

农杆菌及基因枪在玉米遗传转化中的应用

韩双艳, 郭 勇

(华南理工大学生物工程系, 广东广州 510640)

摘 要: 目前外源基因导入玉米受体细胞的方法很多, 最受瞩目的是农杆菌介导法和基因枪法。就农杆菌、基因枪转化玉米的基本原理、影响转化率的因素, 以及近年来在玉米遗传转化中的最新动态进行了综述。

关键词: 玉米; 遗传转化; 农杆菌; 基因枪

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)03-0259-05

Application of genetic transformation in maize by *Agrobacterium* and gene gun

HAN Shuang-yan, GUO Yong

(Department of Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Agrobacterium* and gene gun have aroused most attention among various genetic transformation methods for exogenous gene into maize. Here, the basic principle of *Agrobacterium* and gene gun, the factors that affect the efficiency of transformation and the latest development in maize genetic transformation are reviewed.

Key words: maize; genetic transformation; *Agrobacterium*; gene gun

玉米是一种重要的粮食兼饲料作物, 也是现代食品工业和化学工业的重要原料, 具有多种遗传特性。其遗传转化的研究一直受到人们的普遍关注。到目前为止, 已建立了多种外源基因导入玉米受体细胞的遗传转化方法。其中, 农杆菌和基因枪在玉米遗传转化中担任着重要角色。农杆菌介导的遗传转化可转移相对较大的 DNA 片段, 获得较多的单拷贝转基因植株, 转化效率高, 目前已成为研究的热点; 而基因枪法因其无宿主限制、受体类型广泛、操作简便快捷, 近年来在玉米遗传转化中得到最广泛的应用。本文就农杆菌及基因枪转化玉米的研究进展做以综述, 以期对玉米的遗传转化研究提供参考。

1 农杆菌介导的遗传转化

1.1 农杆菌介导的遗传转化发展

1987 年 Grimsley 等通过农杆菌将玉米条纹病毒导入玉米幼苗, 第一次证实农杆菌能够浸染玉米^[1]。1991 年 Gould 等用 *gus* 报告基因和 *Npt II* 基因通过农杆菌介导法转化玉米 Funk's G90 的芽尖, 得到的再生植株及其子一代基因组中带有标记基因, 从而为玉米建立高效的遗传转化体系奠定了基础^[2]。1996 年, Ishida 等建立了一套农杆菌介导的高效转化体系。通过对菌株、菌液浓度、幼胚基因等各种因素的优化, 使玉米的转化效率达到了 30%, 证明了外源基因地整合、表达及稳定遗传, 成为玉米

收稿日期: 2001-03-19

作者简介: 韩双艳(1976-), 女, 河南郑州人, 华南理工大学食品与生物工程学院在读博士生, 发酵工程专业。

遗传转化过程中的一个里程碑^[3]。随后,Lupotto 等和国内的黄璐等也相继成功地实现了农杆菌介导的玉米遗传转化^[4,5]。

1.2 遗传转化原理

目前在玉米遗传转化中应用的主要是根癌农杆菌,其介导的转化过程主要包括:(1)细菌在植物敏感细胞上吸附;(2)农杆菌中的 Ti 质粒上的 Vir 区基因被激活;(3)T-DNA 切割和 T-DNA 复合物形成;(4)T-DNA 复合物由农杆菌进入植物细胞;(5)T-DNA 以单或多拷贝随机整合到植物染色体上并且进行表达^[6]。

Ti 质粒(Tumor inducing)是约 200 kb 的环状质粒,包括毒性区(Vir 区)、接合转移区(Con 区)、复制起始区(ori 区)和 T-DNA 区 4 个部分。T-DNA 区两个边界为 24bp 重复序列,是 T-DNA 加工和整合的重要标记。这两个重复序列之间的任何基因都可被 T-DNA 转入植物基因组中。其中 Vir 区与 T-DNA 区在转化中尤为重要。Vir 区含有 VirA~J 等至少 10 个操纵子,决定了 T-DNA 的加工和转移过程^[7]。VirA 是一种细胞膜内蛋白,可作为受体蛋白接受损伤植物细胞分泌物的诱导,自身磷酸化后进一步磷酸化激活 VirG 蛋白;后者是一种 DNA 转录活化因子,被激活后可以特异性结合到其它 Vir 基因启动子区上游的 Vir box,启动这些基因的转录。因此农杆菌侵染玉米的能力主要是由 VirA 位点决定的。其中,VirD 基因产物对 T-DNA 进行剪切,产生 T-DNA 单链,然后类似于细菌结合转移将 T-DNA 与 VirD2 组成的复合物转入细胞^[8]。在那里与许多 VirE2 蛋白分子(为 DNA 单链结合蛋白)相结合,形成 T 链复合物(T-complex)^[9,10]。Hansen 等证明在 VirE2 蛋白存在时,能使玉米转化效率提高 2 倍^[11]。

1.3 影响农杆菌转化玉米效率的因素

1.3.1 细菌菌株和载体质粒的构建 在大批已分离的农杆菌株中,A281 是具有超毒 Ti 质粒,宿主范围广、转化率高的一个菌株。目前玉米转化中常用的菌株 LBA4404,常用的载体是 PSB131 和 PTOK233,均为超双元载体;都含有 A281 中 VirB、VirC、VirG 基因,对转化玉米非常有效。但是 Hiei 等人的实验表明,菌株和质粒的组合在转化中至关重要,否则“超强组合”(超强菌株和超双元载

体组合)的转化效率比普通农杆菌与双元质粒组合的效率还要低^[12]。另外,用遗传改造或分离突变体,使其能不依赖于创伤诱导物的存在就能诱导被调控的 Vir 基因高水平或组成型表达,从而促进 T-DNA 转移也是实现有效转化的新途径。在胭脂碱型菌株中引入 VirGN54D 突变能将农杆菌对玉米的感染率(瞬间表达)从 36%~40%提高到 78%~83%,而在章鱼碱型菌株中则从 0%~15%提高到 70%~77%^[13]。

1.3.2 受体基因型 基因型是影响农杆菌转化效率的一个重要因素。Ishida 等发现不同基因型之间转化效率差异显著,最低可至 0,最高可达 30%^[14];黄璐等的研究中,感染能力很强的农杆菌 EHA101 能侵染不同品种的玉米愈伤组织,其中对苏玉 1 号的转化效率可达 8.1%^[5]。基因型与农杆菌的相互作用也影响了转化效率。一定浓度(1.0×10^9 cfu/mL)的农杆菌 LBA4404 菌液对玉米 A188、B73 的浸染效果较好,转化效率也较高^[13,14]。

1.3.3 受体及发育状态 不同来源的受体,其对农杆菌的敏感性也不同。Crimsley 等将 Ti 质粒 T-DNA 上携带有玉米条纹病毒 DNA 的农杆菌注入玉米分生组织或是靠近生长点的部位,得到大量具有条斑病性状的植株,而注入非分生组织处,感染很少出现^[15]。Graves 等人也证明玉米盾片结节和中胚轴最易被农杆菌感染。同时,不同发育状态的受体也会影响转化率^[14]。Ishida 等发现授粉后 9~14 d,长度在 1.0~2.0 mm 的幼胚,最容易被农杆菌感染^[13]。结果表明 T-DNA 转移依赖受体发育,农杆菌识别细胞的关键受体成分可能在幼胚的发育中逐渐获得。

1.3.4 其它因素 实现农杆菌对玉米成功转化的因素还有很多,如农杆菌侵染方式、共培养的时间、培养基成分、培养温度及 pH 值等。

2 基因枪法

2.1 基因枪法发展

最早是由美国康奈尔大学的 Sanford 等(1987 年)研制出火药引爆的基因枪,并与该校工程技术专家 Wolf 及 Klein 合作研究基因转移的新方法^[16]。基因枪法,又称微粒枪法、微粒轰击法(gene gun, particle gun, particle bombardment),是依赖高速度

的金属微粒将外源基因引入活细胞的一种转化技术。1990年,Gordon-Kamm等用基因枪法将gus报道基因和pat选择性基因导入玉米悬浮细胞系,且再生的转基因玉米植株能够结实^[16]。首次获得转基因玉米后,1993年Koziel等培育出了抗虫的转基因玉米。转基因植株能高水平表达CryIA(b)在温室和大田栽培中表现出很强的抗玉米螟的能力,且在后代中稳定遗传^[17]。1994年,Rasmussen等用质粒PBC-17或PBAR-gus转化的完整大肠杆菌DH5 α -F和用质粒PNY转化的根瘤农杆菌A208,作为微弹转化玉米细胞,用飞盘型氮动力基因枪轰击,每次得到数个瞬间转化体,6个稳定转化体^[18]。1999年,张秀君等构建了两个含高赖氨酸蛋白质基因cDNA的表达载体,用基因枪法将其导入玉米不同杂交组合的胚性愈伤组织。通过潮霉素筛选,经Southern杂交检测,得到了含该基因的转基因植株^[19]。2000年,刘大文等将Zm13-Barnase基因转化玉米经高渗处理的Q31 $\times$ Z3、Z31 $\times$ Q31的胚性愈伤组织,经6轮的除草剂筛选获得32块抗性愈伤组织,再生得到24个植株。Southernblot分析证明,其中5个植株中整合有Barnase基因^[20]。

2.2 基因枪转化原理及分类

基因枪法利用高速运动的金属离子,可非特异地将外源基因导入致密的可再生的植物细胞、组织和器官,不再受受体基因型的限制,同时又避开了原生质体再生的障碍,从而使玉米的遗传转化掀开了新的一页。其原理是利用火药爆炸、高压放电或高压气体为驱动力,加速金属离子(微弹)使其进入带壁细胞。在此过程中,质粒DNA首先沉淀在微弹(钨粉、金粉)表面(通常以氯化钙、亚精胺作为沉淀剂来促进DNA与微弹结合),结合着DNA的微弹经加速而获得足够的能量,进而穿透植物细胞壁进入靶细胞,随后释放出DNA分子,其中一部分随机整合到植物染色体中,就可得到稳定的转化体。根据基因枪不同的动力系统,可将它们分为3类^[21]:(1)火药式基因枪;(2)放电式基因枪;(3)气动式基因枪。

2.3 影响基因枪转化玉米效率的因素

2.3.1 不同受体材料对玉米再生的影响^[22,23] 目前基因枪技术已能实现对许多玉米受体细胞进行遗传转化,包括外植体、胚性愈伤组织、胚性愈伤组织

建立的悬浮细胞系及胚性愈伤组织或悬浮细胞系分离出的原生质体。

外植体(包括幼穗、幼胚、成熟胚)的来源和生理状态对植株再生有较大的影响。玉米幼穗和幼胚的再生能力明显高于其它部位,而且它们的发育阶段也是影响再生的重要因素。对玉米幼胚而言,Todorova等认为,授粉后10~15d,幼胚长度为1.0~2.0mm时,再生能力最强,是理想的受体材料^[24]。但国内柯遐义等有报道指出16~20d胚龄的幼胚再生能力较高,14d及22、24d胚龄的幼胚再生能力较低,其中以18d胚龄之幼胚具最高的再生能力^[25]。这可能与不同培养条件或基因型有关。

Ⅱ型愈伤组织即胚性愈伤组织^[21,25]再生性好。1995年王国英等用基因枪将Bt基因转入Ⅱ型愈伤组织中,获得大量转基因植株^[26]。尽管玉米Ⅱ型愈伤组织的诱导受基因型的影响,由于其愈伤组织较易获得,再生能力强,获得转化植株的周期相对较短,仍是目前应用最广泛的受体材料。此外,悬浮细胞系由均一的小细胞团组成,易于大量获得,便于进行转化体的获得,常用于基因枪的转化。

2.3.2 基因型对玉米体细胞再生能力的影响 不同品种的玉米幼胚诱导的愈伤组织的再生能力差异显著。许多实验均表明在相同的培养条件下观察到A188的再生能力明显高于其它品系,一起作为亲本的杂交后代也表现出较高的再生频率^[3,27,28]。Todorova等对不同基因型的玉米幼胚(0.5~3.0mm)进行培养,结果发现A619表现出良好的再生能力,而A344的幼胚不能再生出完整的植株^[24]。黄璐等也观察到普甜1号和苏玉1号的再生频率高达78%和75%,糯玉米和掖单9号仅为10%和8%。植株再生途径也有所不同,普甜1号以器官发生为主要途径,苏玉1号则以体胚发生途径为主^[5]。与此相一致的是,张秀君等用基因枪将高赖氨酸基因导入玉米时,也发现在相同的轰击条件下,相同的筛选条件下,不同的基因型分化再生能力不同^[19]。这可能与不同基因型间的遗传差异有关。

2.3.3 培养条件对玉米细胞再生能力的影响 玉米的愈伤组织的诱导和体细胞的再生能力也受到各种培养条件的影响。同其它单子叶植物一样,2,4-D(2~4mg/L)诱导外植体脱分化产生愈伤组织。细胞分裂素对玉米愈伤组织的诱导和植株再生也起

着重要的作用。黄璐等发现低浓度(0.2 mg/L)的细胞分裂素类似物(6BA 或 KT)能促进玉米幼胚的诱导和愈伤组织的再生^[5]。其他激素的使用结果的报告不尽相同。Hodges 等还发现硝态氮比例高有利于诱导愈伤组织,氨态氮比例高有利于植株再生^[27]; Armstrong 等证明培养基中添加高浓度的脯氨酸有利于维持玉米愈伤组织的胚性^[29];柯遐义等研究发现加 Ag^+ 至 10 mg/L 可使胚性组织诱导率提高大约 6 倍^[25]。

2.3.4 其它因素 影响基因枪转化玉米的因素还有很多,如质粒 DNA 的包被、渗透压的影响等。

3 展 望

目前,利用农杆菌介导和基因枪转化玉米已取得可喜的成绩:利用基因枪转化技术获得的抗虫、抗除草剂的转基因玉米已率先应用于玉米的商业化生产,农杆菌介导法建立的高效转化体系越来越多。然而,不管是农杆菌介导法,还是基因枪法,都存在一些需要解决的问题。如:拓展其宿主范围,导入较大的 DNA 片段,保证外源基因定点整合;提高基因枪法的转化率,避免过多拷贝,增强稳定表达等。那么,能否考虑将这两种技术结合,取长补短?事实上,人们已经开始了尝试。1994 年, Ras-mussen 等用 1.0% 的酚类物质处理后的农杆菌细胞和大肠杆菌细胞结合在钨粉粒上,用基因枪轰击悬浮培养的玉米细胞,提高了转化效率^[18]。1996 年, Hansen 创建了农杆菌枪法(Agrobastic),将 VirD1、VirD2 基因连同 T-DNA 上的目的基因一同用基因枪打入植物细胞中,表达的 VirD1、VirD2 能在植物细胞内切割保守序列的 DNA 并将 T-DNA 转入细胞核,其频率在总的转化事件中约占 20%^[30]。该方法集中了农杆菌介导法中精确切割转移和低拷贝等特性与基因枪转化范围无限制性等优点,因而是一种值得重视的新思路。

参考文献:

- [1] Grimsley N, Hohn T, Davis JW, et al. *Agrobacterium* mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants[J]. *Nature*, 1987, **325**: 177—179.
- [2] Gould J, Devey M, Hasegawa O, et al. Transformation of *Zea mays* L using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex[J]. *Plant Physiology*, 1991, **95**:

426—434.

- [3] Ishida Y, Saito H, Ohta S, et al. High efficiency transformation of maize mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, **14**: 745—750.
- [4] Lupotto A, Reali A, Passera S, et al. Maize transformation with *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 1998, **72**: 20—22.
- [5] 黄璐,卫志明.不同基因型玉米的再生能力和胚性与非胚性愈伤组织 DNA 的差异[J]. *植物生理学报*, 1999, **25**(4): 332—338.
- [6] 贺晨霞,夏光敏.农杆菌介导单子叶植物基因转化研究进展[J]. *植物学通报*, 1999, **16**(5): 567—573.
- [7] 李卫,郭光沁,郑国锴.根癌农杆菌介导遗传转化研究的若干新进展[J]. *科学通报*, 2000, **45**(8): 798—807.
- [8] Fuller KJ, Lara JC, Nester EW. Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer gene[J]. *Science*, 1996, **273**: 1107—1109.
- [9] Sundberg C, Meek L, Carroll K, et al. VirE1 protein mediate export of the single-stranded DNA-binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells[J]. *J Bacteriol*, 1996, **178**(4): 1207—1212.
- [10] Lee LY, Gelvin SB, Kado CL. Psa causes oncogenic of *Agrobacterium* by inhibiting VirE2 protein export [J]. *J Bacteriol*, 1999, **18**(1): 186—196.
- [11] Hansen G, Shillito RD, Chiton MD, et al. T-strand integration in maize protoplasts after code livery of a T-DNA substrate and virulence genes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 11726—11730.
- [12] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice(*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. *Plant J*, 1994, **6**: 271—281.
- [13] Hansen G, Das A, Chiton MD, et al. Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(16): 7603—7607.
- [14] Graves ACF, Goldman SL. The transformation of *Zea mays* seedling with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Mol Biol*, 1986, **7**: 43—50.
- [15] Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, et al. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bom-

- bardment process[J]. *Particulate Science and Technology*, 1987, **5**(1): 27—37.
- [16] Gordon-Kamm WJ, Spencer TM, Mangano ML, *et al.* Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants[J]. *Plant Cell*, 1990, **2**: 603—618.
- [17] Koziel MG, Beland GL, Bowman C, *et al.* Field performance of elite transgenic maize plant expressing an insecticidal protein derived from bacillus thuringiensis [J]. *Bio/technology*, 1993, **11**: 194.
- [18] Rasmussen JL, Kikkert JR, Roy MK, *et al.* Biolistic transformation of tobacco and maize suspension cells using bacterial cells as microprojectiles[J]. *Plant Cell Report*, 1994, **13**: 212—217.
- [19] 张秀君, 刘俊起, 赵倩, 等. 用基因枪将高赖氨酸基因导入玉米及转基因植株的检测[J]. 农业生物技术学报, 1999, **7**(4): 363—367.
- [20] 刘大文, 王守才, 谢友菊, 等. 转 Zm13-Barnase 基因玉米的获得及其花粉育性研究[J]. 植物学报, 2000, **42**(6): 611—615.
- [21] 李慧芬, 张晓明, 宋凤斌, 等. 农杆菌及基因枪在禾谷类作物遗传转化中的应用[J]. 吉林农业科学, 1998, (2): 32—34, 76.
- [22] 杜娟, 王罡, 王萍, 等. 玉米遗传转化系统的研究进展[J]. 遗传, 2001, **23**(1): 69—72.
- [23] 谭振波, 刘昕, 曹鸣庆, 等. 玉米遗传转化的研究进展[J]. 生物技术通报, 2000, (6): 9—13.
- [24] Todorova L, Kruleva M, Krapchev B, *et al.* Maize immature embryo culture[J]. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 1988, **72**: 76.
- [25] 柯遐义, 张秀文, 石和平, 等. 玉米幼胚培养及其影响因素的研究[J]. 中山大学学报论丛, 1996, (2): 19—24.
- [26] 王国英, 谢友菊, 米景九, 等. 用基因枪将 Bt 毒蛋白转入玉米及转基因植株的再生. 中国科学(B 辑) [J], 1995, **25**(1): 71—76.
- [27] Hodges TK, Kamo KK, Imbrie CW, *et al.* Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize[J]. *Bio/technology*, 1986, **4**: 219—223.
- [28] Schalppi M, Hone B. Competence of immature maize embryos for *Agrobacterium*-mediated gene transfer [J]. *Plant cell*, 1992, **4**: 7—16.
- [29] Armstrong CL, Green CE. Established and maintenance of friable, embryonic maize callus and the involvement of L-proline[J]. *Planta*, 1985, **164**: 207—214.
- [30] Hansen G, Chiton MD. "Agrolistic" transformation of plant cells: integration of T-strands generated in *Planta*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 14 978—14 983.