不同

物种。一个引物可在每个样品中产生 120 条条带，因此很容易区分茄属 *Solanum* 中各物种 (Kardolus, 印刷中)。

番茄基因组和马铃薯基因组很保守，因此可用其中一个基因组的探针来鉴定另一个基因组 (Gebhart et al, 1991)。这对于构建遗传图谱和开发分子标记具有极为重要的意义。

第五节 遗传特征：基因组

茄属 *Solanum* 的染色体基数为 12。马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 为二倍体 ($2n=24$) 或四倍体 ($4n=48$)。二倍体只在智利发现，而四倍体在世界各地广泛栽培。四倍体的起源尚不清楚。马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 的栽培种既可以是同源四倍体 (二倍体种的染色体加倍)，也可以是异源四倍体 (两个二倍体近缘种的杂交种的染色体加倍) (Hawkes, 1990)。

茄属 *Solanum* 的各个种中不减数配子现象十分普遍。大多数茄属 (*Solanum*) 植物中，紧临正常的单倍体配子 (n)，即可发现不减数配子 ($2n$)，这大大提高了天然杂交的可能性 (见关于杂交的章节) (Hanneman, 1995)。据 Watanabe 等 (1991) 报道，在检测的 38 个块茎类茄属 *Solanum* 物种中，大部分物种能产生 $2n$ 花粉，频率为 2% ~ 10%。

双单倍体植株易于通过四倍马铃薯栽培种获得。双单倍体可通过利用诸如 *S. phureja* 品种 (可产生孤雌生殖的二倍体植株) 授粉获得，也可通过花药离体培养获得 (Howard, 1970; Caligari, 1992)。研究表明，用 *S. phureja* 生产双单倍体时，在该双单倍体中可见到来源于 *S. phureja* 的染色体小片段 (Clulow et al, 1991)。

这些二倍体在育种项目中具有十分重要的价值：不易与四倍体马铃薯杂交的品种可与双单倍体杂交 (见下面关于杂交的章节)。这些双单倍体通常是胚珠可育而花粉不育。

第六节 繁殖生物学

1. 有性繁殖

petota 组中的二倍体马铃薯栽培种 *S. tuberosum* 和其他二倍体种都具有自交不亲和性 (Kirch et al, 1989)。这种不亲和性是由于 S 等位基因存在造成的多等位基因控制的配子体不亲和。这些种通常由昆虫传粉实现有性杂交。

马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 的四倍体栽培种具有自交亲和性。虽然这个种存在 S 等位基因，但是不知何种原因其不亲和系统被削弱。目前，这一现象背后的机制尚不清楚。Plaisted (1980) 研究表明，田间条件下，四倍体马铃薯 *S. tuberosum* 最可能发生自花授粉，其 80%~100% 的种子来自自交。

昆虫的存在有助于杂交育种和自花授粉。特别是，熊蜂 (如秘鲁的 *Bombus funebris* 和美国的 *B. impatiens*) 是马铃薯很好的传粉昆虫 (White, 1983)。花粉传播主要受传粉昆虫飞行距离的限制。熊蜂和蜜蜂的飞行距离不超过 3 km (Reheul, 1987)。由于马铃薯的花没有花蜜，因此蜜蜂 (意大利蜜蜂 *Apis mellifera*) 和 *Bombus fervidus* 不是马铃薯

的传粉昆虫 (Sanford and Hanneman, 1981)。White (1983) 进行了一些试验来判断风对于马铃薯授粉的重要性。在试验中, 通过将花去雄排除昆虫的作用, 然后观察这些花的结籽情况。结果发现这些花中均无种子形成, 因此推断风对于传粉不重要。

Conner 等 (1996) 收集了在新西兰、英国和瑞典进行的几个转基因马铃薯田间试验中的异型杂交数据。通过分析发现在各试验中, 当受体生物与转基因生物相隔距离超过 20 米时, 异型杂交率降到 0%。

尽管茄属 *Solanum* 中很多物种是可育的, 但是似乎大量的四倍体马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 栽培种的育性较低。(Ross, 1986)。大多数栽培种的花粉育性降低, 甚至花粉不育。其中包括有名的栽培品种 Bintje 和 King Edward。尽管雌性育性降低的现象不常见, 但是发现很多栽培种比野生种的开花少。另一个现象是, 花在授粉后脱落, 因而无果实的形成。因此, 在大部分马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 的栽培种中只形成少量的果实和种子。

马铃薯种子不能通过鸟类传播, 但是可通过小型哺乳动物传播 (Hawkes, 1988)。Lawson (1983) 研究表明, 在苏格兰, 马铃薯种子可在土壤中存贮近 10 年而不会丧失活力。Love 等 (1994) 报道马铃薯种子超过 7 年后仍可存活和萌发。

2. 无性繁殖

马铃薯可进行营养繁殖。其块茎形成于地下。由于块茎是马铃薯栽培的产品, 因此, 为了使块茎高产和优质, 人们已经进行了广泛的选择。只要不遇到大的霜冻期, 这些块茎就可保存很长时间。马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 栽培种形成块茎的匍匐茎通常不是很长; 而野生结薯茄属 *Solanum* 的匍匐茎要长得多 (Hawkes, 1990)。

第七节 杂 交

1. 种内杂交

马铃薯 *Solanum tuberosum* 的 *tuberosum* 和 *andigena* 亚种之间存在完全的杂交亲和性, (Plaisted, 1980), 可发生天然杂交。由于这两个亚种的形态差异极小, 因此发生杂交的几率尚不清楚。由于这两个亚种只在北美南部和南美洲的部分地区同时出现, 因此天然杂交只可能发生在这些地区。

2. 种间杂交: *potatoe* 亚组内的杂交

马铃薯的基因库非常大。Dale 等 (1992) 和 Evenhuis 等 (1991) 指出, *potatoe* 亚组内的结薯马铃薯之间都可以进行杂交, 尽管有些情况下需要应用一些技术来保证杂交成功。

在这一亚组内有 2 组极难进行杂交:

- *morelliformia*、*bulbocastana*、*pinnatisecta*、*polyadenia*、*commersoniana*、*lignicaulia* 和 *circaeifoli* 系中的二倍体植株。

- 其他系中的二倍体植株。

具有正常单倍花粉的二倍体植物的授精作用实际上是双受精。花粉含有两个 (单倍体) 生殖核, 一个核使卵细胞受精, 另一个使极核受精, 从而产生二倍体胚和三倍体

胚乳。

据 Den Nijs 和 Peloquin (1977) 报道, 四倍体植株与二倍体植株杂交时, 会出现“三倍体障碍”。这一阻碍是由于胚乳 ($5\times$) 和胚 ($3\times$) 之间的不平衡引起的, 从而导致胚乳无法形成, 进而出现胚败育 (Jacobsen and Rousselle, 1992)。

Johnston 等 (1980、1982) 发现具有相同染色体倍数的一些物种间不能杂交, 而具有不同染色体倍数的物种可成功进行杂交。他们引入了胚乳平衡数 (Endosperm Balance Number, EBN) 这一概念, 胚乳平衡数表示的是“胚乳中基因组的有效染色体倍数”。为保证授精后胚乳的正常发育, 母本的胚乳平衡数必须为父本的两倍 ($2:1$)。

胚乳平衡数与物种的染色体倍数无关, 并且具有相加效应。这就意味着, 染色体数加倍, 胚乳平衡数也加倍。

存在两种情况:

- 两个物种的胚乳平衡数相同: 可发生天然杂交;
- 两个物种的胚乳平衡数不同: 不能发生天然杂交。

如果两个物种的胚乳平衡数不同, 则有几种天然的机制或人为机制来避免不亲和性:
天然机制:

- 不减数配子的出现可使胚乳平衡数较低的物种与胚乳平衡数较高的物种进行杂交。

例如:

四倍体植株 (胚乳平衡数为 4) 不能与二倍体植株 (胚乳平衡数为 2) 杂交, 但是如果二倍体植株产生了不减数配子, 则这些配子的胚乳平衡数为 4, 这样就可以进行杂交了。所得的植株是胚乳平衡数为 4 的四倍体。值得注意的是, 由于在大多数茄属 *Solanum* 种中不减数配子比较常见, 因此这种杂交可自然发生。

人为机制:

- 双单倍体的产生可使胚乳平衡数较高的物种与胚乳平衡数较低的物种杂交。例如:

四倍体植株 (胚乳平衡数为 4) 不能与二倍体植株 (胚乳平衡数为 2) 杂交, 但是如果四倍体植株二倍体化之后, 则产生有效胚乳平衡数为 2 的双单倍体植株。这种植株可与二倍体植株 (胚乳平衡数为 2) 进行授粉。所得的植株是胚乳平衡数为 2 的二倍体。值得注意的是, 由于双单倍体很少在自然条件下形成, 因此这种杂交很难自然发生。

- 染色体多倍化可使胚乳平衡数较低的物种与胚乳平衡数较高的物种杂交。例如:

二倍体植株 (胚乳平衡数为 2) 不能与四倍体植株 (胚乳平衡数为 4) 杂交, 但是如果二倍体植株 (胚乳平衡数为 2) 被多倍化之后, 则产生有效胚乳平衡数为 4 的四倍体植株。这种植株可与四倍体植株 (胚乳平衡数为 4) 杂交。所得的植株是胚乳平衡数为 4 的四倍体。值得注意的是, 由于多倍体化很少自发产生, 因此这种杂交很难自然发生, 但也不能排除自然发生的可能。

尽管存在胚乳平衡数体系, 不同组的马铃薯间也可通过体外体细胞融合进行组合。这一方法的应用频率正在增加。融合产物可能是可育的, 因此体细胞杂交可以成为连接不亲和基因组的桥梁。

附录 1 提供了 *petota* 组内大部分常见马铃薯种的染色体倍数和胚乳平衡数。可用这

些数据来判断马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 与这些种在自然条件下形成杂种的可能性。*S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 容易与附录 1 中所有胚乳平衡数为 4 的茄属物种杂交, 此外, 由于不减数配子的存在, 马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 也可能与附录 1 中所有胚乳平衡数为 2 的茄属物种杂交。

为确定某一杂交能否自然发生, 需考虑几个因素。其中最重要的是:

- 杂交亲本的胚乳平衡数

胚乳平衡数还必须匹配, 或者杂交亲本一方的胚乳平衡数应当不低于另一方胚乳平衡数的一半。

- 杂交亲本的地理分布

杂交亲本应分布于同一地区和生境。

- 杂交亲本的开花期

杂交亲本的开花期应存在重叠。

- 是否存在阻碍花粉管生长的花柱障碍

存在合适的传粉者。

在世界大部分地区, 栽培的四倍体马铃薯周围, 不会出现胚乳平衡数为 2 或 4 的 *petota* 组其他茄属 *Solanum* 种。由于这种地理隔离的存在, 天然杂交不可能发生。只有在美国南部和南美洲才发现有合适胚乳平衡数的种与栽培四倍体马铃薯毗邻。在这些地区, 需要通过评价相关种的特征和生境来预测杂交的可能性。

3. 种间杂交: 与 *petota* 组以外的其他种杂交

由于马铃薯亚种 *tuberosum* 与 *petota* 组以外其他马铃薯之间存在很强的杂交障碍, 因而不可能发生杂交, 不过, 在世界的多个地区, 四倍体的马铃薯栽培种与本地的茄属 *Solanum* 物种 (非 *petota* 组物种) 同时存在。例如, 在荷兰就存在两种 *petota* 组以外的茄属物种——*S. nigrum* 和 *S. dulcamara*。Eijlander 和 Stiekema (1990) 发现, 四倍体的马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 与 *S. dulcamara* 杂交不能产生可育的种子和植株。*S. nigrum* 与马铃薯 *S. tuberosum* 杂交同样如此。只有进行胚抢救之后, 才可获得上述杂交种。这些杂交种生活力低、雄性不育, 不能形成块茎并且表现较低的雌性育性, 授粉 (回交) 之后, 不能产生可育的种子。

第八节 马铃薯 *Solanum tuberosum* Subsp. *tuberosum* 的生态学

1. 栽培

马铃薯可在世界上很多地区栽培, 据此可以推断: 能成功种植马铃薯 *S. tuberosum* 的环境条件多种多样。许多栽培品种可适应不同的环境条件。马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 栽培的条件:

- 马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 的块茎不能耐受 -3°C 或更低的温度。在 -4°C 时叶片死亡 (van Swaaij et al, 1987; Vayda, 1994)。Dale (1992) 报道, 在 -2°C 霜冻 25 小时或 -10°C 霜冻 5 小时后马铃薯的块茎被破坏。拉丁美洲的茄属 *Solanum* 抗霜冻

性较强。

● 马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 不能进行低温驯化，茄属 *Solanum* 的其他种（如马铃薯野生种 *S. acaule*）则可以（van Swaaij et al, 1987; Li and Fennel, 1985）。

● 栽培马铃薯对土壤水分亏缺十分敏感（Vayda, 1994）。

● 栽培马铃薯可适应广泛的土壤 pH（通常为 5 以上，但也有在 pH 3.7 时获得高产的报道）（Vayda, 1994）。

● 栽培马铃薯是一种中性日照作物，块茎的形成与生育期的日照长度无关。但是在马铃薯栽培种中也发现不同的光周期敏感性。

● 极端的低温或高温，特别是夜间温度，会妨碍块茎的形成。

● 短日照（低于 14 小时）和适中的土壤温度（15~18℃）可促进块茎的形成。长日照（14~16 小时）和较高的（白天）温度（20~25℃）可促进开花和种子形成（Beukema and van der Zaag, 1979; Burton, 1989）。

● 人们用来自世界各地的种质资源改良马铃薯品种。主要目标是开发出对生物胁迫因子（真菌、病毒、细菌和昆虫）具有抗性的栽培种。其他目标包括：提高淀粉含量、适应热带生长条件、抗除草剂、耐胁迫和导入抗机械损伤的基因（Brown, 1995）。常用来改良马铃薯的种有 *S. demissum* 和 *S. acaule*、*S. chacoense*、*S. spegazinii*、*S. stoloniferum* 和 *S. vernei*。较少应用的物种有 *S. microdontum*、*S. sparsipilum*、*S. verrucosum*、*S. phureja*、*S. tuberosum* subsp. *andigena*、*S. commersonii* 和 *S. maglia*（Caligari, 1992）。这些种质已经被引入到马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 的很多栽培品种中。

附录 2 中列出了马铃薯中常见的病虫害（昆虫、螨类、病毒、细菌和真菌）以及它们在世界各地的传播和分布。该附录并没有全面列出所有已知的马铃薯病虫害。因此，应当考虑到其他病害在当地的可能具有重要意义。对于这一问题最好咨询国家植物检疫部门。此外，附录 2 没有说明某一国家中需要采取的卫生或检疫规定。

2. 自生苗和杂草

在马铃薯 *S. tuberosum* Susp. *tuberosum* 的栽培过程中，上一茬马铃薯作物种子中长出的植株可成为自生杂草。在栽培过程中，块茎也可成为自生杂草。一般来说，这些种子或块茎自生出的植株可通过正常的农艺措施去除。此外，在大多数栽培区域，由于环境条件不利（低温），块茎不会存活很长时间。

在田间以外的地方马铃薯苗由于无法与其他植物竞争，因此很难定殖。据 Love 等（1994）报道，由于竞争性和适应能力的原因，这些苗只在栽培区生长。马铃薯块茎可通过运输和应用扩散，但是由于环境条件的不利，通过这些途径扩散的植株通常不会长期定殖。

马铃薯通常不会入侵野生生态系统。在顶级植被中，马铃薯竞争不过其他物种（如杂草、树木和灌木）（Anonymous, 1996）。

附录 1 茄属 *petota* 组中大部分物种的染色体 倍数和胚乳平衡数 (EBN)

(Hawkes, 1990, 1992, 1994)

亚组	系	染色体倍数	EBN=1	EBN=2	EBN=4	EBN=未知
<i>estoloniifera</i>	—	二倍体	所有物种			
<i>juglandifolia</i>	—	二倍体				所有物种
<i>potatoe</i>	<i>morelliiformia</i>	二倍体				<i>S. morelliiformia</i>
	<i>bulbocastana</i>	二倍体	<i>S. bulbocastanum</i>			<i>S. clarum</i>
		三倍体	<i>S. bulbocastanum</i>			
			<i>S. branchistotrichum</i>			
			<i>S. jamesii</i>			
	<i>pinnatisecta</i>	二倍体	<i>S. cardiophyllum</i>			<i>S. tarnii</i>
			<i>S. pinnatisectum</i>			
			<i>S. trifidum</i>			
		三倍体	<i>S. cardiophyllum</i>			<i>S. jamesii</i>
	<i>polyadenia</i>	二倍体				<i>S. polyadenium</i> <i>S. lesteri</i>
	<i>commersoniana</i>	二倍体	<i>S. commersonii</i>			
		二倍体	<i>S. commersonii</i>			<i>S. caltaescens</i>
		二倍体	<i>S. capsicibaccatum</i>			
	<i>circaeifolia</i>	二倍体	<i>S. circaeifolium</i>			
	<i>lignicaulia</i>	二倍体	<i>S. lignicaule</i>			
	<i>olmosiana</i>	二倍体				<i>S. olmosense</i>
	<i>yungasense</i>	二倍体		<i>S. chacoense</i> <i>S. tarijense</i>		<i>S. arnezii</i> <i>S. yungasense</i>
				<i>S. astileyi</i>		
	<i>megistacroloba</i>	二倍体		<i>S. megistacrolobum</i>		<i>S. boliviense</i>
				<i>S. sanctae-rosae</i>		
				<i>S. toralapanum</i>		

(续)

亚组	系	染色体倍数	EBN=1	EBN=2	EBN=4	EBN=未知
	<i>cuneolata</i>	二倍体		<i>S. infundibuliforme</i>		
	<i>conicibaccata</i>	二倍体		<i>S. chomatophilum</i> <i>S. violaceimarmoratum</i> <i>S. agrimoniifolium</i> <i>S. colombianum</i> <i>S. oxycarpum</i>		<i>S. santolalle</i>
		六倍体			<i>S. moscopanum</i>	
	<i>piurana</i>	二倍体				<i>S. piurae</i>
	<i>ingiifolia</i>	二倍体				<i>S. ingifolium</i>
	<i>maglia</i>	二倍体				<i>S. maglia</i>
		三倍体				<i>S. maglia</i>
	<i>tuberosa</i>	二倍体		野生种; <i>S. berthaultii</i> <i>S. brevicaule</i> <i>S. bukasovi</i> <i>S. canasense</i> <i>S. gourlayi</i> <i>S. kurtzianum</i> <i>S. leptophyes</i> <i>S. medians</i> <i>S. microdontum</i> <i>S. multidissectum</i> <i>S. multiinterruptum</i> <i>S. sparsipilum</i> <i>S. spigazzinii</i> <i>S. vernei</i> <i>S. verrucosum</i> 栽培种; <i>S. phureja</i> <i>S. stenotomum</i>		野生种; <i>S. alandiae</i> <i>S. hondelbunamii</i> <i>S. neocardenasii</i> <i>S. okadae</i> <i>S. oplocense</i> 栽培种; <i>S. ajanhuiri</i>
		三倍体				野生种; <i>S. maglia</i> <i>microdontum</i> 栽培种; <i>S. × chaucha</i> <i>S. × juzepezukii</i>

(续)

亚组	系	染色体倍数	EBN=1	EBN=2	EBN=4	EBN=未知
		三倍体			野生种; <i>S. gourlayi</i> <i>S. oplocense</i> <i>S. sucrensis</i> 栽培种; <i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> <i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i>	<i>S. × curtilobum</i>
		五倍体				
		六倍体			<i>S. oplocense</i>	
	<i>aucaulia</i>	四倍体		<i>S. acule</i>		
		六倍体			<i>S. albicans</i>	
	<i>demissa</i>	三倍体				<i>S. × semidemissum</i>
		三倍体		<i>S. fenderi</i> <i>S. hjertingii</i> <i>S. papita</i> <i>S. polytrichon</i> <i>S. stoloniferum</i>		
	<i>demissa</i>	三倍体				<i>S. × semidemissum</i>
		六倍体			<i>S. brachycarpum</i> <i>S. demissum</i> <i>S. guerrerense</i> <i>S. hougasii</i> <i>S. iopetalum</i>	<i>S. scheckii</i>

附录 2 马铃薯 *Solanum tuberosum* Susp. *tuberosum* 常见的病虫害及其分布： (Hide and Lap-wood, 1992; Evans and Trudgill, 1992; Raman and Radcliffe, 1992)

昆虫和哺乳类 (Hooker, 1986)	发生地
生物	
<i>Myzus persicae</i> , <i>Phthorimaea operculella</i> , <i>Agriotes</i> spp.	世界各地

(续)

昆虫和螨类 (Hooker, 1986) 生 物	发 生 地
<i>Macrosiphum euphorbiae</i> , <i>Aphis fabae</i> , <i>Empoasca devastans</i> , <i>Heliothus armigera</i> , <i>Spodoptera exigua</i>	世界各地(非洲除外)
<i>Plusia orichalcea</i> , <i>Shenariidea pulsilla</i> , <i>Psylloides plana</i> , <i>Epicauta hirticornis</i> , <i>Anomala dimidiata</i> , <i>Phyllognathus dionysius</i> , <i>Melolontha</i> spp., <i>Olontotermes obesus</i> , <i>Eremotermes</i> spp., <i>Acidodes westermanni</i> , <i>Myllocerus subfasciatus</i> , <i>Pyralis farinalis</i> , <i>Nipacoccus vastator</i>	亚洲
<i>Empoasca fabae</i> , <i>Paratriosa cockerelli</i> , <i>Hypolithus</i> spp.	北美
<i>Diabrotica</i> sp., <i>Epicauta</i> spp., <i>Prennotrypes</i> spp., <i>Phylophaga</i> spp., <i>Scrobipalpus absoluta</i> , <i>Scrobipalpus solanivora</i> , <i>Symmetri-schema plaeseosema</i> , <i>Feltia exserta</i> , <i>Stenotycha</i> spp., <i>Copitarsia turbata</i> , <i>Bonthinus mainon</i> , <i>Phenacoccus grenadensis</i> , <i>Liriomyza</i> spp.	中美洲和南美洲
<i>Stisocerca gregaria</i> , <i>Liriomyza trifolii</i>	非洲
<i>Henosepilachna sparsa</i> , <i>H. vigintisex punctata</i> , <i>Austroasca virigrisea</i> , <i>Listroderes obliquus</i> , <i>Heteronychus arator</i> , <i>Chetroplatys latipes</i> , <i>Graphognathus leucoloma</i> , <i>Aphis nasturtii</i> , <i>Limoniis</i> spp., <i>Cenicera</i> spp., <i>Conodorus</i> spp.	澳大利亚 北美和欧洲
<i>Aphis gossypii</i>	中美洲和南美洲、亚洲
<i>Aulacorthum solani</i>	北美、欧洲和非洲
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	北美、欧洲和亚洲
<i>Epirix</i> spp.	北美洲、中美洲和南美洲
<i>Epilachna</i> spp., <i>Polyphagotarsonemus latus</i> , <i>Thrips palmi</i> , <i>Gryllotalpa africana</i>	非洲和亚洲

(续)

	线虫 (Hooker, 1986) 生 物	发 生 地
	<i>Globodera rostochiensis</i> , <i>Globodera pallida</i>	世界各地
	<i>Meloidogyne hapla</i>	北美和温带地区
	<i>Meloidogyne chitwoodi</i>	美国西北部、欧洲西部部分地区
	<i>Nacobbus aberrans</i>	秘鲁和玻利维亚
	<i>Pratylenchus penetrans</i> , <i>Trichodorus and Paratrichodorus</i> spp.	北美洲和欧洲
	<i>Ditylenchus destructor</i>	北美洲、欧洲西部和前苏联
	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	欧洲西部
	病毒 (Valkonen, 1994) 生 物	发 生 地
	病毒 X (轻性花叶病毒), 卷叶病毒, 病毒 Y (重花叶病毒), 病毒 A (轻性花叶病毒), 病毒 S	世界各地
	病毒 M	欧洲和北美洲
	烟草脆裂病毒	欧洲、北美洲、巴西和日本
	马铃薯帚顶病毒	欧洲西部和秘鲁
	黄矮病毒	北美洲
	纺锤块茎类病毒	北美洲、前苏联和南非
	丛枝病 (支原体)	欧洲、北美洲、澳大利亚、中国

(续)

	细菌 (Hooker, 1986) 生 物	发 生 地
	<i>Clavibacter michiganensis</i> var. <i>sepedonicus</i> , <i>Erwinia carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i> and <i>subsp.</i> <i>Carotovora</i>	欧洲和北美洲
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	热带和亚热带地区
	<i>Streptomyces scabies</i>	世界各地
	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	热带和温带地区
	真菌 (Hooker, 1986) 生 物	发 生 地
	<i>Alternaria solani</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Collectotrichum coccodes</i> , <i>Helicobasidium purpureum</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Spongospora subterranea</i> , <i>Verticillium albo-atrum</i> , <i>V. dahliae</i>	世界各地
	<i>Angiosorus solani</i>	中美洲和南美洲
	<i>Fusarium</i> spp.	北美洲
	<i>Fusarium solani</i> var. <i>Coeruleum</i> , <i>Phoma foveata</i>	欧洲
	<i>Helminthosporium solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	欧洲和北美洲
	<i>Macrophomina phaseolina</i>	北美洲和印度
	<i>Polyscytatum pustulans</i>	欧洲北部、北美洲、澳大利亚
	<i>Synchytrium endobioticum</i>	欧洲、北美洲和南美洲、南非和亚洲
	<i>Phoma exigua</i> var. <i>Exigua</i> , <i>Phytophthora erythroseptica</i>	欧洲、北美洲和澳大利亚

◆ 参考文献

- Anonymous, 1996. The biology of *Solanum tuberosum* (potato). Regulation Directive of the Plant Products Division, Agriculture and Agri-Food Canada, 11 pp.
- Beukema and van der Zaag, 1979. Potato improvement; some factors and facts. IAC, Wageningen.
- Brown, C. R., 1995. Diffusion of potato germplasm and modern breeding. In: Environmental concerns with transgenic plants in centres of diversity: Potato as a model. Proceedings from a regional workshop, Parque National Iguazu, Argentina (Eds. Fredrick, R. J., Virgin, I. and Lindarte, E.), 70 pp.
- Burton, W. G., 1989. The potato. Longman Group UK Limited, 742 pp.
- Caligari, P. D. S., 1992. Breeding new varieties. In: The potato crop: scientific basis for improvement (Ed. Harris, P. M.). Chapman and Hall, London, 909 pp.
- Child, A., 1990. A synopsis of *Solanum* subgenus *Potatoe* (G. DON) (*DARCY*) (*tuberarium*) (*DUN.*) *BITTER* (s. l.). Feddes Repertorium 101: 209-235.
- Clulow, S. A., Wilkinson, M. J., Waugh, R., Baird, E., DeMaine, M. J. and Powell, W., 1991. Cytological and molecular observations on *Solanum phureja*-induced dihaploid potatoes. Theor. Appl. Genet. 82: 545-551.
- Conner, A. J. and Dale, P. J., 1996. Reconsideration of pollen dispersal data from field trials of transgenic potatoes. Theor. Appl. Genet. 92: 505-508.
- Cutter, E. G., 1992. Structure and development of the potato plant. In: The potato crop: scientific basis for improvement (Ed. Harris, P. M.). Chapman and Hall, London, 909 pp.
- Dale, P., 1992. General presentation. In: Report on the seminar on scientific approaches for the assessment of research trials with genetically modified plants, 6-7 April 1992. OECD, Paris.
- Dale, P. J., McPartlan, H. C., Parkinson, R., MacKay, G. R. and Scheffler, J. A., 1992. Gene dispersal from transgenic crops by pollen. In: Proceedings of the second international symposium on the biosafety results of field tests of genetically modified plants and micro-organisms. Goslar, Germany, pp. 73-77.
- Debener, T., Salamini, F. and Gebhart, C., 1990. Phylogeny of wild and cultivated *Solanum* species based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). Theor. Appl. Genet. 79: 360-368.
- Den Nijs, A. P. M. and Peloquin, S. J., 1977. 2n gametes in potato species and their function in sexual polyploidisation. Euphytica 26: 585-600.
- Eijlander, R. and Stiekema, W. J., 1990. Study of gene dispersal from plants produced by recombinant DNA technology; assessment of the crossability of potato and two wild relatives. In: Abstract of the sectorial meeting on risk assessment, CEE-BAP, Padua.
- Evans, K. and Trudgill, D. L., 1992. Pest aspects of potato production Part 1: The nematode pests of potatoes. In: The potato crop: scientific basis for improvement (Ed. Harris, P. M.). Chapman and Hall, London, 909 pp.

- Evenhuis, A. and Zadoks, J. C., 1991. Possible hazards to wild plants of growing transgenic plants. A contribution to risk analysis. *Euphatica* 55: 81-84.
- FAO, 1985. *FAO Production Yearbook* 39.
- Gebhart, C., Ritter, E., Barone, A., Debener, T., Walkemeier, B., Schlachtsnabel, U., Aufmann, H., Thompson, R. D., Bonierbale, M. W., Ganai, M. W., Tanksley, S. D. and Salamini, F., 1991. RFLP maps of potato and their alignment with the homologous tomato genome. *Theor. Appl. Genet.* 83: 49-57.
- Hanneman, Jr., R. E., 1994. The testing and release of transgenic potatoes in the North American Center of diversity. In: *Biosafety of Sustainable Agriculture; Sharing Biotechnology Regulatory Experiences of the Western Hemisphere* (Eds. Krattiger, A. F. and Rosemarin, A.). ISAAA, Ithaca and SEI, Stockholm, pp. 47-67.
- Hanneman, Jr., R. E., 1995. Ecology and reproductive biology of potato; the potential for and the environmental implications of gene spread. In: *Environmental concerns with transgenic plants in centres of diversity; Potato as a model. Proceedings from a regional workshop, Parque National Iguazu, Argentina* (Eds. Fredrick, R. J, Virgin, I. and Lindarte, E.), 70 pp.
- Hawkes, J. G., 1988. The evolution of cultivated potatoes and their tuber-bearing wild relatives. *Kulturpflanze* 36: 189-208.
- Hawkes, J. G., 1990. *The potato: Evolution, biodiversity and genetic resources*. Belhaven Press, London: 259 pp.
- Hawkes, J. G., 1992. Biosystematics of the potato. In: *The potato crop: scientific basis for improvement* (Ed. Harris, P. M.). Chapman and Hall, London: 909 pp.
- Hawkes, J. G., 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: *Potato genetics* (Eds. Bradshaw, J. E and Mackay, G. R.), CAB International, Wallingford, 3-42.
- Hide, G. A. and Lapwood, D. H., 1992. Disease aspects of potato production. In: *The potato crop: scientific basis for improvement* (Ed. Harris, P. M.). Chapman and Hall, London, 909 pp.
- Hooker, W. J., 1986. *Compendium of potato diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul, 125 pp.
- Horton, D. E. and Fano, H., 1985. *Potato Atlas*. CIP.
- Hosaka, K., Ogihara, Y., Matsubayashi, M. and Tsunewaki, K., 1984. Phylogenetic relationship between the tuberous *Solanum* species as revealed by restriction endonuclease analysis of chloroplast DNA. *Jpn. J. Genet.* 59: 349-369.
- Howard, H. W., 1970. *Genetics of the Potato*. Logos Press Limited, London, 126 pp. Jacobsen, E. and Rousselle, P., 1992. Potato. In: *Traditional crop breeding practices; an historical review to serve as a baseline for assessing the role of modern biotechnology*. OECD, Paris, 235 pp.
- Johnston, S. A., Den Nijs, A. P. M., Peloquin, T. P. M. and Hanneman, R. E., 1980. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor. Appl. Genet.* 57: 5-9.
- Johnston, S. A. and Hanneman, R. E., 1982. Manipulations of Endosperm Balance Number overcome

- crossing barriers between diploid *Solanum* species. *Science* 217: 446-448.
- Kirch, H. H., Uhrig, H., Lottspeich, F., Salamini, F. and Thompson, R. D., 1989. Characterisation of proteins associated with self-incompatibility in *Solanum tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* (1989) 78: 581-588.
- Lawson, H. M., 1983. True potato seeds as arable weeds. *Potato research* 26: 237-246.
- Li, P. H. and Fennel, A., 1985. Potato frost hardiness. In: *Potato Physiology* (Ed. Li, P. H.), Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, publishers, 457-479.
- Love, S. and Pavek, J., 1994. Ecological risk of growing transgenic potatoes in the United States and Canada; potential for vegetative escape or gene introgression into indigenous species. *American Potato Journal* 71: 647-658.
- Plaisted, R. L., 1980. Potato. In: *Hybridisation of crop plants* (Eds. Fehr, W. R. and Hadley, H. H.). American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, publishers, Madison, Wisconsin, 483-494.
- Powell, W., Phillips, M. S., McNicol, J. W. and Waugh, R., 1991. The use of RAPD markers to estimate the extent and nature of genetic variability in *Solanum tuberosum* cultivars. *Annals of Appl. Biol.* 118: 423-432.
- Quiros, C. F., Ceada, A., Georgescu, A. and Hu, J., 1993. Use of RAPD markers in potato genetics: segregation in diploid and tetraploid families. *American Potato Journal* 70: 35-42.
- Raman, K. V. and Radcliffe, E. B., 1992. Pest aspects of potato production Part 2: Insect pests. In: *The potato crop: scientific basis for improvement* (Ed. Harris, P. M.). Chapman and Hall, London; 909pp.
- Reheul, D., 1987. Ruimtelijke isolatie in de plantenveredeling. 2. Ruimtelijke isolatie bijinsectenbestuivers. *Landbouwtijdschrift* 40: 15-23.
- Ross, H., 1986. Potato breeding - Problems and perspectives. *Advances in Plant breeding. Supplement 13 to the Journal of Plant Breeding*, 132 pp.
- Sanford, J. C. and Hanneman, R. E., 1981. The use of bees for the purpose of inter-mating in potato. *American Potato Journal* 58: 481-485.
- Schweizer, G., Borisjuk, N., Borisjuk, L., Stadler, M., Stelzer, T., Schilde, L. and Hamleben, V., 1993. Molecular analysis of highly repeated genome fractions in *Solanum* and their use as markers for the characterisation of species and cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 85: 801-808.
- Simmonds, N. W., 1966. Studies on the tetraploid potatoes III. Progress in the experimental recreation of the *Tuberosum* group. *J. Linn. Society (Botanic)* 59: 279-285.
- Simmonds, N. W., 1976. Potatoes. *Solanum tuberosum* (Solanaceae). In: *Evolution of Crop Plants* (Ed. Simmonds, N. W.), Longman, London and New York, 279-283.
- Valkonen, J. P., 1994. Natural genes and mechanisms for resistance to viruses in cultivated and wild potato species. *Plant Breeding* 112: 1-16.
- Van Swaaij, A. C., Nijdam, H., Jacobsen, E. and Feenstra, W. J., 1987. Increased frost tolerance and amino acid content in leaves, tubers and leaf callus of regenerated hydroxyproline resistant potato

- clones. *Euphytica* 36: 369-380.
- Vayda, M. E. , 1994. Environmental stress and its impact on potato yield. In: Potato genetics (Ed. Bradshaw, J. E and Mackay, G. R.), CAB International, Wallingford: 239-262.
- Watanabe, K. and Peloquin S. J. , 1991. The occurrence and frequency of 2n pollen in 2x, 4x and 6x wild, tuber-bearing *Solanum* species from Mexico and Central and South America. *Theor. Appl. Genet.* 82: 621-626.
- Weising, K. , Kaemmer, D. , Ramser, J. S. , Bierwerth, S. and Kahl, G. , 1992. Plant DNA fingerprinting with simple repetitive oligonucleotides. *Adv. in Mol. Genet.* 5: 135-156.
- White, J. W. , 1983. Pollination of potatoes under natural conditions. CIP Circular 11: 1-2.

第六章



番木瓜 (*Carica Papaya*) 生物学特性的共识文件*

第一节 分类和总体介绍

1. 分类

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 是番木瓜科中一种近于草本的 (多汁软木质) 无分枝的小树。16 世纪初欧洲人首次在西半球热带地区发现番木瓜 (Sauer, 1966), 随后番木瓜受到各方关注, 并广为传播 (Ferrão, 1992)。目前番木瓜在世界各地的亚热带和热带气候条件下栽培, 主要是为了获得瓜类果实。

番木瓜科 (Caricaceae) 在分类上属于十字花目 (Brassicales) (有时也称作白花菜目 (Capparales), 该目的植物的主要特征是表达芥子油苷 (硫代葡萄糖苷) (Jørgensen, 1995; Rodman et al, 1998; Olson, 2002)。近来, 人们一致认为, 番木瓜属只有一个种, 即番木瓜 (*C. papaya*)。番木瓜科可能有 6 个属 (Aradhya et al, 1999; Badillo, 2000; Van Droogenbroeck et al, 2002, 2004; Kubitzki, 2003; Manshardt, 2002, Hawaii University.)。大多数属为新热带森林植物, 生长于南美洲和中美洲, 或只生长在中美洲。*Vasconcellea* 是最大的属, 有 21 个种, 过去曾被认为是番木瓜属中的一个派别。其他生长于新热带区的属有墨西哥木瓜属 (7 个种), *Jarilla* (3 个种) 和 *Horovitzia* (1 个种) (Badillo, 1993)。*Cylicomorpha* 属 (2 个种) 生长在赤道非洲的山地森林 (Badillo, 1971)。

高原木瓜 *Vasconcellea* (非 *Vasconcella*——见 Badillo, 2001; Kubitzki, 2003) 与番木瓜的亲缘关系最近 (Badillo, 1993; Aradhya et al, 1999; Van Droogenbroeck et al, 2002, 2004)。高原木瓜包括多个有可食果实的种 (和一些栽培种) (Badillo, 2000; Scheldeman and Van Damme, 2001)。番木瓜科中商业化栽培的种仅限于番木瓜、chamburo (ababai)、babaco 和 toronche 或 higacho (名称因地而异, 有时当地一个名称可指代多个种)。Chamburo 或山番木瓜 (*V. cundinamarcensis*) (经常指 *V. pubescens*) 种植于美洲, 果实常用于来烹调和加糖食用。智利有商业化规模的番木瓜栽培, 在当地果实称为 ababai (Scheldeman and Van Damme, 2001)。在南美洲西部 (特别是厄瓜多尔), 消费者很喜爱 babaco (通常称为 *V. pentagona*), Babaco 也在其他一些地方栽培, 包括新西兰、南非、西班牙和意大利 (Scheldeman and Van Damme, 2001; Villarreal et al, 2003)。Babaco 通常被认为是 F1 代杂交种 (被看作 *V. × heilbornii*, 但有时被认为是五棱番木瓜

* Originally published by the OECD in English under the title: "Consensus Document on the Biology of Papaya (*Carica Papaya*)" © 2005 OECD. All rights reserved.

的变种)(Jiménez et al, 1999; Wiersema and León, 1999; Scheldeman and Van Damme, 2001; Morales Astudillo et al, 2004)。Higacho(或普遍认为的 toronche)被认作是 *V. × heilbornii* var. *chrysoptala*(有时称作 *V. chrysoptala*)的杂交种, 生长于厄瓜多尔, 它的一个商业变种种植于新西兰(NRC, 1989; Scheldeman and Van Damme, 2001)。

国际植物遗传资源研究所 (IPGRI) 从这个科鉴定出了 8 个可食用果实品种。从墨西哥到南非的食用者主要从野生或半野生植物中采摘果实, 也可能种植部分果树(可称作早期驯化)。Siglalón Silvestre (*V. stipulate*) 是厄瓜多尔南部的一种当地食品。生长于厄瓜多尔、秘鲁和玻利维亚的 Col de monte (*V. monoica*) 具有可供生食成熟食的小果实。Chungay 或 mito (*V. candicans*) 是秘鲁的一种常见食品 (De Feo et al, 1999)。哥伦比亚的 Papayuelo (*V. goudotiana*) 是一种小的类似苹果的果实。其他可食用的 *Vasconcellea* 有 tapaculo (bonete, papayito) 或高原木瓜 (*V. cauliflora*) 和 higuera (calasacha), 高原木瓜的果肉在食用前可用不同方法进行加工 (Coppens d' Eeckenbrugge and Libreros Ferla, 2000), higuera (calasacha) 是 *V. quercifolia* 的坚果。此外, Scheldeman 和 Van Damme (2001) 指出, *V. crassipetala*, *V. microcarpa* (lechocillo), *V. palandensis* (papaillo), *V. parviflora* (coral) 和 *V. sphaerocarpa* (higuillo negro) 的果实可食用。*Jacaratia digitata*, *J. mexicana*, *J. spinosa* 和 *Jarilla heterophylla* 的果实也在不同地区被食用 (Whitmore, 1978; Scheldeman and Van Damme, 2001)。

2. 形态

番木瓜通常是不分枝、叶顶端簇生的巨型草本植株, 高 2~10 m, 如果植株达到不易收获果实的高度, 种植者会定期修剪以控制其高度。番木瓜树干笔直, 树干末端簇生(或轮生)着具有长而粗壮叶柄(125cm)的掌状裂叶, 巨大的叶片伸展形成松散而开放的树冠。每张叶片通常为 5 裂或 7 裂, 每个裂片羽状深裂达 20~60 cm (甚至 75~100 cm), 裂片交汇处即叶柄末端 (Campostrini and Yamanishi, 2001a)。树干基部通常 10~30cm, 树冠处粗 5~7.5cm, 逐渐变细, 树干表面具有大而明显的叶痕; 随着树龄增加, 树皮变薄, 经常为中空(节间) (Elias, 1980)。柔软的木质主要由韧皮部和少量次生木质部形成 (Whitmore, 1978; Carlquist, 1998)。这种快速生长的植株大约有 15~30 片成熟叶片, 叶片在树上存活 2.5~8 个月, 新叶以每周 1.5~4 片的速度长出 (Sippel et al, 1989; Allan et al, 1997; Mabberley, 1998; Nakasone and Paull, 1998; Fournier et al, 2003); 叶片衰老似乎是行使其在植株冠层着生部位的功能(如自荫作用), 而不仅是因为衰老。植株的各个部位, 包括未成熟的果实, 均含有稀且具腐蚀性的乳水。野生树木的寿命约为 15~20 年 (Anon, 2003), 即使年老或受损伤, 植株也很少会发育成叉状树干或分成数个分枝; 一些地方(如肯尼亚)的种植者通过修剪树苗或去顶, 使其产生多条树干 (Dodson and Gentry, 1978; Rao, 1993; Malo and Campbell, 1994)。

花梗从叶腋中伸出。驯化植株有 3 种基本花型, 但可能存在一定程度的变异, 从而产生 6 种类型 (Storey, 1941, 1967; Hsu, 1958a, 1958b; Mosqueda Vázquez and Molina Galán, 1973; Fisher, 1980; Nakasone and Lamoureux, 1982):

- 雌花(具有球形至椭圆形子房)(有时在农艺上称为“第 1 类”);
- 雄花(有 2 类): 形态典型(具有 10 枚雄蕊和小而未发育的雌蕊)(第 5 类), 或某

种程度上具有两性外型,但功能为雄花(第4-1类);

- 两性花(有3类):一雌十雄(具有10枚雄蕊和1枚伸长的子房)(第4类),一雌五雄(具有5枚雄蕊和1枚深皱沟卵形子房)(第2类)和不规则型(第3类),即雄蕊数目可变且花丝形成心皮状(即心皮化)(译者注:类似于棉花的雄蕊管)。

花序和花的形态因树的性别而异。典型品种为雌雄异株(具有单性花,只为雄株或雌株)或一雌多雄(具有两性花和单性花、雌雄同体和单性植株)。雌株中花梗长约2.5~6cm生一朵或多朵具有弧状分离花瓣的钟状花。雄株中,长约60~100cm(甚至150cm)的花序悬挂而生,许多小的喇叭状花朵着生其中,每朵小花的花瓣(即花药丝)聚合成窄长而有扩口的管。(Fisher, 1980; Calif. Rare Fruit Growers, 1997; Nakasone and Paull, 1998; Ronse Decraene and Smets, 1999)。雌雄同体的植株形态,介于单性植株之间,花梗长度不足25cm,有两性花,花呈管状,中间或下部收缩,花瓣(管)扩口较大。雌雄同体的植株有时也长有雄花(Crop Knowl. Master, 1993)。一些植株在短花梗上产生雄花。

番木瓜具有高度复杂的性别表达和开花能力。一些农业品种(如Solo和Eksotika)为雌花两性花异株——即植株或雌雄同体或为雌株。此外,番木瓜植株的性别易发生变化。两性花可因环境条件而减少子房大小和功能,进而变成雄花。雄株(有雄蕊)及雄花两性花同株的植株(具有雄花和两性花),其表型稳定或易变。这些类型都可表现出季节性的性别逆转,发育成雄花、两性花和雌花(Storey, 1958、1976)。幼小的雌雄同体植株第一次开花时可能有雄花;但是成年植株仅具有两性花(Stambaugh, 1939)。雌株(有雌蕊)性别表达稳定,它们不会发育成具有雄性结构的花(Hofmeyr, 1939b; Nakasone and Paull, 1998)。关于改变性别表达和形态的条件,详见第五节性别发育的诱导性改变

果实由果柄悬挂并着生在树干上部,着生部位在老叶以下,幼嫩果实的着生部位高于成熟的果实。果实形状是针对消费者和市场偏好而选择的结果,也是花型的反映。大果实通常为球形或卵形至梨形或长形,长度10~50cm(Storey, 1969、1987)。果实的重量变化很大(约0.35~10kg甚至12kg)(Font Ouer, 1958; Linnell and Arnount, n. d),果实重量也主要依赖于消费者和市场的选择。据Storey(1969, 1987)报道,南美和南太平洋地区通常喜欢2.5~6.0kg的果实,南非人喜欢1.25~2.5kg有小裂片的果实,独型果实只有400~500g(夏威夷开发)。关于亚种和品种的其他情况,可见表6-1和第五节繁殖类型和栽培地点。

第二节 分布和起源中心

番木瓜是西半球北部热带地区的本地种。有人认为它的起源中心为中美洲或墨西哥南部(de Candolle, 1883、1884; Singh, 1990; Storey, 1976)。Manshardt和Zee(1994)在墨西哥南部和洪都拉斯北部的加勒比海沿海的低地发现野生番木瓜(只有雌雄异株的)。野生雌株产生高尔夫球大小的果实,重量不足100g,这种果实通常不可食用(Manshardt, 1999)。这种发霉的苦味果实(浆果)可产生大量种子,其种子比驯化的番木瓜

种子小 25%，萌发条件更为严格。经测试，野生型种子需要强光才能发芽，但是 75% 的驯化种子可在黑暗中发芽。而且，温度波动会部分抑制野生种子的萌发，但不影响驯化种子的萌发 (az and Vázquez-Yanes, 1998)。与太平洋沿岸的野生番木瓜相比，中美洲加勒比海沿岸的野生番木瓜 (feral papaya) 渗入了更多野生型性状，太平洋沿岸的野生番木瓜似乎野生型性状少 (Manshardt and Zee, 1994)。从已知的野生番木瓜分布区向西和向南延伸，野生植株中渗入了更多的驯化性状，同时经过驯化的野生植株数量增加了。

番木瓜相对较大的一个属 *Vasconcellea* (以前在分类上属于 *Carica*) 的多样性中心是沿安第斯山脉的南美地区尤其是厄瓜多尔 (Badillo, 1993; Morales Astudillo, et al, 2004), *Vasconcellea* 属以外的其他番木瓜科物种的多样性中心远至墨西哥、智利、阿根廷和乌拉圭 (Aradhya et al, 1999; Van Droogenbroeck et al, 2004)。因此一些人认为南美是番木瓜的起源中心 (Prance, 1984)。不过，有人提供了相反的证据，发现那里只存在经过驯化的野生番木瓜 (Manshardt and Zee, 1994; Morshidi, 1996)，但是在墨西哥和洪都拉斯发现了确切的野生型植株 (Moreno, 1980; Manshardt and Zee, 1994; Paz and Vázquez-Yanes, 1998; Manshardt, 1999)。此外，叶绿体和线粒体的同工酶分析、RAPD (随机扩增多态性 DNA) 分析和 RFLP (限制性片段长度多态性) 分析表明，番木瓜 *Vasconcellea* 属物种存在明显分化 (Jobin-Decor et al, 1997; Aradhya et al, 1999; Kim et al, 2002; Van Droogenbroeck et al, 2004)。这就解释了在试验中番木瓜与番木瓜科的其他物种难以形成杂交种的原因 (见第六节 番木瓜的种间杂交)。由于番木瓜在遗传上分化分明，而且只有南美存在野生番木瓜，因此美国南部是野生番木瓜的起源地的观点几乎站不住脚。

番木瓜可能是在北美的热带地区被驯化的，更为确切的地区尚未确定 (Schroeder, 1958)。北美、中美洲、加勒比海和南美的很多热带生境均有野生番木瓜。在北美，墨西哥和美国的佛罗里达的亚热带地区是该物种目前分布的最北端，南部边界则从哥伦比亚和委内瑞拉扩展到法属圭那亚地区、巴西、秘鲁、玻利维亚和巴拉圭。有证据表明，在佛罗里达南部，当地土著人在哥伦布发现美洲大陆之前就开始利用番木瓜 (Allen et al, 2002)。据报道，至少于 1519 年和 1526 年前，西班牙人和葡萄牙人分别在墨西哥 (玛雅人时期)、巴拿马加勒比海沿岸地区以及哥伦比亚遇到过栽培番木瓜，至少在 1756 年牙买加就有了栽培番木瓜的报道 (Sauer, 1966; Singh, 1990)。番木瓜于 16 世纪被运输到菲律宾和印度，很快传播到亚洲的热带地区、非洲和太平洋岛屿 (Singh, 1990; Ferrão, 1992)。关于番木瓜果实、番木瓜树或两者不大广泛应用的名称有：papaw, paw paw (paw-paw, pawpaw) (但是番荔枝科的三萼泡泡果也被称为 pawpaw), papaye, papayer, papayo, lechosa, fruta bomba, melón zapote, mamón, mamonero, mamão 和 mamoeiro。在很多国家，番木瓜现在已融入到当地的文化、农业和烹饪中。作为未驯化种或外来物种，番木瓜在栽培区之外的西半球和东半球 (包括大洋洲) 热带地区中得到不同程度的栽培。

第三节 作为农作物应用和农艺措施

番木瓜的非商业化生产十分广泛，很多国家收获的番木瓜不用于出口。相反，种植者

自己消费这些水果或在当地销售。例如, 据估计, 印度尼西亚生产了744 000吨番木瓜, 只有不到4吨出口国外 (Setyobudi and Purnomo, 1999)。在越南, 50%的农户在自己的园子里栽培番木瓜, 有500万~1 000万甚至更多的农户种植了1~10棵树, 然而只有5 000~10 000的农户在果园或大田中生产番木瓜 (Le Tran and Tran, 1999)。在菲律宾, 多达150万农户的现金收入来自庭院或农业生产中番木瓜的销售 (Kositratana et al, 1999)。种植番木瓜, 其单位面积土地的收入可比水稻多2~4倍, 对于小农户而言, 种植番木瓜的整体价值不可低估 (The Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia-Workshop participants, 1999; ISAAA; cf. Cook, 2004)。

据报道, 2004年, 番木瓜在52个国家的商业生产总量达650万吨 (FAO, 2005)。总种植面积达365 846公顷。按地区算, 美洲中部 (中美洲和北美) 的种植区有7个, 加勒比海的种植区有5个, 南美有10个, 非洲有11个, 近东有4个, 亚洲和澳大利亚有10个, 大洋洲有5个。主要的生产国是巴西 (24.6%)、墨西哥、尼日利亚、印度、印度尼西亚、埃塞俄比亚、刚果民主共和国、秘鲁、委内瑞拉和中国。

1. 应用和负面影响

(1) 工业应用

番木瓜主要用作市场上销售的新鲜水果, 也用于制作饮料、果酱、果胶、糖果和蜜饯。未成熟的果实、叶子、花和根可作为蔬菜 (Duke, 1967; Watson, 1997)。番木瓜有一些已知的工业用途, 著名的有木瓜蛋白酶 (四种半胱氨酸蛋白酶中的一种) [El Mous-saoui et al, 2001], 性质与胃蛋白酶相似。沿着未成熟的果实纵向切口, 诱发胶乳从切口流出, 从中纯化出的木瓜蛋白酶可用于食品、饮料、药品和其他制造业 (Mabberley, 1998; Wiersema and León, 1999)。例如, 食品工业将木瓜蛋白酶用于酿造、婴儿食品生产以及人和动物用蛋白质的生产。木瓜蛋白酶也可用于生产防缩水羊毛和丝绸, 以及用于皮革软化过程, 从而生产更柔软的皮革。不过, 在一些应用中, 某些人工合成的酶和其他来源的酶正在替代天然木瓜蛋白酶的应用 (Watson, 1997; ETA, 2001)。番木瓜胶乳已经用于生产口香糖 (de Wit, 1966)。从木瓜球形种子 (200~1000粒) [大约 (2~5mm) × (3.5~6mm)]、果实及叶片的其他成分中提炼出的油用于化妆品和肥皂生产。

(2) 营养和医药的应用

番木瓜成分有益于人的营养和健康。一个中等大小番木瓜 (食用部分为350g) 的维生素A和维生素C含量, 超过了美国食品营养学会 (Inst. Medicine, Natl. Acad. Sci.) 确定的居民膳食营养素参考摄入量的成人每日最低摄入量 (CRN, 2001; USDA, 2001), 番木瓜是矿物质钾、镁和硼的良好来源 (Hardisson et al, 2001)。番木瓜可用于传统和现代医药以及牙科。其果实、种子、胶乳和提取物已至少用于40种人体症状的治疗, 人们正着力研究其在其他治疗中的应用 (Lewis and Elvin-Lewis, 1977; Mezhlumyan et al, 2003; Petitto, 2004)。有部分应用功效已有记载: (Animal Sci. Dept. Cornell Univ., 2001), 包括驱虫剂 (Satrija et al, 1995)、抗变形虫剂 (To and Kyu, 1934) (Burdick, 1971) 和肠细菌抗菌剂 (Osato et al, 1993), 其中抗变形虫剂可能是由生物碱即番木瓜碱介导的。木瓜蛋白酶可用于制备或生产抗生素和疫苗的助剂和试剂, 木瓜凝乳蛋白酶是治疗脊柱椎间盘突出生物制剂 (Quenum, 2001; Mezhlumyan et al, 2003)。

(3) 负作用及其他作用

已有人描述对番木瓜的过敏反应，包括呼吸系统对花粉的过敏反应 (Blanco et al, 1998)。食用成熟的水果很少产生上述不良后果 (Castillo et al, 1996; Iliev and Elsner, 1997)。皮肤可因接触水果 (Ezeoke, 1985) 或提取物 (Banik et al, 1992) 而产生这些反应。接触含有木瓜蛋白酶或其他蛋白酶的受磨损未成熟果实和植株或提取物中的胶乳，可能伤害未加保护的皮肤，但这些胶乳也可用于治疗伤口 (Mezhlumyan et al, 2003)。大量食用含有氰苷 (Olafsdottir et al, 2002; Seigler et al, 2002) 和单宁的木瓜组织 (包括叶片和根)，可能产生不良反应。

番木瓜酶可用于医疗注射。Moneret-Vautrain 等 (1985) 报道了注射木瓜凝乳蛋白酶提取物导致过敏的概率——近 1% 的人可能产生不良反应。注射番木瓜的其他已知半胱氨酸蛋白酶加木瓜蛋白酶和甘氨酸肽链内切酶 (Dando et al, 1995) 也可能引起免疫反应 (Dando et al, 1995)。对果实、花粉和木瓜蛋白酶的过敏反应由 IgE 介导 (Blanco et al, 1998; Soto-Mera et al, 2000)。

一些人认为食用番木瓜会对胎儿发育产生风险，能够引起或预防流产，已有人研究了番木瓜对妊娠的可能影响 (Eno et al, 2000; Adebisi et al, 2002a)。一项对怀孕大鼠的研究表明，从成熟果实中提取的汁液是安全的 (Adebisi et al, 2002a)。体外实验中未观察到番木瓜汁对子宫肌产生影响，但是粗提胶乳可引起痉挛 (Adebisi et al, 2002a, 2002b)。已有人报道了番木瓜不常食用的部分所产生的其他生理效应，例如对雄性啮齿动物和猴的繁殖的影响。小鼠、大鼠和长尾猴食用了番木瓜种子提取物后，似乎出现不育现象，但其不育性可恢复，并未出现中毒现象 (Chinoy et al, 1994; Pathak et al, 2000; Lohiya et al, 2002)。番木瓜种子提取物可防治一种寄生的原生生物，这种寄生生物是水产养殖中鱼的一种主要病害 (Ekanem et al, 2004)。

2. 繁殖

(1) 种子

番木瓜生产者一般种植种子，农艺专家建议购买商业种子进行繁殖 (Muthukrishnan and Irulappan, 1985)。大多数商业种子的生产商提供的是种子自交系，但也提供一些杂交种 (如 Rainbow 和 Eksotika II)。关于杂交种地位的进一步讨论可见本节第三小节和第七节。栽培品种是遗传变异的来源。商业和育种的常用品种见表 6-1。

为了保证种子质量，种植者应当考虑有性繁殖类型和品种的遗传变异。品系的异质性增加了后代性状多样性。雌雄异株的品种为自由授粉，种子易产生表型变异。雌雄异株品系 (见第五节，繁殖类型和栽培地点) 多为杂合体，只有树木和果实的特征得到保持。为了在各世代中保持性状，生产者应严格控制授粉，并对多个品系进行严格隔离。该类品系要应用严格杂交程序 (Watson, 1997)。保持某些品种纯度的策略之一是从自花授粉的雄树 (“模棱两可”的雄树) 中获得种子，这种树仅在特定条件下 (如季节) 产生果实 (Aquilizan, 1987)。另外，也可通过选择来开发优良品系，尤其在种植者通过套袋和人工授粉生产种子时。

在雌雄同体品系中，自花授粉为主要方式，但也不排除杂交的可能性 (见第五节 授粉)。从自花授粉的雌雄同体植株上进行种子选择将使性状更为均一 (Singh, 1990)。严

格控制杂交种子的生产是另一方法,其重要性正在增加。种子生产者用选择的雌雄同体植株的花粉给选择的雌株授粉。

当包含在果实中或未成熟时,种子(包括最外层——凝胶状肉质种皮)(Fisher, 1980)中含有阻止其萌发的抑制剂。(Yahiro and Hayashi, 1982; Ellis et al, 1985; Arumugum and Shanmugavelu, 1975; Tseng, 1992)。果实中新收获的种子发芽率极低且不稳定。除去肉质种皮可大大增加新鲜种子的发芽率。对种子进行干燥、冷藏以及种植前浸泡可提高存活率、发芽率及萌发的整齐度。在 15℃ 下贮存 30~50 d 可大大降低生长抑制剂的活性,提高发芽率(Yahiro 1979; Yahiro and Hayashi, 1982)。浸泡(定期换水)也可大大提高发芽率(Paz and Vázquez-Yanes, 1998)。种子长期贮存方法是使其干燥至含水量 9%~12% (Teng and Hor, 1976; Ellis et al, 1991)。在干燥和低温条件下储藏,木瓜种子可存活 3 年(Malo and Campbell, 1994)。热激可打破干燥种子的休眠(Wood et al, 2000)。

番木瓜可在大田直接播种,也可在苗圃催芽,种子萌发于播种后 10~21 天或预处理后 4~10 天,也可能间歇性萌发达 35~40 天。(Chen and Tseng, 1996; Bhattacharya and Khuspe, 2001)。苗圃培育约 60d 的幼苗可移栽到田间(Muthukrishnan and Irulappan, 1985)。由于开花时才知植株的性别,因此经常种植较多树苗,然后通过间苗而除去非目的性别植株。如果欲种植雌雄同体的植株,每一穴位上可移栽 2~4 棵(雌花两性花异株)植株。确定性别后(播种后约 4~8 个月)除去雌性小苗。如果欲种植雌雄异株的植株,则要除去过多的雄株,只留一棵雄树来对 10~15 棵(有时更多)雌株进行授粉。

近来已经建立了几种分析方法,使通过常规分子检测确定幼苗性别成为可能。这些方法包括:用于分析雄株和雌雄同体植株的 SCAR 标记(该标记由 RAPD 标记发展而来)(Urasaki et al, 2002a、2002b),在雌株中不产生的 1 对 SCAR 标记(Deputy et al, 2002),雄性特异性的 SSR 标记和 SCAR 标记(Parasnis et al, 1999、2000),雌雄同体特异性的 RAPD 探针(Lemos et al, 2002)。此外,Chan-Tai 等(2003)正在深入评价一个雌雄同体的 Sunrise Solo 突变体,该突变体在自交时性别表型十分稳定,只产生雌雄同体植株。

(2) 营养繁殖

南非品种 Hortus Gold 采用茎枝插条进行营养繁殖(Allan, 1974)。Allan (1964)报道了在试验中通过插枝成功进行番木瓜的繁殖。一般选择冬季过后新长出的大的多叶侧枝作为插条,它在周期性薄雾条件不易于生根。用细胞分裂素和赤霉酸的混合物对适宜大小的侧枝(去除顶端优势)进行处理可促进侧枝诱导和繁殖成植株。(Allan, 1995; Ono et al, 2004)。插枝大约在 3 周内生根。在特殊情况下,一些品种的木瓜是无籽的(Wettstein et al, 1944; de Wit, 1966)。

与种子繁殖相比,无性繁殖的植株一致性好、开花早、结实高度低且产量高(Drew, 1988; Chan and Teo, 2002)。插枝繁殖的“夏威夷彩虹”转基因番木瓜比种子繁殖的后代开花早 1~3 个月,结实部位低 30 cm (Fitch et al, 2002)。无性繁殖植株的果重也明显增加,在不利的环境条件下差异更为显著。人们开发了小规模商业化和实验室组织培养技术。(Litz and Conover, 1978; Drew, 1992; Magdalita et al, 1997a)。田间试验发现,

体外试管苗性别稳定、不发生无性系逆转。

番木瓜也可通过嫁接繁殖。Airi 等 (1986) 将品种 Co-1 和 Honey Dew 的接穗成功地劈接到幼苗上。也可应用修补嫁接和 T 形芽接, 但成功率低于劈接法。在马来西亚, 一些果园种植者应用嫁接来取代 Eksotika 品种的结果雌树 (Cheah et al, 1993)。植株性别一旦确定, 繁殖人员就可用 Eksotika 雌雄同体植株的小枝 (底部直径 2~3 cm) 作为接穗, 劈接在雌树上, 接穗在嫁接 6 个月后可结出果实。

(3) 品种的选择: 自交系和杂交种

尽管市场上最常见的是当地番木瓜品种, 但生产商经常种植来自其他地方的品种。Singh (1990) 指出, 就表型一致性和稳定性而言, 只有几个品种可作为严格意义的栽培品种, 只是 Solo 最接近这一标准。如第七节所述, 栽培品种是遗传变异的来源, 在夏威夷开发的 Solo 组品种具有有限的、内在的遗传变异性。其他表型一致的品系有来自马来西亚的 Eksotika 和 Eksotika II, 以及中国台湾 Known You 种子公司销售的 Tainung 系列 (Formosa 组) 杂交种和自交种 (Manshardt, 2002, 私人通信)。生产商经常种植 Solo、来自泰国的 Khaek Dam、以及 Tainung (Subhadrabandhu and Nontaswatsri, 1997; Le Tran and Tran, 1999; Story, 2001)。其他 Solo 品种还有 Kapoho 和 Waimanalo (Watson, 1997; Beltraide, 2000)。果实较大的品种 (如 Maradol) 也广泛种植。表 6-1 列出了在商业和育种中常用的一些品种。

表 6-1 商业和育种中常见的番木瓜品种

品 种	起 源	平均果重, 显著性状	果实特征 (如形状、颜色)
Bettina	澳大利亚 (佛罗里达 Betty×昆士兰州品种)	1.36~2.27 kg	圆形—卵形颜色好
Cariflora	美国佛罗里达	0.8 kg 抗番木瓜环斑病	圆形, 暗黄至浅橙色肉质
Coorg Honey Dew ^H Eksotika ^H	印度 马来西亚 (Sunrise Solo ×Subang6)	2~3.5 kg 0.6~0.9 kg	长形至卵形、黄色 长(从雌雄同体的植株上)橘红色果肉
Eksotika II ^H	马来西亚 (Eksotika lines19×20)	0.6~1.0 kg 比 ksotika 高产	皮上有较少的斑, 比 Eksotika 甜
Sekaki ^H	马来西亚	1.0~2.5 kg	长、圆柱形、皮光滑、红色、肉质紧。
Hortus Gold (se- lection: Honey Gold)	南非	1 kg 通过嫁接繁殖	圆形—卵形, 金黄色
Known You 1 ^H	中国台湾	1.6~3 kg, 抗番 木瓜环斑病	十分细长肉质黄色
Maradol	古巴	2.6 kg	伸长, 皮绿色或黄色
Rainbow ^H	美国夏威夷 (SunUp× Kapoho Solo)	0.65 kg 转基因, 抗 PRSV.	梨形至椭圆形, 橘黄色果肉
Red Lady 786	中国台湾	1.5~2kg 抗 PRSV	伸长果肉红色
Red Maradol	墨西哥	2.5~2.6 kg	果肉红色、皮成橘黄色
Solo ^H	在美国夏威夷培育, 最初 来源于于巴巴多斯岛	0.5~1 kg 两性花 严格自花授粉	梨形 (雌雄同体的植株上) 皮橘黄色 果肉金橙色

(续)

品 种	起 源	平均果重, 显著性状	果实特征 (如形状、颜色)
Kapoho Solo ^H	美国夏威夷	0.45 kg	梨形, 但是颈部比 Sunrise Solo 短, 果肉橘黄色
Sunrise Solo ^H	美国夏威夷	0.57 kg	梨形、粉红色果肉
Tainung 1 ^H	中国台湾	1.1 kg	果蒂 (雌雄同体植株), 红色果肉

注: H 雌雄同株品种 (即一些植株两性花, 其他植株只有雌花)。

过去, 番木瓜研究人员认为不需要通过杂种提高该作物性能。最近的研究表明, 杂交具有改良作物的潜力。在农艺评估 (Subramanyam and Iyer, 1984; Dinesh et al, 1992; Chan, 2001) 和种子生产试验 (Grant, G., 2004; Papaya Seed Australia, 私人通信) 中, F1 代杂交种具有提高植株活力和产量等方面的优势。在马来西亚, Eksotika Line 20 与近亲系杂交所产生的 F1 代杂交种 Eksotika II, 在活力和产量方面具有杂种优势 (Chan, 1992)。在夏威夷, 转基因品种 Rainbow 来自于雌花两性花异株亲本系 SunUp (转基因) 和 Kapoho (非转基因品种) 的 F1 代。在澳大利亚, 约 65% 商业品种选种雌雄异株的杂交种 1B, 种植面积超过 10hm² (Grant, G., 2004; Papaya Seed Australia, 私人通信)。其他的杂交种也已商业化, 并普遍种植。澳大利亚昆士兰州政府保存了用于杂交所生产的亲本, 并且启动原种生产计划对种子生产商进行培训 (Dunn, J., 2004; Queensland Dept. Primary Indust. & Fisheries, 私人通信)。在雌雄同株植物的双列杂交所期望的农艺性状表现出良好的配合力 (Dinesh et al, 1992; Subhadrabandhu and Nontaswatsri, 1997)。

3. 耕作措施

番木瓜种植后 1 年内 (一些品种在 7~9 个月内), 开始结果。大规模商业生产中植株的寿命周期通常为 3 年, 但一些地方可能短于或长于这个时间 (Singh, 1990; Watson, 1997)。在美国的 Virgin 岛, 已经开发出结果早、结果位置低的一年生栽培番木瓜, 从而最大限度地降低番木瓜环斑病和季节性飓风的破坏 (Zimmerman and Kowalski, 2004)。在夏威夷, 番木瓜第 4 年产量急剧下降, 因而一般在第 3 年后重新种植 (Younge and Plucknett, 1981)。如果冬季温度温和 (如海洋的缓冲作用), 在亚热带地区可能实现番木瓜的连续生产, 但是在一些地方, 植株在较冷月份开花这可能会降低夏季的收获期产量 (Watson, 1997)。尽管一些地区可常年生产果实, 但是种植的月份可影响植物的发育、收获时间和总产量 (Singh and Singh, 1998)。果实在 7~9 个月内开始成熟, 2 个月后可进行全面收获。番木瓜因品种不同可能需要进行疏果处理。例如, Sunrise Solo 每节可结 5 个果实, 而通过人工减少到 2 个 (Watson, 1997)。

种植密度取决于番木瓜的品种和种植地区, 通常的措施是每 hm² 种植 1 160~1 930 株 (Watson, 1997), 行距为 2.7~3 m, 株距为 1.8~2.7 m。有时要进行双行种植, 如行距为 3.25 m×1.75 m×2.4 m (PROSEA, 1991)。成功的种植措施包括在果树之间的空地上进行适当的土壤覆盖。Younge 和 Plucknett (1981) 的研究表明, 相对于无植被而言, 树间空地生长三叶草或青草会降低收益, 空地上杂草丛生同样减少利润。用垃圾覆盖空地可提高产量, 因为在番木瓜的连续生产中, 可能出现三叶草的生长粗干草覆盖也可显

著提高产量 (Elder et al, 2002a)。

若安排适当, 番木瓜可进行间作。在印度, 在番木瓜树达到结果年龄之前, 可与短期蔬菜作物西红柿 (*Lycopersicon*)、洋葱 (*Allium*)、甘蓝或花椰菜进行间作 (Muthukrishnan and Irulappan, 1985), 但是在结果的几个月中应当避免与番木瓜竞争, 以免降低产量。在尼日利亚, 已经检测了番木瓜与黄麻、甘薯 (*Ipomoea batatas*)、黄秋葵 (*Abelmoschus esculentus*) 和西瓜 (*Citrullus lanatus*) 进行的间作 (Aiyelaagbe and Jolaoso, 1992)。棉蚜或瓜蚜 (*Aphis gossypii*) 可从葫芦 (葫芦科) 上传播番木瓜环斑病毒 (Ali et al, 2004)。一些种植者在芒果 (*Mangifera indica*) 或荔枝 (*Litchi chinensis*) 的行间将番木瓜作为短期间作物种植 (Muthukrishnan and Irulappan, 1985)。在马来西亚, 人们有时将番木瓜与油椰或橡胶进行间作。(Chan et al, 1999)。由于番木瓜通常为 2 年或 3 年生作物, 这类间作对未到达生产年龄的树木影响很小。

4. 栽培要求

充足的灌溉对植物生长和果实品质极为重要, 番木瓜的最佳降水量为 1 000~2 500 mm (Watson, 1997), 同时需要考虑不同季节降雨量的变化。降雨模式可能引起土壤水分亏缺, 因此在果实生产时需要补充水分 (Terra de Almeida et al, 2003b)。所用的措施有喷灌、改良的滴灌或树下灌溉。由于喷灌会增加叶片病害, 它可能是最合适的方式 (Watson, 1997)。就澳大利亚而言, Watson (1997) 建议一周两次回灌根区, 以保持土壤含水量。番木瓜栽培的适合 pH 为 5.0~7.0 (Nakasone and Paull, 1998), 通常用石灰增加碱性。

番木瓜为生长快、结果多的作物, 从种植到收获的整个过程, 都应当提供均衡的营养 (Cunha and Haag, 1980; Watson, 1997)。氮、磷和钾对植物生长具有重要作用 (Shoji et al, 1958; Awada et al, 1986; Nakasone and Paull, 1998)。氮源不足加上气温的降低可导致一些品种的花心皮化, 产生不能上市的果实 (Awada and Ikeda, 1957)。硼不足可引起畸形果和胶乳外渗 (Chan and Raveendranathan, 1984), 该症状可通过叶面施用硼酸或地面施用硼砂消除。

5. 产量参数

不同国家的番木瓜果实产量差异很大, 这取决于土壤特性、品种、病虫害发生率和管理措施 (Singh, 1990)。果园的生产能力也取决于结果树的数量、雌雄同株和雌株的类型、单株平均结果数量 (可能为 25~100) 和果实的平均重量 (通常为 350~3 000g)。在 1991—2001 年的 10 年间, 世界平均单产为每 hm^2 15 000 kg (FAO, 2001)。印度的番木瓜的最优单产量是每 hm^2 27 000~35 000 kg; 特立尼亚为每 hm^2 12 500~6 2500kg; 夏威夷虽然普遍单产为 20 00~3 000kg/ hm^2 (除出残次果) 但实验中已实现单产 100 000kg/ hm^2 (Manshardt, 2002, 私人通信)。由于番木瓜的产量随树龄而变化, 在集约种植条件下, 种植后的第 1 年产量最高。

每年从未成熟的果实中可获得几千吨番木瓜胶乳。一个面积不低于 10 hm^2 的果园通常每年生产 2t 干乳胶 (El Moussaoui et al, 2001)。

番木瓜种子的生产因品种、种植条件、栽培措施 (如在隔离田中自由授粉或人工控制授粉) 和目的 (如生产市场销售的基础种子或育种种子) 的不同而有很大差异。例如, 在

印度 (比哈尔省), 雌雄异株的 Pusa Dwarf 和 Pusa Giant 比雌花两性花异株的 Pusa Delicious 和 Pusa Majesty 在人工授粉情况下用较低的成本生产更多的种子。在隔离小区的一个点, Pusa Dwarf 的种子产量为 579 kg/hm², 而另一地点在控制授粉情况下, 产量为 362 kg/hm²。人工授粉的 Pusa Majesty 的产量只有 52 kg/hm² (Ram and Majumdar, 1990; Ram, 1996)。

第四节 害虫和病原体

番木瓜的乳白色胶乳贮存于植物体内密集、网状交织的乳汁管 (连在一起的细胞) 中, 但成熟果实内不含有 (Roth and Clausnitzer, 1972; Fisher, 1980; Zeng et al, 1994)。胶乳可通过清洁和愈合伤口而起到防御作用。胶乳 (含水量约 85%) 的可溶性部分含有各种生物分子, 包括一些可能参与或直接参与抵御昆虫或病原体的生物分子——如糖基水解酶 (如第 II 类番木瓜几丁质酶)、蛋白酶抑制剂 (番木瓜西司他汀) 和 9 种蛋白酶 (El Moussaoui et al, 2001; Azarkan et al, 2004)。木瓜蛋白酶 (不是木瓜主要的半胱氨酸蛋白酶) 是防御一些鳞翅目幼虫 (蚕蛾, 天蚕蛾科; 夜蛾和斜纹夜蛾, 夜蛾科) 的关键因子 (Konno et al, 2004)。不过, 在夏威夷, 用螨类害虫 (叶螨和 *Calacarus*) 和白粉菌接种木瓜幼苗, 未发现诱导产生的抗性; 相反, 在消毒并移栽至田间后诱导产生较弱的敏感性 (Fournier et al, 2004)。主要害虫和病原体可逃避防御, 也可通过其他类似物种增强力。

1. 害虫: 螨类、昆虫和线虫

尽管番木瓜可感染很多螨类和昆虫, 但是只有少量的螨类和昆虫是其主要害虫 (Singh, 1990; Pantoja et al, 2002)。果园周围或果园内的杂草中常常集生蚜虫, 当杂草干枯时, 蚜虫攻击番木瓜 (Singh, 1990)。桃蚜 (*Myzus persicae*)、棉蚜或瓜蚜 (*Aphis gossypii*) 和黑豆蚜 (*A. craccivora*) 可传播番木瓜环斑病毒。其他害虫有: 夏威夷葱蓟马 (*Thrips tabaci*)、澳大利亚昆士兰州的昆虫 (如 *Aonidiella orientalis*) 以及粉蚧 (粉蚧科)。果蝇 (如东方果蝇和地中海果蝇) 是夏威夷地区番木瓜主要害虫 (Manshardt, 2002, pers. com)。番木瓜果蝇 (*Toxotrypana curvicauda*) (Malo and Campbell, 1994) 是加勒比海地区的主要害虫; 果蝇对于出口市场极为重要 (Nakasone and Paull, 1998)。叶蝉是一种重要的害虫, 包括巴西马铃薯叶蝉 (Firko and Podleckis, 1996) 和夏威夷木瓜叶蝉 (Manshardt, 2002, 私人通信)。大多数害虫可通过适当的杀虫剂控制; 控制蚜虫的最好的办法是去除果园邻近地区的寄主杂草 (Singh, 1990)。

相对昆虫而言, 螨虫可能是更为严重的害虫, 大多数番木瓜种植区都发生过伪蛛螨 (如短须螨, *Brevipalpus phoenicis*) 和蛛螨 (如棉红蜘蛛, *Tetranychus cinnabarinus*), (Singh, 1990)。跗线螨 (如 *Polyphagotarsonemus latus*) 发生于巴西的番木瓜 (Firko and Podleckis, 1996)。可应用合适的杀螨剂防治螨类的危害 (Singh, 1990)。在一些国家, 根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 和肾形线虫 (*Rotylenchulus reniformis*) 制约番木瓜的生产 (Singh, 1990)。生产者一般应用各种卤化土壤杀菌剂, 并结合去除番木瓜残株以及轮作等栽培措施来控制线虫。

2. 病原体：真菌、病毒和细菌

病原体在不同的发育阶段和不同的组织器官侵染番木瓜，其危害比螨类和有害昆虫更为严重。危害严重程度取决于栽培措施和环境条件。Singh (1990) 报道了将近 17 种番木瓜病害，其中 6 种是很多番木瓜种植区的主要病害。很多地区番木瓜受茎腐病、猝倒病、炭疽病、花叶病和缩叶病的危害。Nishijima (1999) 列出了大量的番木瓜致病菌相关的发病条件。最近，Persley 和 Ploetz (2003) 描述了对主要病害的特征。

一些真菌可引起苗期 (播种后 60 d 内) 番木瓜植株的猝倒，致病因子为疫霉属、腐霉属和丝核菌属真菌。茎腐病是重要的病害，可感染幼苗和较老的植株 (使茎腐烂开裂，引起死亡)，腐霉属、疫霉属以及丽赤壳属真菌是致病因子。炭疽病是一种广泛分布的病害，感染叶柄和果实，胶孢炭疽菌是这一病害的诱因。叶片和叶柄的真菌感染包括棒孢叶斑病，可能由多主棒孢引起 (加勒比海地区)。感染果实和其他器官的白粉病有：番木瓜粉孢 (Hawaii)、单丝壳属真菌、鞣鞣内丝白粉菌 (*Oidiopsis taurica*) (昆士兰州)、*Ovulariopsis papayae* (非洲东部) (Morton, 1987)。

收获后真菌性病害也可造成损失。疫霉蒂腐病 (*Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*)、褐色蒂腐病 (*Phomopsis caricae-papayae*)、炭疽病 (*C. gloeosporioides*)、黑蒂腐病 (*Phoma caricae-papayae*、*Lasiodiplodia theobromae*) 和番木瓜黑腐病 (*Alternaria alternata*) 可能因温度不恒定或机械损伤发生。(Pernezny and Litz, 1999)。各种杀菌剂可用作炭疽病和疫病控制 (Pernezny and Litz, 1999)。用未被感染的土壤替代感染土壤或通过熏蒸处理可解决相关连作或减产问题 (可能由真菌病原菌引起) (CTAHR, 1985)。

病毒是番木瓜栽培的最大限制，在很多番木瓜种植区，一些病毒的危害正在增加。例如：在夏威夷、墨西哥、加勒比海、南美、非洲和东南亚，一种马铃薯 Y 病毒，即番木瓜环斑的病毒 (PRSV) 已经成为番木瓜减产的主要原因 (Persley and Ploetz, 2003)。番木瓜环斑病的症状为：果实上有暗绿色环斑，叶片为黄花叶、小而呈细带状 (Gonsalves, 1993)。番木瓜环斑病一般通过机械损伤传播，也通过桃蚜、棉蚜或瓜蚜传播 (Bhargava and Khurana, 1970)。尽管通过应用栽培措施限制番木瓜环斑病的传播，但仍然造成减产。该病的防治策略包括去除感染植物，但是病害一旦定殖就不能根除 (Queensland Dept. Primary Indust. & Fisheries, 2003)。杀蚜虫的农药对防治该病害无效，因为在杀死蚜虫前，蚜虫已经通过插入植株而传播了病毒 (Pernezny and Litz, 1999)。如果在番木瓜行间间作非寄主作物，则蚜虫在取食番木瓜之前已经在非寄主植物上取食，这可降低病害的传播和发生 (Gonsalves, 1998)。中国台湾的研究人员已经开发出了一些抗病的番木瓜品种。将番木瓜幼苗用番木瓜环斑毒株的弱病毒株或突变毒株接种，可为植物提供交叉保护，防止致病力强的病毒株感染 (Yeh, 1990)。不过，由于病毒易突变，这一保护并不完全有效，不能提供永久性保护 (Lin et al, 1989)。而且，目前的耐病害品种 (如 Tainung No. 5) 品质较差，在消费者中的认可度较低 (Japan Intl. Res. Centre Agric. Sci., 2003)。

康奈尔大学和夏威夷合作，研发出一种具有 PRSV (番木瓜环斑病毒) 抗性的转基因番木瓜，这种转基因植株通过表达病毒的外壳蛋白产生抗性。新品种迅速扭转了夏威夷木瓜产业衰落的局面 (Lius et al, 1997; Manshardt, 1999; Gonsalves, 2000)。该番木瓜于 1992 年进行小规模田间试验，1998 年进行大规模的田间试验和商品化种子释放。2003

年,夏威夷近一半的商品化番木瓜是抗 PRSV (番木瓜环斑病毒) 的转基因番木瓜品种 Rainbow (Pacific Bus. News, 2003)。关于衣壳蛋白抗性的详细情况,见第七节农艺性状改良的分子生物学方法。

番木瓜的其他病毒包括花叶病毒 (PapMV), 它是在南美和美国佛罗里达州鉴定出的一种马铃薯 X 病毒 (Malo and Campbell, 1994)。番木瓜花叶病毒通过机械传播, 而不由生物载体传播 (Buchen-Osmond and Hiebert, 1988)。番木瓜畸叶病毒 (PLDMV) 目前还未完全鉴定, 但已完成了实验室的相关分析, 它是一种马铃薯 Y 病毒 (Maoka et al, 1996), 与番木瓜环斑病毒的氨基酸序列相似性不超过 59%。Chen 等 (2001) 研究表明, 中国台湾的分离株 DL-1 的抗原性与番木瓜环斑病毒不同, 已知日本也有这一病毒 (Maoka, 2002)。在佛罗里达发现了番木瓜下垂坏死病毒 (PDNV), 它是一种棒状病毒 (Zettler and Wan, 1993)。有一种类似的棒状病毒在委内瑞拉称为番木瓜顶部坏死病毒 (PANV), 但是该病毒尚未得到国际病毒分类委员会的认定 (Zettler and Wan, 1993), 这种病毒以一种叶蝉为载体传播。(Lastra and Quintero, 1981)。巴豆黄脉花叶病毒 (CYVMV) 是一种双生病毒, 可引起叶片严重卷曲和叶柄扭曲, 使植株在开花或结果前死亡 (Singh, 1990; Brunt et al, 1996)。在一些地方, 如印度, 该病毒是一种毁灭性的病原菌。该病毒可通过粉虱传播, 尽管番木瓜不是粉虱最佳寄主。番木瓜卷叶病毒 (PLCV) 是一种由粉虱传播的双生病毒, 分布于日本和中国台湾 (Chang et al, 2003)。已有人分析了 PLVC 与其他病毒的分子特征相似性 (Saxena et al, 1998)。番木瓜致死黄化病毒 (PLYV) 与番茄丛矮病毒具有显著的序列相似性 (Silva et al, 1997), 该病毒对巴西番木瓜具有重要的经济影响。番茄斑萎病毒 (TSWV) 属于番茄斑萎病毒属, 它在夏威夷零星暴发, 主要寄生于常见的杂草, 由牧草虫传播 (Gonsalves and Trujillo, 1986; Bautista et al, 1995)。P (番木瓜) 型番木瓜环斑病毒感染番木瓜和葫芦, W (西瓜) 型番木瓜环斑病毒在自然条件下只感染葫芦, 但在试验内它也可感染番木瓜 (Purcifull et al, 1986)。目前已经检测到变形环斑病毒引起的病害, 该病毒可能是番木瓜环斑病毒的异名 (Brunt et al, 1996)。巴西地区一种重要的病毒被称为番木瓜 Meleira 病毒 (PMeV) (目前尚未得到国际病毒分类委员会的认定), 它是双链 DNA 病毒, 与其他病毒没有相似性 (Maciel-Zambolim et al, 2003)。番木瓜其他病毒病的控制措施与番木瓜环斑病相似, 但是还没有开发出抗性策略。

在番木瓜种植区可能出现多种病毒以及与其他病原体共同感染而引起的病害, 如在委内瑞拉, PLYV (番木瓜致死黄化病毒) 和 PRSV (番木瓜环斑病毒) 共同感染 (Marys et al, 2000)。在对墨西哥 10 个州进行的评价中, 1 个州发现了 PapMV (番木瓜花叶病毒) 和 PRSV (番木瓜环斑病毒) 共同感染的现象 (Noa-Carrazana et al, 2000)。据报道, 小西葫芦黄花叶病毒 (ZYMV)、PRSV (番木瓜环斑病毒) 和番木瓜束顶病也可同时发生 (Fewerda-Licha, 2002)。

番木瓜的细菌病害或多或少地取决于种植区。欧文氏菌属感染初期引起叶片下表面的损害, 随后叶片变黄、枯萎和死亡, 然后植株腐烂 (Seaver, 2000)。在加勒比海和委内瑞拉, 这一病害的经济意义比环斑病毒更为重要 (Coppens d' Eeckenbrugge, G, IPGRI Cali, Colombia, 私人通信)。由于杀细菌剂和抗生素不能有效防治欧文氏菌, Webb

(1985) 建议在 Virgin 岛采用抗性品种和非寄主作物屏障来防治这一病害。在马里亚纳群岛的北部, 欧文氏菌引起的病害由非洲大蜗牛 (*Achatina fulica*) 传播, 通过防治蜗牛可降低病害的发生。

在澳大利亚, *Phytoplasma australiense* 可引发严重的番木瓜顶枯病。(Liefting et al, 1998)。目前已经鉴定番木瓜黄皱病和番木瓜顶枯病, 分别由两组不同的植原体引起 (Padovan and Gibb, 2001)。在澳大利亚, 已经报道了少量发生的第三类植原体病害, 番木瓜花叶病 (Elder et al, 2002b)。叶蝉偶尔携带植原体, 而番木瓜不是叶蝉偏爱寄主, 这表明叶蝉是番木瓜植原体的传播介体。番木瓜束顶病由乳汁管中的里克次氏体属细菌引起, 里克次氏体属细菌由叶蝉 (*Empoasca papayae*) 传播 (Davis et al, 1998, 1999)。防治束顶病的策略包括除去感染植株、通过去顶而产生未感染的腋生枝条及防治传播载体蚜虫 (Davis, 1993)。

第五节 繁殖生物学

1. 繁殖类型和栽培地点

番木瓜可栽培雌雄异株 (雄株和雌株分离) 的品种, 也可以栽培雌花两性花异株 (既有雌雄同株的植株, 又有雌株) 的品种。在亚热带地区, 由于雌花两性花异株的表型在多变而极端的季节条件下不稳定, 经常种植雌雄异株的品系 (Manshardt, 1999)。在果园中雌株和雄株的混合种植比例为 10~25 : 1。

雌雄同株植株的花发育对气候胁迫高度敏感, 而热带地区的稳定气候对其十分有利, 因此雌花两性花异株的品系通常只在热带地区种植。雌雄同株植株的心皮易于败育或雄蕊易于转变成心皮状肉质结构 (心皮化), 因此其子房发育不稳定, 易于产生雌性果或畸形果, 两者都不能在市场上销售。在雌花两性花异株的品系中, 所有植株都具有完全的繁殖力, 雌雄同株植株和雌株 (纯雌株) 都可结果实。在一些雌花两性花异株的品系中, 雌雄同株的植株经常产生形状不规则的果实, 并且其果实也没有雌株产生的果实重 (Shetty, 1953; Persley and Ploetz, 2003)。不过, 在一些雌花两性花异株的品系中, 一些地区经常优选雌雄同株的果实而除去雌株。例如, Solo 的雌雄同株植株产生梨形果, 果肉质厚、种腔小, 在夏威夷地区, 这种果实比雌株上所结的球形果更受欢迎 (Arkle and Nakasone, 1984)。

2. 有性繁殖

很多研究有报道了番木瓜单性花和两性花类型的分类, 这些分类存在一定的分歧 (Sakai and Weller, 1999)。番木瓜杂交后代性别类型的分类极为复杂, 简单总结为表 6-2 所示。

表 6-2 番木瓜杂交后单株性别的形成 (改编自 Storey, 1976)

花和植物: S = 有雄蕊 (雄性); P = 有雌蕊 (雌性); H = 雌雄同株 (雄性和雌性)				
杂交组合	S	P	H	(无活性受精卵)
S×P	1	1	0	0
H×P	0	1	1	0
S×H	1	1	1	1
H×H	0	1	2	1
S×S*	2	1	0	1

注: * 当性 (如模糊雄性) 植株发生性别逆转时, 认为杂交完成。

番木瓜繁殖模式复杂的遗传和染色体机制尚未完全阐明。人们用简单的说明来解释下面的情形。M 代表雄性植株的显性等位基因， M_H 代表雌雄同株植株的显性等位基因，m 代表雌性植株的隐性等位基因。具有纯合显性等位基因的受精卵 (MM, MM_H , $M_H M_H$) 被认为是致死的，因此只有 Mm (雄株)， $M_H m$ (雌雄同株) 和 mm (雌株) 是可存活的表型 (Hofmeyr, 1938a、1938b、1939a; Storey, 1938; Muthukrishnan and Irulappan, 1985; Ma et al, 2004)。Storey (1953) 进一步提出，在一条染色体上决定性别、致死性和其他性别特征 (如花序的分支、花的数目、花瓣的融合、雌蕊的数目、子房的形状) 的基因紧密连锁，并且与杂交结果一致。Hofmeyr (1967) 假设，M (M_1) 和 M_H (M_2) 代表重要基因缺失长度略有不同的区域。Sondur 等 (1996) 应用其他植物中花器官发育的近期研究解释这一现象。研究认为，反式作用调节蛋白诱导了性别类型：性别位点 M 等位基因 (sex1) 诱导花的雄性部分，并抑制心皮的发育； M_H 等位基因诱导雄性部分，并且降低心皮的大小；而 m 等位基因不能诱导雄性器官。显性纯合子的致死性是由于 m 等位基因缺失时，必要功能的丧失引起的。雄株很少出现性别逆转，但有时雌雄同株的植株中会发生这一现象，这可能是由于 M_H 基因和其靶标 (启动子序列或另一蛋白因子) 的相互作用不如 M 基因和其靶标的相互作用稳定导致的。花药培养获得的胚只产生雌性小苗 (可能是单倍体或多倍体，如双单倍体)，据推测其可能来源于小孢子 (花粉粒)，由于显性等位基因的致死性，因而只具有 m 基因型 (Rimberia et al, 2005)。

最近从雌雄同株的品种 Sunrise Solo 中发现了一个突变体，该突变体在自花授粉后只产生雌雄同株的植株 (即无预期的 2 : 1 的 H : P 比中的雌株) (Chan-Tai et al, 2003)。用该突变体的花粉与典型的雌雄同株植株授精，产生雌雄同株与雌株的比率为 3 : 1，这说明所有基因型都可存活。随机自花授粉后，这些 F1 代都产生分离的 F2 代，从而证明存在存活的显性纯合体植株 ($M_H M_{\oplus}$)，该纯体植株中含有一个新的雌雄同株等位基因 (M_H 的突变体 M_{\oplus})。此外，据推测有一个新的隐性致死基因 (1) 与 m 连锁，当雌性基因型为隐性纯合 (m1m1) 时，植株将致死。

根据番木瓜的种间杂交结果，Horovitz 和 Jiménez (1967) 提出了性别决定的 XX-XY 系统。Micheletti de Zerpa (1980) 研究了山区木瓜 (*Vasconellea cundinamaricensis*) 与 *V. stipulata* 回交 2 代的减数分裂，发现 18 条染色体中的 2 条为有限配对且有时表现为单价。这表明具有雌雄同体表型山木瓜的 Y 染色体及其雌雄同体表型已发生了转移，从而产生了雌雄同体的 BC₂ 代，而 *V. stipulata* 为雌雄异株。(两个亲本物种都没有异型染色体)。Liu 等 (2004) 发现，番木瓜的性别决定基因位于 LG1 染色体上一段 4.4 Mb 的区域 (连锁群)，该区域占染色体的 10%，不易发生重组 (Ma et al, 2004)。因此，LG1 的作用类似初始的 Y 染色体，一部分似 Y 染色体，其余部分似常染色体。这种雄性特异性 Y 区 (该区大小等同于约 100~200 个基因，此估值依据番木瓜基因组各部分的平均基因数) 含有非雌性的 DNA 编码区，即用于编码雄性或雌雄同株特征的区域 (Viskot and Hobza, 2004)。X-Y 序列的差异可能为 10%~20% (Charlesworth, 2004)。

3. 授粉

番木瓜异花授粉的发生状况取决于品种、开花行为 (包括花的类型) 和环境条件。某

些情况下,与雌雄同株植株自花授粉相比,雄株可更容易与邻近果园中的雌雄同株植株进行异花授粉。不同品系中可能存在基因型差异,花容受性的季节性改变也会影响授粉(Louw, 2000; A. Louw, 2003, *Inst. Trop. & Subtrop. Crops, South Africa*, 私人通信; Parés et al, 2002; Parés-Martínez et al, 2004),在雌花两性花异株的植株中,印度的 Coorg Honey Dew 植株在自由授粉后进行人工授粉,结实率提高了 10 倍(Purohit, 1980),但牙买加植株的人工授粉不能增加番木瓜结实率(Free, 1975)。这些结果既取决于授粉者,也取决于番木瓜品种;例如,套袋可使雌雄同株的品种 Sunrise 结实率达到 90%,而 Higgins 的结实率只达到 33%(Rodríguez-Pastor et al, 1990)。在雌雄异株条件下,雄株和雌株是分离的,必须通过异型杂交授精。

在雄花中,有花丝的花药(位于上轮)可伸出花粉管外开裂,无花丝的花药(位于下轮)位于花粉管内并在管内开裂(Wiggins and Porter, 1971)。雌雄异株的品种(华盛顿)中在开花(开花期)前 18~36h,花药完全裂开,在开花前 1d 柱头可接受花粉(Khuspe and Ugale, 1977)。在雌花两性花异株的品种中,两性花能进行自花授粉,开花前花药开裂,以利于闭花授精(Rodríguez Pastor et al, 1990; Chan et al, 1999; Ronse Decraene and Smets, 1999)。雄株及功能型雄花(第 4+型)的花药在开花前 2d 开裂,而两性花在开花前 1d 开裂。(Parés et al, 2002; Parés-Martínez et al, 2004)。尽管柱头可在开花前 3d 接受花粉,且接受花粉的能力保持到开花后 5d,但开花当日是柱头接受花粉能力最强的时期(Subramanyam and Iyer, 1986; Dhaliwal and Gill, 1991)。(如 Car-tagena Amarilla 品种)两性花可在柱头能接受花粉前释放花粉(即雌雄蕊异熟且雄蕊先熟),而柱头只有开花后才能接受花粉。(Parés et al, 2002)。

花粉可长年产生。花粉粒相对较大(直径 32~39 μm),亚热带地区的花粉粒比温和地区的花粉粒大(Sippel and Holtzhausen, 1992),花粉粒表面呈精细的网状(Allan, 1963a; Fisher, 1980)。花粉的活力(通过染色性能和萌发率测定)可发生季节性改变,雨季和春天最高(Singh and Sharma, 1997),而在亚热带地区(如澳大利亚),冬天则显著降低(Garrett, 1995, in OGTR, 2003a; Allan, 2002)。花粉的寿命相对较长;室温下在培养 16%的花粉可存活 16d(Sharma and Bajpai, 1969; cf. Vahidy and Nafees, 1973)。

花粉可通过风力传播。但是在植株附近检测到的花粉较少(Allan, 1963c)。在夏威夷的 Kapoho,在 0.4 公顷 GUS 标记转基因番木瓜 Rainbow 的下风向 396m 处种植非转基因植株,非转基因后代中未检测到 GUS 基因的表达(Manshardt, 2002, 私人通信)。Purseglove (1968)指出,距离 244m 的雄树能为隔离的雌树授粉,但是 Baker (1976)推测,这些观察结果可能由于单性结实,已经发现有些品种存在单性结实现象。(如 Wettstein et al, 1944; Free, 1975; Rodríguez Pastor et al, 1990; Garrett, 1995, in OGTR, 2003a)。在一项旨在区分风和昆虫对传粉重要性的研究中,在自由传粉植株(Ceratype)中有 38%的植株授粉,但是在开花期用薄棉布套袋的对照中只有 26%的植株授粉,因此说明在墨西哥韦拉克鲁斯这一非最适宜的测试地点,昆虫传粉可能起了重要作用(Mateos Sánchez et al, 1995)。在南非,在用金属网挡住个体中等或较大的昆虫后,番木瓜的结实率发生变化(Allan, 1963c)。在一些地区,不常采用人工授粉来帮助结实(Ca-

lif. Rare Fruit Growers, 1997)。

番木瓜开花的时间在晚间较早时 (Mekako and Nakasone, 1975a; Sippel et al, 1989; Parés et al, 2002) 或在早上 (Khuspe and Ugale, 1977; Azad and Rabbani, 2004), 而且由于它们具有很强的二态性或多态性, 因此提供了潜在传粉昆虫的不同线索。雄花花香更浓, 开放时间长达 24 小时, 它们可在花药和花蜜 (来源于雌蕊前体) 中产生草酸钙晶体, 从而吸引昆虫。雌花无花蜜, 但是在其喇叭口状的大柱头 (或柱头裂片) 上可能具有有甜味的非糖类分泌物 (Ronse Decraene and Smets, 1999; Parés et al, 2002), 在这方面可能与雄花相似 (Baker, 1976)。雌花可持续开放 7 天 (Mabberley, 1998)。

番木瓜的主要的传粉昆虫尚不清楚。已经描述了一些昆虫 (特别是天蛾, 显然也有蚊子、蠓、牧草虫) 传粉的详细情况 (Heide, 1923; Free, 1975; Baker, 1976; Knudsen and Tollsten, 1993; Garrett, 1995, in OGTR 2003a; Morrisen et al, 2003)。在 Galápagos 岛, 天蛾经常在天黑后访问花 (McMullen, 1999); 在厄瓜多尔大陆, 访问雄花和雌花的昆虫包括甲虫、蝇和蚊子 (Nielsen, 1998, in Ronse Decraene and Smets, 1999)。在委内瑞拉, 已经鉴定了 17 种昆虫为传粉昆虫 (或访花昆虫), 包括 *Trigona* 和 *Xylocopa* 蜜蜂 (Marín Acosta, 1969)。在墨西哥 (韦拉克鲁斯), 从 100 朵花中收集到 12 个目 68 个科的 712 种昆虫, 但是只有 38% 的昆虫进行传粉 (Mateos Sánchez et al, 1995)。在亚马逊中部 (巴西), 番木瓜花粉是蜜蜂 (*Trigona williana*) 常年喜欢取食的食物 (Marques-Souza et al, 1996)。同样的, 在南非也发现了蜜蜂传播番木瓜花粉 (Allan, 1963c)。

在一些国家, 昆虫被认为在番木瓜传粉中起主导作用, 而在另外的国家, 风力传播似乎更受关注。因此, 他们对番木瓜适当的隔离距离有不同的建议, 这反映了不同生产地点的特定条件。正因为认识到昆虫和风是花粉的传播者, Singh (1990) 建议原种生产的隔离距离应为 2~3 km, 但是没有文献支持这一距离的试验结果。根据本小节之前报道的转基因番木瓜田间测试结果, 夏威夷身份保持协议 (Hawaiian Identity Preservation Protocol) 规定, 非转基因番木瓜种子生产时, 与其他品种之间的隔离距离应不少于 1 320 ft (400 m) (Hawaii Dept. Agric., 2003)。东南亚番木瓜生物技术网络建议, 在田间试验中, 非转基因番木瓜应当与可长出花药的转基因番木瓜植物隔离 400m (Anon, 1999)。美国农业部动植物卫生检疫局 (USDA-APHIS) 批准在佛罗里达的番木瓜田间试验隔离距离为 500 m。澳大利亚基因技术管理局 (Gene Technology Regulator) 规定田间测试只能在用纱网将昆虫完全挡在外的条件下, 或在除去所有雄花序的条件下进行 (OGTR, 2003b)。

4. 有性发育的诱导性改变

环境条件 (温度、湿度、水分、氮源) 的变化可诱导番木瓜开花和繁殖的改变 (Lange, 1961; Singh et al, 1963; Rojas et al, 1985; Terra de Almeida et al, 2003a)。雌花两性花异株的番木瓜在干热条件下发育时, 每个节结处的花序可形成末端的两性花, 并于腋生雄花对生。(Manshardt, 2002, 私人通信)。在该条件下, 80% Solo 品种花序能形成雄花 (Nakasone and Paull, 1998)。在较冷的条件下, 腋生花将会回复转变为两性花占主导。

也观察到反向的性逆转现象, 即转变成雌性结构。在雌雄异株和雌花两性花异株的品系中, 高温和湿度增加可导致花序向雌花转变 (Singh, 1990)。夏威夷冬季的夜间低温可诱导心皮化, 即雄蕊发育成类似心皮的结构, 并影响果实的发育 (Awada, 1958; Hsu, 1958a), 产生不能市售的形状不规则果实 (Chandrasekaran et al, 1950; Watson, 1997)。在澳大利亚亚热带地区, 杂交种和自交种的心皮化植株达 10%~15%。(Grant, 2004)。

当夜温低于 12℃ 时, 雌雄异株品种的雄株会被诱导产生两性花, (Allan et al, 1987), 短日照温暖条件也可引起这一改变 (Aquilizan, 1987)。雄株抗性别逆转的能力在春季较强, 在较冷季节较弱。(Allan et al, 1987)。在亚热带气候区, 雄树 (性别模糊雄树) 可能结实。(Watson, 1997)。在澳大利亚昆士兰州, 该条件性别逆转可用于确保雌雄异株的品系原种的自交 (Aquilizan, 1987)。在热带地区, 树干砍伤造成的机械损伤可激发雄树产生两性花 (Duke, 1967)。

与两性和雄性繁殖结构相比, 雌性繁殖结构稳定。不过, 雌株的育性可因环境条件而改变。低湿度或低含氮量可诱导雌性不育 (Awada and Ikeda, 1957)。

第六节 杂 交

1. 番木瓜的种间杂交

通过传统杂交试图将 *Vasconcellea* 属物种的性状转移至番木瓜, 大多数试验没有形成胚乳 (Horovitz and Jiménez, 1958、1967; Mekako and Nakasone, 1975b; Manshardt and Wenslaff, 1989a)。应用胚胎拯救和微繁殖技术, 已经产生了一些种间杂交种 (Manshardt and Wenslaff, 1989a、1989b)。尽管与番木瓜杂交可产生 F1 代种间杂交种, 但是这些杂交种通常都不育, 因而不产生 F2 代 (Manshardt and Drew, 1998)。无法进行减数分裂导致未减数配子的形成, 其与番木瓜回交产生了不育的倍半二倍体植株 (Manshardt and Drew, 1998)。在菲律宾, 已有人报道了番木瓜分别与 *V. cundinamarcensis* (也称 *V. pubescens*)、*V. quercifolia*、*V. stipulata* 以及 *V. cauliflora* 杂交而产生不育的 F1 代杂交种 (Magdalita et al, 1997b、1998; Siar et al, 1998; Villegas, 1999)。在委内瑞拉, 番木瓜与 *V. cauliflora* 杂交的结实率可达 76% (Vegas et al, 2003)。用 *V. cundinamarcensis* 与番木瓜杂交可得到不育的雌株 (Drew et al, 1998; R. Drew, 2001; Griffith, Univ., Australia, 私人通信)。

Drew 等 (1998) 获得了一定量的番木瓜与 *V. quercifolia* 的可育杂交种。经胚胎拯救获得了大量 F1 代植株, 然后将其与番木瓜进行回交, 最终获得一株可育且抗番木瓜环斑病毒的雌株 (BC1), 并计划继续回交以进一步研究 (Drew, 2004、私人通信)。Sajise 等 (2004) 将 F1 代杂交种 (由 Drew 提供) 与菲律宾的番木瓜优良品系进行回交, 获得了 24 株回交 1 代小苗。不仅如此, 番木瓜与 *V. parviflora* 进行的一些杂交已经产生了具有可育花粉的 F1 代植株 (Drew et al, 1998)。

Jobin-Décor 等 (1997) 应用 RAPD 技术 (用 14 个引物) 研究了番木瓜科一些物种的亲缘关系。番木瓜与 *Vasconcellea* 属的 6 个物种之间的平均差异为 69%, 与 *Jacaratia*

spinosa 之间的差异为 84% (且没有共同的同工酶)。应用同工酶分析番木瓜与这些 *Vasconcellea* 物种间的序列一致性, 也得出类似结论——两者存在 70% 的差异。应用扩增片段长度多态性 (AFLP) 技术 (用 5 个引物组合, 产生近 500 条多态性条带), Van Droogenbroeck 等 (2002) 将样品进行了分组, 聚类分析表明番木瓜与所有 8 个 (加上未鉴定的) *Vasconcellea* 物种存在很强的遗传分化。在另一项 AFLP 研究中, Kim 等 (2002) 发现, *Vasconcellea* 属的物种与番木瓜只有 43% 的序列相似性, 但物种间存在 73% 的序列相似性。Van Droogenbroeck 等 (2004) 应用 RFLP 技术分析线粒体和叶绿体非编码 DNA 序列, 发现 *Vasconcellea* 属的 6 个物种与番木瓜的序列相似性高于其与 *Vasconcellea* 属中其余 11 个物种的相似性, 这一结果进一步说明了番木瓜间杂交的可能性。与番木瓜较为近缘的物种包括 *V. quercifolia*, *V. weberbaueri* 和 *V. ×heilbornii*; 近缘性较小的物种包括 *V. parviflora* 和 *V. stipulata*, 但是不包括 *V. cundinamarcensis* 或 *V. cauliflora*。

2. *Vasconcellea* 属的种间杂交

研究人员希望在 *Vasconcellea* 属中找到一个能与同属中其他物种进行杂交的桥梁物种, 从而使其与已知能和番木瓜杂交的 *Vasconcellea* 物种进行杂交。在安第斯山脉, *Vasconcellea* 属一些物种间可天然杂交 (Badillo, 1971、1993; Van Droogenbroeck et al, 2004)。*V. xheilbornii* 的起源尚不清, 因为没有明确的分子生物学资料 (Badillo, 1971、1993; Van Droogenbroeck et al, 2004) 表明这些野生型和半驯化的植株来源于 *V. cundinamarcensis* 与 *V. stipulata* 的杂交。 (Badillo, 1967; NRC, 1989; Jiménez et al, 1999)。已经发现其细胞器基因组的图谱与 *V. weberbaueri* 相似 (Van Droogenbroeck et al, 2004)。并且试验已经证明 *Vasconcellea stipulate* 可与 *V. cundinamarcensis* 杂交产生可育的杂交种。同样地, 用 *V. stipulata* 作为父本与 *V. ×heilbornii* 杂交, 可产生具有 10~20 粒完全种子的后代 (Horovitz and Jiménez, 1967; Micheletti de Zerpa, 1980)。番木瓜和 *V. ×heilbornii* (以及番木瓜和 *V. stipulata*) 之间杂交可产生不育的 F1 代杂交种。

第七节 遗传变异

1. 细胞学和基因组

番木瓜二倍体 (2n) 的染色体数为 18 (Meurman, 1925; Asana and Sutaria, 1929; Chen, 1993)。尽管在不同品系中发现了各异的染色体长度和缢缩形态, 但是未发现异形染色体 (Datta, 1971, 见第五节第二小节有性繁殖)。试验中已成功诱导出四倍体植株。 (Hofmeyr, 1945)。

通过构建遗传连锁图分析了番木瓜的核基因组 (Sondur et al, 1996)。应用 RAPD 技术分析育种品系和商业品系, 发现了 11 个连锁群, 总图谱距离约为 1 000 cM, 预期的基因组大小约为 1 350 cM。与其他农艺植物相比, 番木瓜每一引物的多态性频率均较低 (0.16), 这说明番木瓜的基因组 (包括多态性重复 DNA) 相对较小或其品系的遗传多样性较低。番木瓜的基因组较小, 二倍体基因组只有 0.77 pg, 单倍体 DNA 的含量仅为 372 Mbp (Arumuganathan and Earle, 1991)。目前, 已经构建了番木瓜的细菌人工染色体

(BAC) 文库, 该文库中包含了近 40 000 个克隆, 番木瓜的全基因组图谱正在构建中。(Ming et al, 2001)。

2. 番木瓜的遗传变异

用于番木瓜育种和改良的遗传变异广度很难估量。番木瓜种质库保存有大量的种质材料, 但是这些贮存库中的遗传资源通常只进行了一般的鉴定。种质材料一般包括各种木瓜属育种材料、栽培型和品种, 以及 *Vasconcellea* 属的一些物种。已经采用传统方法并越来越多地采用分子技术 (如 Santos et al, 2003) 调查、分析和评价其农艺性状。IBPGR (1988) 已经对番木瓜习性、花、果实、种子等农艺性状进行了标准化描述, 并对性状的范围进行了规定。对 Solo 组、Formosa 组 (Tainung 系列) 以及一些杂交种 (贮存于巴西的 1 个贮藏室中) 等 125 个材料进行常规分析, 发现其主要在果实大小和疫霉抗性方面存在差异 (Dantas and Firmino de Lima, 2001)。对大多数来自种植区, (约 17 个国家) 63 份材料进行 AFLP 分析, 发现它们之间的平均相似度为 0.880 (Kim et al, 2002)。

(1) 种质的收集

联合国粮农组织种子和植物遗传资源服务处 (AGPS) 列出了栽培番木瓜的种质所在地, 包括近 90 个研究站或种子生产点 (FAO, 2001; cf. Bettencourt et al, 1992)。不过, 世界番木瓜种质资源尚未汇总至可访问的数据库中。CIRAD-FLHOR (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement) 和 IPGRI 启动了一项改良新热带地区水果的项目, 其中就包括建立一个有限目标的数据库。一项正在进行的区域性工作旨在收集和评价番木瓜的种质, 该工作侧重于抗性或耐性性状, 特别是对该地区最严重病原菌 (如: 番木瓜环斑病、细菌衰退和炭疽病) (Coppens, 2001, 私人通信)。种质收集的目标还包括将 *Vasconcellea* 作为潜在的商品化水果加以开发, 以及开发新的酶资源 (如木瓜蛋白酶) (如 Colombo et al, 1989; Villarreal et al, 2003)。

各个国家通过育种计划建立起种质资源收集和品种改良计划。位于夏威夷 Hilo 的美国国家植物种质系统农业部站点, 报道了 153 份番木瓜和几份 *Vasconcellea* 材料 (GRIN, 2001), 通过互联网可在数据库中找到与特定材料相关的农艺性状。大型贮存库有: 巴西 (Coppens, 2001、私人通信; Dantas and Firmino de Lima, 2001) 的 EBDA-Bahia (82 份材料)、EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia (141 份材料) 和 IAC-Campinas, São Paulo (169 份材料); 哥伦比亚的 Univ. Nacional Medellín and CORPOICA (83 份材料), 以及在其他地方建立的贮存库; 印度 (90 份番木瓜材料) (Giacometti et al, 1987) 和马来西亚 (72 份材料) (Chan et al, 1999)。

大部分种质资源为活体植株, 但也包括一些种子 (Giacometti et al, 1987)。将种子置于密封的广口瓶中, 可在 12℃ 下贮存近 12 个月, 在 IBPGR 规定的条件下贮存时间会更长 (Giacometti et al, 1987)。同样的, 如果贮存条件适宜, 花粉可保存活力, 如在 10℃ 和 10% 的相对湿度下 (Allan, 1963b) 或在 -18℃ 下 (Cohen et al, 1989) 贮存, 花粉活力可保持 6 个月, 在超低温冰箱中冷冻保存则可存活 10~16 个月——甚至数次冻融也无妨 (Ganeshan, 1986)。

(2) 栽培品种作为遗传变异的来源

一个国家通常栽培多个番木瓜品种, 每一个品种一般都有地域局限性。在印度尼西亚

东瓜哇的目录中至少记录了 12 个这样的品种 (Baswarsiati et al, 1985, in Setyobudi and Purnomo, 1999)。有些番木瓜品种已经得到国际认可, 并在世界各地广泛种植, 例如 Solo 已从该品种选育出其他品系 (Sunrise Solo)。Eksotika 是马来西亚出口的旗舰品种, 该品种是用 Subang 6 与轮回亲本 Sunrise Solo 回交选育成的 (Chan et al, 1999)。

为了确定番木瓜品种间的变异性以及一些栽培种之间的亲缘关系, Stiles 等 (1993) 应用 RAPD 技术 (用 11 个引物扩增出 102 个不同的条带)。对来自马来西亚、马里亚纳群岛、夏威夷和佛罗里达的 10 个品种进行比较分析, 结果表明, 亲缘关系最远的品种间的同源率为 70%, 亲缘关系最近的品种之间的同源率达 95%。人们预期通过遗传相似性了解品种的起源地和育种历史。Kim 等 (2002) 对 63 个番木瓜国际资源样品的 186 个 AFLP 条带进行分析, 发现其遗传多样性十分有限, 平均相似率为 0.880, 并且在单一种植区, 如夏威夷的 Solo 型雌雄同株品种的平均相似率达 0.921。也可进行同工酶分析——在 11 个彼此分离的基因座中发现了 29 个等位基因。

令人惊讶的是, Kim 等 (2002) 发现雌雄异株品种 (自由授粉) 的遗传多样性低于雌雄同株品种, 此前人们一直认为雌雄同株品种主要为自花授粉, 因而其遗传变异较少。关于番木瓜育种的文献 (包括大量的综述) (Singh, 1990) 均未发现自交衰退 (Hamilton, 1954)。实际上, 对新性状进行初步筛选, 通常的做法是, 通过同胞交配约 4 代建立新的品种。杂交通常不用于新品种培育 (Storey, 1953), 这进一步表明了栽培番木瓜中自交衰退不是重要问题。尽管如此, 澳大利亚的品种和马来西亚 Eksotika II 品种的开发事例表明, 杂交正越来越多地用于新品种开发。

(3) 抗病的遗传变异

各个研究计划试图寻找对 PRSV (番木瓜环斑病毒) 具有耐性 (即可被感染但是只受到有限影响) 或抗性 (对感染不敏感) 的植株, 番木瓜环斑病毒是破坏性最强的病原体。完全抗性植株是最佳选择, 耐性植株也是同样有用。在伟略利达开发的雌雄异株品系之一, Cariflora 表现了高水平的耐性 (Conover et al, 1986)。泰国农业部的研究人员选育出一个对番木瓜环斑病毒具有耐性的品种, 称之为 Thapra 2, 其植株可被感染, 但是只表现较弱的症状或不表现症状。Kasetsart 大学开发了泰国的第二个耐性品种 Pakchong 1 (Kositratana et al, 1999)。在菲律宾, 品种 Sinta 表现出较高耐性 (Villegas et al, 1996)。在马来西亚, 人们将受欢迎的品种 Eksotika 与耐番木瓜环斑病毒的 Tainung No. 5 杂交, 其后代表现出高水平的田间耐性, 对后代的持续选择正在进行中。(Chan and Ong, 1996; Chan et al, 1999; Chan, 2004; Chan, Y. K., 私人通信)。关于这方面的进展详见第四节 害虫和病原体。自开发出通过表达病毒衣壳蛋白而获得番木瓜环斑病毒抗性的转基因品种之后, 耐性品种的开发力度逐步降低, 转基因抗性正在带来更多益处 (Ferreira et al, 2002)。

(4) 农艺改良的分子学方法

诱变技术推动了传统育种实践的进步, 例如培育单位面积产量更高的矮化番木瓜 (Ram and Majumdar, 1981)。利用雌花两性花异株、植株高、晚开花品种与雌雄异株、半矮生、早开花选系杂交而获得 F₂ 代番木瓜种群, 通过数量性状位点 (QTLs) 分析, 已经用基于 RAPD 的遗传连锁图谱 (Sondur et al, 1996) 将影响生长 (高度和茎粗) 和

第一次开花时间的基因进行了定位和特征描述 (Sondur et al, 1995), 最终检测到影响植株增高速度和最终高度的 3 个 QTLs、影响茎秆直径增加速率和最终直径的 4 个 QTLs 和影响最初开花时节数的 5 个 QTLs。这一结果被认为是该性状主效 QTLs 的下限, 其中 5 个 QTLs 位于连锁群 I (LGI) 上, 连锁群 3、4、5、10 上各有 1 个 QTL。这些 QTLs 呈非随机分布。影响高度的 QTLs 作用占高度增长表型变异的 64%, 影响茎的 QTLs 作用占直径增长表型变异的 52%, 影响最初开花时节数 (第一个长有花的节为第 15 节至第 36 节) 的 QTLs 作用占节数变异的 30%。据估计, 由于环境而引起的变异占高度增加变异的 20%、占直径增加变异的 25%。

由于建立了可行的番木瓜遗传转化方法, 并且生物技术越来越精确 (Fitch et al, 1990; Pinto et al, 2002; Zhu et al, 2004; Wall et al, 2004)。自 1998 年转基因商业化产品系认可和使用时以来 (Cai et al, 1999; Ying et al, 1999; Gonsalves, 2000), 番木瓜成为遗传工程改良的重点。一些计划正在应用该技术转化不同的品种, 例如, 在东南亚番木瓜生物技术网络的协调下 (ISAAA, 2001a), 目前重点开发晚熟和抗番木瓜环斑病毒的品种。在商业利益的推动下, 人们改变番木瓜的成熟期, 以延长上市时间。在澳大利亚, 转 *capacs1* 和 *capacs2* 基因 (改变 ACC 合酶表达) 以及转乙烯表达基因 (*ETR1*) 的番木瓜已经获准进行田间测试 (OGTR, 2003b)。为了提高对铝的耐性 (普遍存在于热带酸性土壤中), 在墨西哥已经获得了过量表达绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 柠檬酸合酶基因的转基因番木瓜 (de la Fuente et al, 1997)。目前正在研究将转基因番木瓜作为一种可食用抗肺结核疫苗的载体 (Zhang et al, 2003)。

已在番木瓜中鉴定的基因包括一些可用于农艺性状改良或提高工业产量的基因。鉴定序列 (NCBI, 2001) 如下 (表 6-3):

表 6-3 已知序列信息的番木瓜基因

工业产品/农艺产品	碳水化合物代谢	其 他
雄性特异性 SCAR 标记	蔗糖合酶	精氨酸脱羧酶 (ADC)
木瓜凝乳蛋白酶	细胞壁转化酶	ATP 合酶
木瓜蛋白酶	β -半乳糖苷酶	膜通道蛋白
类金属硫蛋白	α -半乳糖苷酶	谷氨酸环化转移酶
1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 合成酶	木葡聚糖内切转糖基酶	Ω -木瓜蛋白酶 (Ω -蛋白酶) 半胱氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶抑制剂
乙烯受体	果胶酯酶	Cu/Zn 超氧化物歧化酶 K

育种家和分子生物学家的目标是开发各种番木瓜抗病品种。很多病原体相关序列已经克隆和鉴定, (NCBI, 2001), 可将它们用于遗传转化, 使番木瓜具有病原体源抗性。大量的病毒基因已经测序, 包括来自于不同地点的各种番木瓜环斑病毒生物型的衣壳蛋白, 一种复制酶, 病毒的 mRNA 产物以及 1 个 RNA 聚合酶基因 (*NIb*)。番木瓜环斑病毒和番木瓜花叶病毒的全基因组已经完成测序; 鉴定的其他基因还包括番木瓜畸形花叶病毒 (PLDMV) 的 2 个基因 (1 个 *Nib* 基因和 1 个衣壳蛋白基因)、1 个来自于番木瓜顶枯病 (*tuf*) 的植物体基因, 来自于番木瓜束顶病的立克次体细菌的、琥珀酸脱氢酶基因和一个异亮氨酸转运 RNA (tRNA)。

转基因番木瓜对病毒具有抗性,需要表达各类地域特异性的病毒蛋白,因此即使转化病毒外壳蛋白后,许多 PRSV 毒株仍可能对番木瓜具有毒性。例如,一些美国佛罗里达分离毒株在分子上与墨西哥和澳大利亚分离毒株相似,但与亚洲分离毒株不相似 (Davis and Ying, 1999)。如果衣壳蛋白序列来源于其他地区而非来源于本地毒株,转基因抗性可能效果差或无效 (Tennant et al, 1994, 2001、2002)。病毒衣壳蛋白基因中 5 个核苷酸发生重组,即可使表达非突变型衣壳蛋白的转基因番木瓜对突变型病毒敏感。(Chiang et al, 2000)。除了序列相似性,基因剂量、植物发育阶段以及番木瓜环斑病毒其他基因也对番木瓜抗性的田间表达具有重要作用 (Tennant et al, 2001; Tripathi et al, 2004)。

来自大学、企业和美国农业部的科学家联盟开发了第一个番木瓜抗性品种,它能特异表达夏威夷番木瓜环斑病毒 (PRSV) 的衣壳蛋白 (Fitch et al, 1992)。墨西哥、危地马拉、牙买加、委内瑞拉、乌干达、坦桑尼亚、孟加拉国、澳大利亚以及东南亚番木瓜生物技术网络的一些成员 (马来西亚、泰国、越南、菲律宾和印度尼西亚) 正在分头开展不同的抗 PRSV 转基因番木瓜项目 (Cai et al, 1999; Flasiński et al, 2002; Tennant et al, 2002)。在美国康奈尔大学工作的巴西研究人员应用巴西特异性 PRSV 衣壳蛋白序列转化了 5 个番木瓜品种,并计划进行田间测试 (ISAAA, 2001b; Lima et al, 2002)。泰国应用东南亚特异性 PRSV 毒株的序列开发了抗性品种,并计划于 2002 年进行田间测试 (ISAAA, 2001c)。地域性的研究作为澳大利亚和委内瑞拉的品种提供了以衣壳蛋白为基础的免疫 (Lines et al, 2002; Fermin et al, 2004)。

已经探索了多个生物技术方使番木瓜获得对各地区流行 PRSV 的抗性。Chiang 等 (2001) 认为,表达嵌合的番木瓜环斑病毒衣壳蛋白或许能应对病毒变化的挑战而保护作物。Bau 等 (2003) 研究表明,中国台湾毒株的一个衣壳蛋白序列足以提供对墨西哥、美国夏威夷和泰国毒株的完全免疫,并且这一品系不产生任何衣壳蛋白。另一做法是用番木瓜环斑病毒复制酶基因提供抗性 (Chen et al, 2001)。通过在转基因番木瓜中产生一种非翻译产物,从而产生 RNA 介导的 PRSV 抗性,已成功应用于澳大利亚和佛罗里达番木瓜品种。此外,将番木瓜环斑病毒和番木瓜畸形花叶病毒 (PLDMV) 的衣壳蛋白结合起来而使番木瓜对病原体具有多重抗性的计划正在实施 (Maoka, 2002)。

第八节 生态学

1. 传播

在喀麦隆,森林象 (*Loxodonta cyclotis*) 在保护区外觅食番木瓜果实并传播其种子。(Tchamba and Seme, 1993; Barlow, 2000)。野生番木瓜的许多特征符合其以巨型动物为媒介进行传播的推测。(Janzen and Martin, 1982; Barlow, 2000)。未驯化的番木瓜果实相当大 (直径 5~8 cm),没有明显的视觉特征, (完全成熟前呈绿色),但其果香浓郁,高挂于无分枝的树干上。果实不开裂 (无结构性开裂)、果肉多汁、辛辣芥末味种子着生于果实中心。这些物种特性可能是为适应诸如地懒、乳齿象等大型哺乳动物 (现已灭绝) 的整果取食和种传播而进化而来的。

许多脊椎动物取食番木瓜,并能传播存活的种子。脊椎动物涵盖了各种生态功能类

型。墨西哥西部沿海（哈利斯科州）的郊狼（*Canis latrans*）习惯性地觅食番木瓜，有时甚至直接从树上取食果实，造成重大的经济损失（Hidalgo-Mihart et al, 2001）。无尾刺豚鼠（*Agouti paca*）是一种大型森林啮齿动物，分布范围从墨西哥到巴拉圭，圈养的无尾刺豚鼠喜欢以高能量的番木瓜为食。（Laska et al, 2003）。印度东部的眉脊叶猴（*Trachypithecus* spp.）会劫掠番木瓜树，并可导致其死亡（Das, 1998）。新热带树栖猴取食番木瓜并在 2 小时内排出种子，如野生棉顶绢毛猴（*Saguinus oedipus*）和圈养卷尾猴（*Cebus*）。大食果蝠（*Artibeus lituratus*）分布于中美洲和小安地列斯群岛到阿根廷北部，它们可以传播番木瓜种子（Garcia et al, 2000）。小裸背果蝠（*Dobsonia minor*）分布在巴布亚新几内亚（Madang）Kau 野生动物保护区，其粪便样本中可见番木瓜种子（Bonaccorso et al, 2002）。

在墨西哥南部的尤卡坦州，这种植物被称为 de pájaro 木瓜（鸟木瓜）。很多鸟类取食番木瓜果实并可传播种子，如褐色拟椋鸟（*Psarocolius montezuma*）（一种分布于墨西哥南部至巴拿马中部的黑鸟）（Webster, 1997）和圭亚那冠伞鸟（*Rupicola rupicola*）（Gilliard, 1962）。据大开曼岛的研究，印度西部大红腹啄木鸟的食物中，番木瓜占 29%。在新喀里多尼亚岛濒危的欧维恩鸚鵡（*Eunymphicus cornutus uvaensis*）喜欢取食番木瓜，其在美拉尼西亚果园常年可取食番木瓜（Robinet et al, 2003）。在印度旁遮普邦，多种鸟类都可觅食番木瓜果实（从成形期至成熟期），至少造成 3.4% 的作物受害（Mahli, 2001）。

2. 杂草化

在不同的地区关于番木瓜基因漂移的描述不同，称为从栽培地中偶然逃逸的物种，或者是机会主义物种、先锋物种，有时称为入侵物种或潜在入侵物种。番木瓜无需耕种即可持久的延续生长。据 Little 和 Wadsworth（1964）描述：“在整个热带地区，番木瓜几乎作为杂草而生长，由种子繁殖的 1 年龄植株即可结实，植株分布于路旁和荒地中”。他们指出，在波多黎各，番木瓜广泛栽培、逃逸和归化。在加拉帕戈斯群岛（圣克鲁斯），在从沿海的内陆干旱地区、过渡区到湿地的一条新道路上发现了番木瓜，但原来的道路上没有番木瓜的存在（Haro Martínez, 1975）。番木瓜通常不认为是外来入侵种（USDA-APHIS, 1997）。

番木瓜是自然生境中的先锋物种。番木瓜具有在干预和强光条件下快速生长、产生大量的种子和诱人果实等特性，因此可在森林间隙和演替早期生长。其先锋生态策略包括种子休眠期短和具有种子库。

作为机会主义者物种，番木瓜具有建立种子库的能力。在巴西亚马逊河流域中部（斯塔伦地区）的一些古老的黑土区（原始耕作土壤），当长期的热带雨林被滥伐和焚烧后，番木瓜植株就会出现。（Clement et al, 2004）。在一项飓风袭击后的再生研究中，比较了未驯化番木瓜与本土先锋树种（小花山黄麻，*Trema micrantha*，与其大小相似）在佛罗里达小丘生境中的再生，研究发现番木瓜具有更广的、适于再生的生态位（Kwit et al, 2000）。他们断言，当生境受到自然干扰后，休眠种子可使用种群恢复。潮湿的野生番木瓜种子在室温黑暗条件下保存于培养皿中，仍然保持活力并具有休眠习性（Vázquez-Yanes and Orozco-Segovia, 1996; cf. Pérez-Nasser and Vázquez-Yanes, 1989）。在日本

小笠原群岛 (Hahajima) 的梅西奇亚热带森林中, 对来自 16 个地点 3 个土层 (0~20 cm) 的种子库进行取样, 三个土层中均有活性种子, 其中 4~10 cm 土层深度中种子含量最高, 其密度约为每平方米 18 粒 (Yamashita et al, 2003)。

Nakasone 和 Paull (1998) 将番木瓜定性为“在林木植被遭破坏地区的一种快速自行生长植物”。在美国佛罗里达南部受到飓风严重破坏 (1992) 之后, 番木瓜在管理区和未管理区中大量快速再生。在未管理地区, 其在第 1 年和第 2 年分别占树木总数的 76% 和 40% (Horvitz and Koop, 2001)。在墨西哥东南部尤卡坦半岛 (金塔纳罗奥) 自然半常绿森林中未发现过番木瓜, 但在强飓风破坏后的 5 个月内, 该地却出现了少量的番木瓜。

Randall (2002) 报道了番木瓜如丛生的杂草在一些热带岛屿和新西兰局部地区蔓延。在圣诞岛 (印度洋)、马里亚纳群岛 (罗塔) 和萨摩亚 (萨瓦伊), 番木瓜可入侵受到干扰或被焚烧的生境 (Craig, 1993; Space et al, 2000; Elmqvist et al, 2001; Green et al, 2004)。在汤加塔布 (汤加), 从不同土壤覆盖 (尤其是零星的内地森林) 的 52 个小区样品中发现 44% 的含有番木瓜。基于这些观察, Wisner 等 (2002) 认为, 番木瓜是一种潜在的严重入侵物种。在澳大利亚昆士兰州沿海地区可发现“小型、低密度的 (番木瓜) 自我延续种群” (OGTR, 2003a)。在夏威夷群岛, 番木瓜主要归化于 4 个主要岛屿上, 一些植株甚至出现在近乎垂直的岩石上 (Wagner et al, 1999; Oppenheimer and Bartlett, 2000)。在厄瓜多尔沿海靠近安第斯山麓丘陵地带的湿润森林地区, Dodson 和 Gentry (1978) 发现番木瓜常见于次生林地区, 包括大约 18 年前退耕还林而再生的森林中。

番木瓜对大部分除草剂敏感, 应用百草枯、草甘膦或绿草定可除去农业生境中的自生番木瓜 (Lee, 1989; Kline and Duquesnel, 1996)。关于减少自然生境中野生番木瓜的工作少有报道 (如 Horvitz and Koop, 2001), 这可能对于生态修复和降低果园受野生番木瓜遗传污染具有重要意义。

3. 最适生境

番木瓜需要相对温暖、强光照的热带或亚热带生境。依据纬度的不同。番木瓜栽培种可在从海平面至海拔 600 米甚至 1200 米范围内生长, 其生长海拔受霜冻的限制。(Arntzen and Ritter, 1994; Bhattarai et al, 2004)。低于 11°C 将对番木瓜的生长和结果产生不利影响, 并严重延迟果实的成熟 (Shetty, 1953; Allan, 2002)。在较高的海拔中, 果实通常味道平淡。

番木瓜适宜的降雨量范围应在 350mm 到 2500mm 范围内, 湿度过大对植株或果实不利 (Singh, 1990)。在韦拉克鲁斯 (墨西哥中东部) 的自然分布区内, (Moreno, 1980), 一项研究分析了 62 个番木瓜材料的地域性参数。(其中 25% 的材料来自于未改良或略为改良的生境, 可参考: Del Angel-Pérez and Mendoza-Briseno, 2004)。大多数植物生长于柯本 Am (f) 亚气候型; 该地区的年降水量为 1 200~1 400 mm, 每年有 100~150 天降雨量极大 (24 小时内的平均降雨量为 30~40 mm), 20~40 天几乎无降雨 (Gómez-C., 2000)。相对湿度高于 60% 对番木瓜生长最为适宜 (FAO, 1986); 不过, 在南非, 品质最好的番木瓜生长在低湿度地区。(Malan, 1953)。

番木瓜可生长于多种土壤中。排灌良好的土壤对促进番木瓜生长最为适宜, 水涝土壤不适合番木瓜生长。(Malaysia Dept. Agric., 2001)。pH 5.0~7.0 有利于番木瓜栽培

(Nakasone and Paull, 1998), pH 6.5~7.0 的均一肥沃壤土最适于番木瓜生长。(Singh, 1990)。就夏威夷土壤而言, Younge 和 Plucknett (1981) 建议最适 pH 为 5.8~6.2; 如果 pH 达到 6.2~6.5, 则疫病危害可能加重 (Adlan, 1969)。丛枝菌根对番木瓜栽培十分有益 (Jaizme-Vega and Azcón, 1995; Vierheilig et al, 2000; Trindade et al, 2001)。土壤板结阻碍番木瓜根系穿透 (Yamanishi et al, 1998), 也将限制番木瓜对 CO₂ 的净同化 (Campostrini and Yamanishi, 2001b)。

避风的地方最适合于番木瓜生长。番木瓜为浅根植物, 强风伴随降雨或低温极易使番木瓜倒伏, 从而引起果实减产。番木瓜大部分根生长于 20 cm 深的上层土中, 并呈辐射状伸长至 80cm 处 (Fisher and Mueller, 1983; Masri, 1993; Malaysia Dept. Agric., 2001)。在最适条件下, 主根长度可达到 1m, 番木瓜生根可适应斜坡 (Marler and Discekici, 1997)。种植前耕作处理较少或未施肥时, 番木瓜只能生出须根系。(Younge and Plucknett, 1981)。

4. 最适地理区域

现有番木瓜商业品种的遗传多样性为其提供了相对广泛的适应性, 使其可在很多地方栽培。在北纬 30°至南纬 40°范围内均有番木瓜的生产, 但是番木瓜的商业化生产范围则压缩在北纬 25°至南纬 25°之间赤道周围的区域 (Singh, 1990)。在该范围外, 最适生长地点位于海平面附近保护良好的地区。(Nakasone and Paull, 1998)。在高辐照强度下, 番木瓜会出现光合作用饱和现象, 遮阴可诱导重要的形态和细胞学变化 (Imai et al, 1982; Buisson and Lee, 1993; Marler, 1994)。番木瓜是一种阳性植物 (Grime, 1981)。番木瓜对冷和风敏感、不抗洪涝并对盐具有中等敏感性 (Marler, 1994; Clemente and Marler, 2001)。不过, 番木瓜已经成功用作庭院树种并且可在许多地点归化。在大多数陆地和很多岛屿中, 由于番木瓜产品的用途和特性, 使得其广泛出现在花园中, 当地市场上以及商业企业的生产中。

◆ 参考文献

- Ackerly, D. 1999. Self-shading, carbon gain and leaf dynamics; A test of alternative optimality models. *Oecologia* 119: 300-310.
- Adebiyi, A., P. G. Adaikan and R. N. V. Prasad. 2002a. Papaya (*Carica papaya*) consumption is unsafe in pregnancy; Fact or fable? Scientific evaluation of a common belief in some parts of Asia using a rat model. *British J. Nutrition* 88: 199-203.
- Adebiyi, A., P. G. Adaikan, R. N. V. Prasad and S. -C. Ng. 2002b. Uterine stimulating effects of crude latex of *Carica papaya* L. (with reference to its indigenous use as an abortifacient). Pp. 299-306 in J. R. Stepp, F. S. Wyndham and R. K. Zarger, eds., *Ethnobiology and Biocultural Diversity: Proceedings of the 7th International Congress of Ethnobiology*. University of Georgia Press, Athens, Georgia, USA.
- Adlan, H. A. 1969. Effects of pH, Silicon and Phosphorus on the Growth and Yield of Papaya (*Carica papaya* L.). Ph. D. thesis, University of Hawaii.
- Airi, S. K., S. S. Gill and S. N. Singh. 1986. Clonal propagation of papaya (*Carica papaya* L.). *J. Res. Punjab Agric. Univ.* 23: 237-239.
- Aiyelaagbe, I. O. O., and M. A. Jolaoso. 1992. Growth and yield response of papaya to intercropping

- with vegetable crops in southwestern Nigeria. *Agroforestry Systems* 19: 1-14.
- Ali, A., T. Natsuaki and S. Okuda. 2004. Identification and molecular characterization of viruses infecting cucurbits in Pakistan. *J. Phytopath.* 152: 677-682.
- Allan, P. 1963a. Pollen studies in *Carica papaya*. I. Formation, development, morphology and production of pollen. *South African J. Agric. Sci.* 6: 517-530.
- Allan, P. 1963b. Pollen studies in *Carica papaya*. II. Germination and storage of pollen. *South African J. Agric. Sci.* 6: 613-624.
- Allan, P. 1963c. Pollination of papaws. *Farm, South Africa* 38: 13-15.
- Allan, P. 1964. Papaws grown from cuttings. *Farm, South Africa* 39 (11): 35-40.
- Allan, P. 1974. Objectives in breeding papaw cultivars. *Citrus Sub-Trop. Fruit J.* 490: 5-12.
- Allan, P. 1995. Propagation of 'Honey Gold' papayas by cuttings. *Acta Hort.* 370: 99-102.
- Allan, P. 2002. *Carica papaya* responses under cool subtropical growth conditions. *Acta Hort.* 575: 757-763.
- Allan, P., J. McChlery and D. Biggs. 1987. Environmental effects on clonal female and male *Carica papaya* L. plants. *Scientia Hort.* 32: 221-232.
- Allan, P., D. I. Mitchell and N. Blore. 1997. Growth and development of 'Honey Gold' papaws at Pietermaritzburg. *J. Southern African Soc. Hort. Sci.* 7: 65-69.
- Allen, G. M., M. D. Bond and M. B. Main. 2002. 50 Common Native Plants Important in Florida's Ethnobotanical History. Univ. Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS), Florida Cooperative Extension Service, Wildlife Ecology and Conservation Dept., IFAS Extension Circular 1439. 22 pp.
- Animal Science Department of Cornell University. 2001. Medicinal Plants for Livestock: Beneficial or Toxic? *Animal Sci. Dept., Cornell Univ.* <http://www.ansci.cornell.edu/plants/medicinal/index.html>
- Anonymous. 1999. Generic questions and answers on risk assessment for the preparation and review of field trial applications of transgenic papaya in Southeast Asia. In R. A. Hautea, Y. K. Chan, S. Attathom and A. F. Krattiger, eds., *The Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia: Biosafety Considerations and Papaya Background Information*. ISAAA Briefs No. 11. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, New York.
- Anonymous. 2003. *El Cultivo de la Papaya (Carica papaya L.)*. Instituto Latinoamericano de Fomento Agroindustrial, Costa Rica [IFAIN] for Corporación Proexant. <http://www.proexant.org.ec/Manual%20de%20papaya.htm>
- Aquilizan, F. A. 1987. Breeding systems for fixing stable papaya inbred lines with breeding potential for hybrid variety production. Pp. 101-106 in W. -N. Chang and R. T. Opera, eds., *The Breeding of Horticultural Crops*. FFTC Book Series No. 35. Food and Fertiliser Technology Centre for the Asian and Pacific Region, Taipei, Taiwan.
- Aradhya, M. K., R. M. Manshardt, F. Zee and C. W. Morden. 1999. A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L. (Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cpDNA intergenic spacer region. *Genet. Resources Crop Evol.* 46: 579-586.
- Arkle Jr., T. D., and H. Y. Nakasone. 1984. Floral differentiation in the hermaphroditic papaya. *HortScience* 19: 832-834.
- Arntzen, C. J., and E. M. Ritter, eds. 1994. *Encyclopedia of Agricultural Science*, Vol. 4 (S-W, Index). Tropical and subtropical fruit. Academic Press, New York.
- Arumuganathan, K., and E. D. Earle. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species.

- Plant Molec. Biol. Rep. 9: 208-218.
- Arumugum, S., and K. G. Shanmugavelu. 1975. Studies on the effect of sarcotesta on the seed germination of papaya (*Carica papaya* L.). Seed Res. (New Delhi) 3: 77-80.
- Asana, J. J., and R. N. Sutaria. 1929. A cytological study of pollen development in *Carica papaya* Linn. J. Indian Bot. Soc. 8: 235-244.
- Awada, M. 1958. Relationships of minimum temperature and growth rate with sex expression of papaya plants (*Carica papaya* L.). Hawaii Agric. Expt. Sta. Tech. Bull. No. 38. 16 pp.
- Awada, M., and W. Ikeda. 1957. Effects of water and nitrogen application on composition, growth, sugars in fruits, yield, and sex expression of the papaya plants (*Carica papaya* L.). Hawaii Agric. Expt. Sta. Tech. Bull. No. 33.
- Awada, M., R. de la Pena and R. H. Suehisa. 1986. Effects of nitrogen and potassium fertilisation on growth, fruiting and petiole composition of bearing plants. University of Hawaii, Honolulu, Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, Res. Ser. 043.
- Azad, M. A. K., and M. G. Rabbani. 2004. Studies on floral biology of different *Carica species*. Pakistan J. Biol. Sci. 7: 301-304.
- Azarkan, M., R. Wintjens, Y. Looze and D. Baeyens-Volant. 2004. Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. Phytochemistry 65: 525-534.
- Badillo, V. M. 1967. Acerca de la naturaleza híbrida de *Carica pentagona*, *C. chrysopetala* y *C. fructifragans*, frutales del Ecuador y Colombia. Rev. Fac. Agron. (Maracay) 4: 92-103.
- Badillo, V. M. 1971. Monografía de la Familia Caricaceae. Asociación de Profesores, Universidad Central de Venezuela, Maracay. 221 pp.
- Badillo, V. M. 1993. Caricaceae, Segundo Esquema. Rev. Fac. Agron. Univ. Cent. Venezuela, Alcance 43. 111 pp.
- Badillo, V. M. 2000. *Carica* L. vs. *Vasconcella* St. Hil. (Caricaceae) con la rehabilitación de este último. Ernstia 10: 74-79.
- Badillo, V. M. 2001. Nota correctiva *Vasconcella* St. Hil. y no *Vasconcella* (Caricaceae). Ernstia 11: 75-76.
- Baker, H. G. 1976. "Mistake" pollination as a reproductive system with special reference to the Caricaceae. Pp. 161-169 in J. Burley and B. T. Styles, eds., Tropical Trees: Variation, Breeding and Conservation. Linn. Soc. Symp. Ser. 2. Academic Press, London, U. K.
- Banik, S., and S. Chanda. 1992. Airborne pollen survey of Central Calcutta, India, in relation to allergy. Grana 31: 72-75.
- Barlow, C. 2000. The Ghosts of Evolution: Nonsensical Fruit, Missing Partners, and Other Ecological Anachronisms. Basic Books, New York. 291 pp.
- Bau, H. -J., Y. -H. Cheng, T. -A. Yu, J. -S. Yang and S. -D. Yeh. 2003. Broad spectrum resistance to different geographic strains of papaya ringspot virus in coat protein gene transgenic papaya. Phytopathology 93: 112-120.
- Bautista, R. C., R. F. L. Mau, J. J. Cho and P. M. Custer. 1995. Potential of tomato spotted wilt tospovirus plant hosts in Hawaii as virus reservoirs for transmission by *Frankliniella occidentalis*. Phytopathology 85: 953-958.
- Beltraide. 2000. Industry Profiles: Agriculture, Fruits & Vegetables: Papaya. Belize Trade and Investment Development Service, Belmopan City, Belize. http://www.belzeinvest.org/bz/profile_agric_fruits_papaya.s.
- Bettencourt, E., T. Hazekamp and M. C. Perry. 1992. Papaya. In Directory of Germplasm Collec-

- tions, Vol. 6.1, Tropical and Subtropical Fruits and Tree Nuts. IBPGR, Rome.
- Bhargava, K. S., and S. M. P. Khurana. 1970. Insect transmission of papaya virus with special reference to papaya mosaic virus. *Zbl. Bekt.* 124: 688-696.
- Bhattacharya, J., and S. S. Khuspe. 2001. *In vitro* and *in vivo* germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. *Scientia Hort.* 91: 39-49.
- Bhattarai, K. R., O. R. Vetaas and J. A. Grytnes. 2004. Fern species richness along a central Himalayan elevational gradient, Nepal. *J. Biogeogr.* 31: 389 - 400.
- Blanco, C., N. Ortega, R. Castillo, M. Álvarez, A. G. Dumpierrez and T. Carillo. 1998. *Carica papaya* pollen allergy. *Ann. Allergy Asthma & Immunol.* 81: 171-175.
- Bonaccorso, F. J., J. R. Winkelmann, E. R. Dumont and K. Thibault. 2002. Home range of *Dobsonia minor* (Pteropodidae): A solitary, foliage-roosting fruit bat in Papua New Guinea. *Biotropica* 34: 127-135.
- Brunt, A. A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs, L. Watson and E. J. Zurcher, eds. 1996. Plant Viruses Online; Descriptions and Lists for the VIDE Database, Version 20 August 1996. <http://image.fs.uidaho.edu/vid/>
- Buchen-Osmond, C., and E. Hiebert. 1988. Papaya mosaic potexvirus. Plant Viruses Online. University of Idaho. <http://image.fs.uidaho.edu/vid/descr548.htm>
- Buisson, D., and D. W. Lee. 1993. The developmental responses of papaya leaves to simulated canopy shade. *Amer. J. Bot.* 80: 947-952.
- Burdick, E. M. 1971. Carpaine; An alkaloid of *Carica papaya*. *Econ. Bot.* 25: 363-365.
- Cai, W., C. Gonsalves, P. Tennant, G. Fermin, M. Souza Jr., M. Sarindu, F. J. Jan, H. Y. Zhu and D. Gonsalves. 1999. A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 35: 61-69.
- California Rare Fruit Growers. 1997. Papaya, *Carica papaya* L., Caricaceae. <http://www.crfg.org/pubs/ff/papaya.html>.
- Campostrini, E., and O. K. Yamanishi. 2001a. Estimation of papaya leaf area using the central vein length. *Scientia Agricola* 58: 39-42.
- Campostrini, E., and O. K. Yamanishi. 2001b. Influence of mechanical root restriction on gas-exchange of four papaya genotypes. *Rev. Brasil. Fisiol. Veg.* 13: 129-138.
- Carlquist, S. 1998. Wood and bark anatomy of Caricaceae: Correlations with systematics and habit. *IAWA J.* 19: 191-206.
- Castillo, R., J. Delgado, J. Quiralte, C. Blanco and T. Carillo. 1996. Food hypersensitivity among adult patients; Epidemiological and clinical aspects. *Allergol. Immunopathol. (Madrid)* 24: 93-97.
- Chan, L. K., and C. K. H. Teo. 2002. Micropropagation of Eksotika, a Malaysian papaya cultivar and the field performance of the tissue culture derived clones. *Acta Hort.* 575: 99-105.
- Chan, Y. K. 1992. Progress in breeding of F₁ papaya hybrids in Malaysia. *Acta Hort.* 292: 41-49.
- Chan, Y. K. 1999. Application for field trial of papaya transformed with resistance to papaya ringspot disease. Malaysia's draft field trial application. In R. A. Hautea, Y. K. Chan, S. Attathom and A. F. Krattiger, eds., *The Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia: Biosafety Considerations and Papaya Background Information*. ISAAA Briefs No. 11. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, New York.
- Chan, Y. K. 2001. Heterosis in Eksotika × Sekaki papaya hybrids. *J. Trop. Agric. Food. Sci.* 29: 139-144.
- Chan, Y. K. 2004. Breeding papaya for resistance to ringspot virus disease in Malaysia. *Acta Hort.*

- 632: 57-64.
- Chan, Y. K., and C. A. Ong. 1996. Resistance of some papaya varieties and their hybrids to ringspot virus disease. Pp. 137-148 in S. Vijaysegaran, M. Pauziah, M. S. Mohamad and A. Ahmad Tarmizi, eds., Proceedings of the International Conference on Tropical Fruits, 23-26 July 1996, Kuala Lumpur, Malaysia. Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI), Serdang.
- Chan, Y. K., and P. Raveendranathan. 1984. Differential sensitivity of papaya varieties to expression of boron deficiency symptoms. MARDI Res. Bull. 12: 281-286.
- Chan, Y. K., M. D. Hassan and U. K. Abu Bakar. 1999. Papaya: The industry and varietal improvement in Malaysia. In R. A. Hautea, Y. K. Chan, S. Attathom and A. F. Krattiger, eds., The Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia: Biosafety Considerations and Papaya Background Information. ISAAA Briefs No. 11. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, New York.
- Chan-Tai, C., C. -R. Yen, L. -S. Chang, C. -H. Hsiao and T. -S. Ko. 2003. All hermaphrodite progeny are derived by self-pollinating the Sunrise papaya mutant. Plant Breed. 122: 431-434.
- Chandrasekaran, S. N., G. H. Madhuram and D. Daniel Sundararaj. 1950. Half-apocarpny in *Carica papaya* Linn. Current Sci. 19: 186.
- Chang, L. -S., Y. -S. Lee, H. -J. Su and T. -H. Hung. 2003. First report of papaya leaf curl virus infecting papaya plants in Taiwan. Plant Disease 87: 204.
- Charlesworth, D. 2004. Plant evolution: Modern sex chromosomes. 2004. Current Biol. 14: R271-R273.
- Cheah, L. S., K. K. Yau, S. Subramaniam and F. T. Lai. 1993. Cleft grafting and quality improvements of papaya cv. Eksotika. Paper presented at Seminar on the Fruit Industry in Malaysia, 7-9 September 1993, Johor Bahru, Malaysia. Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI).
- Chen, G., C. M. Ye, J. C. Huang, M. Yu and B. J. Li. 2001. Cloning of the papaya ringspot virus (PRSV) replicase gene and generation of PRSV-resistant papayas through the introduction of the PRSV replicase gene. Plant Cell Rep. 20: 272-277.
- Chen, R. -Y., ed. 1993. Chromosome Atlas of Chinese Principal Economic Plants, Vol. 1. Chromosome Atlas of Chinese Fruit Trees and their Close Wild Relatives. International Academic Publishers, Beijing.
- Chen, U. C., and M. T. Tseng. 1996. Change in morphology and moisture content of papaya (*Carica papaya* L.) seeds during germination. J. Agric. Assoc. China, New Series 176: 112-121.
- Chiang, C. -H., F. -J. Jan, S. -D. Yeh and D. Gonsalves. 2000. Potential risk of papaya ringspot recombinant viruses with coat protein segments expressed in transgenic papaya. Phytopathology 90 (6, Suppl.): S14.
- Chiang, C. -H., J. -J. Wang, F. -J. Jan, S. -D. Yeh, and D. Gonsalves. 2001. Comparative reactions of recombinant papaya ringspot viruses with chimeric coat protein (CP) genes and wild-type viruses on CP-transgenic papaya. J. Gen. Virol. 82: 2827-2836.
- Chinoy, N. J., J. M. d' Souza and P. Padman. 1994. Effects of crude aqueous extract of *Carica papaya* seeds in male albino mice. Reproductive Toxicol. 8: 75-79.
- Clement, C. R., J. M. McCann and N. J. H. Smith. 2004. Agrobiodiversity in Amazôia and its relationship with Dark Earths. Pp. 159-178 in J. Lehmann, D. C. Kern, B. Glaser and W. I. Woods, eds., Amazonian Dark Earths -Origin, Properties, and Management. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Clemente, H. S., and T. E. Marler. 2001. Trade winds reduce growth and influence gas exchange patterns in papaya seedlings. *Ann. Bot.* 88: 379-385.
- Cohen, E., U. Lavi and P. Spiegel-Roy. 1989. Papaya pollen viability and storage. *Scientia Hort.* 40: 317-324.
- Colombo, P., M. R. Melati, A. Scialabba, S. Trapani and M. Sortino. 1989. The ecomorphology of *Carica quercifolia* Solms-Laub. in a Mediterranean climate. *Agric., Ecosystems & Environm.* 27: 397-409.
- Conover, R. A., R. E. Litz and S. E. Malo. 1986. 'Cariflora': A papaya for South Florida with tolerance to papaya ringspot virus. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, S. Florida Agric. Expt. Sta. Circular No. 329.
- Cook, I. 2004. Follow the thing: Papaya. *Antipode* 36: 642-664.
- Coppens d' Eeckenbrugge, G., and D. Libreros Ferla. 2000. Fruits from America: An Ethnobotanical Inventory. Institute for Plant Genetic Resources (IPGRD), Cali, Colombia & Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Département des productions fruitières et horticoles (CIRAD-FLHOR). http://www.ciat.cgiar.org/ipgri/fruits_from_americas/frutales/species%20Vasconcella.htm.
- Craig, R. J. 1993. Regeneration of native Mariana Island forest in disturbed habitats. *Micronesica* 26: 99-108.
- CRN (Council for Responsible Nutrition). 2001. Vitamins: Comparison of current RDIs, new DRIs and Uls. Summarizing findings from U. S. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2000), Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. National Academies Press, Washington, D. C. <http://crnusa.org/pdfs/CRNintakes.pdf>.
- Crop Knowledge Master. 1993. Papaya. General Crop Information. University of Hawaii Extension, College of Tropical Agriculture and Human Resources (CTAHR). http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/crops/i_papa.htm
- Cruz, A., and D. W. Johnston. 1984. Ecology of the West Indian Red-bellied Woodpecker on Grand Cayman; Distribution and foraging. *Wilson Bull.* 96: 366-379.
- CTAHR, University of Hawaii, Manoa. 1985. Papaya; Diseases in An Information System of Tropical Crops in Hawaii. University of Hawaii Extension, College of Tropical Agriculture and Human Resources (CTAHR). <http://www.ctahr.hawaii.edu/fb/papaya/papaya.htm#Diseases>
- Cunha, R. J. P., and H. P. Haag. 1980. Nutrição mineral do mamoeiro. I. Curva de crescimento do mamoeiro (*Carica papaya* L.) em condições de campo. *Anais Escola Superior Agric. "Luiz de Queiroz"* 37: 81-97.
- Dando, P. M., S. L. Sharp, D. J. Buttle and A. J. Barrett. 1995. Immunoglobulin E antibodies to papaya proteinases and their relevance to chemonucleosis. *Spine* 20: 981-985.
- Dantas, J. L. L., and J. Firmino de Lima. 2001. Seleção e recomendação de variedades de mamoeiro Avaliação de linhagens e híbridos. *Rev. Brasil. Frutic.* 23: 617-621.
- Das, S. 1998. Depredations on crops by langurs in Tripura. *Tigerpaper* 25 (4): 29-32.
- Datta, P. C. 1971. Chromosomal biotypes of *Carica papaya* Linn. *Cytologia* 36: 555-562.
- Davis, M. J. 1993. Papaya bunchy top, MLO. Crop Knowledge Master. University of Hawaii Extension, CTAHR. <http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/papbunc.htm>
- Davis, M. J., and Z. Ying. 1999. Genetic diversity of the papaya ringspot virus in Florida. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 112: 194-196.

- Davis, M. J. , and Z. Ying. 2002. Development of transgenic ringspot virus-resistant papaya for Florida. *Phytopathology* 92 (6, Suppl.): S18.
- Davis, M. J. , Z. Ying, B. R. Brunner, A. Pantoja and F. H. Ferwerda. 1998. Rickettsial relative associated with papaya bunchy top disease. *Current Microbiol.* 36: 80-84.
- Davis, M. J. , Z. Ying, B. R. Brunner, A. Pantoja and F. H. Ferwerda. 1999. Rickettsia discovered in diseased papaya apparently causes the disease and provides clue to plant evolution. Caribbean Basin Administrative Group and Pacific Basin Administrative Group, Tropical and Subtropical Agriculture, T-STAR Res. Notes Summer 99: 1, 4.
- de Candolle, A. 1883. Origine des plantes cultivées. Bibliothèque scientifique internationale Vol. 43. G. Baillière, Paris. 377 pp.
- de Candolle, A. 1884. Origin of Cultivated Plants. International Scientific Series Vol. 49. Kegan Paul, Trench & Co. , London, U. K. 468 pp.
- De Feo, V. , F. De Simone, G. A. Arroyo and F. Senatore. 1999. *Carica candicans* Gray (mito), an alimentary resource from Peruvian flora. *J. Agric. Food. Chem.* 47: 3682-3684.
- de la Fuente, J. M. , V. Ramírez-Rodríguez, J. L. Cabrera-Ponce and L. Herrera-Estrella. 1997. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276: 1566-1568.
- Del Angel-Pérez, A. L. , and M. A. Mendoza-Briseno. 2004. Totonac homegardens and natural resources in Veracruz, Mexico. *Agric. & Human Values* 21: 329-346.
- Deputy, J. C. , R. Ming, H. Ma. , Z. Liu, M. M. M. Fitch, M. Wang, R. Manshardt and J. I. Stiles. 2002. Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 107-111.
- de Wit, H. C. D. 1966. Plants of the World; The Higher Plants I. E. P. Dutton & Co. , New York. 335 pp.
- Dhaliwal, G. S. , and M. I. S Gill. 1991. Testing pollen viability, germination and stigma receptivity in some papaya cultivars. *J. Res. Punjab Agric. Univ.* 28: 206-210.
- Dinesh, M. R. , C. P. A. Iyer and M. D. Subramanyam. 1992. Genetical study in papaya (*Carica papaya* L.). *Acta Hort.* 321: 152-163.
- Dodson, C. H. , and A. H. Gentry. 1978. Flora of the Rio Palenque Science Centre, Los Rios Province, Ecuador. Selbyana Vol. 4. 628 pp.
- Drew, R. A. 1988. Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature field-grown trees. *Hort-Science* 23: 609-611.
- Drew, R. A. 1992. Improved techniques for *in vivo* propagation and germplasm storage of papaya. *Hort-Science* 27: 1122-1124.
- Drew, R. A. , C. M. O' Brien and P. M. Magdalita. 1998. Development of interspecific *Carica* hybrids. *Acta Hort.* 461: 285-292.
- Duke, J. A. 1967. Darien Survival Manual. Battelle Memorial Institute, Columbus, Ohio. 80 pp.
- Ekanem, A. P. , A. Obiekezie, W. Kloas and K. Knopf. 2004. Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitol. Res.* 92: 361-366.
- Elder, R. J. , D. J. Reid, W. N. B. Macleod and R. L. Gillespie. 2002a. Post-ratoon growth and yield of three hybrid papayas (*Carica papaya* L.) under mulched and bare-ground conditions. *Aust. J. Expt. Agric.* 42: 71-81.
- Elder, R. J. , J. R. Milne, D. J. Reid, J. N. Guthrie and D. M. Persley. 2002b. Temporal incidence of three phytoplasma-associated diseases of *Carica papaya* and their potential hemipteran vectors

- in central and south-east Queensland. *Australasian Plant Pathol.* 31: 165-176.
- Elias, T. S. 1980. *The Complete Trees of North America: Field Guide and Natural History.* Van Nostrand Reinhold, New York. 948 pp.
- Ellis, R. H., T. D. Hong and E. H. Roberts. 1985. *Handbooks for Genebanks No. 3, Handbook of Seed Technology for Genebanks, Vol. II; Compendium of Specific Germination Information and Test Recommendations.* Chapter 28, Caricaceae. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.
- Ellis, R. H., T. D. Hong and E. H. Roberts. 1991. Effect of storage temperature and moisture on the germination of papaya seeds. *Seed Sci. Res.* 1: 69-72.
- El Moussaoui, A., M. Nijs, C. Paul, R. Wintjens, J. Vincentelli, M. Azarkan and Y. Looze. 2001. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cell. Molec. Life Sci.* 58: 556-570.
- Elmqvist, T., M. Wall, A. L. Berggren, L. Blix, S. Fritioff and U. Rinman. 2001. Tropical forest reorganization after cyclone and fire disturbance in Samoa: Remnant trees as biological legacies. *Conservation Ecol.* 5 (2): Article 10 (online). <http://www.consecol.org/vol5/iss2/art10>.
- Eno, A. E., O. I. Owo, E. H. Itam and R. S. Konya. 2000. Blood pressure depression by the fruit juice of *Carica papaya* L. in renal and DOCA-induced hypertension in the rat. *Phytotherapy Res.* 14: 235-239.
- ETA. 2001. *Enzymes; A Primer on Use and Benefits Today and Tomorrow.* Enzyme Technical Association, Washington, D. C. 34 pp. http://www.enzymetechnicalassoc.org/benefits_paper.pdf.
- Ezeoke, A. C. J. 1985. Hypersensitivity to paw-paw (*Carica papaya*): Report of a case. *African J. Med. & Med. Sci.* 14: 121-124.
- FAO. 1986. *Carica papaya.* Chapter 17 in *Food and Fruit-bearing Forest Species.* 3. Examples from Latin America. FAO Forestry Paper 44/3.
- FAO. 2001. *World List of Seed Sources.* FAO Plant Production and Protection Division, Seed and Plant Genetic Resources Service (AGPS). <http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPS/seed/wlss.htm>.
- FAO. 2005. *Agricultural Data; FAOstat. Papayas.* <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture> (accessed 18/01/2005).
- Fermin, G., V. Inglessis, C. Garboza, S. Rangel, M. Dagert and D. Gonsalves. 2004. Engineered resistance against papaya ringspot virus in Venezuelan transgenic papayas. *Plant Disease* 88: 516-522.
- Ferrão, J. E. M. 1992. *A Aventura das Plantas e os Descobrimentos Portugueses.* Instituto de Investigação Científica Tropical, Comissão Nacional para as Comemorações dos Descobrimentos Portugueses, and Fundação Berardo, Lisbon, Portugal. 247 pp.
- Ferreira, S. A., K. Y. Pitz, R. Manshardt, F. Zee, M. M. Fitch and D. Gonsalves. 2002. Virus coat protein transgenic papaya provides practical control of papaya ringspot virus in Hawaii. *Plant Disease* 86: 101-105.
- Fewerda-Licha, M. 2002. Mixed infection of papaya ringspot virus, zucchini yellow mosaic virus and papaya bunchy top affecting papaya (*Carica papaya* L.) in Puerto Rico. *Phytopathology* 92 (6, Suppl.): S25.
- Firko, M. J., and E. V. Podleckis. 1996. Importation of Papaya Fruit from Brazil into the Continental United States. *Qualitative, Pathway-Initiated Pest Risk Assessment.* USDA-APHIS, Riverdale, Maryland.
- Fisher, J. B. 1980. The vegetative and reproductive structure of papaya (*Carica papaya*). *Lyonia* 1: 191-208.

- Fisher, J. B., and R. J. Mueller. 1983. Reaction anatomy and reorientation in leaning stems of balsa (*Ochroma*) and papaya (*Carica*). *Canad. J. Bot.* 61: 880-887.
- Fitch, M. M. M., R. M. Manshardt, D. Gonsalves, J. L. Slightom and J. C. Sanford. 1990. Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.* 9: 189-194.
- Fitch, M. M. M., R. M. Manshardt, D. Gonsalves, J. L. Slightom and J. C. Sanford. 1992. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio/Technology* 10: 1466-1472.
- Fitch, M. M. M., T. Leong, L. Akashi, A. Yeh, S. White, S. A. Ferreira and P. H. Moore. 2002. Papaya ringspot virus resistance genes as a stimulus for developing new cultivars and new production systems. *Acta Hort.* 575: 85-91.
- Flasinski, S., V. M. Aquino, R. A. Hautea, W. K. Kaniewski, N. D. Lam, C. A. Ong, V. Pillai and K. Romyanon. 2002. Value of engineered virus resistance in crop plants and technology cooperation with developing countries. Chapter 14 in R. E. Evenson, V. Santaniello and D. Zilberman, eds., *Economic and Social Issues in Agricultural Biotechnology*. CABI Publishing, New York.
- Font Quer, P. 1958. *Botánica Pintoresca*. Editorial Ramón Sopena, Barcelona. 719 pp.
- Fournier, V., J. A. Rosenheim, J. Brodeur, L. O. Laney and M. W. Johnson. 2003. Herbivorous mites as ecological engineers: Indirect effects on arthropods inhabiting papaya foliage. *Oecologia* 135: 442-450.
- Fournier, V., J. A. Rosenheim, J. Brodeur and M. W. Johnson. 2004. Inducible responses in papaya: Impact on population growth rates of herbivorous mites and powdery mildew under field conditions. *Environ. Entomol.* 33: 1088-1094.
- Free, J. B. 1975. Observations on the pollination of papaya (*Carica papaya* L.) in Jamaica. *Trop. Agric.* 52: 275-279.
- Ganeshan, S. 1986. Cryogenic preservation of papaya pollen. *Scientia Hort.* 28: 65-70.
- Garcia, Q. S., J. L. P. Rezende and L. M. S. Aguiar. 2000. Seed dispersal by bats in a disturbed area of Southeastern Brazil. *Rev. Biol. Trop.* 48: 125-128.
- Garrett, A. 1995. The Pollination Biology of Papaw (*Carica papaya* L.) in Central Queensland. Ph. D. thesis, Department of Biology, Central Queensland University, Rockhampton, Queensland, Australia.
- Giacometti, D. C., D. H. van Sloten and N. Chomchalow. 1987. Genetic resources of banana, citrus, mango, papaya and pineapple. *Acta Hort.* 196: 7-24.
- Gilliard, E. T. 1962. On the breeding behavior of the Cock-of-the-Rock (*Aves, Rupicola rupicola*). *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 124: 35-68.
- Gómez-C., M. 2000. Caricaceae, Fasc. 22 in M. Soto-Esparza, A. Gómez-Pompa and L. Giddings, eds., *Bioclimatología de Flora de Veracruz*. Instituto de Ecología, A. C., Xalapa, Veracruz, Mexico. http://www.ecologia.edu.mx/diagnostico/bioclimas/fas_22_26/familias/cari/cari.html.
- Gonsalves, D. 1993. Papaya Ringspot Virus (P-strain). *Crop Knowledge Master*. University of Hawaii Extension, CTAHR. <http://www.extento.hawaii.edu/kbase/Crop/Type/papring.htm>.
- Gonsalves, D. 1998. Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study. *Annual Rev. Phytopathol.* 36: 415-437.
- Gonsalves, D. 2000. Impact of virus resistant transgenic papaya: Two years after its commercialization. *Phytopathology* 90 (6, Suppl.): S109.
- Gonsalves, D., and E. E. Trujillo. 1986. Tomato spotted wilt virus in papaya and detection of the virus by ELISA. *Plant Disease* 70: 501-506.
- Grant, G. 2004. Papaya Seed Australia. <http://www.papayaseed.com.au>.

- Green, P. T., P. S. Lake and D. J. O' Dowd. 2004. Resistance of island rainforest to invasion by alien plants: Influence of microhabitat and herbivory on seedling performance. *Biol. Invasions* 6: 1-9.
- Grime, J. P. 1981. Plant strategies in shade. Pp. 159-186 in H. Smith, ed., *Plants and the Daylight Spectrum*. Academic Press, London.
- GRIN. 2001. Germplasm Resources Information Network database. USDA National Plant Germplasm System. <http://www.ars-grin.gov/npgs/searchgrin.html>.
- Hamilton, R. A. 1954. A quantitative study of growth and fruiting in inbred and crossbred progenies from two Solo papaya strains. *Hawaii Agric. Expt. Sta. Bull. No. 38*: 16.
- Hardisson, A., C. Rubio, A. Baez, M. M. Martin and R. Álvarez. 2001. Mineral composition of the papaya (*Carica papaya* variety Sunrise) from Tenerife island. *Eur. Food Res. Technol.* 212: 175-181.
- Haro Martínez, M. 1975. Grado de distribución de las plantas introducidas en la Isla Santa Cruz, Galápagos. *Rev. Univ. Católica (Quito) No. 8*: 243-258.
- Hawaii Department of Agriculture. 2003. Identity Preservation Protocol for Non-GMO Papayas. Revised January 19, 2003.
- Heide, F. 1923. Bloembestuuving in West-Java. *Meded. Alg. Proefstn. Landbou* 14: 20-37.
- Hidalgo-Mihart, M. G., L. Cantú-Salazar, C. A. López-González, E. Martínez-Meyer and A. González-Romero. 2001. Coyote (*Canis latrans*) food habits in a tropical deciduous forest of western Mexico. *Amer. Midl. Nat.* 146: 210-216.
- Hofmeyr, J. D. J. 1938a. Genetical studies of *Carica papaya* L. *South African J. Sci.* 35: 300-304.
- Hofmeyr, J. D. J. 1938b. Genetical studies of *Carica papaya* L. I. The inheritance and relation of sex and certain plant characteristics. II. Sex reversal and sex forms. *South African Dept. Agric. Sci. Bull. No. 187*. 64 pp.
- Hofmeyr, J. D. J. 1939a. Sex-linked inheritance in *Carica papaya* L. *South African J. Sci.* 36: 283-285.
- Hofmeyr, J. D. J. 1939b. Sex reversal in *Carica papaya* L. *South African J. Sci.* 36: 286-287.
- Hofmeyr, J. D. J. 1945. Further studies of tetraploidy in *Carica papaya* L. *South African J. Sci.* 41: 225-230.
- Hofmeyr, J. D. J. 1967. Some genetic and breeding aspects of *Carica papaya* L. *Agron. Trop.* 17: 345-351.
- Horovitz, S., and H. Jiménez. 1958. Cruzabilidad entre especies de *Carica*. *Agron. Trop.* 7: 207-215.
- Horovitz, S., and H. Jiménez. 1967. Cruzamientos interespecíficos e intergenéricos en Caricáceas y sus implicaciones fitotécnicas. *Agron. Trop.* 17: 323-344.
- Horvitz, C. C., and A. Koop. 2001. Removal of nonnative vines and post-hurricane recruitment in tropical hardwood forests of Florida. *Biotropica* 33: 268-281.
- Hsu, T. -C. 1958a. Observations on sexuality in *Carica papaya* L. -Changes in sexuality. *Acta Bot. Sinica* 7: 237-246.
- Hsu, T. -C. 1958b. Observations on sexuality in *Carica papaya* L. - Female plants. *Acta Bot. Sinica* 7: 231-236.
- IBPGR. 1988. Descriptors for Papaya. International Board for Plant Genetic Resources, Rome. 34 pp.
- Iliev, D., and P. Elsner. 1997. Generalized drug reaction due to papaya's juice in throat lozenge. *Dermatology* 194: 364-366.
- Imai, K., F. Ogura and Y. Murata. 1982. Photosynthesis and respiration of papaya (*Carica papaya* L.) leaves. *Acta Oecologica* 3: 399-407.

- ISAAA. 2001a. Biotechnology Transfer Projects - Asia. Biotechnology transfer projects in Southeast Asia: A review. The Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia. ISAAA Biennial Report 1997-1999. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, New York. <http://www.isaaa.org/projects/SEAsia/Transferx.htm>
- ISAAA. 2001b. Papaya: A more promising harvest for Brazilian farmers. ISAAA Biotechnology Fellowship Program, Fellowships that Shape the Future. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, New York. http://www.isaaa.org/publications/about_isaaa/FellowR.htm#Innovative%20Potato%20Research.
- ISAAA. 2001c. SouthEast Asia to field test GM papaya in 2002. Crop Biotech Update, 7 November 2001. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, New York.
- Jaizme-Vega, M. C., and R. Azcón. 1995. Responses of some tropical and subtropical cultures to endomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 5: 213-217.
- Janzen, D. H., and P. S. Martin. 1982. Neotropical anachronisms: Fruits the gomphotheres ate. *Science* 215: 19-27.
- Japan International Research Centre for Agricultural Sciences. 2003. Papaya ringspot virus (PRSV) and papaya leaf distortion mosaic virus (PLDMV). <http://ss.jircas.affrc.go.jp/engpage/jarq/33-1/kiritani/kiritani2.html>.
- Jiménez, Y., J. Romero and X. Scheldeman. 1999 [1998]. Colección, caracterización y descripción de *Carica × heilbornii* nm. *pentagona* Badillo, *Carica pubescens* (A. DC.) Solms-Laub. y *Carica stipulata* Badillo, en la provincia de Loja. *Rev. Difusión Téc. Cien. Fac. Cien. Agric. Univ. Nac. Loja* 29: 43-54.
- Jobin-Decor, M. P., G. C. Graham, R. J. Henry and R. A. Drew. 1997. RAPD and isozyme analysis of genetic relationships between *Carica papaya* and wild relatives. *Genetic Resources Crop Evol.* 44: 471-477.
- Jørgensen, L. B. 1995. Stomatal myrosin cells in Caricaceae: Taxonomic implications for a glucosinolate-containing family. *Nordic J. Bot.* 15: 523-540.
- Kader, A. A. 2000. Produce Facts. Papaya: Recommendations for maintaining postharvest quality. Postharvest Technology Research and Information Centre, Department of Pomology, University of California, Davis. <http://rics.ucdavis.edu/postharvest2/Produce/ProduceFacts/Fruit/papaya.shtml>
- Khuspe, S. S., and S. D. Ugale. 1977. Floral biology of *Carica papaya* Linn. *J. Maharashtra Agric. Univ.* 2: 115-118.
- Kim, M. S., P. H. Moore, F. Zee, M. M. M. Fitch, D. L. Steiger, R. M. Manshardt, R. E. Paull, R. A. Drew, T. Sekioka and R. Ming. 2002. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. *Genome* 45: 503-512.
- Kline, W. N., and J. G. Duquesnel. 1996. Management of invasive exotic plants with herbicides in Florida. *Down To Earth* (New Delhi) 51 (2): 22-28.
- Knudsen, J. T., and L. Tollsten. 1993. Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: Floral scent composition in moth-pollinated taxa. *Bot. J. Linnean Soc.* 113: 263-284.
- Konno, K., C. Hirayama, M. Nakamura, K. Tateishi, Y. Tamura, M. Hattori and K. Kohno. 2004. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: Role of cysteine proteases in latex. *Plant J.* 37: 370-378.
- Kositratana, W., O. Chatchavankarnpanich, K. Kanokwaree, W. Jamboonsri and C. Babprasert. 1999. Papaya production in Thailand. In R. A. Hautea, Y. K. Chan, S. Attathom and A. F. Krattiger, eds., *The Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia: Biosafety Considerations and*

- Papaya Background Information. ISAAA Briefs No. 11. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, New York.
- Kubitzki, K. 2003. Pp. 57-61 in K. Kubitzki and C. Bayer, eds., The Families and Genera of Vascular Plants, Vol. 5, Flowering Plants, Dicotyledons; Malvales, Capparales and Non-betain Caryophyllales. Springer-Verlag, New York.
- Kwit, C., W. J. Platt and H. H. Slater. 2000. Post-hurricane regeneration of pioneer plant species in South Florida subtropical hardwood hammocks. *Biotropica* 32: 244-251.
- Lange, A. H. 1961. Factors affecting sex changes in the flowers of *Carica papaya* L. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 77: 252-264.
- Laska, M., J. M. Luna Baltazar and E. Rodriguez Luna. 2003. Food preferences and nutrient composition in captive pacas, *Agouti paca* (Rodentia, Dasyproctidae). *Mamm. Biol.* 68: 31-41.
- Lastra, R., and E. Quintero. 1981. Papaya apical necrosis, a new disease associated with a rhabdovirus. *Plant Disease* 65: 439-440.
- Lee, S. A. 1989. Further studies on weed management in papaya cv. Eksotika. Pp. 43-63 in Y. K. Chan and P. Raveendranathan, eds., Proceedings of the MARDI-MAPPS Seminar on Eksotika Papaya: Problems and Prospects, 7-8 March 1989, Johor Bahru, Malaysia. Malaysian Agricultural Research and Development Institute and Malaysian Plant Protection Society, Serdang.
- Lemos, E. G. M., C. L. S. P. Silva and H. A. Zaidan. 2002. Identification of sex in *Carica papaya* L. using RAPD markers. *Euphytica* 127: 179-184.
- Le Tran, B., and O. Y. T. Tran. 1999. Papaya research and development in Vietnam. In R. A. Hautea, Y. K. Chan, S. Attathom and A. F. Krattiger, eds., The Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia: Biosafety Considerations and Papaya Background Information. ISAAA Briefs No. 11. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, New York.
- Lewis, W. H., and M. P. Elvin-Lewis. 1977. Medical Botany: Plants Affecting Man's Health. John Wiley & Sons, New York. 515 pp.
- Liefting, L. W., A. C. Padovan, K. S. Gibb, R. E. Beever, M. T. Andersen, R. D. Newcombe, D. L. Beck and R. L. S. Forster. 1998. 'Candidatus *Phytoplasma australiense*' is the phytoplasma associated with Australian grapevine yellows, papaya dieback and Phormium yellow leaf diseases. *European J. Plant Pathol.* 104: 619-623.
- Lima, R. C. A., M. T. Souza Jr., G. Pio-Ribeiro and J. A. A. Lima. 2002. Sequences of the coat protein gene from Brazilian isolates of papaya ringspot virus. *Fitopatologia Brasil.* 27: 174-180.
- Lin, C. C., H. J. Su and D. N. Wang. 1989. The control of papaya ringspot virus in Taiwan, ROC. *FFTC Tech. Bull.* 114: 1-3.
- Lines, R. E., D. Persley, J. L. Dale, R. Drew and M. F. Bateson. 2002. Genetically engineered immunity to papaya ringspot virus in Australian cultivars. *Molec. Breed.* 10: 119-129.
- Linnell, T., and J. Arnoult. n. d. *Plantes Utiles du Monde Entier*. Fernand Nathan, Paris. 194 pp.
- Little Jr., E. L., and F. H. Wadsworth. 1964. Common Trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. *USDA Agriculture Handbook*. No. 249. 548 pp.
- Litz, R. E., and R. A. Conover. 1978. *In vitro* propagation of papaya. *HortScience* 13: 241-242.
- Liu, Z., P. H. Moore, H. Ma, C. M. Ackerman, M. Ragiba, Q. Yu, H. M. Pearl, M. S. Kim, J. W. Charlton, J. I. Stiles, F. T. Zee, A. H. Paterson and R. Ming. 2004. A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature* 427: 348-352 + Figs. S1-S3, Table S1 & Suppl. Notes1-3.
- Lius, S., R. M. Manshardt, M. M. Fitch, J. L. Slightom, J. C. Sanford and D. Gonsalves. 1997.

- Pathogenderived resistance provides papaya with effective protection against papaya ringspot virus. *Molec. Breed.* 3: 161-168.
- Lohiya, N. K., B. Manivannan, P. K. Mishra, N. Pathak, S. Sriram, S. S. Bhande and S. Panneerdoss. 2002. Chloroform extract of *Carica papaya* seeds induces long-term reversible azoospermia in langur monkey. *Asian J. Androl.* 4: 17-26.
- Louw, A. 2000. Papaya pollination. *Neltropika Bulletin No.* 307 (Jan.): 18-19.
- Ma, H., P. H. Moore, Z. Liu, M. S. Kim, Q. Yu, M. M. M. Fitch, T. Sekioka, A. H. Paterson and R. Ming. 2004. High-density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determining locus in papaya. *Genetics* 166: 419-436.
- Mabberley, D. J. 1998. *The Plant-Book; A Portable Dictionary of the Higher Plants*, 2nd Ed., rev. printing. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U. K. 858 pp.
- Maciel-Zambolim, E., S. Kunieda-Alonso, K. Matsuoka, M. G. de Carvalho and F. M. Zerbini. 2003. Purification and some properties of papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. *Plant Pathol.* 52: 389-394.
- Magdalita, P. M., I. D. Godwin, R. A. Drew and S. W. Adkins. 1997a. Effect of ethylene and culture environment on development of papaya nodal cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 49: 93-100.
- Magdalita, P. M., R. A. Drew, S. W. Adkins and I. D. Godwin. 1997b. Morphological, molecular and cytological analyses of *Carica papaya* × *C. cauliflora* interspecific hybrids. *Theor. Appl. Genetics* 95: 224-229.
- Magdalita, P. M., R. A. Drew, I. D. Godwin and S. W. Adkins. 1998. An efficient interspecific hybridisation protocol for *Carica papaya* L. × *C. cauliflora* Jacq. *Aust. J. Expt. Agric.* 38: 523-530.
- Malan, E. F. 1953. *The Production of Pawpaws*. Farming in South Africa, Reprint 57.
- Malaysia Department of Agriculture. 2001. Papaya. Crop requirements. http://agrolink.moa.my/doi/english/croptech/bet_req.html.
- Malhi, C. S. 2001. Bird damage to guava (*Psidium guava*) and papaya (*Carica papaya*). *Tigerpaper* 28 (3): 27-30.
- Malo, S. E., and C. W. Campbell. 1994. *The Papaya*. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Series of Horticultural Sciences Department, Fact Sheet HS-11.
- Manshardt, R. M. 1999. The development of virus-resistant papayas in Hawaii; A collaborative project between the University of Hawaii and Cornell University. In R. A. Hautea, Y. K. Chan, S. Attathom and A. F. Krattiger, eds., *The Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia: Biosafety Considerations and Papaya Background Information*. ISAAA Briefs No. 11. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, New York.
- Manshardt, R. M., and R. A. Drew. 1998. Biotechnology of papaya. *Acta Hort.* 461: 65-73.
- Manshardt, R. M., and T. F. Wenslaff. 1989a. Interspecific hybridisation of papaya with other *Carica* species. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114: 689-694.
- Manshardt, R. M., and T. F. Wenslaff. 1989b. Zygotic polyembryony in interspecific hybrids of *Carica papaya* and *C. cauliflora*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114: 684-689.
- Manshardt, R. M., and F. Zee. 1994. Papaya germplasm and breeding in Hawaii. *Fruit Varieties J.* 48: 146-152.
- Maoka, T. 2002. The incidence of papaya' s viruses in Southeast Asia. *Agrochemicals Japan* 80: 22-26.
- Maoka, T., S. Kashiwazaki, S. Tsuda, T. Usugi and H. Hibino. 1996. Nucleotide sequence of capsid

- protein gene of papaya leaf-distortion mosaic virus. Arch. Virol. 141: 197-201.
- Marín Acosta, J. C. 1969. Insectos relacionados con la lechosa, *Carica papaya* L., en Venezuela. Agron. Trop. 19: 251-267.
- Marler, T. E. 1994. Papaya. Pp. 216-224 in B. Schaffer and P. C. Andersen, eds., Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops, Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Marler, T. E., and H. M. Discekici. 1997. Root development of 'Red Lady' papaya plants grown on a hillside. Plant & Soil 195: 37-42.
- Marques-Souza, A. C., C. O. Moura and B. W. Nelson. 1996. Pollen collected by *Trigona williana* (Hymenoptera: Apidae) in Central Amazonia. Rev. Biol. Trop. 44: 567-573.
- Marys, E. E., O. Carballo and M. L. Izaquirre-Mayoral., 2000. Occurrence and relative incidence of viruses infecting papaya in Venezuela. Ann. Appl. Biol. 136: 121-124.
- Masri, M. 1993. Rooting pattern and distribution of absorbing roots of papaya (*Carica papaya* L.) var. Eksotika. MARDI Res. J. 21: 99-104.
- Mateos Sánchez, M., J. Pérez Flores and C. Acosta Zamudio. 1995. Determinación de la importancia del viento y los insectos en la polinización y amarre de fruto en papaya (*Carica papaya* L.) tipo Cera. Rev. Chapingo Serie Hort. 1 (4): 33-37.
- McMullen, C. K. 1999. Flowering Plants of the Galápagos Islands. Comstock Publishing Associates, Ithaca and London. 370 pp.
- Mekako, H. U., and H. Y. Nakasone. 1975a. Floral development and compatibility studies of *Carica* species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100: 145-148.
- Mekako, H. U., and H. Y. Nakasone. 1975b. Interspecific hybridisation among six *Carica* species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100: 237-242.
- Meurman, O. 1925. The chromosome behavior of some dioecious plants and their relatives with special reference to the sex chromosomes. Soc. Sci. Fennica Com. Biol. 2 (3): 105.
- Mezhlumyan, L. G., T. D. Kasymova and P. Kh. Yuldashev. 2003. Proteinases from *Carica papaya* latex. Chem. Nat. Compounds 39: 223-228.
- Micheletti de Zerpa, D. 1980. Comportamiento meiótico de la descendencia híbrida producida al transferir el carácter bisexual de *Carica pubescens* a *Carica stipulata*. Rev. Fac. Agron. (Maracay) 9: 5-47.
- Ming, R., P. H. Moore, F. Zee, C. A. Abbey, H. Ma and A. H. Paterson. 2001. Construction and characterization of a papaya BAC library as a foundation for molecular dissection of a tree-fruit genome. Theor. Appl. Genet. 102: 892-899.
- Moneret-Vautrin, D. A., M. Benoist, M. C. Laxenaire, A. Croizier and J. L. Gueant. 1985. Allergy to chymopapain: Value of predictive tests before chemonucleolysis. Ann. Fr. Anesth. Reanim. 4: 313-315.
- Morales Astudillo, A. R., D. L. Medina Medina and B. D. Yaguache Camacho. 2004. Diversidad genética, filogenética y distribución geográfica del género *Vasconcellea* en el Sur de Ecuador. Lyonia: J. Ecol. Applic. 7 (2): 15-23.
- Moreno, N. P. 1980. Caricaceae. Flora de Veracruz, Fasc. 10. Instituto de Ecología's, A. C., Xalapa, Veracruz, Mexico. 18 pp.
- Morrison, A., D. Astridge, V. Hansen and R. Elder. 2003. DPI Note: Hawk moth pollinators in papaya. <http://www.Dpi.qld.gov.au/horticulture/5333.html>.
- Morshidi, M. 1996. Genetic variability in *Carica papaya* and its related taxa. Dissertation, University of Hawaii, Honolulu. 282 pp.
- Morshidi, M. 1998. Genetic control of isozymes in *Carica papaya* L. Euphytica 103: 89-94.

- Morton, J. F. 1987. Papaya (pp. 336-346). Fruits of Warm Climates. Julia F. Morton [publisher], Miami, Florida.
- Mosqueda Vázquez, R. , and J. Molina Galán. 1973. Formas sexuales, sus frecuencias y su relación con otras características en *Carica papaya* L. Agrobiencia 11: 73-83.
- Muthukrishnan, C. R. , and I. Irulappan. 1985. Papaya. Pp. 320-344 in T. K. Bose, Fruits of India: Tropical and Subtropical. Naya Prokash, Calcutta.
- Nakasone, H. Y. , and C. Lamoureux. 1982. Transitional forms of hermaphroditic papaya flowers leading to complete maleness. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107: 589-592.
- Nakasone, H. Y. , and R. E. Paull. 1998. Papaya. Chapter 10 (pp. 239-269) in Tropical Fruits. CABI Publishing, New York.
- NCBI. 2001. NCBI GenBank (nucleotide database). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Nielsen, V. 1998. The reproductive biology of *Carica papaya* in Ecuador. Nordic J. Bot. : "in press".
- Nishijima, W. T. 1999. Diseases of papaya (*Carica papaya* L.). The American Phytopathological Society. <http://www.scisoc.org/resource/common/names/papaya.htm>
- Noa-Carrazana, J. C. , B. C. Ruíz-Castro and L. Silva-Rosales. 2000. Molecular studies of viruses of papaya (*Carica papaya*) in Mexico. Phytopathology 90 (6, Suppl.) : S56.
- NRC. 1989. Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. Board of Science and Technology for International Development, National Research Council. National Academy Press, Washington, D. C.
- OGTR. 2003a. The Biology and Ecology of Papaya (paw paw), *Carica papaya* L. , in Australia. Office of the Gene Technology Regulator, Government of Australia. 20 pp.
- OGTR. 2003b. Risk Assessment and Risk Management Plan. Application for License for Dealings Involving an Intentional Release into the Environment. DIR 026/2002. June 2003. Office of the Gene Technology Regulator, Government of Australia. <http://www.ogtr.gov.au/ir/dir026.htm>.
- Olafsdottir, E. S. , L. B. Jørgensen and J. W. Jaroszewski. 2002. Cyanogenesis in glucosinolate-producing plants: *Carica papaya* and *Carica quercifolia*. Phytochemistry 60: 269-273.
- Olson, M. E. 2002. Intergeneric relationships within the Caricaceae-Moringaceae clade (Brassicales) and potential morphological synapomorphies of the clade and its families. Intl. J. Plant Sci. 163: 51-65.
- Ono, E. O. , J. F. Grana Jr. and J. D. Rodrigues. 2004. Reguladores vegetais na quebra da dominância apical de mamoeiro (*Carica papaya* L.). Rev. Brasil. Frutic. 26: 348-350.
- Oppenheimer, H. L. , and R. T. Bartlett. 2000. New plant records from Maui, Ohu, and Hawaii 'islands. Bishop Museum Occas. Papers 64: 1-10.
- Osato, J. A. , L. A. Santiago, G. M. Remom, M. S. Cuadara and A. Mori. 1993. Antimicrobial and antioxidant activities of unripe papaya. Life Sci. 53: 1383-1389.
- Pacific Business News. 2003. Papaya production is lower. September 24, 2003. American City Business Journals.
- Padovan, A. C. , and K. S. Gibb. 2001. Epidemiology of phytoplasma diseases in papaya in Northern Australia. J. Phytopathol. 149: 649-658.
- Pantoja, A. , P. A. Follett and J. A. Villanueva-Jimez. 2002. Pests of papaya. Pp. 131-156 in J. E. Peña, J. L. Sharp and M. Wysoki, eds. , Tropical Fruit Pests and Pollinators: Biology, Economic Importance, Natural Enemies and Control. CABI Publishing, Oxon. , U. K.
- Parasnis, A. S. , W. Ramakrishna, K. V. Chowdari, V. S. Gupta and P. K. Ranjekar. 1999. Microsatellite (GATA)_n reveals sex-specific differences in papaya. Theor. Appl. Genet. 99: 1047-052.
- Parasnis, A. S. , V. S. Gupta, S. A. Tamhankar and P. K. Ranjekar. 2000. A highly reliable sex

- diagnostic PCR assay for mass screening of papaya seedlings. *Molec. Breed.* 6: 337-344.
- Parés, J., C. Basso and D. Jáuregui. 2002. Momento de antesis, dehiscencia de anteras y receptividad estigmática en flores de lechosa (*Carica papaya* L.) cv. Cartagena Amarilla. *Bioagro* 14: 17-24.
- Parés-Martínez, J., R. Linárez, M. Arizaleta and L. Meléndez. 2004. Aspectos de la biología floral en lechosa (*Carica papaya* L.) cv. Cartagena Roja, en el estado Lara, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 21: 116-125.
- Passera, C., and P. Spettoli. 1981. Chemical composition of papaya seeds. *Qual. Plant Foods & Human Nutr.* 31: 77-83.
- Pathak, N., P. K. Mishra, B. Manivannan and N. K. Lohiya. 2000. Sterility due to inhibition of sperm motility by oral administration of benzene chromatographic fraction of the chloroform extract of the seeds of *Carica papaya* in rats. *Phytomedicine* 7: 325-333.
- Paz, L., and C. Vázquez-Yanes. 1998. Comparative seed ecophysiology of wild and cultivated *Carica papaya* trees from a tropical rain forest region in Mexico. *Tree Physiol.* 18: 277-280.
- Pérez-Nasser, N., and C. Vézquez-Yanes. 1989 [1986]. Longevity of buried seeds from some tropical rain forest trees and shrubs of Veracruz, Mexico. *Malaysian Forester* 49: 352-356.
- Pernezny, K., and R. E. Litz. 1999. Some Common Diseases of Papaya in Florida. Florida Cooperative Extension Service, Plant Pathology Fact Sheet PP-35.
- Persley, D. M., and R. C. Ploetz. 2003. Diseases of papaya. Chapter 17 in R. C. Ploetz, ed., *Diseases of Tropical Fruit Crops*, CABI Publishing, Cambridge, Massachusetts.
- Petitto, V. 2004. Papaya: Un antiossidante naturale dai tropici. *Erboristeria Domani* No. 284 (Sept.): 48-59.
- Pinto, A. A., M. C. F. Coelho, M. T. Souza Jr. and M. P. Guerra. 2002. Expressão transiente do gene *gus*, sob regulação de quatro promotores, em diferentes tecidos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) e videira (*Vitis* sp.). *Rev. Brasil. Frutic.* 24: 787-789.
- Prance, G. T. 1984. The pejibaye, *Guilielma gasipaes* (H. B. K.) Bailey and the papaya, *Carica papaya* L. Pp. 85-104 in D. Stone, ed., *Pre-Columbian Plant Migration*. Papers Peabody Museum 76. PROSEA (Plant Resources of South-East Asia). 1991. *Carica papaya* L. in E. W. M. Verheij and R. E. Coronel, eds., *PROSEA Handbook 2: Edible Fruits and Nuts*. Pudoc-DLO, Wageningen, The Netherlands. <http://www.agralin.nl/prosrom>
- Purcifull, D. E., J. R. Edwardson, E. Hiebert and D. Gonsalves; & R. S. Greber. 1986. Watermelon mosaic virus 1. ICTV Database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm>
- Purohit, A. G. 1980. Effect of supplementary pollination on seed production in gynodioecious papaya var. Coorg Honey Dew. *Progressive Hort.* 11: 63-66.
- Purseglove, J. W. 1968. *Tropical Crops: Dicotyledons*, Vol. I. Longman, London, U. K.
- Queensland Department of Primary Industries and Fisheries. 2003. Papaya ringspot control. <http://www.dpi.qld.gov.au/health/4188.html>.
- Quenum, B. M. 2001. Business Opportunities in Africa. Freeze-dried papain production plant. *Africabiz* 1 (20): December 15, 2000-January 14, 2001. <http://businessafrica.net/africabiz/arcvol1/is20front.php>.
- Ram, M. 1996 [1995]. Papaya seed production under controlled pollination and isolation. *Seed Res.* (New Delhi) 23: 98-101.
- Ram, M., and P. K. Majumdar. 1981. Dwarf mutant of papaya (*Carica papaya* L.) induced by gamma rays. *J. Nuclear Agric. & Biol.* 10 (3): 72-74.

- Ram, M. , and P. K. Majumdar. 1990. Cost of seed production in gynodioecious and dioecious papaya under controlled conditions. *Seed Res.* (New Delhi) 18: 117-120.
- Randall, R. P. 2002. *A Global Compendium of Weeds.* R. G. and F. J. Richardson, Meredith, Victoria, Australia. 905 pp.
- Rao, P. S. N. 1993. On branching in *Carica papaya* L. (Caricaceae). *J. Bombay Nat. Hist. Soc.* 90: 123.
- Rimberia, F. K. , H. Sunagawa, N. Urasaki, Y. Ishimine and S. Adaniya. 2005. Embryo induction via anther culture in papaya and sex analysis of the derived plantlets. *Scientia Hort.* 103: 199-208.
- Robinet, O. , V. Bretagnolle and M. Clout. 2003. Activity patterns, habitat use, foraging behaviour and food selection of the Ouvéa Parakeet (*Eunymphicus cornutus uvaeensis*). *Emu* 103: 71-80.
- Rodman, J. E. , P. S. Soltis, D. E. Soltis, K. J. Sytsma and K. G. Karol. 1998. Parallel evolution of glucosinolate biosynthesis inferred from congruent nuclear and plastid gene phylogenies. *Amer. J. Bot.* 85: 997-1006.
- Rodríguez Pastor, M. C. , V. Galán Saúco and M. Herrero Romero. 1990. Evaluation of papaya autogamy. *Fruits* 45: 387-391.
- Rojas, T. Y. , R. R. Ramos and R. C. Salazar. 1985. Posible relación del sexo con algunas características morfológicas y agronómicas de la papaya, *Carica papaya*. *Acta Agronómica* 35: 20-33.
- Ronse Decraene, L. P. , and E. F. Smets. 1999. The floral development and anatomy of *Carica papaya* (Caricaceae). *Canad. J. Bot.* 77: 582-598.
- Roth, I. , and I. Clausnitzer. 1972. Desarrollo y anatomía del fruto y de la semilla de *Carica papaya* L. (lechosa). *Acta Bot. Venez.* 7: 187-206.
- Sajise, A. G. C. , S. V. Siar and J. B. Sangalang. 2004. Cross compatibility of elite papaya inbred lines to an intergeneric hybrid of *Carica papaya* L. × *Vasconcellea quercifolia* (Saint-Hil.) Hieron. 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia, September 2004. [www. cropscience. org. au](http://www.cropscience.org.au)
- Sakai, A. K. , and S. G. Weller. 1999. Gender and sexual dimorphism in flowering plants: A review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates and phylogenetic approaches. pp. 1-31 in M. S. Geber, T. E. Dawson and L. F. Delph, eds. , *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants.* Springer-Verlag, Berlin.
- Sánchez-Sánchez, O. , and G. A. Islebe. 1999. Hurricane Gilbert and structural changes in a tropical forest in south-eastern Mexico. *Global Ecol. & Biogeogr.* 8: 29-38.
- Santos, S. C. , C. Ruggiero, C. L. S. P. Silva and E. G. M. Lemos. 2003. A microsatellite library for *Carica papaya* L. cv. Sunrise Solo. *Rev. Brasil. Frutic.* 25: 263-267.
- Satrija, F. , P. Nansen, S. Murtini and S. He. 1995. Anthelmintic activity of papaya latex against patent *Heligmosomoides polygyrus* infections in mice. *J. Ethnopharmacol.* 48: 161-164.
- Sauer, C. O. 1966. *The Early Spanish Main.* University of California Press, Berkeley. 306 pp.
- Saxena, S. , V. Hallan, B. P. Singh and P. V. Sane. 1998. Nucleotide sequence and intergeminal homologies of the DNA-A of papaya leaf curl geminivirus from India. *Biochem. Molec. Biol. Intl.* 45: 101-113.
- Scheldeman, X. , and P. Van Damme. 2001. *Vasconcella.* Laboratory of Tropical and Subtropical Agriculture and Ethnobotany, Ghent University. <http://allserv.rug.ac.be/~xschelde/vasconcella1.htm>.
- Schroeder, C. A. 1958. The origin, spread and improvement of the avocado, sapodilla and papaya. *Indian J. Hort.* 15: 116-128.

- Schroth, G. , J. Lehmann, M. R. L. Rodrigues, E. Barros and J. L. V. Macêdo. 2001. Plant-soil interactions in multistrata agroforestry in the humid tropics. *Agroforestry Systems* 53: 85-102.
- Seaver, A. L. 2000. Crop profile for papaya in Northern Mariana Islands. Centre for Integrated Pest Management, North Carolina State University.
<http://ipmwww.ncsu.edu/cipm/cropprofiles/docs/mppapaya.html>.
- Seigler, D. S. , G. F. Pauli, A. Nahrstedt and R. Leen. 2002. Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*. *Phytochemistry* 60: 873-882.
- Setyobudi, L. , and S. Purnomo. 1999. Papaya research and development in Indonesia. In R. A. Hautea, Y. K. Chan, S. Attathom and A. F. Krattiger, eds. , *The Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia: Biosafety Considerations and Papaya Background Information*. ISAAA Briefs No. 11. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, New York.
- Sharma, A. , and P. Bajpai. 1969. Studies on floral biology of papaya (*C. papaya* L.). *Indian J. Soc. Hort. Sci.* 3: 9-18.
- Sharma, B. M. , and P. Singh. 1975. Diagnostic characters of seeds of *Carica papaya* L. - an adulterant of black pepper of commerce. *Quart. J. Crude Drug Res.* 13: 69-76.
- Shetty, M. H. 1953. The culture of papaya, *Carica papaya*. *South Indian Hort.* 1: 35-46.
- Shoji, K. , M. Nakamura and M. Matsumura. 1958. Growth and yield of papaya in relation to fertiliser applications. *Hawaii Agric. Expt. Stat. Progress Notes* 118.
- Siar, S. V. , S. B. Geronimo, Z. Sierra and V. N. Villegas. 1998. Cytology of *Carica papaya*, *C. cauliflora* and their F₁ interspecific hybrids. *Philippine J. Crop Sci.* 23: 91-96.
- Silva, A. M. R. , E. W. Kitajima, M. V. Sousa and R. O. Resend. 1997. Papaya lethal yellowing virus: A possible member of the *Tombusvirus* genus. *Fitopatologia Brasil.* 22: 529-534.
- Simpson, G. G. 1969. South American mammals. pp. 879-909 in E. J. Fittkau, J. Illies, H. Klinge, G. H. Schwabe and H. Sioli, eds. , *Biogeography and Ecology in South America*, Vol. 2. Dr. W. Junk, Publishers, The Hague.
- Simpson, G. G. 1980. *Splendid Isolation: The Curious History of South American Mammals*. Yale University Press, New Haven and London. 266 pp.
- Singh, A. K. , and G. Singh. 1998. Effect of time of planting on growth, fruiting behaviour and sex relations of papaya (*Carica papaya*). *Indian J. Agric. Sci.* 68: 769-772.
- Singh, I. D. 1990. *Papaya*. Oxford and IBH Publishing, New Delhi. 224 pp.
- Singh, I. P. , and C. K. Sharma. 1997 [1995]. Effect of pollen viability of different papaya varieties under agro-climatic condition of Tripura. *Indian J. Hill Farm.* 8: 88-90.
- Singh, R. N. , P. K. Majumdar and D. K. Sharma. 1963. Seasonal variation in the sex expression of papaya (*Carica papaya* L.). *Indian J. Agric. Sci.* 33: 261-267.
- Sippel, A. D. , and L. C. Holtzhausen. 1992. Microsporogenesis in the hermaphrodite 'Sunrise Solo' papaya (*Carica papaya* L.). *J. Southern African Soc. Hort. Sci.* 2: 89-91.
- Sippel, A. D. , N. J. F. Claassens and L. C. Holtzhausen. 1989. Floral differentiation and development in *Carica papaya* cultivar Sunrise Solo. *Scientia Hort.* 40: 23-33.
- Sondur, S. N. , R. M. Manshardt and J. I. Stiles. 1995. Genetics of growth rate and flowering time in papaya (*Carica papaya* L.). *J. Quantitative Trait Loci* 1: article 4 [now *J. Agric. Genomics*].
<http://www.cabi-publishing.org/gateways/jag/papers95/paper495/indexp495.html>.
- Sondur, S. N. , R. M. Manshardt and J. I. Stiles. 1996. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 93: 547-553.

- Soto-Mera, M. T., M. R. López-Rico, J. F. Filgueira, E. Villamil and R. Cidrás. 2000. Occupational allergy to papain. *Allergy* 55: 983-984.
- Space, J. C., B. Waterhouse, J. S. Denslow and D. Nelson. 2000. Invasive Plant Species on Rota, Commonwealth of the Northern Mariana Islands. USDA Forest Service, Pacific Southwest Research Station, Institute of Pacific Islands Forestry, Honolulu. 31 pp. Pacific Island Ecosystems at Risk (PIER), <http://www.hear.org/pier/rreport.htm#native>
- Stambaugh, S. U. 1939. The Papaya: A Fruit Suitable for South Florida. Florida Department of Agriculture Bulletin, New Series No. 90. 60 pp.
- Stiles, J. I., C. Lemme, S. Sondur, M. B. Morshidi and R. Manshardt. 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating relationships among papaya cultivars. *Theor. Appl. Genetics* 85: 697-701.
- Storey, W. B. 1938. Segregation of sex types in 'Solo' papaya and their application to the selection of seed. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 35: 83-85.
- Storey, W. B. 1941. The botany and sex relationship of the papaya. Pp. 5-22 in *Papaya Production in the Hawaiian Islands*. Hawaii Agric. Expt. Sta. Bull. No. 87.
- Storey, W. B. 1953. Genetics of the papaya. *J. Heredity* 44: 70-78.
- Storey, W. B. 1958. Modification of sex expression in papaya. *Hort. Adv.* 2: 49-60.
- Storey, W. B. 1967. Theory of the derivations of unisexual flowers of Caricaceae. *Agron. Trop.* 17: 273-321.
- Storey, W. B. 1969. Papaya. Pp. 389-407 in F. D. Ferwerda and F. Wit, eds., *Outlines of Perennial Crop Breeding in the Tropics*. Misc. Papers 4, Landbouwhogeschool, Wageningen, The Netherlands.
- Storey, W. B. 1976. Papaya, *Carica papaya*. Pp. 21-24 in N. W. Simmonds, ed., *Evolution of Crop Plants*. Longman, London, U. K.
- Storey, W. B. 1987. Papaya. Pp. 374-392 in F. D. Ferwerda and F. Wit, eds., *Genotecnia de Cultivos Tropicales Perennes*. A. G. T. Editora, Mexico.
- Story, R. 2001. Year 2001 papaya seed selections. Aloha Seed and Herb Co., Paia, Hawaii, USA. <http://www.alohaseed.com/papaya>.
- Subhadrabandhu, S., and C. Nontaswatsri. 1997. Combining ability analysis of some characters of introduced and local papaya cultivars. *Scientia Hort.* 71: 203-212.
- Subramanyam, M. D., and C. P. A. Iyer. 1984. Exploitation of heterosis in papaya. *Indian J. Hort.* 41: 40-46.
- Subramanyam, M. D., and C. P. A. Iyer. 1986. Flowering behaviour and floral biology in different species of *Carica* L. genus. *Haryana J. Hort. Sci.* 15: 179-187.
- Tchamba, M. N., and P. M. Seme. 1993. Diet and feeding behavior of the forest elephant in the Santchou Reserve, Cameroon. *African J. Ecol.* 31: 165-171.
- Teng, Y. T., and Y. L. Hor. 1976. Storage of tropical fruit seeds. Pp. 135-146 in H. F. Chin, I. C. Enoch and R. M. Raja Harun, eds., *Seed Technology in the Tropics*. Universiti Pertanian Malaysia, Serdang.
- Tennant, P. F., C. Gonsalves, K. -S. Ling, M. M. Fitch, R. M. Manshardt, J. L. Slightom and D. Gonsalves. 1994. Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. *Phytopathology* 84: 1359-1366.
- Tennant, P. F., G. Fermin, M. M. Fitch, R. M. Manshardt, J. L. Slightom and D. Gonsalves. 2001. Papaya ringspot virus resistance of transgenic Rainbow and SunUp is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. *European J. Plant Pathol.* 107: 645-653.

- Tennant, P. F., M. H. Ahmad and D. Gonsalves. 2002. Transformation of *Carica papaya* L. with virus coat protein genes for studies on resistance to papaya ringspot virus from Jamaica. *Trop Agric. (Trinidad)* 79: 105-113.
- Terra de Almeida, F., C. S. Marinho, E. Fernandes de Sousa and S. Grippa. 2003a. Expressão sexual do mamoeiro sob diferentes laminas de irrigação na região Norte Fluminense. *Rev. Brasil. Frutic.* 25: 383-385.
- Terra de Almeida, F., S. Bernardo, E. Fernandes de Sousa, S. L. D. Marin and S. Grippa. 2003b. Growth and yield of papaya under irrigation. *Scientia Agricola* 60: 419-424.
- To, S., and C. Kyu. 1934. Amebecidal activity of alkaloids. *J. Med. Sci.* 8: 52-54.
- Trindade, A. V., J. O. Siqueira and F. Pinto de Almeida. 2001. Dependência micorrizica de variedades comerciais de mamoeiro. *Pesq. Agropec. Brasil.* 36: 1485-1494.
- Tripathi, S., H. -J. Bau, L. -F. Chen and S. -D. Yeh. 2004. The ability of papaya ringspot virus strains overcoming the transgenic resistance of papaya conferred by the coat protein gene is not correlated with higher degrees of sequence divergence from the transgene. *European J. Plant Pathol.* 110: 871-882.
- Tseng, M. T. 1992. Effects of sarcotesta removal, gibberellic acid and drying treatments on the germination of papaya seeds. *J. Agric. Assoc. China, New Series* 158: 46-54.
- Urasaki, N., M. Tokumoto, K. Tarora, Y. Ban, T. Kayano, H. Tanaka, H. Oku, I. Chinen and R. Terauchi. 2002a. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104: 281-285.
- Urasaki, N., K. Tarora, T. Uehara, I. Chinen, R. Terauchi and M. Tokumoto. 2002b. Rapid and highly reliable sex-diagnostic PCR assay for papaya (*Carica papaya* L.). *Breed. Sci.* 52: 333-335.
- USDA. 2001. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 17. Papayas, raw; Measure 3 (whole papaya, edible portion). <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/SR17/reports/sr17fg09.pdf>.
- USDA-APHIS. 1997. USDA-APHIS response to Cornell University and the University of Hawaii petition 96-051 01p for a determination of nonregulated status for 'Sunset' papaya lines 55-1 and 63-1. Information Systems for Biotechnology. <http://www.nbiap.vt.edu/>.
- Vahidy, A. A., and A. Nafees. 1973. Temperature, pH and genotype interactions affecting pollen germination and tube growth in *Carica papaya* L. *Pakistan J. Bot.* 5: 159-163.
- Van Droogenbroeck, B., P. Breyne, P. Goetghebeur, E. Romeijn-Peeters, T. Kydnt and G. Gheysen. 2002. AFLP analysis of the genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. *Theor. Appl. Genet.* 105: 289-297.
- Van Droogenbroeck, B., T. Kydnt, I. Maertens, E. Romeijn-Peeters, X. Scheldeman, J. P. Romero-Motochi, P. Van Damme, P. Goetghebeur and G. Gheysen. 2004. Phylogenetic analysis of the highland papayas (*Vasconcellea*) and allied genera (Caricaceae) using PCR-RFLP. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1473-1486.
- Vázquez-Yanes, C., and A. Orozco-Segovia. 1996. Comparative longevity of seeds of five tropical rain forest woody species stored under different moisture conditions. *Canad. J. Bot.* 74: 1635-1639.
- Vegas, A., G. Trujillo, Y. Sandra and J. Mata. 2003. Obtención, regeneración y evaluación de híbridos intergenéricos entre *Carica papaya* y *Vasconcellea cauliflora*. *Interciencia* 28: 710-714.
- Vierheilig, H., R. Bennett, G. Kiddle, M. Kaldorf and J. Ludwig-Müller. 2000. Differences in glucosinolate patterns and arbuscular mycorrhizal status of glucosinolate-containing plant species. *New Phytol.* 146: 343-352.

- Villarreal, L. , C. Dhuique-Mayer, M. Dornier, J. Ruales and M. Reynes. 2003. Évaluation de l'intérêt du babaco (*Carica pentagona* Heilb.). Fruits 58: 39-52.
- Villegas, V. N. 1999. Status of the papaya industry and papaya R&D in the Philippines. In R. A. Hautea, Y. K. Chan, S. Attathom and A. F. Krattiger, eds. , The Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia: Biosafety Considerations and Papaya Background Information. ISAAA Briefs No. 11. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, New York.
- Villegas, V. N. , R. B. Pimentel and E. R. Barile. 1996. Development of ringspot virus tolerant papaya (*Carica papaya* L.) varieties. Vol. 1, Pp. 117-120 in S. Vijaysegaran, M. Pauziah, M. S. Mohamed and S. Ahmad Tarmizi, eds. , Proceedings of the International Conference on Tropical Fruits, 23-26 July 1996. Kuala Lumpur, Malaysia. Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI), Serdang.
- Viskot, B. , and R. Hobza. 2004. Gender in plants: Sex chromosomes are emerging from the fog. Trends in Genetics 20: 431-438.
- Wagner, W. L. , D. R. Herbst and S. H. Sohmer. 1999. Manual of the Flowering Plants of Hawaii 'i, Rev. Ed. University of Hawaii Press and Bishop Museum Press, Honolulu. 1919 pp.
- Wall, E. M. , T. S. Lawrence, M. J. Green and M. E. Rott. 2004. Detection and identification of transgenic virus resistant papaya and squash by multiplex PCR. Eur. Food Res. Technol. 219: 90-96.
- Watson, B. 1997. Agronomy/Agroclimatology notes for the production of papaya. Soil and Crop Evaluation Project. Ministry of Agriculture, Forests, Fisheries and Meterology, Australia.
- Webb, R. R. 1985. Epidemiology and control of bacterial canker of papaya caused by an *Erwinia* sp. on St. Croix, U. S. Virgin Islands. Plant Disease 69: 305-309.
- Webster, M. S. 1997. Extreme sexual size dimorphism, sexual selection, and the foraging ecology of *Montezuma oropendolas*. The Auk 114: 570-580.
- Wehncke, E. V. , S. P. Hubbell, R. B. Foster and J. W. Dalling. 2003. Seed dispersal patterns produced by white-faced monkeys: Implications for the dispersal limitation of neotropical tree species. J. Ecol. 91: 677-685.
- Wettstein, R. , M. Hirmer, K. Süssenguth and F. Wettstein. 1944. Tratado de Botánica Sistemática, 4th Ed. Editorial Labor, Barcelona. 1039 pp.
- Whitmore, T. C. 1978. Caricaceae. Page 105 in V. H. Heywood, ed. , Flowering Plants of the World. Mayflower Books, New York.
- Wiersema, J. H. , and B. León. 1999. World Economic Plants: A Standard Reference. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Wiggins, I. L. , and D. M. Porter. 1971. Flora of the Galápagos Islands. Stanford University Press, Stanford, California. 998 pp.
- Wiser, S. K. , D. R. Drake, L. E. Burrows and W. R. Sykes. 2002. The potential for long-term persistence of forest fragments on Tongatapu, a large island in western Polynesia. J. Biogeogr. 29: 767-787.
- Wood, C. B. , H. W. Pritchard and D. Amritphale. 2000. Desiccation-induced dormancy in papaya (*Carica papaya* L) seeds is alleviated by heat shock. Seed Sci. Res. 10: 135-145.
- The Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia- Workshop participants. 1999. In R. A. Hautea, Y. K. Chan, S. Attathom and A. F. Krattiger, eds. , The Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia: Biosafety Considerations and Papaya Background Information. ISAAA Briefs No. 11. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, New York.
- Yahiro, M. 1979. Effect of seed pre-treatments on the promotion of germination in papaya, *Carica papaya*

- ya L. Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ. 15: 49-54.
- Yahiro, M., and Y. Hayashi. 1982. Growth-inhibitors in papaya (*Carica papaya* L.) seeds - Growthinhibitors and promoters in papaya seeds pre-treated at 15°C. Japan. J. Trop. Agric. 26: 63-67.
- Yamanishi, O. K., E. Campostrini, S. L. D. Marin and L. A. P. Martelleto. 1998. Influence of root restriction on the growth of four papaya (*Carica papaya* L.) genotypes. Acta Hort. 516: 155-162.
- Yamashita, N., N. Tanaka, Y. Hoshi, H. Kushima and K. Kamo. 2003. Seed and seedling demography of invasive and native trees of subtropical Pacific islands. J. Vegetation Sci. 14: 15 - 24.
- Yeh, S. D. 1990. Control of ringspot disease by induced mild virus. Acta Hort. 275: 753-760.
- Ying, Z., X. Yu and M. J. Davis. 1999. New method for obtaining transgenic papaya plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. Proc. Fla. State Hort. Soc. 112: 201-205.
- Younge, O. R., and D. L. Plucknett. 1981. Papaya fruit yield and quality as influenced by crop rotation, cover cropping, liming and soil fumigation in Hawaii. Hawaii Agric. Expt. Sta. Res. Bull. No. 155.
- Zeng, Y., B. -R. Ji and B. Yu. 1994. Laticifer ultrastructural and immunocytochemical studies of papain in *Carica papaya*. Acta Bot. Sinica 36: 497-501 + 2 plates.
- Zettler, F. W., and S. H. Wan. 1993. Papaya Necrosis Virus. Crop Knowledge Master. University of Hawaii Extension, CTAHR. <http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/papnecr.htm>
- Zhang, G. -L., P. Zhou, A. -P. Guo, W. -T. Shen and X. -Y. Li. 2003. An initial study of transgenic *Carica papaya* used as a kind of vaccine for anti-tuberculosis. Acta Bot. Yunnanica 25: 223-229.
- Zhu, Y. J., R. Agbayani and P. H. Moore. 2004. Green fluorescent protein as a visual selection marker for papaya (*Carica papaya* L.) transformation. Plant Cell Rep. 22: 660-667.
- Zimmerman, T. W., and J. A. Kowalski. 2004. Breeding and selection for early bearing papayas. Acta Hort. 632: 53-55.

第七章



杨属 *Populus* L. (杨树) 生物学特性的共识文件*

第一节 林业概况

据估计，分布于世界各地的杨树栽培树种中，超过 90% 集中于黑杨派 (*Aigeiros*) 及其杂交种 (Thielges 1985)。这是由于黑杨派树种中易于进行派内杂交，而且还能与青杨派 (*Tacamahaca*) 树种进行派间杂交，这些树种和杂交种在温带和亚热带地区具有广泛的适应性、且易于进行无性繁殖。胡杨派 (*Turanga*) 的重要性在不断增加，表现在其造林计划规模巨大：在中国北方沙漠边界的三北防护林系统 (Three North Shelterbelt System) 的种植规模为 3 560 万公顷，而其中杨树占 60%，且很大部分是胡杨 (*P. euphratica*) 及小叶杨 (*Populus simonii*) × 欧洲黑杨 (*P. nigra*) 的杂交种 (Weisberger et al, 1995; Wang, 1996)。

1. 造林材料的利用 (deployment)

尽管在加拿大没有用白杨派 (*Populus*) 树种来进行大规模造林，但对于白杨派中难以生根的树种，实施幼苗繁殖是最常用的繁殖方式 (PCC, 1996b)。在实践中，主要是通过人工杂交，再应用标准的温室繁殖技术进行种子繁殖 (Burr, 1986; Stanton and Villar, 1996)。

通常情况下，青杨派和黑杨派树种的扦插容易生根，而白杨派、大叶杨派 *Leucoides* 和胡杨派树种的生根能力则很差 (Zsuffa, 1975)。相比于生根能力极高的欧洲黑杨和香脂杨 (*P. balsamifera*)，美洲黑杨 (*P. deltoides*) 的生根能力相差较大。欧洲黑杨和香脂杨良好的生根能力可通过杂交方式传递给与美洲黑杨的杂交后代 (Zsuffa et al, 1993)。运用于幼苗栽培的无性繁殖技术可分成两组：一组为自体营养繁殖 (autovegetative propagation)，包括插条法、压条法等；另一组为异体营养繁殖 (heterovegetative propagation)，包括嫁接、芽接等 (Fröhlich and van der Meiden, 1979)。

对于容易生根的品种而言，通常在休眠季节自苗床中挑选一年生幼株上截取茎段 (stem cuttings)。但有时也从老树的嫩枝条上取。这类品种经常作为无根插条或带根种条直接扦插或栽种在经过精细翻整过的种植地上。对于较难生根的品种而言，通常应当使用更为强化的生根技术，如采用嫩枝插条 (greenwood material)、促生根激素和保湿生长箱技术 (mist chamber techniques)。白杨派中的树种不易进行茎段繁殖因而通常利用根蘖、

* Originally published by the OECD in English under the title: "Consensus Document on the Biology of *Populus* L. (Poplars)" ©2000 OECD. All rights reserved.

根段和根压条而繁殖 (Benson and Schwalbach, 1970; Zsuffa, 1971; Dirr and Heuser, 1987; Hall et al, 1989)。

对于难以生根的品种可利用嫁接和芽殖法实现繁殖, 一些树种的嫁接组合表明其存在组间的亲和性, 例如, 欧洲山杨 (*P. tremula*) 可以嫁接到毛果杨 (*P. trichocarpa*) 上 (Dirr and Heuser, 1987), 银白杨 (*P. alba*) × 银灰杨 (*P. canescens*) 杂种可以嫁接到大叶杨 (*P. lasiocarpa*) 上 (Fröhlich and van der Meiden, 1979): 嫁接作为繁殖技术最为广泛的应用是在中国, 茎段生根能力差的毛白杨 (银白杨 × 响叶杨杂交种), 通常嫁接到小叶杨或其杂交种上。如果将嫁接植株的嫁接部位埋于土表以下, 接穗部分也可以生根 (Zsuffa et al, 1996)。

杨树也可利用外植体通过多种组织培养方法进行繁殖。难于生根的白杨派树种已成功通过侧枝组培实现离体繁殖。在其他的一些品种如加杨 (*P. × canadensis*) (美洲黑杨 × 欧洲黑杨杂交种) 和滇杨 (*P. yunnanensis*) 的栽培种则通过休眠芽成功地进行组培繁殖 (Fröhlich and Weisgerber, 1985; Ahuja, 1987)。离体培养技术为白杨派树种及其杂交种营养繁殖提供了最佳方案 (Fröhlich and Weisgerber, 1985; Ahuja, 1987)。体细胞胚胎诱导技术已成功用于银白杨 × 大齿杨 (*P. grandidentata*) 杂交种的繁殖 (Michler and Bauer, 1991)。

尽管杂种基因型在自交时常不可避免地会出现高频率的败育胚和胚胎, 滞育胚培养 (也称胚胎拯救) 技术可提高杂交基因型的恢复率。此技术可以直接培养授粉后几周的单个胚胎或整个胚珠 (Kouider et al, 1984; Savka et al, 1987), 后续的技术发展还能实现通过半胚囊或单个心皮来诱导胚, 然后继代培养的胚胎 (Raquin et al, 1993)。

杨树不仅是种植园树种来源, 而且还是防护林的重要树种 (特别是作为北美平原上的防风林), 也可以用作其他景观树种。人工林可营造为无性系纯林 (monoclonal stands)、多无性系区组混合林 (mosaics of monoclonal blocks)、以行为单位的多无性系混合林 (clonal rows) 或完全混合林 (Zsuffa, 1993)。

尽管目前加拿大没有监管和认证苗木种植的法律, 但是加拿大杨树委员会 (Poplar Council of Canada) 已经设计并提供相关的认证服务。该服务机构提供如下认证服务: ①品种 (无性系) 的认定; ②质量和类别; ③检疫状况。此外, 该机构持有加拿大不推荐种植的杨树无性系和变种的名录 (Zsuffa, 1993; PCC, 1996a)。在欧洲, 已做登记商业化的 130 个栽培种, 在 1966 年与 1993 年间仅可在欧盟国家销售, 1993 年随着单一市场的开放, 这些栽培种才开始了任意流通 (Pinon and Valadon, 1997)。在德国, 杨属树种的繁殖材料受 Gesetz über forstliches Saat-und Pflanzgut (FSaatG) 的约束。

2. 种源转移

种源在形态、生长和材性上存在较大地理变异, 但是迄今为止的结果表明, 种源利润可能经历了“从可喜到低迷再到萧条” (vary from encouraging to confusing to bleak) 的过程 (Farmer, 1996)。对杨属多个物种进行的少量研究表明, 通过起源地的转移的确可实现产量的提高 (如 Nelson and Tauer, 1987), 但是对杂交育种和无性系选择工作的关注将起源地转移排除在改良措施之外。

3. 育种计划

杨树的育种主要有 2 个物种主要特征：同域及引入物种可种间杂交和无性系选择 (Bisoffi and Gullberg, 1996)。在 20 世纪初，此事拉开了育种计划的序幕，更多推测认为决定杂种优势的所选无性系的表现是 F1 代杂种优势的基础。不过，近来的研究表明杂种优势 (hybrid vigor) 的确存在 (Stettler et al, 1988, Bradshaw and Stettler, 1995)。将无性系选择作为杨树育种的一个特征而纳入到育种计划中，主要是由于其营养繁殖与有性杂交相比更为容易 (Mohrdiek, 1983; Thielges, 1985)。

20 世纪 30 年代生长快速的三倍体杨树的发现 (Einspahr et al, 1963, Einspahr and Winton, 1976) 使多倍体育种受到了关注，但关注度到 20 世纪 70 年代则大幅度下降，但一些分子遗传研究例外 (Bradshaw and Stettler, 1993)。在加拿大西部和位于五大湖区的州内重新燃起了对杨树育种的兴趣，其主要侧重于美洲山杨 (*P. tremuloides*) 和欧洲山杨杂交种的杂种优势、其次才是无性系选择和应用 (Li and Wyckoff, 1991; Li et al, 1993; Li, 1995)。

在欧洲 (意大利、法国、比利时、荷兰) 的重大长期育种计划已经有很长历史了。最近，大学与纸浆业 (pulp industries) 的合作引发了北美的太平洋东北地区 (Pacific Northwest region of North America) 对培育毛果杨×美洲黑杨的杂交种培育的高度关注，相较而言毛果杨×辽杨 (*P. maximowiczii*)、毛果杨×欧洲黑杨、美洲黑杨×欧洲黑杨杂交种的培育关注程度则较轻 (Stettler et al, 1996b; Zsuffa et al, 1996)。在德国的巴伐利亚，已经进行了辽杨×毛果杨以及辽杨×欧洲黑杨的杂交。集约化管理和短期轮作 (5~8 年) 主要实施面向于纸浆林的管理。作为本项目的一部分，在美国俄勒冈州和加拿大不列颠哥伦比亚省之间的地带有 30 000 公顷的人工林正在营造中 (Zsuffa et al, 1996)。

由于现代分子生物学技术在杨属中得到成功运用，因此可以预计，更多的新性状 (如除草剂抗性、抗虫性和改良的木材性质) 将会被引导到这些树种中。

4. 遗传资源的保护

杨树育种和集约化种植已经有 70 年的历史了。国际杨树委员会 (International Poplar Commission, IPC) 成立于 1947 年，皆在指导和协调杨树的育种和栽培，并促进 35 个成员 (IPC, 1996) 间种质的保存和交换。1992 年，国际杨树委员会正式要求其成员“采用合适的措施来保证自然林地中以及人工林地中杨树和柳树的现有遗传资源得到正确的保护，强调速生树种有利于减轻全球自然环境压力并缓解自然资源濒危的状况” (IPC, 1992)。

一些杨属树种在其部分自然分布内正濒临灭绝的边缘，例如欧洲西部的欧洲黑杨，而其他物种却处于全面进化阶段，例如美洲黑杨。对此国际杨树委员会积极鼓励建立就地保护策略。在联合国粮农组织协调的 3 个杨树项目中，中国北方开展了小叶杨树的异地保护工作，欧洲 EUFORCEN 网络开展了欧洲黑杨树保护工作。就广泛分布的树种如美洲黑杨而言，就地保护工作的重点应放在分布区边缘的小隔离种群上，将其作为适应性变异的来源。一旦广泛分布，则人为干预对自然更新的破坏，将使欧洲黑杨许多原始遗传资源丢失，一旦进行广泛种植，由于自然更替掺入了人为因素中欧洲地区欧洲黑杨的消失很可能是由于杂交种 (特别是加拿大杨×欧洲黑杨的杂交种) 的回交

造成的。

其他一些杨树树种有特定的自然分布范围，需要特殊保护。在北海道山脉的不同海拔，甜杨 (*P. suaveolens*, 亦称辽杨) 在自然保护区中得到很好的保护，可在这些地区由种子天然再生。异叶杨 (*P. heterophylla*) 是另一种只在特定范围分布的树种，其生长的土壤对于美洲黑杨而言过于湿润。这些树种需要采用特别的策略对其进行就地保护。(Steenackers, 1996)。

尽管已有长期的驯化历史，但异地保护工作极为有限且很少涉及种子材料。但一个明显的例外是 20 世纪 70 年代由荷兰人建立的毛果杨种子库。鉴于对杨树遗传资源的全球化管理和保护指南的需要，IPC 需要推动易地保护工作的开展。(Steenackers, 1996)。

第二节 分类和自然分布

杨树 (法语为 *peuplier*) 属于杨柳 (Salicales) 目杨柳科 (Salicaceae) 杨属 *Populus*。这一属通常还可再分成几个派。这些派别中，得到广泛认定的有 5 个：胡杨派 (*Turanga*)，大叶杨派 (*Leucoides*)，黑杨派 (*Aigeiros*)，青杨派 (*Tacamahaca*) 和白杨派 (*Populus*) (亦名 *Leuce*) (Zsuffa, 1975)。不时，会有分类学家提出增加第 6 个派来解决分类方面的问题。例如，Browicz (1966) 建议单列查瓦杨派 (*Tsavo*) 以囊括非洲东部的树种河白杨 (*P. ilicifolia*) 入内。这一物种甚至未得到一些分类学家的认可，还有一些分类学家将其划分到胡杨派中。还有人建议单列缘毛杨派 (*Ciliata*)，将之前归于大叶杨派的缘毛杨纳入其中。并将缘毛杨 (*P. ciliate* Wall. Ex Royle) 归入该派中，这一物种之前归于大叶杨派中 (Khosla and Khurana, 1982)，但也有人建议将这一树种归入青杨派以纠正这一早期明显错误。有人还建议另设一个阿巴索杨派 (*Abaso*) 以包括墨杨 (*P. mexicana*)，这一物种之前归与黑杨派，但却与黑杨派中其他物种同源性很低。(Eckenwalder, 1996)。无疑关于杨树的派别的分类的争议仍将继续；加拿大有 3 个派别的杨树树种：白杨派、黑杨派和青杨派 (Krüssmann, 1985; Farrar, 1995)。

杨树分类的分歧没有缓和的迹象。杨树广泛的树种分布、频繁的渐渗杂交、长期的栽培历史和易行的营养繁殖，给杨树命名带来混淆。别名大量存在，杂交种和栽培品种常被命为种。(Zsuffa, 1975)。因此，这一属的物种数少可至 20 个，多可达 80 个，这是不同权威机构认定所造成的。Eckenwalder (1996) 最新发表了建议分为 29 种的文章，因此这一观点占据轻微时间优势。这一分类在表 7-1 中列出了，其中的别名是由 Zsuffa (1975) 鉴定的。DNA 的多态性为这一“传统”分类增添了新数据 (Cervera et al, 1997)。

胡杨派 *Turanga* Bge

这一派中的 3 个种是非洲东北部和亚洲的本地种。其中最重要的是胡杨 (*P. euphratica*)，尽管这一物种在过去并非普遍种植，但是其可抗贫瘠的土壤、极端高温和土壤盐碱的性状，使其成为中国北部东三省防护林项目中抗沙漠化的关键种 (Wang, 1996)。

大叶杨派 *Leucoides* Spach——大叶杨

这一派的树种都不是加拿大的本地种，异叶杨 (*P. heterophylla*) 是美国中部和东

部湿润地带的次要种。这一组的其他物种如大叶杨 (*P. lasiocarpa*) 和灰背杨 (*P. glauca*) 是中国温带地区的本地种。

青杨派 *Tacamahaca* Spach——香脂杨

这一派中亦可见于加拿大和美国的北美种有香脂杨——*peuplier baumier* (香脂杨), 黑色三角叶杨 - *peuplier de l' Ouest* (毛果杨), 和窄叶杨 - *peuplier à feuilles étroites* (窄叶杨, *P. angustifolia*)。这一派中包括了普遍种植的来自亚洲东部的小叶杨 - *peuplier de Simon* (小叶杨, *P. simonii*)。来自亚洲的其他重要的树种有苦杨 (*P. laurifolia*) 和甜杨 (*P. suaveolens*)。

表 7-1 杨属 *Populus* 树种的建议分类、命名和发现地 (Eckenwalder, 1996)、
括号中是早先分类中的别名 (Zsuffa, 1975)

派的学名 & 别名	通用名	发现地
阿巴索杨派 <i>Abaso</i> Ecken. 墨杨 <i>P. mexicana</i> Wesmael		墨西哥
胡杨派 <i>Turanga</i> Bge. 胡杨 <i>P. euphratica</i> Oliv.	幼发拉底杨 (Euphrates poplar), bah-an	西班牙、非洲东北部、亚洲
河白杨 <i>P. ilicifolia</i> (Engler)Rouleau		非洲东部
灰胡杨 <i>P. pruinosa</i> Schrenk		欧亚大陆东部
大叶杨派 <i>Leucoides</i> Spach 大叶杨 <i>P. lasiocarpa</i> Oliv.	大叶杨 (large-leaved poplars)	
灰背杨 <i>P. glauca</i> Haines	Chinese necklace poplar	中国
[<i>P. wilsonii</i> Schneid.] 椅杨/威氏杨		中国
异叶杨 <i>P. heterophylla</i> L.	异叶杨 (swamp cottonwood), swamp poplar	美国
青杨派 <i>Tacamahaca</i> Spach 窄叶杨 <i>P. angustifolia</i> James	balsam poplars narrowleaf cottonwood, narrowleaf	Sask. 和 Alberta 南部至美国西南部
香脂杨 <i>P. balsamifera</i> L.	balsam poplar	北美
缘毛杨 <i>P. ciliata</i> Royle		喜马拉雅山
苦杨 <i>P. laurifolia</i> Ledeb.	laurel poplar	亚洲东部
小叶杨 <i>P. simonii</i> Carr.	Simon poplar	亚洲东部
甜杨 <i>P. suaveolens</i> Fish.	doronoki, Japanese poplar	中国东北、日本
[青杨 <i>P. cathayana</i> Rehd., 香杨 <i>P. koreana</i> Rehd 辽杨 <i>P. maximowiczii</i> A. Henry] 川杨 <i>P. szechuanica</i> Schneid.		欧洲东部

(续)

派的学名 & 别名	通用名	发现地
毛果杨 <i>P. trichocarpa</i> Torr. & A. Gray 滇杨 <i>P. yunnanensis</i> Dode	black cottonwood, western balsam poplar	加拿大西部和美国 欧亚大陆东部
黑杨派 <i>Aigeiros</i> Duby	Cottonwoods and Black Poplars	
美洲黑杨 <i>P. deltoides</i> Marsh. [<i>P. sargentii</i> Dode, <i>P. wislizenii</i> Sarg.]	eastern cottonwood (ssp. <i>deltoides</i>), plains cottonwood (ssp. <i>monilifera</i>), Rio Grande cottonwood (ssp. <i>wislizenii</i>)	魁北克、安大略湖 大草原诸省至德克萨斯西南部 美国
弗里蒙特氏杨 <i>P. fremontii</i> S. Wats.	Fremont cottonwood	美国西南部
欧洲黑杨 <i>P. nigra</i> L.	black poplar, European black poplar	欧洲、亚洲西部
白杨派 <i>Populus</i> L. [Leuce Duby]	aspens	
响叶杨 <i>P. adenopoda</i> Maxim.		
银白杨 <i>P. alba</i> L.	白杨 (white poplar), 银白杨 (silver poplar)	欧洲中部和南部至非洲北部、亚洲中部
南亚杨 <i>P. gamblei</i> Haines		欧亚大陆东部
大齿杨 <i>P. grandidentata</i> Michx.	largetooth aspen, bigtooth aspen, aspen, poplar, popple	北美东部
<i>P. guzmanantlensis</i> Vasq. & Cue.		墨西哥
山白松 <i>P. monticola</i> Brand		墨西哥
日本山杨 <i>P. sieboldii</i> Miq.	Siebold aspen, Japanese aspen	日本
<i>P. simaroa</i> Rzed.		墨西哥
欧洲山杨 <i>P. tremula</i> L.	European aspen, tremble, Zitterpappel	欧洲、非洲北部。亚洲东北部
[<i>P. davidiana</i> (Dode) Schneid.]		
美洲山杨 <i>P. tremuloides</i> Michx.	trembling aspen, quaking aspen	北美

黑杨派 *Aigeiros* Duby——三角叶杨和黑杨

这一派包括“真正的”三角叶杨（这一词也与 *Tacamahaca* 有关）。在北美，这一派别的代表种为见于美国和加拿大的东方三角叶杨 - *peuplier deltoïde* (*P. deltoides* ssp. *deltoides*) 和平原三角叶杨 - *peuplier deltoïde de l' Ouest* (美洲黑杨, *P. deltoides* ssp. *monilifera*)、以及美国西南部的次要种弗里蒙特三角叶杨 (*P. fremontii*) 和里约格兰德杨 (Rio Grande cottonwood) (美洲黑杨, *P. deltoides* ssp. *wislizenii*)。黑杨 - *peuplier noir* (欧洲黑杨, *P. nigra*) 是非洲北部、欧洲中西部重要的本地种, 其栽培种 Lombardy 杨。-*peuplier noir d' Italie* (欧洲黑杨 *P. nigra* cv. 'Italica') 在北美作为耐寒性观赏植物而普遍种植。

白杨派 *Populus* L. (别名 *Leuce* Duby) ——山杨

本派可再分成两个亚派: 白杨亚派 *Albidae* 和山杨亚派 *Trepididae*, 分别包含白杨和

山杨。这一派的北美代表种是同属山杨亚派 *Trepididae* 的颤杨 - *peuplier faux-tremble* (美洲山杨, *P. tremuloides*) 和大齿白杨 - *peuplier à grandes dents* (大齿杨, *P. grandidentata*)。美洲山杨是欧洲重要的、高度变异的山杨, 而日本山杨 (*P. sieboldii*) 则是发现于日本的种。不过, 分布于亚欧大陆的山杨现在被认为是来源于单一且具有高度多态性的种, 即起源于欧洲的欧洲山杨 (Barnes and Han, 1993)。尽管白杨都不是北美的本地种, 但是欧洲白杨——*peuplier blanc* (银白杨, *P. alba*) 却是从欧洲引入的早期物种之一。

在北美和欧洲均发现, 同域杨树物种间, 以及本地种和引进种间都存在自然杂交的现象 (Schreiner, 1974; Demeritt, 1990)。虽然派间杂交偶有发生, 但自然杂交更多地发生在分布区有一定重叠的派内亲本之间 (Brayshaw, 1965; Eckenwalder, 1977)。不同派别的物种尽管分布区高度重叠, 但是彼此存在生态隔离, 因此自然杂交虽可在广泛的地理区域发生, 但仅限于极窄的生态重叠区内 (Eckenwalder 1984a)。当3个或更多物种的分布区重叠时, 可能会出现复杂的天然杂交种群 (Rood et al, 1986)。

美洲黑杨于18世纪晚期从加拿大东南部引入到法国。在德国南部, 自20世纪70年代后, 加杨 (*P. × canadensis*) 的杂交育种被毛果杨 × 美洲黑杨杂交或毛果杨 × 白杨杂交种与本地黑杨自然杂交产生的杂交种加杨 (1789年命名) 所代替 (Mühle Larsen, 1960; Wright, 1976)。这一杂交种的无性系现在在欧洲广泛种植。这一杂交种也是英国人 A. Henry 通过人工授粉而产生的第一个人工杨树杂交种 (Larsen, 1956)。在北美, 人工杂交自20世纪20年代和30年代后得以应用 (Stout and Schreiner, 1933; Heimburger 1936)。表7-2列出了在北美分布的较为重要的几个自然发生的杂交种, 及其别名和通用名。

第三节 起源中心/多样性中心

1. 自然分布

杨属 (*Populus*) 树种在北半球的温带和亚热带地区广泛分布。从阿拉斯加州和拉布拉多南部到墨西哥北部以及欧洲、非洲北部、喜马拉雅山、中国大陆和日本均可发现其代表树种 (Schreiner, 1974)。其中, 一些树种分布十分广泛, 如美洲山杨 *P. tremuloides* 是北美分布最广泛的物种, 横跨经度 110° 和纬度 47° , 是世界上第二大分布最广的树种 (Jones, 1985; Barnes and Han, 1993)。

2. 进化和迁移史

长期以来, 人们认为杨属是最古老的被子植物属, 在三叠纪时期起源于中国和日本; 而现在证实这些化石与其他分类群相关。尽管在大风子科 (Flacourtiaceae) 中亲缘关系最近的物种来自亚洲的亚热带地区, 但化石记录表明, 杨属 *Populus* 起源于大约 5 800 万年前的古新世晚期北美的热带地区 (Collinson, 1992)。这些早期的叶片化石与如今阿巴索杨派 (Abaso) 中的墨杨 (*P. mexicana*) 十分相似 (Eckenwalder, 1996)。在始新世晚期, 来自其他派的第一个欧亚近缘种出现, 胡杨派树种被限制于欧洲大陆以及大叶杨派的一个祖先种侵入温带生境。在渐新世时期, 出现了青杨派 (Tacamahaca) 和黑杨派 (Aigeiros) 的前身, 直至中新世时期它们才演变成明显的派别, 与此同时也出现了白杨

派 (Populus) 物种 (Collinson, 1992; Eckenwalder, 1996)。

表 7-2 自然界出现的 *Populus* 杂交种的命名

亲 本	杂交种命名	通用名
银白杨 <i>P. alba</i> × 大齿杨 <i>P. grandidentata</i>	<i>P. × roulwauiana</i> Boivin	
银白杨 <i>P. alba</i> × 响叶杨 <i>P. adenopoda</i>	<i>P. × tomentosa</i> Carr.	Chinese white poplar
银白杨 <i>P. alba</i> × 欧洲山杨 <i>P. tremula</i>	<i>P. × canescens</i> (Ait.) Sm.	grey poplar
银白杨 <i>P. alba</i> × 美洲山杨 <i>P. tremuloides</i>	<i>P. × heimbürgeri</i> Boivin	
窄叶杨 <i>P. angustifolia</i> × 美洲黑杨 <i>P. deltoides</i>	<i>P. × acuminata</i> Rydb. [syn. <i>P. × andrewsii</i> Sarg.]	Lanceleaf cottonwood, <i>peuplier à feuilles acuminées</i>
窄叶杨 <i>P. angustifolia</i> × 香脂杨 <i>P. balsamifera</i>	<i>P. × brayshawii</i> Boivin	Brayshaw's poplar, <i>peuplier hybride de Brayshaw</i>
窄叶杨 <i>P. angustifolia</i> × 美洲山杨 <i>P. tremuloides</i>	<i>P. × sennii</i> Boivin	
香脂杨 <i>P. balsamifera</i> × 美洲黑杨 <i>P. deltoides</i>	<i>P. × jackii</i> Sarg.	Jack's poplar, <i>peuplier hybride de Jack</i>
香脂杨 <i>P. balsamifera</i> × 美洲山杨 <i>P. tremuloides</i>	<i>P. × dutillyi</i> Lepage	
美洲黑杨 <i>P. deltoides</i> × 欧洲黑杨 <i>P. nigra</i>	<i>P. × canadensis</i> Moench cv. <i>Eugenei</i> [syn. <i>P. × euramericana</i> (Dode) Guinier]	Carolina poplar, <i>peuplier de Caroline</i> [syn. Canada poplar, Euramerican poplars]
美洲黑杨 <i>P. deltoides</i> × 美洲山杨 <i>P. tremuloides</i>	<i>P. × bernardii</i> Boivin	Bernard poplars
美洲黑杨 <i>P. deltoides</i> × 毛果杨 <i>P. trichocarpa</i>	<i>P. × generosa</i> Henry [syn. <i>P. × interamericana</i> Brockh.]	Interamerican poplars
<i>P. fremontii</i> × 毛果杨 <i>P. trichocarpa</i>	<i>P. × parryi</i> Sarg.	Parry cottonwood
大齿杨 <i>P. grandidentata</i> × 美洲山杨 <i>P. tremuloides</i>	<i>P. × smithii</i> Boivin	
苦杨 <i>P. laurifolia</i> × 欧洲黑杨 <i>P. nigra</i>	<i>P. × berlinensis</i> Dippel [异名 <i>P. × rasumowskyana</i> Schr., <i>P. × petrowskyana</i> Schr.]	Berlin poplars, Russian poplars
美洲黑杨 <i>P. deltoides</i> × 香脂杨 <i>P. balsamifera</i> × 窄叶杨 <i>angustifolia</i> (天然三系杂交)	Unnamed	未命名

杨树的早期派别通过不同独立周期的快速物种形成而进化,但同时受到派内与派间广泛基因渗入的影响。(Eckenwalder, 1984b、1996; Smith and Symata, 1990; Kaul,

1995)。这个快速的系列进化事件诸多相互矛盾的证据以及物种鉴定中的混淆已经使我们难以追踪最新派杨树的进化历史 (Eckenwalder, 1996)。尽管有证据表明存在派间分化, 但是各派本身都广泛地分布。各派内的物种同源性很高, 其中很多是广泛分布的树种。

显然, 在北半球的大部分温带地区易于出现基因漂移到其他派物种的情况。杨树作为先锋种迁移速度快。花粉研究表明, 在冰冻期后, 杨属树种经常在初生林群落中占主要地位 (Cwynar, 1988; Keenan and Cwynar, 1992)。在欧洲, 欧洲山杨 *P. tremula* 是早期的先锋种。欧洲黑杨与白柳 (*Salix alba*) 一起分布于河边和草原中。人们认为, 美洲山杨的起源始于更新世时期冰盖退却后不久, 长期以来通过根段进行无性繁殖, 从而成为世界上分布最广、最古老的物种之一 (Barnes, 1975; Kemperman and Barnes, 1976; Mitton and Grant, 1980; Cheliak and Dancik, 1982)。

第四节 生殖生物学

1. 生殖发育

杨树通常为雌雄异体和专性异型杂交 (obligatory outcrosser)。不过, 雌雄同体的花序和完全花亦有报道 (Lester, 1963a、1963b; Melchior, 1967)。美洲山杨的花芽在不同时期可发育成雌蕊、雄蕊或完全花 (Lester, 1963a)。大叶杨 (*P. lasiocarpa*) 是一个明显的例外, 它通常为雌雄同体且自花授粉 (Schreiner, 1974)。已经证实美洲山杨 (Einspahr and Winton, 1976, Grant and Mitton, 1979) 和美洲黑杨 (Farmer, 1964b) 的总性比为 1:1, 不过在洛基山脉地区观察到美洲山杨的性比因海拔不同而出现的梯度, 低海拔区大多为雌花, 而当海拔超过 3200m 时, 超过 90% 的花为雄花 (Grant and Mitton, 1979)。

花芽相对简单 (Jackson and Sweet, 1972), 其发生和早期发育在美洲山杨和美洲黑杨中已做描述 (Nagaraj, 1952; Seitz, 1958; Lester 1963a)。(花发生于当年生枝条的叶腋的花芽。花芽为极小的点状结构, 在冬季休眠时各有一个芽鳞)。花蕾是由位于当年生枝条上叶腋处的花萌发生长而来, 这芽不过一手指尖大小, 每个芽外有一芽鳞能护其抵御寒冬的到来 (Owens and Blake, 1985; Kaul, 1995)。芽于 5 月萌发, 在枝条快速伸长期, 叶腋原基开始形成数片芽鳞。生殖点在 6 月中旬左右决定 (Lester, 1963a)。在 6 月下旬前, 雌蕊原基的花器官首先开始发育, 随后 7 月上旬雄蕊原基开始发育。对美洲黑杨而言, 在仲夏雄花芽就易于与营养芽 (vegetative buds) 区分开来, 而雌花则需要解剖才能鉴定 (Farmer, 1976)。在整个 9 月期间花芽一直处于发育阶段, 因此在冬季休眠来临前花药和胚珠均已发育完全 (Owens and Blake, 1985; Kaul, 1995)。至少对于某些杨属物种而言, 下一轮发育的起始必须经历春化作用 (Farmer, 1964a)。大孢子母细胞在春天分化, 小孢子在开花期前分化 (Farmer and Pitcher, 1981)。

在早春, 花是由柔荑花 (柔荑花序) 发育而得, 早于营养花芽先行开放。当发育完全时, 雌、雄柔荑花序均长约 10~15 cm。雌花形成 2~4 个帽状或 Y 状的柱头, 而雄花有 30~80 枚雄蕊 (Demeritt, 1990)。每一柔荑花序可结几十个单室蒴果, 每个蒴果含 10~30 粒种子。

雄花在雌花成熟前几天即可成熟并散落花粉, 确保当第一批雌花可接受花粉时, 花粉恰已散落在空气中 (Farmer and Pitcher, 1981)。这类花粉—雌蕊相互作用已经在欧洲黑杨中有大量的记载 (Villar et al, 1987a; Villar et al, 1993)。开花期的变化源自不同树种间的差异, 美洲黑杨开花期可高度遗传 (Farmer, 1976)。开花期的变化使授粉期由 2 周延长至 3 周。另一项对法国 111 个地点的欧洲黑杨的自然变异研究表明该物种存在相当水平的多样性和较低水平的分化, 并存在重要的地区内基因多样性 (Legionnet et al, 1997)。

授粉后几小时内花粉即可萌发。几天后授精过程发生并通常在 2 周内完成 (Farmer and Pitcher, 1981)。随后种子快速发育, 在仲夏前, 也就是叶片完全生长前大多数树种的种子会散播出来 (Schreiner, 1974)。在北美, 白杨派 *Populus* 和青杨派 *Tacamahaca* 的种子成熟期由总积温 (temperature sums) 决定, 在同一生态区内相当一致 (Pauley, 1950)。另一方面, 黑杨派 *Aigeiros* 杨树种子可能在整个夏天和早秋持续散播 (Farmer, 1966)。

2. 交配系统和基因流

两个因素导致了杨树高水平的基因流和遗传多样性。第一, 大多数物种为雌雄异体, 因此可专性异型杂交。第二, 除了风媒授粉外, 种子短柄上的白色丝状长毛还有助于风媒授粉的远距离传播 (Schreiner, 1974), 从而导致高迁移率。

电泳实验表明, 美洲山杨具有高水平基因流, 因而并导致不同种群间假定的中性等位酶位点 (neutral allozyme loci) 缺乏分化。不过非随机交配在同类研究中的作用存在差异, 从明尼苏达取样的种群中未检测到偏离 Hardy-Weinberg 平衡的现象 (Lund et al, 1992), 在 Alberta 种群中发现了过量的杂合子 (Cheliak and Dancik, 1982), 而来自安大略的种群中则观察到杂合子缺乏 (Hyun et al, 1987)。

3. 种子产量

大多数杨树在 10~15 年时开始开花 (Schreiner, 1974), 不过美洲黑杨可能在 4 年时即可开花 (Farmer and Pitcher, 1981)。青杨派和黑杨派杨树每年都产生大量的实生苗。白杨派的树种每年都会产生一些种子, 但存在大小年现象, 大年 (bumper crops) 每 3~5 年发生一次。杨树产种量高。据估计, 通常一棵 12 m 的美洲黑杨一年可产 2 800 万粒种子, 而欧洲山杨的种子产量估计可高达 5 400 万粒。杨树种子非常小。白杨派树种的种子每克可达 6 000~8 000 粒, 而北美的大叶杨派和黑杨派则为 300~450 粒 (Schreiner, 1974)。

自然条件下, 杨树种子的寿命通常十分短——大约 2~4 周。在人工控制的低温环境 (-18~5℃) 稳定的湿度 (5%~8%) 条件下, 香脂杨 *P. balsamifera* 种子的贮存期可延长至 140 天 (Hellum, 1973), 美洲山杨 *P. tremuloides* 种子的则可延长至 2 年 (Fechner et al, 1981), 而黑杨派 *Aigeiros* 杨树种子的贮存期还可长达 5~6 年 (Tauer, 1979; Muller and Tessier du Cros, 1982)。

4. 自然再生

杨树种子从树上自然脱落后在几天内萌发或死亡。种子在地表萌发。下胚轴基部发育出的一轮毛, 使幼苗保持垂直向上生长, 并使根向下扎入土中。

种子的萌发需要适宜的基质 (如细的矿质土)、光照和持续的湿润。 (McDonough,

1979, Farrar, 1995)。适宜的条件, 诸如海岸、沙洲和老沙石场中的精细矿质土等, 通常较为稀少, (Barnes, 1966; Schier, 1973; Einspahr and Winton, 1976)。在北美, 由种子发育的白杨派树仅在新开辟的地区有所发现, 而林区中主要的繁殖方式仍为营养繁殖。

5. 自然界中的营养繁殖

除白杨派以外, 其他所有杨树种都可以从树桩和根茎中长出有活力的芽。幼小的白杨偶尔也可产生萌芽 (Zsuffa, 1975)。在很多树种中常常会见到由根上不定芽形成的萌条(根蘖), 而在黑杨派和大叶杨派中较少发生。

美洲山杨无性系群 (Clonal groups) 在北美东部十分常见, 但是面积通常不超过 0.1hm², 但在犹他州, 却发现了面积达 80hm² 的无性系群 (Kemperman and Barnes, 1976)。在美国西部的半干旱地区, 一些人认为, 自大约 10 000 年前上一次冰河期后, 未出现大范围的定殖 (Einspahr and Winton, 1976; McDonough, 1985)。事实上, 一些生物学家认为西部的无性系已有 100 万年的历史。(Barnes, 1966、1975)。有人声称一个无性系(昵称“Pando”, 拉丁名为 *I spread*) 覆盖面积有 43hm², 有 4 700 多条茎, 重量超过 600 万千克, 使之成为已知的最大生物体 (Grant et al, 1992; Mitton and Grant, 1996)。

研究还表明, 在自然界中既发生自然繁殖也发生营养繁殖, 例如, 欧洲黑杨 (Legionnet et al, 1997)。

第五节 遗 传

1. 细胞学

杨树通常为二倍体, 染色体数为 $2n = 38$ (Blackburn and Harrison, 1924; Smith, 1943)。多倍体杨树较为罕见, 只在 6 个树种中有所报道 (Darlington and Wylie, 1956)。尽管少见, 但是首次发现的三倍体森林树种即为欧洲山杨的一个无性系 (Müntzing, 1936)。随后欧洲山杨和美洲山杨天然三倍体无性系也相继被发现, 通常表现为叶片更大、生长超常 (Einspahr et al, 1963; Heimbürger, 1968; Einspahr and Winton, 1976)。

一些报道表明, 杨树的性别由性染色体控制 (Peto, 1938; Smith, 1943; van Buijtenen and Einspahr, 1959)。不过, 这一理论仍然存在争议。尽管已发表的报道倾向于性别决定于遗传基础, 但是在毛果杨×美洲黑杨的 F1 代杂交种的一个分离群体 (segregating family) 中, 用 2500 个基于 PCR 的 RAPD 标记进行的连锁分析中并没有发现任何与性别连锁的标记 (McLetchie et al, 1994)。因此作者推测, 性别的决定在遗传上可能是由测试标记未覆盖的基因组区域决定, 或由表现为上调效应 (additive threshold) 或上位效应的多位点控制, 又或是在合子早期由环境条件决定。

2. 遗传变异

如前所述, 广泛分布于北半球的杨属树种间差异巨大, 并且通过杂交产生新基因型的机会也很高。虽然狭义和广义上遗传率的定量估算以及选择标准的协方差无疑已经使育种及选择策略更为有效, 但育种计划将无疑继续利用这种遗传变异 (Riemenschneider et al, 1996)。杨树对于数量遗传学研究而言是理想的物种, 因为其易于进行无性繁殖, 从而便

于观察复杂的基因作用方式。(Foster and Shaw, 1988; Mullin and Park, 1992; Bradshaw and Foster, 1992)。然而,令人惊讶的是目前仅对少数几个树种和性状进行了详细的遗传变异研究。

杨树的真正潜力只有通过以防止林内及林间遗传变异为目的的遗传研究才能确定。不幸的是,育种人员往往只侧重于种间杂交而忽略了这一巨大领域,且对众多天然种群的详细研究最近才开始进行,而较完整的研究结果只在几个树种中得到报告(Mohr diek, 1983; Farmer, 1991)。

(1) 种群水平差异

种群间在生长性状和锈病抗性方面存在较大差异,但在其他性状方面几乎不存在地理分化。总体上,分子遗传研究数据表明,迁移过程中的基因流能有效阻止遗传漂移、近亲繁殖以及引起与适应性选择无关的地理变异中涉及的其他过程(Farmer, 1996)。

在香脂杨的4个原产地中,在 10° 范围内的纬度带上可以观察到物候特征(Farmer et al, 1988a)、苗/根的异速生长系数(allometric coefficients)(Schnekenburger and Farmer, 1989)以及差异,由于南方的树种生长期延长而产生的差异显著的生长高度(Schnekenburger and Farmer, 1989; Farmer, 1993)。其中相同种群中同工酶特征(Farmer et al, 1988a)、生根能力(Farmer et al, 1989)、及萌芽期(Farmer and Reinholdt, 1986)几乎没有差异。而在更小的 3.5° 纬度范围内取样的测试种群实验中发现了显著的群体差异,两年龄植株高度、叶片形态、侧枝生成(sylleptic branching)和抗性上存在大约12%的变异(Riemenschneider et al, 1992),继而将种群分成西北组、中部组和东南组(Riemenschneider and McMahon, 1993)。

同样地,美洲山杨的同工酶及RAPD差异研究未发现群体差异,但在形态、生长和树性上却存在很大差异(如Hyun et al, 1987; Lund et al, 1992; Yeh et al, 1995), (van Buijtenen et al, 1959; Barnes, 1969; Einspahr and Winton, 1976)。种群间的变异通常有渐变趋势(clinal trends),木质密度会随着海拔高度的增加(Valentine, 1962)从南到北逐渐降低(Einspahr and Benson, 1967)。一个普通的园林试验表明,在北部和西部原平地树种的生长期的起始和终止均提前,而在密歇根州的树种的存活率相对较低(Brissette and Barnes, 1984)。另一项试验表明,来自于密歇根州的无性系生长更好(Reighard and Hanover, 1985)。有证据表明,美洲山杨种群对杨树炭团溃疡病菌(*Hyphoxylon mammatum*)的易感性呈由北向南增加的趋势(French and Hart, 1978)。此外,美洲山杨种群在对臭氧的敏感性上也有所不同,耐受性受最大日臭氧含量、年降雨量和最低气温影响(Berrang et al, 1991)。

关于美洲黑杨的地理变异也有详细记载。在内布拉斯加州实施了全分布区产地试验,种源范围南至德克萨斯州,北达明尼苏达州,东起宾夕法尼亚州。除了评价植株的生长和存活之外,树皮、树干、树冠和叶片形态也囊括在内(Ying and Bagley, 1976)。大多数性状中,呈现出从北向南、从西到东的渐变模式。来自内布拉斯加州、明尼苏达州和威斯康星州的插条生根数目明显多于来自其他地方的插条(Ying and Bagley, 1977)。对来自南部大平原的40个种群进行的研究也发现类似的渐变趋势,在2年生株高、直径、分枝以及*Melampsora*锈病抗性方面,均呈现从北向南、从西向东的渐变模式(Nelson and Tau-

er, 1987)。对安大略省的 9 个种群进行的研究表明在叶片形态上存在的大的变异与经纬度无关,也与异构酶的适度变异无关,既而表明东西部种群之间存在差异(Rajora et al, 1991)。

对华盛顿的毛果杨种群进行的一系列研究表明,在叶片、枝条及物候特征(Weber et al, 1985)、光合作用(Dunlap et al, 1993)、存活株增长高度生物量(Heilman and Stetler, 1985)、材积、*Melampsora* 锈病抗性以及对干旱地带的适应性(Dunlap et al, 1994)、叶片和树冠形态(Dunlap et al, 1995)方面均有显著差异。对 4.5° 纬度范围内的 10 个种群样本的分析发现,仅在 3 年生株高和直径上存在微弱的渐变趋势(Rogers et al, 1989)。另一项对华盛顿河畔种群样本的研究发现,幼苗和生根插条对洪涝的抗性几乎不存在种群间差异(Smit, 1988)。

(2) 个体水平差异

在种群间遗传变异程度的大小因性状而不同,但在种群内所有性状均有中等至高等不同程度的变异。遗憾的是,大部分遗传测试仅仅侧重于无任何特定家系结构的无性系材料,并且只着重研究了青杨派和黑杨派的树种及其杂交种。一般而言可运用的只有广义遗传率(H^2)估算的数据,遗传结构并不分成加性和非加性成分(additive and non-additive components)(Riemenschneider et al, 1996)。在有限的几个苗期种群研究中人们发现,美洲黑杨生长的狭义遗传率(h^2)估算结果与广义遗传率 H^2 接近;(Farmer, 1970; Ying and Bagley, 1976; Nelson and Tauer, 1987),而毛果杨的狭义遗传率(h^2)估算结果则比广义遗传率(H^2)低得多。

大量关于美洲黑杨生长和产量的研究已经得到了一致的广义遗传率估算值,即 H^2 为 0.20~0.50,其基因型与环境间的相互作用显著,但通常低于相应的主遗传效应的一半(Wilcox and Farmer, 1967; Farmer and Wilcox, 1968; Mohn and Randall, 1971, 1973; Randall and Cooper, 1973; Foster, 1986)。有限的几个无性系繁殖试验表明,产量的遗传变异很多不具有加性效应(Foster, 1985; Foster and Shaw, 1988)。香脂杨茎生长的广义遗传率大约为 $H^2 = 0.50$ (Farmer et al, 1988b)。在美洲黑杨和香脂杨中,第一年中由于是无性系苗 C 效应通常作用明显,(Wilcox and Farmer, 1968; Farmer et al, 1989),但是在田间种植之后其作用效应降低(Farmer et al, 1988b)。对理想株型影响植株生产力的叶片尺寸、分枝及物候特征参数的确定(ideotypes)(Dickmann and Keathley, 1996),可能有助于对香脂杨(Riemenschneider et al, 1992)、毛果杨(Riemenschneider et al, 1994)以及美洲黑杨、欧洲黑杨和小叶杨 *P. simonii* 的杂交种(Wu, 1994a, 1994b)进行产量选择。产量选择中理想株型概念的含义至今还没有形成统一。

生根能力和根特征的遗传率通常非常高,美洲黑杨的 H^2 估值可高达 0.85~0.91(Wilcox and Farmer, 1968; Ying and Bagley, 1977)。其他近来的研究也表明毛果杨的生根能力具有很高的遗传率(Riemenschneider et al, 1996)。

由于 *Melampsora* 锈病影响杨树的栽培,因此很多工作都专注于研究 *Melampsora* 锈病抗性的遗传率。在关于美洲黑杨 *P. deltoides* 锈病抗性的早期研究中, h^2 的估值为 0.38~0.66, H^2 为 0.66~0.88(Jokela, 1966)。在美洲黑杨、欧洲山杨、美洲山杨、香脂杨、毛果杨及其杂交种,还有美洲黑杨、欧洲黑杨与辽杨间的杂交种中锈病抗性或锈病

敏感性也有类似的高估算值。

(3) 分子遗传学

近年来,大量的研究方向已转向将重要性状与分子标记挂钩上,并试图建立相应的遗传图谱。(Bradshaw et al, 1994, Cervera et al, 1997)。这一部分工作的重点是针对适应性性状 (Bradshaw and Stettler, 1995) 以及抗病性 (Villar et al, 1996), 并揭示几个数量性状位点 (QTL) 对这些数量性状的巨大影响。

3. 自交衰退和遗传负荷

由于杨树中存在高频率的基因流,我们推测其自交频率较低。对安大略省 200 个美洲山杨无性系的研究中,未发现杂合体且平均固定指数为 0.462 (Hyun et al, 1987)。不过,这些结果可能是由于取样中的 Wahlund 效应所造成的而非自交所导致。与这些观察结果相反,位于加拿大阿尔伯塔中通常以无性方式繁殖的美洲山杨种群中出现过过量的杂合体 (Cheliak and Dancik, 1982, Jelinski and Cheliak, 1992)。尽管在天然种群中自交频率可能较低,在杂交种系中遗传负荷常常表现为自交衰退,从而导致后代分离比偏离了孟德尔分离比 (Bradshaw and Stettler, 1994)。

第六节 杂 交

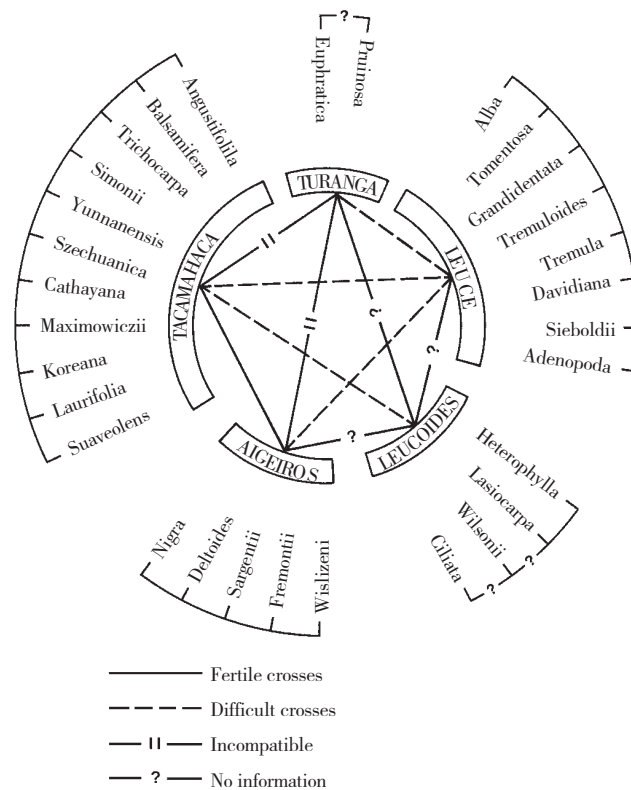


图 7-1 杨属 *Populus* 物种的可杂交性
(摘自 Zsuffa, 1975)

深入的杂交研究在白杨派、青杨派和黑杨派树种都曾进行过，但有关于胡杨派和大叶杨派的杂交数据仍尚少 (Zsuffa, 1975)。图 7-1 总结了派间杂交结果。

派内树种易于产生杂交种且杂交种活力强于亲本，典型的例子如美洲山杨和欧洲山杨的杂交种 (Ilstedt and Gullberg, 1993)。派间树种杂交的成功率因不同派系而有所不同。黑杨派与青杨派易于杂交；而白杨派与黑杨派、白杨派与青杨派难以杂交，结果往往产生死种子或矮化苗 (Zsuffa, 1975)。应用种间杂交种作为亲本比用纯种作为亲本更容易实现派间杂交。

有些物种的不亲和性表现为花粉管发育停滞，无法穿过柱头 (Melchior and Seitz, 1968, Guries and Stettler, 1976; Stettler et al, 1980; Knox, 1984; Villar et al, 1987b; Rougier et al, 1992; Villar et al, 1993)。某些情况下，通过将不亲和花粉与“蒙导花粉” (即通过 γ -射线而杀死的亲和花粉) 混合 (Stettler and Ager, 1984; Knox et al, 1987; Villar and Gaget-Faurobert, 1996)。以及用溶剂和亲和花粉提取物来处理花粉和柱头，来克服这一阻碍作用 (Whitecross and Willing, 1975; Willing and Pryor, 1976)。这一技术可使白杨派、黑杨派与青杨派三者之间实现杂交 (Stettler, 1968; Zuffa, 1971, Knox et al, 1972; Willing and Pryor, 1976)。

第七节 生态和相关物种

1. 生境

杨树生长于多种森林生态系统，从寒带到亚热带，高山到河畔。在寒带森林和大河谷中，杨树能形成大片的杨树林；而在其他环境下，它们则形成小的树林或树群。尽管不同杨树种之间存在较大差异，但是实际上所有杨树都十分不耐阴。它们是先锋树种，是第一批入侵和再次被定殖于经采伐、开垦和火灾过后地区的树种。白杨派树种及其杂交种虽都是营养需求型，且在持续湿润环境下生长旺盛，但是它们对气候的适应性相差很大 (Heilman et al, 1996)。

白杨派树种分布十分广泛，可见于多种气候条件下。对于美洲山杨而言，其分布区最南端大约界定为 7 月月平均等温线为 24°C 的地方，而最北方则界定为年平均积温为 700°C (正负偏差 5.6°C) 的地方，(Fowells, 1965)。在这一范围内，年降雨量超过土壤水分蒸腾损失总量的地方就会有这一物种的生长。美洲山杨可生长于多种土壤类型中，从浅滩和多石的土壤至重度沙壤土和重质黏土，这派树木的生长很大程度受到排灌和土壤肥力的影响 (Perala, 1990)。大齿杨树对分布区的要求更为严格，全年应水分充足，最小降水量出现在马尼托巴大草原的西北部边界，只有 510 mm。美洲山杨的适应性比大齿杨强很多，在潮湿、透气性好的肥沃沙质高地中美洲山杨的生长状况最好 (Laidly, 1990)。

青杨派和黑杨派树种统称河畔三角叶杨。青杨派树种通常见于高海拔和高纬度的地方 (山区的高位水系以及新山麓地带山谷冲积平原中) (Braatne et al, 1996)。该派中，香脂杨的分布最为广泛，与美洲山杨一样可抵抗极端气候。它通常只在潮湿的低地中生长，是生长于排灌不良且 pH 高于 7.2 的黏土中的少数寒带种之一 (Dix and Swan, 1971; Zasada and Phipps, 1990)。毛果杨最常见于太平洋西北部沿海的潮湿森林中，在水分、营养、

氧气充足且 pH 为 6.0~7.0 的冲积土中生长最好 (Smith, 1957; DeBell, 1990)。而窄叶杨的分布范围十分有限, 在水流湍急的河流旁的沙洲上为先锋树种 (Brayshaw, 1965)。

黑杨派的树种生长于低海拔和低纬度地区 (成熟的山谷冲积平原的低位水系中) (Braatne et al, 1996)。美洲黑杨的自然分布区主要是广泛的南部地区, 无霜期可以是小于 100 或到大于 200 天不等, 从降雨量小于 380 mm 的西北部地区到降雨量大于 1 400 mm 的南部地区。这一物种在潮湿、排灌良好、细沙壤土或粉砂壤土、高度很少超过附近河面平均水平 6m 的地点生长最好 (Cooper and Van Haverbeke, 1990)。

异叶杨 (*P. heterophylla*) 是大叶杨派中唯一的北美树种, 可见于雨量充沛且温暖潮湿的地区。它在浅沼泽地的湿润深土中及靠近潮水的低地中生长最好, 其生境对于美洲黑杨而言过于潮湿 (Johnson, 1990)。

2. 群落生态学和相关树种

杨树出现于多种森林生态系统中的早期演替阶段, 因而可见, 其生态联系十分多样。白杨派树种尤其如此, 因为它们不只在河畔生境中生长。在欧洲, 欧洲山杨是早期先锋树种。欧洲黑杨 (*Salix alba*) 常见于河畔和草原地区与白柳混生生长, 而美洲山杨 *P. tremuloides* 在其生境内则常以纯林的形式出现, 但是也见于与白云杉 (*Picea glauca*)、黑云杉 (*Picea mariana*)、香脂冷杉 (*Abies balsamea*)、白桦 (*Betula papyrifera*)、香脂杨和北美短叶松 (*Pinus banksiana*) 的混生林中。杨树与灌木和草本植物混生的情况更为多见与多变 (Perala, 1990; Farrar, 1995)。大齿杨可见于小型纯林中, 但是更多地是与美洲山杨或香脂杨一起形成的混合林。它在很多的其他林型中高于次要种, 因此与多种灌木和地表植物混生 (Laidly, 1990; Farrar, 1995)。

青杨派中的香脂杨在河流冲击平原中生长最好, 以纯林或与各种柳树和桤木混生的混合林方式出现 (Viereck et al, 1983)。不过, 它也可与寒带针叶树和几种阔叶树混生, 此外与之混生的灌木和草本植物则更多 (Zasada and Phipps, 1990)。毛果杨通常与大型柳树混生, 但也有少量可与几种西方针叶树混生的 (DeBell, 1990)。与之混生的灌木和草本植物很多, 但是生长较好的地点往往是与长喙榛 (*Corylus cornuta*)、接骨木 (*Sambucus* spp.)、红花覆盆子 (*Rubus spectabilis*)、荨麻 (*Stachys* spp.)、刺羽耳蕨 (*Polystichum munitum*) 和蹄盖蕨 (*Athyrium filix-femina*) 混生的地方 (Smith, 1957)。

在河畔, 美洲黑杨常见于纯林或与其他河畔物种混生的开放林地中。在该物种生长最好的地方, 山茱萸 (*Cornus drummondii*) 和女贞 (swamp-privet) (*Forestiera acuminata*) 是与之混生的主要灌木 (Cooper and Van Haverbeke, 1990)。

3. 竞争和林分结构

如前所述, 所有杨树都不耐阴且为早期演替种。许多杨树生态系统的维持都需要外力干预。有无合适的定殖地点 (特别是火灾之后) 是决定幼苗定殖的关键因素。(DeByle and Winokur, 1985; Jelinski and Cheliak, 1992; Kay, 1993)。树苗一旦定殖, 火灾也能消除耐阴的竞争树种, 使生命力旺盛的美洲山杨由成活的根系中萌蘖成株, 密度可超过 100 万/hm² (Schier et al, 1985)。当干预时不存在, 山杨被认为是暂时演替树种, 演替模式由土壤水分条件所决定 (Roberts and Richardson, 1985)。不耐阴的树种通常比山杨

寿命长, 而耐阴的阔叶树和针叶树也可借助阴处阴影再生的能力成为主要的树种。

河畔生三角叶杨十分抗涝, 因而冲积生境的干扰特征能促进其定殖和生长。在非冲积生境中, 它们可在潮湿的农田、林中空地和沼泽地边缘定殖, 但是最终会被次生林种支配 (Braatne et al, 1996)。柳树和桤木可能先于香脂杨定殖, 而随后香脂杨通常被白云杉所取代 (Walker and Chapin, 1986; Walker et al, 1986)。美洲黑杨由于非常不耐阴, 因此是竞争力十分弱的竞争树种。但因其生长速度快于柳树所以它能竞争过柳树 (过于潮湿地点除外) (Cooper and Van Haverbeke, 1990)。

用杨树及其杂交种营造人工林时, 通常应当营造纯林。除了高度不耐阴之外, 杨树幼苗还无法与其他青草、杂草或灌木竞争。尽管杨树用于对控制植被的许多除草剂敏感, 但在造林后的最初几年中进行人工除草控制还是有必要的 (Demeritt, 1990)。

4. 生态系统动力学

杨树与多种昆虫共存, 但是大部分昆虫只对栽培种和杂交种的人工林产生较严重的威胁。在北美, 最严重的食叶害虫 (特别是在杂种人工林中) 是三角叶杨叶甲 (*Chrysomela scripta*)。其他食叶害虫还有森林黄褐天幕毛虫 (*Malacosoma disstria*)、杨树天幕毛虫 (poplar tent maker) (*Ichthyura inclusa*)、黄绿蛱蝶 (*Nymphalis antiopa*) 幼虫、卷叶蛾 (*Choristoneura conflictana*)、盾瘤胸叶甲 (*Zeugophora scutellaris*)、叶潜蛾 (*Phyllocnistis populiella*)。三角叶杨小卷蛾 (*Gypsonoma haimbachiana*) 的破坏性特别大, 其他几种蛾也有一定的破坏力。杨树瘿蚊 (*Prodiplosis morrisoni*) 和很多种蚜虫也可产生危害 (Dickmann and Stuart, 1983; Demeritt, 1990)。据报道, 在中国的宁夏, 有2 400万株树木的生长受到光肩星天牛 (*Anoplophora glabripennis*) 的威胁 (Chinese National Report IPC, 1996)。人们认为有几种机制会导致杂交种较亲本树种抗性上有所增强或减弱, 通常, 在杂交种群中害虫密度高 (Whitham et al, 1996)。

其他害虫包括:

- 柳毒蛾 *Stilpnoia salicis*
- 北方咕噜舟蛾 *Gluphisia septentrionis*
- 副王蛱蝶 *Basilarchia archippus* 幼虫
- 舞毒蛾 *Lymantria dispar* [亚洲和欧洲种]
- 黄缘蛱蝶 *Nymphalis antiopa*
- 褐卷蛾 *Pandemis pyrusana*
- 大山杨卷叶蛾 Large aspen tortrix *Christoneura conflictana*
- 黄褐天幕毛虫 *Malacosma dissitria*
- 杨树/柳树天牛 *Chryptorhyuchus lapthi*
- 透明翅膀的杨树天牛 *Panthrene robiniae*
- 杨树天牛 *Saperda calcerata*
- 赤褐色杨树天牛 *Agrilus grandulatus lirogus*
- 叶蜂 *Nematus salicis odoratus*
- Phratora californica*
- 跳甲 *Altica* sp.

——*Corythucha salicata*

——西方柳盲蝽

——三角叶杨小卷蛾 *Gypsonoma haimbachiana*

——蚜虫

关于杨树害虫的更多情况, 可见 Peterson et al, 1996; Hiratsuka, 1987; Furniss and Carolin, 1977; Hepting, 1971 以及 USDA Forest Service 1979。也可查询国际互联网网页: “<http://ww.cas.psu.edu/docs/CASDEPT/PLANText/poplar.html>”。

与杨树有关的真菌十分多。单单与美洲山杨腐烂相关的真菌已知的就已有 250 多种 (Lindsey and Gilbertson, 1978)。目前, 只对与白杨派、黑杨派和青杨派相关的真菌做过一定程度的研究, 与其他杨树派别相关的真菌是“真正的一无所知”(Newcombe, 1996)。

对黑杨派和青杨派造成危害或存在潜在危害最严重的五种病害是:

——青杨叶锈病 (*Melampsora* spp.), 虽然只引起人工林中中等程度树木死亡, 但材积量可减少多达 65% (Widin and Schipper, 1981)。这一形势在欧洲变得越来越严重, 已有报道称该病原菌 (*Melampsora larici-populina*) 存在变异, 以前选育的具有完全抗性的种间杂交种现在正受这一病原菌新的变种的影响 (Pinon, 1992a、1992b; Pinon, 1995; Pinon and Frey, 1997);

——褐斑病 (*Marssonina anthracnose*) 或叶斑病 (*Marssonina* spp.), 主要对象为黑杨派树种, 及其与其他派之间的派间杂交种, 据估计, 在意大利该病害使产量损失达 16% (Thielges, 1985);

——细菌性肿瘤病 (*Xanthomonas populi* Ridé), 可对欧洲种植的黑杨派和青杨派的非本地种产生严重破坏 (Thielges, 1985);

——壳孢菌肿瘤病 (*Discosporium populeum*), 该病害在北美危害不大, 但对欧洲的加杨 *P. × canadensis* 无性系林却能造成广泛严重的损失 (Waterman, 1957; Thielges, 1985);

——斑枯病和肿瘤病 (*Septoria musiva* Peck), 对本地种仅产生叶片枯斑, 但对杂交危害严重, 阻碍了大多数加杨无性系在加拿大、美国和阿根廷的推广应用 (Thielges, 1985)。

白杨派树种最有可能受到如下病害的影响:

——枝干肿瘤病 [*Hypoxylon mammatum* (Whal.) Miller] 广泛分布于白杨派寄主树种上, 但是只在某些地区形成病害问题 (Manion and Griffin, 1986, Newcombe, 1996)。有时在欧洲可引发毛果杨肿瘤 (Terrasson et al, 1988), 在北美可引发多种杂交种无性系林的肿瘤病 (Ostry and McNabb, 1986)。

——尽管黑杨派和青杨派的抗白腐病机制尚不清楚 (Newcombe, 1996), 但是白腐病真菌能使山杨产生严重的腐烂 (Thomas et al, 1960)。

多种杨树树种和杂交种对环境胁迫表现出很好的适应性, 特别是在干旱、洪涝、盐碱、冷胁迫和大气污染 (如臭氧) 上 (Blake et al, 1996; Neuman et al, 1996)。银灰杨 (*P. canescens*) 有强的抗风能力。

很多哺乳动物取食杨属树种的树皮、叶片和根，尤其是雪兔 (*Lepus americanus*)，海狸 (*Castor canadensis*)，豪猪 (*Erethizon dorsatum*)，黄面囊鼠 (*Thomomys bottae*)，负鼠 (*Trichosurus vulpecula*) (Edwards, 1978; Bryant, 1981; Cantor and Whitham, 1989; Basey et al, 1990)。有蹄类动物，如鹿、驼鹿和麋鹿 (*Cervus elaphus*) 不仅取食枝条和新芽，而且通过咬和用鹿角磨蹭从而破坏树皮 (Romme et al, 1995)。牛和羊如果放牧到林间，也取食萌条并破坏现有树木的根 (Cooper and Van Haverbeke, 1990; Perala, 1990)。尽管在哺乳动物对杨属杂交组合的反应上鲜有了解，但是它们对杂交种和单个无性系有很大的取食偏好性。据推测，这可能是由于不同树种中酚苷浓度不一所致，酚苷与植物防御哺乳动物相关。(Whitham et al, 1996)。

小鼠和田鼠可严重为害新造幼林 (DeBell, 1990)。在杨树林中有很多种鸟类繁衍生息，但只有少数种类可通过取食对杨树造成危害。流苏松鸡和尖尾松鸡取食山杨芽，在夏天流苏松鸡还会取食叶片。赤胸啄木鸟和黄腹啄木鸟在找食树皮内昆虫的时候通过在树上钻孔而在留下疤痕 (Fowells, 1965)。

河畔三角叶杨是北美西部河畔生态系统中产量最高、最敏感的组成部分。与这些群落有关的脊椎动物数量是与云杉、美国黑松或花旗松群落相关的脊椎动物数量的4倍，但是人类活动每年使河畔生境损失面积超过100 000 hm² (Finch and Ruggiero, 1993)。尽管河畔生态系统占北美西部不到1%的面积，但是它们可为更多种鸟类提供生境，比所有其他植物类型生境的总和还高 (Knopf et al, 1988)。据认为，杂种区是生物多样性的中心 (Whitham et al, 1996)，是多种昆虫种类的保护区 (Whitham, 1989)，也是食虫性鸟类的理想生境 (Martinsen and Whitham, 1994; Dickson and Whitham, 1996)。

第八节 总 结

杨属在北半球的广泛分布意味着该属树种是多种森林生态系统重要而宝贵的组成部分，具有很大的驯化潜力。这一个属的进化特征可分成多个不同的派，因而提供了更多通过杂交而得到新遗传组合的机会。在单个树种范围内基因流通常十分高，种群间的唯一区别是对环境选择压力的反应不同。

杨树最初是通过种子定殖，因为种子可长距离迁移进而入侵新的分布区，但是种群的维持则通常依靠杨树的营养繁殖能力。杨树的人工林培育已利用了这一特性，大多数育种计划的特征是利用所选择的无性系。无性系在产量性状、病害抗性和材性上的变异都非常大。

在北美，美洲山杨是分布最广的树种，并且是很多林型的重要组成部分。来自黑杨派和青杨派的河畔三角叶杨除了在人工林培育中起着重要作用之外，在维持复杂的河畔三角叶杨群体中也起着重要作用。尽管北美的杨树群体大部分仍然保持完整，但是在树种分布区边缘的小种群也需要进行保护。在欧洲，人类活动对杨树（特别是欧洲黑杨）遗传资源的侵蚀是更为值得考虑的问题。

杨树适合作为揭示林木生长过程的模式生物。无疑，其已经并将继续在世界多个地区成为驯化和森林经营的主要树种。

◆ 参考文献

- Ahuja, M. R. 1987. *In vitro* propagation of poplar and aspen. *In* Cell and tissue culture in forestry. Vol. 3. Edited by J. M. Bonga and D. J. Durzan. Nijhoff, The Hague. pp. 207-223.
- Bailey, A. W., Irving, B. D., and Fitzgerald, R. D. 1990. Regeneration of woody species following burning and grazing in Aspen Parkland. *Journal of Range Management* 43: 212-215.
- Barnes, B. V. 1966. The clonal growth habit of American aspens. *Ecology*, 47: 439-447.
- Barnes, B. V. 1969. Natural variation and delineation of clones of *Populus tremuloides* and *P. grandidentata* in northern Lower Michigan. *Silvae Genet.* 18: 130-142.
- Barnes, B. V. 1975. Phenotypic variation of trembling aspen in western North America. *For. Sci.* 21: 319-328.
- Barnes, B. V., and Han, F. Q. 1993. Phenotypic variation of Chinese aspens and their relationship to similar taxa in Europe and North America. *Can. J. Bot.* 71: 799-815.
- Basey, J. M., Jenkins, S. H., and Miller, G. C. 1990. Food selection by beavers in relation to inducible defenses of *Populus tremuloides*. *Oikos* 59: 57-62.
- Benson, M. K., and Schwalbach, D. E. 1970. Techniques for rooting aspen root sprouts. *Tree Plant. Notes*, 21: 12-14.
- Berrang, P., Karnosky, D. F., and Bennett, J. P. 1991. Natural selection for ozone tolerance in *Populus tremuloides*: an evaluation of nationwide trends. *Can. J. For. Res.* 21: 1091-1097.
- Bisoffi, S., and Gullberg, U. 1996. Poplar breeding and selection strategies. *In* Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. Edited by R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr., P. E. Heilman and T. M. Hinkley. NRC Research Press, National Research Council Canada, Ottawa, ON. pp. 139-158.
- Blackburn, K. B., and Harrison, J. W. H. 1924. A preliminary account of the chromosomes and chromosome behaviour in the Salicaceae. *Ann. Bot.* 38: 361-378.
- Blake, T. J., Sperry, J. S., Tschaplinski, T. J., and Wang, S. S. 1996. Water relations. *In* Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. Edited by R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr., P. E. Heilman and T. M. Hinkley. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, ON. pp. 401-422.
- Braatne, J. H., Rood, S. B., and Heilman, P. E. 1996. Life history, ecology and conservation of riparian cottonwoods in North America. *In* Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. Edited by R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr., P. E. Heilman and T. M. Hinkley. NRC Research Press, National Research Council Canada, Ottawa, ON. pp. 57-85.
- Bradshaw, H. D. and Foster, G. S. 1992. Marker-aided selection and propagation systems in trees: advantages of cloning for studying quantitative inheritance. *Can. J. For. Res.* 22: 1044-1049.
- Bradshaw, H. D., Jr., and Stettler, R. F. 1993. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. I. Triploidy in hybrid poplars. *Theor. Appl. Genet.* 86: 301-307.
- Bradshaw, H. D., Jr., and Stettler, R. F. 1994. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. II. Segregation distortion due to genetic load. *Theor. Appl. Genet.* 89: 551-558.
- Bradshaw, H. D., Villar, M., Watson, B., Otto, K., Stewart, S., and Stettler, R. F. 1994. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. III. A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS and RAPD markers. *Theor. Appl. genet.* 89: 167-178.
- Bradshaw, H. D., Jr., and Stettler, R. F. 1995. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. IV. Mapping QTLs with large effects on growth, form, and phenology traits in a forest

- tree. *Genetics* 139: 963-973.
- Brayshaw, T. C. 1965. Native poplars of southern Alberta and their hybrids. Publ. No. 1109, Department of Forestry, Ottawa. 40 pp.
- Brissette, J. C., and Barnes, B. V. 1984. Comparisons of phenology and growth of Michigan and western North American sources of *Populus tremuloides*. *Can. J. For. Res.* 14: 789-793.
- Browicz, K. 1966. *Populus ilicifolia* (Engler) Rouleau and its taxonomic position. *Acta Soc. Bot. Poloniae*, 35: 325-335.
- Bryant, J. P. 1981. Phytochemical deterrence of snowshoe hare browsing by adventitious shoots of four Alaskan trees. *Science*, 313: 889-890.
- Burns, R. M., and Honkala, B. H. 1990. *Silvics of North America. Agriculture Handbook 654*, Forest Service, USDA, Washington, DC. 877 pp.
- Burr, K. E. 1986. Greenhouse production of quaking aspen seedlings. *In Gen. Tech. Rep. RM-125*, Rocky Mtn. For. Range Exp. Sta., USDA For. Serv. pp. 31-37.
- Cagelli, L., and Lefèvre, F. 1996. The conservation of *Populus nigra* L. and gene flow with cultivated poplars in Europe. *Forest Genetics*, 2: 135-144.
- Cantor, L. F., and Whitham, T. G. 1989. Importance of belowground herbivory: pocket gophers may limit aspen to rock outcrop refugia. *Ecology*, 70: 962-970.
- Cervera, M. T., Villar, M., Faivre-Rampant, P., Goué, M. C., Van Montagu, M. and Boerjan, W. 1997. Applications of molecular marker technologies in *Populus* breeding. *In Microporopagation, Genetic Engineering, and Molecular Biology of Populus*. Gen. tech. Rep. RM-GTR-297, Fort Collins, CO: USDA, Forest Service.; Klopfenstein, N. B., Chun, Y. W., Kim, M. S. and Ahuja, M. R. *Edited by*, Dillon, M. C., Carman, R. C. and Eskew, L. G. (tech. eds.) pp 101-116.
- Cheliak, W. M., and Dancik, B. P. 1982. Genic diversity of natural populations of a clone-forming tree *Populus tremuloides*. *Can. J. Genet. Cytol.* 24: 611-616.
- Collinson, M. E. 1992. The early fossil history of the Salicaceae. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh Sect. B (Biol. Sci.)*, 98: 155-177.
- Cooper, D. T., and Van Haverbeke, D. F. 1990. *Populus deltoides* Bartr. ex Marsh. Eastern cottonwood. *In Silvics of North America. Vol. 2, Hardwoods. Edited by* R. M. Burns and B. H. Honkala. *Agriculture Handbook 654*, Forest Service, USDA, Washington, DC. pp. 530-543.
- Cwynar, L. C. 1988. Late Quaternary vegetation history of Kettlehole Pond, southwestern Yukon. *Can. J. For. Res.* 18: 1270-1279.
- Darlington, C. D., and Wylie, A. P. 1956. *Chromosome atlas of flowering plants*. MacMillan Co., New York.
- DeBell, D. S. 1990. *Populus trichocarpa* Torr. & Gray. Black cottonwood. *In Silvics of North America. Vol. 2, Hardwoods. Edited by* R. M. Burns and B. H. Honkala. *Agriculture Handbook 654*, Forest Service, USDA, Washington, DC. pp. 570-576.
- DeByle, N. V., and Winokur, R. P. 1985. Aspen; ecology and management in the western United States. *Gen. Tech. Rep. RM-119*, USDA Forest Service, Fort Collins, CO. 283 pp.
- Demeritt, M. E., Jr. 1990. *Populus* L. Poplar hybrids. *In Silvics of North America. Vol. 2, Hardwoods. Edited by* R. M. Burns and B. H. Honkala. *Agriculture Handbook 654*, Forest Service, USDA, Washington, DC. pp. 577-582.
- Dickmann, D. I., and Keathley, D. E. 1996. Linking physiology, molecular genetics, and the *Populus* ideotype. *In Biology of Populus and its implications for management and conservation. Edited by* R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr., P. E. Heilman and T. M. Hinkley. NRC Research Press,

- National Research Council of Canada, Ottawa, ON. pp. 491-514.
- Dickmann, D. I., and Stuart, K. W. 1983. Culture of hybrid poplars in northeastern North America. Michigan State University, Department of Forestry, East Lansing, MI. 168 pp.
- Dickson, L. L., and Whitham, T. G. 1996. Genetically-based plant resistance traits affect arthropods, fungi, and birds. *Oecologia*, 106: 400-406.
- Dirr, M. A., and Heuser, C. W., Jr. 1987. The reference manual of woody plant propagation: from seed to tissue culture. Varsity Press, Athens, GA. 239 pp.
- Dix, R. L., and Swan, H. M. A. 1971. The roles of disturbance and succession in upland forest at Candle Lake, Saskatchewan. *Can. J. Bot.* 49: 657-676.
- Dunlap, J. M., Braatne, J. H., Hinckley, T. M., and Stettler, R. F. 1993. Intraspecific variation in photosynthetic traits of *Populus trichocarpa*. *Can. J. Bot.* 71: 1304-1311.
- Dunlap, J. M., Heilman, P. E., and Stettler, R. F. 1994. Genetic variation and productivity of *Populus trichocarpa* and its hybrids. VII. Two-year survival and growth of native black cottonwood clones from four river valleys in Washington. *Can. J. For. Res.* 24: 1539-1549.
- Dunlap, J. M., Heilman, P. E., and Stettler, R. F. 1995. Genetic variation and productivity of *Populus trichocarpa* and its hybrids. VIII. Leaf and crown morphology of native *P. trichocarpa* clones from four river valleys in Washington. *Can. J. For. Res.* 25: 1710-1724.
- Eckenwalder, J. E. 1977. North American cottonwoods (*Populus*, Salicaceae) of sections *Abaso* and *Aigeiros*. *J. Arnold Arboretum* 58: 193-208.
- Eckenwalder, J. E. 1984a. Natural intersectional hybridization between North American species of *Populus* (Salicaceae) in sections *Aigeiros* and *Tacamahaca*. I. Population studies of *P. X parryi*. *Can. J. Bot.* 62: 317-324.
- Eckenwalder, J. E. 1984b. Natural intersectional hybridization between North American species of *Populus* (Salicaceae) in sections *Aigeiros* and *Tacamahaca*. III. Paleobotany and evolution. *Can. J. Bot.* 62: 336-342.
- Eckenwalder, J. E. 1984c. Natural intersectional hybridization between North American species of *Populus* (Salicaceae) in sections *Aigeiros* and *Tacamahaca*. II. Taxonomy. *Can. J. Bot.* 62: 325-335.
- Eckenwalder, J. E. 1996. Systematics and evolution of *Populus*. In *Biology of Populus and its implications for management and conservation*, Edited by R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr., P. E. Heilman and T. M. Hinkley. NRC Research Press, National Research Council Canada, Ottawa, ON. pp. 7-32.
- Edwards, W. R. N. 1978. Effect of salicin content on palatability of *Populus* foliage to opossum (*Trichosurus vulpecula*). *N. Z. J. Sci.* 21: 103-106.
- Einspahr, D. W., and Benson, M. K. 1967. Geographic variation of quaking aspen in Wisconsin and Upper Michigan. *Silvae Genet.* 16: 106-112.
- Einspahr, D. W., and Winton, L. L. 1976. Genetics of quaking aspen. Res. Pap. WO-25, USDA For. Serv. 23 pp.
- Einspahr, D. W., van Buijtenen, J. P., and Peckham, J. R. 1963. Natural variation and heritability in triploid aspen. *Silvae Genet.* 12: 51-58.
- Farmer, R. E., Jr. 1964a. Cottonwood flowering as related to cold requirements of flower buds. *For. Sci.* 10: 296-299.
- Farmer, R. E., Jr. 1964b. Sex ratio and sex-related characteristics in eastern cottonwood. *Silvae Genet.* 13: 116-118.
- Farmer, R. E., Jr. 1966. Variation in time of flowering and seed dispersal of eastern cottonwood in the

- lower Mississippi Valley. *For. Sci.* 12: 343-347.
- Farmer, R. E., Jr. 1970. Genetic variation among open-pollinated progeny of eastern cottonwood. *Silvae Genet.* 19: 149-151.
- Farmer, R. E., Jr. 1976. Sexual reproduction of eastern cottonwood. *In Proceedings of Symposium on Eastern Cottonwood and Related Species*, Greenville, Mississippi. Louisiana State Univ., Baton Rouge, LA. pp. 89-98.
- Farmer, R. E., Jr. 1991. Genetic improvement of poplar in western Canada: alternatives, opportunities, and pitfalls. *In Aspen management for the 21st century*. Edited by S. Navratil and P. B. Chapman. pp. 129-134.
- Farmer, R. E., Jr. 1993. Latitudinal variation in height and phenology of balsam poplar. *Silvae Genet.* 42: 148-153.
- Farmer, R. E., Jr. 1996. Geneecology of *Populus*. *In Biology of Populus and its implications for management and conservation*. Edited by R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr., P. E. Heilman and T. M. Hinkley. NRC Research Press, National Research Council Canada, Ottawa, ON. pp. 33-55.
- Farmer, R. E., Jr., and Pitcher, J. A. 1981. Pollen handling for Southern hardwoods. *In Pollen management handbook*. Edited by E. C. Franklin. Agriculture Handbook 587, USDA For. Serv., Washington, DC. pp. 77-83.
- Farmer, R. E., Jr., and Reinholt, R. W. 1986. Genetic variation in dormancy relations of balsam poplar along a latitudinal transect in northwestern Ontario. *Silvae Genet.* 35: 38-42.
- Farmer, R. E., Jr., and Wilcox, J. R. 1968. Preliminary testing of eastern cottonwood clones. *Theor. Appl. Genet.* 38: 197-201.
- Farmer, R. E., Jr., Cheliak, W. M., Perry, D. J., Knowles, P., Barrett, J., and Pitel, J. A. 1988a. Isozyme variation in balsam poplar along a latitudinal transect in northwestern Ontario. *Can. J. For. Res.* 18: 1078-1081.
- Farmer, R. E., Jr., Garlick, K., and Watson, S. 1988b. Heritability and C effects in a 3-year-old balsam poplar clonal test. *Can. J. For. Res.* 18: 1059-1062.
- Farmer, R. E., Jr., Freitag, M., and Garlick, K. 1989. Genetic variance and 'C' effects in balsam poplar rooting. *Silvae Genet.* 38: 62-65.
- Farrar, J. L. 1995. *Trees in Canada*. Fitzhenry & Whiteside/Canadian Forest Service, Markham and Ottawa.
- Fechner, G. H., Burr, K. E., and Myers, J. F. 1981. Effects of storage, temperature, and moisture stress on seed germination and early seedlings development of trembling aspen. *Can. J. For. Res.* 11: 718-722.
- Finch, D. M., and Ruggiero, L. F. 1993. Wildlife habitats and biological diversity in the Rocky Mountains and the northern Great Plains. *Natural Areas Journal* 13: 191-203.
- Foster, G. S. 1985. Genetic parameters for two eastern cottonwood populations in the lower Mississippi Valley. *In Proceedings of the 18th Southern Forest Tree Improvement Conference*, 21-23 May 1985, Long Beach, MS. Edited by R. C. Schmidtling and M. M. Griggs. pp. 258-266.
- Foster, G. S. 1986. Provenance variation of eastern cottonwood in the lower Mississippi Valley. *Silvae Genet.* 35: 32-38.
- Foster, G. S., and Shaw, D. V. 1988. Using clonal replicates to explore genetic variation in a perennial plant species. *Theor. Appl. Genet.* 76: 788-794.
- Fowells, H. A. 1965. *Silvics of forest trees of the United States*. Agricultural Handbook No. 271, Forest Service, USDA, Washington, DC. 762 pp.

- French, J. R. , and Hart, J. H. 1978. Variation in resistance of trembling aspen to *Hypoxylon mammatum* identified by inoculating naturally occurring clones. *Phytopathology*, 68: 485-489.
- Frölich, H. , and van der Meiden, H. A. 1979. Propagation of poplars; nursery techniques. *In* Poplars and willows in wood production and land use. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. pp. 88-106.
- Frölich, H. J. , and Weisgerber, H. 1985. Research on *in vitro* techniques within the framework of poplar breeding - results and future trends. *Silvae Genet.* 34: 132-137.
- Furniss, R. L. and Carolin, V. M. 1977. Western Forest Insects. USDA Forest Service Miscellaneous Publication No. 1339.
- Gallo, L. A. , Stephan, B. R. , and Krusche, D. 1985. Genetic variation of *Melampsora* leaf rust resistance in progenies of crossings between and within *Populus tremula* and *P. tremuloides* clones. *Silvae Genet.* 34: 208-214.
- Grant, M. C. , and Mitton, J. B. 1979. Elevational gradients in adult sex ratios and sexual differentiation in vegetative growth rates of *Populus tremuloides* Michx. *Evolution*, 33: 914-918.
- Grant, M. C. , Mitton, J. B. , and Linhart, Y. B. 1992. Even larger organisms. *Nature*, 360: 216.
- Guries, R. P. , and Stettler, R. F. 1976. Prefertilization barriers to hybridization in the poplars. *Silvae Genet.* 25: 37-43.
- Hall, R. B. , Colletti, J. P. , Schultz, R. C. , Faltonson, R. R. , Kolison, S. H. , Jr. , Hanna, R. D. , Hillson, T. D. , and Morrison, J. W. 1989. Commercial-scale vegetative propagation of aspens. *In* Proceedings of Aspen Symposium, 25-27 July 1989, Duluth, MN. Gen. Tech. Rep. NC-140, USDA Forest Service, Duluth, MN. pp. 211-219.
- Heilman, P. E. , and Stettler, R. F. 1985. Genetic variation and productivity of *Populus trichocarpa* and its hybrids. II. Biomass production in a 4-year plantation. *Can. J. For. Res.* 15: 384-388.
- Heilman, P. E. , Hinckley, T. M. , Roberts, D. A. , and Ceulemans, R. 1996. Production physiology. *In* Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. Edited by R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr. , P. E. Heilman and T. M. Hinkley. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, ON. pp. 459-489.
- Heimburger, C. 1936. Report on poplar hybridization. *For. Chron.* 12: 285-290.
- Heimburger, C. 1968. Poplar breeding in Canada. *In* Growth and utilization of poplars in Canada. Publ. No. 1205, Can. For. Bra. pp. 88-100.
- Hellum, A. K. 1973. Seed storage and germination of balsam poplar. *Can. J. Plant Sci.* 53: 227-228.
- Hepting, G. H. 1971. Diseases of Forest Shade Trees of the United States. USDA Forest Service Agricultural Handbook No. 386.
- Hiratsuka, Y. 1987. Forest Tree Diseases of the Prairie Provinces. *Can. For. Serv. , North For. Cent. , Edmonton, Alberta. Inf. Rep. NOR-X-286. ISBN 0-662-15281-6, ISSN 0704-7673.*
- Hsiang, T. , Chastagner, G. A. , Dunlap, J. M. , and Stettler, R. F. 1993. Genetic variation and productivity of *Populus trichocarpa* and its hybrids. VI. Field susceptibility of seedlings to *Melampsora occidentalis* leaf rust. *Can. J. For. Res.* 23: 436-441.
- Hyun, J. O. , Rajora, O. P. , and Zsuffa, L. 1987. Genetic variation in trembling aspen in Ontario based on isozyme studies. *Can. J. For. Res.* 17: 1134-1138.
- Ilstedt, B. , and Gullberg, U. 1993. Genetic variation in a 26-year-old hybrid aspen trial in southern Sweden. *Scand. J. For. Res.* 8: 185-192.
- [IPC] International Poplar Commission. 1992. Proceedings Working Party on Breeding and Selection of Poplars and Willows, 19th Session IPC, Zaragoza, Spain, 22-25 September 1992. International Pop-

- lar Commission.
- [IPC] International Poplar Commission. 1996. Synthesis of national reports on activities related to poplar and willow areas, production, consumption and the functioning of the National Poplar Commissions. Secretariat Note, 20th Session, Budapest, Hungary, 2-4 October 1996, International Poplar Commission. 10 pp.
- Jackson, D. I., and Sweet, G. B. 1972. Flower initiation in temperate wood plants; a review based largely on the literature of conifers and deciduous fruit trees. *Horticult. Abstr.* 42: 9-24.
- Jelinski, D. E., and Cheliak, W. M. 1992. Genetic diversity and spatial subdivision of *Populus tremuloides* (Salicaceae) in a heterogeneous landscape. *Amer. J. Bot.* 79: 728-736.
- Johnson, R. L. 1990. *Populus heterophylla* L. Swamp cottonwood. In *Silvics of North America*. Vol. 2, Hardwoods. Edited by R. M. Burns and B. H. Honkala. Agriculture Handbook 654, Forest Service, USDA, Washington, DC. pp. 551-554.
- Jokela, J. J. 1966. Incidence and heritability of *Melampsora* rust in a seedling plantation of hybrid poplar. In *Breeding pest resistant trees*. Edited by H. D. Gerhold, E. J. Schriener, R. E. McDermott and J. A. Winieski. Pergamon Press, Oxford, UK. pp. 111-117.
- Jones, J. R. 1985. Distribution. In *Aspen: ecology and management in the western United States*. Edited by N. V. DeByle and R. P. Winokur. Gen. Tech. Rep. RM-119, USDA Forest Service, Fort Collins, CO. pp. 9-10.
- Kaul, R. B. 1995. Reproductive structure and organogenesis in a cottonwood, *Populus deltoides* (Salicaceae). *Int. J. Plant Sci.* 156: 172-180.
- Kay, C. E. 1993. Aspen seedlings in recently burned areas of Grand Teton and Yellowstone National Parks. *Northwest Sci.* 67: 94-104.
- Keenan, T. J., and Cwynar, L. C. 1992. Late Quaternary history of black spruce and grasslands in southwest Yukon Territory. *Can. J. Bot.* 70: 1336-1345.
- Kemperman, J. A., and Barnes, B. V. 1976. Clone size in American aspens. *Can. J. Bot.* 54: 2603-2607.
- Khosla, P. K., and Khurana, K. D. 1982. Evolution of genus *Populus* L. and systematic placement of *P. ciliata* Wall. ex Royle. *J. Tree Sci.* 1: 81-87.
- Knopf, F. L., Johnson, R. R., Rich, T., Samson, F. B., and Szaro, R. C. 1988. Conservation of riparian ecosystems in the United States. *Wilson Bull.* 100: 272-284.
- Knox, R. B. 1984. Pollen-pistil interactions. In *Cellular interactions*. Edited by H. F. Linskens and J. Heslop-Harrison. Springer Verlag, Berlin. pp. 508-608.
- Knox, R. B., Willing, R. R., and Pryor, L. D. 1972. Interspecific hybridization in poplars using recognition pollen. *Silvae Genet.* 21: 65-69.
- Knox, R. B., Gaget, M., and Dumas, C. 1987. Mentor pollen techniques. *Int. Rev. Cytol.* 107: 315-332.
- Kouider, M., Skirvin, R. M., Saladin, K. P., Dawson, J. O., and Jokela, J. J. 1984. A method to culture immature embryos of *Populus deltoides* *in vitro*. *Can. J. For. Res.* 14: 956-958.
- Krüssmann, G. 1985. Manual of cultivated broad-leaved trees and shrubs. Vol. II, E-PRO. Timber Press, Portland, OR. 445 pp. [Translated by M. E. Epp from the 1977 German edition]
- Laidly, P. R. 1990. *Populus grandidentata* Michx. Bigtooth aspen. In *Silvics of North America*. Vol. 2, Hardwoods. Edited by R. M. Burns and B. H. Honkala. Agriculture Handbook 654, Forest Service, USDA, Washington, DC. pp. 544-550.
- Legionnet, A., Faivre-Rampant, P., Villar, M. and Lefèvre, F. 1997. Sexual and asexual reproduc-

- tion in natural stands of *Populus nigra*. Bot. Acta 110: 257-263.
- Larsen, C. S. 1956. Genetics in silviculture. Oliver and Boyd, Edinburgh. [Translated by M. L. Anderson]
- Lerner, I. M. 1958. The genetic basis of selection. John Wiley & Sons, New York. 298 pp.
- Lester, D. T. 1963a. Floral initiation and development in quaking aspen. For. Sci. 9: 323-329.
- Lester, D. T. 1963b. Variation in sex expression in *Populus tremuloides* Michx. Silvae Genet. 12: 141-151.
- Li, B. 1995. Aspen improvement strategies for western Canada - Alberta and Saskatchewan. For. Chron. 71: 720-724.
- Li, B., and Wyckoff, G. W. 1991. A breeding strategy to improve aspen hybrids for the University of Minnesota Aspen/Larch Genetics Cooperative. In Proceedings of the International Energy Agency 1991 Joint Meeting of the Task V Activity Groups on Exchange of Genetic Material, Disease/Management, and Joint Trials of *Alnus*, *Populus*, and *Salix*, 22-27 August, 1991. Iowa State University, Ames, Iowa. pp. 33-41.
- Li, B., Wyckoff, G. W., and Einspahr, D. W. 1993. Hybrid aspen performance and genetic gains. North. J. Appl. For. 10: 117-122.
- Lindsey, J. P., and Gilbertson, R. L. 1978. Basidiomycetes that decay aspen in North America. Bibl. Mycol. 63: 1-406.
- Lund, S. T., Furnier, G. R., and Mohn, C. A. 1992. Isozyme variation in quaking aspen in Minnesota. Can. J. For. Res. 22: 521-524.
- Manion, P. D., and Griffin, D. H. 1986. Sixty-five years of research on *Hypoxylon canker* of aspen. Plant Disease, 70: 803-808.
- Martinsen, G. D., and Whitham, T. G. 1994. More birds nest in hybrid cottonwoods. Wilson Bull. 106: 474-481.
- McDonough, W. T. 1979. Quaking aspen - seed germination and early seedling growth. Res. Pap. INT-234, USDA For. Serv., Ogden, UT. 13 pp.
- McDonough, W. T. 1985. Sexual reproduction, seeds and seedlings. In Aspen: ecology and management in the western United States. Edited by N. V. DeByle and R. P. Winokur. Gen. Tech. Rep. RM-119, USDA Forest Service, Fort Collins, CO.
- McLetchie, D. N., Tuskan, G. A., and Dietrichson, J. 1994. Gender determination in *Populus*. Norweigan J. Agric. Sci. 18: 57-66.
- Melchior, G. H. 1967. Zwei Funde von Zwitterigkeit an Pappeln der Sektion *Aigeiros*. Silvae Genet. 16: 77-80.
- Melchior, G. H., and Seitz, F. W. 1968. Interspezifische Kreuzungssterilität innerhalb der Pappelsektion *Aigeiros*. Silvae Genet. 17: 88-93.
- Michler, C. H. and Bauer, E. O. 1991. High frequency somatic embryogenesis from leaf tissue of *Populus* spp. Plant Science 77: 111-118.
- Mitton, J. B., and Grant, M. C. 1980. Observations on the ecology and evolution of quaking aspen *Populus tremuloides*, in the Colorado front range. Amer. J. Bot. 67: 202-209.
- Mitton, J. B., and Grant, M. C. 1996. Genetic variation and the natural history of quaking aspen. BioScience, 46: 25-31.
- Mohn, C. A., and Randall, W. K. 1971. Inheritance and correlation of growth characters in *Populus deltoides*. Silvae Genet. 20: 182-184.
- Mohn, C. A., and Randall, W. K. 1973. Interaction of cottonwood clones with site and planting year.

- Can. J. For. Res. 3: 329-332.
- Mohr diek, O. 1983. Discussion: future possibilities for poplar breeding. Can. J. For. Res. 13: 465-471.
- Morley, P. M., and Balatinecz, J. J. 1993. Poplar utilization in Canada: past, present and future. For. Chron. 69: 46-52.
- Mühle Larsen, C. 1960. L'Amélioration du peuplier par voie génétique. Extrait de bulletin de la Société Royale Forestière de Belgique, Mars-Avril: 48 pp.
- Müntzing, A. 1936. The chromosomes of a giant *Populus tremula*. Hereditas, 21: 383-393.
- Muller, C., and Tessier du Cros, E. 1982. Storage of *Populus nigra* seed for five years. Ann. Sci. For. 39: 179-185.
- Mullin, T. J., and Park, Y. S. 1992. Estimating genetic gains from alternative breeding strategies for clonal forestry. Can. J. For. Res. 22: 14-23.
- Nagaraj, M. 1952. Floral morphology of *Populus deltoides* and *P. tremuloides*. Bot. Gaz. 114: 222-243.
- Nelson, C. D., and Tauer, C. G. 1987. Genetic variation in juvenile characters of *Populus deltoides* Bartr. from the southern Great Plains. Silvae Genet. 36: 216-221.
- Neuman, D. S., Wagner, M., Braatne, J. H., and Howe, J. 1996. Stress physiology -- abiotic. In Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. Edited by R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr., P. E. Heilman and T. M. Hinkley. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, ON. pp. 423-458.
- Newcombe, G. 1996. The specificity of fungal pathogens of *Populus*. In Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. Edited by R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr., P. E. Heilman and T. M. Hinkley. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, ON. pp. 223-246.
- Ostry, M. E., and McNabb, H. S., Jr. 1986. *Populus* species and hybrid clones resistant to *Melampsora*, *Marssonina*, and *Septoria*. Res. Pap. NC-272, North Central Forest Experiment Station, USDA Forest Service. 6 pp.
- Owens, J. N., and Blake, M. D. 1985. Forest tree seed production. Inform. Rep. PI-X-53, Petawawa National Forestry Institute, Can. For. Serv., Chalk River, ON. 161 pp.
- Pauley, S. S. 1950. Flowering habits in *Populus*. Genetics, 35: 684. [abstract]
- Perala, D. A. 1990. *Populus tremuloides* Michx. Quaking aspen. In Silvics of North America. Vol. 2, Hardwoods. Edited by R. M. Burns and B. H. Honkala. Agriculture Handbook 654, Forest Service, USDA, Washington, DC. pp. 555-569.
- Peterson, E. B., Peterson, N. M., and McLennan, D. S. 1996 (March). Black Cottonwood and Balsam Poplar Manger's Handbook for British Columbia. FRDA Report # 250. ISSN 0-7726-2952-8.
- Peto, F. H. 1938. Cytology of poplar species and natural hybrids. Can. J. Res. (Sec. C) 16: 445-455.
- [PCC] Poplar Council of Canada. 1996a. Activities related to poplar and willow cultivation, exploitation and utilization. Canadian report to the 20th session of the International Poplar Commission, Canadian Forest Service, Poplar Council of Canada, Ottawa, ON. 12 pp.
- [PCC] Poplar Council of Canada. 1996b. Environmental and social issues in poplar and willow growing and utilization. Canadian report on the theme of the 20th session of the International Poplar Commission, Canadian Forest Service, Poplar Council of Canada, Ottawa, ON. 12 pp.
- Pinon, J. 1992a. Variability in the genus *Populus* in sensitivity to rusts. Silvae Genet. 41: 25-34.

- Pinon, J. 1992b. Frequency and evolution of *Melampsora larici-populina* Klebahn races in North-Western France. *Ann. Sci. For.* 49: 1-15.
- Pinon, J. 1995. Présence en France d'une nouvelle race de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille foliaire des peupliers cultivés. *Rev. For. Fr.* 47: 230-234.
- Pinon, J. and Frey, P. 1997. Structure of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar. *Eur. J. Plant. Pathol.* 103: 159-173.
- Pinon, J. and Valadon, A. 1997. Comportement des cultivars de peupliers commercialisables dans l'union Européenne vis-à-vis de quelques parasites majeurs. *Ann. Sci. For.* 54: 19-38.
- Rajora, O. P., Zsuffa, L., and Dancik, B. P. 1991. Allozyme and leaf morphological variation of eastern cottonwood at the northern limits of its range in Ontario. *For. Sci.* 37: 688-702.
- Rajora, O. P., Zsuffa, L., and Yeh, F. C. 1994. Variation, inheritance and correlations of growth characters and *Melampsora* leaf rust resistance in full-sib families of *Populus*. *Silvae Genet.* 43: 219-226.
- Randall, W. K., and Cooper, D. T. 1973. Predicted genotypic gain from cottonwood clonal tests. *Silvae Genet.* 22: 165-167.
- Raquin, C., Troussard, L., and Villar, M. 1993. In-ovary embryo culture as a tool for poplar hybridization. *Can. J. Bot.* 71: 1271-1275.
- Reighard, G. W., and Hanover, W. 1985. Progeny testing of native aspens and their hybrids for biomass production in Michigan. *In Proceedings 29th Northeastern Forest Tree Improvement Conference, Morgantown, WV, 1984.* pp. 5-22.
- Riemenschneider, D. E., and McMahon, B. G. 1993. Genetic variation among Lake States balsam poplar populations is associated with geographic origin. *For. Sci.* 39: 130-136.
- Riemenschneider, D. E., McMahon, B. G., and Ostry, M. E. 1992. Use of selection indices to increase tree height and to control damaging agents in 2-year-old balsam poplar. *Can. J. For. Res.* 22: 561-567.
- Riemenschneider, D. E., McMahon, B. G., and Ostry, M. E. 1994. Population-dependent selection strategies needed for 2-year-old black cottonwood clones. *Can. J. For. Res.* 24: 1704-1710.
- Riemenschneider, D. E., Stelzer, H. E., and Foster, G. S. 1996. Quantitative genetics of poplars and poplar hybrids. *In Biology of Populus and its implications for management and conservation. Edited by R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr., P. E. Heilman and T. M. Hinkley.* NRC Research Press, National Research Council Canada, Ottawa, ON. pp. 159-181.
- Roberts, M. R., and Richardson, C. J. 1985. Forty-one years of population change and community succession in aspen forests on four soil types, northern lower Michigan, USA. *Can. J. Bot.* 63: 1641-1651.
- Rogers, D. L., Stettler, R. F., and Heilmann, P. E. 1989. Genetic variation and productivity of *Populus trichocarpa* and its hybrids. III. Structure and pattern of variation in a 3-year field test. *Can. J. For. Res.* 19: 372-377.
- Romme, W. H., Turner, M. G., Wallace, L. L., and Walker, J. S. 1995. Aspen, elk, and fire in northern Yellowstone National Park. *Ecology*, 76: 2097-2106.
- Rood, S. B., Campbell, J. S., and Despains, T. 1986. Natural poplar hybrids from southern Alberta. I. Continuous variation for foliar characteristics. *Can. J. Bot.* 64: 1382-1388.
- Rougier, M., Jnoud, N., Said, C., Russell, S., and Dumas, C. 1992. Interspecific incompatibility in *Populus*: inhibition of tube growth and behaviour of the male germ unit in *P. deltoides* X *P. alba*. *Protoplasma*, 168: 107-112.

- Sargent, C. S. 1965. Manual of the trees of North America (exclusive of Mexico). Dover, New York. 934 pp.
- Savka, M. A., Dawson, J. O., Jokela, J. J., and Skirvin, R. M. 1987. A liquid culture method for rescuing immature embryos of eastern cottonwood. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 10: 221-226.
- Schier, G. A. 1973. Origin and development of aspen root suckers. *Can. J. For. Res.* 3: 45-53.
- Schier, G. A., Jones, J. R., and Winokur, R. P. 1985. Vegetative regeneration. In *Aspen: ecology and management in the western United States*. Edited by N. V. DeByle and R. P. Winokur. Gen. Tech. Rep. RM-119, USDA Forest Service, Fort Collins, CO.
- Schnekenburger, F., and Farmer, R. E., Jr. 1989. Genetic variance in growth of balsam poplar under 16- and 8-hour photosynthetic periods. *For. Sci.* 35: 903-919.
- Schreiner, E. J. 1974. *Populus* L. -- Poplar. In *Seeds of woody plants in the United States*. Edited by C. S. Schopmeyer. Agricultural Handbook No. 450, Forest Service, USDA, Washington, DC. pp. 645-655.
- Seitz, F. W. 1958. Frühtriebversuche mit Blühreisern der Aspe. *Silvae Genet.* 7: 102-105.
- Smit, B. A. 1988. Selection of flood-resistant and susceptible seedlings of *Populus trichocarpa* Torr. & Gray. *Can. J. For. Res.* 18: 271-275.
- Smith, E. C. 1943. A study of the cytology and speciation in the genus *Populus*. *J. Arnold Arboretum* 24: 275-304.
- Smith, J. H. G. 1957. Some factors indicative of site quality for black cottonwood (*Populus trichocarpa* Torr. and Gray). *J. For.* 55: 578-580.
- Smith, R. L., and Symata, K. J. 1990. Evolution of *Populus nigra* (sect. *Aigeiros*): introgressive hybridization and the chloroplast contribution of *Populus alba* (sect. *Populus*). *Amer. J. Bot.* 77: 1176-1187.
- Stanton, B. J., and Villar, M. 1996. Controlled reproduction of *Populus*. In *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. Edited by R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr., P. E. Heilman and T. M. Hinkley. NRC Research Press, National Research Council Canada, Ottawa, ON. pp. 113-138.
- Steenackers, V. 1996. Towards a global management of poplar genetic resources. Presentation at 20th Session of the International Poplar Commission, Budapest, Hungary, 1-4 October 1996, International Poplar Commission. 11 pp.
- Stettler, R. F. 1968. Irradiated mentor pollen; its use in remote hybridization of black cottonwood. *Nature*, 219: 746-747.
- Stettler, R. F., and Ager, A. A. 1984. Mentor effects in pollen interactions. In *Cellular interactions*. Edited by H. F. Linskens and J. Heslop-Harrison. Springer Verlag, Berlin. pp. 609-623.
- Stettler, R. F., Koster, R., and Steenackers, V. 1980. Interspecific crossability studies in poplars. *Theor. Appl. Genet.* 58: 273-282.
- Stettler, R. F., Fenn, R. C., Heilman, P. E., and Stanton, B. J. 1988. *Populus trichocarpa* X *Populus deltoides* hybrids for short rotation culture: variation patterns and 4-year field performance. *Can. J. For. Res.* 18: 745-753.
- Stettler, R. F., Bradshaw, H. D., Jr., Heilman, P. E., and Hinkley, T. M. 1996a. Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. NRC Research Press, National Research Council Canada, Ottawa, ON. 539 pp.
- Stettler, R. F., Zsuffa, L., and Wu, R. L. 1996b. The role of hybridization in the genetic manipulation of *Populus*. In *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. Edited

- by R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr., P. E. Heilman and T. M. Hinkley. NRC Research Press, National Research Council Canada, Ottawa, ON. pp. 87-112.
- Stout, A. B., and Schreiner, E. J. 1933. Results of a project in hybridizing poplars. *J. Hered.* 24: 217-227.
- Tauer, C. G. 1979. Seed tree, vacuum, and temperature effects on eastern cottonwood seed viability during extended storage. *For. Sci.* 25: 112-114.
- Terrasson, D., Pinon, J., and Ridé, M. 1988. L'infection naturelle de *Populus trichocarpa* par *Hypoxyylon mammatum*. *Rev. For. Fr.* 40: 126-130.
- Thielges, B. A. 1985. Breeding poplars for disease resistance. Forestry Paper 56, FAO, Rome. 66 pp.
- Thielges, B. A., and Adams, J. C. 1975. Genetic variation and heritability of *Melampsora* leaf rust resistance in eastern cottonwood. *For. Sci.* 21: 278-282.
- Thomas, G. P., Etheridge, D. E., and Paul, G. 1960. Fungi and decay in aspen and balsam poplar in the boreal forest region, Alberta. *Can. J. Bot.* 38: 459-466.
- Turok, J., Lefèvre, F., de Vries, S. and Toth, B. 1997 *Populus nigra* network. Report of the third meeting, 5-7 October 1996, Saver, Hungary, IPGRI, Rome, Italy. 27p.
- USDA Forest Service, 1979. A Guide to Common Insects and Diseases of Forest Trees in the Northeastern United States. USDA Forest Service, Northeast. Area State Priv. For. Publ. NA-FR-4 (Address: Northeastern Area, State and Private Forestry, 370 Reed Road, Broomal, PA 19008).
- Valentine, F. A. 1962. Natural variation in specific gravity in *Populus tremuloides* in northern New York. In Proceedings 9th Northeastern Forest Tree Improvement Conference, 1961. pp. 17-24.
- van Buijtenen, J. P., and Einspahr, D. W. 1959. Note on the presence of sex chromosomes in *Populus tremuloides*. *Bot. Gaz.* 121: 60-61.
- van Buijtenen, J. P., Einspahr, D. W., and Joranson, P. N. 1959. Natural variation in *Populus tremuloides* Michx. *Tappi* 42: 819-823.
- Viereck, L. A., Dyrness, C. T., van Cleve, K., and Foote, M. J. 1983. Vegetation, soils, and forest productivity in selected forest types in interior Alaska. *Can. J. For. Res.* 13: 703-720.
- Villar, M., Gaget, M. and Dumas, C. 1987a The route of pollen tube from stigma to ovule in *Populus nigra*; a new look. *Ann. Sci For.* 44: 259-264.
- Villar, M., Gaget, M., Said, C., Knox, R. B., and Dumas, C. 1987b Incompatibility in *Populus*: structure and cytochemical characteristics of the receptive stigmas of *Populus alba* and *Populus nigra*. *J. Cell. Sci.* 87: 483-490.
- Villar, M., Gaget, M., Rougier, M., and Dumas, C. 1993. Pollen-pistil interactions in *Populus*: beta galactosidase activity associated with pollen tube growth in the crosses *P. nigra* x *P. nigra* and *P. nigra* . x *P. alba*. *Sex. Plant Reprod.* 65: 249-256.
- Villar, M., Lefèvre, F., Bradshaw, H. D., Teissier du Cros, E. 1996. Molecular genetics of rust resistance in poplars (*Melaampsora larici-populina* Kleb/*Populus* sp.) by bulked segregant analysis in a 2 x 2 factorial mating design. *Genetics* 143: 531-536.
- Villar, M., Gaget-Faurobert, M. 1996. Mentor Effects in pistil-mediated pollen-pollen interactions. In "Pollen biotechnology for Crop Production and Improvement." K. R. Shivanna and W. K. Sawhney Edited by Cambridge University Press, new York, pp. 315-322.
- Walker, L. R., and Chapin, F. S., III. 1986. Physiological controls over seedling growth in primary succession on an Alaskan floodplain. *Ecology*, 67: 1508-1523.
- Walker, L. R., Zasada, J. C., and Chapin, F. S., III. 1986. The role of life history processes in

- primary succession on an Alaskan floodplain. *Ecology*, 67: 1243-1253.
- Wang, S. 1996. Approaching poplar's functions in the improvement of environment in China's Tree North Shelterbelt System. *In* Environmental and social issues in poplar and willow cultivation and utilization. Proceedings 20th Session of the International Poplar Commission, Budapest, 1-4 October 1996. Vol. 1. Edited by I. Bach. International Poplar Commission, FAO, Budapest. pp. 500-503.
- Waterman, A. M. 1957. Canker and dieback of poplars caused by *Dothichiza populea*. *For. Sci.* 3: 175-183.
- Weber, J. C., Stettler, R. F., and Heilman, P. E. 1985. Genetic variation and productivity of *Populus trichocarpa* and its hybrids. I. Morphology and phenology of 50 native clones. *Can. J. For. Res.* 15: 376-383.
- Weisgerber, H., Kowanatzki, D., and Mussong, M. 1995. Natural poplar resources in China and their significance for breeding and afforestation. *Silvae Genetica*, 44: 298-303.
- Whitecross, M. I., and Willing, R. R. 1975. Hybridization of incompatible poplars following solvent treatment of stigmas. *Experientia*, 31: 651-653.
- Whitham, T. G. 1989. Plant hybrid zones as sinks for pests. *Science*, 244: 1490-1493.
- Whitham, T. G., Floate, K. D., Martinsen, G. D., Driebe, E. M., and Keim, P. 1996. Ecological and evolutionary implications of hybridization: *Populus*-herbivore interactions. *In* Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. Edited by R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr., P. E. Heilman and T. M. Hinkley. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, ON. pp. 247-275.
- Widin, K. D., and Schipper, A. L., Jr. 1981. Epidemiology and impact of *Melampsora medusae* leaf rust infection on yield of hybrid poplars in the north-central United States. *Eur. J. For. Path.* 11: 438-448.
- Wilcox, J. R., and Farmer, R. E., Jr. 1967. Variation and inheritance of juvenile characters of eastern cottonwood. *Silvae Genet.* 16: 162-165.
- Wilcox, J. R., and Farmer, R. E., Jr. 1968. Heritability and C effects in early root growth of eastern cottonwood cuttings. *Heredity*, 23: 239-245.
- Willing, R. R., and Pryor, L. D. 1976. Interspecific hybridization in poplar. *Theor. Appl. Genet.* 47: 141-151.
- Wright, J. W. 1976. Introduction to forest genetics. Academic Press, New York. 463 pp.
- Wu, R. -L. 1994a. Quantitative genetics of yield breeding for *Populus* short-rotation culture. II. Genetic determination and expected selection response of tree geometry. *Can. J. For. Res.* 24: 155-165.
- Wu, R. -L. 1994b. Quantitative genetics of yield breeding for *Populus* short rotation culture. III. Efficiency of indirect selection on tree geometry. *Theor. Appl. Genet.* 88: 803-811.
- Yeh, F. C., Chong, D. K. X., and Yang, R. C. 1995. RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. *J. Hered.* 86: 454-460.
- Ying, C. C., and Bagley, W. T. 1976. Genetic variation in eastern cottonwood in an eastern Nebraska provenance study. *Silvae Genet.* 25: 67-73.
- Ying, C. C., and Bagley, W. T. 1977. Variation in rooting capacity of *Populus deltoides*. *Silvae Genet.* 26: 204-207.
- Zasada, J. C., and Phipps, H. M. 1990. *Populus balsamifera* L. Balsam poplar. *In* Silvics of North America. Vol. 2, Hardwoods. Edited by R. M. Burns and B. H. Honkala. Agriculture Handbook 654, Forest Service, USDA, Washington, DC. pp. 518-529.

- Zsuffa, L. 1971. A rapid method for vegetative propagation of aspens and their hybrids. *For. Chron.* 47: 36-39.
- Zsuffa, L. 1975. A summary review of interspecific breeding in the genus *Populus* L. *In Proceedings 14th meeting of the Canadian Tree Improvement Association, part 2.* Dept. Environment, Canadian Forestry Service, Ottawa. pp. 107-123.
- Zsuffa, L. 1993. Proposal for establishment and implementation of a certification service for poplar and willow planting stool. *Poplar Council of Canada Newsletter* 4: 4-6.
- Zsuffa, L., Sennerby-Forsse, L., Weisgerber, H., and Hall, R. B. 1993. Strategies for clonal forestry with poplars, aspens and willows. *In Clonal forestry II: Conservation and application.* Edited by M. R. Ahuja and W. J. Libby. Springer-Verlag, Berlin. pp. 91-119.
- Zsuffa, L., Giordano, E., Pryor, L. D., and Stettler, R. F. 1996. Trends in poplar culture: some global and regional perspectives. *In Biology of Populus and its implications for management and conservation.* Edited by R. F. Stettler, H. D. Bradshaw Jr., P. E. Heilman and T. M. Hinkley. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, ON. pp. 515-539.
- Zsuffa, L. 1971. Summary report on poplar and pine breeding in 1968 and 1969. *In Proc. 12th Meet. Comm. Forest Tree Breed. Can., Part 2.* pp. 53-63.

第八章

马铃薯新品种成分的共识文件：食品和饲料的关键营养素、抗营养成分和毒素*

第一节 背景

本文讨论了马铃薯的关键成分（营养素、抗营养成分和毒素），数据来源于常规育种技术选育的马铃薯品种，可用于评价其实质等同性（Love, 2000; Rogan et al, 2000）。

1. 马铃薯的产量

2000年，全世界马铃薯（*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*）的产量接近3.8亿吨（FAO, 2001），马铃薯广泛种植于120多个国家中（Burton, 1989）。

由于品种和种植条件的差异，马铃薯块茎的产量和成分变异很大。

2. 食用马铃薯

马铃薯在不同国家的平均消费量存在很大差异。FAO的相关统计数据(表8-1)。

表 8-1 1998 年马铃薯的平均消费量

	马铃薯消费量 (kg/人·年)		马铃薯消费量 (kg/人·年)
世界	30	北美	63
非洲	11	南美	31
亚洲	19	发展中国家	17
欧洲	94	发达国家	75
欧盟 (15个国家)	78		

数据来源：FAO, 2001。

在发达国家，人们对马铃薯的直接消费量显著下降，而对马铃薯加工产品（如薯条、薯片）的消费量增加。例如，在德国新鲜马铃薯的消费量已由1971年的87 kg/人·年下降到1999年的42 kg/人·年，但同时期马铃薯加工产品的消费量则由14 kg/人·年增加至29 kg/人·年（以新鲜马铃薯计算）。

由于含有无法消化的非糊化淀粉，并且存在抗营养蛋白，因此马铃薯在食用前需要煮熟。不同类型的加工制备方法会使营养物质发生不同程度的损失 [如未去皮的马铃薯在烹

* Originally published by the OECD in English under the title: "Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Potatoes; Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Toxicants" ©2002 OECD. All rights reserved.

饪过程中维生素 C 损失 13%，而去皮的马铃薯在烹饪过程中维生素 C 损失 41% (Weber and Putz, 1998)]。

由于消费者的需要，马铃薯越来越多地以加工产品的形式供应。马铃薯不同加工方法的示意图见图 8-1。

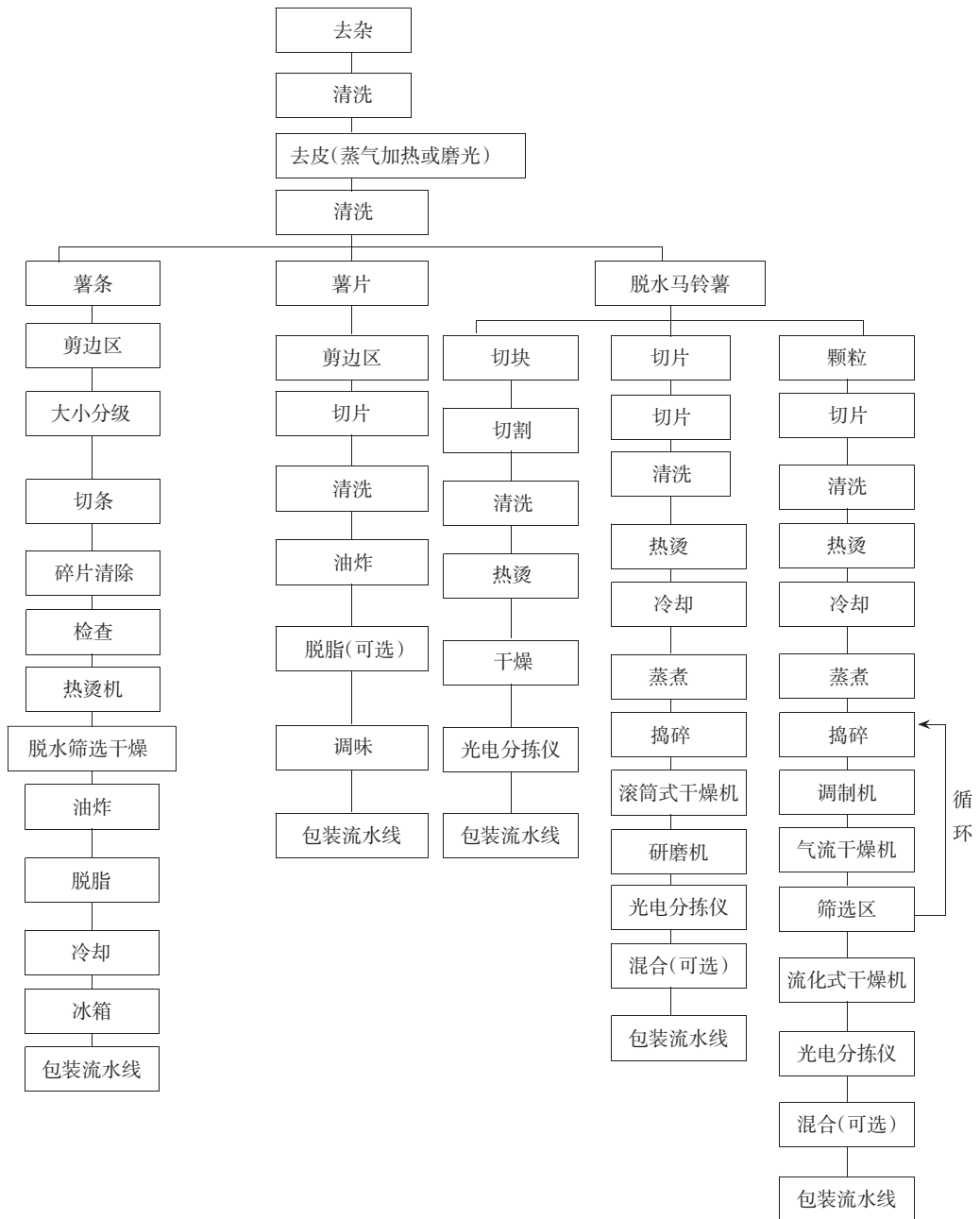


图 8-1 马铃薯加工示意图 (Lisinska and Leszczynski, 1989)

3. 工业用马铃薯

在欧洲，马铃薯可作为淀粉生产原料。欧盟每年约生产 190 万吨马铃薯淀粉（Anonymous, 1995）。由于马铃薯块茎含水量及其伴随的贮存问题，马铃薯淀粉的生产主要在秋天和初冬进行，因为马铃薯对霜冻敏感。

由于淀粉颗粒大、块茎结构特殊，马铃薯淀粉容易从块茎中分离。除了良好设备的大型工厂之外，小规模简易加工厂也可分离马铃薯淀粉（特别是在发展中国家）。马铃薯淀粉加工的典型生产线如图 8-2 所示。

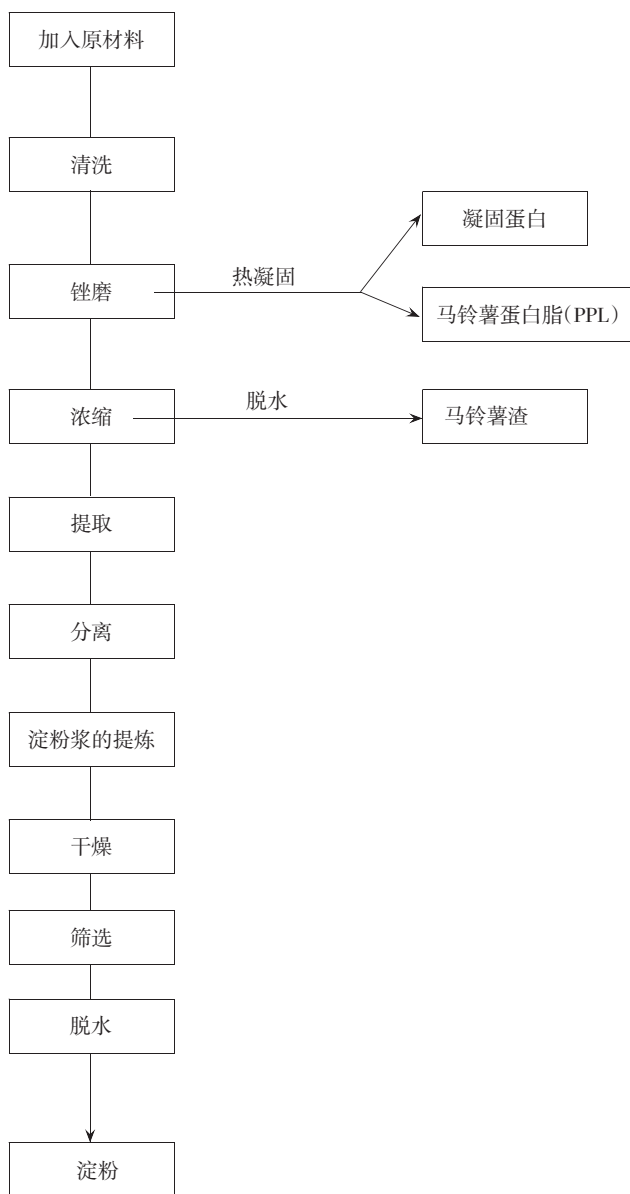


图 8-2 马铃薯淀粉加工的示意图

马铃薯淀粉为直链淀粉和支链淀粉的混合物 (75 : 25), 其特性与其他来源的淀粉不同。因此, 在涂布纸、棉花上浆以及纺织业尾工中, 优先选用马铃薯淀粉 (Treadway, 1975)。马铃薯淀粉也可用于食品工业, 特别是以预糊化淀粉改良形式应用。随着只含有一种主要成分或其他淀粉马铃薯品种的开发, 可以预见马铃薯在其他特定方面的应用。

马铃薯的副产品 (马铃薯渣、凝固蛋白) 通常用于饲养动物, 也可用于食品生产。

如果凝固蛋白是从糖苷生物碱含量高的马铃薯中制备而来 (特别是从未去皮的马铃薯中提取), 则由于蛋白质的毒素含量高而无法应用于食品工业。

马铃薯也可用于工业乙醇生产。乙醇生产的基本方法是将马铃薯在水中压榨和蒸煮, 将所得的糊状淀粉用酸或酶水解成糖, 在糖中加入酵母进行发酵, 2~3 天后完成发酵过程, 乙醇被馏出。1 吨马铃薯可生产 60~140L 乙醇。

蒸馏过程的残渣可用作饲料。

4. 饲用马铃薯

马铃薯在动物饲料的应用程度变化很大, 这主要取决于替代物的价格以及是否有可替代物。马铃薯营养素含量低, 因此不是有效的基础饲料。另一方面, 每公顷马铃薯中营养素的产量高于其他作物, 因此, 自产的饲用马铃薯比其他作物更具优势 (Burton, 1989)。马铃薯通常与其他饲料搭配应用, 通过互补效应满足动物的需求 (Burton, 1989; Schindler, 1996)。饲用马铃薯应用时, 需考虑补充氨基酸、矿物质和维生素来维持营养平衡。

在马铃薯加工业 (供食用和工业用) 发达的国家, 马铃薯加工后的残留物和副产品 (马铃薯皮、碎料、废弃的马铃薯、分离的马铃薯渣和蛋白质) 被用作饲料 (通常在脱水后)。在没有马铃薯加工业的国家, 达不到食品标准的马铃薯通常用于饲养牲畜 (Burton, 1989)。

马铃薯通常不经加工就能饲喂反刍动物, 但煮熟后才可饲喂猪。有关论文和课本介绍了各种动物饲养的实用指南 (如 Church, 1984; Pond et al, 1995)。动物饲料中马铃薯的加入比例如下 (Kling M. and Wöhlbier W., 1983):

- 猪: 按体重 (30~110 kg), 2.4~7.8 kg/天 (在猪生长的整个生育期, 马铃薯的总消费量约为 700 kg);
- 肉牛: 5~15 kg/天;
- 奶牛: 5~10 kg/天。

第二节 食品和饲料的关键营养素

马铃薯块茎是作为器官, 对环境影响十分敏感。因品种、气候条件、土壤类型和农业措施的不同, 马铃薯块茎的成分存在很大差异。马铃薯块茎的颜色因品种而异。表 8-2 列出了可安全食用的马铃薯品种中块茎的主要营养素。数值变化范围并不表示范围之外的数值一定为异常或存在某种有害作用。

表 8-2 马铃薯块茎的主要营养素（以鲜重计）

		平均值	范围
干物质 (DM)	%	23.7	13.1~36.8
淀粉	%	17.5	8.0~29.4
蛋白质	%	2.0	0.69~4.63
脂肪	%	0.12	0.02~0.2
食用纤维	%	1.7	1~2
粗纤维	%	0.71	0.17~3.48
矿物质 (粗灰粉)	%	1.1	0.44~1.87
糖	%	0.5	0.05~8.0
维生素 C+ 脱氢抗坏血酸	mg/kg	100~250	10~540

数据来源：Lisinska and Leszczynski, 1989；Woolfe, 1987a。

干物质

块茎的干物质（固体物质）由多种溶于水或不溶于水的物质组成。干物质的含量与比重有关，其范围为 1.048 5~1.151 g/cm³（Lisinska and Leszczynski, 1989）。比重是一个品质因子，用于干物质的测定。

干物质含量高（18%~24%）的马铃薯适于生产脱水食品和动物饲料。特别是高温油炸马铃薯（薯片和薯条），其最适干物质含量范围为 21%~24%。

贮存过程中，由于块茎的呼吸作用，干物质的损失可达鲜重的 8%或干重的 2%。呼吸强度取决于贮存条件。

淀粉

马铃薯干物质中含有 75%~80%的淀粉。

淀粉是确定食用或饲用马铃薯品质的最重要碳水化合物。淀粉含量高的块茎对机械损伤较为敏感（黑斑敏感性）。块茎在煮熟后通常为粉状。

马铃薯淀粉（天然淀粉和改良淀粉）是一种重要的食品成分和工业原料。

蛋白质

尽管加工过程中马铃薯蛋白质会变性，但其营养价值仍然很高，含有较高水平的必需氨基酸，如赖氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸和色氨酸等（表 8-3）。

马铃薯块茎的主要蛋白质为白蛋白、球蛋白、醇溶谷蛋白和麦谷蛋白。另有部分蛋白质分离物由糖蛋白（patatin，植物凝集素）、金属蛋白和磷酸化蛋白组成。通过块茎可溶性蛋白的凝胶电泳可区分马铃薯的种与品种。

表 8-3 马铃薯块茎中蛋白质的氨基酸组成

氨基酸	范围 (%)
丙氨酸	4.62~5.32
精氨酸	4.74~5.70
天冬氨酸	11.9~13.9

(续)

氨基酸	范围 (%)
半胱氨酸	0.20~1.25
谷氨酸	10.2~11.8
甘氨酸	4.30~6.05
组氨酸	2.10~2.50
异亮氨酸	3.73~5.80
亮氨酸	9.70~10.3
赖氨酸	6.70~10.1
甲硫氨酸	1.20~2.15
苯丙氨酸	4.80~6.53
脯氨酸	4.70~4.83
丝氨酸	4.90~5.92
苏氨酸	4.60~6.50
色氨酸	0.30~1.85
酪氨酸	4.50~5.68
缬氨酸	4.88~7.40

脂肪

马铃薯的脂类主要包括游离脂肪酸、脂肪和磷脂。亚油酸占总脂肪酸含量的40%~50%，亚麻酸占20%~30%，油酸占1%~5%，棕榈酸占20%，硬脂酸占5%。由于马铃薯块茎的脂肪含量很低（占鲜重的0.02%~0.2%），因此马铃薯不是重要的脂肪来源。

磷脂化合物中最重要的成分是卵磷脂。马铃薯块茎中存在极少量（占总脂类含量的0.1%~0.4%）的游离态类胡萝卜素及其脂肪酸酯类。

脂类中的不饱和脂肪酸使马铃薯易于氧化，这是加工和贮存中重要的考虑因素，尤其对脱水马铃薯产品而言。

食用纤维和粗纤维

膳食纤维由不溶性和可溶性多糖组成，也包括木质素和抗性淀粉。膳食纤维的定义侧重于“不可利用”。从这点讲，膳食纤维是所有被人小肠中酶消化的成分。不过，它们中的许多成分能在大肠中通过微生物发酵。食品的加工过程（如蒸煮或煎炸）可能会改变纤维的一些属性（胶质分解）和抗性淀粉的含量。

粗纤维由纤维素、半纤维素、戊聚糖和果胶组成，它们集中于细胞壁中。细胞壁的组成决定了马铃薯块茎的结构特征。在蒸煮过程中细胞壁遭到破坏，淀粉粒的膨胀和糊化导致细胞破裂，胞间层细胞的解体使细胞分离（煮熟的块茎软化）。同时细胞壁降解还伴随着果胶的释放和脱脂作用。

糖

马铃薯块茎的含糖量因品种、成熟状况和生理阶段不同存在很大差异。

贮存过程中，含糖量会发生改变。蔗糖含量的特定变化可用于指示马铃薯块茎的生理

年龄。

含糖量高（特别是还原性糖如葡萄糖和果糖含量）的马铃薯块茎不适合用作加工原材料，特别是对高温油炸和脱水产品而言。用于加工薯片的马铃薯，还原糖的含量不得超过鲜重的 0.15%；而薯条和脱水马铃薯生产中，块茎还原糖的含量不得超过鲜重的 0.25%。

4℃下贮存可抑制马铃薯发芽，不过大多数品种在此温度下，会因为淀粉水解导致还原糖的含量增加。

维生素

在块茎的制备和加工过程中，水溶性维生素可被洗出。此外，高温和氧化也会破坏维生素，据报道，因高温和氧化而损失的维生素可达 20%~80% (Kolbe, 1997)。由于维生素 C 可作为抗氧化剂被消耗，因此在贮存过程中维生素 C 的含量 (10~540 mg/kg) 也会降低。不过，马铃薯可提供人每日推荐维生素 C 摄入量的 40% 以上。

矿物质

马铃薯块茎中的主要阳离子是钾（占鲜重的 0.22%~0.94%）。钾离子约占总矿物质含量的 50% (Lisinska and Leszczynski, 1989)，可以提供人每日推荐钾摄入量的 30%。因此，低钾食品在制备前应将该物质浸出。钾的含量与有机酸的含量呈正相关。块茎中钠的含量特别低（占总矿物质含量的 3%）。

第三节 毒素和过敏原

糖苷生物碱

马铃薯天然含有各种生物碱。在马铃薯商业化品种中最重要的生物碱是糖苷生物碱 (GA)，它是由一个或多个糖分子（通常为 3 个）连接到甾体生物碱-龙葵次碱上构成的。

马铃薯块茎中的糖苷生物碱总量 (TGA) 差异很大，其变化范围为 2~410 mg/kg 鲜重 (Lisinska and Leszczynski, 1989)，但大多数情况下，马铃薯整个块茎的糖苷生物碱总量为 10~150 mg/kg 鲜重 (van Gelder, 1990)。马铃薯块茎中 95% 的糖苷生物碱由 α -卡茄碱（龙葵次碱-葡萄糖-鼠李糖-鼠李糖）和 α -茄碱（龙葵次碱-半乳糖-葡萄糖-鼠李糖）组成。

此外，可能存在少量的龙葵次碱和糖分子的其他组合形式：

- β -卡茄碱（龙葵次碱-葡萄糖-鼠李糖）；
- γ -卡茄碱（龙葵次碱-葡萄糖）；
- β 1-茄碱（龙葵次碱-半乳糖-葡萄糖）；
- β 2-茄碱（龙葵次碱-半乳糖-鼠李糖）；
- γ -茄碱（龙葵次碱-半乳糖）。

某些马铃薯品种中，特别是与茄属 (*Solanum*) 野生种杂交的马铃薯品种中，可能还存在其他糖苷生物碱。糖苷生物碱在块茎中并非均匀分布，块茎边缘的浓度较高（见 Smith et al, 1996 的综述）。因此，块茎大小是决定糖苷生物碱含量的重要因素。品种、地点、季节、栽培措施和胁迫因子等方面的差异，也可能导致糖苷生物碱含量出现较大变化。目前，广泛接受的马铃薯块茎中糖苷生物碱总量的安全限值为 200 mg/kg 鲜重 (Bo-

emer and Mattis, 1924; Smith et al, 1996)。

糖苷生物碱主要集中于块茎的外围区域。不过,在绿色块茎、发芽的块茎中以及内部组织中,糖苷生物碱含量同样很高。在所有情况下,去皮可显著减少糖苷生物碱的含量。烹饪和油炸过程,糖苷生物碱不会受到破坏。

糖苷生物碱中毒会导致一系列症状,包括胃肠紊乱、思维混乱、产生幻觉、局部麻痹,甚至痉挛、昏迷和死亡 (Smith et al, 1996)。现有的资料表明,人对糖苷生物碱的敏感性很高,并且差异较大:1~5 mg/kg 体重的口服剂量是人类产生严重毒性的临界值 (Hellenäs et al, 1992), 3~6 mg/kg 体重的口服剂量可致人死亡 (Morris and Lee, 1984)。

用马铃薯(蒸煮,但是未去皮)比例很高的饲料喂猪,糖苷生物碱含量为 150 mg/kg 鲜重时几乎没有风险,且猪的生长不受到抑制。在牛的饲喂试验中,要将芽切除,要加入饲料中也不会产生风险(见第 17 段)(Jeroch et al, 1993)。

最近有研究表明马铃薯块茎还含有少量旋花碱,它是具有糖苷酶抑制活性的去甲托品烷生物碱。旋花碱集中分布在马铃薯芽眼和芽中 (Keiner et al, 2000)。目前这类生物碱对人的生物学意义尚不明确。

过敏原

直至最近,马铃薯才被认为是过敏原的重要来源之一。不过,马铃薯可含有多种热不稳定蛋白,当马铃薯被生食时,可诱导速发型超敏反应 (Jeannet-Peter et al, 1999)。

一项对马铃薯主要贮存蛋白——patatin 进行的研究表明,马铃薯可诱导敏感儿童发生过敏反应 (Seppälä et al, 1999)。作者认为,证实 patatin 的致敏性,需要进一步的研究。除了 patatin 之外,马铃薯中还观察到与大豆胰蛋白酶抑制剂家族中几个蛋白质结合的免疫球蛋白 E (IgE) (Seppälä et al, 2001)。

第四节 抗营养成分

蛋白酶抑制剂

马铃薯块茎中含有多种蛋白酶抑制剂,能抑制胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和其他蛋白酶的活性,降低摄入蛋白质的可消化性和生物学价值。胰蛋白酶抑制剂的浓度可高达 174 mg/g 蛋白 (Baker et al, 1982)。据推测,马铃薯块茎中蛋白质的含量占鲜重 2% 时(表 8-2),就可能会出现胰蛋白酶抑制剂含量达到 3.5g/kg 块茎。

通过煮或者其他热加工过程,马铃薯中的蛋白酶抑制剂大部分失活。如果人或动物吃了生的或未充分煮熟的马铃薯,则可能会出现严重的营养拮抗反应。

植物凝集素

植物凝集素是糖蛋白,存在于几乎所有生物体中,通常结合在细胞(如肠细胞或血细胞)表面的特定碳水化合物结构上。(Liener, 1989; Allen et al, 1996; Ciopraga et al, 2000)。众所周知,菜豆中发现的一些植物凝集素如被人和动物摄入,可对健康产生严重影响。加热过程中会使植物凝集素失活,因此人或动物只有在食用了生的或未充分煮熟的马铃薯时才可能产生不良影响。植物凝集素对动物健康和行为的不良影响尚不明确

(Kling and Wöhlbier, 1983; Smart et al, 1999)。

第五节 马铃薯新品种评价的考虑事项

农艺特征是马铃薯新品种的重要考虑因素，非特异和无法预见的表型性状以及表型性状的改变，可能需要进一步调查非预期影响的安全隐患。在登记马铃薯新品种时，需要测试其表型性状和农艺特征，包括产量以及对特定病害的敏感性和抗性。此外，鲜食马铃薯品种需要进行感官品质分析，加工马铃薯品种则需要测试薯条、薯片和脱水马铃薯的品质。

转基因马铃薯块茎应当与同时期、同一条件下种植的非转基因马铃薯块茎进行如下化学成分的比较（根据 Love, 2000 的建议）：

- 干物质；
- 糖，尤其是还原糖；
- 蛋白质；
- 维生素 C；
- 糖苷生物碱。

除了改良的目的 DNA 和新蛋白，如果新品种的各参数值在文献报道的数值范围之内，则可认为转基因新品种的总成分与常规品种等同。安全性评价将集中考虑新引入的成分（如重组 DNA 和外源蛋白）或改变的成分（如淀粉含量）。

除了改良的目的 DNA 和新蛋白，如果遗传改良还使马铃薯成分发生了自然变化范围之外的质的改变，安全性评价将考虑这些差异，可能需要进行营养学和毒理学方面的研究。

◆ 参考文献

- Allen A. K., Bolwell G. P., Brown D. S., Sidebottom C. and Slabas A. R. 1996. Potato lectin; a three-domain glycoprotein with novel hydroxyproline-containing sequences and sequence similarities to wheatgerm agglutinin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28 (11). 1285-1291.
- Anonymus. 1995. Stäkekontingente. *Kartoffelwirtschaft*. 02. 08.
- Baker E. C., Rackis J. J., Mustakas G. C., and Strolle E. O. 1982. Development of a pilot-plant process for the preparation of a trypsin inhibitor-rich fraction from potatoes. *Industrial and Engineering Chemistry. Product Research and Development* 21. 80-82.
- Boemer A. and Mattis H. 1924. Der Solaningehalt der Kartoffeln. *Z. Unters. Nahr. Genussm. Gebrauchsgegenstände* 47. 97-127.
- Burton W. G. 1989. *The potato* (3rd ed.). Longman Group UK Limited. 742 pp.
- Church D. C. 1984. *Livestock feeds and feeding*. 2nd Ed., Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J.
- Ciopraga J., Ångström J., Bergström J., Larsson T., Karlsson N., Motas C., Gozia O. and Teneberg S. 2000. Isolectins from *Solanum tuberosum* with different detailed carbohydrate binding specificities: Unexpected recognition of lactosylceramide by N-acetyllactosamine-binding lectins. *J. Biochem.* 128. 855-867.

- Food and Agriculture Organization (FAO). 1996. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Biotechnology and Food Safety, Rome, Italy, 20 September to 4 October
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2000. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology, Geneva, Switzerland, 29 May to 2 June
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2001 Statistical databases, www. fao. org, as of 24. 02. 2001.
- Gelder, van W. M. J. 1990. Chemistry, Toxicology, and Occurrence of Steroidal Glycoalkaloids: Potential Contaminants of the Potato (*Solanum tuberosum* L.). In: Poisonous Plant Contamination of Edible Plants (Rizk, A-F., M., Ed.), CRC Press, 117-156.
- Hellenäs K-E., Nyman A., Slanina P., Löf L., and Gabrielsson J. 1992. Determination of potato glycoalkaloids and their aglycone in blood serum by high-performance liquid chromatography. Application to pharmacokinetic studies in human. J. of Chrom. 573. 69-78.
- Jeanett-Peter N., Piletta-Zanin, P. A. and Hauser C. 1999. Facial dermatitis, contact urticaria, rhinoconjunctivitis, and asthma induced by potato. Am. J. Contact Dermat. 10. 40-42.
- Jeroch H., Flachowsky G. and Weißbach F. 1993. Futtermittelkunde Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
- Keiner R., Nakajima K., Hashimoto T. and Dräger B. 2000. Accumulation and biosynthesis of calystegines in potato. J. of Applied Botany 74. 122-125.
- Kling M. and Wöhlbier W. 1983. Handelsfuttermittel. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Kolbe H. 1997. Einflußfaktoren auf die Inhaltsstoffe der Kartoffel. Teil VII; Vitamine. Kartoffelbau 48. 34-39.
- Liener I. E. 1989. The nutritional significance of lectins. In: Food Proteins (Kinsella, J. E., and W. G. Soucie, Eds.), Am. Oil Chem. Soc., Champaign, IL, 329-353.
- Lisinska G. and Leszczynski W. 1989. Potato Science and Technology. Elsevier Applied Science. London.
- Love S. L. 2000. When does similar mean the same; A case for relaxing standards of substantial equivalence in genetically modified food crops. HortScience 35. 803-806.
- Morris S. C. and Lee T. H. 1984. The toxicity and teratogenicity of Solanaceae glycoalkaloids, particularly those of the potato (*Solanum tuberosum*): a review. Food Technol. Aust. 36. 118-124.
- Organisation for Economic Co-Operation and Development (OECD). 1993. Safety Evaluation of Foods Derived by Modern Biotechnology. Concepts and Principles. OECD, Paris, Frankreich.
- Organisation for Economic Co-Operation and Development (OECD). 1997. Report of the OECD Workshop on the Toxicological and Nutritional Testing of Novel Foods, Aussois, France, 5 - 8 March
- Pond W. G., Church D. C. and Pond K. R. 1995. Basic animal nutrition and feeding. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Rogan G. J., Bookout J. T., Duncan D. R., Fuchs, R. L., Lavrik P. B., Love S. L., Mueth M., Olson T., Owens E. D., Raymond P. J. and Zalewski J. 2000. Compositional analysis of tubers from insect and virus resistant potato plants. J. Agric. Food Chem. 48. 5936-5945.
- Schindler M. 1996. Kartoffeln in der Futtermittellieferung. Kartoffelbau 47. 384-385.
- Seppälä U., Alenius H., Turjanmaa K., Reunala, T., Palosuo, T. and Kalkkinen, N. 1999. Identification of patatin as a novel allergen for children with positive skin prick test responses to raw potato. J. Allergy Clin. Immunol. 103. 165-171.
- Seppälä U., Majamaa H., Turjanmaa K., Helin J., Reunala T., Kalkkinen N. and Palosuo T. 2001. Identification of four novel potato (*Solanum tuberosum*) allergens belonging to the family of soybean

- trypsin inhibitors. *Allergy* 56 (7). 619-626.
- Smart J. D. , Nicholls T. J. , Green K. L. , Rogers D. J. and Cook J. D. 1999. Lectins in drug delivery: a study of the acute local irritancy of the lectins from *Solanum tuberosum* and *Helix pomatia*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 9. 93-98.
- Smith D. B. , Roddick J. G. , and Jones J. L. 1996. Potato glycoalkaloids: Some unanswered questions. *Trends in Food Science & Technology* 7. 126-131.
- Treadway R. H. 1975. Potato starch (Chapter 15) in: Talburt W. F. and Smith O. (Eds.): *Potato Processing*. 3rd ed. . Avi Publ. Co. , Westport, CT. USA. 546-562.
- Weber L. , and Putz B. 1998. Vitamin C in Kartoffeln, *Kartoffelbau* 49. 278-281.
- Woolfe J. A. 1987. *The potato in the human diet*. Cambridge Press, Cambridge, UK.

第九章

苜蓿和其他温带豆科牧草新品种成分的 共识文件：食品和饲料的关键营养素、 抗营养成分以及植物次生代谢物

第一节 苜蓿 *Medicago sativa* L.

1. 生产

苜蓿，也称紫花苜蓿，为豆科多年生草本植物，世界各种气候条件下都可生长。苜蓿广泛分布于温带地区，包括美国、加拿大南部、欧洲、中国、南拉丁美洲和南非。世界各地苜蓿种植面积达3 300万多公顷。苜蓿是第一批驯化的饲料植物，由于其具有很高的产量潜力，在动物饲料中深受欢迎。

育种家将苜蓿分成3个栽培亚种，分别为紫花苜蓿（ssp *medicago*）、黄花苜蓿（ssp *falcata*）和杂花苜蓿（spp *varia*）。*Varia*亚种可能是 *Medicago* 和 *Falcata* 的杂交种。常见的紫花苜蓿产量高、成熟早，但不耐寒。相比而言，黄花苜蓿产量低，但抗寒性高。在加拿大较干旱和寒冷地区应用较多的是具有冬眠特性的黄花苜蓿 *M. falcata*。该品种在抗寒和放牧方面比紫花苜蓿具有更强的抗性（Frame et al, 1998）。

据报道，苜蓿起源于伊朗，在亚洲中部和西伯利亚也发现了其近缘植物。据说苜蓿因生长在瑞典紫花苜蓿湖（Lake Lucerne）边而得名。直到20世纪早期，由于不耐寒，苜蓿还未能能在北半球成功种植。Wendelin Grimm从德国引进杂花苜蓿，从而建立了可在较为寒冷的美国北部和加拿大存活的栽培种（Frame et al, 1998）。苜蓿是世界上最重要的饲料作物（Michaud et al, 1988）。

适宜苜蓿生长的土壤和气候条件较为广泛，以排灌良好、pH呈中性的肥沃土壤最好。与温带豆科牧草相比（包括百脉根和红三叶），苜蓿在严重干旱条件下可进入休眠状态，因此抗旱性强（Peterson et al, 1992）。另外，苜蓿具有抗碱和耐盐性，但对于pH低于6.0、排水不良或长期水浸的土壤不具备抗性（Sheaffer et al, 1988）。

虽然可与其他豆科植物或牧草混合种植，但苜蓿与其他豆科牧草不同，通常以单一耕作方式种植。苜蓿/牧草混合种植可减少杂草入侵，为制作青贮饲料提供更均衡的营养成分，同时牧草还可利用苜蓿中的可转移氮（Chamblee and Collins, 1988）。但混合种植可能会影响苜蓿的干物质产量。

在充分灌溉和适宜管理条件下，苜蓿产量会因年久而降低（Hayman and McBride,

* Originally published by OECD in English under the title: “Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Alfalfa and other Temperate Forage Legumes: Key Feed Nutrients, Anti-nutrients and Secondary Plant Metabolites” © 2005 OECD. All right reserved.

1984)。苜蓿干物质产量逐年降低有多方面的因素，包括与共生牧草的竞争，杂草的压力、病虫害、冬季寒冷受损、排灌不良或管理方面的因素(如放牧过度、修剪频繁或肥料不足)。

连续放牧可导致苜蓿的持久性降低；采叶后充分再生对于保证植株的存活 (stand survival) 至关重要。苜蓿最好用于轮牧系统。

苜蓿的重要功能之一是固氮。通过利用空气中的氮，加强土壤中氮平衡，转而被其他植物利用，这样可以免于氮肥的施用。根瘤菌群是感染和诱导苜蓿根部固氮的主要细菌群落之一。据估计，苜蓿的固氮能力存在很大差异，但通常高于温带的豆科牧草 (Frame et al, 1998)。土壤中的矿物氮或肥料氮会限制苜蓿的固氮能力。某些矿物质(如钾、钙或镁)不足或土壤过酸也会限制苜蓿的固氮能力 (Frame et al, 1998)。

2. 加工

除了放牧之外，苜蓿主要用作干草、青贮饲料、人工干燥饲料或球状颗粒。研究表明，在明尼苏达州，苜蓿在 10% 开花范围时期刈割，隔 5~7 周再刈割一次，可使干物质产量达到最高，并且营养价值全面、可利用寿命延长 (Sheaffer et al, 1988)。某些地区在适宜条件下，每年可刈割 6~9 茬，而在其他地区，最多只能切刈割 2~5 茬。为了保证苜蓿冬季存活率，最后一次的收获时间应尽早，以使植株在停止生长前贮备碳水化合物和氮，但是冬季来临之前苜蓿顶部不能过于茂盛。研究表明，每年刈割 3 次的产量高于每年刈割 4 次，虽然饲料的营养价值降低 (Brink and Marten, 1989)。

苜蓿刈割之后需经过田间晾晒再进行加工，干草需要晾晒到干物质含量为 85% 左右；地面堆贮最适干物质含量为 30%；在混凝土青贮塔中存贮，最适干物质含量为 35%；在限氧青贮窖存贮，最适干物质含量为 45%。苜蓿干草与青贮饲料的成分比较见表 9-1。生产脱水苜蓿，要求饲草的蛋白含量高，同时在孕蕾期进行刈割。苜蓿适当脱水可以提高反刍动物对饲草蛋白的利用率。

苜蓿粉或苜蓿叶粉是干草经过干燥（自然干燥或人工干燥）和研磨制成的。苜蓿叶粉的质量较好，粗纤维含量不超过 18%。苜蓿粉包括茎秆成分，因此纤维含量较高。苜蓿叶粉和苜蓿粉是胡萝卜素的良好来源。苜蓿加工过程中，应尽可能保留叶片部分。

表 9-1 第二茬刈割时苜蓿青贮饲料和干草的营养成分比较 (Broderick, 1995)

成 分	青贮饲料	干 草
干物质 (DM) (gm/kg)	413	850
中性洗涤纤维 (NDF) (gm/kg 干物质)	354	352
酸性洗涤纤维 (ADF) (gm/kg 干物质)	265	257
粗蛋白 CP (gm/kg 干物质)	212	197
非蛋白氮 NPN (gm/100gm 总氮)	49.4	7.7

除含钾量外，苜蓿叶片营养成分含量高于茎秆。镁随着作物成熟含量逐渐降低。干草刈割晚期，由于土壤中含钾量较高造成植物优先摄入钾元素，镁的含量则远低于满足动物需求的最低水平 (Frame et al, 1998)。苜蓿本身含钠量低，因此在苜蓿种植地中添加盐有利于牛羊的健康生长 (Jagusch, 1982)。

3. 苜蓿筛选的一般指标

在美国和加拿大，登记和释放苜蓿新品种时，仅需要考虑其表型特征。在动物饲养中衡量苜蓿质量好坏的主要指标包括常规成分、酸性洗涤纤维、中性洗涤纤维、木质素和矿物质（见表 9-2，Forage Genetics Inc.，2003）。因地理位置、环境条件、品种、刈割时间和贮存条件的不同，文献中上述成分的变化范围很大。因此，选择合适的对照十分重要，例如近等基因系、参比栽培种或商业品种，并应处于相同的时间，相近的条件和地点。

表 9-2 动物饲料检测常用指标 (Forage Genetics, 2003)

成 分	重 要 性
含水量	饲养指标
常规成分： 蛋白质 脂肪 灰分	营养/饲养指标
酸性洗涤纤维	可消化性
中性洗涤纤维	可消化性
木质素	可消化性/反质量因素
矿物质： 钙 (Ca) 铜 (Cu) 铁 (Fe) 镁 (Mg) 锰 (Mn) 磷 (P) 钾 (K) 钠 (Na) 锌 (Zn)	营养

第二节 苜蓿中的营养素

表 9-3 至表 9-6 总结了多个数据库统计的苜蓿常规成分、氨基酸、脂肪酸和矿物质组成。

表 9-3 营养生长晚期或开花早期苜蓿中常规成分、木质素、酸性洗涤纤维和中性洗涤纤维的组成（除干物质外，其余数据均以干物质百分比表示）

	NRC71 ^①	NRC82 ^②	Ensminger ^③	NRC96 ^④	Monsanto ^⑤	变化范围
干物质	90.1	23.0	91.0	19.0	17.9~29.2	17.9~91.0
粗蛋白	19.7	19.0	17.9	25.0	15.3~25.8	15.3~25.8
粗脂肪	2.2	3.1	2.6	2.9	1.3~3.2	1.3~3.2
粗纤维	29.8	25.0	25.8	—	—	25.0~25.8
中性洗涤纤维	—	40.0	36.8	39.3	26.5~35.7	26.5~40.0

(续)

	NRC71 ^①	NRC82 ^②	Ensminger ^③	NRC96 ^④	Monsanto ^⑤	变化范围
酸性洗涤纤维	—	31.0	29.0	—	23.1~33.4	23.1~33.4
木质素	7.7	7.0	5.8	7.9	3.9~9.7	3.9~9.7
灰分	8.7	9.5	8.4	9.2	8.8~15.3	8.4~15.3

注：①NRC, 1971；② NRC, 1982；③ Ensminger et al, 1990；④ NRC, 1996；⑤ Monsanto, 2003。

表 9-4 苜蓿中氨基酸的组成（数据以干物质的百分比表示）

	干草 NRC82 ^①	干草 NRC01 ^②	干草 Literature ^③	干草 Monsanto ^④	干草 数值范围	青贮饲料 数值范围 ^⑤
丙氨酸	—	—	0.70	0.79~1.59	0.70~1.59	0.69~0.94
精氨酸	1.14	1.18	0.62	0.71~1.54	0.62~1.54	0.27~0.51
天冬氨酸	—	—	1.40	1.75~3.52	1.40~3.52	1.83~0.95
半胱氨酸	—	0.32	0.20	0.18~0.35	0.18~0.35	—
谷氨酸	—	—	1.20	1.52~3.03	1.20~3.03	1.27~1.48
甘氨酸	1.03	—	0.60	0.71~1.47	0.60~1.47	0.67~0.76
组氨酸	0.50	0.44	0.28	0.37~0.74	0.28~0.74	0.14~0.28
异亮氨酸	0.96	0.97	0.50	0.66~1.26	0.50~1.26	0.55~0.76
亮氨酸	1.64	1.68	0.90	1.11~2.25	0.90~2.25	0.90~1.23
赖氨酸	1.27	1.17	0.59	0.99~1.81	0.59~1.81	0.32~0.74
甲硫氨酸	0.36	0.36	0.18	0.24~0.48	0.18~0.48	0.06~0.21
苯丙氨酸	1.07	1.09	0.65	0.72~1.59	0.72~1.59	0.53~0.79
脯氨酸	—	—	0.70	0.75~1.34	0.70~1.34	0.89~1.14
丝氨酸	0.97	—	0.60	0.75~1.36	0.60~1.36	0.57~0.67
苏氨酸	1.08	1.00	0.60	0.61~1.15	0.60~1.15	0.63~0.72
色氨酸	—	0.35	—	0.16~0.31	0.16~0.35	—
酪氨酸	0.74	—	0.50	0.50~1.16	0.50~1.16	0.25~0.41
缬氨酸	1.22	1.20	0.60	0.79~1.55	0.60~1.55	0.76~0.94

注：① NRC, 1982；② NRC, 2001；③ Cunningham et al, 1994；Phuntsok et al, 1998；④ Monsanto, 2003；⑤ Christensen, 2004a；Phuntsok et al, 1998。

表 9-5 苜蓿中脂肪酸的组成

	干草 gm/100 gm FA ^①	青贮饲料 gm/100 gm 干物质 ^②
C12: 0	0.70	0.01~0.03
C14: 0	2.90	0.01~0.02
C16: 0	27.6	0.41~0.47
C16: 1	0.20	0.04~0.05
C17: 0	2.15	0.01~0.11
C18: 0	36.5	0.06~0.07
C18: 1	4.11	0.06~0.07
C18: 2	0.75	0.34~0.42
C18: 3	—	0.14~0.63
其他	24.90	0.35~0.92
总计	100	2.09~2.10

注：① gm/100gm 脂肪酸；Bas et al, 2003；② gm /100 gm 干物质；Christensen, 2004b。

表 9-6 营养生长晚期至开花早期苜蓿中矿物质的组成 (以干物质百分比表示)

	NRC71 ^①	NRC82 ^②	Ensminger ^③	NRC00 ^④	Preston ^⑤	NRC01 ^⑥	Monsanto ^⑦	范围
钠 100gm	0.15	0.19	0.15	0.12	—	0.03	0.02~0.21	0.02~0.21
钾 g/100gm	2.08	2.09	2.56	2.51	2.50	2.56	1.39~4.31	1.39~4.31
钙 g/100gm	1.40	1.96	1.63	1.41	1.41	1.56	0.90~1.53	0.90~1.96
磷 g/100gm	0.21	0.30	0.22	0.22	0.26	0.31	0.22~0.45	0.22~0.45
镁 g/100gm	0.30	0.27	0.34	0.34	—	0.33	0.11~0.45	0.11~0.45
铁 mg/100gm	0.02	0.03	0.02	0.02	—	0.021	0.02~1.54	0.02~1.54
硫 g/100gm	0.30	0.37	0.30	0.30	0.27	0.33		0.27~0.37
铜 mg/kg	13.4	10.0	12.6	12.7	—	10.0	5.3~10.2	5.3~13.4
钴 mg/kg	0.01	0.13	0.29	0.29	—	0.65		0.01~0.65
锰 mg/kg	31.5	43.0	36.2	36.0	—	49.0	34.6~109.5	31.5~109.5
锌 mg/kg	—	18.0	30.2	30.0	22.0	26.0	18.1~36.0	18.0~36.0
砷 mg/kg	—	—	0.55	0.55	—	0.20		0.20~0.55
氯 g/100gm	0.38	0.47	0.38	0.34	0.38	0.55		0.34~0.55

注: ① NRC, 1971; ② NRC, 1982; ③ Ensminger et al, 1990; ④ NRC, 2000; ⑤ Preston, 2003; ⑥ NRC, 2001; ⑦ Monsanto, 2003.

第三节 苜蓿中抗营养和次生代谢物

反刍动物的臃胀病

苜蓿中可消化蛋白质和碳水化合物的含量高, 因而是反刍动物的宝贵饲料, 但苜蓿有其不同之处, 其独有特征是使动物胃气胀, 严重情况下可引起动物死亡。Clark 和 Reid (1974)、Colvin 和 Backus (1988)、Howarth 等 (1991)、Popp 等 (2000) 总结了胃气胀的病因以及动植物的影响因子。

发生条件与概率

最初的胃部胀气和泡状膨大 (腹部臃胀) 是由于发酵气体以稳定的泡沫形式积累而导致瘤胃过度膨胀 (Tanner et al, 1995), 这种现象通常是由放养家畜食用较多豆科牧草后引发的突发状况。在畜舍饲养的牛也可以发生胃胀气。动物出现臃胀病时, 瘤胃的内容物 (大部分是液体) 上会产生一层稳定的泡沫, 从而阻止气泡上升和内容物分散。泡沫一旦形成, 就可阻止气泡自然喷出, 瘤胃的运动性加剧, 进而促进泡沫进一步产生, 最后导致肌肉张力和瘤胃运动性丧失。动物死亡有几个因素, 包括瘤胃膨胀使心肺抑郁以及从瘤胃中吸收毒素。

泡沫产生的主要风险因子是动物快速摄入了未成熟或开花前期正处于营养生长的豆科植物。苜蓿、红三叶草和白三叶草产生泡沫的潜力相近。其他饲用豆科植物产生泡沫的风险小。

泡沫产生的一个重要风险因子是动物仅食用了植物汁液最多的部分。研究表明, 苜蓿在霜冻和低温环境可增加泡沫产生的风险, 这主要是由于细胞内容物中可溶性蛋白和果胶多糖的增加 (MacAdam and Whitesides, 1996)。草地的湿润度也是产生泡沫的一个风险因子。然而, 真正的风险在于湿润和适宜的气候条件下牧草快速生长导致的细胞内容物中可溶性蛋白和果胶物质的增加。

动物本身的若干因素也可导致臌胀病 (Mendel and Boda, 1961; Howarth et al, 1991)。幼小动物比龄期大的动物对急性或者严重胃臌胀病更为敏感, 据推测, 动物在食用膨胀性牧草之后, 可产生适应性, 变得不大敏感。研究表明, 禁食可使动物出现胀气现象, 但机制尚未确定。由于动物在瘤胃膨大能力上的个体差异, 以及瘤胃膨大成因的不同, 一些牛只会遭受亚临床或轻微臌胀。尽管轻微胃臌胀抗性可使动物适应新的牧草, 但是胃臌胀病已经被认为是造成牧草损失的主要原因, 因为它使动物减少饲料的吸收, 进而减少体重的增加 (Latimori et al, 1992; Rossi et al, 1997)。

在应用温带豆科植物作为反刍动物饲料的所有地区中, 臌胀病都是常见问题, 并且是部分国家 (如新西兰) 长期面临的主要问题, 因为三叶草是这些国家牧草的重要组成部分。(Carruthers et al, 1987)。由于臌胀病与三叶草有关, 因此, 三叶草被认为是有机农场的风险因子, 这些有机农场中三叶草的比例通常在 50% 以上。不过, 英国和欧洲其他地方对有机农场的研究表明, 有机农场中发生臌胀病的几率不高于常规农场 (Weller et al, 1996; Frankow-Lindberg and Danielsson, 1997)。

尽管目前对于如何衡量臌胀病的程度尚无广为认可的方法。但在“抗胃膨胀病”苜蓿品种 AC Grazeland Br 选育过程中, 选择较低的初始 (<4h) 消化速度品系已经被成功应用 (Coulman et al, 2000)。除了测定最初消化速度外, 也可测定已知饲料的其他因素, 如叶脉模型、纤维含量和可消化性、细胞壁厚度、瘤胃细菌易于成核、优先合成蛋白质、叶绿体中脂类含量降低 (Lees et al, 1982; Howarth et al, 1979; Fay et al, 1981; Lees, 1984; Stifel et al, 1968)。

皂角苷

皂角苷分成两类, 包括甾体皂苷和三萜皂苷。甾体皂苷存在一些牧草中以糖苷的形式存在, 而三萜皂苷在很多温带豆科植物 (特别是苜蓿) 中。由于皂角苷具有显著的胃臌胀病特征 (Marston et al, 2000), 历史上被认为是引起胃气胀的主要原因。所开发的一些低皂苷苜蓿品种仍造成胃臌胀, 这表明对于其他主要因素的研究具有重要意义。

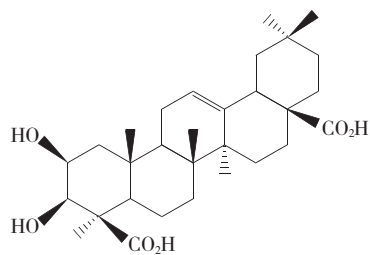


图 9-1 The monodesmosidic medicagenic acid

在苜蓿中已经鉴定出约 24 种皂角苷 (Bialy et al, 1999), 根据含量计算, 皂草精醇, 三萜皂苷 (Zanhic acid glycosides) 和苜蓿酸是最重要的皂角苷 (表 9-7, Oleszek et al, 1992; Massiot et al, 1988、1991)。植物中的皂角苷既可起正面作用, 也可起负面作用。研究表明, 加入皂角苷可降低氨产量和原生动物的数目, 提高小羊的生长速度 (Makkar and Becker, 2000)。各种皂角苷对动物的毒性不同 (Hostettmann and Marston, 1995)。三萜皂苷可降低反刍动物饲料的适口性、减少饲料的降解, 皂角苷的存在大大限制了苜蓿在一些非反刍动物饲料中的应用 (Lu and Jorgensen, 1987; Oleszek, 1996 的综述)。家禽饲料中含 10% 苜蓿粉的, 皂角苷可造成鸡的生长受到抑制、产蛋量下降 (Birk, 1969; Bondi et al, 1973; Pedersen et al, 1972)。皂角苷对鱼和两栖动物具有高毒性 (Cheeke, 1971; Khalil and El Adawy, 1994;

Makkar and Becker, 2000), 但是对反刍动物和猪不具有毒性 (Bins and Pedersen, 1964)。一般认为, 皂角苷毒性大部分源于苜蓿中的苜蓿酸和三萜皂苷 (zanhic acid), 其症状包括对口和消化道产生刺激、增加膜的渗透性, 急性情况下引起红血球溶解 (Oleszek, 1996)。三萜皂苷 (Zanhic acid glycosides) 还可能引起肠道气体的产生。苜蓿青贮可降低总皂角苷和苜蓿酸的含量 (Kalac et al, 1996)。

表 9-7 墨西哥种植的苜蓿栽培种中粗皂角苷和苜蓿酸的含量

(数据来源于 Pérez et al, 1997)

栽培种	粗皂角苷 (g/kg 干物质)	苜蓿酸 (g/kg 干物质)
Sundor	17.7	0.023
Maxidor	11.7	0.027
Valenciana	8.8	0.165
Condor	8.5	0.024
Puebla 76	8.3	0.097
Inia 76	6.8	0.115
NK-819	5.9	0.013
Pierce	4.9	0.031

关于皂角苷分析方法研究较多, 并取得了不同程度的成功。其中生物学方法取决于真菌绿色木霉 *Trichoderma viride* 生长抑制情况, 这种方法只能测定苜蓿酸。Oleszek (2004) 开发了高效液相色谱法, 但是这种方法难以进行改进而成为日常可用的程序。目前尚无充分可靠的文献数据可与数据库进行有意义的比较。在皂角苷测定时, 选择合适的比较对象进行分析十分重要。

缩合单宁

缩合单宁 (原花青素) 来源于类黄酮生物合成途径, 实质上是大小不同、复杂性各异的黄烷-3-醇低聚体。在 Marles 等 (2003) 的研究中, 已经总结了这些植物代谢物的化学、生物化学和分子调控机制。该代谢物在植物界中广泛分布。缩合单宁的普遍特征是将饲料、唾液和微生物细胞中的蛋白质与微生物酶、内源蛋白或其他饲料成分发生可逆或不可逆的结合, 并抑制反刍动物中微生物的活性 (Bae et al, 1993; Hagerman et al, 1993; Jones et al, 1994; Tanner et al, 1994; Molan et al, 2001)。不同种植物不同发育阶段低聚体间的蛋白结合能力因原花色素和蛋白质结构的不同而异 (Hagerman and Butler, 1981; Butler et al, 1984)。缩合单宁也是金属螯合剂和强抗氧化剂 (Muir, 1997; Stoutjeskijk et al, 2001; Slabbert, 1992)。它们具备消除牧草引起胃腹胀的潜在能力, 可提高植物蛋白转化成动物蛋白 (过瘤胃蛋白) 的效率、减少温室气体的排放、减少胃肠寄生虫的数目、抑制昆虫的取食 (Waghorn, 1990, Waghorn and Shelton, 1992; Neizen et al, 1995; 1998; Broderick and Albrecht, 1997; Aerts et al, 1999; Muir et al, 1999; McMahan et al, 2000; Butter et al, 2001; McSweeney et al, 2001)。单宁酸和皂角苷可在瘤胃中以叠加的方式作用 (Makkar et al, 1995)。

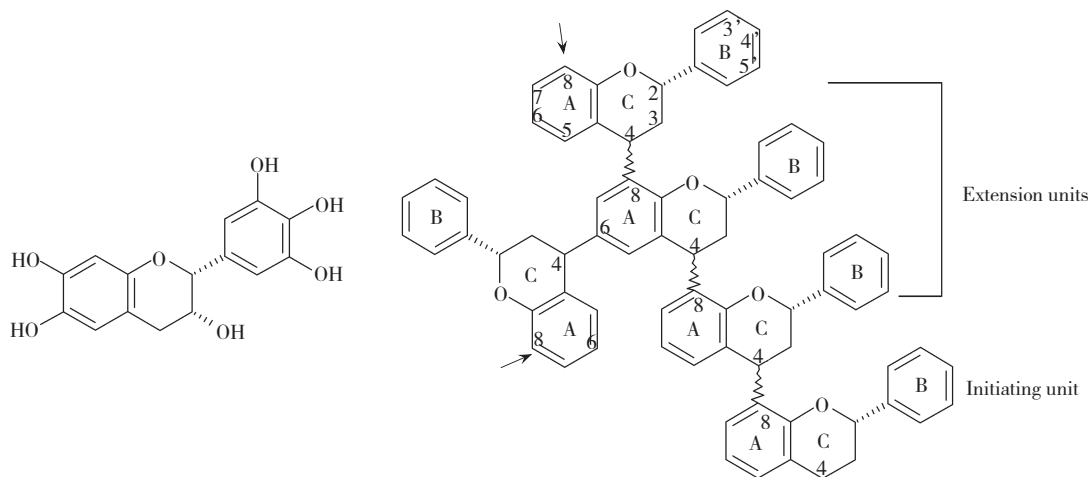


图 9-2

一种黄烷-3-醇（儿茶酚）单体和一种新型的原花青素低聚体通过在 4-8 和 4-6 位附加黄酮键所表现的延伸机制。

饲料中缩合单宁的含量超过 40~50 g/kg，可降低反刍动物饲料中蛋白质和干物质的消化性，因此高浓度的缩合单宁可作为抗营养成分（Barry, 1989）。不过，中低浓度的单宁酸（2 040 g/kg 干物质）可增加流入小肠的食用蛋白量，特别是必需氨基酸的量，增加动物产量的同时并不影响饲料的摄入量（Aerts et al, 1999）。

虽然可对蛋白质的消化产生副作用，但是单宁酸含量超过 50 g/kg DM 的豆科植物通常不会引起胃臌胀（表 9-8）。食用缩合单宁为有效控制蛋白质的摄入，或防止牧草对反刍动物引起的胃臌胀提供了一种手段。目前正在进行转基因苜蓿的研究，以抑制花青素的生物合成途径，或分离这一途径中的编码基因，并将该基因导入到苜蓿和三叶草中（见 Marles et al, 2003 的综述）。在过去 2 年中，已经发现了很多新可实现上述策略的缩合单宁合成基因和调节基因（见 Marles et al, 2003 的综述）。此外，玉米的花青素调节基因 Lc 可诱导苜蓿产生少量缩合单宁（Ray et al, 2003），降低饲料的最初摄入速度，从而在离体条件下减少气体的产生。

表 9-8 用丁醇-HCl 方法测定的引起胃臌胀和不引起胃臌胀的牧草中可提取单宁酸和浓缩结合态单宁酸的含量（Barry and McNabb, 1999）

饲 料	缩合单宁 (g/kg 干物质)		
	可提取单宁酸	结合态单宁酸	总单宁酸
不引起胃气胀长梗百脉根 (<i>Lotus pedunculatus</i>)	61	15	77
百脉根 (<i>Lotus corniculatus</i>)	36	11	47
冠状岩黄茛 (<i>Hedysarum coronarium</i>)	33	12	45
红豆草 (<i>Onobrychis viciifolia</i>)	29	—	—
可能引起胃气胀红三叶草 (<i>Trifolium pratense</i>)	0.4	1.3	1.7
苜蓿 (<i>Medicago sativa</i>)	0.0	0.5	0.5

雌激素拮抗剂和拮抗物

20 世纪 40 年代以来, 有报道认为放牧用苜蓿会对农场动物的生殖健康产生不良影响, 在澳大利亚三叶草场放牧的羊中出现了严重的不育现象。后来经研究表明这是由各种天然存在的雌激素类似物, 即所谓的植物雌激素导致。目前认为存在两类植物雌激素, 一类是与香豆素有关的考迈斯托醇 (香豆雌酚), 是苜蓿中的一种重要物质; 另一类是广泛分布在红三叶草属植物的异黄酮 (Livingston, 1978)。这些化合物会在受病原菌胁迫的苜蓿中诱导产生 (Latunde-Dada and Lucas, 1985)。苜蓿中香豆雌酚的含量为 2.99~104.37 ppm (Monsanto, 2003)。在红三叶草中鉴定出的重要异黄酮的结构见表 9-9 (Klejduš et al, 2001)。植物雌激素导致的不育具有种间特异性, 牛和羊等反刍动物比其他动物更为敏感 (Stob, 1983; Moule et al, 1963; reviewed in Howarth, 1988)。

表 9-9 从红三叶草中鉴定出的异黄酮的结构 (摘自 He et al, 1996)

混合物	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
大豆素	H	H	H	H	H
异黄酮苷	H	H	H	葡萄糖	H
染料木黄酮	H	H	OH	H	H
染料木苷	H	H	OH	葡萄糖	H
刺芒柄花素	CH ₃	H	H	H	H
芒柄花苷	CH ₃	H	H	葡萄糖	H
鹰嘴豆芽素 A	CH ₃	H	OH	H	H
印度黄檀苷	CH ₃	H	OH	葡萄糖	H
红车轴草异黄酮苷	葡萄糖	H	H	CH ₃	H
毛蕊异黄酮	CH ₃	H	H	H	OH
柳穿鱼素	CH ₃	OH	OCH ₃	H	H
红车轴草素	CH ₃	OH	H	H	OH
野靛黄素	-CH ₂ -	H	H	H	-O-

刺芒柄花素和鹰嘴豆芽素 A 是饲用豆科植物中含量最丰富的异黄酮 (Smolenski et al, 1981), 在一些红三叶草栽培种中两者含量可达 15g/kg DM。在白三叶草中的浓度经常要低很多 (0.5 g/kg DM)。异黄酮的代谢转化主要发生在瘤胃。鹰嘴豆芽素 A 脱甲基变成木黄酮, 经环裂解形成雌激素活性丧失的 4-乙基苯酚和有机酸。刺芒柄花素脱甲基化, 主要形成大豆素, 然后通过加氢和环裂解变成雌马酚 (Lundh, 1995)。与鹰嘴豆芽素 A 代谢的终产物不同, 雌马酚比其亲本化合物具有更强的雌激素特性。

不论在苜蓿还是在白三叶草中作为主要的植物雌激素考迈斯托醇, 都不会被瘤胃中的微生物代谢掉, 且以其最初的形式被吸收。已知考迈斯托醇对小鼠的效率大约是木黄酮的 30 倍, 并可使动物雌激素紊乱。考迈斯托醇在健康植物中的浓度很少超过 30~60 mg/kg DM, 但

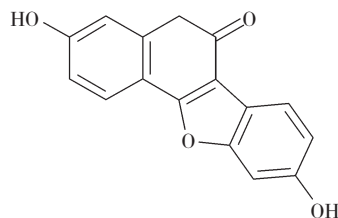


图 9-3 Coumestrol (coumestrol)

可在被真菌侵入后的植物中积累。考迈斯托醇在苜蓿中存在显著的遗传变异 (Hanson et al, 1965)。此外, 考迈斯托醇短期食用不产生影响, 如果长期食用, 可能会诱导激素效应。

生氰苷

生氰苷由 α -醇氰 (α -hydrozynitrile) 型糖苷配基和糖分子 (通常为 D-葡萄糖) 组成。它们在植物中广泛存在, 但是在温带豆科牧草中, 只有白三叶和百脉根中生氰苷的产生原因引起了关注 (Vetter, 2000)。在白三叶草种群中, 叶片受到破坏之后产生和未产生氢氰酸的植物在同一种群中共存。生氰苷含量的差异由 2 个基因的变异引起: 一个是调节生氰苷亚麻苦苷和百脉根苷生产的 Ac 基因, 另一个是调节亚麻苦苷水解酶产生的 Li 基因。植物至少含有 Ac 和 Li 基因中一个活性位点才可产生氢氰酸。白三叶草和百脉根中两种代谢物的含量不同 (见 Smolenski et al, 1981 的综述)。

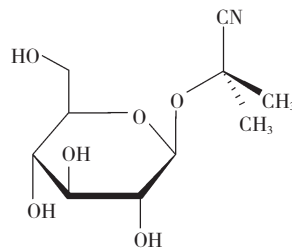


图 9-4 Linamarin a cyanogenic glucoside from white clover

由于微生物可快速降解生氰糖苷, 因此反刍动物比非反刍动物对氢氰酸的毒害更为敏感 (Smolenski et al, 1981)。在食草动物体内, 亚麻苦苷和百脉根苷释放的氢氰酸进一步代谢成有机硫氰酸盐, 有机硫氰酸盐可导致甲状腺肿。白三叶草北美栽培种比大多数欧洲栽培种的产氢氰酸的潜力明显要低, 不同国家培育的栽培种之间也存在相当大的差异 (Wheeler, 1989)。在瑞士, 已经没有氢氰酸含量平均高于 370 mg HCN/kg 干物质的栽培种。环境因素也可大大影响氢氰酸生成的潜力, 在水分胁迫、动物取食、光照强度低的寒冷放牧条件下, 以及土壤磷供应量低的情况下氢氰酸生成潜力会增加 (Vickery et al, 1986)。

其他次生代谢物

据各种天然产品数据库和资源 (<http://www.ars.usda.gov>) 记载, 在温带豆科牧草中存在大量的次生代谢物 (Duke, 1992; Chapman and Hall, 1982—1998)。苜蓿和红三叶草尤其如此, 两者都有利于健康, 因此激发了人们将其作为草药进行研究的兴趣。不过, 在大多数情况下, 没有定量方面的数据, 只有定量数据才能作为比较评价的一部分。如果有理由推测已知次生代谢物的代谢途径发生了改变, 或这些物质具有毒性, 则有必要检测该次生代谢物。刀豆氨酸是 L-精氨酸潜在的毒性结构类似物, 为许多豆科植物 (包括苜蓿) 所贮存 (Rosenthal and Nkomo, 2000)。在正常情况下, L-刀豆氨酸存在于种子、子叶和发芽的苗中, 极少量存在于较老的营养组织中。不过, 其细胞毒性需经过比较分析后才能确定。

第四节 苜蓿及其产品在饲料中的应用

苜蓿富含蛋白质、维生素和矿物质, 是饲料配给中的主要成分。苜蓿中天然存在的酚类防御化合物包括生物碱、皂角苷和香豆素 (接触豆长管蚜后会增加)、异黄酮 (紫檀素

和迪紫檀素,两者都受真菌侵染的诱导)和黄酮(Massiot et al, 1988、1991; Oleszek et al, 1992; Stochmal et al, 2001; Ray et al, 2003; 以及 Howarth, 1988 的综述)。在天然产物数据库中可发现其他的成分(如 Duke, 1992)。苜蓿在草料中只积累微量的缩合单宁(Goplen et al, 1980; Ray et al, 2003)。

世界各地均认为苜蓿是奶牛和马的优质饲料。它还是养肉牛、羊以及其他营养需求较高动物(如泌乳母羊、奶山羊或乳牛)的高价值饲料。不过,苜蓿是一种能够导致致胃膨胀的豆科牧草(Howarth et al, 1991; Popp et al, 2000)。AC Grazeland Br 是世界上第一个减轻胃膨胀病的品种(使胃膨胀发生率降低了 60%~80%),因其起始摄入速度较低而被选择(Coulman et al, 2000)。该品种的细胞壁较厚,可快速再生(Goplen et al, 1993; Najda, 2002)。

若以高浓度添加到饲料中,苜蓿不是非反刍动物(马、兔子和怀孕母猪除外)的合适饲料。饲料中加入苜蓿对单胃动物的不良影响包括:蛋白质的消化能力低,可消耗的能量低,纤维、皂角苷和酚醛含量较高,适口性差。

苜蓿的饲养价值主要取决于生长期,随着植物的成熟,苜蓿的营养价值会相应降低。苜蓿叶片富含营养素,包括蛋白质、维生素 E 和维生素 K,钙、酶、钾和胡萝卜素。苜蓿的干物质产量随着成熟期的推进而增加,但是营养价值会降低。植物的成熟导致叶片与茎秆比降低,茎秆中木质素含量增加、叶片因脱落而减少。

随着植物的成熟,瘤胃中蛋白的可降解性降低。在反刍动物中,由于苜蓿蛋白在瘤胃中周转快,并且很高比例的蛋白以氨态氮的形式损失掉,因此苜蓿蛋白的利用率不高并会产生很多问题(Amrane and Michaeletdoreau, 1993)。青贮苜蓿的粗蛋白含量通常比干草高,主要是干草制备过程中很多叶片损失,不过,在青贮饲料中更多的氮为非蛋白氮(NPN)(Broderick, 1995)。

与禾本科饲草相比,苜蓿的摄入性能好、单位干物质摄入量的动物产量高。可能的原因包括:消化物快速通过瘤胃(刺激胃口),可溶性蛋白含量高(有助于在瘤胃中微生物的形成),刺激纤维素的消化,干物质中细胞壁的含量低、矿物质和维生素供应充分(Conrad and Klopfenstein, 1988)。

苜蓿的特异蛋白提取物也可用于牲畜饲养,例如,叶黄素有时用于家禽可使蛋和肉略带黄色。

第五节 苜蓿在食品中的应用

芽菜作为食品已经有很长的应用历史。目前,在北美食品杂货店的水果和蔬菜区,经常可见绿豆和苜蓿芽菜,在天然食品和健康食品店,有更多已发芽或供发芽的种子出售,包括绿豆、苜蓿、赤豆、甘蓝、三叶草、小扁豆、洋葱和萝卜。尽管本文只讨论了豆科牧草中的苜蓿和三叶草芽菜,这并不表示其他豆科牧草的芽就不能供人类食用。除了苜蓿芽菜外,苜蓿的蛋白质[如核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶(rubisco)]提取物也可应用到各种食品中,并受到人们关注。

大部分北美人期望少量食用的这些食物,粗略算为 60 mL(菜中含 8~20 g,具体含

量取决于不同芽的类型)，并且只是偶尔食用。小部分忠实消费者每日消费量通常为 1~2 杯。

应当根据某一国家中这类芽菜的食用频率和用量以及它们对营养素吸收的作用，来评价人类饮食中豆科牧草营养成分的重要性。在要求的数据中还需要考虑到它们经常被认为是高营养素这一事实。

表 9-10 表明了苜蓿芽菜的组成成分，数据摘自 USDA 国家营养素数据库参考标准第 16 项 (USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release # 16.)。该数据库提供了发芽苜蓿、四季豆、绿豆、菜豆、斑豆、小扁豆、萝卜种子、大豆和小麦的数据。

将一杯苜蓿芽菜的营养素组成与这些营养素的推荐摄入量进行比较分析表明，它们的作用很小。当苜蓿芽可能作为食品销售时，建议的成分分析至少包括：分析新鲜饲料或发芽的苜蓿种子，分析的参数如表 9-11 所列，同时还应分析维生素 C、 β -胡萝卜素、叶酸和植物雌激素的含量，从而为其用于食品的潜在非预期效应评价提供基础。

表 9-10 未加工的苜蓿芽菜中的成分

营养物	单位	每 100 g 中的含量	每 240 mL (33 g) 的含量	样本数	标准误	每 100 g 干物 质中的含量
水分	g	91.140	30.076	10	1.226	
能量(计算值)	kcal	29.000	9.570	0		327.314
蛋白质	g	3.990	1.317	10	0.563	45.034
总脂类(脂肪)	g	0.690	0.228	10	0.141	7.788
灰分	0.400	0.132	10	0.044	4.515	
“碳水化合物，以差异计”	g	3.780	1.247	0		42.664
“纤维，总食用纤维”	g	2.500	0.825			28.217
“糖，总糖”	g	0.180	0.059	3	0.012	2.032
钙	mg	32.000	10.560	10	4.659	361.174
铁	mg	0.960	0.317	10	0.114	10.835
镁	mg	27.000	8.910	10	3.978	304.740
磷	mg	70.000	23.100	10	7.914	790.068
钾	mg	79.000	26.070	10	9.79	891.648
钠	mg	6.000	1.980	10	1.094	67.720
锌	mg	0.920	0.304	10	0.273	10.384
铜	mg	0.157	0.052	10	0.017	1.772
锰	mg	0.188	0.062	10	0.019	2.122
砷	mcg	0.600	0.198	0		6.772
维生素 C	mg	8.200	2.706	10	0.678	92.551
硫铵	mg	0.076	0.025	10	0.005	0.858
核黄素	mg	0.126	0.042	10	0.017	1.422

(续)

营养物	单位	每 100 g 中的含量	每 240 mL (33 g) 的含量	样本数	标准误	每 100 g 干物 质中的含量
烟酸	mg	0.481	0.159	10	0.044	5.429
泛酸	mg	0.563	0.186	10	0.069	6.354
维生素 B ₆	mg	0.034	0.011	10	0.005	0.384
“叶酸，总叶酸含量”	mcg	36.000	11.880	10	0.8	406.321
维生素 B ₁₂	mcg	0.000	0.000	0		0.000
维生素 A (类胡萝卜素)	IU	155.000	51.150	0		1749.436
维生素 E	mg	0.020	0.007	0		0.226
维生素 K	mcg	30.500	10.065	0		344.244
苏氨酸	g	0.134	0.044	1		1.512
异亮氨酸	g	0.143	0.047	1		1.614
亮氨酸	g	0.267	0.088	1		3.014
赖氨酸	g	0.214	0.071	1		2.415
缬氨酸	g	0.145	0.048	1		1.637

数据来源：USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 16, 2003。

第六节 新牧草品种中主要产品的 鉴定和成分分析

豆科牧草是动物饲料工业中的必要成分。它们对环境的益处包括降低土壤侵蚀能力和从空气中固定氮。草料是粗蛋白、碳水化合物、维生素、钙、镁、钾、铁、钴和胡萝卜素的很好来源。评价新的豆科牧草时，这些营养成分的含量要重点考虑。

牧草种子被引进到生长环境中，若条件有利，则植物开始生长。植物生长的一个重要阶段是开花期。此时营养价值和产量达到最高，因此建议在此时进行刈割或放牧。在这个时间点之后，木质素的比例增加、可消化性降低。苜蓿草对生长环境具有很好的适应性。目前已经选育出对冬季霜冻、干旱、盐碱、酸或碱具有抗性的植株。

饲用豆科植物除了作为牧草外，还可加工成各种形式，包括干草、青贮饲料、粒装粉、草块。除饲用豆科植物外，还可将其他饲草进行加工处理从而贮存营养物质。这些过程可能会影响植物的结构和营养价值。

苜蓿的化学组成随着生理年龄的不同而有所差异，因此有必要对草料进行品质分析。对于新品种而言，应当考虑表 9-11 中所列的分析指标。另外需根据不同作物进一步考虑表 9-12 中所列的其他分析指标。在评价某一新的草料过程中，如果通常用切割的干草和青贮饲料时，应当对营养生长晚期或开花早期的样品进行成分分析。

饲用豆科植物中存在的胃气胀风险和皂角苷是限制该植物应用的主要因素。

表 9-11 苜蓿干草或新鲜草料中建议的最低成分分析参数

参 数	新鲜草料/干草
粗蛋白	X
中性洗涤纤维	X
酸性洗涤纤维	X
木质素 (ADL 或其他)	X
粗脂肪	X
灰分	X
矿物质 (钙、磷)	X
氨基酸	X

表 9-12 苜蓿干草、青贮饲料或新鲜草料中的其他成分分析参数

参 数	新鲜草料/干草	青贮饲料
浓缩的总单宁酸	X	X
总皂角苷	X	X
-苜蓿酸	X	—
-三萜皂苷	X	—
植物雌激素		
-考迈斯托醇 (及甲酯衍生物)	X	X
-刺芒柄花素	X	X
-大豆素	X	X
生氰糖苷		
-昆布多糖 (Limnarin)	X	—
-百脉根甙	X	—
刀豆氨酸	X	—

第七节 苜蓿之外的其他豆科牧草

本文综述的有关苜蓿的情况适用于所有的温带豆科牧草。其余部分介绍了牲畜饲养中应用的其他重要的豆科牧草。新牧草品种中需分析的主要成分见表 9-11。

红三叶草 *Trifolium pratense* L.

三叶草分布较为广泛。在温带地区中发现了该属的 240 个物种，三叶草在美国的种植总面积超过了苜蓿 (Smith et al, 1985)。苜蓿和三叶草同时满足温带、湿润地区和半湿润地区中豆科牧草、干草和青贮饲料生产的需要 (Rumbaugh, 1990)。

红三叶草是一种生长在北部温带地区 (特别是欧洲和北美) 的饲用豆科植物。20 世纪 80 年代，世界 2 000 万公顷红三叶草种植面积中有 700 万公顷种植于北美 (Smith et al, 1985)。据报道，红三叶草起源于欧洲东南部和小亚细亚。

生理学特性

红三叶草适宜在各种土壤和环境条件下生存，特别是排灌不良的环境，其对低 pH 值和低土壤肥力具有相对较高的抗性。红三叶草主根深，可使其抗干旱，但其抗旱能力比苜蓿或红豆草差。红三叶草的最适生长温度为 20~25℃，最适 pH 值为 6.0~7.5。尽管红

三叶草被认为是一种生育期短的多年生植物，但是美国改良品种的繁殖力相对较高，可繁殖 3 年，有时可达 4 年。

碳水化合物对红三叶草越冬具有重要的意义。红三叶草贮存的主要碳水化合物是多糖淀粉，生长季节可在根中积累，用于冬季消耗。秋季收获的三叶草中碳水化合物的积累降低，因此次年第一次收获的产量会降低。

红三叶草可以单播或与其他禾本科牧草混合种植，是世界上几个地区的主要牧草作物。在北美，红三叶草生长于美国灌溉条件下的东北部湿润地区和太平洋西北部，在美国东南部被用作一年生植物 (Taylor and Smith, 1995)。红三叶草的产量潜力高，在美国南部与加拿大交界地区，红三叶草产量低于苜蓿 (Undersander et al, 2002)。红三叶草与禾本科牧草混合播种时，在严冬的生存能力强 (Belzile, 1987)。红三叶草干燥速度慢，因此通常作为青贮饲料和牧草种植，而不调制干草。在北美部分地区，通常将收获的第一茬作物作为草料或青贮饲料，第二茬用于种子生产。在红三叶草为主的草地中青贮饲料的管理包括在开花初期割一茬，6~8 周后再割一茬。通常地，红三叶草被认为是难以青贮的作物，其原因是红三叶草中干物质含量低、水溶性碳水化合物含量低、缓冲能力强导致，达到良好发酵所需低 pH 值的时间长。红三叶草与禾本科草混合后，由于其干物质含量高、水溶性碳水化合物浓度高、氮含量低，因此更容易进行青贮发酵 (Frame et al, 1998)。红三叶草致胃膨胀的潜力大 (Howarth et al, 1991)。

固氮

欧洲的大多数土壤含有豌豆根瘤菌的三叶草生物型 (*R. leguminosarum* bv. *Trifolii*)，因此通常不进行根瘤菌的接种。如果将红三叶草种植于没有三叶草种植历史的土壤中，则有必要对种子进行根瘤菌接种。

红三叶草的固氮总量以及对土壤含氮量的影响存在差异，引发固氮能力变化的因素包括气候和土壤条件、根瘤菌的存在和固氮效率、伴生种以及植物的发育阶段。红三叶草中近 80% 的总氮量可由固氮作用完成 (Heichel et al, 1985)。不过，固氮速率可能由于干旱、土壤中无机氮的积累、土壤酸性或植物落叶而大大降低 (Maag and Nosberger, 1980)。

饲料

红三叶草对反刍动物具有很高的营养价值。气候合适的条件下可提高秋天贮存的越冬草料的品质。随着植株的成熟，红三叶草最初生长部分的可消化性呈线性降低，并与叶片茎秆比降低有关。可消化性的降低伴随着木质素含量的增加以及与非淀粉类多糖的降解降低 (Taylor and Quesenberry, 1996)。

红三叶草的营养成分见表 9-13 和表 9-14。与杂草相比，红三叶草中果胶、木质素、氮、钙、镁、铁和钴的含量通常要高 (Frame et al, 1998)。红三叶草和苜蓿的营养成分类似。二者主要差异之一是红三叶草含有多酚氧化酶，这种酶可抑制青贮窖中的植物蛋白酶 (蛋白质降解酶) 和蛋白质水解酶 (蛋白质分解) 的活性。由于多酚氧化酶的作用，在青贮发酵过程中，红三叶草蛋白质的降解程度与苜蓿蛋白不同。因此，红三叶草中的不可降解蛋白 (过瘤胃蛋白 25%~35%) 高于苜蓿 (15%~25%)。另外有研究表明，当红三叶草和苜蓿纤维含量相近时，红三叶草比苜蓿更易消化，从而为泌乳奶牛提供能量更为集

中的草料 (Hoffman and Broderick, 2001)。然而, 红三叶草无法抵御连续放牧, 但是在轮牧系统中 (rotational stocking system) 反应良好。红三叶草的浓缩单宁含量低 (Sarkar et al, 1976)。正如在苜蓿章节所述, 三叶草中的类黄酮含量高于苜蓿。

表 9-13 营养生长晚期/开花早期的红三叶草 (*Trifolium repens* L.) 中常规成分、木质素、酸性洗涤纤维和中性洗涤纤维的组成 (以干物质基准表示)

	干草 NRC7 ^①	干草 NRC82 ^②	干草 sminger ^③	干草 NRC96 ^④	干草 offman ^⑤	干草的范围	文献报道的 饲料的范围 ^⑥
干物质	87.3	89.0	87.0	89.0		0.87~0.89	21.1~53.5
粗蛋白	21.4	16.0	21.4	20.8	18.4	16.0~21.4	14.9~22.5
粗脂肪	3.9	2.8	3.9	3.0	—	2.8~3.9	4.3
粗纤维	20.4	28.8	20.4	—	—	20.4~28.8	—
中性洗涤纤维	—	—	—	48.0	34.9	34.9~48.0	31.7~50.5
酸性洗涤纤维	—	—	—	—	24.4	24.4	24.9~37.0
木质素	—	10.0	—	16.67	4.3	4.3~10.0	4.2~4.3
灰分	9.7	8.5	9.7	7.0	—	7.0~9.7	1.9~11.5

注: ① NRC, 1971; ② NRC, 1982; ③ Ensminger et al, 1990; ④ Hoffman et al, 1993; ⑤ Dewhurst et al, 2003; Broderick et al, 2001; Coblenz et al, 1998; Hoffman et al, 1997; Hoffman et al, 1993; Al-Mabruk et al, 2004。

表 9-14 营养生长晚期的红三叶草 (*Trifolium pratense* L.) 中矿物质的组成 (以干物质基准表示)

	NRC71 ^①	NRC82 ^②	Ensminger ^③	NRC01 ^④	范围
钠 mg/100 g	—	0.19	—	0.18	0.18~0.19
钾 mg/100 g	2.57	1.62	3.24	1.81	1.62~3.24
钙 mg/100 g	1.77	1.53	1.55	1.38	1.38~1.77
磷 mg/100 g	0.31	0.25	0.37	0.24	0.24~0.37
镁 mg/100 g	0.51	0.43	0.39	0.38	0.38~0.51
铁 mg/100 g	—	0.018	0.073	0.024	0.018~0.073
硫 mg/100 g	—	0.17	—	0.16	0.16~0.17
铜 mg/kg	—	11.0	21.1	11.0	11.0~21.1
钴 mg/kg	—	0.16	0.23	0.16	0.16~0.23
锰 mg/kg	—	73.0	86.7	108.0	73.0~108.0
锌 mg/kg	—	17.0	52.0	17.0	17.0~52.0
氯 mg/100 g	—	. 32	—	0.32	0.32

注: ① NRC, 1971; ② NRC, 1982; ③ Ensminger et al, 1990; ④ NRC, 2001。

白三叶草 *Trifolium repens* L.

就三叶草属的牧草而言, 白三叶草 (*Trifolium repens* L.) 是世界上最重要的真正三叶草物种。白三叶草主要应用于西欧、北美、新西兰和澳大利亚。澳大利亚白三叶草的种植面积大约有1 500万公顷, 美国有 500 万公顷。据报道这种豆科植物可能起源于地中海地区 (Taylor et al, 1980)。

生产

白三叶草通常与某些禾本科牧草如多年生黑麦草混合种植, 在美国一般与草地早熟

禾 (*Poa pratensis*) 一起种植。禾本科饲草和三叶草混合种植的方式在各种牧草系统中都得到了成功应用, 既可用于间断的放牧系统 (轮牧), 也可应用于连续的放牧系统, 在同一季节还可应用于两类混合的放牧系统。在加拿大, 白三叶草可从夏末开始贮备并供秋末应用, 因此延长了放牧季节 (Fraser et al, 1993; Kunelius and Narasimhalu, 1993)。白三叶草具有很高的致胃臌胀潜力 (Howarth et al, 1991), 这可能由于其具有大量叶片。

白三叶草在耕作系统中起着重要作用, 特别是在维持和建立土壤肥力中起着重要作用, 不管是作为绿色肥料还是在轮作中作为豆科牧草均是如此 (Barney, 1987; Ten Holte and Van Keulen, 1989)。当有深播的耕作作物 (如玉米) 时, 还可起着保护土壤免受侵蚀的作用, 最大限度减少因为耕作引起的破坏 (Lampkin, 1990)。在单作或与禾本科牧草混合种植的系统中, 白三叶草可作为保护地面的覆盖物或稳定土壤的植物 (Parente and Frame, 1993)。人们越来越多地关注白三叶草的地下生长, 与粮食作物套种可为其提供氮肥。

生理学

白三叶草可在牧场适合的生境中扩散和定殖。与其他豆科植物相比, 白三叶草对严重脱叶的抗性强, 在环境中的持续性和入侵性强 (Burdon, 1983)。白三叶草可适应各种土壤, 但是在排灌条件不好的土壤中 (McAdam, 1983)、易干旱的浅土中 (Foulds, 1978, Thomas, 1984)、或湿地 (Burdon, 1983) 中生长不好。与红三叶草和苜蓿不同, 白三叶草可持续产生新叶。

固氮

就固氮而言, 豌豆根瘤菌三叶草生物型 *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* 菌群可感染白三叶草的根, 是土壤中三叶草属的优势菌群。否则, 需要用高效竞争性强的根瘤菌接种白三叶草 (Newbould et al, 1982)。

饲料

白三叶草的营养成分见表 9-15 和表 9-16。白三叶草的可消化性高于其他温带豆科牧草。白三叶草几乎总是与禾本科牧草混合种植, 10%~20% 的白三叶草可使动物产量达到最高 (Curl, 1982; Stewart, 1984)。动物对干物质的吸收表明, 不管饲料以何种形式供应 (新鲜草料、干燥草料、干草或青贮饲料), 动物对白三叶草中干物质的吸收要高于禾本科牧草 (Thomson, 1984)。白三叶草的物理、化学和形态特征使其具有优良的吸收品质。羊咀嚼白三叶草的时间短, 由于堆积密度大每口所咬的草较多 (Edwards et al, 1995)。小母牛对禾本科牧草的咀嚼时间和反刍时间比三叶草长 (Orr et al, 1996)。白三叶草颗粒在瘤胃中的降解速度比黑麦草快 (Moseley and Jones, 1984; Ulyatt et al, 1986), 且瘤胃对豆科植物的消化快 (Beever and Thorp, 1996)。在同样的消化水平下, 白三叶草的吸收速度比禾本科牧草快, 而且白三叶草中的营养素的利用效率更高 (Beever et al, 1985), 动物能够更高效地利用代谢能量 (Rattray and Joyce, 1974)。白三叶草在饲草中不积累浓缩单宁酸, 但是在花中会积累这些多聚体 (Sarkar et al, 1976; Foo et al, 1982)。一些白三叶草栽培种含有生氰苷。

表 9-15 营养生长晚期/开花早期收获的白三叶草 (*Trifolium repens* L.) 的常规成分、木质素、酸性洗涤纤维和中性洗涤纤维的含量 (以干物质百分含量表示)

	NRC71 ^①	干草 NRC82 ^②	干草 Ensminger ^③	干草 NRC96 ^④	干草的范围	干草 ^⑤ Dewhurst
干物质	17.7	90.0	89.0	89.0	17.7~90.0	24.2
粗蛋白	28.2	22.0	22.4	22.4	22.0~28.2	26.1
粗脂肪	3.3	2.7	2.7	2.7	2.7~3.3	—
粗纤维	15.7	21.2	20.8	—	15.7~21.2	—
中性洗涤纤维	—	—	36.0	36.0	36.0	26.9
酸性洗涤纤维	—	32.0	32.0	—	32.0	27.4
木质素	—	7.0	6.6	7.0	6.6~7.0	—
灰分	11.9	10.1	9.4	9.4	9.4~11.9	10.0

注：① NRC, 1971；② NRC, 1982；③ Ensminger et al, 1990；④ NRC, 1996；⑤ Dewhurst et al, 2003。

表 9-16 营养生长晚期至开花早期的白三叶草 *Trifolium repens* L. 中矿物质的组成 (以干物质百分含量表示)

	NRC71 ^①	NRC82 ^②	Ensminger ^③	NRC01 ^④	范围
钠 g/100 g	0.39	0.13	0.13	0.13	0.13~0.39
钾 g/100 g	2.13	2.62	2.44	2.44	2.13~2.44
钙 g/100 g	1.40	1.35	1.45	1.45	1.35~1.45
磷 g/100 g	0.51	0.31	0.34	0.33	0.31~0.51
镁 g/100 g	0.45	0.48	0.47	0.47	0.45~0.48
铁 g/100 g	0.034	0.041	0.047	0.047	0.034~0.047
硫 g/100 g	0.33	0.21	0.21	0.21	0.21~0.43
铜 mg/kg	—	10.0	9.40	9.41	9.40~10.0
钴 mg/kg	—	0.16	0.16	0.16	0.16
锰 mg/kg	307.2	95.0	123.1	123.0	95.0~307.2
锌 mg/kg	—	17.0	17.0	17.9	17.0~17.9
氯 g/100 g	0.61	0.30	0.30	0.30	0.30~0.61

注：① NRC, 1971；② NRC, 1982；③ Ensminger et al, 1990；④ NRC, 2001。

杂三叶 (*Trifolium hybridum* L.)

杂三叶 (*Trifolium hybridum* L.) 生长于欧洲、亚洲、北美和南美的温带和亚北极地区以及澳大利亚部分地区。通常在寒冷的气候条件下产量高、生长良好。有报道认为，杂三叶起源于北欧。这种生命周期短的多年生植物与红三叶草具有类似的定殖能力。

产量

杂三叶在寒冷的气候条件下生长最好，对于不适于红三叶草或苜蓿生长的湿润、贫瘠或酸性土壤也具有适应性 (Townsend, 1995)。不过，杂三叶不抗干旱或盐碱。杂三叶通常对寒冷和霜冻具有非常高的抗性，因此可在较为寒冷的区域定殖和生长。世界上大部分杂三叶种子产于北美，包括亚伯达州、爱达荷州和俄勒冈州。

杂三叶通常与禾本科牧草或其他豆科植物混合种植。在北美，通常建议将杂三叶与红三叶草及某种禾本科牧草 (如猫尾草) 混合种植 (Townsend, 1995)。杂三叶的农艺和管理措施与红三叶草相似，也会引起胃气胀 (Howarth et al, 1991)。

饲料

与其他豆科植物一样, 杂三叶富含蛋白质和矿物质, 随着植物的成熟, 可消化性降低。杂三叶整个季节一直开花, 是牲畜十分可口的饲料。尽管杂三叶的含水量高, 难以干燥而生产干草, 但是杂三叶仍被用作牧草和干草。第一茬刈割制作干草之后的再生植株可用于秋天的放牧系统。需要重点提出的是, 不建议用杂三叶含量在 5% 以上的干草或牧草饲养马, 原因是杂三叶会引起马中毒, 其症状表现为马的肝脏受损并发生过敏反应。引起中毒的原因目前尚不清楚, 可能由真菌引起, 而不是杂三叶本身的原因 (Knight and Walter, 2003)。杂三叶的组成成分见表 9-17 和表 9-18。

表 9-17 营养生长晚期/开花早期的杂三叶 *Trifolium hybridum* L. 的常规成分
(以干物质百分含量表示)

	NRC71 ^①	Ensminger ^②	NRC82 ^③	范围
干物质	87.4	88.0	19.0	19.0~88.0
粗蛋白	14.2	14.2	24.1	14.2~24.1
粗脂肪	2.7	2.8	3.2	2.7~3.2
粗纤维	30.1	29.9	17.5	17.5~30.1
灰分	8.7	8.7	12.8	8.7~12.8

注: ① NRC, 1971; ② Ensminger et al, 1990; ③ NRC, 1982。

表 9-18 营养生长晚期至开花早期的杂三叶 *Trifolium hybridum* L. 中矿物质的组成
(以干物质基准表示)

	NRC71 ^①	Ensminger ^②	NRC82 ^③	范围
钠 g/100 g	0.46	0.46	0.46	0.46
钾 g/100 g	2.74	2.22	2.62	2.22~2.74
钙 g/100 g	1.29	1.30	1.32	1.29~1.32
磷 g/100 g	0.26	0.25	0.28	0.25~0.28
镁 g/100 g	0.32	0.45	0.31	0.31~0.45
铁 g/100 g	0.045	0.026	0.046	0.026~0.046
硫 g/100 g	0.21	0.19	0.17	0.17~0.21
氯 g/100 g	0.78	0.78	0.77	0.77~0.78
铜 mg/kg	6.0	6.0	6.0	6.0
锰 mg/kg	117.0	69.0	117.0	69.0~117.0

注: ① NRC, 1971; ② Ensminger et al, 1990; ③ NRC, 1982。

地三叶草 (*Trifolium subterraneum*)

地三叶草 (*Trifolium subterraneum*) 也称亚三叶草, 冬季一年生植物, 是澳大利亚旱地一种十分重要的植物。这类豆科植物可能起源于地中海地区, 经驯化后作为牧草应用, 或与粮食作物轮作而用于改良土壤。地三叶草也应用于美国西北部、欧洲南部、拉丁美洲和新西兰, 但应用程度较低。地三叶草喜好夏天干热、冬季湿润、气温温和 (6~14℃)、降雨充沛的地区。

生产

地三叶草可在湿润的秋季快速发芽, 冬季和春季生长, 冬末春初开花结子, 夏季干旱

时期种子休眠得以保存，该机制可避免夏天干旱的破坏性。地三叶在土壤相对肥沃，特别是磷和硫含量较高时生长最好，与其他豆科植物相比，其突出之处在于可在不肥沃的酸性土壤中生长 (Frame et al, 1998)。

地三叶草用于放牧的同时，还可用于防止水土流失以及在园林和果园中作为绿肥或作为抑制杂草生长的覆盖植被 (Caporali et al, 1993)。

固氮

如果牧场准备重新播种地三叶草或者与其他禾本科牧草一起播种，除非此牧场之前种植地三叶草的时间较长，否则建议接种根瘤菌。应用正确的豌豆根瘤菌生物型 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*) 菌株对地三叶草的定殖和生产具有积极影响。

饲料

在放牧耐受性方面，地三叶草在一年生豆科牧草中比较突出 (Caporali et al, 1993)。在牧场中作为一年生种子作物是地三叶草持久生长的基本条件。因此，草地产生种子的潜力不能因为过度放牧而受损，这是很重要的。与其他豆科植物相同，地三叶草富含粗蛋白 (与禾本科杂草相比)。随着地三叶草的成熟，蛋白质的浓度逐渐降低，可消化性也降低。

在灌溉草场中，牧用地三叶草具有高度的可消化性，含氮量高，中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维和木质素含量低 (Frame et al, 1998)。叶片中瘤胃可有效降解的蛋白含量很低，因此瘤胃中微生物蛋白的合成受到限制，这对动物的生产具有不良影响 (Mulholland et al, 1996)。表 9-19 列出了地三叶草的常规组成成分。

表 9-19 开花早期收获的地三叶草 *Trifolium subterraneum* L. 的常规成分
(以干物质百分含量表示)

	NRC71 ^①
干物质	90
CP	30.5
脂肪	3.7
CF	10.1
灰分	11.1

注：① NRC, 1971。

百脉根 (*Lotus corniculatus* L.) 和 Greater Lotus (百脉根属 *Lotus* spp.)

百脉根属被认为是豆科植物的先锋物种，原因是它可以在寒冷、潮湿、酸性、不肥沃的土地上生存 (Frame et al, 1998)。百脉根属物种很多，包括一年生和多年生物种。(Zandstra and Grant, 1968; USDA Plants Database, 2003)。用作牧草的主要有百脉根、湿地百脉根 (大乌脚拟三叶草或忘忧草) (*Lotus uliginosus* Schkuhr. 也称 *L. pedunculatus*) 以及窄叶百脉根 (*Lotus tenuis*) 3 种。

直至 20 世纪 90 年代初，百脉根才被引入到北美，但这种草在欧洲、非洲和亚洲十分常见。地中海地区可见到大部分物种。据说地中海地区是其起源地。北美地区的酸性、贫瘠和低投入管理系统中种植了大约 120 万公顷百脉根。英国、法国和德国以及美国西北部可见更多的百脉根属物种。

生产

百脉根适宜黏性土壤，而黏性土对于苜蓿生长则过于湿润或酸性太强。百脉根可抗干旱，甚至比苜蓿抗旱性更强 (Peterson et al, 1992)。与苜蓿或红三叶草相比，百脉根可在排灌不良的土壤中长期存活 (Barta, 1986)，且对盐碱土具有高度抗性 (Schachtman and Kelman, 1991)。窄叶百脉根适宜生长在排灌不良的地区，如欧洲中部和美国北部地区，特别是盐碱和碱性土壤中。百脉根属各物种由于定殖慢、生长速度慢、竞争力弱而不易被人们接受 (McKersie et al, 1981)。很多百脉根属物种不抗寒。但百脉根一旦定殖就十分抗寒，抗寒性略低于苜蓿，并且在加拿大牧场恶劣的环境条件下不能生存。与苜蓿不同，百脉根属植物不开花的时间短，而苜蓿的具有相当长的不开花生长期。

百脉根在干旱土壤中的作用很大，由于体内含有浓缩单宁 (Foo et al, 1982; Sarkar et al, 1976)，因此是一种不引起胃臌胀的豆科植物 (Howarth et al, 1991)。大三叶草也含单宁酸 (Foo et al, 1982)。世界不同地区的报道证实，在各式的草地改良 (从低地放牧到高山放牧) 中均应用了百脉根属植物，尤其是百脉根 (Frame et al, 1998)。如果百脉根同时用作干草和牧草，则应当在开花早期收获，然后在再生植株开始开花时放牧。由于百脉根在杂草中不具有竞争性，因此杂草防治十分重要，尤其是在定殖年份。百脉根的产量比苜蓿少 25%~30%。建议只在土壤酸性、排灌不良或土壤肥力低的不适于苜蓿生产的地区种植。

饲料

有关百脉根化学组成方面的研究较少，但是百脉根的营养价值与苜蓿相近 (Marten and Jordan, 1979)。百脉根的组成成分见表 9-20 和表 9-21。百脉根的木质素含量低于其他豆科植物，如白三叶草、红三叶草和苜蓿。百脉根属各物种的花和草料中缩合单宁的含量不同 (Sarkar et al, 1976; Foo et al, 1982; Muir et al, 1999; Muir, 未发表)，黄酮醇的含量不同 (Harney and Grant, 1964; 1965)，生氰糖苷的含量也不同 (Grant and Sidhu, 1967)。大百脉根中缩合单宁的含量中等，在 40~245 mg. g⁻¹ 干重 (Lees et al, 1994; Muir et al, 1999)。百脉根具有中低含量的单宁酸 (Muir et al, 1999)。一些百脉根植生氰糖苷含量很高 (Zandstra and Grant, 1968)。

植株较为直立的百脉根适于生产干草和青贮饲料，每季可割 2~3 茬。这种豆科植物作为干草、青贮饲料和牧草在美国北部和加拿大东部具有很重要的作用 (Beuselinck and Grant, 1995)。尽管百脉根可积累浓缩的单宁酸，但是它仍是牲畜适口的饲料。因此，该牧草最好应用于轮牧系统 (Van Keuren and Davis, 1968, Van Keuren et al, 1969)。早春放牧或连续放牧将减弱百脉根的直立状态，甚至使之无法直立。如果管理得当，百脉根可定殖，并将持续数年。

表 9-20 营养生长晚期或开花早期收获的百脉根 *Lotus corniculatus* L. 中常规成分、木质素、酸性洗涤纤维、中性洗涤纤维的组成 (以干物质百分含量表示)

	NRC71 ^①	NRC82 ^②	Ensminger ^③	NRC96 ^④	Hoffman ^⑤	范围
干物质	89.0	92.0	91.0	91.0	100	89.0~100

(续)

	NRC71 ^①	NRC82 ^②	Ensminger ^③	NRC96 ^④	Hoffman ^⑤	范围
粗蛋白	16.0	16.3	15.3	15.9	17.0	15.3~16.3
粗脂肪	2.2	2.5	2.1	2.1		2.1~2.5
粗纤维	29.6	30.7	32.3			29.6~32.3
中性洗涤纤维			47.0	47.5	44.4	44.4~47.5
酸性洗涤纤维		36.0	36.0		35.8	35.8~36.0
木质素		9.0		9.1	9.8	9.1~9.8
灰分	7.6	7.0	7.4	7.4		7.0~7.6

注：① NRC, 1971；② NRC, 1982；③ Ensminger et al, 1990；④ NRC, 1996；⑤ Hoffman et al, 1993。

表 9-21 开花早期的百脉根 *Lotus corniculatus* L. 中矿物质的组成
(以干物质百分含量表示)

	NRC71 ^①	Ensminger ^②	范围
钠 g/100 g	0.07	0.07	0.07
钾 g/100 g	1.92	1.92	1.92
钙 g/100 g	1.70	1.7	1.70
磷 g/100 g	0.27	0.23	0.23~0.27
镁 g/100 g	0.51	0.51	0.51
铁 g/100 g	0.023	0.023	0.023
磷 g/100 g	0.25	0.25	0.25
铜 mg/kg	9.0	9.3	9.0~9.3
钴 mg/kg	0.11	0.11	0.11
锰 mg/kg	29.0	28.7	28.7~29.0
锌 mg/kg	77.2	77.2	

注：① NRC, 1971；② Ensminger et al, 1990。

红豆草 (*Onobrychis viciifolia* Scop.)

红豆草 (*Onobrychis viciifolia* Scop.) 也称公鸡头香草。在法国，红豆草定义为“健康的干草”，这可能是指它不具有致胃气胀的特征。这种多年生豆科植物是亚洲西部和欧洲南部的本地草，也可见于美国西部和加拿大的干燥石灰质土壤中 (Miller and Hoveland, 1995)，由于不具有遗传多样性而无法成为这些国家农业中的重要牧草。

生产

红豆草在 pH 值为 6.0 或更高的石灰质土壤中生长良好，这种土壤对于三叶草或苜蓿而言过于干燥或贫瘠。红豆草的抗旱能力甚至比苜蓿强，但其产量低 (Rogers, 1976)。红豆草在深灌以及排灌良好的土壤中生长最好，对湿润土或地下水位高的土壤不具有抗性。红豆草对盐碱土具有一定抗性，一般在低磷含量的土壤中生长良好。红豆草要求土壤中富含石灰。红豆草可抗寒，但它的抗寒性不如当地的苜蓿栽培种。由于在定殖年份生长缓慢，易受到杂草的入侵。

红豆草可单作也可与其他牧草 (如牛毛草或鸭茅) 混作，但它竞争不过匍匐类的深根杂草。刈割时的生长期决定了干草或青贮饲料的品质，开花中期刈割适于用作干草，开花初期切割适于制作青贮饲料。第一茬刈割后的再生营养价值高，是牲畜的优选饲料。不

过, 由于植株的再生能力受限, 应当避免过度放牧, 尤其是大范围放牧。红豆草的适口性, 比苜蓿好。在旱地条件下, 红豆草的干物质产量比苜蓿低 20%, 在灌溉区干物质的产量可比苜蓿低 30% 甚至更高。

与苜蓿不同, 红豆草的下部叶片不脱落, 随着植物茎秆逐渐成熟而始终多汁, 因此品质不会快速降低。遗憾的是, 由于成本和种子供应方面的问题, 红豆草的应用受到了限制。种子供应不足, 主要是由于其依赖于本地昆虫传粉, 而昆虫传粉制种的产量不稳定。而且, 随着廉价氮肥的增加, 这种豆科植物的流行程度也有所降低。

基于上述原因, 建议红豆草只用于短期轮作或与禾本科牧草、豆科植物 (如苜蓿、百脉根、草地雀麦或果园草) 混合种植, 混合种植的植物在红豆草减少之后定殖。红豆草与不具有竞争力的禾本科草一起播种, 可能有利于提高产量, 降低杂草压力。红豆草用作牧草的优势在于其优良的品质和适口性, 动物食用后不会有臃胀病的风险, 保证了动物的生产性能, (Howarth et al, 1991)。在苜蓿饲料中加入 10%~20% 的红豆草, 可抑制公牛的部分胃气胀现象 (McMahon et al, 1999)。

固氮

与苜蓿和三叶草相比, 红豆草的固氮能力弱。在种植前, 应当接种特定的根瘤菌, 红豆草才能很好地定殖和生长。固氮菌可能生命周期短或效率不高, 因此需要对这种豆科植物施用氮肥。

饲料

与其他豆科植物相似, 红豆草富含蛋白质, 不过, 蛋白质的消化性较低。红豆草的粗蛋白含量和消化率低于苜蓿 (Karnezos et al, 1994)。与禾本科草相比, 红豆草富含矿物质, 但是其钙和钠的含量比其他饲用豆科植物低得多 (Spedding and Diekmahns, 1972)。红豆草的碳水化合物含量高于苜蓿, 粗蛋白、纤维和灰分含量低于苜蓿。红豆草缩合单宁的含量中等, 为 27~75 mg/g 干物质 (Koupai-Abyazani et al, 1993; Marais et al, 2000)。如果牛饲用混合红豆草的牧草 (红豆草作为缩合单宁的来源) 时, 可显著降低生产成本 (Popp et al, 2000)。

鹰嘴紫云英 (*Astragalus cicer*)

鹰嘴紫云英 (*Astragalus cicer*) 是一种生命周期长的多年生植物, 是欧洲大陆的本地种。这种豆科植物由于可在贫瘠的土壤中生长良好, 因此广泛生长在各种环境中。鹰嘴紫云英小规模种植于加拿大。

生产

鹰嘴紫云英是一种耐寒性牧草, 根系深且具有匍匐生长习性。鹰嘴紫云英抗干旱、略抗酸性和碱性, 但是不抗水淹。与苜蓿相比, 鹰嘴紫云英对晚春和早期霜冻现象的免疫更强。鹰嘴紫云英在定殖两年后才可进行干草或牧草生产。在整个季节都可进行放牧, 且生长良好。鹰嘴紫云英不致臃胀病, 原因是它具有网状叶脉, 且表皮厚 (Howarth et al, 1979; Lees et al, 1982)。在生长季节较长的地区, 该豆科植物的产量与苜蓿相当。由于鹰嘴紫云英在春天生长慢, 收获后恢复慢, 因此每季只收获 2 次或 3 次。鹰嘴紫云英一般与禾本科草竞争生长, 因此要想维护其正常生长, 需要具有同样竞争力的禾本科草, 这些草包括匍匐狐尾草、草地雀麦、果园草和高羊茅。

饲料

鹰嘴紫云英的蛋白质含量等于或超过其他豆科植物，原因是由于叶片与茎秆比高，比苜蓿的含量高出40%，在干燥和打捆过程中保留叶片的能力强。鹰嘴紫云英收获时的含水量比苜蓿或红豆草平均高出4%~8%。这使干燥的时间延长，比其他豆科植物大约长3d。鹰嘴紫云英特别适宜于放牧环境，并抵御过度放牧的破坏。鹰嘴紫云英通常以干草或牧草形式被各类动物取食。目前还没有关于鹰嘴紫云英引起胃气胀的案例。

草木樨 (*Melilotus officinalis*)

草木樨 (*Melilotus officinalis*) 是一种抗寒、抗干旱的二年生植物，可适应各种土壤。这种豆科植物可抗盐碱，但是不抗酸 (Gorz and Smith, 1978)。黄色草木樨比白色草木樨对干旱的抗性强、植株矮、成熟期早。

生产

草木樨多种植在加拿大和美国玉米带中土壤为碱性的地区，可用作干草，由于其根系深，因此有助于防止土壤侵蚀。为了获得具有良好品质的草木樨干草，应当在蕾期前进行刈割。在放牧时，割茬高度应保持在30cm，这有利于植物的再生。

饲料

与其他三叶草一样，这种豆科植物可引起胃气胀，只是潜力不如苜蓿和三叶草强 (Howarth et al, 1991)。草木樨可产生香豆素，香豆素是一种香甜的酚类物质，在不宜干草加工的条件下（如潮湿、发霉）会变成双香豆素。双香豆素是一种抗凝血剂，可使牲畜因内部出血（草木樨出血病）而死亡。现已经开发出了香豆素含量低的品种 (Goplen, 1971、1981)。

锯齿草 (*Ornithopus*)

锯齿草是欧洲西南部的夏季一年生植物。这种豆科植物在气候温和的地区（如澳大利亚南部）种植时，为冬季或冷季一年生植物。锯齿草有两个种，一个是粉红色锯齿草或法国锯齿草 (*Ornithopus sativus* Brot.)，作为饲草栽培于欧洲部分地区、澳大利亚以及肯尼亚和南非的高海拔地区；另一个是黄色锯齿草 (*Ornithopus compressus* L.)，广泛存在于地中海周边国家非石灰土质的天然草场中。

生产

锯齿草生长在适于苜蓿生长的所有类型土壤中，而且也可生长于三叶草无法生长的砂砾质土、含砂的土壤中 (Gladstones and McKeown, 1977)。黄色锯齿草只生长在年降水量大于500 mm的地区。

饲料

与大多数豆科植物相似，随着植物的成熟，锯齿草粗蛋白的含量以及可消化性降低，只是降低的速度低于苜蓿或红三叶草 (Iglesias and Lloveras, 2000)。

锯齿草一旦定殖，就可在与其他具有相似放牧频率的地三叶草系统中放牧，而且在刈割后制作饲料 (Taylor and Hughes, 1978)。这类豆科植物的干物质产量变化很大，且取决于几个因素。粉红色锯齿草品种通常营养价值高 (Gladstones and Barrett-Lennard, 1964)。在西班牙西北部，种植于秋初的粉红色锯齿草可与玉米一起用于双耕作系统中 (Iglesias and Lloveras, 1998)。

锯齿草固氮能力强, 在新西兰的农林系统中一般作为放牧的下层植物。在葡萄园也用作下层植物, 当葡萄树处于休眠期时, 可为葡萄树防治杂草和供应氮 (Lloveras, 1987)。

冠状岩黄芪 (*Hedysarum coronarium* L.)

冠状岩黄芪 (*Hedysarum coronarium* L.) 也称为意大利红豆草、法国金银花或甜豌豆。据报道, 这种生活期短的多年生草本植物起源于地中海西部和非洲北部 (Duke, 1981)。

生产

冠状岩黄芪是意大利南部最主要的豆科植物, 大约有250 000公顷用于动物放牧和作为动物干草 (Martiniello and Ciola, 1994)。已经评价了冠状岩黄芪在北美的应用, 但是目前只有几英亩进行了商业化生产 (Allen and Allen, 1981)。冠状岩黄芪主要是单独播种, 也可与禾本科植物一起种植, 或其他豆科植物混合种植, 通常生长于 pH 值不超过 6.0~6.5 的土壤中。

饲料

冠状岩黄芪作为饲料的营养价值高 (特别是小叶的营养价值高), 为了获得最适宜的干草产品, 应在开花前期刈割。就放牧而言, 该豆科植物最好应用于轮牧系统中。岩黄芪属各物种含有缩合单宁酸, 可避免胃臌胀病的发生 (Skadhauge et al, 1997)。

◆ 参考文献

- Aerts, J. R., Barry, T. N. and McNabb, W. C. 1999. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agric. Ecosyst. Environ.* 75: 1-12.
- Allen, O. N. and Allen, E. K. 1981. *The Leguminosae, a source book of characteristics, uses and nodulation*. Univ. Wisconsin Press, Madison, WI, USA.
- Al-Mabruk, R. M., Beck, N. F. G. and Dewhurst, R. J. 2004. Effects of silage species and supplemental vitamin E on the oxidative stability of milk. *J. Dairy Sci.* 87: 406-412.
- Amrane, R. and Michaeltdoreau, B. 1993. Effect of maturity stage of Italian ryegrass and lucerne on ruminal nitrogen degradability. *Ann. Zootech.* 42: 31-37.
- Bae, H. E., McAllister, T. A., Yanke, J., Cheng, K. -J. and Muir, A. D. 1993. Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2132-2138.
- Barney, P. A. 1987. The use of *Trifolium repens*, *Trifolium subterraneum* and *Medicago lupulina* as overwintering leguminous green manures. *Biol. Agric. Hort.* 4, 225-234.
- Barry, T. N. 1989. Condensed tannins: Their role in ruminant protein and carbohydrate digestion and possible effects upon the rumen ecosystem. In: Nolan, J. V., Leng, R. A. and Demeyer, D. I. 1988. *The roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion*. Penambul Books, Armidale, NSW Australia, pp. 153-169.
- Barry, TN. and McNabb, W. C. 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *Br. J. Nutr.* 81: 263-272.
- Barta, A. L. 1986. Metabolic response of *Medicago sativa* L. and *Lotus corniculatus* L. roots to anoxia. *Plant Cell Env.* 9: 127-131.
- Bas, P., Archimede, H., Rouzeau, A. and Sauvart, D. 2003. Fatty acid composition of mixed-rumen bacteria: Effect of concentration and type of forage. *J. Dairy Sci.* 86: 2940-2948.

- Beever, D. E. and Thorp, C. 1996. Advances in the understanding of factors influencing the nutritive value of legumes. In: Younie, D. (ed.) *Legumes in Sustainable Farming Systems*. Occasional Symposium No. 30, British Grassland Society, Reading, pp. 194-207.
- Beever, D. E., Thomson, D. J., Ulyatt, M. J., Cammell, S. B. and Spooner, M. C. 1985. The digestion of fresh perennial ryegrass (*Lolium perenne* L. cv. Melle) and white clover (*Trifolium repens* L. cv. Blanca) by growing cattle fed indoors. *Br. J. Nutr.* 54: 763-775.
- Belzile, L. 1987. Effect of companion timothy on winter survival of red clover. *Can. J. Plant Sci.* 67: 1101-1103.
- Beuselinck, P. R. and Grant, W. F. 1995. Birdsfoot trefoil. In: Barnes, R. F. Miller, D. A. and Nelson, C. J. (eds) *Forages*, 5th edn, Vol. 1, An Introduction to Grassland Agriculture. Iowa State University Press, Ames, Iowa pp. 237-248.
- Bialy, Z., Jurzysta, M., Oleszek, W., Piacente, S. and Pizza, C. 1999. Saponins in alfalfa (*Medicago sativa* L.) root and their structural elucidation. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3185-3192.
- Bins, W. and Pedersen, M. W. 1964. Effecting of feeding high saponin hay to four-month-old Holstein-Friesian bulls. *Proc. 7th Conf. Rumen Function*, Chicago, IL.
- Birk, Y. 1969. Saponins. Pp. 169-210. In: Liener, E. I. (ed.) *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. Academic Press, New York.
- Bondi, A., Birk, Y. and Gestetner, B. 1973. Forage saponins. Ppg. 511-528. In: Butler, G. W. and Bailey R. W. (eds.). *Chemistry and Biochemistry of Herbage*. Academic Press, New York.
- Brink, G. E. and Marten, G. C. 1989. Harvest management of alfalfa - nutrient yield vs. forage quality and relationship to persistence. *J. Prod. Agric.* 2: 32-36.
- Broderick, G. A. 1995. Performance of lactating dairy cows fed either alfalfa silage or alfalfa hay as the sole forage. *J. Dairy Sci.* 78: 320-329.
- Broderick, G. A. and Albrecht, K. A. 1997. Crop quality and utilization. Ruminal in vitro degradation of protein in tannin-free and tannin-containing forage legume species. *Crop Sci.* 37: 1884-1891.
- Broderick, G. A., Walgenbach, R. P. and Maignan, S. 2001. Production of lactating dairy cows fed alfalfa or red clover silage at equal dry matter or crude protein contents in the diet. *J. Dairy Sci.* 84: 1728.
- Burdon, J. J. 1983. Biological flora of the British Isles; *Trifolium repens*. *J. Ecol.* 71: 307-330.
- Butler, L. G., Riedl, D. J., Lebryk, D. G. and Blytt, H. J. 1984. Interaction of proteins with sorghum tannin; mechanism, specificity and significance. *JAOC* 61: 916-920.
- Butter, N. L., Dawson, J. M., Wakelin, D. and Buttery, P. J. 2001. Effect of dietary condensed tannins on gastrointestinal nematodes. *J. Agric. Sci.* 137: 461-469.
- Caporali, F., Campiglia, E. and Paolini, R. 1993. Prospects for more sustainable cropping systems in central Italy based on subterranean clover as a cover crop. In: Baker, M. J. (ed.) *Proceedings of the XVth International Grassland Congress*, New Zealand and Australia, Vol. III. New Zealand Grassland Association, Palmerston North pp. 2197-2198.
- Carruthers, V. R., O'Connor, M. B., Feyter, C., Upsdell, M. P. and Ledgard, S. F. 1987. The 1986 MAF bloat survey. *Proceedings of the 4th Seminar of the Dairy Cattle Society of the New Zealand Veterinary Association held at Rotorua, New Zealand, 18-20 November 1987*. Massey University, Palmerston North, New Zealand; pp. 11-16.
- Chamblee, D. S. and Collins, M. 1988. Relationships with other species in a mixture. In: Hanson, A. A., Barnes, D. K. and Hill, R. R., Jr. (eds) *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Agronomy Monograph No. 29, ASA/CSSA/SSSA, Madison, Wisconsin, pp. 439-461.

- Chapman and Hall, . 1982-98. The Combined Chemical Dictionary on CD-ROM. HeadFAST/CD Software. Head Software Int. PST. Release 2. 2.
- Christensen, R. A. 2004a. unpublished data from the following experiments; Christensen, R. A., Drackley, J. K., LaCount, D. W. and Clark, J. H. 1994. Infusion of four long-chain fatty acid mixtures into the abomasum of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77: 1052-1069;. , Overton, T. R. , , J. H. , Drackley, J. K. , Nelson, D. R. , and Blum, S. A. 1996. Effects of dietary fat with or without nicotinic acid on nutrient flow to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79: 1410-1424; and R. A. Christensen and J. H. Clark, personal communication.
- Christensen, R. A. 2004b. unpublished data from the following experiments; Christensen, R. A., Clark, J. H., Drackley, J. K. and Blum, S. A. 1998. Fatty acid flow to the duodenum and in milk from cows fed diets that contained fat and nicotinic acid. *J. Dairy Sci.* 81: 1078; Christensen, R. A., Cameron, M. R., Clark, J. H., Drackley, J. K., Lynch, J. M. and Barbano, D. M. 1994. Effects of amount of protein and ruminally protected amino acids in the diet of dairy cows fed supplemental fat. *J. Dairy Sci.* 77: 1618-1629; and Christensen, R. A., Drackley, J. K., LaCount, D. W. and Clark, J. H. . 1994. Infusion of four long-chain fatty acid mixtures into the abomasum of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77: 1052-1069.
- Cheeke, P. R. 1971. Nutritional and physiological implications of saponins. A review. *Can. J. Anim. Sci.* 51: 621-632.
- Clark, R. T. J. and Reid, C. S. W. 1974. Foamy bloat of cattle. A review. *J. Dairy Sci.* 57: 753-785.
- Coblentz, W. K., Fritz, J. O., Fick, W. H., Cochran, R. C. and Shirley, J. E. 1998. In situ dry matter, nitrogen, and fiber degradation of alfalfa, red clover, and eastern gamagrass at four maturities. *J. Dairy Sci.* 81: 150-161.
- Colvin, H. W. and Backus, R. C. 1988. Bloat in sheep (*Ovis aries*). Mini Review. *Comp. Biochem. Physiol.* 91A: 635-644.
- Conrad, H. R. and Klopfenstein, T. J. 1988. Role in livestock feeding - greenchop, silage, hay and dehy. In: Hanson, A. A., Barnes, D. K. and Hill, R. R., Jr. (eds) *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Agronomy Monograph No. 29, ASA/CSSA/SSSA, Madison, Wisconsin, pp. 539-566.
- Coulman, B., Golen, B., Majak, W., McAllister, T., Cheng K. -J., Berg, B., Hall, J., McCartney, D. and Acharya, S. 2000. A review of the development of a bloat-reduced alfalfa cultivar. *Can J. Plant Sci.* 80: 487-491.
- Cunningham, K. D., Cecava, M. J., and Johnson, T. R. 1994. Flows of nitrogen and amino acids in dairy cows fed diets containing supplemental feather meal and blood meal. *J. Dairy Sci.* 77: 3666-3675.
- Curll, M. L. 1982. The grass and clover content of pastures grazed by sheep. *Herbage Abstracts* 52: 403-411.
- Dewhurst, R. J., Fisher, W. J., Tweed, J. K. S., and Wilkins, R. J. 2003. Comparison of grass and legume silages for milk production. 1. Production responses with different levels of concentrate. *J. Dairy Sci.* 86: 2598-2611.
- Duke, J. A. 1981. *Handbook of Legumes of World Economic Importance*. Plenum Press, New York and London.
- Duke, J. A. 1992. *Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants*. Boca Raton, FL. CRC Press.
- Edwards, G. R., Parsons, A. J., Penning, P. D. and Newman, J. A. 1995. Relationship between vegetation state and bite dimensions of sheep grazing contrasting plant species and its implications for in-

- take rate and diet selection. *Grass and Forage Sci.* 50: 378-388.
- Ensminger, M. E., J. E. Oldfield and W. W. Heinemann. 1990. *Feeds & Nutrition*. 2nd Edition. Ensminger Publishing Co., Clovis, CA, USA.
- Fay, J. P., Cheng, K. -J., Hanna, M. R., Howarth, R. E. and Costerton, J. W. 1981. A scanning electron microscopy study of the invasion of leaflets of a bloat-safe and a bloat-causing legume by rumen microorganisms. *Can. J. Microbiol.* 27: 390-399.
- Foo, L. Y., Jones, W. T., Porter, L. J. and Williams, V. M. 1982. Proanthocyanidin polymers of fodder legumes. *Phytochem.* 21: 933-935.
- Foulds, W. 1978. Response to soil moisture supply in three leguminous species. *New Phytologist* 80: 535-545.
- Frame, J., Charlton, J. F. L. and Laidlaw, A. S. 1998. *Temperate Forage Legumes*. CAB International, Wallingford, U. K.
- Frankow-Lindberg, B. E. and Danielsson, D. A. 1997. Energy output and animal production from grazed grass/clover pastures in Sweden. *Biol. Agric. Hort.* 14: 279-290.
- Fraser, J., Sutherland, K. and Martin, R. C. 1993. Effects of autumn harvest date on the performance of white clover/grass mixtures in Nova Scotia. *J. Agric. Sci.* 121: 315-321.
- Gladstones, J. S. and Barrett-Lennard, R. A. 1964. Serradella- a promising pasture legume in Western Australia. *J. Australian Inst. Agric. Sci.* 30: 258-262.
- Gladstones, J. S. and McKeown, N. R. 1977. Serradella - a Pasture Legume for Sandy Soils. Bulletin 4030, Western Australia Department of Agriculture, Perth.
- Goplen, B. P. 1981. Norgold - A low coumarin yellow blossom sweet clover. *Can. J. Plant Sci.* 61: 1029-1021.
- Goplen, B. P. 1971. Polara, a low coumarin cultivar of sweet clover. *Can. J. Plant Sci* 51: 241-251.
- Goplen, B. P., Howarth, R. E., Sarkar, S. K. and Lesin, K. 1980. A search for condensed tannins in annual and perennial species of *Medicago*, *Trigonella*, and *Onobrychis*. *Crop Sci.* 20: 801-804.
- Goplen, B. P., Howarth, R. E. and Lees, G. L. 1993. Selection of alfalfa for a lower initial rate of digestion and corresponding changes in epidermal and mesophyll cell wall thickness. *Can. J. Plant Sci.* 73: 1111-1122.
- Gorz, H. J. and Smith, W. K. 1978. Sweetclover. In: Heath, M. E., Metcalfe, D. S., Barnes, R. F. (Eds) *Forages: The Science of Grassland Agriculture* 3rd edition, pp 159-166.
- Grant, W. F. and Sidhu, B. S. 1967. Basic chromosome number, cyanogenic glycoside variation, and geographic distribution of *Lotus* species. *Can. J. Bot.* 45: 639-647.
- Hagerman, A. E. and Butler, L. G. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 256: 4494-4497.
- Hagerman, A. E. and Robbins. C. T. 1993. Specificity of tannin-binding salivary proteins relative to diet selection by mammals. *Can. J. Zool.* 71: 628-633.
- Hanson, C. H., Loper, G. M., Kohler, G. O., Bickoff, E. M., Taylor, K. W., Kehr, W. R., Stanford, E. H., Dudley, J. W., Pedersen, M. W., Sorensen, E. L., Carnahan, H. L. and Wilkie, C. P. 1965. Variation in Coumestrol Content of Alfalfa as Related to Location, Variety, Cutting Year, Stage of Growth, and Disease. UDSA Tech. Bull. 1333. U. S. Government Printing Office, Washington, DC.
- Harney, P. M. and Grant, W. F. 1964. A chromatographic study of the phenolics of species of *Lotus* closely related to *L. corniculatus* and their taxonomic significance. *Am. J. Bot.* 51: 621-627.
- Harney, P. M. and Grant, W. F. 1965. A polygonal presentation of chromatographic investigations on

- the phenolic content of certain species of *Lotus*. *Can. J. Genet. Cytol.* 7: 40-51.
- Hayman, J. M. and McBride, S. D. 1984. The Response of Pasture and Lucerne to Irrigation. Technical Report 17, Winchmore Irrigation Research Station, Ministry of Agriculture and Fisheries, p. 79. (Cited in Douglas, 1986.)
- He, X-G., Lin, L-Z. and Lian, L-Z. 1996. Analysis of flavonoids from red clover by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatography* 755: 127-132.
- Heichel, G. H., Vance, C. P., Barnes, D. K. and Henjum, K. I. 1985. Dinitrogen fixation and N and dry matter distribution during 4 year stands of birdsfoot-trefoil and red clover. *Crop Sci.* 25, 101-105.
- Hoffman, P. C., Sievert, S. J., Shaver, R. D., Welch, D. A., and Combs, D. K. 1993. In situ dry matter, protein, and fiber degradation of perennial forages. *J. Dairy Sci.* 76: 2632-2643.
- Hoffman, P. C., Combs, D. K., Brehm, N. M., and Welch, D. A. 1997. Performance of lactating dairy cows fed red clover or alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 80: 3308-3315.
- Hoffman, P. and Broderick, G. 2001. Red Clover Forages for Lactating Dairy Cows. Focus on Forage, University of Wisconsin.
- Hostettmann, K. and Marston, A. 1995. Saponins. Cambridge University Press, Cambridge.
- Howarth, R. E. 1988. Antiquality factors and non-nutritive chemical components. In: *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Agronomy monograph 29: 493-514.
- Howarth, R. E., Goplen, B. P., Fay, J. P. and Cheng, K. -J. 1979. Digestion of bloat-causing and bloat-safe legumes. *Ann. Rech. Vet.* 10: 332-334.
- Howarth, R. E., Chaplin, R. K., Cheng, K. -J., Goplen, B. P., Hall, J. W., Hironaka, R., Majak, W., Radostits, O. M. 1991. Bloat in Cattle. Agriculture Canada Publication 1858/E. Communications Branch. Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa.
- Iglesias, I. and Lloveras, J. 1998. Annual cool-season legumes for forage production in mild winter areas. *Grass and Forage Sci.* 53 (4): 318-325.
- Iglesias, I. and Lloveras, J. 2000. Forage production and quality of serradella in mild winter areas in north-west Spain. *New Zealand J. Agric. Res.* 43: 35-40.
- Jagusch, K. T. 1982. Nutrition of ruminants grazing lucerne. In: Wynn-Williams, R. B. (ed.) *Lucerne for the 1980s*. Special Publication No. 1, Agronomy Society of New Zealand, pp. 73-78.
- Jones, G. A., McAllister, T. A., Muir, A. D. and Cheng, K. -J. 1994. Effects of sainfoin (*Onyobrychis vicifolia Scop.*) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacterial. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1374-1378.
- Kalac, P., Price, K. R. and Fenwick, G. R. 1996. Changes in saponin content and composition during ensilage of alfalfa (*Medicago sativa* L). *Food Chemistry* 56: 377-380.
- Karnezos, T. P., Matches, A. G. and Brown, C. P. 1994. Spring lamb production on alfalfa, sainfoin and wheatgrass pastures. *Agronomy Journal* 86: 497-502.
- Khalil, A. H. and El Adawy, T. A. 1994. Isolation, identification and toxicity of saponin from different legumes. *Food Chem.* 50: 197-201
- Klita, P. T., Mathison, G. W., Fenton, T. W. and Hardin, R. T. 1996. Effects of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. *J. Anim. Sci.* 74: 1144-1156.
- Klejdus, B., Vitamvasova-Sterbova, D. and Kuban, V. 2001. Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatographic-mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction. *Analytical Chimica Acta* 450: 81-97.
- Knight, A. P. and Walter, R. G. 2003. Plants affecting the skin and liver. In: *A Guide to Plant Poisoning of Animals in North America*, A. P. Knight and R. G. Walter (eds). Publisher: Teton NewMe-

- dia, Jackson WY. Internet Publisher; International Veterinary Information Service, New York, USA. (www. ivis. org)
- Koupai-Abyazani, M. R. , Muir, A. D. , Bohm, B. A. , Towers, G. H. N. and Gruber, M. Y. 1993. The proanthocyanidin polymers in some species of *Onobrychis*. *Phytochemistry* 34: 113-117
- Kunelius, H. T. and Narasimhalu, P. R. 1993. Effect of autumn harvest date on herbage yield and composition of grasses and white clover. *Field Crops Res.* 31: 341-349.
- Lampkin, N. 1990. *Organic Farming*. Farming Press Books, Ipswich.
- Latimori, N. J. Kloster, A. M. Amigone, M. A. Cuerpo, L. and Pizzi, A. 1992. Treatment of pastures with paraquat in the control of bloat; effect on weight gain and residues in animal tissues. *Revista Argentina de Produccion Animal* 12: 217-222.
- Latunde-Dada, A. O. and Lucas, J. A. 1985. Involvement of the phytoalexin medicarpin in the differential response of callus lines of Lucerne (*Medicago sativa*) to infection by *Verticillium albo-atrum*. *Physiol. Plant Path.* 26: 31-42.
- Lees, G. L. 1984. Cuticle and cell wall thickness; Relations to mechanical strength of whole leaves and isolated cells from some forage legumes. *Crop Sci.* 24: 1077-1081.
- Lees, G. L. 1992. Condensed tannins in some forage legumes; Their role in prevention of ruminant pasture bloat. In: Hemingway, R. W. and Laks, P. E. (eds.). *Polant Polyphenols* 1. pp. 915-935.
- Lees, G. L. , Howarth, R. E. and Goplen, B. P. 1982. Morphological characteristics of leaves from some legume forages; relation to digestion and mechanical strength. *Can. J. Bot.* 60: 2126-2132.
- Lees, G. L. , Hinks, C. F. and Suttill, N. H. 1994. Effect of high temperature on condensed tannin accumulation in leaf tissues of big trefoil (*Lotus uliginosis* Schkuhr). *J. Sci. Food. Agric.* 65: 415-421.
- Livingston, A. L. 1978. Forage plant estrogens. *J. Toxicol. Environ. Health* 4: 301-324.
- Lu, C. D. and Jorgensen, N. A. 1987. Alfalfa saponins affect site and extent of nutrient digestion in ruminants. *J. Nutr.* 117: 919-927.
- Lloveras, J. 1987. Traditional cropping systems in northwestern Spain (Galicia). *Agricultural Systems* 23: 259-275.
- Lundh, T. 1995. Metabolism of estrogenic isoflavones in domestic animals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208: 33-39.
- Maag, H. P. and Nosberger, J. 1980. Photosynthetic rate, chlorophyll content and dry matter production of *Trifolium pratense* L. as influenced by nitrogen nutrition. *Angewandte Botanik* 54: 187-194.
- MacAdam, J. W. and Whitesides, R. E. 1996. Growth at low temperatures increases alfalfa leaf cell constituents related to pasture bloat. *Crop Sci.* 36: 378-382.
- Majak, W. , Howarth, R. E. , Fesser, A. C. , Goplen, B. P. and Pedersen, M. W. 1980. Relationships between ruminant bloat and the composition of alfalfa herbage. II. Saponins. *Can. J. Anim. Sci.* 60: 699-708.
- Makkar, h. P. S. , Blummel, M. and Becker, K. 1995. In vitro effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *J. Sci. Food. Agric.* 69: 481-493.
- Makkar, H. P. S. and Becker, K. 2000. Beneficial effects of saponins on animal production. In: Oleszek, W. and Marston, A. (eds.) *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants*. Kluwer Academic Publishers, Boston, MS. Pp. 281-286.
- Marles, M. A. S. , Ray, H. and Gruber, M. Y. 2003. Review. New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry* 64: 367-383.
- Marais, J. P. J. , Mueller-Harvey, I. , Brandt, E. V. and Ferreira, D. 2000. Polyphenols, condensed tannins, and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (Sainfoin). *J. Agric. Food Chem.* 48:

- 3440-3447.
- Marston, A. , Wolfender, L. -L. and Hostettmann, K. 2000. Analysis and isolation of saponins from plant material. In: Oleszek, W. and Marston, A. (eds.). Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants. Kluwer Academic Publishers, Boston, MS. Pp. 1-12.
- Marten, G. C. and Jordan, R. M. 1979. Substitution value of birdsfoot trefoil for alfalfa-grass in pasture systems. *Agronomy Journal* 71: 55-59.
- Martiniello, P. and Ciola, A. 1994. The effect of agronomic factors on seed and forage production in perennial legumes sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) and French honeysuckle (*Hedysarum coronarium* L.) *Grass and Forage Sci.* 49: 121-129.
- Massiot, G. , Lavaud, C. , Guillaume, D. and Le Men-Olivier, L. 1988. Reinvestigation of the saponins and prosapogenins from alfalfa (*Medicago sativa*). *J. Agric. Food Chem.* 36: 902-909.
- Massiot, G. , Lavaud, C. , Besson, V. , Le Men-Olivier, L. and Van Binst, G. 1991. Saponins from the aerial part of alfalfa (*Medicago sativa*). *J. Agric. Food Chem.* 39: 78-82.
- McAdam, J. H. 1983. Characteristics of Grassland on Hill Farms in N. Ireland - Physical Features, Botanical Composition and Productivity. Report, Queens University of Belfast/ Department of Agriculture for Northern Ireland, Belfast.
- McKersie, B. D. , Tomes, D. T. and Yamamoto, S. 1981. Effect of seed size on germination, seedling vigour, electrolyte leakage, and establishment of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). *Can. J. Plant Sci.* 61: 337-343.
- McMahon, L. R. , McAllister, T. A. , Berg, B. P. , Majak, W. , Acharya, S. N. , Popp, J. D. , Coulman, B. E. , Wang, Y. and Cheng K. -J. 2000. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Can. J. Plant Sci.* 80: 469-485.
- McMahon, L. R. , Majak, W. , McAllister, T. A. , Hall, J. W. , Jones, G. A. , Popp, J. D. and Cheng K. -J. 1999. Effects of sainfoin on in vitro digestion of fresh alfalfa and bloat in steers. *Can. J. Anim. Sci.* 79: 203-212.
- McSweeney, C. S. , Palmer, B. , McNeill, D. M. and Krause, D. O. 2001. Microbial interactions with tannins; nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Sci. Tech.* 91: 83-93.
- Mendel, V. E. and Boda, J. M. 1961. Physiological studies of the rumen with emphasis on the animal factors associated with bloat. *J. Dairy Sci.* 44: 1881-1898.
- Michaud, R. , Lehman, W. F. , and Rumbaugh, M. D. 1988. World Distribution and historical development. In: A. Hanson, D. K. Barnes, and R. R. Hill (eds) *Alfalfa and Alfalfa Improvement*, American Society of Agronomy, Madison, WI. , pp 259-25-91.
- Miller, D. A. and Hoveland, C. S. 1995. Other temperate legumes. In: Barnes, R. F. , Miller, D. A. and Nelson, C. J. (eds) *Forages*, 5th edn. Vol. 1, *An Introduction to Grassland Agriculture*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 273-281.
- Molan, A. L. , Attwood, G. T. , Min, B. R. and McNabb, W. C. 2001. The effect of condensed tannins from *Lotus pedunculatus* and *Lotus corniculatus* on the growth of proteolytic rumen bacteria in vitro and their possible mode of action. *Can. J. Microbiol.* 47: 626-633.
- Monsanto. 2003. Safety, Compositional and Nutritional Assessment of Roundup Ready Alfalfa Events J101 and J103. U. S. FDA/CFSAN. BNF84.
- Moseley, G. and Jones, J. R. 1984. The physical digestion of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens*) in the foregut of sheep. *Br. J. Nutr.* 52, 381-390.
- Moule, G. R. , Braden, A. W. H. and Lamond, D. R. 1963. The significance of oestrogens in pasture plants in relation to animal production. *Anim. Breed. Abstr.* 31: 139-157.

- Muir, A. D. 1997. Antioxidative activity of condensed tannins. In: Shahidi (ed.). Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications. AOCS Press, Champaign, Illinois. Pp. 204-212.
- Muir, A. D., Gruber, M. Y., Hinks, C. F., Lees, G. L., Ohylagha, J., Hallett, R., Xia, F., Soroka, J. and Erlandson, M. 1999. The effects of condensed tannins in the diets of major crop insects. In: Gross, G. G., Hemingway, R. W. and Yoshida, T. (eds.). Plant Polyphenols 2. Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology. Plenum Press, New York. Pp. 867-881.
- Mulholland, J. G., Nandra, K. S., Scott, G. B., Jones, A. W. and Coombes, N. E. (1996) Nutritive value of subterranean clover in a temperate environment. Aust. J. Exp. Agric. 36, 803-814.
- NRC (National Research Council) 1971. Atlas of Nutritional Data on United States and Canadian Feeds. National Academy of Science, Washington, D. C., USA.
- NRC (National Research Council). 1982. United States - Canadian Tables of Feed Composition (Third Revision) National Academy Press, Washington D. C., USA.
- NRC (National Research Council) 1996. Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th edition. National Academy Press Research Council, Washington, D. C. USA.
- NRC (National Research Council) 2000. Nutrient Requirements of Beef Cattle. Update 2000. National Academy Press, Washington, D. C., USA.
- NRC (National Research Council). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th edition. National Academy Press, Washington, D. C., USA.
- Najda, H. 2002. Standard Alfalfa, AC Grazeland Br. <http://www1.agric.gov.ab.ca/general/crop-var-t.nsf/Varieties/AC+Grazeland+Br>. Last revision, Dec. 12, 2002.
- Neizen, K. E., Waghorn, T. S., Charleston, W. A. G. and Waghorn, G. C. 1995. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. J. Agric. Sci. 125: 281-285.
- Neizen, J. H., Robertson, H. A., Waghorn, G. C. and Charleston, W. A. G. 1998. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. Vet. Parasitol. 80: 15-27.
- Newbould, P., Holding, A. J., Davies, G. J., Rangeley, A., Copeman, G. J. F., Davies, A., Frame, J., Haystead, A., Herriot, J. B. D., Holmes J. C., Lowe, J. F., Parker, J. W. G., Waterson, H. A., Wildig, J., Wray, J. P. and Younie D. 1982. The effect of *Rhizobium* inoculation on white clover in improved hill soils in the United Kingdom. J. Agric. Sci. 99: 591-610.
- Oleszek, W., Jurzystra, M., Ploszynski, M., Colquhoun, I. J., Price, K. R. and Fenwick, G. R. 1992. Zanhic acid tridesmoside and other dominant saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L) aerial parts. J. Agric. Food Chem. 40: 191-196.
- Oleszek, W. 1996. Alfalfa saponins: Structure, biological activity, and chemotaxonomy. In: Waller and Yamasaki (eds.). Saponins Used in Food and Agriculture. Plenum Press, New York, pp. 155-170.
- Oleszek, W. 2004. Personal communication to W. D. Price, U. S. Food and Drug Administration, Rockville, MD
- Orr, R. J., Rutter, S. M., Penning, P. D., Yarrow, N. H. and Champion, R. A. 1996. Grazing behaviour and herbage intake rate by Friesian dairy heifers grazing ryegrass or white clover. In: Younie, D. (ed.) *Legumes in Sustainable Farming Systems*. Occasional Symposium No. 30, British Grassland Society, Reading, pp. 221-224.
- Parente, G. and Frame, J. 1993. Alternative uses of white clover. FAO/REUR Technical Series 29: 30-36.
- Pérez, N., Peña, S., Vega, S., Noa, M. and Enríquez, R. 1997. Medicagenic acid content in foliage of

- ten varieties of alfalfa (*Medicago sativa* L) cultivated in Mexico. J. Sci Food Agric. 75: 401-404.
- Pedersen, M. W., Anderson, J. O., Street, J. C., Wang, L. C. and Baker, R. 1972. Growth response of chicks and rats fed alfalfa with saponin content modified by selection. Poult. Sci. 51: 458-464.
- Peterson, P. R., Sheaffer, C. C. and Hall, M. H. 1992. Drought effects on perennial forage legume yields and quality. Agronomy Journal, 84 774-779.
- Phuntsok, T., Froetschel, M. A., Amos, H. E., Zheng, M. and Huang, Y. W. 1998. Biogenic amines in silage, apparent postruminal passage, and the relationship between biogenic amines and digestive function and intake by steers. J. Dairy Sci. 81: 2193-2203.
- Popp, J. D., McCaughey, W. P., Cohen, R. D. H., McAllister, T. A. and Majak, W. 2000. Enhancing pasture productivity with alfalfa: A review. Can. J. Plant Sci. 80: 513-519.
- Preston, R. L. 2003. Beef, March 2003, pages 40-48.
- Rattray, P. V. and Joyce, J. P. 1974. Nutritive value of white clover and perennial ryegrass for young sheep. IV. Utilisation of dietary energy. New Zealand J. Agric. Res. 17: 401-406.
- Ray, H., Yu, M., Auser, P., Blahut-Beatty, L., McKersie, B., Bowley, S., Westcott, N., Coulman, B., Lloyd, A. and Gruber, M. Y. 2003. Expression of anthocyanins and proanthocyanidins after transformation of alfalfa with maize Lc. Plant Physiol. 132: 1448-1463.
- Rogers, H. H. 1976. Forage legumes. In: Plant Breeding Institute Annual Report, 1975. Plant Breeding Institute, Cambridge, pp. 22-57.
- Rosenthal, G. A. and Nkomo, P. 2000. The natural abundance of L-canavanine, an active anticancer agent, in alfalfa, *Medicago sativa* (L.). Pharmaceutical Biology 38: 1-6.
- Rossi, D. M., Navarro, F. and Grivel, C. D. 1997. Effect of monensin on weight gain and prevention of bloat in steers feeding on lucerne pasture. Archivos de Medicina Veterinaria 29, 279-282.
- Rumbaugh, M. D. 1990. Special purpose forage legumes. In: J. Janick and J. E. Simon (eds.), Advances in New Crops. Timber Press, Portland, Oregon.
- Sarkar, S. K., Howarth, R. E. and Goplen, B. P. 1976. Condensed tannins in herbaceous legumes. Crop Sci. 16: 543-546.
- Schachtman, D. P. and Kelman, W. M. 1991. Potential of *Lotus* germplasm for the development of salt, aluminum and manganese tolerant pasture plants. Aust. J. Agric. Res. 42: 139-149.
- Sheaffer, C. C., Lacefield, G. D. and Marble, V. I. 1988. Cutting schedules and stands. In: Hanson, A. A., Barnes, D. K. and Hill, R. R., Jr (eds) Alfalfa and Alfalfa Improvement. Agronomy Monograph No. 29, ASA/CSSA/SSSA, Madison, WI, USA pp. 411-437.
- Skadhauge, B., Gruber, M. Y., Thomsen, K. K. and von Wettstein, D. 1997. Leucoacyanidin reductase and accumulation of proanthocyanidins in developing legume tissues. Am. J. Bot. 84: 494-503.
- Slabbert, N. 1992. Complexation of condensed tannins with metal ions. In: Hemingway, R. W. and Laks, P. E. (eds.), Plant Polyphenols. Synthesis, Properties and Significance. Plenum Press, New York. Pp. 421-436.
- Smith, R. R., Taylor, N. L. and Bowley, S. R. 1985. Red clover. In: Taylor, N. L. (ed.) Clover Science and Technology. ASA/CSSA/SSSA, Madison, WI, USA, pp. 457-470.
- Smolenski, S. J., Kinghorn, A. D. and Balandrin, M. F. 1981. Toxic constituents of legume forage plants. Econ. Bot. 35: 321-355.
- Spedding, C. R. W. and Diekmahns, E. C. 1972. Grasses and Legumes In British Agriculture. Bulletin No. 49, Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, Farnham Royal, 511 pp.
- Stewart, T. A. 1984. Utilising white clover in grass based animal production systems. In: Thomson, D.

- J. (ed.) Forage Legumes. Occasional Symposium No. 16, British Grasslands Society, Hurley, pp. 93-103.
- Stifel, F. B., Vetter, R. L., Allen, R. S. and Horner, H. T. Jr. 1968. Chemical and ultrastructural relationships between alfalfa leaf chloroplasts and bloat. *Phytochem.* 7: 335-364.
- Stob, M. 1983. Naturally occurring food toxicants extorgens. Pages 81-100. In: Rechcigl, M., Jr. (ed.). *CRC Handbook of Naturally Occurring Pfood Toxicants*. CRC Press, Boca Raton.
- Stochmal, A., Simonet, A. M., Macias, F. A., Oliveira, M. A., Abreu, J. M., Nash, R. and Oleszek, W. 2001. Acylated apigenin glycosides from alfalfa (*Medicago sativa* L.) var. Artal. *Phytochemistry* 57: 1223-1226.
- Stoutjeskijk, P. A., Sale, P. W. and Larkin, P. J. 2001. Possible involvement of condensed tannins in aluminium tolerance of *Lotus pedunculatus*. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 1063-1074.
- Tanner, G. J., Moore, A. E. and Larkin, P. J. 1994. Proanthocyanidins inhibit hydrolysis of leaf proteins by rumen microflora *in vitro*. *Brit. J. Nutr.* 71: 947-958.
- Tanner, G. J., Moate, P., Dailey, L., Laby, R. and Larkin, P. J. 1995. Proanthocyanidins (condensed tannins) destabilise plant protein foams in a dose dependent manner. *Aust. J. Agric. Res.* 46: 1101-1109.
- Taylor, A. O. and Hughes, K. A. 1978. Conservation-based forage crop systems for major or complete replacement of pasture. *Proceedings of the Agronomy Society of New Zealand* 8, 161-166.
- Taylor, N. L. and Quesenberry, K. H. 1996. *Red Clover Science*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Taylor, N. L. and Smith, R. R. 1995. Red clover. In: Barnes, R. F., Miller, D. A. and Nelson, C. J. (eds) *Forages*. Vol. 1, *An Introduction to Grassland Agriculture*, 5th edn. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 217-226.
- Taylor, N. L., Quesenberry, K. H. and Anderson, M. K. 1980. Genetic system relationships in the genus *Trifolium*. *Economic Botany* 36, 431-441.
- Ten Holte, L. and Van Keulen, H. 1989. Effects of white clover and red clover as a green crop on growth, yield and nitrogen of sugar beet and potatoes. *Developments in Plant and Soil Sciences* 37: 16-24.
- Thomas, H. 1984. Effects of drought on growth and competitive ability of perennial ryegrass and white clover. *J. Appl. Ecol.* 21: 591-602.
- Thomson, D. J. 1984. The nutritive value of white clover. In: Thomson, D. J. (ed.) *Forage Legumes*. Occasional Symposium No. 16, British Grassland Society, Hurley, pp. 78-92
- Townsend, C. E. 1995. Registration of C-33, C-34 and C-35 genetic root stocks of diploid alsike clover. *Crop Sci* 35: 1519.
- Ulyatt, M. J., Dellow, D. W., John, A., Reid, C. S. W. and Waghorn, G. C. 1986. Contribution of chewing during eating and rumination to the clearance of digesta from the reticulorumen. In: Milligan, L. P., Grovum, W. L. and Dobson, A. (eds) *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*. Proceedings of the VIth International Symposium on Ruminant Physiology, Banff, Canada. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, pp. 498-515.
- Ulyatt, M. J., Lancashire, J. A. and Jones, W. T. 1977. The nutritive value of legumes. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 38: 107-118.
- Undersander, D. J., Bertran, M. G., Crooks, A. E., Rankin, M. C., Silveira, K. G. and Wood, T. M. 2002. Forage variety update for Wisconsin, UWEX A 1525 (revised).
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 16, 2003
- USDA Plants Database, 2003. <http://plants.usda.gov/>

- Van Keuren, R. W. and Davis, R. R. 1968. Persistence of birdsfoot trefoil, *Lotus corniculatus* L., as influenced by plant growth habit and grazing management. *Agronomy Journal* 60: 92-95.
- Van Keuren, R. W., Davis, R. R., Bell, D. S. and Klosterman, E. W. 1969. Effect of grazing management on the animal production from birdsfoot trefoil pastures. *Agronomy Journal* 61: 422-425.
- Vetter, J. 2000. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* 38: 11-36.
- Vickery, P. J., Wheeler, J. L. and Mulcahy C. 1986. Factors affecting the hydrogen cyanide potential of white clover (*Trifolium repens* L.). *Aust J. Agric. Res.* 38, 1053-1059.
- Waghorn, G. C. 1990. Beneficial effects of low concentrations of condensed tannins in forages fed to ruminants. In: Akin, D. E., G, L. L., Wilson, J. R. and Harris, P. J. (eds.). *Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants*. Elsevier, New York. Pp. 137-147.
- Waghorn, G. C. and Shelton, I. D. 1992. The nutritive value of Lotus for sheep. *Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod.* 52: 89-92.
- Wang, Y., Frutos, P., Gruber, M. Y., Ray, H. and McAllister, T. A. 2003. Comparison of *in vitro* digestibility of parental and anthocyanin-containing *Lc*-transgenic alfalfa. *Can. J. Anim. Sci.* 83: 639 (Abstract).
- Weller, R. F. Cooper, A. and Wilkinson W. 1996. Animal Health. In: *Conversion to Organic Milk Production* (ed. Hagggar and Padel), Technical Review No. 4, Institute of Grassland and Environmental Research, Aberystwyth, UK.
- Wheeler, J. L. 1989. Variation in HCN potential among cultivars of white clover (*Trifolium repens* L.). *Grass and Forage Science* 44: 107-109.
- Zandstra, I. I. and Grant, W. F. 1968. The biosystematics of the genus Lotus (Leguminosae) in Canada. 1. Cytotaxonomy. *Can. J. Botany* 46: 557-583.

目 录

理事会建议

递交信

引言

第一章 重组 DNA 技术的应用

- (一) 大规模工业应用
- (二) 农业与环境应用
 - 1. 用于农业的重组 DNA 技术
 - 2. 用于控制环境污染的重组 DNA 技术
 - 3. 微生物用于金属提取和回收
 - 4. 提高原油的采收率

第二章 安全性考虑

- (一) 风险评估方法
- (二) 重组 DNA 生物风险评估的考虑
 - 1. 供体生物与受体生物的特性
 - 2. 获得重组 DNA 生物的基因操作技术
 - 3. 重组 DNA 生物的特性
- (三) 大规模工业应用中的安全性考虑
推测的危害和安全性证据
- (四) 农业与环境应用中的安全性考虑
 - 1. 总体考虑
 - 2. 针对微生物的考虑
 - 3. 针对植物的考虑
 - 4. 针对动物的考虑
 - 5. 结论

第三章 大规模工业应用

- (一) 隔离原则
 - 1. 生物学隔离
 - 2. 物理隔离
- (二) 隔离的实施
- (三) 良好大规模工业应用规范 (GILSP)
- (四) 特定物理隔离等级下在工业流程中应用生物的评价
- (五) 物理隔离与潜在风险评估相适应

第四章 环境与农业应用

- (一) 应用于环境与农业的重组 DNA 微生物在安全评估时的考虑
 - 1. 在环境中的应用

2. 在环境中生存、繁殖和/或传播
3. 与其他生物或生物系统的相互作用
4. 对环境的影响

(二) 相关植物和动物

(三) 信息和检测方法的获取

(四) 工业用重组 DNA 生物释放的环境风险评价

第五章 总结与建议

(一) 要点总结

(二) 建议

1. 总体建议
2. 工业用重组 DAN 生物的建议
3. 环境与农业用重组 DNA 生物的建议

附录

附录 A 定义

附录 B 总体科学考虑

附录 C 人体健康的考虑

附录 D 环境与农业的考虑

附录 E 常规与重组生物对人和动植物的潜在风险

附录 F GILSP 中重组 DNA 微生物的建议准则

附录 G GILSP 之外其他大规模工业应用隔离措施的实例

附录 H 生物技术安全与法规政府特别专家组

附录 I 生物技术安全与法规政府特别专家组成员名单

术语表

理事会建议

重组 DNA 生物在工业、农业与环境中的应用的安全性考虑

理事会，

考虑到，1960 年 12 月 14 日的经济合作与发展组织公约第 1 (c)、3 (a) 和 5 (b) 条；

考虑到，“重组 DNA 安全性考虑——通过重组 DNA 技术获得的生物在工业、农业与环境应用中的安全性考虑”的报告；

考虑到，重组 DNA 技术作为一项新技术具有广阔的应用前景，该技术预期可给人类带来巨大的利益；

特别是认识到，该技术对促进人类健康的贡献，以及在不久的将来该贡献将在一定程度上快速增加；

考虑到，重组 DNA 技术安全性的共识将为生物技术领域在迈向国际共识、保护人体健康与环境、促进国际贸易和减少贸易壁垒中迈出坚实的一步；

考虑到，绝大部分大规模工业用重组 DNA 生物自身风险较低，只需要遵循 GILSP 最低隔离条件；

考虑到，物理隔离技术已为工业中广为认知，并且已在病原体防护中成功应用多年；

认识到，当需要使用高风险的重组 DNA 生物时，可以确定风险评估的附加准则，这些生物也可在适当的物理隔离和/或生物学隔离条件下进行安全的操作；

考虑到，与应用于工业的重组 DNA 生物潜在风险的评估相比，环境或农业中应用的重组 DNA 生物潜在风险的评估发展不足；

认识到，在环境与农业中应用的重组 DNA 生物对环境潜在风险的评估应该参考并依据现存的资料信息，该信息一般从改良生物在农业与环境的广泛使用中获得，随着研发进程逐步进行评估，将最小化并应当将潜在风险降至最低；

考虑到目前科学认识水平；

认识到目前研制应用于农业与环境的重组 DNA 生物的一般国际准则尚不成熟；

认识到，通过立法管理重组 DNA 生物尚没有科学基础。

科学与技术政策委员会提议：

1. 建议各成员国：

① 尽可能自由地共享国家法规的原则或指南、风险分析的进展和风险管理的实践经验，以促进重组 DNA 技术管理方法的统一。

② 检查现存的监督和审查机制，确保对重组 DNA 技术实施的进行充分审查与控制，在应用的同时避免其承受不应承受的负担，从而阻碍该领域技术的发展。

③ 认识到，在达成国际共识的过程中，指南实施的任何方法都不应该阻碍重组 DNA 技术未来的发展。

④ 在国家与国际水平上审查测试方法、设备设计、微生物分类等的新进展，以促进不同国家间的数据交换，并使贸易壁垒降至最小。应考虑正在开展的工作符合国际组织（如

WHO、CEC、ISO、FAO、MSDNI*) 的标准。

⑤努力提高公众对重组 DNA 技术的认知。

⑥观察重组 DNA 技术在工业、农业与环境应用中的发展，同时认识到，对于应用于特定的工业，以及在农业与环境中的应用的重组 DNA 生物，一些国家希望有一套报告方案。

⑦确保评估与审查程序能够保护重组 DNA 技术应用的知识产权和秘密，认识到在进行创新的同时还要确保获得必要的安全评估信息。

2. 当应用于工业时，建议各成员国：

①确保重组 DNA 技术的大规模工业应用，重组 DNA 生物自身风险较低，在可能的情况下遵循 GILSP 的条件；

②应确保，当使用本报告规定的准则所进行的风险评估结果表明不能仅按照 GILSP 操作重组 DNA 生物时，除了 GILSP 之外，还应使用与风险评估相适应的隔离措施；

③在需要进行物理隔离的大规模工业应用中，鼓励开展创新研究提交重组 DNA 生物无意释放的监测与控制技术。

3. 当应用于农业与环境时，建议各成员国：

①应用现有的活生物体对环境与人类健康的影响的数据来指导风险评估；

②确保在重组 DNA 生物应用于农业与环境之前，按照个案分析和个别^②独立审查的方式，评估重组 DNA 生物的潜在风险；

③按照分阶段的方式进行应用于农业与环境的重组 DNA 生物的研发，适时地从实验室到生长箱和温室，到小规模田间试验，再到大规模田间试验；

④鼓励创新研究提高重组 DNA 生物应用结果的预测、评价与监测。

4. 指导科学技术政策委员会：

①审查各成员国执行本报告所述原则的实践；

②审查各成员国推行本建议所采取的行动，并向理事会报告；

③在制定生物技术未来工作的协调框架中，咨询 OECD 其他相关的委员会。

递 交 信

致科学技术政策委员会主席

1983 年 7 月科学技术政策委员会授权成立生物技术安全与法规特别工作组，该工作组于当年 12 月在巨大的挑战中开始运行。

对我而言，能够领导如此众多的著名科学家、实业家、政策制定者以及管理机构的

* 脱氧核糖核酸（见术语表）。

① 世界卫生组织（World Health Organisation，WHO）；欧盟委员会（Commission of the European Communities，CEC）；国际标准组织（International Standards Organisation，ISO）；粮农组织（Food and Agriculture Organisation，FAO）；微生物菌株数据网（Microbial Strains Data Network，MSDN）。

② “逐个”的意思是对照与某一特定建议相关的评估标准对该建议进行单独审查；由于并非所有建议均包括其中，因此并不是指每种情况均需要国家机构或其他权力机构来进行审查。

代表，专门致力于一项新的生物技术（特别是其在重组 DNA 生物的实际应用）的安全可持续发展，是一个十分有意义的经历。就我个人的观点，我想对我们的工作做一些评论。

您会了解到，我们的研究受益于激烈的讨论和争论。并最终我们的报告达成一致意见，即为重组 DNA 应用的风险评价与风险控制构建一个框架。因此，我将我们的报告提交给您，并确信相关议题已得到充分论证，并在专家间达成了一致意见。

我们知道，经济合作与发展组织（OECD）的成员国和很多国际组织都在急切等待着我们的研究结果。我们也知道，重组 DNA 生物正计划着在不久的将来释放到环境中进行田间试验。在这样的背景下完成这份报告，我们的压力很大，尤其是当前许多国家正在推动生物技术安全管理政策的制定。你们委员会的建议再及时不过了。

我想强调一下我们报告中的几个要点：

首先，我们特别重视我们任务的中心议题，即确定重组 DNA 生物在工业、农业与环境中安全应用的科学准则。对任务的其他议题（即审查目前 OECD 成员国的生物技术管理框架和管理方法）仅进行了初步的分析。我们看来，还需要更多资源才能圆满完成原定的成员国现状调查。

第二，在报告中，我们为重组 DNA 在工业、农业与环境中应用的风险评估设计了一个科学框架。附录中列出了详细的科学技术考虑因素，该因素应该会成为生物技术从业人员建立自己风险评估和风险管理程序的有用工具；

第三，我们认识到，对于在环境与农业中应用而言，最终建立国际公认的安全准则还有很大的差距，还需要做进一步研究。因此，我们建议在准则应用之前采用临时办法，并附以个案审查来评价潜在风险；

第四，鉴于迄今为止大部分工业应用的重组 DNA 生物的低风险较低，我们建议采用相应等级的控制措施——基于现有的良好工业操作规范建立“良好大规模工业应用规范（GILSP）”。低风险生物的准则已得到确认。对于高风险的重组 DNA 生物，我们提供了可供选择的附加的控制与隔离措施。

工作组深信，接受这一国际认可的框架是十分重要的一步。我们希望它能促进生物技术应用的发展，在造福人类的同时，确保对潜在风险应有的关注。

最后，我想对工作组的所有成员表示感谢，感谢他们研制了这份科学、准确、全面的报告，同时我还要感谢 OECD 秘书处的支持。能与这样一支优秀的团队共事我十分高兴。

如果您认为必要的话，我们愿意随时协助您开展后续工作。

你真挚的，

Roger Nourish

生物技术安全与法规特别工作组主席

引 言

在过去的 15 年中重组 DNA 技术已经发展到商业化阶段，因此本报告的议题就是重

组 DNA 生物^①在工业、农业与环境中的应用。随着重组 DNA 生物的商业应用，一些质疑也出现了，即现有方法是否能够处理新技术带来的风险。由此引发的公众争议往往是由于缺乏对近期科学进展的充分认识。

特别工作组聚焦该技术在工业、农业与环境中的应用，试图为这些问题提供一些答案。特别工作组授权^②的主要任务包括：

①在现有的或计划制订的关于微生物操作的法律法规背景下，审查各国对基因工程生物在工业、农业与环境中的应用的安管理现状；

②确定已经采用或可能采用何种准则来监管或批准基因工程生物在如下方面的生产应用：

- 工业
- 农业
- 环境

为未来重组 DNA 生物在如下方面的生产应用探索可能的监管方式与方法：

- 工业
- 农业
- 环境

对重组 DNA 技术安全性问题的共同认识将为达成国际协议、保护健康与环境、促进国际贸易、减少生物技术领域的贸易壁垒等问题迈出第一步打下基础。

生物技术并不是新鲜事物。早在公元前 3 000 年前，闪族人就利用酵母以啤酒的形式生产酒精。多年前发展形成的医药业、发酵业和农产品产业，在某种程度上就是由于在商业化规模中成功应用了生物技术，今天这些行业仍在继续发展。目前，很多国家都在管理生物技术在传统工业与农业中的应用。常规遗传学方法（如自然选择、杂交育种、接合、化学或辐射诱导突变、转化）已经在工业与农业中成功的商业化安全应用了数十年。

在过去的 15 年中，科学家发现通过生物技术可在体外将不同生物的 DNA 进行重组，从而为生物技术增加了新的内容。第一个，也是了解得最清楚的技术是就重组 DNA 技术。在过去的 10 年中，这一技术成为重点研究与开发的课题，并且已经证明在实验室中使用的安全性。第一批商业应用已经获得批准（如人胰岛素、苯丙氨酸、人生长激素）。

重组 DNA 技术代表了常规程序的发展。通过这项技术可以对基因进行精确的改造、构建、重组、缺失和转移，从而赋予受体细胞理想的表型。此外，重组 DNA 技术可以将遗传物质转移进与供体生物毫无关系的受体生物中，并在其中表达。

以下是特别工作组在制定重组 DNA 生物及其应用准则时重点强调的几个概念：

——特别工作组将本文件的重点集中于成熟的重组 DNA 技术在产品开发与加工中的应用。不过，本报告中有关重组 DNA 的考虑因素可能也适用于其他遗传操作改良生物，包括常规的遗传操作技术（杂交、接合、突变、选择等）以及体外技术（如细胞和原生质体融合、胚胎移植和微注射）；

① 本文件中后续都指 rDNA 生物。重组 DNA 的定义见附录 A。

② 授权全文见附录 H。

——特别工作组决定不涉及直接应用于人的遗传操作技术。本报告的重点是安全性，不考虑伦理方面的问题，伦理问题是一个完全不同的议题；

——特别工作组重点研究授权的第二项任务，即为未来重组 DNA 生物的应用确定监管准则以及监管的方式和方法。

关于授权的第一项任务，我们通过问卷的方式进行了各国现状的调查。大多数 OECD 成员国都有一系列现存的关于健康、安全与环境保护的法律，基本上可用于管理重组 DNA 技术在工业、环境与农业中应用时可能带来的风险。现有的法律条款种类繁多，一般涉及生物技术在加工过程和产品中的安全性。此外，对重组 DNA 技术应用的具体规定多见于自愿性的指南或建议。大多数成员国已经开始检查现有的监督机制，以确保进行充分的审查与控制，同时避免其承受不应承受的负担，从而阻碍该领域技术的发展。

本报告形成的科学原则，构成了重组 DNA 技术在工业、农业与环境中的应用的风险管理方法的基础。本报告所讨论的一系列科学因素的考虑可用来制定重组 DNA 安全性的政策。这些政策不是用来管理重组 DNA 应用或重组 DNA 产品的标准，而是为了在这些问题上最终达成国际共识所迈出的第一步。

在 OECD 成员国中，应用生物技术的工业生产一般通过在良好工业操作规范中使用低风险微生物来保持生物安全。对于病原微生物，还使用附加的相适应可控制和隔离措施来确保其安全应用。类似的处理方法也适用于重组 DNA 微生物在工业中的应用。不过，可能也会出现没有适宜的安全标准的情况。在准则建立之前，可按照个案原则^①对重组 DNA 生物进行安全评价。

当重组 DNA 微生物应用于环境中时，可能会引发不同的问题。相较于微生物在工业应用的风险评估而言，微生物在环境或农业应用的风险评估还不完善。有必要进行更多的研究来提高我们预测重组 DNA 微生物对生态系统影响的能力。因此，目前还不太可能形成国际通用的数据要求和评价标准。然而，本报告拟订了一个临时办法，用于确定风险评估所需的信息。工作组认为，该临时办法具有充分的灵活性因而可适用于各个国家。随着认识的提高，我们希望看到国际公认的安全准则的建立。

第一章 重组 DNA 技术的应用

（一）大规模工业应用

本节综述了重组 DNA 技术目前在工业中的应用，及其潜在的应用。我们考虑了重组 DNA 技术在工业中可能应用的类型与范围，但是我们并没有全面回顾目前在工业中的应用以及未来可能的应用。美国国会技术评估办公室^②（U. S. Congress Office of Tech-

^① 见理事会建议的第 2 条注释。

^② *Commercial Biotechnology, An International Analysis*, Office of Technology Assessment, U. S. Congress, U. S. Government Printing Office, Washington, D. C., 1984.

nology Assessment)、世界卫生组织^①、德国化学技术、化学工程与生物技术协会^② (German Society of Chemical Technology, Chemical Engineering and Biotechnology, DECHEMA) 以及 OECD^③ 已经发表了有关综述。

重组 DNA 技术的应用为工业生产提供了新的更大范围的可能性。在人和动物的治疗与营养、工业发酵、环境污染物的降解、矿物质和油的提炼以及农业中都可以利用这些技术。该技术可促进我们对疾病认识与诊断, 为医疗提供更好的治疗与保护方法。同时, 该技术还可改进工业与环境的处理方法, 提高食品与纤维的质量。

通过应用新的生物合成方法, 药物、食品添加剂、精细化学品与特种化学品的制造工艺得到改良, 从而提高产量和纯度。

医药产业已经从重组 DNA 技术中显著获益。例如, 第一个市场化的重组 DNA 药品——人胰岛素, 现在可以买到无限供给的人胰岛素, 适当地替代了从猪和牛组织中生产的非人源胰岛素。

胰岛素的生产表明, 重组 DNA 技术可以生产新的、比现有药物更好的药物。更为有意义的是, 应用该技术可以生产迄今为止稀有且昂贵的治疗药物, 如干扰素、血液因子和疫苗, 这些治疗物通过原有的技术无法生产出所需的量和纯度。例如, 促进垂体性侏儒症病人生长的人生长激素 (hGH), 以前只能在人死后通过收集脑垂体而获得, 因量不足而难以满足需要。应用重组 DNA 技术, 现在已经将编码人生长激素的 DNA 序列插入到细菌中, 不但可以无限供应的生产, 还能降低成本。此外, 几乎完全排除了外源有害物质 [如最近在某些来源于脑垂体的 hGH 制备物中发现了克雅氏病病原 (Creutzfeldt-Jakob agent)] 污染的可能性。

很多用于稀有药物的重组生物已经达到中试规模, 一些则达到了生产规模, 可以产生体积达几千升的细菌培养物。这些加工方法可以生产充足的物质以用于在诸多治疗领域进行临床试验。利用在细菌、酵母与真菌大规模发酵中掌握的经验, 加工规模已从试验室水平扩大至中成水平, 最后直至生产规模。

在有效利用新的重组 DNA 技术生产充足数量有用产品的同时, 绝不能低估现在发酵经验的重要性。此外, 通过重组 DNA 技术产生的生物易于纯化, 因此可生产出高纯度高品质的产品。现有发酵技术与重组 DNA 技术的结合为医疗及其他领域中很多重要物质的生产提供了一个强有力的方法。

重组 DNA 产品的开发将持续下去, 包括多种人类激素、免疫系统调节剂、抗病毒药物与抗癌药物。这类物质将增进我们对很多重要疾病的了解, 并带来很多疾病新的治疗方法。随着以重组 DNA 为基础的新的诊断方法的出现, 可以比目前更准确、更早地诊断出疾病。包括血凝性疾病在内的很多预防和治疗的药物将生产出来。人“纤维蛋白溶解”酶

① *Health Impact of Biotechnology*, Report of a WHO (World Health Organisation) Working Group, Dublin, 9th-12th November, 1982, WHO, Copenhagen, 1984.

② E. W. Houwink, *A Realistic View on Biotechnology*, Dechema, Frankfurt am Main, 1984 (published on behalf of the European Federation of Biotechnology).

③ Alan T. Bull, Geotrey Holt, Malcolm D. Lilly, *Biotechnology - International Trends and Perspectives*, OECD, Paris, 1982.

的研发生产工作将继续扩大，例如尿激酶组织型纤溶酶元激活因子，以及大规模表达凝血因子 IX 和 VIIIc。后一种加工方法不仅能增加凝集因子的供应，还可保证产品的纯度，降低外源有害物质污染的可能性。该技术还可以改良现有疫苗，如流感疫苗和霍乱疫苗，并可生产新的疫苗，如疟疾疫苗、疱疹疫苗和病毒性出血热疫苗。所有这些情况，均不需要大量操作病原菌。

因此，在医疗领域可以为老药物提供新形式、提供新药物、为目前没有好的治疗方法或无治疗方法的疾病提供疫苗。通过更好的诊断程序可以促进上述药物的发展，使公众以及个人获得更好的卫生保健。经济效益可能出现得较慢，但随着技术的推进会不断增加。

在医疗领域及领域外，重组 DNA 技术最可用于提高已有产品的产量、或在药品、化学制品和食品业中生产新的化合物。例如：①改进单细胞蛋白生产的动力学，降低成本；②增加青霉素酰基转移酶的产量，促使青霉素转变成 6-氨基青霉烷酸；③提高核黄素的产量；④产生新的微生物，在有毒物处理中用于氯代芳香族化合物的降解与生物转化；⑤增加垃圾与污水的甲烷产量。

和氨基酸的生物合成方法一样，通过重组 DNA 技术大规模发酵生产的酶正在影响着制造业。利用重组 DNA 技术的研究成果，可以提高现有制造工艺的产量和质量。以前，此类改良往往借助于随机突变方法来实现，尽管这些方法在很多情况下取得了成功，但基本上是任意和随机的，需要通过昂贵的筛选程序才能选出最合适的生物。

基础科学的进步使我们可以提取或合成 DNA 序列，并用于生物和物质的改良。新的重组 DNA 技术将在制造业中得到广泛应用，并带来巨大的效益。根据已经获得的经验，重组 DNA 技术的利用很大程度上取决于常规的工艺方法，如大规模发酵或产物的提取与纯化。把上述技术与产品鉴定和质量控制相结合，不仅可以增加产量、提高纯度，还可以获得更安全的产品。

（二）农业与环境应用

本节综述了重组 DNA 技术目前在农业与环境中的应用及其潜在的应用。很多应用还处于早期发展阶段，不过，这说明它们在未来具有广泛的应用前景。

1. 用于农业的重组 DNA 技术

重组 DNA 技术主要应用于农业。很多大学、政府和公司的研究团队都在研究该技术应用，旨在提高粮食的产量、质量与生产效率。目前在农业领域的研究主要是：培育新的作物品种、开发新的动植物诊断手段、动物改良、疫苗、新的杀虫剂与除草剂等。

大约 10 000 年前人类从狩猎、放牧转变为栽培作物，在这个过程中选择、分离与杂交等经由的遗传技术一直在农业中占主导地位。目前这些方法仍然是农业的支柱，并且农场管理、规模经济、体外培养以及农药、化肥和大规模灌溉技术的应用巩固了它们在农业中的地位。

29 种基础作物（8 种谷类作物、3 种块根作物、2 种糖料作物、7 种豆科作物、7 种油料作物、加上香蕉和椰子），辅以大约 15 种蔬菜品种和 15 种水果品种，所组成的植物产品占人类饮食的 93%。重组 DNA 技术使我们可以对这些作物的生理、生化、改良以及与农业生态系统因子（如有益或寄生的微生物和动物、盐度、酸度、湿度、温度、化肥和农

药)的相互作用等方面开展全新的基础研究。

农业中应用重组 DNA 技术的目标是,例如,降低对环境胁迫的敏感性,测定并控制动物体内、田间以及采收后的传染性病原,降低对化学农药的依赖性并改良化学农药的应用模式,降低对化学肥料与灌溉的依赖性,提高种子、水果、谷物与蔬菜的营养品质。

利用重组 DNA 技术可以对农业中重要的微生物进行操作,从而使植物与动物获得简单的遗传性状。复杂的遗传性状的操作如产量、对栖息地的适应性、光合作用,需要很多基因的表达,目前技术上还不可行。通过导入外源基因而增加遗传多样性,应该可以提高应对环境变化所造成影响的能力。具体应用如下。

(1) 提高种子贮藏蛋白的营养品质

豆科作物与谷物提供了人类饮食所需的 70% 蛋白质。不过,这些来源的蛋白质不能提供均衡的饮食,原因是这些蛋白中缺少某些人类必需的氨基酸。在美国,第一个申请进行田间试验重组 DNA 植物是在玉米 (*Zea mays*) 中构建一个贮藏蛋白基因,该基因编码的蛋白含有玉米中缺乏的人类必需氨基酸。

(2) 增强对低温与霜冻的抗性

据估计,在美国每年霜冻造成的损失达 30 亿美元。通常采用物理方法来保护珍贵的作物,包括风机、烟熏、抽水灌溉。这些方法成本很高,不但对环境不友好,而且效率较低。在 5℃ 以内的霜冻温度下,细菌(如丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae* 或草生欧文氏菌 *Erwinia herbicola*) 表面蛋白可介导在叶片上形成冰,这一过程称之为冰核^①。可应用冰核缺陷型细菌(I⁻细菌),通过与叶片表面野生型细菌的(I⁺细菌)竞争,来控制作物的霜冻。这种 I⁻细菌已经:①从自然种群中分离得到;②通过化学诱变得得到;③通过重组 DNA 技术敲除冰核形成基因得到。重组 DNA 生物至少可与其他突变菌株一样界定清楚,且与特定宿主植物菌株进行竞争的可能性更大。

(3) 增强作物对化学制剂和病害的抗性

控制植物生长的化学制剂(如除草剂)广泛应用于农业中,以去除与作物竞争的杂草。某些重要的农作物(如玉米)对除草剂阿特拉津具有抗性,而其他生长于同一农业生态系统中的作物(如大豆)会被这种除草剂毁坏。玉米和抗性杂草对阿特拉津的抗性受基因的控制。如果可从抗性杂草中分离到该抗性基因,并通过重组 DNA 技术转移到大豆中,如果该基因可在大豆中表达,那么抗性机制也可得以转移。

在栽培作物的近缘物种中可经常发现病虫害抗性基因。通过常规育种技术进行种间杂交,可将抗性基因导入到作物中,但是同时也导入了很多不想要的基因,这些基因需要通过数代回交与选择才能去除。某些情况下,隔离生物可阻止异花受精或受精卵的发育,阻止细胞与原生质体的融合,进而阻止植株再生,目前已经能够跨越这些屏障进行基因转移。生物与细胞育种技术和重组 DNA 技术联合,可比常规植物育种节约许多年的时间,重组 DNA 技术可将特定的抗性基因直接导入细胞或原生质体。

(4) 用微生物菌剂代替化学农药

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 是一种广泛应用的微生物菌剂,用于防治

① I⁺ 指示冰核形成阳性或能形成冰核; I⁻ 指示冰核形成阴性或不能形成冰核。

舞毒蛾等多种鳞翅目害虫。这种杀蚧体是一种蛋白质，编码该蛋白的基因已经克隆出来并进行了鉴定，它对昆虫幼虫具致死效应。应用重组 DNA 技术，已经将编码该蛋白的基因导入到植物根部栖息的细菌中，从而将杀虫蛋白递送到害虫可能会取食的位置。该生物防治菌剂十分有望替代化学农药。

最后，微生物产品还可改变青贮饲料或干草的 pH 及其他特性，从而显著降低采收后由于生物污染造成的损失。同时，重组 DNA 技术可用于提高这些微生物产品的效率。

(5) 通过生物固氮节约肥料

氮不仅是植物必需的营养素，还是作物产量的关键因子，但是氮会从土壤中快速流失。世界各地每年大约需要 6 000 万吨氮肥，到 2000 年将增加至 1.6 亿吨。但具有讽刺意味的是，植物是沐浴在氮中的（空气中 80% 是氮）。与其他经济作物不同的是，大豆、苜蓿及其他豆科植物已经通过进化与根瘤菌（*Rhizobium*）建立了共生关系，它们可以直接从空气中获取氮。通过乙炔还原分析法可检测生物的固氮能力，从而方便地进行生物筛选，并分离出参与该过程的相关酶。

应用重组 DNA 技术，已经鉴定出至少 15 种基因，主要是参与固氮过程或调节其表达的一些酶、离子转移蛋白或其他蛋白。目前已经可以分离出基因簇、并将其插入载体中，然后将这些基因转移到非固氮物种或属中。遗憾的是，确定这些基因在受体细胞中发挥功能却十分困难。从目前来看，在将固氮基因导入其他共生细菌方面将取得显著进展。

一个很有前途的方法是利用固氮菌 *zotobacter*，该菌能在土壤中自由生活且不需要形成根瘤的固氮菌（*Azotobacter*）。其他土壤微生物也可通过基因工程手段使其固氮。

(6) 植物病害的诊断

重组 DNA 技术可用于诊断植物病害。已经应用重组 DNA 技术有效诊断了多种病毒和类病毒诱导的病害。目前已经分离出了病原 RNA 或 DNA 的特异序列，并制备了诊断用的基因探针。除此之外，还有许多基于细菌 [如温室中观赏植物的冠瘿病；柑橘和高粱黄单胞菌（*Xanthomonas*）病]、真菌 [如草坪草镰刀菌（*Fusarium*）] 和病毒的单克隆抗体诊断方法。这些方法对于选择用于栽培与杂交的无病原菌植物，以及筛选感病作物十分有用，在动物与人的医药方面也有类似的方法。

(7) 动物的生产性能

在 OECD 国家，肉、鱼和禽都是饮食中十分重要的部分。这些产业在 OECD 各国是极具竞争力的产业，因而十分重视生产效率。已经克隆的动物生长激素基因，将其构建到表达载体系统，并转入胚胎中，能使动物长得更快、个体更大。通常，将基因转入食用动物中是希望增加其商业价值；如增强抗病性、快速生长、改良品质等。目前已经用机械方法，如胚胎细胞的显微注射，在实验动物中实现了基因转移。未来可以使用动物病毒在食用动物中进行基因转移。该病毒可以有效地转移遗传物质但不会使宿主动物感染疾病。

动物疾病的诊断、治疗和预防也是优先发展方向。全世界兽用生物制品中的疫苗市场价值预计为 5.41 亿美元，其中 1.18 亿美元为狂犬病疫苗，1.18 亿美元为家禽疫苗、1.09 亿美元为牛用疫苗，其余的为猪、羊、马和猫的疫苗。通过重组 DNA 技术生产的疫苗已经用于预防新生猪的腹泻症。其他疫苗也在开发中，包括口蹄疫病毒、鲑鱼和鳟鱼弧菌（*Vibrio*）、家禽球虫和猫白血病毒。使用重组 DNA 技术可减少动物饲料中类固醇、

抗生素以及相关药物的广泛使用。

2. 用于控制环境污染的重组 DNA 技术

重组 DNA 微生物对于减少或克服环境污染问题发挥了很大的作用。必须找到或改良这种微生物以符合极端环境的要求，该微生物需要在植物、食肉动物以及某些极端或剧烈变化的理化环境中生存与增殖。

来自农业、林业、工业以及居民生活的废水给环境造成了巨大的压力。微生物（尤其是土壤、垃圾填埋场和农林废地中的微生物）具有非同寻常的降解能力，尽管其酶的活性通常较低。尽管对于该微生物的应用已经积累了丰富的经验，但对于那些能降解有毒化学物质的微生物以及在极端温度和盐度环境下能发挥功能的微生物，在生理学和遗传学上的研究都相当少。此外，这些微生物基因操作技术的发展也不成熟。另一方面，人们正在深入研究自然界中常见的假单胞菌（*Pseudomonas*），它很有希望成为应用于环境中的微生物。

多年来，生物系统已经成功应用于工业污染和生活污染的控制。从本质上说，这些系统是由混合种群组成的，能够发挥广泛生化功能的恒化系统。该系统必须能够接受并有效矿化相对稀释且随时间变化的废液。重组 DNA 生物最有前景的作用需要涉及制造工艺的改进，使废液更为简单、一致和浓缩。其中最有用的生化反应是脱卤、脱氨、脱硝和裂环作用。即使是对危险化合物的部分脱毒作用也将是整个处理策略中的重要一环。

至于居民生活垃圾，用微生物方法进行浓缩将具有十分重要的价值。

重组 DNA 生物在环境中最具挑战性的应用是降解高毒废物。重组 DNA 生物在这一领域的研究正在大量开展。文献中已有大量关于应用重组 DNA 微生物降解有毒化合物（如氯代苯酚、氰化物和二恶英）的资料。

然而，很多情况下，危险废物对本身微生物是有毒的，尽管通过合适的筛选可以减轻这一问题。最初的研究是在控制良好的环境中提高有毒废物的降解（如某一容器中含有确定的废物）。同时，有关应用重组 DNA 微生物降低沉淀池中废物的浓度或者清理溢出物的研究也在推进。土壤、船体、机油箱都是去除污染的良好靶标。运用重组 DNA 技术，可使生物具有更强的有毒物质降解能力。

3. 微生物用于金属提取和回收

利用微生物从矿石中回收金属已经商业化应用了一个多世纪。有资料表明，20 世纪 50 年代，氧化亚铁硫杆菌（*Thiobacillus ferrooxidans*）和氧化硫硫杆菌（*T. thiooxidans*）已应用于一些金属和硫化铜矿石的氧化。如今，已应用这些微生物从矿石中大量萃取铜和铀。同样，自 20 世纪 60 年代，应用微生物浓缩回收金属的相关工作一直在发展。建议使用的生物包括：藻类（如小球藻 *Chlorella vulgaris*，*Hormidium fluitans*），细菌（如铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*，枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*，大肠杆菌 *Escherichia coli*）和真菌（如酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*，黑曲霉 *Aspergillus niger*）。

很多矿藏开采至今，应用常规技术回收金属已无法满足商业化的需求。应用微生物萃取技术从低等矿石中获得金属相对廉价。而且，微生物技术比常规回收技术的能源密集度低。使用重组 DNA 技术可开发出更耐酸和盐的生物，提高生物在高温和低温下的生存能力，提高生物萃取金属的能力。

4. 提高原油的采收率

世界各地的地下的油井仍有巨大的储油量，但这些原油不是困于岩层中，就是黏性太强难以抽出。这就促使研究人员开发特异的化学和微生物方法来采收更多的原油。通过经典的突变和选择技术改良获得的乙酸钙不动杆菌（*Acinetobacter calcoaceticus*）能产生一种微生物高聚物——一种高效的烃类乳化剂，该物质可增强油箱中渣油的去除能力。这种生物高聚物有望作为原油采收增强剂进行测试，从而有助于将原油从油井中抽取。重组 DNA 技术可用于改良其他微生物，并提高或赋予其产生生物高聚物的能力，从而最大程度地提高原油采收率。

也可使用重组 DNA 技术开发可直接注入油井的微生物。对于具有商业价值的微生物而言，它必须能在剧烈的热、盐和压力下生存。微生物一旦注入井中，或是产生气体给油井增压，或是产生表面活性剂或乳化剂降低油的黏稠度。应重组 DNA 微生物的应用将对增加世界可采油储量产生重要影响。

第二章 安全性考虑

本章的目的是：为评价微生物、植物和动物在工业与环境应用中的潜在风险，并选择合适的安全措施，本文提出了一系列科学考虑。

微生物与人、动物、植物以及环境息息相关，其影响通常是有利的（见第 I 章）。然而，一些微生物具有致病性，一些微生物可能对环境产生不良影响，因此有必要基于科学的考虑，评价这些微生物的安全应用。

常规生物技术与现代生物技术的潜在应用范围很广泛。从具有特定性状的基因改良微生物在良好控制条件下的工业应用，至其在农业或环境中的释放。现在已有大量的科学方法来评价与这类应用的潜在风险。

（一）风险评估方法

本报告的范围不包括风险评估技术的详尽讨论。本节简短的综述了与重组 DNA 微生物应用相关的风险评估方法。它们原则上也适用于动植物。以下六段摘自近期的一份美国报告^①，并略加修改。

美国技术评估办公室（the US Office of Technology Assessment，OTA）^② 提交的一份报告中介绍了微生物的一个生物技术应用模型。OTA 模型各阶段如下：

- ① 形成——通过有意或无意的的方式产生遗传改良微生物。
- ② 释放——这些微生物的一部分被有意释放或意外逃逸到工作场所中和/或环境中。
- ③ 扩散——这些微生物在环境中增殖、遗传重建、生长、转移、改良和消亡，包括遗

^① *The suitability and Applicability of Risk Assessment Methods for Environmental Applications of Biotechnology*, Covello, V. T. and J. R. Fiksel (eds), National Science Foundation, 1985, no. NSF/PRA 8502286.

^② *Impacts of Applied Genetics: Micro-organisms, Plants and Animals*, US Congress, Office of Technology Assessment, Washington, D. C., 1981.

传物质向其他微生物转移。

④定殖——这些微生物在生态系统的一个小生境中定殖,包括在人或其他生物的定殖。

⑤影响——这些微生物与宿主或环境因素的互作所造成的对人或生态的影响。

前两个阶段,即形成与释放,应与风险-来源的特征相符。从原则上讲,通过对各阶段所产生结果的可能性和重要性进行量化,可以对其进行分析。正如最近由环境保护局(EPA)进行的一个研究^①,通过故障-树、事件-树或模拟分析能够达到对可能性与重要性的评估。

最后一个阶段,即对人与生态的影响,原则上可采用常规流行病学方法或毒理学方法进行分析。已经应用这类方法评价其侵染宿主生物并引发疾病的可能性^②。另一个广泛研究的领域是抗生素抗性细菌在人群中的扩散。因此,目前已经应用现有风险评估方法来分析人暴露生物技术产品后的影响。虽然在农业生态系统中已经采用预测模型进行流行病学研究,但生态效应评价仍是一个发展不成熟的领域,需要进一步研究。

应用现有的风险评估方法,很难对第3和第4阶段进行分析。一个关键的难点是如何评价微生物与生态系统之间的相互作用。例如,某一转基因微生物可将遗传物质转移给其他微生物。微生物一旦定殖下来,就可能通过增殖或基因转移来改变环境,继而产生次级效应。

与扩散和定殖相关的两个重要研究领域是:①微生物在环境中的转移与命运;②生态系统的相互作用。了解微生物的转移与命运(或生存)有助于评价与非目标区域和非靶标生物接触的可能性。近年来,在污水处理过程、病原的扩散、杀虫剂的应用以及供水系统保护的研究中,对各种细菌、藻类、病毒及其他微生物的转移路径与命运途径进行了科学研究。这些研究中得到的许多信息与遗传改良微生物的转移和命运的评价息息相关。

遗传改良微生物与现有生物之间在生态系统的相互作用很难准确的描述或预测。可用一种方法,即定性风险评估,用于比较不同环境条件下生物存活定殖的习性和遗传稳定性。转入外源基因后,微生物的扩散可能遵循以下3种模式之一:暂时存活但最终消亡、建立一个或多个稳定群落、生长至限定的范围。尽管上述原则主要是针对微生物进行的讨论,它们同样适用于动植物。

(二) 重组 DNA 生物风险评估的考虑

如果通过常规突变或选择技术来增强或引发一个生物的某一特征,新生物的安全评价主要依赖于亲本生物的信息,以及新生物与亲本生物的差异。同样,对于工业、农业或环境中应用的重组 DNA 生物而言,安全评价的第一步是生物特性的描述。

典型的重组 DNA 生物是通过将“供体”生物中的一小段 DNA 片段引入“受体”生物中形成的。因此通过重组 DNA 技术由这两个“亲本”获得的新生物,其基因组与受体生物最相似。除了一小部分遗传信息外,改良生物的其余的遗传信息,全都源于受体生物。因此,受体生物的特性描述是重组 DNA 生物评价的首要信息。改良生物与受体生物之间

^① Lincoln et al., *Release and Containment of Organisms from Applied Genetics Activities*, EPA Report, Carnegie-Mellon Univ., December 1983.

^② Summers and Kawanishi, *EPA Symposium*, EPA Report no. 60019-78026, Washington, D. C., 1978.

特性的差异则决定了安全评价的框架。

如果风险评估的结果是必须对改良生物进行物理隔离,这对于工业应用是可行的,但对于农业或环境应用则不可行。这种差别甚至比改良生物是否是通过基因操作获得的更为重要。

1. 供体生物与受体生物的特性

“受体”生物的特性包括:原产地与分类学地位、遗传、致病性、生理与生态特征。“供体”生物的特性与插入 DNA 序列的结构和功能相关。当该 DNA 序列的特征未完全明确时,需要更多供体生物的信息。这些信息通常是在实验室、田间试验和中试阶段获得的,有时需要额外的测试以补充数据(见附录 B)。

当用化学合成的核酸构建生物时,应考虑该序列的结构与功能。

2. 获得重组 DNA 生物的基因操作技术

受体生物以及供体 DNA 的相关特性可给我们提供有关改良生物特性的信息。

对用于获得生物所用的 rDNA 技术的描述给我们提供了与预期特性相关的重要信息。例如,其组成部分将包括供体核酸、控制元件、连接序列、抗生素抗性基因、侧翼区等等之类信息。

3. 重组 DNA 生物的特性

重组 DNA 生物评价的实质是评价导入 DNA 使受体生物特性发生改变的程度。首先考虑的应该是导入遗传物质的表达程度。其次是基因操作引起的受体相关特性的改变程度,包括新的或者非预期的影响。受体生物与改良生物之间的相似性表明所进行的改良生物的特性测试是有效的。

应用重组 DNA 技术可改变某一生物的基因组,如使受体基因组的部分序列缺失。与其他类型的基因操作相比,基因敲除技术的安全性考虑较少,原因是该技术引起的改变通常更小更精确,同时降低生物的竞争性,并且没有新的遗传信息增加到亲本中。基因缺失也像自然情况下生物中发生的突变。不过,应当适当考虑非预期功能表达的可能性,特别是进行其他类型的基因修饰时。

(三) 大规模工业应用中的安全性考虑

工业中应用的常规生物工艺是利用特征清楚的微生物。对于低风险的生物,仅需要采取很少的控制与隔离措施。除少数情况(如疫苗生产)外,一般使用对人和动物无致病性的生物。

推测的危害和安全性证据^①

重组 DNA 技术应用之初自然就关注其潜在的危害,但是在控制条件下进行多年的试验后,这些危害仍然是推测的,没有任何安全事件的发生。通过 3 个有说服力的证据,可消除这些技术在安全方面的不确定性。首先,特定的风险评估试验,用于检测受体生物从 DNA 供体细胞获得非预期危害特性的可能性,研究结果表明不存在这种推测的危害。第

^① *Health Impact of Biotechnology*, Report of a WHO (World Health Organisation) Working Group, Dublin, 9-12 November, 1982, WHO, Copenhagen, 1984; *Swiss Biotech*, no. 5, pp. 25-26 (1984).

二，基于免疫学、致病性和传染性等现有信息进行的更严格的评价，研究结果表明，应该放宽国家管理机构推荐的特定的隔离措施。第三，近年来进行的试验没有发现可观察到的新的危害。

以上证据表明，重组 DNA 微生物的安全等级可通过检测 CNA 重组过程中所用成分的特性进行评价。例如，当克隆的 DNA 极有可能编码毒素时，就要特别注意。

工业应用的重组 DNA 生物潜在危害与其他生物制剂具有相同的性质，即：

- ① 传染性——人、动植物暴露于活生物体或病毒之后感染疾病的可能性；
- ② 无活性的生物体、细胞及其组成成分或天然代谢产物所具有的毒性、致敏性或其他生物学效应；
- ③ 生物的表达产物具有毒性、致敏性或其他生物学效应；
- ④ 环境效应（见下节）。

适当的操作规范与控制措施的发展已经使生物技术通常被视为是一个安全的产业。如果存在以上推测的危害（①~④），则需要明确暴露的风险，并采取适当的措施来防止或减少可能的暴露。应当说，和实验室相比，在工业中应用的重组 DNA 生物自身不会产生更多危害。主要是操作的规模扩大了，可能导致生物逃逸的体积、浓度以及暴露时间增加了。此外，只有在良好的发酵条件下，单位体积的生物量才能达到最大值。因此这就需要加以权衡，因为在实验室研究阶段中大多数的生物不确定性已经在规模扩大前就排除了。不仅如此，只有当实验室中的缺陷型菌株在发酵条件下是高效的，该生物才可进行发酵生产。应当强调的是，工业生产有应用低风险生物的内动力。这不仅可以减少法规的制约，还可以降低生产成本，例如，降低了昂贵的隔离设备以及严格的安全隔离程序的要求。

附录 E 中列出了常规生物和重组生物对人、动植物潜在风险的进一步分析，包含了微生物的致病性、大规模操作以及生物活性产物的考虑。

（四）农业与环境应用中的安全性考虑

1. 总体考虑

本节讨论的是重组 DNA 微生物、动植物在农业与环境中的应用的安全性以及假定的风险。对活生物体进行有意的基因操作始于以下认识，即杂交可以提高生物的应用性能。应用重组 DNA 技术，可以将特定的改良导入生物体中，从而克服或规避遗传物质在不同物种之间转移的屏障。因此通过重组 DNA 技术产生的一些微生物、动植物与自然界中发现的或通过常规育种培育的品种存在质或量上的不同。

重组 DNA 生物在环境中应用的生态风险已经引起关注，并且进行了很多尝试来评估潜在危害。目前，这些尝试工作主要基于对如下推断：①将天然存在的生物引入到非本地的生态系统中；②在现有种群中演化出新性状；③对农作物、植物相关微生物以及动物进行基因操作。然而，我们对这些生物在一些领域的认知比不上在工业应用中形成的认知，因此随着田间试验的发展，应对这些领域进行持续的审查。

通过物种引进经验的研究，尝试建立可能的风险。在绝大多数情况下，都没有产生不良影响。不过，在某些情况下，物种引进可以使接受环境发生生物学改变，有些改变已达

显著水平。此外，建立种群的物种引进量无从得知，因为未在文献中提及。

种群中“新”性状的演化为建立潜在风险参数提供了基础。在自然界中物种不断发生着遗传改变。有时，会出现一种新性状，这种性状具有选择优势，能使生物的数量更多，寄主范围更大，分布范围更广，并能/或利用新的资源和栖境。尽管很少观察到这些事件，但这表明，微小的遗传改变可对表型可产生显著的影响。根据“改变”的性质，在特定生态背景下这种“改变”的效应可能被扩大，从而对环境产生显著影响。

少部分重组 DNA 生物可对环境产生有害影响，这一推论是根据以下补充论点得出的：①在一些应用中，生物的数量可能会比较大；②活生物体可在环境中繁殖并扩散；③加入到改良生物体并赋予其理想特征的核酸可能会通过质粒、病毒或其他方式转移到其他生物中，使这些生物获得非理想的特征；④重组 DNA 技术使生物产生的密码子组合与自然界中生物通常出现的不同。

重组 DNA 生物在农业与环境应用中对环境产生的潜在影响，预计与应用到农业中的自然发生物种或选择物种相似。这些影响包括：①改良生物对非靶标生物产生的直接但非预期的影响；②对物种直接相互作用结果的影响；③物种间接关系的改变；④对生态系统中生化进程的影响；⑤物种间以及物种与其理化环境的演化反应速度和方向的变化。

随着农业与环境产品研究和开发的推进，越来越明显的是，人们正应用重组 DNA 技术实现各种目标。这些目标包括从某一生物的小部分基因组缺失，到生物中已有路径的控制，到近缘生物的遗传物质的组合，再到基因在不同生物之间的转移，从而产生自然界中不可能出现的性状组合。考虑到如此广泛的基因操作，重组 DNA 生物及其应用可能会带来不同类型的风险，其中一些类型的风险与其他相比较小。已经对低风险的应用进行了一些分类^①。

由于一些原因，重组 DNA 生物应用的非预期负面影响通常较低。在大多数情况下，重组 DNA 技术获得生物的特征比常规技术更为清楚。成功开发出有用的基因工程生物取决于：选择合适的受体；鉴定基因的功能；分离、克隆基因并将其转移到理想的受体中；调控导入的基因，使其发挥预期功能。因此，构建一种有用的生物需要该生物大量的资料，并在构建过程中获得到额外的信息。

在农业与环境中的应用的微生物和高等生物的研发过程中，随着研发的进程物理隔离措施逐步降低——实验室研究、在隔离环境中的研究、小规模田间试验、大规模田间试验。因此可以合理地逐步进行安全性数据和性能数据的收集。在这一发展过程中，每一阶段都要对生物的特征进行分析和观察，并预测其在下一阶段中的表现。

2. 针对微生物的考虑

重组 DNA 微生物释放到环境中的考虑因素包括：遗传修饰可能影响宿主范围、影响利用氮或木质素等底物的能力、转变为病原体和/或改变它们与生态系统中生态关联种群之间的平衡。

^① 参见案例：美国国家卫生研究所（NIH）指南中的附录 L，以及澳大利亚重组 DNA 顾问委员会文件：《重组 DNA 技术改良的活生物体的计划释放（临时磋商版）》，工业部、技术部与商务部，堪培拉第 2600 号法案，1985 年 5 月，第 2.6 节中的例外情况。

由于病原生物对人和农业系统的影响最明显，因此，一个主要的考虑是遗传修饰可能将非病原生物转变为病原生物，或者当应用病原生物控制植物昆虫或其他害虫时，遗传修饰可能改变这些病原物的宿主范围或毒力。病原体的研究已经表明，许多基因必须进行适当的相互作用该病原体才会引起疾病。病原体必须具有并适当表达一些特征，如识别因子、黏附能力、致毒性、对寄主防御系统的抵抗力。对无致病潜力或致病历史的微生物进行单个基因的修饰或导入几个致病性相关基因，一般不太可能引起非预期的致病性。不仅如此，在致病性方面已经存在广泛经验和大量数据，在考虑重组 DNA 修饰的影响时这些经验和数据可用于确定应当关注的参数。

3. 针对植物的考虑

与重组 DNA 微生物相比，重组 DNA 植物在农业应用中推测的风险较小，因为植物通常易于监管和控制。不过，重组 DNA 植物需要特别考虑产生难以控制的杂草的可能性。杂草化的程度取决于植物的性质、改良的基因以及改良植物引入的环境。假设，杂草可通过如下方式产生：①无意；②向农作物中有意引入适应性强的性状；③野生植物与重组 DNA 品种之间杂交。假设杂交可以将新基因转移给野生植物，并引入抗除草剂、耐逆和抗虫等性状。由单一基因（其等位基因已经存在于很多植物中）编码的性状（如除草剂抗性）最有可能被转移。

杂草在属与种上的分类和遗传学资料表明，当一植物为杂草型植物或其所在属含有杂草时，对该植物进行基因操作开发新品种时，产生杂草型植物的可能性最大。但是，通过常规植物育种，我们在这一领域已经有了经验而且获得成功，如改良的西红柿品种。一般来说，大量的基因发生适当的相互作用，植物才会表现出杂草的特性，因此重组 DNA 植物通常不太可能意外地发展成杂草型植物。任何情况下，通过重组 DNA 技术将“杂草性状”引入某一作物中的可能性远远小于通过常规植物育种方法；常规植物育种中，杂草经常被用作理想性状（如抗病性和抗虫性）的遗传信息来源。

用于人或动物消费的重组 DNA 植物开发过程中，第二个可能的考虑是改良植物产生有毒次生代谢物或蛋白质毒素的可能性，特别是通过基因工程手段使植物具有抗虫性时。在常规植物育种中也会出现同样的问题。

一些常规植物育种中的考虑同样适用于应用重组 DNA 技术。这些考虑包括：植物遗传改变引起的附生于植物的微生物群落发生改变、或在一个广泛区域内密集种植单一植物品种而引起的附生于植物的微生物群落发生改变。一个负面影响的例子是病原体和昆虫对植物抗性作出的遗传应答。这些应答可使害虫克服植物抗性。很久以来，已经从大量害虫中观察到这一进化应答，不应当认为是应用重组 DNA 技术产生的特有问題。

4. 针对动物的考虑

目前针对动物基因操作的经验有限，但是预期风险较低。对驯养动物进行基因操作的主要考虑是：基因调控的改变；内源性潜伏病毒或外源基因的表达、食品中的活性物质在不可接受的水平。对于能够进入或可以不受限制地进入环境的水生动物或其他动物而言，也可应用与植物和微生物类似的安全性原则。本报告没有详细考虑这些可能的问题。

5. 结论

安全考虑的重点是重组 DNA 技术改良生物在环境与农业中的应用是否产生“增加

的”风险。尽管重组 DNA 技术可产生一些自然条件下不存在的性状组合，但重组 DNA 技术引起的遗传改变比常规技术的可预测性更强，因为重组 DNA 技术能进行特定的改良，准确性更高。可以预期的是，非重组 DNA 生物的风险评价方法同样适于重组 DNA 生物。关于重组 DNA 微生物、动植物的诸多研究和经验一定会提高我们预测重组 DNA 生物引入不同生态系统所产生结果的能力，并提高预测的准确性。

第三章 大规模工业应用

本章介绍了用重组 DNA 生物在大规模工业中安全应用的一般原则。在大多数 OECD 成员国中，生物或后动物细胞培养规模大于 10L 一般认为是大规模工业过程。实验室规模与大规模之间在量上的这种差异（10L 为界）是武断的，其他体积同样认为是恰当的。

现在在传统制造业中应用的大部分生物由于在长期的（有时甚至长达数百年）工业应用中很少出现安全方面的问题，因此认为是安全的。

同样，为了提高性能而将特征明确且没有已知危害的 DNA 片段插入生物中获得的改良生物，也不太可能产生任何风险。

为了便于制造新产品，人们通过插入 DNA 片段对常规安全的微生物进行改良，除了考虑产品本身外，该操作不用进行任何安全性考虑。每一案例都应当进行单独评价，对于少数存在安全问题的情况，应当在隔离的条件下进行生产。

隔离的目的旨在减少工人和其他人员的暴露，防止潜在危险性载体释放到外部环境中，并对产品进行保护。一般进行“生物学隔离”（利用天然屏障限制生物的生存和/或限制遗传信息转移到特定环境中）或“物理隔离”。

详细的隔离方法见附录 G。当应用致病生物或插入基因编码有害产物时，应采用合适的隔离方法。

（一）隔离原则

工业的安全方案，有两种方法：①生物学隔离；②物理隔离。

1. 生物学隔离

在特定环境中存在能够限制生物生存和/或遗传信息转移的天然屏障。可以利用这些高度特异的屏障进行生物隔离。包括营养缺陷型、对紫外线的敏感性等特征。当这类屏障自然存在于生物中，或特异引入到生物中时，生物就在某种程度上具有生物学隔离能力。通过对生物或载体进行操作，可以影响某一生物的生物学隔离程度。最常应用的生物学隔离改良能限制：

- ①生物在环境中的存活与繁殖；和/或
- ②遗传信息转移给其他生物。

2. 物理隔离

“物理隔离”一词涵盖了隔离的三个因素：①设备；②操作规范与技术；③设施的设计。主要隔离例如采用适当的设备和安全操作程序对工作人员以及生产地点四周实施隔离

远离这些物质。二级隔离，例如通过设施（大楼）的设计和操作程序对设施外的环境进行保护。

（1）设备

重组 DNA 生物工业生产的发酵设备是实现物理隔离的主要方法。设备的设计因加工过程、容器大小及其他相关因素而异。应通过操作规范和程序保持设备隔离的有效性。

主要隔离措施在不同程度上由工厂本身提供。例如，潜在泄漏点周围的排气通风装置可以提供额外的防护。

（2）操作规范与技术

隔离的一个重要因素是严格遵守标准操作规范与技术。操作传染性病原、致敏性或有毒材料的人员应当认识到潜在的危害，并接受培训，熟练掌握处理这些材料的操作规范与技术。负责设施的主管或人员应当为工作人员提供或安排适当的培训；

当标准化操作程序不足以控制危害时，就应选择额外的安全操作规范。该操作规范应当与病原或操作程序相一致；

操作程序的一些因素包括：①生物安全手册或操作手册，该手册详细描述操作规范和程序，从而将风险降至最低或排除风险；②工作机制。就具体的危害向工作人员提出建议、要求工作人员阅读并遵守的操作规范与程序；③指导。由经过培训并精通操作程序、安全程序并熟悉工作地点潜在危害的人员指导活动的开展；

工作人员的安全操作规范和技术还应包括适合的设施设计与工程特性、安全设备和管理措施；

（3）设施的设计

设施的设计有助于保护生产区以外的环境和人员。设计的完善程度应当与生产活动相符。不同类型实验室所采用的设计原则也可用于工业设施的设计，以达到二级隔离系统。应当认识到，设施的设计与操作规范和程序、主要隔离设备之间并不是彼此独立的。

（二）隔离的实施

隔离措施选择的主要目的是为了与适当的物理措施相匹配，相关的安全程序与风险评估结论相匹配。隔离的原则是要描述执行的结果而不是所采取的技术手段。对于良好大规模工业应用规范（如下）以及各级隔离措施，建议应用如下良好职业安全与卫生基本原则：

- ①保持车间及其环境处于物理、化学或生物因子的最低水平；
- ②在源头应用工程控制措施，并且在必要时应用防护服和防护设备；
- ③充分测试并维护控制措施与设备；
- ④必要时，在主要物理隔离之外测试是否存在活体目标生物；
- ⑤提供培训；
- ⑥按要求成立生物安全委员会或分委会；
- ⑦制定并执行保证工作人员安全的地方性操作规范。

已经制定了工业用重组 DNA 生物及其他生物安全隔离级别的实验室研究指南。在确定大规模应用的隔离级别时，实验室采取的隔离等级是一个考虑因素。

（三）良好大规模工业应用规范（GILSP）

正如本报告和其他文献所述^①，可以采用其他生物类似的方式，对重组 DNA 微生物的危害进行评价与管理。应当认识到，对于低风险生物，只需要应用很低的控制与隔离措施。大规模工业生产中应用的大部分重组 DNA 生物都属于该类。正因为如此，我们认可良好大规模工业应用规范（GILSP）的原则，GILSP 适用于较低控制条件下操作的生物。这与欧洲生物技术联盟对 1 类生物建议的控制措施是一致的。

对于重组 DNA 的生物而言，允许应用 GILSP（见附录 F）的标准鉴定宿主生物、重组 DNA 生物以及载体或插入片段：

——宿主生物应当不具有致病性；应当不含有外源因子；应当在工业中有长期的安全使用历史；或有内在的环境限制因素，使其最适宜在工业设备中生长，但环境却限制其存活且无不良后果。

——重组 DNA 生物应当不具有致病性；在工业设备中应当与宿主生物一样安全，且对环境无不良后果；

——载体或插入片段应当是特征明确且无已知为害性的序列，其长度应当限制在执行预期功能所需的最小长度；除非执行预期功能所必需，否则不应该增加载体在环境中的稳定性；移动性较差；应当不会将抗性标记转移到已知的在自然状况下不会获得抗性标记的微生物中，如果该抗性会削弱人、动物或农业中所用病原药物的效果。

两个清晰的事例说明了除非具有致病性，否则该构建就可以按照 GILSP 进行操作：

①来源于单一原核宿主（包括质粒和病毒）或单一真核宿主（包括叶绿体、线粒体或质粒，但不包括病毒）；

②由不同物种的 DNA 片段组成，这些物种通过已知的生理学过程进行 DNA 交换。

（四）特定物理隔离等级下在工业流程中应用生物的评价

已经认识到，在某些情况下有必要应用特定等级的物理隔离措施。评价潜在风险时，关注的生物特性包括生物学隔离以及生物潜在不良影响。重组 DNA 生物产生不良影响的评价主要考虑几类信息。首先，是供体生物和受体生物的特性以及导入 DNA 的特性。该类生物和导入 DNA 的评价要点列于本报告的第二章和附录 B 中。它们可作为备忘录，不一定适用于所有情况。第二，重组 DNA 生物特性的评价。附录 C 列出了要考虑的因素，以及在工业设备中对人类健康潜在影响的评估因素。附录 D 列出了基因工程生物的特性，当生物从设施中释放时，该资料可作为应急计划的一部分。应当注意的是，附录 D 主要是针对环境应而建立的，绝大多数大规模工业应用生物在环境中只有有限的生存能力。评价大规模工业应用重组 DNA 生物对环境的影响时，主要考虑应用的限制因素（见第四章）。很多必要的信息将会在实验室和中试阶段获得。

^① Kuenzi et al., "Safe Biotechnology-General Considerations", in: *Applied Microbiology and Biotechnology*, Springer-Verlag, 1985, Vol. 21, pp. 1-6. A report prepared by the Safety in Biotechnology Working Party of the European Federation of Biotechnology.

（五）物理隔离与潜在风险评估相适应

在重组 DNA 技术建立之前的很长时间，物理隔离程序已经应用于大规模工业生产中。重组 DNA 生物也能够使用这些标准的物理防护原则。显然，物理隔离等级应当与风险相适应。

然而，其他考虑因素也会影响对隔离措施的选择。这些因素是：①改良生物的特性；②产品和加工过程的特性。一些情况下，改良生物的评价结果表明实验室的隔离等级并不适合于大规模加工。例如，如果供体生物为致病菌，实验室的物理隔离等级可能会较高；不过，所得到的重组 DNA 生物可能为非致病菌，因为它含有与致病性表型无关的供体 DNA 序列（如表达乙型肝炎表面抗原的大肠杆菌宿主-载体系统）。较低等级的隔离可能适合于该重组 DNA 生物构建后的实验室研究。这类改良生物在工业加工中应用较低的物理隔离等级也是合适的。不过，由于工业加工相关的一些考虑因素与实验室研究不同，在转到大规模加工时，应当对改良生物进行重新评价，并选用合适的隔离措施。

应当认识到，在一些情况下，加工过程其他方面存在的风险以及产品存在的风险可能会决定物理隔离等级。加工厂与设备在应用和规模上比实验室研究更加多样，因此，物理隔离方法的选择也更加多样。并且，应当按照加工过程的各个单元逐步考虑隔离方法。加工过程特定部分的要求可能就决定了该部分所要采取的物理隔离。通过以上程序就可列出各类工业设备的隔离等级范围，并可选择最适合的程序和设计以确保安全隔离。

只要这些方法能够提供所需的隔离，就可以对其进行灵活地选择。其结果是，根据加工过程中各单元的评价，选择并组合不同类型的隔离措施。因此，描述固定的隔离方法是没用的。附录 G 给出了隔离类型的实例。由于知识的快速发展，与物理隔离相关的准确的风险评估也要随着经验的积累而修订。

第四章 环境与农业应用

利用重组 DNA 技术开发在环境中不受限制应用的生物，例如杀虫剂，促进植物生长，提高矿石沥滤，提高原油采收率，降解污染物。重组 DNA 植物与动物也可用于增加纤维、粮食和饲料的产量。其他应用包括一些兽药和医药的生产与使用。重组 DNA 生物可能会从加工场所释放出来，对此应当予以考虑。

在目前的农业研究与开发实践中，常规改良生物通常在商品化之前进行广泛的测试。该测试通常是一个逐步的过程，从温室或其特定隔离条件下的小规模田间试验，最后到多点的大规模田间试验。农业用重组 DNA 生物的开发过程，也适用于类似的程序。用于动物和人体的产品在商品化之前也要经过研究试验阶段。在环境释放之前，环境应用的微生物通常要在控制系统中进行预测试。在每一阶段都要进行评价并收集数据，以明确效果，并排除对环境不利影响（或对预期目标无效）的生物。这些数据通常与环境影响的评估有关。

一套科学考虑方法不可能适用于所有的生物、环境以及重组 DNA 生物在农业与环境应用中的各种释放模式。相反，改良生物的特性及其特定应用将表明安全评价是否能够得

到保证，以及哪些考虑因素与之相关。本章旨在叙述与评估相关的各种科学考虑因素，而不是对审查的通用规则或标准提出建议。重要的是，随着重组 DNA 生物在环境与农业中应用的扩大，应当整理其安全记录，并与常规生物进行比较。

（一）应用于环境与农业的重组 DNA 微生物在安全评估时的考虑

本章的科学考虑因素是围绕一系列的事件建立起来的，所有的事件均发生在产生不良影响之前。因此，对生物的安全评价也是围绕这些事件的考虑因素逐步建立起来的。如果事件发生的可能性较低，则产生不良影响的可能性也较低。

1. 在环境中的应用

应用地点的位置、类型以及应用的方法和数量对于安全评价十分重要。在农业应用中，食品、饲料与纤维生产可能会造成大量改良生物释放到陆地或水生生态系统中（如抗除草剂植物、不形成冰核的细菌、抗病毒剂或杀菌剂、转基因动物）。用于动物或人的重组 DNA 疫苗，以及附生于植物的微生物在环境中的暴露模式十分有限，原因是它们具有宿主特异性，但是他们在下水道、饲养场或径流水中肯定会发生偶然释放到环境中的情况，并且可能很重要。环境应用（如金属的提取、污染物和有毒废物的降解）的最初局限于某一特定的场所，或广泛暴露于生态系统。安全评价的科学考虑因素将视各特定的应用情况，具体生物，以及人和/或其他重要生物的暴露程度而异。在研究与开发过程中所适用的地方检疫法规和监测方法也有很大关系。

2. 在环境中生存、繁殖和/或扩散

在评价环境释放的安全性时，生物在应用环境中的生存、繁殖和扩散能力是重要的考虑因素。毫无疑问，为了实现既定目标，农业与环境应用的重组 DNA 生物将具有一定的生存和繁殖能力，还可能具有扩散能力。这与许多大规模工业应用的缺陷型（限制的）生物不同（见第三章）。对其进行评价时，要确定改良生物与非改良生物在暴露于影响其生存与繁殖的环境条件（如气候和土壤因素）时存在的差异；这种改良会不会影响生物的传播途径和/或传播范围；是否会出现生物数量的过度增加并对环境产生不良影响。此外，应当优先使用重组 DNA 载体，由于该载体转移至其他生物的能力有限因而在环境中扩散的能力也有限。

3. 与其他生物或生物系统的相互作用

在描述重组 DNA 生物与其应用生态系统的相互作用时，两个通常的考虑因素十分重要：生态系统（如栖境、优势物种）的描述、该生态系统中可能的相互作用（如致病性、基因转移、数量过度增长）。对生态系统的所有要素进行描述几乎是不可能的，因此应当重点考虑特定生态系统的重要特征。与受体生物相比重组 DNA 生物所具有的特征可为确定哪些相互作用最有意义提供指导。评估的考虑要点已在第二章以及附录 B 与 D 中列出。

4. 对环境的影响

该评估阶段需要考虑对环境可能产生显著影响的因素。这些因素包括：①对其他生物的影响，如致病性、传染性以及对竞争者、捕食者、宿主、共生生物的影响等；②已知或推定的生物地球化学过程（如矿物质循环、氮固定等）；③生物的遗传稳定性或表型稳定性；④遗传物质转移给生态系统中其他生物的可能性；⑤应用后生物数量过度增长所产生的影响。

（二）相关植物和动物

本章描述的许多科学考虑因素与重组 DNA 动植物有关。此外，第二章总体考虑中描述的供体生物、受体生物与改良生物的特性，是安全评价起始阶段所必不可少的。

动植物的环境安全评价与微生物存在很大差异。这些差异主要在于生物复杂性、个体大小、寿命长短以及遗传隔离或生物学隔离程度的差异。微生物应用相关的检测、监测与隔离的考虑程度不可能达到动植物的水平。

（三）信息和检测方法的获取

附录 D 阐明了生物释放的环境影响评价中通常考虑的各种参数。尽管生物引入到环境中所产生风险的评价还不是很成熟，但是确实存在大量关于微生物和动植物的生态、病理、分类和生理学方面的信息，它们都可作为数据来源。

随着重组 DNA 生物从研究发展到田间试验和商业应用阶段，预期将会获得更多的科学信息。应当鼓励开展更多的研究，以提高我们对重组 DNA 生物引入生态系统产生后果的预测能力。对家畜和农作物的病原物而言，可能存在关于其生存、传播和最佳检测方法的全面数据。

已经收集了微生物的相关数据，并在一定程度上进行了系统化和电子化。菌株特异性数据系统正在协调开展。基因序列数据库和遗传元件（如质粒、噬菌体）功能图谱已经运行。已经对一些病毒进行了全基因组测序。

畜禽农作物和特定微生物引进、选育和释放的长期历史为重组 DNA 生物的评价提供了重要的基础数据。如前所述，关于受体生物的信息有助于预测改良生物的命运。

可能会出现这样的情况：基于对基因工程生物非预期环境影响的关注可能需要提供更多的数据。尽管要隔离或模拟环境中获得的数据对评价是有用的，但是生物在田间的表现与模拟环境不同。因此，小规模田间试验可能是获得有效数据的唯一机制。

（四）工业用重组 DNA 生物释放的环境风险评价

大规模工业用的风险评估应当考虑生物意外或偶然释放到环境中的可能性。大部分大规模工业用生物使用的是 GILSP 生物，这些生物或者具有长期安全使用的历史，或者在生产设施之外只有有限的生存能力。其物理隔离程度（包括排放控制）由改良生物的生物特性决定。

对于大规模工业应用会导致活生物体向环境中释放的情况来说，应当使用本章所述的科学考虑因素进行安全评价。

第五章 总结与建议

（一）要点总结

重组 DNA 技术开辟了在各领域广泛应用的新的可能性和前景，预期将为人类带来巨

大裨益。它们通过多种方式为促进人类健康做出贡献，预期在不久的将来这种贡献会显著增加。

绝大部分大规模工业用的重组 DNA 生物风险较低、只需要采取最低的隔离措施 [GILSP（良好大规模工业应用操作规范）]。

当需要使用高风险的重组 DNA 生物时，要确定风险评估的额外标准。不仅如此，物理隔离技术要为工业领域所熟知，并且已经成功用于病原生物的隔离。因此，高风险的重组 DNA 生物也可在合适的物理和/或生物学隔离条件下进行安全的操作。

与工业用生物相比，环境或农业用生物潜在风险评估的发展还没有其成熟。不过，通过与在农业和环境中的应用的常规改良生物数据库进行类比，可以获得重组 DNA 生物的评价方法。随着研究与开发过程中分阶段评价的进行，应当可将重组 DNA 生物对环境的潜在风险降至最低。

（二）建议

1. 总体建议

（1）通过如下交流有利于重组 DNA 技术的共识：各国法规的原则或指导方针；风险分析的发展；风险管理的实践经验。因此，应当尽可能实现信息共享。

（2）重组 DNA 技术及其应用的专门法规还没有科学基础。各成员国应当检查现有的监管和审查机制，确保进行足够的审查与控制，同时避免可能阻碍这一领域技术发展的过重负担。

（3）贯彻指导方针的任何措施都不应当阻碍重组 DNA 技术的发展。国际共识应当认识到这一必要性。

（4）为了促进国家之间的数据交换并最大限度减少贸易壁垒，应当在国家与国际水平上进一步发展检测方法、设备的设计以及微生物分类。应适当考虑国际组织 [如世界卫生组织 (World Health Organisation, WHO)、欧盟委员会 (Commission of the European Communities, CEC)、国际标准化组织 (International Standards Organisation, ISO)、粮农组织 (Food and Agriculture Organisation, FAO)、微生物菌株数据网 (Microbial Strains Data Network, MSDN)] 在标准方面正在开展的工作。

（5）应当努力提高公众对重组 DNA 技术各方面的认识。

（6）对于重组 DNA 技术在工业、农业与环境中的应用，各成员国应关注技术的发展。对于重组 DNA 生物在特定工业领域以及在环境与农业中的应用，一些国家希望制订通知方案。

（7）要认识到创新的必要性，确保安全的同时采用合适的方法保护知识产权和商业秘密。

2. 工业用重组 DNA 生物的建议

（1）重组 DNA 技术的大规模工业应用应当尽可能使用风险较低的微生物。这类微生物可在良好大规模工业应用规范 (GILSP) 下进行操作。

（2）在使用本报告列出的标准评估之后，如果重组 DNA 微生物不能仅按照 GILSP 进行操作，除 GILSP 之外，还应当采用与风险评估相适应的隔离措施。

(3) 在需要采取物理隔离的大规模工业应用中，应当鼓励开展进一步研究，提高重组 DNA 生物无意释放的监测和控制能力。

3. 环境与农业用重组 DNA 生物的建议

(1) 应当使用现有活生物体对环境与人体健康影响的数据指导风险评估。

(2) 在应用于农业与环境之前，对重组 DNA 生物的潜在风险进行评价十分重要。不过，建立一般国际标准指导其应用还不成熟。在应用前，应当按照个案分析^①对潜在的风险进行评价。

(3) 应当开发用于农业或环境的生物，逐步从实验室转移到生长室和温室，再到小规模田间试验，最终到大规模田间试验。

(4) 应当鼓励进一步研究，提高重组 DNA 生物应用后果的预测、评估与监测能力。

^① “个案”的意思是依据特定建议相关的评估标准对某一提案进行独立审查；由于不含盖各类建议，因此并不表示每种情况都需要国家机构或其他机构进行审查。

附 录

附录 A 定 义

不同国家对基因操作与重组 DNA 的定义不同。例如：

1. 英国——卫生与安全（基因操作）法，1978：

“基因操作”指将细胞外产生的核酸分子插入病毒、质粒或其他载体系统中，使其整合到受体生物中，并在受体中扩繁，自然情况下不发生这种整合。通过上述方法形成遗传物质新组合。

2. 美国——重组 DNA 分子研究指南，1983 年 6 月：

“重组 DNA 分子的定义。在指南中，重组 DNA 分子的定义是：(i) 在活体细胞外将自然或人工合成的 DNA 片段连接到 DNA 分子上，通过该方法构建的分子能够在活体细胞中复制，或 (ii) 通过 (i) 中所述的分子复制产生的 DNA 分子。”

注意：应当把可能产生有害多核苷酸或多肽（如毒素或具有活性的药物）的人工合成 DNA 片段看作与天然 DNA 对照是等同的。如果人工合成的 DNA 片段不能在体内表达具有生物活性的多核苷酸或多肽产物，则将其从指南中排除”。

附录 B 总体科学考虑

本附录尝试列出重组 DNA 生物潜在风险的基本科学考虑。虽然尽可能根据目前知识把列表做得综合全面，但是列表中包括的所有要点并非适用于每种情况。因此，可以预计，个别建议只适合个别情况的特定问题。根据不同个案情况，各考虑因素的详尽程度也可能不同。

1. 供体生物和受体生物的特征

(1) 分类、鉴定、来源、培养

①名称和命名；

②供体生物与受体生物之间的亲缘关系，以及通过自然方式进行遗传物质交换的证据；

③可用于鉴定的生物特征，以及鉴定方法；

④实验室和/或环境中用于测定是否存在该生物以及监测该生物数量的技术；

⑤生物的来源；

⑥受体生物繁殖周期（有性生殖/无性生殖）；

⑦限制受体生物繁殖、生长与存活的因素。

(2) 供体生物与受体生物的遗传特征

①基因操作历史；

- ②受体与供体基因组的特征；
- ③受体生物相关遗传性状稳定性。
- (3) 受体生物与供体生物的致病性与生理性状

- ①致病性、毒力、传染性或毒性；
- ②宿主范围；
- ③其他潜在的重要生理性状；
- ④性状的稳定性。

2. 基因工程生物的特征

- ①基因修饰的描述；
- ②插入供体核酸的特征、功能及来源的描述，包括影响 DNA 与载体功能的调控元件或其他元件；
- ③载体构建方法的描述；
- ④载体-插入序列导入受体生物方法的描述，以及改良生物筛选鉴定程序的描述；
- ⑤改良生物中留存的载体和/或供体核酸的结构与数量的描述；
- ⑥受体基因组修饰位点的特征。插入 DNA 的稳定性；
- ⑦插入载体的动用频率和/或遗传转移能力；
- ⑧导入的遗传物质的表达速度与表达水平。测定方法与方法的灵敏度；
- ⑨受体生物对外源蛋白活性的影响。

附录 C 人体健康的考虑

本附录尝试列出重组 DNA 生物对人体健康潜在影响的考虑。虽然尽可能根据目前知识把列表做得综合全面，但是列表中包括的所有要点并非适用于每种情况。因此，可以预计，个别建议只适合个别情况的特定问题。根据不同个案的情况，各考虑因素的详尽程度也可能不同。

1. 基因工程生物的特征

- (1) 基因工程生物与受体生物的致病性比较；
- (2) 定殖能力；
- (3) 如果生物对人（或动物，如果有的话）具有致病性：
 - ①疾病类型及致病机制（包括侵染力和毒力）；
 - ②传播性；
 - ③感染剂量；
 - ④宿主范围，及改变的可能性；
 - ⑤在人以外的宿主中存活的可能性；
 - ⑥是否存在载体或传播方式；
 - ⑦生物稳定性；
 - ⑧抗生素抗性模式；
 - ⑨毒性；

⑩致敏性。

2. 无活性的生物或重组 DNA 加工产品对人体健康影响的考虑

(1) 无活性的生物和/或其代谢产物的毒性或致敏性；

(2) 产品的危害。

3. 人体暴露的管理

(1) 生物学措施：

①适当的预防与治疗措施；

②医学监测。

(2) 物理措施与组织措施。

附录 D 环境与农业的考虑

本附录尝试列出重组 DNA 生物对环境与农业潜在影响的考虑。虽然尽可能根据目前知识把列表做得综合全面，但是列表中包括的所有要点并非适用于每种情况。因此，可以预计，个别建议只适合个别情况的特定问题。根据不同个案情况，各考虑因素的详尽程度也可能不同。

1. 供体与受体相关的生态性状

①自然生境和地理分布。原生境的气候特征；

②环境过程的参与度；

③致病性——宿主范围、传染性、致毒性、毒力、载体；

④与环境其他生物的相互作用以及对环境中其他生物的影响；

⑤形成存活结构体（如种子、孢子、菌核）的能力；

⑥基因型与表现型改变的频率；

⑦遗传物质在供体生物生态学中的作用；

⑧遗传物质对受体生物的预计影响。

2. 基因工程生物在环境中的应用

①应用地点的地理位置，在物理和生物学上与人和/或其他种群的距离；

②应用地点的描述，包括其规模、筹备、气候、温度、相对湿度等；

③隔离和净化；

④引进方案，包括应用数量和频率；

⑤应用地点的操作和耕作方法；

⑥监测方法；

⑦应急方案；

⑧应用后的处理程序。

3. 基因工程生物在环境中的存活、繁殖与传播

(1) 检测、鉴定与监测技术

①检测、鉴定与监测技术的描述；

②检测方法的特异性、灵敏度和可靠性；

③供体 DNA 转移到其他生物的检测技术。

(2) 影响存活、繁殖和扩散的特征

- ①影响存活、繁殖或传播的生物学特征；
- ②在模拟自然环境（如微环境、生长室、温室、昆虫饲养室等）中的行为；
- ③可能影响存活、繁殖、传播的已知环境条件或预测的环境条件。

4. 基因工程生物与生物系统的相互作用

(1) 靶标与非靶目标种群

- ①基因工程生物的已知生境或预测生境；
- ②对靶标生态系统以及生物可传播生态系统的描述；
- ③靶标生物的鉴定与描述；
- ④基因工程生物与靶标生物之间相互作用的预期机制及后果；
- ⑤对可能暴露的非靶标生物的鉴定与描述。

(2) 稳定性

- ①遗传性状的稳定性；
- ②遗传转移能力；
- ③释放后选择导致基因工程生物表达非预期性状及非理想性状的可能性。
- ④如果有的话，保证遗传稳定性的方法；
- ⑤防止或减少遗传物质扩散的遗传性状描述。

(3) 传播途径

- ①传播途径，物理途径或生物途径；
- ②已知或潜在的相互作用方式，包括吸入、摄入、表面接触、钻入和注射。

5. 潜在的环境影响

(1) 对靶标生物和非靶标生物的潜在影响

- ①致病性、传染性、毒性、毒力、病原载体、致敏性、定殖性；
- ②对环境中其他生物的已知影响或预计影响；
- ③释放后生物相互作用以及宿主范围发生转变的可能性。

(2) 对生态系统的影响

- ①在生物地球化学过程中的已知或预计参与度；
- ②种群过度增加的潜力。

附录 E^① 常规与重组生物对人和动植物的潜在风险

1. 致病性

致病性是活生物体与病毒使人和动植物产生疾病的潜在能力。科学上已知的大量微生物

① 本附录的第 1 点和第 2 点来源于：应用微生物学和生物技术，*op. cit.* 中的生物技术对健康的影响，*op. cit.*；以及生物技术——总体考虑。

物中只有少部分微生物具有这种能力。该疾病是寄生物与宿主之间相互作用的结果,不太可能推断某一特定的微生物或病毒是否会致病,原因是致病性通常取决于宿主和寄生物的遗传组成和生理状态,还取决于其他因子,包括感染剂量及侵入部位。

致病微生物和病毒很少用于工业中,但在疫苗、类毒素或诊断试剂的制造中会经常应用这些微生物。

希望引进新技术工艺的制造商面临的安全性问题是要确定通过该技术产生的生物是否致病,如果致病,则要确定合适的隔离方法。在解决这一问题时,制造商首先要进行生物分类,将其归入特定的属与种。这样就可以根据对生物本身及其近缘种属的现有了解,初步评价其作为病原菌的可能性。然后可通过致病性测试对其进行补充评价。

临床和实验室研究对各种微生物(包括病原菌)采用分类管理方法,按致病性递增的顺序、并根据对工人和公众的危害程度将其分成1~4四个风险等级。

在将DNA插入序列从一个生物引入到非致病细胞生物后,会增加其获得致病性特征的可能性。例如,就大肠杆菌这一分子遗传学特征最为清楚的生物而言,插入序列可能是基因组DNA大小的 10^{-3} 倍。大约50年前,用分离到大肠杆菌K12进行重组DNA的工作,在实验室保存过程中,它已丧失了野生型大肠杆菌的很多特征,包括:

- 细胞表面抗原K;
- 部分脂多糖侧链;
- 使菌株附着在人肠道上皮细胞的黏附因子(*fimbriae*);
- 对人血清中溶菌作用的抵抗力;
- 对白细胞吞噬作用的部分抵抗力。

因此,大肠杆菌K12不定殖于人的肠道,也不致病。决定上述特性的5个基因中有4个在大肠杆菌染色体的距离很远。可以推断,致病性所涉及的基因数目对于重组DNA试验中的意外转移来说太大了。类似的推论也适用于该类试验的其他微生物(如枯草芽孢杆菌和酿酒酵母)。

有人认为,在鸟枪法试验中,可能会发生这类不大可能出现的事件。不过,如上述情况一样,多年的试验结果不支持这一推测。此外,如果构建了用于生产的一个菌株,所选的DNA已经界定清楚、进行了测序,并切割到所需的最小长度。并且产物和菌株特性已经进行详细研究,生产用的菌株与亲本只在生产预期产物的能力上有所不同。因此,就生产环节本身而言,所用菌株变为致病性菌株感染工作人员的风险可以忽略不计。

2. 大量微生物的安全操作

在一些加工过程中,分离出预期的产物之后仍留有大量的微生物,这些微生物需要进行安全处理。如果这些微生物具有致病性,则通过物理或化学方法或同时应用这些方法将其杀死。

关于废弃物处理的问题,处理的性质由细胞群的组成决定。

3. 生物活性产品的安全性

关于产品的质量,按照个案原则考虑生物改变相关的推导的危害,以及生物改变后所表达产品质量相关的推导的危害。目前治疗用蛋白的生产已经有标准操作规范,利用重组DNA技术,定期检测载体、基因以及终产品的完整性。大多数情况下,该规范能够

满足加工过程中生物学改变的检测。例如，作为产品严格质量控制的一部分，需要筛选动物细胞组织培养产品是否存在病毒（如反转录病毒）或宿主 DNA 成分，这些成分可能含有有害的遗传物质。因此，需要对源自细胞蛋白和核酸的产品进行纯化。

植物细胞产品的潜在危害通常与制药工业相关，可通过现有技术进行控制。

不管加工过程涉及的是微生物细胞、动物细胞还是植物细胞，其产品相关的潜在危害具有共性，这些危害与重组 DNA 技术无关。应当按照个案原则对这些潜在危害进行分析。产品的危害主要来源于气溶胶的形成并逃逸到环境中。应当考虑如下准则：

① 对人、动物或植物的直接毒性；

② 可以被鼻、眼或肺泡吸收，或通过口腔或皮肤直接接触（特别是在皮肤擦伤时）吸收；

③ 产品通过次生代谢在其入侵的组织中转变成有毒物质；

④ 产品引起免疫应答或过敏反应。

⑤ 暴露后引起毒性反应或免疫应答。

在处理具有生物活性的微生物产品时，生物技术工业的优势是加工过程在受控条件下进行。因此不管遵守任何所需标准，都可以对产品进行检测、隔离或去除。因此，重组 DNA 技术是建立在标准化工业发酵规范基础之上的，该规范已有多年的成功应用经验。

附录 F GILSP 中重组 DNA 微生物的建议准则

受体生物	重组 DNA 生物	载体/插入序列
不致病	不致病	特征明确且不具有已知的有害序列
无外源因子	在工业设施中与受体生物一样安全，在环境中存活率有限且不产生不良后果	只要能执行预期功能，尽可能限制 DNA 大小；不应当增加构建体在环境中的稳定性（除非执行预期功能所需）
有工业应用的长期历史；或		动源性应当较差
自身的环境限制因子，使其最适于在工业设施中生长，在环境中的存活率有限且不产生不良后果		不应将抗性标记转移到已知在自然情况下不会获得这些标记的微生物中（如果微生物获得抗性标记可削弱控制这些病原的药物的使用）

附录 G GILSP 之外其他大规模工业应用隔离措施的实例

1. 第 1 类

该等级的物理隔离应当达到如下目标：

①活生物体应当在与环境物理隔离的系统中进行操作；

②应对排出的废气进行处理，以将活生物体的释放降至最低（即降低到符合安全的最低水平）；

③样品收集、材料添加、活生物体转移等应当以适合的方式进行操作，并将释放降至最低；

④除非活生物体已通过有效方法灭活，否则大规模的培养液不得从该系统中取走；

⑤封闭系统应位于下表 6③和④要求的控制区域中；

⑥从生产设备中流出的废液在排放前应通过有效的方法进行灭活。

2. 第 2 类

该等级的物理隔离应当达到如下目标：

①活生物体应当在与环境物理隔离的系统中进行操作；

②应当对排出的废气进行处理，以防止活生物体的释放；

③样品收集、材料添加、活生物体转移等应当以适合的方式进行操作，以防止释放；

④除非活生物体已通过有效的化学或物理方法灭活，否则培养液不得从封闭系统中取走；

⑤应当在防止渗漏的密封装置中；或应当在完全封闭的通风房屋中；

⑥封闭系统应位于下表 6①、②、③和④要求的控制区域中；

⑦从生产设备中流出的液体在排放前应通过有效的化学或物理方法进行灭活。

3. 第 3 类

该等级的物理隔离应当达到如下目标：

①活生物体应当在与环境物理隔离的系统中进行操作；

②应对排出的废气进行处理，以防止活生物体的释放；

③样品收集、材料添加、活生物体转移等应当以适合的方式进行操作，以防止释放；

④除非活生物体已通过有效的化学或物理方法灭活，否则培养液不得从封闭系统中取走；

⑤应当在防止渗漏的密封装置中；或应当在完全封闭的通风房屋中；

⑥生产系统应位于下表 6①~⑪要求的特定控制区域中；

⑦从生产设备中流出的液体在排放前应当通过有效的化学或物理方法进行灭活。

GILSP 之外其他大规模工业应用隔离措施的实例

要 求	隔离类别		
	1	2	3
1. 活生物体应当在与环境物理隔离的系统（封闭系统）中进行操作	是	是	是
2. 从封闭系统中排出的废气应当进行处理，以：	使释放量降至最低	防止释放	防止释放
3. 样品收集、材料添加活生物体转移，应当以适合的方式操作，以：	使释放量降至最低	防止释放	防止释放

(续)

要 求	隔离类别		
	1	2	3
4. 除非活生物体已进行如下处理，否则大规模的培养液不得从封闭系统中，取走：	通过有效方法灭活	通过有效的化学或物理方法灭活	通过有效的化学或物理方法灭活
5. 应当在密封装置中，以：	使释放量降至最低	防止释放	防止释放
6. 封闭系统应当位于控制区域	可选	可选	是，且是特定建造的
①应当贴上生物危害标记	可选	是	是
②只有特定的人员才可进入	可选	是	是，通过气压过渡舱
③工作人员应当穿防护服	是，穿工作服	是	全部更换
④应当向工作人员提供清除污染和清洗的设施	是	是	是
⑤工作人员在离开控制区之前应当淋浴	否	可选	是
⑥应当收集水池和淋浴间流出的水，并在释放前进行灭活处理	否	可选	是
⑦控制区应当充分通风，以最大限度降低空气污染	可选	可选	是
⑧控制区应当保持负压	否	可选	是
⑨进入控制区以及从控制区排出的气体应当进行高效微粒空气过滤器过滤	否	可选	是
⑩控制区应可容纳封闭系统全部内容物的溢出	否	可选	是
⑪控制区应当是封闭的，可进行熏蒸消毒	否	可选	是
7. 废液在最终排放前应当进行处理	通过有效方法灭活	通过有效的化学或物理方法灭活	通过有效的化学或物理方法灭活

附录 H 生物技术安全与法规 政府特别专家组

科学技术政策委员会（Committee for Scientific and Technological Policy）决定成立生物技术安全与法规政府特别专家组，委任如下：

1. 专家组应当

——在现有的或计划的关于微生物操作的法律法规背景下，审查各国对工业、农业与环境用基因工程生物安全性的立场。

2. 专家组尤其应当

——确定基因工程生物在以下方面生产和应用的已有或可能采用的监测或审批标准：

①工业；②农业；③环境；

——探索基因工程生物未来在以下方面生产和应用的可能方式和监测方法；①工业；

②农业；③环境。

3. 专家组要求在 1985 年 6 月之前向委员会报告。

4. 该工作应当为指南、操作规程和/或法规更好地协调而迈出的一步。

附录 I 生物技术安全与法规政府 特别专家组成员名单

主席：Dr. R. NOURISH

H. M. Superintending Specialist Inspector

Technology and Air Pollution Division

Health and Safety Executive

(Bootle) Merseyside, United Kingdom

澳大利亚

Mr. P. FLAHERTY

Secretary, Recombinant DNA Monitoring Committee

Department of Industry, Technology & Commerce

Canberra

奥地利

Prof. R. LAFFERTY

Institut für Biotechnologie

Mikrobiologie und Abfalltechnologie

Graz University

Graz

Mr. H. SCHWAB

Institut für Biotechnologie

Mikrobiologie und Abfalitechnologie

Graz University

Graz

比利时

Professor H. COUSY

Katholieke Universiteit Leuven

Leuven

Prof. Dr. J. DE LEY

Microbiology Laboratory

Rijksuniversiteit

Ghent

Mrs. N. NOLARD

Institut d' Hygiène et d' Epidémiologie

Brussels

Mme. A. M. PRIEELS

Chargée de Mission

Services de Programmation de la Politique Scientifique

加拿大

Dr. A. ALBAGLI

Senior Project Manager

National Research Council of Canada

Ottawa

Dr. J. FURESZ

Director, Bureau of Biologics

Department of Health and Welfare

Ottawa

Mr. T. McINTYRE

Advisor

Environmental Protection Service

Department of the Environment

Ottawa

Dr. D. B. SHINDLER

Manager-Biotechnology

Ministry of State for Science & Technology

Ottawa

丹麦

Mrs. P. H. ANDERSEN

(观察员)

DVM, National Food Institute

Institute of Toxicology

Søborg

Prof. B. HARVALD (delegate until June 1984)

Chairman of the National Research Councils' Registration Committee
for Genetic Engineering

Copenhagen

Prof. E. LUND (delegate from June 1984 onwards)

Royal Vet. & Agricultural University of Copenhagen

Copenhagen

Mr. H. PEDERSEN

DVM, National Agency of Environmental Protection
Copenhagen

芬兰

(观察员)

Prof. H. G. GYLLENBERG
Department of Microbiology
University of Helsinki
Helsinki
Dr. M. SARVAS
National Public Health Institute
Helsinki

法国

Prof. G. BERNARDI
Directeur de Recherche
Laboratoire de Génétique Moléculaire
Université Paris VII
Paris
Mr. P. CAZALA
Ministre du Redéploiement Industriel et du Commerce Extérieur
Paris
Dr. N. LELONG
Chef de la Division Biotechnologie—Bioindustrie
Ministère du Redéploiement Industriel et du Commerce Extérieur
Paris
M. P. PRINTZ
Programme Mobilisateur Biotechnologies
Ministère de la Recherche et de la Technologie
Paris

德国

Prof. Dr. W. FROMMER
Bayer AG
Wuppertal
Prof. Dr. M. A. KOCH
Bundesgesundheitsamt
(Federal Health Office)
Berlin
Dr. Peter LANGE
Bundesministerium für Forschung und Technologie,
(Ministry of Research & Technology)

Bonn

希腊

Dr. G. TZOTZOS
Scientific Advisor
Ministry of Research and Technology
Department of Science Policy
Athens

爱尔兰

Prof. S. DOONAN
Professor of Biochemistry
University College
Cork

意大利

Prof. C. FRONTALI (Observer)

(观察员)

Istituto Superiore di Sanità
Laboratorio di Biologia Cellulare
Rome
Prof. V. SGARAMELLA
Dipartimento di Genetica e Microbiologia
University of Pavia
Pavia

日本

Mr. T. FUKUMIZU
Former Deputy Director
Bioindustry Office
Ministry of International Trade & Industry
Tokyo
Dr. H. HARADA
Professor
Institute of Biological Sciences
University of Tsukuba
Sakura-mura, Niihari-gun
Mr. R. HIGASHIUCHI
Deputy Director
Ministry of Health & Welfare
Tokyo
Mr. H. HIRAMATSU
Director

Bioindustry Office
Ministry of International Trade & Industry
Tokyo
Mr. N. INOUE
Counsellor
Ministry of International Trade & Industry
Tokyo
Mr. T. ITO
Deputy Director
Biology and Antibiotics Division
Ministry of Health & Welfare
Tokyo
Dr. T. TAKAHASHI, M. D.
Director, Life Sciences Division
Science and Technology Agency
Tokyo
Dr. K. TANAKA
Chairman of Development Promoting Committee
The Japan Association for Advanced Research of Pharmaceuticals
Tokyo
Mr. M. TANAKA
Former Director
Bioindustry Office
Ministry of International Trade & Industry
Tokyo
Dr. A. OYA
Director, Department of Virology & Rickettsiology
National Institute of Health
Tokyo
Dr. S. TSURU
Secretariat
Council of Agriculture, Forestry & Fisheries
Tokyo
Prof. H. UCHIDA
Advisor
University of Tokyo
Tokyo
Prof. I. WATANABE

Faculty of Hygiene
Kitazato University
Sagarnihala-City

荷兰

Dr. A. W. J. J. BUIJS
Ministry of Housing,
Physical Planning and Environment
Leidschendam

Dr. Van EE
Gist Brocades N. V.
Delft

Prof. Dr. D. G. de HAAN
Laboratory for Microbiology
Rijksuniversiteit te Utrecht
Utrecht

Mr. M. C. KROON, M. C.
Ministry of Housing, Physical Planning
and Environment
Leidschendam

挪威

Dr. W. GUNDERSEN
Associate Professor
Institute of General Genetics
University of Oslo

Oslo
Mr. S. HAGEN
State Pollution Control Authority
Oslo

Mr. B. HAREIDE
Director, M. D. ,
National Institute of Public Health
Oslo

Mr. K. S. NORBRAATHEN
State Pollution Control Authority
Oslo

葡萄牙

Prof. L. ARCHER
Universidade Nova de Lisboa

Instituto Gulbenkian de Ciencia
Oeiras

西班牙

Prof. A. ALBERT
Science Advisor
Direccion General de Política Científica
Madrid

Dr. R. REVILLA PEOREIRA
Ministerio de Industria y Energía
Madrid

瑞典

Dr. G. BRUNIUS
Swedish Recombinant DNA Advisory Committee
National Board of Occupational Safety & Health
Solna

瑞士

Dr. M. KOENZI
Ciba-Geigy AG
Basel

土耳其

Prof. M. BARA
Faculty of Sciences
Istanbul University
Istanbul

英国

Mr. B. P. AGER
Secretary, Advisory Committee on Genetic Manipulation
Health & Safety Executive
London

Mr. W. E. O. JONES
Health & Safety Executive
Medical Division
London

Mrs. M. PRATT
Plant Pathologist
Ministry of Agriculture, Fisheries and Food
Harpenden, Herts

Mr. J. F. A. THOMAS

Department of Environment
London
Mr. J. F. THORLEY
DISTA Products Ltd.
Liverpool

美国

Mr. R. E. BENEDICK
Deputy Assistant Secretary
Environment, Health and Natural Resources
Department of State
Washington, D. C.
Mr. D. CLAY
Director, Office of Toxic Substances
Environmental Protection Agency
Washington, D. C.
Mr. J. COHRSEN
Regulatory Counsel
Office of Science and Technology Policy
Executive Office of the President
Washington, D. C.
Dr. D. L. DULL
Office of Toxic Substances
Environmental Protection Agency
Washington, D. C.
Dr. J. R. FOWLE III
ORD Biotechnology Co-ordinator
Environmental Protection Agency
Washington, D. C.
Mr. I. FULLER
Director
Industrial Competitive Assessment
Office of the U. S. Trade Representative
Executive Office of the President
Washington, D. C.
Dr. W. J. GARTLAND, Jr.
Director
Office of Recombinant DNA Activities
National Institutes of Health

Bethesda, MD

Dr. E. L. KENDRICK

Acting Deputy Assistant Secretary

Department of Agriculture

Washington, D. C.

Dr. M. A. LEVIN

Office of Research and Development

Environmental Protection Agency

Washington, D. C.

Dr. C. MAZZA

Office of Toxic Substances

Environmental Protection Agency

Washington, D. C.

Dr. E. MILEWSKI

Office of Recombinant DNA Activities

National Institutes of Health

Bethesda, MD

Dr. Henry I. MILLER, M. D.

Medical Officer

Food and Drug Administration

Rockville, MD

Mr. M. L. SMITH

Executive Secretary

Biotechnology Group

Office of Policy Development

Executive Office of the President

Washington, D. C.

Mr. R. J. SMITH

Deputy Assistant Secretary

Bureau of Oceans and International Environmental and Scientific Affairs

Department of State

Washington, D. C.

Dr. S. TOLIN

Consulting Scientist

Department of Agriculture

Washington, D. C.

Mr. William J. WALSH, III

Co-ordinator for Biomedical Research & Health Affairs

Department of State
 Washington, D. C.
 Dr. F. E. YOUNG
 Commissioner
 Food & Drug Administration
 Rockville, MD

南斯拉夫

Prof. Vladimir GLISIN
 Institute for Biological Research
 University of Belgrade
 Belgrade

欧盟委员会

Dr. G. Del BINO
 Environment, Consumer Protection & Nuclear Safety Directorate (DGXI)
 Brussels

Mr. M. F. CANTLEY
 Directorate-General for Science, Research & Development (DGXII)
 CUBE (Concertation Unit for Biotechnology in Europe)
 Brussels

Mr. T. GARVEY
 Director
 Internal Market & Industrial Affairs (DGIII)
 Brussels

Mr. C. MANTEGAZZINI
 Consultant to the Environment,
 Consumer Protection & Nuclear Safety (DGXI)
 Brussels

Dr. Ken SARGEANT
 Directorate General for Science, Research & Development (DGXII)
 CUBE (Concertation Unit for Biotechnology in Europe)
 Brussels

Mr. F. SAUER
 Internal Market & Industrial Affairs Directorate (DGUI)
 Pharmaceutical Division
 Brussels

Miss C. WHITEHEAD
 Consultant to the Environment
 Consumer Protection & Nuclear Safety Directorate (DGXI)

Brussels

顾问

Mr. W. ROSKAM

ELF Bio Recherche

Castanet Tolosan.

FRANCE

OECD 秘书处

Miss Bruna Teso

Directorate for Science, Technology & Industry

术 语 表

气溶胶 (Aerosol): 气体中悬浮的液体微粒

等位基因 (Allele): 同一基因的不同形式。例如, 负责眼睛颜色 (蓝色、棕色、绿色等) 的基因为等位基因。

氨基酸 (Amino Acid): 蛋白质的组成单元。氨基酸以特定的次序连接, 决定着不同蛋白质的特征。

抗原 (Antigen): 一种大分子 (通常为蛋白质或碳水化合物), 这种大分子导入到人体或高等动物中时, 会刺激生成能与其发生特异性反应的抗体。

分析试验 (Assay): 测定某一生物反应的技术。

营养缺陷型 (Auxotrophy): 微生物突变体需要的生长因子, 但对应的野生型却不需要。

生物隔离 (Biological Containment): 限制生物在环境中存活和/或繁殖的生物特征。

生物量 (Biomass): 通过光合作用由太阳能转化而来的所有有机物。

生物聚合物 (Biopolymer): 天然存在的大分子, 包括蛋白质、核酸和多糖。

生物合成过程 (Biosynthetic process): 通过活生物体的合成或降解生成化合物的过程。

生物群 (Biota): 某一区域的植物群和动物群。

细胞 (Cell): 由膜包围的活物质团, 是大多数生物的基本结构和功能单位。

细胞培养 (Cell culture): 从多细胞生物中分离出的细胞在体外生长。这些细胞通常为同一种类型。

叶绿体 (Chloroplasts): 光合作用的细胞器。

克隆 (Clone): 遗传上相同的细胞或生物集合, 他们来自于共同的祖先且通过无性繁殖获得; 克隆的所有成员遗传组成相同。

定殖 (Colonisation): 在新领地建立一个种群, 在胃肠道中建立一种新的微生物菌落。

接合 (Conjugation): 细菌间通过细胞接触进行的单向 DNA 转移。

杂交育种 (Cross-breeding): 同一物种的两个品种之间进行杂交。

培养液 (Culture fluid): 生物生长的介质。

脱氨作用 (Deamination): 除去氨基 (NH_2) 基团。

脱卤作用 (Dehalogenation): 除去卤素 (如 Cl_2 、 I_2) 基团。

脱硝作用 (Denitration): 除去硝酸、硝酸盐、硝基、氮氧化物。

DNA: 脱氧核糖核酸; 由脱氧核糖核苷酸组成的多聚体; 除 RNA 病毒以外的所有生物的遗传物质。

供体生物 (Donor organism): 在构建重组 DNA (rDNA) 时, 提供插入到受体或宿主生物中 DNA 片段的生物。

生态系统 (Ecosystem): 自然界中, 群落及其环境所构成的生态单元。

电子传递蛋白 (Electron transfer proteins): 通过一系列氧化还原反应, 在电子 (特别在细胞呼吸中) 从氧化底物依次转移到分子氧的过程中参与的蛋白质。

酶 (Enzyme): 催化某一化学反应的蛋白质。

流行病学 (Epidemiological): 关于生物 (尤其是病原体) 的发生、分布和控制的学科。

真核生物 (Eukaryotic): 构成动植物、原生动物、真菌和藻类结构单元的高度分化的细胞。

发酵 (Fermentation): 一种厌氧的生物过程。通过酵母、霉菌和细菌的作用, 应用于多种工业生产中, 如生产乙醇、酸和奶酪等产品。

絮凝作用 (Flocculation): 悬浮物质因重力作用而凝聚成颗粒, 如见于对废物的“三级”处理。

基因 (Gene): 遗传的基本单位; 由核苷酸有序排列而组成的 DNA 片段。一个基因含有编码某一多肽链 (通过 RNA) 的 DNA 序列。

基因探针 (Gene probe): 在核酸分子中用于检测互补序列的特定 DNA 序列或 RNA 序列。

遗传物质 (Genetic Material): 组成某一生物体遗传物质的 DNA、基因、染色体; 特定病毒中的 RNA。

基因组 (Genome): 某一生物或个体的全部遗传信息。

宿主 (Host): 重组 DNA 构建过程中插入供体 DNA 的生物; 提供重组 DNA 生物的大部分基因组; 即受体。

体外 (的) (In vitro): 从字义上讲, 为在玻璃器皿中; 属于一种发生于人造设备中的生物学反应; 有时包括在细胞培养条件下, 多细胞生物细胞的生长; 体外诊断产品是指从机体中取出样品, 在体外进行疾病诊断的产品。

体内 (的) (In vivo): 从字义上讲, 为在活的有机体内。属于一种发生于活细胞或生物体中的生物学反应; 体内产品是在机体内使用的产品。

昆虫饲养室 (Insectary): 饲养活昆虫的地方。

浸滤 (Leaching): 通过清洗或过滤, 除去固体混合物中的某一可溶性化合物 (如矿石)。

脂多糖 (Lipopolysaccharide): 水溶性脂类-多糖的复合物。

后生动物细胞 (Metazoan Cell): 来源于多细胞生物 (后生动物) 而非单细胞生物 (原生动物) 的细胞。

微生物 (Micro-organism): 显微镜下可见的活体; 微生物可以是病毒、原核生物 (如细菌) 或真核生物 (如真菌)。可用 microbes 指示。

微观系统 (Microcosm): 代表较大系统的一个群落。

显微注射 (Microinjection): 用显微针头穿透细胞膜将极少量物质 (DNA 或 RNA 分子、酶、细胞毒素) 导入到完整细胞中的技术。

线粒体 (Mitochondria): 高等细胞中作为细胞“发电站”、产生化学能的结构。

免疫系统调节剂 (Modulators of the immune system): 与抗原接触后, 致敏淋巴细胞释放的非抗体蛋白, 作为免疫应答的胞间介质。

单克隆抗体 (Monoclonal antibodies): 单一来源或单细胞克隆获得的抗体, 它只能识别一种抗原。

致突变 (Mutagenesis): 诱导某一生物的遗传物质发生突变。研究人员可以应用物理方法或化学方法提高生物的突变能力。

突变 (Mutation): DNA 碱基序列的任何改变, 他使遗传物质发生了改变。

无活力的 (Non-viable): 没有能力存活、生长或发育以及成功发挥功能。

生物 (Organism): 能自我延续并对进化动力作出反应的任何细胞或非细胞的生物实体; 包括植物、动物、真菌、原生生物、原核生物和病毒。

病原体 (Pathogen): 产生疾病的生物体, 通常只限于某一活的生物体, 如细菌或病毒。

致病性 (Pathogenic): 能引起疾病的。

噬菌体 (Phage): 在细菌中繁殖的病毒。

吞噬作用 (Phagocytosis): 细胞 (如白细胞) 吞噬并 (通常) 破坏颗粒物, 一般典型性吞噬外来物质并消耗残骸。

表现型 (Phenotype): 遗传组成与环境相互作用形成的生物特征。

物理隔离 (Physical Containment): 降低或防止活生物体释放的规程或结构; 隔离程度各异。

垂体 (Pituitary): 一个小的椭圆形内分泌器官, 和脑部漏斗相连, 并产生多种内分泌物直接或间接地影响身体的大部分基本功能。

质粒 (Plasmid): 位于染色体之外, 能够自我复制的环形 DNA 片断; 质粒 (及某些病毒) 可用作“载体”, 在细菌“寄主”细胞中克隆 DNA。

多核苷酸 (Polynucleotide): 由连有嘌呤碱或嘧啶碱基的核糖或脱氧核糖与磷酸基团组成的多聚体, 是 DNA 和 RNA 的基本结构单元。

多肽 (Polypeptide): 氨基酸组成的长肽。

种群 (Population): 具有共同特征的一群个体。

原核的 (Prokaryotic): 低度分化的细胞, 他是细菌的结构单元。

原生质体 (Protoplast): 无细胞壁的细胞。

反应物 (Reagent): 参与某一化学反应的物质。

受体生物 (Recipient Organism): 见“宿主 (Host)”。

反转录病毒 (Retrovirus): 一种具有糖蛋白膜和 RNA 基因组 (通过 DNA 中间体进行复制) 的动物病毒。

裂环作用 (Ring cleavage): 一种化合物的分裂, 该化合物中的分子通常由 5~6 个原子组成、以环状 (封闭的链) 排列, 还有已知的更大和更小的环。

扩大规模 (Scale-up): 从试验规模向工业规模的转变。

菌核 (Sclerotia): 能长期保持休眠状态的真菌存活结构。

筛选 (Screening): 根据特定的特征选择生物。

次级代谢产物 (Secondary Metabolite): 生物产生的其生命系统所不需要的代谢物。

选择 (Selection): 根据特定特征选择细胞或生物的一种实验过程。

单细胞蛋白 (Single Cell Protein): 微生物的细胞或蛋白提取物, 用作人或动物的蛋白质的补充剂。

孢子 (Spore): 细菌或真菌细胞的一种休眠形式, 它没有代谢活性, 萌发后可形成营养细胞; 在极端环境条件下可以脱水, 并存活很长时间。

贮藏蛋白基因 (Storage Protein Genes): 植物种子中编码主要蛋白质的基因。

底物 (Substrate): 如酶所作用的物质 (酶作用物)。

共生体 (Symbiont): 通过共生生存的生物; 在大小不同的共生物中通常为较小的一个。

共生的 (Symbiotic): 可以与某一不同生物形成互利的紧密关系而生活。

类毒素 (Toxoid): 去毒的毒素, 但是抗原性没有改变。

转基因动物 (Transgenic animals): 通过显微注射或反转录病毒感染导入另一物种 DNA 的动物。

转座 (Translocation): 在非同源染色体之间发生部分染色体的互换。

载体 (Vector): 进行传递的一种介体。例如, DNA 载体是一种自我复制的 DNA 分子, 可将遗传信息从一个细胞或生物传递到另一个细胞或生物。在细菌克隆中, 质粒 (和一些病毒) 被用作 DNA 的“载体”。

类病毒 (Viroid): 不能编码蛋白质的小型致病性 RNA 分子, 它依赖于宿主的复制机制进行自身复制。

受精卵 (Zygote): 两个成熟的生殖细胞结合而形成的细胞。

生物技术安全性考虑*

经济合作与发展组织

1960 年 12 月 14 日，在巴黎签署了《经济合作与发展组织公约》，该公约于 1961 年 9 月 30 日生效。根据公约第一条的规定，经济合作与发展组织(OECD)应当推动如下政策：

- 促进成员国实现经济快速可持续增长，就业和生活水平提高，同时维护金融稳定，由此促进世界经济的发展；
- 帮助成员国和非成员国在经济发展过程中保持良好的经济增长态势；
- 在多边无歧视的基础上履行促进世界贸易增长的国际职责。

最初的 OECD 成员国有奥地利，比利时，加拿大，丹麦，法国，德国，希腊，冰岛，爱尔兰，意大利，卢森堡，荷兰，挪威，葡萄牙，西班牙，瑞典，瑞士，土耳其，英国和美国。下列国家在如下日期成为成员国：日本（1964 年 4 月 28 日），芬兰（1969 年 1 月 28 日），澳大利亚（1971 年 6 月 7 日）和新西兰（1973 年 5 月 29 日）。欧盟委员会参与了 OECD 的工作（OECD 公约第 13 条）。南斯拉夫在 OECD 中占有特殊的位置（1961 年 10 月 28 日达成协议）。

引 言

本报告是 1986 年出版的《重组 DNA 安全性考虑》(Recombinant DNA Safety Considerations) 的延续，它是生物技术在工业、农业与环境应用的第一个国际性安全指南。OECD 理事会的建议采纳了报告的结论和建议，并指导科学技术政策委员会 (Committee for Scientific and Technological Policy) 在咨询其他相关委员会，并结合成员国对报告的实施和经验进行审查。

在理事会的建议和指导下，成员国一致表示有兴趣做出回应，科学技术政策委员会在 1987 年 2 月 10—11 日举行的第 46 届会议上决定继续审查安全性议题，并授权其下属机构——国家生物技术安全专家组 (Group of National Experts on Safety in Biotechnology) 与环境委员会 (Environment Committee) 共同实施后续项目。

本报告涉及该项目的两个重要问题，这两个问题与成员国生物技术在工业生产和田间

* Originally published by the OECD in English under the title: "Safety considerations for biotechnology 1992" © 1992 OECD. All rights reserved.

试验发展密切联系。也就是说，它详细说明了 1986 年生物技术产品发酵生产的科学准则，即符合“良好大规模工业应用规范（Good Industrial Large-Scale Practice, GILSP）”，并详细解释了性状改良植物和微生物小规模田间试验的“良好开发原则（Good Developmental Principles, GDP）”。

1991 年 11 月 28 日，OCED 理事会同意解除对本报告的限制。

目 录

前言

第 1 部分 良好大规模工业应用规范（GILSP）的准则和原则

背景

- （一）总体考虑
- （二）GILSP 重组 DNA 微生物及细胞培养的准则
- （三）GILSP 生物加工过程中良好职业与环境安全的基本原则

附件 GILSP 重组 DNA 微生物及细胞培养的建议标准

（重组 DNA 安全性考虑，1986，附件 F 的修订版）

第 2 部分 良好开发原则（GDP）：遗传改良植物和微生物小规模田间试验的设计指南

背景

- （一）目的和范围
- （二）引言
- （三）良好开发原则（GDP）：工作假设
- （四）关键安全性因子
 - 1. 生物的特征
 - 2. 试验点的特征
 - 3. 试验条件
- （五）良好开发原则的应用

- 1. 植物试验

- 2. 微生物试验

附件 1 植物小规模田间试验的科学考虑

附件 2 微生物小规模田间试验的科学考虑

参考文献

前 言

多年来，生物技术的安全性是科学技术政策委员会考虑的首要问题。

1983 年，委员会成立了国家专家组（Group of National Experts），以考虑工业、农业与环境应用重组 DNA 生物的安全性。由此，1986 年在《重组 DNA 安全性考虑》的报告中公布了总的指南。

1988年，该报告的后续项目启动，并由科学、技术与工业委员会（Directorate for Science, Technology and Industry）联合 OECD 环境理事会（Environment Directorate of the OECD）共同实施。国家专家组的主要任务是更新并进一步发展 1986 年的安全性考虑。

本报告列出了生物技术大规模工业生产和小规模田间试验的总体原则与准则，其中两个领域受到国家专家组优先考虑。

本报告由两部分组成：

——第 1 部分对于在工业生产中使用低风险的重组 DNA 生物，进一步发展了 GILSP 的准则，并重审了 1986 年报告中确定的基本原则。

——第 2 部分提供了重组 DNA 植物与微生物低风险或基本无风险（小规模）的田间试验设计指南。介绍了试验总体原则或从实验室到生产释放全过程的《良好开发原则（GDP）》。这一过程按阶段（阶段 1，阶段 2，阶段 3）以图表的形式列出。如图表中所示，尽管每一阶段通常会应用多次，但是人们认识到，在一些情况下，在一个阶段就可获得满意的结果。因此，应当理解，在一些情况下根据现有经验和认知，可能不必要由第 1 阶段向第 3 阶段逐步推进。

本报告列出的科学原则应当有助于促进自 1986 年开始的关于生物技术安全应用的科学共识。

国家专家组在审查关于生物技术应用和食品安全的其他议题时一致认为，本报告应当立即公布，以便为成员国不断增长的工业应用和田间试验提供及时的指导。

第 1 部分 良好大规模工业应用规范 （GILSP）的准则和原则

背景

1986 年的 OECD 报告《重组 DNA 的安全性考虑》提出了良好大规模工业应用规范（Good Industrial Large-Scale Practice，GILSP）的概念，应用于工业生产中低风险的重组 DNA 生物。这一概念包括重组 DNA 生物应当满足特定的标准，才能赋予 GILSP 地位。报告声明：GILSP 重组 DNA 生物可以在宿主菌株相同的较低控制与隔离程序下进行大规模操作。GILSP 的主要原则是重组 DNA 生物应该与低风险受体生物一样安全。

1988 年在成员国内部进行的关于 GISP 的概念及原则调查表明，很多国家指南中已经采用了这一概念和原则，其他国家正在考虑实施这一概念和原则。此外，在一些国家，一定物种范围内相当数量的重组 DNA 微生物以及一些重组 DNA 细胞培养也被赋予了 GILSP 地位。

调查确定了：

- 现在在世界各地有大量 GILSP 微生物的事例；
- 实践中，在采用这一概念上，存在一定程度的差异；
- 概念的应用需要一个更好的理解方式，特别是 GILSP 准则的进一步细化。

第 1 部分进一步发展 1986 年报告确定的 GILSP 的准则和原则。它建立在现有知识和 GILSP 生物使用经验的基础上。考虑了调查和图表的结果，部分考虑了成员国所提交的 GILSP 准则应用的 25 个案例。作为 GILSP 的一部分，1986 年报告中的“良好职业安全与卫生的基本原则 (Fundamental Principles of Good Occupational Safety and Hygiene)”已经进行了更新，进一步细化后命名为“良好职业与环境安全基本原则 (Fundamental Principles of Good Occupational and Environmental Safety)”。

第 1 部分的材料旨在帮助成员国识别符合 GILSP 准则的低风险生物，并选择与 GILSP 原则一致的适当规范。预计随着 GILSP 的概念和原则在应用中不断丰富和积累经验，其准则将不断发展。现有资料显示，大范围的生物可大规模、低风险地安全种植。对于不符合 GILSP 准则的低风险生物可根据 (一) 列出的考虑事项在相同条件下进行操作。

(一) 总体考虑

1986 年 OECD 报告的重要一点是可评估重组 DNA 生物相关的危险，并像其他相关生物一样进行管理。预计大规模工业生产中应用的大部分重组 DNA 生物可采用 GILSP 进行管理。

即使不考虑生物本身的安全性，GILSP 生物的零风险也是不现实的。

GILSP 概念的核心是：

- 根据规定的准则对重组生物进行评估，以确定它与低风险宿主生物一样安全；
- 确定和接受规范，以确保操作的安全性。

符合 GILSP 准则的重组 DNA 生物风险较低，因此可在适合相关宿主的条件下进行操作。

因此，GILSP 在现有安全规范的框架下，等同于建立了最低风险生物的国内外定义。应当强调，迄今为止对于 GILSP 的概念，特别是应用，在具体事例中，如何满足 1986 年报告中附录 F 的标准具有很大的灵活性。

GILSP 生物为低风险的生物，在分类中归为最低风险类别。为了确保在每个情况下，重组 DNA 生物可以获得 GILSP 地位，应当全面考虑 (二) 中详细介绍的标准。当生物不致病且对环境无负面影响时，需要遵照 GILSP 规范的其他类型生物，有两个明显例子：

①完全从原核宿主（包括内源质粒和病毒）或从真核宿主（包括其叶绿体、线粒体或质粒——但是不包括病毒）构建；

②来源于不同物种 DNA 片段的 DNA 交换的生理过程已知。

未满足 GILSP 所有准则的生物不是 GILSP 生物。不过，在个案评价后，可能会发现他们是低风险生物。在这种情况下，这些生物可应用 GILSP 进行操作。在将 GILSP 推广到其他生物时，必须评价是否需要 GILSP 之外其他特定的规范作以减轻特定的考虑。

可在最小控制和隔离条件下进行大规模操作的生物是：

- 满足 (二) 中标准的生物；
- 上段第①和第②中所述的其他类型生物；
- 不满足上述准则，但是已经证明为低风险的生物。

对 GILSP 生物和其他低风险生物进行操作时，应当遵循（三）中所述的良好职业与环境安全原则。

（二）GILSP 重组 DNA 微生物及细胞培养的准则

下列准则与微生物相关，并同样适用于细胞培养。在评估一个生物体的 GILSP 地位时，应当将所有准则相互联系起来考虑。

宿主^①

不致病

应当确认宿主的身份并掌握其分类地位。应当对宿主进行评价，以确定它不具有致病性。宿主不应当出现在国内或其他认可的人类致病菌名录上。成员国可能有动植物致病菌的其他名录，在评价宿主是否具有致病菌的潜力时，这是有用的信息来源。如果一个生物或弱菌株的致病潜力仍然不确定，应当建立进一步的数据证实其安全性，从而证实其在 GILSP 条件下操作的适合性。此外，未在致病菌名录上的一些生物可能会产生需要进一步评价的有毒物质^②。

目前在 GILSP 规范中应用的宿主例子如下。应当注意到，在一些情况下，整个物种可以获得 GILSP 宿主地位，另外的情况下，只有一些菌株或类型可以指定：

酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

大肠杆菌 *Escherichia coli* K-12

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*

中国仓鼠卵巢细胞 (CHO cells)

米曲霉 *Aspergillus oryzae*

非外源因子

在培养细胞时，应当检测不到有害微生物，特别是有害病毒和支原体。细菌培养物不应当含有不想要的噬菌体。

延长安全应用的历史

应当有充分的、文献记载的宿主生物安全应用历史，即对人或环境无害。关于宿主的历史和其他数据，其祖先或近缘种可能适合进行评价。

一些证据可以从产品的应用中获得，包括食品、酶和抗生素的生产与释放。在最小隔离条件下的实验室应用和中试规模的发酵可能也可提供有用的数据。

内在的环境限制因子使其适于在工业设施中生长，但限制其在环境中存活并对环境无负面影响

通过限制生物的繁殖、传播或存活可减小产生不良影响的可能性。为实现这一个目标，可应用内部稳定的生物学限制因子，该因子产生不干扰生物在生物反应器中的生长，但是减少了生物在环境中的存活，并可防止对环境产生不良影响。

具有生物学限制因子的生物事例包括：营养缺陷型菌株、不生孢子的菌株，对环境因

① 本文件第 1 部分中，“宿主”一词用于描述受体生物。

② 毒性的概念应当不仅限于致死能力，还应当包括致突变、致癌、神经毒性等。

子（如紫外光）敏感的菌株，等等。

载体/插入序列

特征明确且不是已知有害序列

载体：对于待确定特征的载体而言，应当明确载体遗传元件的功能。

通过参考文献、国立生命科学院（National Institute of Health, NIH）和/或其他名录，载体的来源和构建以及后续构建体的验证资料，可对载体进行鉴定。

载体鉴定应当确认其不含有会对人或环境产生危害的序列，如通过产生毒素或已知的致病和/或定殖相关因子。

插入序列：应当清楚插入 DNA 的来源、功能以及在载体中的位置。实践表明，在很多情况下，这就表示插入 DNA 的核苷酸序列已知。其中包含了解插入序列中是否有一个以上的功能编码。此外，如上文所述，插入序列应当不会产生对人或环境有害的表型。

尽可能将 DNA 限制至发挥预期功能所需的长度；不应当增加构建体在环境中的稳定性（除非是预期功能所需）

应当尽可能限制载体/插入序列的大小，使其达到发挥预期功能所需遗传序列的最小长度。这将减少隐性功能（cryptic functions）导入和表达的可能性，或减少非期望性状的出现。

在一些情况下，载体或插入序列可影响构建体在环境中的稳定性。例如，抗性基因的导入可能会影响受体在环境中的存活能力（见下面的介绍）。

活动性弱

用载体导入插入序列的一个考虑是载体/插入序列从原受体的转移速度。例如，通过删除转移功能，可降低质粒载体的交换率。

也可应用其他方法降低插入 DNA 从受体转移到其他生物的频率，如稳定整合到染色体

不应当将抗性标记转移到已知在自然条件下无法获得该标记的微生物中

为选择目标性状，经常在重组生物中导入对各种物质（如抗生素、重金属）具有抗性的基因。评价特定的抗性基因时，应当考虑如下因素：

——抗性标记是否并且以何种频率从重组生物转移到其他生物（见上文）。

——获得抗性基因是否会影响治疗物质的应用或引起对环境的干扰。应当对商业生产中尚未应用的标记物质（如抗生素）进行评价，以确定该标记是否会表现出交叉反应或连锁抗性（linked resistance）。

——对于特定的标记而言，是否存在选择压力。例如，如果选择物质在环境中的浓度足够高，则携带抗性基因的生物在环境中的选择能力会增强。例如，在饲料中应用抗生素或饲料受重金属等物质污染时，可能会出现这种情况。

重组 DNA 生物

不致病

必要时，应当考虑插入基因的特征和来源。应当根据宿主的特征，检测基因表达产物的类型及功能。例如，如果已知基因表达产物不致病，且宿主不具有致病性，预期重组 DNA 生物不具有致病性。

在工业设施中与宿主生物一样安全或在环境中存活率有限，且对环境无不良影响

这包括对人和环境的安全性。通常地，采用的方法应当考虑宿主的特征，重点是插入基因及其表达产物的特征。应当考虑它们对生物适合度和适应性的影响，包括在生境中的定殖能力。例如，通过应用与野生型菌株相比在环境中存活率有限的重组 DNA 生物，可避免不良影响。在一些情况下，有必要产生和/或收集重组 DNA 生物特性的数据，例如，检测环境中的释放。

（三）GILSP 生物加工过程中良好职业与环境安全的基本原则

核心目标是确定合适的、良好且审慎的规范来操作（一）所述的 GILSP 生物或其他低风险生物。这些规范应当基于职业卫生与环境管理的良好原则之上，必要时应当建立在物理控制的应用之上。

工业用的重组 DNA 及其他生物在实验室开发过程通常应遵守良好规范、指南或政府相关法规。这些生物的实验室应用经验是在决定大规模生产规范的重要考虑因素。

下列良好职业与环境安全的基本原则，应当应用于 GILSP 以及各水平的隔离。这些原则表示的是最终结果，而非特定的技术方法。

①物理、化学或生物因子（包括细胞产物和残体）在生产场所及环境的暴露量保持在适于该生物、产品和程序特征的水平；

②在源头应用工程控制措施，必要时穿戴合适的防护衣和防护设备；

③充分测试和维护控制措施与控制设备。检查和测试的频率取决于改良生物、产品及加工过程的特征；

④适合时，在加工设备以外的地方包括车间及环境，检测是否存在存活生物体；

⑤确保工作人员进行充分的培训并具有足够的经验；

⑥必要时，建立生物安全委员并向工人代表或行政管理部门咨询；

⑦在车间建立并实施工作人员安全规范和环境保护规范^①。

附件 GILSP 重组 DNA 微生物及细胞培养的建议标准

（重组 DNA 安全性考虑，1986，附件 F 的修订版）

受体生物	载体/插入序列	r-DNA 生物
不致病	特征明确且不具有已知的有害序列	不致病
非外源因子	尽可能限制序列大小至执行预期功能所需的最小长度；不应当增加构建体在环境中的稳定性（除非是预期功能所需）	在工业设施中与受体生物一样安全；在环境中存活率有限且不产生不良后果
有长期安全应用的历史；或	动用性应当较差	
自身限制因子使其适于在工业设施中生长，但限制其在环境中存活且无不良的环境影响	不应当将抗性标记转移到在自然条件下不会获得该标记的微生物中	

^① 内容可包括，但是不仅限于：禁止在车间吃、喝、抽烟、吸食、化妆；人员的培训和监管；处理生物废物和其他废物；辅助人员和维护人员指南；生物加工及相关设备的操作；医学或健康的监督；意外事故的响应程序。

第 2 部分 良好开发原则（GDP）：遗传改良植物和微生物小规模田间试验的设计指南

背景

1986 年的 OECD 报告《重组 DNA 安全性考虑》认为“环境或农业用生物的潜在风险评估比工业用生物发展慢”。“通过农业与环境中的常规改良生物应用获得的现有基础数据进行类推，可获得重组 DNA 生物的评价方法”。1986 年的报告也表示，由于在研发过程中采取“逐步”评价，应当可将重组 DNA 生物对环境的潜在风险降至最小。

本领域的建议是：“现在已有活生物体对环境和人体健康影响的大量数据，该数据应当用于指导安全评价”，并且“应当鼓励提高重组 DNA 生物应用影响的预测、评估和监测研究”。1986 年认为，研制该应用的国际通用指南还不成熟；建议“在应用前，应按照个案分析原则对潜在风险进行审查”。个案分析（Case-by-case）指按照特定案例 2 有关评估准则，对案例进行逐项审查，这并不说明每一案例均需要国家机构或其他机构的审查，有些类型的案例可以排除在外。

1988 年 4 月，OECD 生物技术安全国家专家组召开会议，考虑实施 1986 年报告后续项目的必要性。专家组确定，项目的部分内容是建立总原则，该原则将确定一个遗传方法对低风险或几乎无风险的小规模田间试验进行安全评估。总原则即良好开发原则（Good Developmental Principles，GDP）建立后，各国继续应用 1986 年报告中的个案分析方法。

在会议上，专家们一致认为：良好开发原则应同样应用于农业与其他类型的环境试验（如矿物质浸出或废物降解），并且通过一个文件可以恰当地描述这些类型应用的原则。

鉴于该议题的重要性、复杂性。并且受到广泛关注，本部分的早期版本于 1990 年 3 月公布，供公众讨论和评议。

目前的版本是在对所收到的意见进行审查和评价后产生的，包括环保人士、工业界、贸易联盟、公众以及一般政策制定人员。

（一）目的和范围

第 2 部分介绍了转基因植物和微生物小规模田间试验的科学设计原则。良好开发原则将作为实施低风险或几乎无风险的小规模田间试验（包括基础研究和应用研究）的科学指南。本报告不会对植物和微生物田间试验的任何管理行为回避或产生偏见。这些原则允许国家采取灵活的方法来设计和执行小规模田间试验。

还需要说明的是植物、自由活动的微生物以及植物促生微生物。未来可能将良好开发原则扩展到其他生物包括动物疫苗。

(二) 引言

通常，环境中应用的转基因生物^①开发包括从实验室、温室检测到引入环境的整个过程。这些阶段如下图所示。在研究与开发过程中，应于释放前，在适合的设施中进行控制条件下试验。每一阶段可进行多次，例如构建具有较好田间表现型的生物，或积累其他数据。在一些情况下，一个阶段就可获得满意的结果。

对于图中在实验室/温室中进行的第一阶段研究的实施，目前已经在国内和国际上建立了良好规范或指南。主要强调人体健康和工作人员的安全。

不过，对于基础研究阶段和应用研究阶段（第2阶段）的小规模田间试验，类似的环境安全规范和原则还没有编制。

本部分列出了第2阶段中小规模田间试验设计的总原则。1986年OECD出版的《重组DNA安全性考虑》附件中列出了转基因生物田间试验评价的考虑因素。随后介绍了这些考虑因素如何应用于低风险或几乎无风险田间试验的设计。

良好开发原则应当通过生物筛选指南、研究地点选择以及试验条件的设计，确保转基因生物小规模田间试验的安全性。它应当有助于小规模田间试验的审查，反过来试验结果应当可以预测大规模田间试验的安全性，并作为逐步分析的一部分。附件1和附件2分别讨论了试验条件与植物和微生物特征的相互作用。

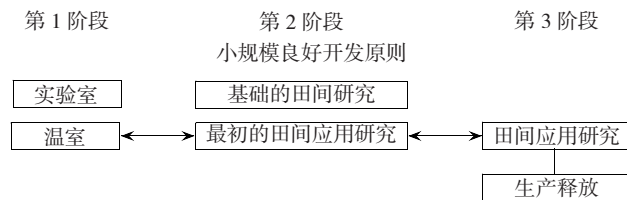


图1 田间试验中的良好开发原则

(三) 良好开发原则 (GDP): 工作假设

良好开发原则的如下假设是确定一系列总的试验原则，在这些原则下对特定转基因生物进行低风险或几乎不具有风险的小^②规模田间试验。

第一个假设：确定某一试验为低风险或风险可忽略时，与生物相关的特定科学原则的重要性随着研究地点、试验条件的变化而改变。

第二个假设：一个试验的风险可通过相关因子及其在试验条件下的相互作用（包括温室和实验室研究的数据）评价而得出结论。

第三个假设：小规模田间试验中相关因子的相互作用比大规模田间试验易于确定，因

^① 这里的“转基因生物 (Genetically modified organism)”一词指的是广义的转基因生物。其范围可能随着时间的推移因科学技术的进步而发展，可能在国家与国家之间、机构与机构之间存在不同，取决于所涉及的不同责任与目的。

^② 就本部分而言，“小 (small)”指的是实现试验目标并遵守良好开发原则所需的最小面积。

为小规模试验的范围有限，可进行更为细致的监管，通常更容易评价和分析，并且对于不可预见的破坏性事件可能采取更为有效的隔离措施。

对于确定特定试验安全性的关键因子方面，也作出了大量假设。

（四）关键安全性因子

确定特定试验的安全性时，关键因子包括：

- 生物的特征，包括导入的基因/遗传物质；
- 研究地点的特征及其周围环境的特征；
- 合适的试验条件。

1. 生物的特征

某些特定生物具有一些特征，使这些生物在广泛的应用条件下被认为具有低风险或可忽略风险。另外一些具有已知不利影响的生物可以进行田间试验，如果通过缓解措施和/或生物及遗传物质的隔离措施可将试验限制在研究地点；从而减少其不利影响。不过，应当认识到，高等植物比大多数微生物更易于实现缓解（mitigation）和隔离。

2. 试验点的特征

选择试验点不仅要满足低风险或可忽略风险的田间试验设计，还要实现研究的目标。“地点”包括合适的研究小区以及合适的周围环境。

通过选择试验点可增加研究的安全性，当该地点具有相关研究的长期历史，并且试验点之外未观察到生物的传播和定殖。

在小规模田间试验阶段，由于环境通常比其他阶段更为局限，因此调查人员应当从安全性角度选择最合适的试验点，例如：

- 与特定地理位置（如水位高、田间流失严重等）安全性相关的重要生态和环境考虑；
- 气候条件；
- 面积，如物理区域；
- 与可能受到影响的特定生物群相邻的合适的地理位置。

3. 试验条件

科学上认可且环境中可行的田间试验需要精心的试验设计，如设定一个假设并建立试验目标；建立生物引入、监测及消除的特定方法；试验设计的精确描述，包括种植密度和处理模式；特定试验数据的描述，以及显著性检验的统计分析方法。

低风险或风险可忽略的小规模田间试验设计包括：在可能受影响的相邻生物区选择合适的地理位置；试验点的特征描述，包括试验点的大小和准备、气候特征等；引入方法的设计，包括应用数量和频率；试验点准备和栽培方法的选择；隔离措施、污染去除、监测和清除等方法的原则；试验处理的设计，建立合适的安全应用操作程序以及在需要建立提前终止试验的应急计划。

在考虑特定生物、性状或环境（如水生环境）时，可能需要其他预防措施。

在建立植物和微生物小规模田间试验方法和规范的过程中，设计和实施人员应当认真考虑如下事项：

- ①改良生物的数量保持在适合试验的最低水平；
- ②采取措施限制生物向试验点以外的地方扩散和定殖，必要时补充这些措施；
- ③在试验过程中和试验终止时，充分监管试验点内的生物。并在合适和必要时，在试验过程中、试验终止时或试验完成后，准备采取控制措施或去除措施，以避免对环境产生非预期不良影响。
- ④检测是否存在已定殖的生物，或合适时，检测外源基因是否转移到试验点之外。
- ⑤合适和必要时采取控制或清除措施，以避免对试验点之外的环境产生不良影响；
- ⑥建立试验终止和废物处理的程序；
- ⑦为参与研究的所有工作人员提供合适的安全保护措施和教育培训；
- ⑧保留试验结果和试验记录。

（五）良好开发原则的应用

1. 植物试验^①

植物小规模田间试验的安全性可通过分析生物和试验点的特征，以及设计合适的、科学和环境上认可的试验条件来确定。下面对于植物良好开发原则的讨论包括生物特征的描述，以及试验点和试验条件的慎重选择。

最可能进行测试的植物是驯化品种。很多情况下，这些植物在生殖隔离、预防扩散等方面已经有了充分的经验。大多数驯化作物不可能在非栽培环境下定殖或生存。

需要考虑的植物特征包括：

——繁殖潜力的生物学，如花、授粉和种子的特征，以及在与试验点相当的环境中可以控制传播和定殖等繁殖特性的长期历史；

——作用方式、定殖以及新获得有毒物质的降解；

——将 DNA 转移到植物时所用生物学载体的特征；

——与其他物种和/或生物系统之间的相互作用。

良好开发原则应当有利于田间试验的设计和实施，以便：①转基因植物与试验点之外的性亲和植物保持繁殖隔离；并且②基因或转基因生物不会释放到试验点以外的环境中；或③即使不进行繁殖隔离，所用的植物也不会产生非预期、无法控制的不良影响。

良好开发原则可通过以下方式应用：

(1) 试验自身可控制繁殖：

——试验限制因素或内在生物学限制因素使植物无法进行繁殖；或

(2) 试验限制了对环境产生危害（或产生显著影响）的可能性：

——植物在试验点以外的地方存活、扩散或定殖的可能性很小；

以及

——植物获得或增加对人工生态系统或自然生态系统产生有害影响的有毒物质的可能性很低。

以及/或

^① 建立的原则适用于裸子植物和被子植物。其他植物（包括腐生真菌）的原则尚未建立。

——可能给植物带来损伤、病害或危害的转化载体已经去除了风险因子和/或从植物中去除了。

附件 1 详细地讨论了试验条件与植物特征的相互作用。本部分的科学考虑是通过植物新品种田间试验取得的经验，这些植物新品种是通过常规育种或新的育种技术获得的。

2. 微生物试验^①

微生物小规模田间试验的安全性可通过分析生物和试验点的特征，以及设计合适的、在科学和环境上认可的试验条件而确定。

与植物不同，微生物测试通常采用大规模的群体，其中部分群体可以长期存在。群体中单个生物通常不能保持遗传上的独立，例如在微生物中通常不能排除基因水平转移的可能性。因此，对于微生物一定要考虑它在某一群体/环境中发生某一事件的统计学概率。

需要考虑的微生物特征包括：

隔离措施

- 扩散、存活和增殖；
- 与其他物种和/或生物系统的相互作用；
- 基因转移的潜力；
- 作用方式、定殖以及新获得有毒物质的降解。

良好开发原则应当有利于田间试验的设计和实施，以便：①遗传物质的转移得到控制；以及②含该遗传物质的微生物的传播^②得到控制；或③即使出现基因转移和传播，也不会对其他生物产生非预期、无法控制的不良效应。

良好开发原则可通过以下方式应用：

(1) 试验可控制遗传物质转移和传播到试验点以外的地方：

——生物学特性可将基因水平转移的概率降至最小或采取措施防止基因水平转移或其降至最小；

以及

——生存竞争能力有限；

以及

——采取措施将试验点的微生物的移动或扩散降至最小；

或

——必要时，采取措施防止或减少在试验点以外环境中的定殖。

(2) 试验限制了对试验点以外其他区域产生危害（或产生显著影响）的可能性：

——已有的资料和经验（如生物特征，包括导入的基因/遗传物质，环境条件，以及在 1986 年 OECD 报告《重组 DNA 的安全性考虑》的框架范围内所进行的隔离试验和田间试验结果）表明，即使生物从试验点扩散也不应当对试验点以外的区域产生不良的环境效应。

① 所建立原则的适用微生物，包括：病毒、细菌、藻类、原生动物和真菌。

② 传播（dissemination）包括在试验点以外的地方发生的“移动/扩散（movement/dispersal）”和“定殖（establishment）”等概念。

并且

必要时，应当设计试验检测对其他生物的影响（如动植物健康、微生物群体、生态系统过程、其他生物系统），而且必要时控制或减轻这类影响的效应。

因此，微生物扩散到环境的能力、遗传物质转移到其他生物的能力以及在试验点附近取得合适的生境/生态位的能力将是安全评价的重要因素。附件 2 详细地讨论了试验条件与微生物特征的相互作用。

附件 1 植物小规模田间试验的科学考虑

下文描述了转基因植物田间试验良好开发原则的科学考虑。田间试验小区的面积很大程度上取决于试验植物的特性（如园林作物需要的试验小区面积较大，而粮食作物应用较小的试验小区就可进行充分评价）。尽管选择性植物育种已经在美国实施了很多年，但是直到 1900 年 Gregor Mendel 的工作被重新发现后，育种人员采取的系统育种才被广泛应用。根据植物遗传学、形态学、繁殖生物学以及生理学的资料，科学家通过观察建立了植物育种人员的操作规范，以确保其试验材料遗传信息的完整性。上述经验以及从转基因植物控制条件下的田间试验所获得的经验有助于鉴定植物的特征和试验条件，从而安全地开展小规模田间试验。

转基因植物的小规模田间试验在概念上与植物育种人员进行新品种有用性评估时所用的小规模田间试验类似。用常规育种技术进行植物的遗传改良，一般通过以下方式引发单个基因或多个基因突变或染色体数目改变：化学处理或离子辐射；栽培种间的杂交；种间杂交，包括栽培种之间的杂交以及栽培种与近缘非栽培种之间的杂交。进行常规育种研究时，经常注意的是防止基因从性亲和的植物流入试验小区。迄今为止，还没有出现遗传物质在自然情况下从植物向植物以外的其他生物转移的现象。

传统的小规模田间试验用于评价植物新品种的特征及其与环境的相互作用。通过常规育种方法获得植物新品种的田间试验表明，育种试验中的大多数植物新品种对育种人员没有实际用途，因而被筛选汰除掉，其对环境或后续植物育种没有进一步的影响。育种产生的新品系只有极小部分需要进行进一步研究或最终商业化释放。不过，这并不表示新品系在竞争能力上不适合于各种生态环境。

一些案例表明，外源物种有意或无意引入到新的环境中已经对环境产生了不良影响。案例包括：19 世纪 30 年代作为牧草引入到美国卡罗莱纳州南部的假高粱 *Sorghum halepense*，作为水生观赏植物引入到美国佛罗里达州的水葫芦 *Eichhornia crassipes*，用于稳定土壤堤坝以及作为不毛地的牧草引入的野葛 *Pueraria lobata*。现存于美国的很多重要杂草（加拿大蓟、黄矢车菊、田旋花）都是无意中引入外来植物的结果。在欧洲，外来植物的有意或无意引入也出现了类似的问题。如向日葵 *Helianthus annuus*、豚草 *Ambrosia artemisiifolia* 和大叶牛防风草 *Heracleum mantagazzianum*，其中大叶牛防风草可引起人体出现严重的皮炎。上述例子都是完整基因组不受控制地释放，而不是植物一个或多个基因的受控制地转移，在控制条件下转移一个或多个基因是目前转基因生物出现的情况。因此，在良好开发原则下进行的转基因植物田间试验应当不同于外源植物不受控制地引入到新环境中，但是从这类引入获得的经验可提供相关信息。

转基因植物的生殖隔离

常规植物育种试验除了限制小区的面积外，还在研究中应用生殖隔离植物。转基因植物生殖隔离是防止遗传物质从试验植物扩散到相同或近缘物种的有效方法。

在物种的进化过程中，考虑植物生殖隔离或遗传隔离的天然机制时，Stebbins (1950) 重点强调了“合子形成前”的特征（发生在交配前），原因是它们可通过对试验植物及其引入环境的操作而得到控制。用这种方式操作得到的植物不能产生和/或传播可进入到物种基因库中的遗传物质（通过花粉、种子等）。

目前植物育种人员和种子生产商采用严格的生殖隔离措施，以生产遗传上的纯种。在生产实践中，重点是防止含有外来遗传物质（通过花粉种子等）的试验植物或育种植物的污染，以保持试验种群或育种种群在遗传上的纯度。尽管保持育种品系遗传纯度的措施与田间试验所用的措施不同（田间试验的重点是控制试验植物的遗传物质从小区扩散），但是两者采用的生殖隔离的原理是相同的。这一原理可成功用于减少遗传物质从试验小区扩散的可能性。

植物育种人员和种子生产商的实践为转基因植物田间试验的生殖隔离提供了有用的模式。这些实践确定了生殖隔离植物种群所用的空间隔离、机械隔离、时间隔离和遗传隔离。大多数情况下，如果在田间试验中转基因植物与试验点以外的性亲和植物保持了生殖隔离，良好开发原则的目标就得以实现。应用良好开发原则对转基因植物进行小规模田间试验，可保证对环境不产生不良影响。

为了确定适于生殖隔离的试验类型，并提供一些指南，下段中列举了例子。在审查生殖隔离措施的例子时，应当考虑在每一案例中的特定措施是如何补偿植物或田间试验环境的特征的。该措施的最终结果是试验所用的转基因植物在生殖上隔离。

如下是目前用于保持植物试验生殖隔离的例子：

——植物与性亲和种群隔离的最常用方法是空间隔离。对于原种或品种的最重要要求是试验田与含有同一物种的大田在相隔距离上的一些规定。隔离距离取决于试验物种的生物学特征。花粉易碎的自花授粉植物隔离距离相对较短，而一些花粉坚硬的异化授粉植物在与亲和植物隔离几英里远时，还会受到一定程度的污染。

——对一些植物来说，除去雄性或雌性繁殖结构可以使植物安全种植于与亲和植物相近的区域。应用该方法的一个例子是，在玉米种子生产中进行机械去雄。通过除去雄穗（含有花粉的雄花）的方式，可以完全去除通过花粉转移来的遗传物质。

——以上讨论的各种技术包括了将细胞质雄性不育性状导入到植物中。如果植物具有这一性状，将无法产生有活性的花粉，植株真正保持繁殖和生物学隔离。

——种植试验植物时，让其开花时间比邻近的亲和本作物和/或野生植物预期的开花日期提前或推迟。这一时间上的繁殖隔离在限制遗传物质活动上与空间隔离同样有效。

——通过物理方式 [如在开花期前将花套袋] 防止花粉传播。

——如果田间试验的目标不要求产生种子，如评价紫花苜蓿的产草量时，可在开花前收获植物。在这种情况下，能够对因某种原因难以隔离的作物实现繁殖隔离。

对于大多数小规模田间试验而言，尽管繁殖隔离是安全性方面主要考虑的问题，但是也有一些例子，需要采用其他方法确保繁殖隔离，同时需要考虑其他的因素。例如，进行田间试验的植物可能经过修饰而含有或表达毒素，或含有可转移遗传物质的生物载体。下

面两个小节总结了植物含有毒素或生物载体的情况下，田间试验可能面临问题的特征，并提供了这类田间试验的评价因素。

经过遗传修饰含有或表达毒素的植物

很多植物含有有毒化合物。其中有些有毒化合物可防御病原菌和捕食者。遗传修饰技术可增强或减弱植物的防御机制，或使植物获得新的防御成分。理想的做法可能是开发含有有毒物质的植物品种或使植物本身具有的有毒物质的表达量远高于天然水平。很多情况下，对表达毒素的植物进行的田间试验是安全的，原因是已经对某一毒素的引入、其作用方式、对靶标和非靶标生物的影响，以及编码毒素的一个或多个基因整合到植物中的技术都有了充分的了解。

在对含有毒素的转基因植物进行小规模田间试验时，即使将植物遗传物质限定在试验点也可能产生环境风险，因为这些植物可能会影响进入该试验点的生物（如生物遇到通常在其生物圈/生态位中不会遇到的毒素）。即使在植物本身从试验点清除之后，仍然会对接触这些植物或其产物的非靶标生物产生一些残存的、非预期影响。经遗传修饰后，植物含有一些有毒化合物或某些天然有毒化合物表达量更高，对这些植物安全地进行试验是可能的。但应当对如下问题充分了解，如毒素的作用方式、活性和降解，以便限制毒素对试验点中靶标生物的影响。其他的预防措施，简单的如篱笆围栏，复杂的如在隔离地点设置试验小区，将田间试验的植物隔离起来、或根据田间试验中植物的产物采用严格的措施。

通过应用生物载体系统改良的植物

可用各种物理、化学和生物学方法将新的遗传物质转化进植物体中。这些方法技术包括电穿孔、微注射、微粒子轰击（ballistic microprojectiles）、生物或分子载体。前3项技术是机械方法，遗传物质在任何时间意外转移对概率不会比最初插入时提高。不过，除非载体不具有生物学活性和/或从转化植株上去除，否则载体有可能充当传染源。

如果在初始转化后，载体系统不能转移遗传物质，则通过生物载体获得转基因植物的小规模田间试验的安全性增加。如果载体具有植物害虫风险（如损伤、感病或危害的风险），则应当充分消除这些风险。在大多数情况下，转化完成之后，应当从植物中去除载体或使其失活。转基因植物研发时应用的DNA应当是：①特征明确，且转入植物后不可能转移（土壤根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 去除危害因子的Ti质粒符合这一特点）；以及②来自相同或近缘物种（作为受体植物）；以及/或③来自非致病性原核生物或非致病性低等真核植物；以及/或④来自植物病原菌，但对植物产生病害或危害的序列应被去除。

目前，植物细胞的DNA转化中应用最广泛的载体系统是土壤农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens*，通常指Ti质粒 *Agrobacterium tumefaciens*。大量的实验室和温室试验表明这一载体系统是安全的。迄今为止，对转基因植物进行的大多数田间试验中，已经去除了该载体系统中与病原菌感染相关的基因。此外，进行转化时，除了边界序列外，在转化植株中不存在致病性相关的载体序列，并且载体和细菌不会存活。这样，就排除了可能由载体导致的遗传物质从转基因植物转移的情况（见第五节）。

附件2 微生物小规模田间试验的科学考虑

本文介绍了转基因微生物田间试验良好开发原则（GDP）的科学考虑。小规模田间

试验存在一种情况，即所研究的问题受到试验区面积相对较小的限制。与大规模试验或使用、或不受限制的应用相反，这类研究通常只在一个或几个地理位置出现。生物防治（作为控制农业害虫的一种方法）的研究结果表明，微生物的引入规模和频率将是决定其是否定殖以及对环境会产生影响的重要因素。

在小规模田间试验中，受到潜在影响的环境通常是局部的，因此易于确定重要的生态/环境考虑因素，这些因素是安全试验设计应当考虑的。此外，由于试验的面积小，因此可以有效应用试验生物隔离程序和试验设计。

在环境中的应用

在评价田间试验的安全性时，生物的应用方法和接种量是重要的考虑因素。“试验地点的位置和特征以及规模对于安全性评价具有重要作用（OECD，1986）”。

在小规模田间试验中，微生物通常作为土壤改良剂、叶面喷施剂、种子处理剂或植物维管组织的接种体而应用。尽管通过其他方法也可将生物导入进来，大多数情况下，有关安全性考虑的评价程序是相似的。因此，科学原则的讨论重点在于最常应用的少数几个。

通过气溶胶的方式，微生物预期会从试验小区进行更大规模的扩散。因此，设置相对较大的边界区（土地的缓冲带）可能是叶面喷施试验的部分内容。另外，通过滴施和滴灌而非喷施和喷灌可将气雾的形成降至最少。

在环境中的传播，包括存活和增殖

“生物在应用环境中的存活增殖以及扩散到新的环境中的相对能力是环境释放安全评价的一个重要考虑因素（OECD，1986）”。

为研发田间试验设计，本文对下述考虑因素进行了讨论。讨论中大部分数据形成的原则源于一些微生物的研究。关于腐生生物（与植物病原菌如土壤根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 相互作用的除外）扩散的信息较少。

研究表明，传播取决于3个因素：①接种（面积、适合度、传染性、存活能力）；②种群的运动^①/扩散^②属性；③是否有合适的生境或生态位。“传播（dissemination）”包括“运动/扩散（movement/dispersal）”和“定殖（establishment）”等概念。“定殖（establishment）”又包括“存活”、“繁殖”，以及“运动/扩散（movement/dispersal）”。

评价田间试验时，不可能完全将“扩散”与“定殖”的概念分开。相反，这些概念应当同时考虑。例如，如果生物不会定殖，则可较少地关注从试验小区进行的扩散，控制扩散的方法将不是太重要。另一方面，如果从试验小区发生的扩散少，则由于试验生物的特征或由于已经采用了控制运动/扩散的方法，定殖的概率会相对较低。

接种体

试验微生物的存活取决于很多因素。在这儿不可能对环境中影响微生物生长速度的所有因素都进行介绍。不过，可根据现有知识和以下途径得到的观察结果，对其可能的行为进行一些预测：温室测试、微环境测试、对近源生物行为的了解 [如亲本生物和导入性状的预期功能（如果试验生物为转基因生物）]。

① “活动”指的是可能涉及行为选择的主动过程，如与昆虫载体的关系。

② “扩散”指的是一个被动过程，如雨水飞溅。

在试验地点中接种体应当含有足量的微生物,以便在其他地点的有效扩散的最低水平。此外,在微生物离开试验点时,接种体可能会出现一些稀释。随着微生物从试验点进一步移动而未遇到合适的生境,稀释的可能性会增加。该假设得到了植物病理学研究的支持,研究表明传播与源-库的大小成比例(本讨论中,源-库与试验地点中测试菌株的数量等同)。

应当指出,最低有效接种量因不同生物而存在很大差异,因此,没有一个标准的生物体数量可作为最低有效接种量的参考。应当考虑,通过载体或机械运输进行的扩散可能会降低最低有效接种量的负荷。因此,对于一些生物而言,少量个体就是有效的接种体,而对于其他生物而言,则需要十分大的数量。在一些情况下,例如,只有引入大的种群才可以克服竞争或其他压力(如捕食作用)。因此,最低有效接种量应当根据不同情况按照个案分析原则确定。

不过,减少微生物流出试验地点数量的措施,将降低最低有效接种所需的个体到达其他地点的概率。对于小规模田间试验而言,可采用该类措施进行试验设计。

运动、扩散和生输

传播速度对运动/扩散的效率十分敏感。通常来说,运动/扩散越有效,传播就越快。

运动/扩散的有效性通常取决于以下几个因素。包括:在特定运输机制下(包括吸附到土壤或其他粒子上的能力)的运动和扩散模式;感染载体的能力;黏附于物理运输载体上的能力(如动物、人和其他媒介);运输后存活的能力。这些因素取决于试验生物的生物学特征。因此,在评价田间试验的安全性时,应考虑试验微生物的生物学特征。

某些微生物可同时通过几种方式扩散,其他微生物可能仅通过其中一种或几种方式扩散。通常来说,通过某种方式运动的微生物,其适应性越强,通过其他方式运动的可能性就越小。理解运动/扩散的可能的几种方式以及了解和运用这些方式中限制运动/扩散的方法,有利于设计安全的田间试验,以及预测有无必要进行监控。

微生物通过如下所述的几种方式进行运输:①风;②水;③物理方法(如人和动物);④生物载体。

(1) 风

气流扩散的有效性受以下几个因素的影响。包括:进入大气的途径(起飞)、粒子的形状、环境胁迫(如干燥、紫外光)下的存活能力、吸附于土壤和其他粒子上的能力。某些微生物能够适应,并可通过气流扩散。

这些适应是多样化的,从被动过程(如在重力下花粉散出)到远距离推进。某些微生物可通过被动方式进行气流扩散,如一些吸附到土壤粒子上的微生物。当地面因太阳辐射温度升高时,土壤团块(Rafts)或粉尘粒子增加,土壤经风吹后,吸附到这些土壤粒子上的微生物即被运输。一些吸附在昆虫或螨类上的微生物也可通过风流扩散。

田间小区位置的选择可解决或限制通过气流进行的运输。例如,考虑试验点的位置,从而利用地形的天然特征(如树木、山、防风林或篱笆)影响风流。如果试验微生物可通过气流方式扩散,则应将小规模田间试验小区安排在位于近海处的岛屿上可能会比较安全。

(2) 水

在水中,扩散主要受悬浮介质的运输性质影响,因此,地表和地下水流的水文学、与

开放水体（如湖、河、溪流）的接近情况以及灌溉水的供应是决定从陆地试验小区进行水传扩散的主要物理因素。

雨水或灌溉水也可作为运输载体。细菌、病毒和孢子、麦角菌硬粒、真菌的菌丝体片断可通过雨水或灌溉水扩散在这个过程中雨水或灌溉水冲刷植物的表面，或在土壤表层或内部流过。

溅出的雨可能会将雨滴从植物表面溅向空气中，这些雨滴可载有微生物。如果撞在植物表面的水滴上含有微生物，则溅出的雨点可引起扩散，例如，通过雨水可使某些植物病原细菌扩散数千米。

可通过对试验小区进行合理设计来解决或限制由以上方式进行的扩散。例如，在试验点周围设置边界地带将试验小区中的植物隔离，从而阻止溅出的雨滴中所含的微生物在靠近试验小区的地方遇到合适的生境。另外在试验小区中加以一些独特设计，如避免使用顶灌系统或将合适的净化系统引入到排水瓦管中。

此外，选择试验小区的位置以限制试验微生物在正常或异常的气候条件下进入地下水或开放水体，通过排水、收集和物理屏障从而控制水流。

（3）机械方法

人类活动：人类可通过多种方式使微生物得以短距离或长距离扩散：通过对植物进行连续处理、通过使用受污染的工具和其他设备、通过运输受污染的土壤、植物、种子和苗木。

机械干扰（如耕作）会将含有微生物的土块抛向空中（raft），然后在试验小区的顺风向落下。同样的，产生气雾剂的活动也可能使气溶胶液滴中所含的微生物进行扩散。

在小规模田间试验中，应加以小心，以限制微生物通过人类活动进行扩散。例如，只有在限制扩散适用程序方面进行过培训的人员才能进入试验小区。其中，可以多种方式对机械干扰进行限制，如通过作物（如免耕品种）或程序的选择。最后，通过应用合适的净化程序，可限制污染材料上的微生物的运输。

动物：在自然界，大量的动物会接触微生物，并充当微生物的载体。例如，通过哺乳动物的放牧和掘洞、土壤节肢动物、蚯蚓以及吸附在鸭子脚掌上的土块，可使细菌得到运输。

在小规模田间试验中，可采取适当的措施以限制动物进入试验区。例如，筛选试验点和围篱笆。为保证有效性，有必要对这类物理屏障进行维护和持续的监控。

其他：昆虫可通过原子导电（phoretically）运输微生物。它们的身体可涂有细菌或粘附有真菌孢子。由于昆虫可在植物中活动，因此可将其身体表面的微生物从一株植物携带到另一株植物。然后，微生物会落在植物表面或昆虫取食时给植物造成的伤口上。损伤通常可使微生物更容易定殖。

此外还有其他被动扩散途径。例如，入侵花和花蕾的微生物可通过植物花粉进行扩散。由于真菌和细菌与植物表面密切相关，因此可能出现通过细菌而引起的真菌传播所造成的污染，这也是细菌被动气流扩散的一个方式。

通常在对田间测试进行试验设计时，应考虑到这些类型的载体。正如在有关植物的小节中所提到，目前已经积累了很多应对花粉产生和扩散的方法。

(4) 生物载体

在昆虫取食过程中或昆虫从一株植物向另一株植物移动时，微生物可通过昆虫而传播。从一定程度讲，昆虫载体和微生物建立了特定的关系。载体将微生物从一个地方运往另一个地方，并在其可定殖时有效落下来（通常通过植株的伤口）。尽管也有一些例外的例子，但是一般地，载体/微生物的适应性和相互作用的特异性越强，则微生物通过其他载体移动的可能性越小。

载体与微生物之间的关系可以是持久的（循环的和可传播的）也可以是非持久的。如果昆虫可长期传播微生物，且微生物可在昆虫中增殖，则产生持久或循环类型的载体/微生物相互作用。非持久性指的是在植物上短暂的取食后，昆虫获得微生物；在继续取食并（几分钟内）失去该微生物前，会立即将微生物传递到另一植株的关系。

通常的昆虫载体有蚜虫和叶蝉，但有文献记载烟粉虱，即粉蚧、甲虫、双翅目昆虫、木虱、蓟马、螨类和其他昆虫也可作为载体。蚜虫和叶蝉是目前植物病毒和支原体（无细胞壁的细菌）最重要的载体。

昆虫可短距离，也可长距离运载微生物。象叶蝉这样的昆虫飞行能力强，一些节肢动物（如螨类）不能飞行，但是可通过风而被动运输微生物。由于风媒昆虫可通过风而被运输数千公里，因此，即使飞行能力不强的昆虫也可远距离扩散微生物。

可用小规模田间试验设计来解决试验微生物通过昆虫进行的运载。例如，如果已知微生物通过蚜虫传播，可对试验地点进行正确选择将试验点放在不存在蚜虫或蚜虫种群水平低的海拔区域。在试验设计中也可应用蚜虫驱避剂或通过加网而使载体不能进入植物。在去除载体活性时，这些方法很少完全起作用，且很大程度上取决于特定季节的气候条件。

是否有合适的环境

在决定微生物是否可传播时，最重要的考虑因素之一是是否有可供微生物定殖的生境^①和/或生态位^②。

微生物可活动/扩散的区域中潜在生境的分布和数量是决定能否定殖的重要因素。生境的数目、分布、大小和敏感性可影响微生物遇到合适生境并在其中成功定殖的概率。

如果潜在生境的密度低，且被相对较远的距离隔开，则成功传播的概率会大大降低，实际可能会接近于零。在农业生产中采取基于生境密度的策略来控制病原菌传播。例如，田间可种植“多系（multilines）”作物。“多系（multilines）”作物由几个不同的作物品种组成，每个品种都含有可对病原菌产生抗性的不同基因。由于病原菌没有找到具有足够密度的合适生境（敏感植物），因而不能流行性传播。应用这类策略时，微生物可能会在试验小区内增殖，但是如果没有找到合适的宿主，将无法在小区以外的区域传播。

在小规模田间试验中采用相关试验设计在一定程度上解决潜在生境的密度和分布问题。例如，可根据试验区中潜在生境的分布和面积来选择试验点的位置，这就称作“地理

① “生境”是发现某一生物的物理位置。生境的物理和化学特征影响在这些生境中发现的微生物的生长、活动、相互作用和存活。

② “生态位”比生境更广。生态位描述的不仅是物理生境，而且是微生物在该空间的功能和活动。本文件中所用的“生态位”描述的是某一生态系统内某一生物的功能。

隔离”。

在与试验点临近的区域，可应用其他策略来帮助限制潜在的合适生境，从而控制传播。例如，在最近对根瘤菌的一次田间试验中，在试验点周围 50 m 半径的范围内，除去了可能为合适宿主/合适生境的野生豆科植物。不过，由于大多数土壤含有大量可萌发的杂草种子，因此实施这种策略时需细致监管。

增殖和存活

如上所述试验微生物的存活和增殖是产生足够大的可进行传播的源一库的重要因素。为了增加微生物在引入地点的数目，试验微生物应当具备能够与试验点的其他生物进行竞争的能力，或找到没有竞争对象或有效竞争对象较少的新的生态位。

显然，通过选择或找到新的生态位，对某一引入的微生物是否会成为有力竞争对象的概率进行评估时，应当考虑一系列因素。这些因素包括：试验微生物的来源，导入基因的来源（如果有的话）、将要进行试验的环境。在很多情况下，可能会选择在隔离试验微生物或其亲本微生物的农业生态系统中进行试验。这种情况下，即使应用后该试验点中出现的基因/微生物组合的频率与通常观察的不一样，导入的基因或导入的微生物都不会成为该环境中新的或仅有的基因或微生物。

加入的基因/微生物组合会与土著微生物种群竞争。尽管无法保证加入的基因/微生物组合不会成为试验环境中的有效竞争物，但它的确对所要考虑的风险类型有一定的限制。在这种研究情况下，了解导入的基因的功能以及亲本生物的行为，可用于预测基因/微生物组合对一些因素（如竞争营养物、捕食作用和环境胁迫、选择和抗性）的可能响应。

不过，鉴于目前的知识，通常只能通过真正的田间试验才可以评价其表现，而且试验微生物的竞争能力通常需通过实验进行检测。此外，实验室、温室/玻璃房或微生境得到数据或可成为评价小规模田间研究的重要方面。

与原土著种群相比，在有限的小规模田间试验中所用的接种体通常并不重要，这一点在决定基因/微生物组合的命运上也发挥着作用。如果向某一试验点中加入相对少量的基因/微生物组合，则很可能本地种群具有竞争优势。此外，如果应用的是相对少量的生物，则在可选择的基因型较少的接种体中，可能会存在大量的遗传变异。

某些情况下，微生物或导入的基因最初可能是从试验点以外的其他环境中分离的。这种情况下，则可以根据对照环境下的研究（如温室/玻璃房、微生境等）而对基因/微生物组合的竞争能力进行仔细比较。所导入的基因的预期功能以及受体亲本微生物的表现也是重要的考虑因素，合适的环境设计一般都会考虑这些因素。

在评价提交的申请以及设计安全的小规模田间试验时，竞争和选择是重要的考虑方面。“找到新的生态位”这一现象在这里被视为选择的一个方面。

(1) 竞争

某一生境的某一微生物群落中存在的负作用被称为“竞争”。这里所指的竞争是广义的，包括竞争可用的底物以及其他负作用，如因产生有毒物质而带来的负作用。如果几个种群在极力争取相同的资源，如空间、光、宿主或有限的营养物等，则产生竞争。在可用底物浓度极低的天然生境中，会出现激烈的竞争。

自由生活的土壤微生物：关于自由生活的土壤微生物的大部分信息来源于根瘤菌 (*Rhizobium*) 以及作为生物防治因子的微生物改良剂而获得的经验。经验表明，在生长季节末期，加入的微生物通常不占主导作用。为了解释这些观察结果，有人假设微生物改良生物肯定是在已经与很好地适应了当前条件的原有微生物种群竞争，但其竞争能力通常较弱。对于具有典型的休眠孢子的微生物（如土传真菌病原菌和半腐生菌）而言，竞争模式可能有所不同。

如果将微生物置于土壤环境中，肯定会与大量因子竞争。这些因子包括：大量的适应性好的竞争者（由于土壤是复杂的基质，其中存在着各种类型的生物）、环境胁迫（如化学物质、水和温度）、各种水平的捕食作用、竞争资源以及抗生。

如果具备足够的营养物且温度和湿度充分，微生物即进行增殖。不过，即使在营养物充足的情况下，土壤栖生菌也会竞争营养物。如果营养物相对充足，生长速度最快的微生物较具有较竞争优势。更常见的情况是营养物不足，且生物经常需经历长期的饥饿而存活。这种情况下，在胁迫条件下存活能力最强的种群通常具有竞争优势。产生抗性构造（如孢子和麦角菌硬粒）的生物具有最强的适应性，可在长期的环境胁迫和饥饿等不利条件下生存。另一些物种也有自己的独特方法，通过休眠的营养细胞也可存活很长时间。

如果一个微生物种群产生了抑制其他种群的物质，则产生抗生现象。抗生的例子包括：产生抑制竞争对象的物质，诸如乳酸、硫酸、乙醇、乙酸、小分子量有机酸等物质。微生物拮抗剂可能在微生物环境的相互竞争作用中具有显著的作用。互补的竞争策略是指对其他生物产生的抗生素具有内在抗性。细菌素和生物毒素也可能抑制土壤中的植物病原菌群，且可能存在应对这些物质的微生物策略。

捕食作用可能也是影响微生物存活和种群水平的因素之一。自由生活的线虫、原生动物和细菌是土壤微生物的捕食者。尽管这类捕食动物对微生物种群的影响尚不清楚，但是很可能微生物已经发展出了应对捕食的策略。

土壤是复杂的基质，呈现的是高度竞争性的环境。以上所述因素的相互作用以及物种对这些因素的响应使土壤中的生命体处于平衡，这一平衡将影响所应用微生物的比较竞争能力。

专性寄生微生物：本文中，依赖宿主存活的微生物被称为专性寄生微生物。大部分关于影响专性寄生微生物竞争能力的因素的信息是从作为生物防治因子的微生物、植物病理学以及植物育种中的微生物的研究而来的。

在微生物/植物的相互作用中，专性寄生微生物附生于植物上（在植物表面）或寄生于植物内部（在植物组织内）或两者兼而有之。

与附生于植物上的微生物或自由生活的土壤微生物相比，寄生于植物内部的微生物竞争对象（其他植物病原菌或可能的感病组织的次要入侵者）较少。寄生于植物内部的微生物，如病毒、类病毒和一些原核生物（如类立克次氏体、支原体和螺原体），完全依赖于宿主或载体增殖，通常认为在其接触环境后易于发生变化。不过，也有某些类型的植物病毒，它们可在水、土壤和作物废弃物上存活。因此，它们竞争的环境很大程度上由宿主决定。尽管寄生于植物内部的微生物的竞争对象较少，但它们须应对

宿主的防御。

植物专性附生微生物可根据它们与宿主之间营养关系的类型进行分类。在其生活的地方或在叶片或根的附生阶段，如果不处于明显的与植物共栖的状态，则会出现某些专性寄生微生物。它们从植物得到营养物（如叶片或根的提取物），但对植物并不产生危害。不过，如果条件合适，它们会通过毒素和酶的作用杀死或破坏宿主组织，然后在坏死组织中增殖。

在第二类营养关系中，专性寄生微生物通过在入侵前杀死宿主组织而从植物获得营养物。

从专性寄生微生物中可以看出很多因素影响自由生活的土壤微生物内的竞争。这些因素包括竞争空间、营养物、捕食作用、环境胁迫和抗生。除了应对这些因素之外，附生于植物上以及寄生于植物体内的专性寄生微生物也需要找到合适的宿主，并定殖/感染这些宿主。专性寄生微生物需找到合适的宿主，这是在对这些生物进行安全性试验前设计试验方案时所考虑的一个要素。

(2) 选择

选择压力是环境施加的，对具有适应性特征的生物有利。微生物中最为了解的关于选择的例子是抗生素抗性细菌菌株的出现。通过将抗生素应用于治疗人和动物微生物感染、动物饲料和农业，促进了抗性菌株的选择。另一个关于选择的例子是可降解某些人工合成的有机化合物（如农药）的微生物数量的增加。在这种情况下，通过将大量的这些人工合成化合物释放到环境中，可促进选择。

就本部分而言，“找到新的生态位”被视作一种选择形式。如果微生物在某一生态系统内建立了执行“新”功能的能力，则会出现这一选择。如果可执行某一原有群落不具备的功能的微生物被引入到该生态系统中，则也会出现这一选择。

选择压可影响生物的存活、增殖及提高种群相对比例的能力。因此，选择对微生物的运动/扩散和定殖以及存活与增殖均具有重要影响。

微生物与其他物种以及环境中的生物系统之间的相互作用

小规模田间试验中环境微生物可以多种方式与其他物种相互作用。在重组 DNA 安全性考虑事项中，在摘要中提到了两种特异性的相互作用。它们是：①微生物对靶标或非靶标生物的影响；②遗传物质水平转移的可能性及影响。以下段落介绍了这两类相互作用，并且作了初步尝试来检验这两类相互作用。这些考虑事项也与田间试验的设计有关。

靶标或非靶标生物

在进行田间小区试验的微生物中大多会对另一生物——靶标生物产生影响。几十年来，植物病理学家将引起植物病害的微生物应用于田间来评价植物的抗病性。在田间也对其他植物病原菌进行试验，以了解这些微生物的生物学特点和致病性。对作为生物防治因子的微生物进行了特定的筛选或改良以使其影响某一靶标有害生物。一些微生物（如苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*）通常被用作环境中一些鳞翅目害虫的生物防治因子。已对未改良的微生物进行了研究，对环境几乎没有不良影响，即使是已有报道微生物对环境中的其他生物有确定影响的也是如此。这些需考虑的常规问题对于转基因微生物的试验

具有指导意义。

当对微生物进行试验时，重要的不仅是评价其对靶标生物的预期影响，对非靶标生物的影响的评价也很重要。当借助基因工程手段来改良作为生物防治因子的微生物时，插入的基因可能会编码毒素或扩大宿主范围，或者增加对某一特定靶标生物的毒力，在进行田间试验之前，应评价新性状对微生物宿主范围的影响。通过在封闭的条件下对代表性物种进行试验，可确定潜在的非靶标生物。如果微生物可被有效地限定在试验小区中或其相邻的周围环境中，则某一群落或生态系统中某一物种的相对密度因小规模田间试验而明显改变的情况通常是不可能发生的。但有一点很重要，进行田间试验时应当限制敏感的非靶标物种接触微生物。

以上概念可应用于特定的例子。应当在未有遭受威胁或濒临灭绝的鳞翅目昆虫种群接触细菌产生的内毒素的试验小区中对苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* 的新菌株进行试验。在进行益虫对试验微生物的敏感性试验以及限制大量的敏感益虫种群接触微生物时，需要十分小心。

基因转移

某一基因工程微生物的基因转移能力或遗传构建体的稳定性可能会影响这一微生物与其他微生物的相互作用。基因转移指的是遗传物质通过天然的遗传机制而进行的传播。

分析基因转移对转基因微生物安全性的影响时，需要考虑如下因素：

①遗传物质发生水平转移的概率多大？

②如果基因发生了转移，则新的遗传信息可以稳定保留并表达吗？

③新的遗传物质的已知功能是什么？

④如果改良的微生物迁移到引入点以外的地方，则由于转化产生的结果，它将如何影响周围的种群或植物、动物和原有微生物群落？

基因转移指的是遗传物质通过天然遗传机制而进行的传播。质粒和/或染色体基因转移的机制包括：接合、转化、转导和细胞融合。尽管已经在实验室对这些机制进行了研究，但对于遗传物质在自然界中的交换频率仍知之甚少。我们预计，与实验室相比，自然界发生的基因转移频率要低一些，但自然界中实际发生的频率尚未得到充分研究。一些自然发生的或模拟自然条件发生的遗传物质的交换已有相关文献报道。

以下几个因素的存在可能会影响基因转移：①可增加交配的较高的细菌密度；②可促进转化的游离 DNA；③可促进生长和质粒转移但不属于转导的黏土物质（clay materials）或矿物质。具有广泛的宿主范围以及高拷贝数的质粒可提供更多的扩散机会，并且相对大量的供体细胞更有利于转移到受体。此外，影响转移的其他因素有：空间、时间和细菌的生理隔离；通过黏附到土壤粒子、有机物和其他活体生物上而进行的固定；遗传屏障（如限制性系统和质粒的不亲和性）；环境条件。

根据类似的考虑因素，对特定环境中观察到的转移频率进行了估计。然而，与自然发生的转移相比，基因以何种频率进行转移以及这类转移的意义，须根据不同情况逐个进行评价。

◆ 参考文献

- AGRIOS, G. N. (1998), *Plant Pathology*, Third Edition, Academic Press, Inc., New York, 803 pages.
- BAKER, K. F. (1987), "Evolving Concepts of Biological Control of Plant Pathogens", *Annual Review of Phytopathology*, 25: 67-85.
- BENTJEN, S. A., FREDRICKSON, J. K., VAN VORIS, P., and LI, S. W. (1989), "Intact Soil-Core Microcosms for Evaluating the Fate and Ecological Impact of the Release of Genetically Engineered Micro-organisms", *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 198-202.
- Committee on Scientific Evaluation of the Introduction of Genetically Modified Organisms and Plants into the Environment (1989), *Field Testing Genetically Modified Organisms, Framework for Decisions*, National Academy Press, Washington, DC.
- DE BOER, S. H. (1982), "Survival of Phytopathogenic Bacteria in Soil", in M. S. Mount and G. H. Lacy, (ed), *Phytopathogenic Prokaryotes*, Vol. 1, pp. 285-302, Academic Press, New York.
- FEHR, W. R., and HADLEY, H. H. (ed) (1980), *Hybridization of Crop Plants*, American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin, 765 pages.
- GILLET, J. W., STERN, A. M., LEVIN, S. A., HARWELL, M. A., ANDOW, D. A., and AL-EXANDER, M. (1985), *Potential Impacts of Environmental Release of Biotechnology Products: Assessment, Regulation and Research Needs*, Ecosystems Research Center, Cornell University.
- LEVIN, M. A., SEIDLER, R. J. and ROGUL, M. (1992), *Microbial Ecology: Principles, Methods and Applications*, McGraw-Hill Publishing Co., New York.
- LEVY, S. B. and MARSHALL, B. M. (1988), "Genetic Transfer in the Natural Environment", in M. Sussman, C. H. Collins, F. A. Skinner and D. Z. Stewart-Tull (ed), *The Release of Genetically Engineered Micro-organisms*, pp. 61-76, Academic Press, New York.
- LINDOW, S. E., KNUDSEN, G. R., SEIDLER, R. J., WALTER, M. V., LAMBOU, V. W., AMY, P. S., SCHMEDDING, D. V. PRINCE, and HERN, S. (1988), "Aerial Dispersal and Epiphytic Survival of *Pseudomonas Syringae* during a Pre-test for the Release of Genetically Engineered Strains into the Environment", *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1557-1563.
- OECD (1986), *Recombinant-DNA Safety Considerations*, Paris.
- RABB, R. L. (1985), "Conceptual Bases to Develop and Use Information on the Movement and Dispersal of Biotic Agents in Agriculture", in D. R. Mackenzie, (ed), *The Movement and Dispersal of Agriculturally Important Biotic Agents*, Claitor's Publishing Division, Baton Rouge, Louisiana.
- REGAL, P. J. (1988), "The Adaptive Potential of Genetically Engineered Organisms in Nature", *Trends in Biotechnology*, 6: S368-S38.
- Royal Commission on Environmental Pollution, Thirteenth Report (1989), *The Release of Genetically Engineered Organisms to the Environment*, Her Majesty's Stationery Office (HMSO), London.
- SCHIPPERS, B., BAKKER, A. W., and BAKKER, P. A. H. M. (1987), "Interaction of Deleterious and Beneficial Rhizosphere Micro-organisms and the Effect of Cropping Practices", *Annual Review of Phytopathology*, 25: 339-358.
- SCHROTH, M. N., LOPER, J. E., and HILDEBRAND, D. C. (1984), "Bacteria as Biocontrol Agents of Plant Disease", in M. J. King and C. A. Reddy (ed), *Current Perspectives in Microbial Ecology*, pp. 362-269, American Society of Microbiology, Washington, DC.
- SUSSMAN, M., COLLINS, C. H., SKINNER, F. A. and STEWART-TULL, D. D. (eds.) (1981), *The Release of Genetically Engineered Micro-organisms*, Academic Press, New York.

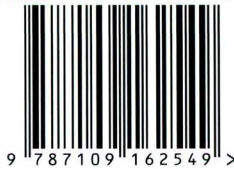
- TIEDJE, J. M. , COLWELL, R. K. , GROSMAN, Y. L. , HODSON, R. E. , LENSKI, R. E. , MACK, R. N. , and REGAL, P. J. (1989), "The Planned Introduction of Genetically Engineered Organisms: Ecological Considerations and Recommendations", *Ecology*, 70: 298-315.
- TOLIN, S. A. and VIDAVER, A. K. (1989), "Guidelines and Regulations For Research with Genetically Modified Organisms: A View From Academe", *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 27, pp. 551-581.
- US Congress, Office of Technology Assessment, (1988), *New Developments in Biotechnology-Field Testing Engineered Organisms: Genetic and Ecological Issues*, OTA-BA-350, May, Government Printing Office, Washington, DC.
- VIDAVER, A. K. and STOTSKY, G. (1992), "Overview: Confinement, Decontamination, and Mitigation", in M. A. Levin, R. J. Seidler, and M. Rogul (eds.), *Microbial Ecology: Principles, Methods, and Applications*, McGraw Hill, New York.
- WALLACE, H. R. (1978), "Dispersal in Time and Space: Soil Pathogens", in J. G. Horsfall and G. B. Cowling (ed), *Plant Disease: An Advanced Treatise*, pp. 182-202, Academic Press, Inc. , New York.



欢迎登录：中国农业出版社网站
www.ccap.com.cn

封面设计：吴 瑶

ISBN 978-7-109-16254-9



9 787109 162549 >

定价：45.00元