

农杆菌介导的植物遗传转化影响因素研究进展

孙华军¹, 李国瑞^{1,2}, 陈永胜^{1,2*}, 黄凤兰^{1,2}, 李跃¹, 邢超¹, 赵永¹, 陈晓凤¹, 包长春³, 张智勇⁴

(1. 内蒙古民族大学生命科学院, 内蒙古通辽 028000; 2. 内蒙古自治区高校蓖麻产业研究中心, 内蒙古通辽 028000; 3. 通辽市土肥料工作站, 内蒙古通辽 028000; 4. 通辽市农业科学研究院, 内蒙古通辽 028000)

摘要 农杆菌介导的转基因方法与其他方法相比具有较多优点, 已被广泛应用于植物遗传转化研究。目前对其转化机理的研究已经相当深入, 而对影响因素的研究较少。主要对农杆菌介导的遗传转化影响因素进行详细评述, 对其作用机理及应用前景进行了说明并进行展望, 以期为提高植物转基因效率研究提供理论依据。

关键词 农杆菌; 遗传转化; 影响因素

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)24-026-02

植物转基因方法有很多种, 如农杆菌介导法、基因枪法、超声波法、电转化法和花粉管通道法等, 其中基因枪法和农杆菌介导法是目前最常用的植物转基因方法。与基因枪法相比, 农杆菌介导法具有操作简单、费用低、转化率高和转化机理清楚等优点, 已成为目前植物转基因的首选方法。

农杆菌属于革兰氏阴性土壤杆菌, 可以分为两类。一类是能使被侵染植物细胞诱发冠瘿瘤的根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*), 其含有 Ti 质粒; 另一类是能导致被侵染植物细胞产生毛发状根的发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*), 其含有 Ri 质粒^[1]。Ti 质粒和 Ri 质粒上都有一段转移 DNA (transfer DNA, 又称 T-DNA), 受伤的双子叶植物细胞分泌的酚类化合物、中性糖等可使农杆菌吸附在植物上, 携带了目的基因的 T-DNA 进入植物细胞, 从而使目的基因整合到植物基因组中。利用农杆菌介导法已经实现了多种植物材料的遗传转化, 得到了大量具有优良性状的品种。目前对农杆菌介导遗传转化作用机理的研究比较透彻, 对其影响因素及应用研究却较少。笔者论述了农杆菌介导遗传转化的影响因素, 并对其作用机理和应用进行阐述, 并提出问题和展望。

1 农杆菌介导的遗传转化作用机理

农杆菌携带的遗传组分 T-DNA 区和毒性 vir 区是植物遗传转化所必需的。T-DNA 区域两端是 2 个约 25 bp 的正向重复序列, 分别称为左边界 (left border) 和右边界 (right border), 是决定 T-DNA 在 Ti 质粒上特定位置的唯一顺式作用元件。目的基因处于左右边界之间, T-DNA 区域最终被整合到植物基因组中使其携带的基因在植物中得以表达。农杆菌介导遗传转化过程是在 Ti 质粒携带的毒性基因辅助下完成, Ti 质粒 vir 毒性区包括 8 个操纵子 virA、virB、virC、virD、virE、virF、virG 和 virH^[2], 他们编码大部分能将 T-DNA 运输和整合到宿主基因组中的毒性蛋白质。它们中的任何一个发生突变都不会发生转化。此外, 根癌农杆菌基因组中 ch-

vA、chvB、chvD、att 等毒性基因在根癌农杆菌介导植物遗传转化中能识别宿主细胞发出的信号, 并使毒性蛋白对此作出响应。受伤的双子叶植物细胞分泌的大量酚类化合物、中性糖如乙酰丁香酮 (AS) 和羟基乙酰丁香酮 (HO-AS) 等既是根癌农杆菌的趋化物, 又是农杆菌中毒性基因 Vir 表达的诱导物, 在它们的作用下, 促进 T-DNA 的加工、转移和整合, 从而侵染植物细胞。带有伤口的单子叶植物细胞不会分泌有利的酚类化合物和中性糖, 所以在转化过程中人为添加 AS 可以促进根癌农杆菌感染单子叶植物^[3]。

2 影响农杆菌介导的遗传转化因素

T-DNA 转移和整合到植物基因组中受农杆菌和植物组织特异性因素影响。Guo 等^[4]就农杆菌介导番茄遗传转化的影响因素进行了广泛研究, 结果表明, 转化效率与侵染时间、细菌悬浮液浓度以及共培养时间有关。一些物种如甘蔗、玉米、小麦和大豆经蔗糖脱水处理后 T-DNA 的传递效率显著提升。

2.1 外植体类型 外植体类型是转化的主要影响因素。不同来源和发育状态的受体都会对农杆菌的侵染产生很大影响。外植体的类型有很多种, 如根、茎、子叶、芽、胚胎等, 其分生组织细胞完成转基因后必须能从转化处理造成的冲击恢复并快速再生植株, 根据试验目的及意义选择合适的材料作为外植体至关重要。风信子和水仙的叶片已成功地作为外植体进行转化。幼龄外植体如未成熟胚比成熟外植体更利于进行转化。与双子叶植物相比, 单子叶植物对农杆菌的敏感性差, 部分单子叶植物进行遗传转化时加入适量 AS 可明显提高转化效率。

2.2 细菌菌株 所用细菌菌株的类型会影响转化效率。常用菌株有 LBA4404、EHA105 和 GV3101 等。Sheetal 等^[5]分析了 LBA4404、EHA105 和 GV3101 3 种菌株对农杆菌介导假马齿苋遗传转化的影响, 结果表明 LBA4404 转化效率最高, EHA105 次之。对毛果杨与美洲黑杨杂交种以及美洲黑杨与欧洲黑杨杂交种的研究表明, EHA105 菌株优于 C58 和 LBA4404 菌株。

2.3 培养基组成 培养基组成包括盐浓度、糖含量、生长调节剂和一些化学物质的加入等, 也对转化效率有巨大影响。目前已发现 9 种能模仿天然酚类化合物诱导农杆菌 vir 区基

基金项目 国家自然科学基金项目 (31460353); 内蒙古民族大学市校合作项目 (SXZD2012006; SXZD2012017)。

作者简介 孙华军 (1992-), 女, 内蒙古呼伦贝尔人, 硕士研究生, 研究方向: 植物生物化学与分子生物学。* 通讯作者, 蒙古族, 教授, 从事植物基因工程研究。

收稿日期 2015-06-29

因活化并促使 T-DNA 形成从而增强转化效率的物质,其中 AS 和羟基乙酰丁香酮 (OH-AS) 的作用较强,在较低浓度时仍可促使农杆菌整合到植物细胞中。在某些植物中也检测到能影响植物遗传转化和再生的其他化学成分,如二硫苏糖醇、硫代硫酸钠和 L-半胱氨酸,它们与潮霉素 B 结合提高了大豆转基因的频率。此外,由于氯化钾和稀土元素铈和镧的盐能够明显改善植物生长状况,从而对提高根癌农杆菌介导的植物遗传转化效率有显著的积极作用^[5]。消毒烟草叶片和茎提取物比乙酰丁香酮更能有效地提高玉米转化效率,此提取物的刺激作用是由于烟草中含有大量能诱导 T-DNA 转移的有利酚类化合物、糖和氨基酸等。相信烟草提取物可同样有利于单子叶观赏植物的改造。

2.4 共培养时间及温度 用处于对数生长期的农杆菌感染外植体并进行共培养使农杆菌将外源基因整合到植物基因组中是提高农杆菌介导遗传转化效率的有效方法之一。由于来自根癌农杆菌的 T-DNA 转移到植物基因组中多发生在细胞周期的 S 期,所以必须建立最佳共培养时间。外植体与农杆菌的共培养时间可能有 1~5 d 的变化,时间太短转化效率低,时间太长会导致农杆菌过度生长。对于大多数植物物种而言,48~72 h 共培养时间最为理想。百子莲共培养时间的研究发现 2~3 d 共培养时间最佳,1 d 时农杆菌不能很好地进入植物细胞转化效率降低,而时间过长会导致农杆菌过度生长为抑菌工作带来困难。共培养温度对转化有较大影响,19~20℃ 是双子叶植物高效转化的最适温度,单子叶植物最佳共培养温度为 24~25℃。在“南林杨 895”的抗虫转化试验中发现最佳共培养温度为 28℃。由此可知,在植物遗传转化中最佳共培养时间和温度是提高转化效率的关键。

2.5 农杆菌浓度及侵染时间 共培养过程中细菌所处状态和浓度对转化效率有很大影响,合适的菌液浓度和侵染时间是提高植物遗传转化效率的关键。Sana 等^[6]对农杆菌介导的丁香罗勒遗传转化研究表明,农杆菌 OD_{600} 为 0.6 时转化效率最佳,过高或过低转化效率明显降低。以毛新杨×毛白杨杂种为材料发现当菌液 OD_{600} 为 0.2 或 0.4 侵染时间 10~20 min 时产生的卡那霉素抗性芽较多。农杆菌浓度超过 10^{10} cfu/ml 且侵染时间过长时通常会损害植物细胞,并导致细胞恢复能力下降从而降低了稳定转化效率。

2.6 筛选标记基因 筛选标记基因可使转化细胞带有除草剂或抗生素抗性,通常与目的基因一起转化到植物细胞以区分转化和非转化外植体。常用的筛选标记基因有新霉素磷酸转移酶基因 *nptII*、潮霉素磷酸转移酶基因 *hpt*、双丙氨酸磷酸抗性基因 *bar* 等。其中使用较普遍的是 *nptII* 基因,其编码新霉素磷酸转移酶,使细胞具有抗卡那霉素 (kanamycin) 的能力。研究发现使用卡那霉素作为转基因杨树的抗性进行筛选时经常出现嵌合体植株。然而考虑到生物安全问题,有必要开发无筛选标记转基因植物的新技术。

2.7 其他影响因素

2.7.1 抑菌抗生素。侵染完成后带有农杆菌的外植体培养

若干天后会出现连片农杆菌,此时应在培养基中加入适量除菌抗生素如头孢噻肟、羧苄青霉素等。这些抗生素通过抑制农杆菌过度生长来提高转化效率,尽管在某些情况下这些因素可能对植物的生长和转化效率产生不利影响。使用浓度 200 mg/L 的头孢霉素对农杆菌侵染后的南林 895 杨进行处理既不会影响叶盘的分化效率,又能有效抑制农杆菌的生长^[7]。青海青杨叶片在侵染农杆菌 4 d 内向培养基中加入 400 mg/L 羧苄青霉素,可以有效地抑制农杆菌的过度繁殖,对外植体正常生长影响较小。

2.7.2 表面活性剂。表面活性剂如 Silwet L77、吐温 20 和聚醚酸 F68 等具有增强细胞通透性的作用,使农杆菌易于粘附在植物细胞表面或通过消除抑制附着的某些物质,从而提高转化效率。拟南芥花序侵染时表面活性剂有利于将农杆菌细胞运送到植物组织中去。

3 农杆菌介导的遗传转化应用

遗传转化是植物分子育种的关键技术,主要目的是将目的基因导入现有基因组中产生具有优良性状的物种,同时保持植物的遗传特性。农杆菌介导的遗传转化已被用于生产各种有用蛋白质如重组抗体和可食用疫苗等。转基因马铃薯能表达来自大肠杆菌的不耐热肠毒素、诺瓦克病毒衣壳蛋白和乙肝表面抗原,转基因苜蓿能够表达口蹄疫病毒蛋白,这说明口服免疫的生产已经实现。以植物为材料,利用农杆菌介导的遗传转化技术生产出多种救生生物药物,如抗凝血剂、人表皮生长因子和干扰素等。

3.1 生物监测与解毒 有些植物已被设计成生物修复和监控仪,用来检测环境中有毒化合物的存在并对污染土壤和地表水进行解毒。在拟南芥、印度芥菜和烟草植物中通过超表达能够诱导植物形成螯合肽的基因提高了植物对金属的耐受能力。已经开发出能够将高毒性污染物甲基汞转换为有更少汞毒元素的转基因拟南芥植物。通过农杆菌介导的遗传转化技术对印度芥菜进行改造实现了炼油厂废水中常见污染物亚硒酸钠的合理处理。Hannink 等^[8]对烟草进行定向改造以促进炸药中三硝基甲苯的降解。而且,通过将参与谷胱甘肽生物合成酶的表达与参与神代谢酶的表达结合实现了对神耐受并有高积累量转基因植物的形成。

3.2 提高作物产量 农杆菌介导遗传转化的应用已经使作物产量显著提升。在水稻密植条件下对油菜素内酯合成相关基因进行调控,结果发现其产量有显著性变化,并研究出油菜素内酯含量极高的水稻品种。通过操纵促进熟化激素乙烯的生物合成使“Flavr SAVR”西红柿实现了贮藏期和藤寿命延长等特性。农杆菌介导的遗传转化增强了水稻铁螯合剂的生物合成,这使得在可用性铁较低条件下植物生长和子粒产量得到改善。Kakkar 等^[9]通过引进各种毒素基因包括最常见的 Bt 毒素基因到玉米、棉花、马铃薯、烟草、水稻等作物中已生产出抗虫作物。抗菌肽在转基因拟南芥和马铃薯植物中的异位表达为植株提供了强有力的细菌和真菌病原体抗性。

(下转第 77 页)

验株果实变小、变黑、变轻,果柄发黑,喷洒时间越早,影响越大,浓度之间无差异。

2.4 在花期喷药对银杏结实的影响 由表 6 可知,在花期对银杏喷施乙烯利溶液,乙烯利溶液浓度为 1 200 mg/L 时,银杏叶片脱落、新梢枯死,所以建议不采用该浓度。乙烯利溶液浓度为 200、400、800 mg/L 时,试验株的生长量与对照株无差异,叶片的叶绿素比对照略大,可能与喷药时间较长有关,在结果方面,喷药的结果数量很少,基本上不结果,对照株结果较多,所以可采用上述 3 种浓度的乙烯利溶液控制结果。

表 6 花期喷药药剂后银杏树的生长情况

处理	生长量//cm	叶绿素(SPAD 值)	果实数
对照	14.3	53.4	较多
乙烯利 200 mg/L	15.1	53.9	极少
乙烯利 400 mg/L	15.9	58.2	极少
乙烯利 800 mg/L	14.7	57.3	极少
乙烯利 1 200 mg/L	新梢死亡	叶脱落	有药害
石硫合剂 0.5%	12.1	45.0	极少
石硫合剂 1.0%	13.9	39.2	极少
石硫合剂 2.0%	12.7	49.7	较多

注:“极少”指果实的数量少于 3 个;“较多”指果实的数量在 10 个以上。

对银杏喷石硫合剂溶液后,在生长量上,试验株生长比对照略慢,叶片的叶绿素在数值上试验株比对照株小,说明药物影响叶绿素的合成。在结果方面,喷洒 0.5%、1.0% 石硫合剂的银杏树结果数量很少,基本上不结果,清水对照银杏树结果较多,喷洒 2.0% 石硫合剂的银杏树结果数量较多,这可能与喷药时的状态有关,该株银杏在喷药时已有许多小果实,可能喷药对果实的生长影响不大,还需进一步试验。

(上接第 27 页)

3.3 提高作物营养价值 对粮食作物的遗传修饰为改善和提高食品营养成分提供可能。农杆菌介导遗传转化已经用于提高作物营养价值的几个方面,包括提高油菜、大豆和玉米中 β -胡萝卜素含量;改善油料作物油成分和含量;减少水稻中维生素 A 缺乏症并开发“金稻”。将水仙中番茄红素合成酶基因转移到玉米中,发现玉米中 β -胡萝卜素水平显著提升。在西红柿中超表达其他有效抗氧化剂如番茄红素和绿原酸相关基因,西红柿抗氧化能力增强。然而尽管农杆菌介导的遗传转化在植物基因工程中已有显著成效,有些问题还需要解决。

4 展望

目前农杆菌介导遗传转化技术已成为提高农产品产量以满足世界人口不断增加需求的有效方法。随着农杆菌高效遗传转化的不断更新和发展,全世界对作物遗传改良作出了巨大努力,使农杆菌介导的遗传转化技术为人类解决更多生产和生活中的问题,为推动经济发展提供强大动力。目前对于农杆菌介导的遗传转化需要解决的重点及难点问题之一是转化效率较低,这是以后研究中应解决的首要问题,而

3 结论

银杏为生命力非常强的树种,若树体已开始结实,采用喷洒化学药剂的方法使果实立即脱落难度非常大。此时喷洒药物,对果实的数量没有影响,但对果实的外观、大小及重量有一定的控制作用,对后期的脱落有一定的促进作用。

在结实期,喷洒乙烯利对银杏果实生长有一定的控制作用,各试验浓度之间无差异,喷洒药物后,果实变小、变轻,果柄发黑,枝条的生长量仍在增加,不影响树木的生长。

喷洒萘乙酸尽管对果实的生长有控制作用,但会产生药害,建议不宜使用。

喷药的时间直接影响控果效果,喷药时间越早,效果越好。

在开花期,喷洒乙烯利和石硫合剂都可以影响果实的数量。乙烯利以浓度 200、400、800 mg/L 的处理效果较好,1 200 mg/L 浓度处理的银杏会出现药害,石硫合剂以浓度 0.5%、1.0% 的处理效果较好,浓度为 2.0% 的效果需进一步试验。

参考文献

[1] 曹秋芬,孟玉平,横田清. MCPB-eghyl 疏花剂对富士苹果授粉授精及胚珠发育的影响[J]. 果树学报,2003,20(1):8-11.

[2] 王学府,孟学平. 无公害疏花剂对不同苹果品种的疏花效应[J]. 山西果树,2006,5(3):3-4.

[3] 张建国,姬延伟. 果树化学疏花疏果技术综述续[J]. 河北果树,2004,5(3):2-4.

[4] 马愿翔. 萘乙酸和乙烯利对梨树的疏花疏果效应[J]. 甘肃林业科技,2009,3(1):38-42.

[5] 王学府,狄红梅,孟玉平,等. 苹果疏花剂“施易乐”疏花试验观察[J]. 山西果树,2010,11(6):3-4.

[6] 李海涛,吕朝晖,朱玉秀,等. 新型疏花剂在灰枣上的应用初报[J]. 河南林业科技,2011,12(4):3-5.

[7] 宋宏伟,孙文奇,宋小菊,等. 几种化学药剂对枣树花果疏除的效应[J]. 果树科学,2000,17(2):119-122.

无选择标记转基因植物的生产也是目前植物分子生物学和生物技术领域急于解决的问题之一。

参考文献

[1] 姚冉,石美丽,潘沈元,等. 农杆菌介导的植物遗传转化研究进展[J]. 生物技术进展,2011,1(4):260-265.

[2] ZIEMIENOWICZ A. Agrobacterium-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2014, 3(4): 95-102.

[3] 张丽君,程林梅,杜建中,等. 农杆菌介导普那菊苣遗传转化体系的建立[J]. 草地学报,2011,19(6):1042-1050.

[4] GUO M, ZHANG Y L, MENG Z J, et al. Optimization of factors affecting Agrobacterium-mediated transformation of Micro-Tomtomatoes [J]. Gen Mol Res, 2012, 11: 661-671.

[5] SHEETAL Y, POOJADEVI S, ANSHU S, et al. Strain specific Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Bacopa monnieri* [J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2014, 12: 89-94.

[6] SANA K, NAVEERA F, POOJA S, et al. Agrobacterium tumefaciens mediated genetic transformation of *Ocimum gratissimum*: A medicinally important crop [J]. Industrial Crops and Products, 2015, 71: 138-46.

[7] 柴文娟. 南林 895 杨转小鼠金属硫蛋白(MT)基因研究[D]. 扬州:扬州大学,2011.

[8] HANNINK N, ROSSER S J, FRENCH C, et al. Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19: 1168-1172.

[9] KAKKAR A, VERMA. Agrobacterium mediated biotransformation [J]. Appl Pharm Sci, 2011, 1: 29-35.