

农杆菌介导的作物遗传转化研究进展

刘维佳¹, 练云², 梁慧珍^{2*}

(1. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 河南省农业科学院 经济作物研究所
国家大豆改良中心郑州分中心, 河南 郑州 450002)

摘要: 分子生物学与植物基因工程的迅速发展, 使得通过基因工程手段改良作物品质、改善作物耐胁迫能力、提高作物产量成为培育作物新品种的一种有效手段。为此, 综述了农杆菌介导遗传转化的分子机制、标记基因的应用、作物转化研究进展和转基因应用前景。

关键词: 作物; 农杆菌; 遗传转化; 标记基因; 转基因

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2011)10-0006-04

Progress on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Crop Transformation

LIU Wei-jia¹, LIAN Yun², LIANG Hui-zhen^{2*}

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Zhengzhou Sub-center of National Soybean Improvement Center, Institute of Economic Crops of Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: It is an effective method to cultivate new crops in genetic engineering means with the rapid development of molecular biology and plant gene engineering, which could improve crop quality, crop yield and the capacity of stress resistance. In this paper, the research progress of *Agrobacterium*-mediated molecular mechanism, the application of transgenic marker genes, the development of crop transformation and the prospect of transgenic application were reviewed.

Key words: Crop; *Agrobacterium tumefaciens*; Transformation; Selectable marker genes; Transgenic technology

农作物在自然栽培条件下, 所处的生长环境变化多端, 人们通过栽培技术来调节其生长环境使之适合作物生长的需求, 但这种调节是有限度的, 那些难以控制的条件一旦超出农作物正常生长发育所能忍受的范围, 就构成了作物生长的“逆境”。逆境包括病虫害等生物胁迫和低温、干旱、高盐等非生物胁迫, 致使植物受到伤害甚至死亡, 严重影响了作物的产量和品质。随着人们生活水平的提高, 仅靠传统育种已难以在作物产量和品质方面满足人们的需求, 为提高作物的产量和品质, 生物和非生物胁迫信号传导中相关基因的研究以及品质基因和转基因研

究都得到了重视, 基因功能研究和转基因研究的开展对改善作物的逆境胁迫耐受性和增加作物产量具有非常重要的意义。农杆菌介导的遗传转化在植物转基因研究中具有重要的应用价值, 为此, 对其相关研究进展进行综述。

1 农杆菌介导遗传转化的分子机制

农杆菌是普遍存在于土壤中的一种革兰氏阴性细菌, 它在自然条件下能趋化性地感染大多数双子叶植物和部分单子叶植物的受伤部位, 是一种天然的植物遗传转化载体。根癌农杆菌介导的基因转化

收稿日期: 2011-06-10

基金项目: “948”国际引进项目(2011-G1-13); 河南省科技创新杰出人才计划(114200510002); 转基因生物新品种培育科技重大专项(2011ZX08004-005)

作者简介: 刘维佳(1990-), 女, 河南夏邑人, 本科, 研究方向: 生物工程。E-mail: lianyun262@126.com

* 通讯作者: 梁慧珍(1968-), 女, 河南永城人, 研究员, 博士, 主要从事大豆遗传育种研究工作。E-mail: lhzh66666@163.com

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

过程中, T-DNA 的整合是关系到外源基因能否稳定遗传的关键步骤。野生型的根癌农杆菌携带有与生长素和细胞分裂素合成有关酶的基因, 可使转化细胞形成肿瘤, 肿瘤性状是一种天然的选择标记, 但利用这种农杆菌作为基因工程载体常使转化细胞丧失分化能力, 因此, 目前在植物遗传转化中最常用的载体是去除了 T-DNA 上的致瘤基因, 同时保存了转化所必需的 *vir* 区和完整 T-DNA 边界区域的 Ti 质粒。利用农杆菌的 Ti 或 Ri 质粒进行遗传转化时, 农杆菌通过侵染植物伤口进入细胞后, 可以精确地把左右 2 个边界之间的 T-DNA 转移并稳定整合到植物核基因组中, 而且多数情况下以单拷贝形式进行整合, 因此, 人们将目的基因插入到经过改造的 T-DNA 区, 借助农杆菌的感染实现外源基因向植物细胞的转移与整合, 然后通过细胞和组织培养技术, 获得再生转基因植株^[14]。农杆菌 Ti 或 Ri 质粒已成为植物分子生物学中广泛应用的遗传转化载体。

2 农杆菌介导转化的影响因素及常用的标记基因

20 世纪 70 年代中期, 农杆菌介导的植物转化分子机制首次被阐明, 80 年代, 科学家已经开始利用农杆菌天然侵染的性能转化植物, 90 年代中期, 通过农杆菌转化得到的转基因植物在一些国家已经常见。目前, 尽管通过农杆菌转化得到的转基因植物在农业上的重要物种中已经很常见, 但仍有很多转化机制人们并不清楚^[5-6]。在遗传转化中, 由于受到多种遗传因子和外界因素的影响, 导致转化效率低, 外源基因在受体植物中表达量低, 甚至有基因沉默等现象^[7-9]。为了提高转化效率, 人们从受体基因型、外植体、菌株、消毒时间、消毒方式、标记基因、激素的种类和浓度、共培养条件、筛选剂、筛选时间及筛选方式等方面对农杆菌介导遗传转化方法进行优化, 不同程度地提高了转化效率^[10-16]。

在植物遗传转化中, 常用的抗生素抗性的选择标记基因有: 新霉素磷酸转移酶基因(*npt*)、潮霉素磷酸转移酶基因(*hpt*)、氯霉素磷酸转移酶基因(*cat*)、链霉素磷酸转移酶基因(*spt*)等^[17-18]。利用除草剂抗性基因作为选择标记基因的有: *epsps* 基因、*bar* 基因、*gox* 基因等, 其中应用最广泛的除草剂类选择标记筛选体系是 *bar* 基因和草丁膦筛选体系^[19-20]。常用的化合物解毒酶选择标记基因有: 来源于甜菜的碱醛脱氢酶(BADH) 基因和植物体内叶绿素生物合成途径中的谷氨酸- α -酮戊二酸转氨酶

(GSA-AT) 基因。BADH 在植物中能催化有毒的甜菜碱醛转变成无毒的甜菜碱; *hemL* 基因是一个具有 3-氨基-2, 3-二氢苯甲酸(gabaculine) 抗性的 GSA-AT 突变基因, 可作为筛选标记基因, 细胞中转入 *hemL* 基因后可以将有毒的 gabaculine 转化为无毒的代谢物, 这 2 个基因在转基因烟草中得到了正确表达^[21-22]。植物糖类代谢酶选择标记基因是近几年发展的利用糖类作为筛选剂的筛选系统所用的基因, 主要有: 甘露糖磷酸异构酶基因 *pmi*、木糖异构酶基因 *xylA* 和核糖醇操纵子 *rtl*。*pmi* 基因编码的 6-磷酸甘露糖转移酶可以催化 6-磷酸甘露糖转变为 6-磷酸果糖, 转化细胞可以将 6-磷酸甘露糖进一步转化为 6-磷酸果糖, 并被植物细胞利用, 同时在转化过程中产生的 ATP 可以为细胞正常生长提供能量。来源于红色链霉菌和高温厌氧芽孢杆菌的木糖异构酶基因 *xylA*, 编码木糖异构酶, 催化 D-木糖异构为 D-木酮糖, 许多植物细胞可利用 D-木酮糖作为主要碳源, 但不能利用 D-木糖, 在含 D-木糖的筛选培养基上, 整合有外源 *xylA* 基因的转化细胞可以将 D-木糖异构为 D-木酮糖, 经磷酸戊糖途径分解代谢, 为转化细胞的生长提供条件。

3 作物转化研究

根癌农杆菌和发根农杆菌是在植物遗传转化中最常用的 2 种土壤农杆菌。Horsch 等^[23]首次使用叶盘转化法获得转基因植物。Saini 等^[24]利用根癌农杆菌介导黑绿豆转化, 结果 *GUS* 基因在 T_0 代叶、根、花粉粒和 T_1 代种子中均能表达。液泡膜 H^+ -PPase (AVP1) 基因的超表达能显著提高转基因植物的耐盐性和抗旱性^[25-26], 还可以促进植物根系对 K^+ 吸收和有机酸释放, 使植株在低磷环境中能正常生长^[27]。王晓娇等^[28]将拟南芥液泡膜 H^+ -PPase 基因利用农杆菌介导法转入甜菜, 获得转基因植株。Zale 等^[29]将发育处于单核中晚期的小麦花粉, 利用农杆菌菌液蘸花侵染的方法进行转化, 获得了转基因植株。Hong 等^[30]建立了大豆器官愈伤组织转化体系, 以去除腋芽的初生叶节或子叶节为外植体, 诱导器官产生愈伤组织, 对愈伤组织进行侵染从而获得转基因再生植株。Oltmanns 等^[31]将 T-DNA 同源重组到农杆菌染色体中, 克服了载体骨架、染色体片段被转移的缺点。农杆菌与受感染细胞之间相互作用时, 受感染部位由于氧化作用发生褐化, 从而影响转化效率, 在共培养培养基里添加半胱氨酸、DTT 有助于提高转化效率^[32]。基因工程育种是提高作物产量、改良作物品质的主要手段之

一,转基因技术已在水稻、棉花、玉米、大豆和油菜等作物上成功应用,并赋予了作物本身所不具备的抗性。

4 转基因技术的应用前景

利用转基因技术将具有优良性状的目的基因导入植物受体细胞,目的基因在植物受体中表达,使得目标植物的遗传性状得到改良,从而达到快速培育植物新品种的目的^[33]。遗传转化是提高作物产量、改良作物品质极为有效的途径。目前,遗传转化技术在小麦、水稻、玉米、大豆等重要农作物中已经得到较为广泛的应用。但在转化过程中往往只有少数植物细胞将外源 DNA 整合到受体植物基因组中,由于大多数细胞并未发生转化,因此标记基因被广泛采用,其转化的结果是,标记基因也随目的基因在转化体内表达并以孟德尔方式遗传,虽然尚无研究表明选择标记基因会影响人类健康,但近年来由于人们对转基因植物安全性存在质疑^[34-35],转基因植物在生产中的推广利用受到了限制。于是无标记基因的转化技术、化合物解毒酶选择标记基因和植物糖类代谢酶选择标记基因应运而生^[36-39],由于这种技术和选择基因的应用不会使植物产生抗生素和除草剂抗性,不必担心因“基因逃逸”产生临床应用抗生素失效或者产生“超级杂草”而造成环境污染、生态平衡破坏等问题。随着研究的不断深入,这种全新的安全性转基因技术和安全标记基因将会在遗传转化中得到更为广泛的应用。

参考文献:

[1] Kudirka D T, Colburn S M, Hinchee M A, *et al.* Interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) leaf explants in tissue culture[J]. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 1986, 28: 808-817.

[2] Villemont E, Dubois F, Sangwan R S, *et al.* Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of petunia: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer[J]. Planta, 1997, 201: 160-172.

[3] Bolton G W, Nester E W, Gordon M P. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence[J]. Science, 1986, 232: 983-985.

[4] Oltmanns H, Frame B, Lee L Y, *et al.* Generation of backbone-free, low transgene copy plants by launching T-DNA from the *Agrobacterium* chromosome [J].

Plant Physiology, 2010, 152: 1158-1166.

[5] Gelvin S B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration[J]. Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2000, 51: 223-256.

[6] Tzfira T, Li J X, Lacroix B, *et al.* *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models[J]. Trends in Genetics, 2004, 20(8): 375-383.

[7] Reddy M S S, Dinkins R D, Collins G B. Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(7): 676-683.

[8] Ko T S, Lee S, Krasnyanski S, *et al.* Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(3): 439-447.

[9] Liu H K, Chao Y, Wei Z M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system[J]. Planta, 2004, 219: 1042-1049.

[10] Bowen B A. Markers for plant gene transfer[C]// Kung S, Wu R. Transgenic plants: engineering and utilization(Vol 1). San Diego: Academic Press, 1993: 89-123.

[11] Santarem E R, Trick H N, Essig J S, *et al.* Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression[J]. Plant Cell Reports, 1998, 17(10): 752-759.

[12] Zeng P, Vadnais D A, Zhang Z, *et al.* Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)[J]. Plant Cell Reports, 2004, 22(7): 478-482.

[13] 刘晓, 景寅. 转基因油菜研究进展[J]. 现代农业科技, 2010(9): 80-81.

[14] 刘海坤, 卫志明. 大豆遗传转化研究进展[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(2): 126-134.

[15] Paz M M, Martinez J C, Kalvig A B, *et al.* Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation[J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(3): 206-213.

[16] Tenea G N, Spantzel J, Lee L Y, *et al.* Overexpression of several Arabidopsis histone genes increases *Agrobacterium* mediated transformation and transgene expression in plants[J]. The Plant Cell, 2009, 21: 3350-3367.

[17] Olhoft P M, Flage L E, Donovan C M, *et al.* Efficient soybean transformation using hygromycin B selection

- in the cotyledonary-node method[J]. *Planta*, 2003, 216(5): 723-735.
- [18] 钱方, 高志芳, 滕木子, 等. 转基因作物的安全标记基因[J]. *河南农业科学*, 2007(7): 17-20.
- [19] Kawai K, Kaku K, Izawa N, *et al.* A novel mutant acetolactate synthase gene from rice cells, which confers resistance to ALS-inhibiting herbicides[J]. *Journal of Pesticide Science*, 2007, 32: 89-98.
- [20] Tougou M, Yamagishi N, Furutani N, *et al.* The application of the mutated acetolactate synthase gene from rice as the selectable marker gene in the production of transgenic soybeans[J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28: 769-776.
- [21] Daniell H, Lee S B, Panchal T, *et al.* Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts[J]. *J Mol Biol*, 2001, 311(5): 1004-1009.
- [22] Gough K C, Hawes W S, Kilpatrick J, *et al.* Cyanobacterial GR6 glutamate- α -semialdehyde aminotransferase: a novel enzyme-based selectable marker for plant transformation[J]. *Plant Cell Rep*, 2001, 20: 296-300.
- [23] Horsch R B, Fry J E, Hoffmann N J, *et al.* A simple and general method for transferring genes into plants[J]. *Science*, 1985, 227(4691): 1229-1231.
- [24] Saini R, Jaiwal P K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of blackgram: an assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer[J]. *Biologia Plantarum*, 2007, 51(1): 69-74.
- [25] Gao F, Gao Q, Duan X G, *et al.* Cloning of an H⁺-PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(12): 3259-3270.
- [26] Duan X G, Yang A F, Gao F, *et al.* Heterologous expression of vacuolar H⁺-PPase enhances the electrochemical gradient across the vacuolar membrane and improves tobacco cell salt tolerance[J]. *Protoplasma*, 2007, 232(1-2): 87-95.
- [27] Yang H, Knapp J, Koirala P, *et al.* Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type H⁺-pyrophosphatase[J]. *Plant Biotechnol J*, 2007, 5(6): 735-745.
- [28] 王晓娇, 孙亚卿, 李国龙, 等. 农杆菌介导 AVP1 基因转化甜菜[J]. *分子植物育种*, 2011, 9(3): 370-375.
- [29] Zale J M, Agarwal S, Loar S, *et al.* Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(6): 903-913.
- [30] Hong H P, Zhang H, Olhoft P, *et al.* *Organogenic callus* as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 2007, 43(6): 558-568.
- [31] Oltmanns H, Frame B, Lee L Y, *et al.* Generation of backbone-free, low transgene copy plants by launching T-DNA from the chromosome[J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(3): 1158-1166.
- [32] Vega J M, Yu W C, Kennon A R, *et al.* Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in H⁺-maize (*Zeamays*) using standard binary vectors[J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(2): 297-305.
- [33] Dang W, Wei Z M. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes[J]. *Plant Sci*, 2007, 173: 384-389.
- [34] 蔡东生, 李国荣, 陈素红, 等. 论转基因食品的安全性[J]. *现代农业科技*, 2008(22): 311, 313.
- [35] 过晓明, 马代夫. 转基因作物安全性探讨[J]. *现代农业科技*, 2009(21): 322-324.
- [36] Richael C M, Kalyaeva M, Chretien R C, *et al.* Cytokinin vectors mediate marker free and backbone free plant transformation[J]. *Transgenic Research*, 2008, 17: 905-917.
- [37] 周洁, 陶玉峰, 府健, 等. 杨树无选择标记转基因体系的建立分子植物育种[J]. *分子植物育种*, 2011, 9(2): 230-237.
- [38] 李文凤, 季静, 王罡, 等. 提高转基因植物标记基因安全性策略的研究进展[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(9): 1761-1770.
- [39] 魏毅东, 许惠滨, 张建福, 等. 转基因植物选择标记基因删除技术[J]. *分子植物育种*, 2010, 8(4): 804-809.