

农杆菌介导杨树遗传转化效率的影响因素

朱学静, 殷鸣放, 金华, 阮成江, 姜国斌*

(1. 沈阳农业大学林学院, 辽宁沈阳 110161; 2. 大连民族学院生命科学学院, 辽宁大连 116600)

摘要 分析了影响农杆菌介导杨树转化效率的因素, 如植物基因型、农杆菌类型、菌液浓度、侵染时间、共培养时间、Vir 基因的活化、选择标记基因等, 同时指出转化受体也是影响转化效率的重要因素。

关键词 杨树; 农杆菌; 遗传转化

中图分类号 Q943.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)22-5772-02

Influence Factors on Agrobacterium mediated Transformation Efficiency of Populus

ZHU Xuejing et al (Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract The factors influencing transformation efficiency were discussed, such as different genotypes, Agrobacterium strains, Agrobacterium concentration, time of infection, time of co-culture, activation of Vir genes, marker genes et al. And it was pointed out that gene transformation receptor was also an important factor influencing transformation efficiency.

Key words Populus; Agrobacterium; Genetic transformation

杨树分布广, 适应性强, 是具有重要经济价值的优良阔叶树种。杨树基因组小(约 450 ~ 550 Mbp), 与水稻类似仅为拟南芥基因组(120 Mbp)的 4 倍, 约为松属植物基因组(20 000 Mbp)的 1/40。杨树生长快, 容易繁殖, 易于基因工程操作, 被认为是林木基因工程中的理想模式树种^[1-4]。目前, 在杨树上应用的遗传转化方法主要有 DNA 直接转移法和农杆菌介导法, 后者最为常用。农杆菌介导法是目前应用最广泛且结果较为理想、技术较为成熟的一种基因转化方法。它具有操作简便, 外源基因插入一般为单拷贝或低拷贝, 转移 DNA 片段明确, 可转移大片段 DNA, 可直接用不同的植物组织进行基因转移等优点。但农杆菌介导法与其他方法一样, 也存在着转化效率偏低的问题。

郝贵霞等都影响农杆菌介导的杨树基因转化效率的主要因素进行了研究, 认为植物基因型、农杆菌类型、菌液浓度、侵染时间、共培养时间、Vir 基因的活化、选择标记基因是影响农杆菌介导的杨树基因转化效率的主要因素^[5-6]。该文对影响农杆菌介导杨树基因转化效率的主要因素进行了较为深入的分析, 指出除上述因素外, 转化受体也是影响转化效率的主要因素。

1 农杆菌及其介导的遗传转化的原理

农杆菌为革兰氏阴性菌, 属于根瘤菌科土壤杆菌属。常用于遗传转化的农杆菌有 2 种类型: 根癌农杆菌和发根农杆菌。前者含有 Ti 质粒, 能诱导被侵染的植物细胞形成冠瘿瘤; 后者含有 Ri 质粒, 能诱导被侵染的植物细胞产生毛发状根。

根癌农杆菌在植物基因转化中应用最早^[7]。根癌农杆菌的 Ti 质粒包括毒性区(Vir 区)、结合区(Con 区)、复制起始区(Ori 区)和 T-DNA 区 4 个部分, 其中与冠瘿瘤生成有关系的是 Vir 区和 T-DNA 区。Vir 区为 30 kb, 该区段的基因能激活 T-DNA 转移, 使农杆菌表现出毒性。Vir 区与 T-DNA 区在质粒 DNA 上相邻, 合起来约占 Ti 质粒 DNA 的 1/3。T-DNA 区在农杆菌侵染植物时可以插入植物基因组中, 使其携带的

基因在植物中表达。T-DNA 两端是 25 bp 的重复序列, 是转移识别的惟一信号, 分为左边界和右边界。两个边界序列之间是生长素和细胞分裂素合成基因以及冠瘿碱合成基因。

2 影响农杆菌介导转化杨树的因素

2.1 植株基因型 大量研究表明, 转化频率与植物基因型有很大关系, 即使是同来源的转化受体因基因型不同农杆菌的转化率差异也很明显。如黑杨无性系 Jean Poret 比 San Gorgio 容易转化, Gus 阳性表达分别为 38.9% 和 26.3%^[8]; 毛新杨 × 毛白杨杂种转化率为 2.59%, 毛白杨无性系 1285 易县雌株转化率是 1.22%, 而毛白杨 1319 雄株难以获得转化芽, 转化频率仅为 0.34%^[9]; 三倍体毛白杨的转化率高于毛白杨的转化率^[10]。这可能是由于不同基因型外植体分化率差异或不同基因型对侵染菌株的敏感度不同。

2.2 农杆菌的类型 农杆菌载体转化是目前最成功的转化系统。其缺点是宿主的局限性, 在同一植物上的不同菌株敏感性也不同。因此, 选择受体植物敏感的菌株是成功转化的重要因素。Confalonieri 等使用 AchS(章鱼碱型)、A281(农杆菌型)、C58(胭脂碱型) 3 种菌株转化黑杨叶片, 表明胭脂碱型菌株 C58 感染能力最强^[11]。这可能是由于 C58 对杂交杨的侵染具有普遍性。很多研究者在杨树遗传转化中使用了 C58 菌株^[12-13]。有的杨树对章鱼碱型菌株 LBA4404 的敏感度也较高, 因此 LBA4404 也广泛应用于 84K 杨^[14]、缘毛杨(*Populus deltata* Wall)^[15]、银腺杨^[16] 等杨树的遗传转化中。Han 等研究表明对于一些顽抗的毛白杨杂交种的转化 EHA105 菌株优于 C58 和 LBA4404 菌株^[17]。Tzfira 等在欧洲山杨转化中使用了 EHA105、AGLO、LBA4404 菌株, 认为 EHA105 菌株易受卡那霉素影响, 使得易于选择二元载体, 优于其他两种菌株^[18]。

2.3 菌液浓度、侵染时间和共培养时间 适当的菌液浓度和侵染时间是转化成功的关键。菌液浓度过大或侵染时间过长容易使外植体褐化, 导致死亡; 菌液浓度过小或侵染时间过短, 则不利于转化。郝贵霞等以杂交杨(毛新杨 × 毛白杨)为材料, 发现当菌液的 OD₆₀₀ 为 0.2 或 0.4, 侵染时间 10 ~ 20 min 时, 卡那抗性芽的产生频率较高; 当菌液浓度过高或过低、侵染时间过长或过短时, 抗性芽的产生频率明显降低, 有时甚至无抗性芽产生^[9]。赵华燕等以三倍体毛白杨为材

基金项目 大连民族学院人才引进科研项目启动基金(20046205)。

作者简介 朱学静(1980-), 女, 辽宁新宾满族自治县人, 硕士研究生, 研究方向: 林学。* 通讯作者。

收稿日期 2006-07-24

料,表明当菌液浓度 OD_{600} 值为0.3~0.5,侵染时间为15~20 min时,外植体转化频率最高^[10]。

研究表明,预培养有利于杨树的转化^[11,19]。饶红宇等农杆菌介导将Bt基因转入杨树NL-80106,发现预培养1~2d既可提高抗性芽诱导率,又能减少假阳性的产生^[20]。

此外,共培养时间的长短直接影响目的基因的整合及转化细胞的数量。若共培养时间过短,则农杆菌不能充分侵染切口细胞,转化率低;若共培养时间过长,则农杆菌生长过多,会导致转化外植体死亡。樊军锋等研究表明,共培养时间应以培养皿中转化叶片与培养基接触处出现肉眼可见菌落为宜^[21]。

2.4 Vir基因的活化 植物受伤细胞分泌的某些酚类化合物可诱导农杆菌Vir区基因被激活和表达,促进T-DNA转移^[22]。目前发现有7种酚类化合物与诱导Vir基因表达有关,其中AS(乙酰丁香酮)和OHAS(羧基乙酰丁香酮)最为有效^[23]。为了提高某些杨树的转化率,在转化过程中往往加入一定的酚类物质。转化杂交杨NC-5331时,在经50倍稀释的菌液中加入25和50 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮时转化频率分别为51%和30%,显著高于不加乙酰丁香酮时转化频率^[24]。G:NHX1基因转化84K杨时,在共培养中添加乙酰丁香酮转化率有明显提高^[25]。郝贵霞等研究表明,只有将pH调到4.8~5.0,加入200 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮时,才能大大提高转化率,并且指出乙酰丁香酮的促进效果可能与菌株类型、植物材料种类和共培养培养基的pH值有关^[9]。

此外,还有一些小分子量的糖类也有助于Vir基因的活化。刘斌等研究表明,5%蔗糖附加定量的表面活性剂稀释菌液,附加的蔗糖可能起与乙酰丁香酮相同的作用,稀释效果优于单独用液体培养基^[26];将农杆菌侵染后的叶片不经冲洗直接转到预先用5%蔗糖液浸湿的滤纸上过夜,增加基因转移的机会,转基因频率有明显提高^[26]。其他研究者也采用了该方法,并且得到一致的结论^[27-29]。

2.5 选择标记基因 在植物基因转化中,外源基因稳定整合的频率低。选择适当的筛选标记以准确、有效地区分转化与非转化细胞,产生选择压,使未转化细胞不能生长,且不干扰细胞的正常生长与植株再生是转化成功的重要环节之一。常用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)、二氢叶酸还原酶基因(dhfr)等。在植物基因转化中使用较为普遍的选择标记基因是新霉素磷酸转移酶基因,简称npt,其编码蛋白可以抑制新霉素族的氨基糖苷类菌素(抗生素)的活性,如卡那霉素、新霉素等^[30]。

在农杆菌介导的杨树转基因试验中,多数将卡那霉素作为转化后的愈伤组织和植株的选择^[12,31-34]。除抗生素可作为抑制剂以外,除草剂化合物也可以作为选择抑制剂。Mhri等研究发现卡那霉素作为转基因杨树的选择时,逃逸和嵌合体组织和植株会经常出现^[35]。Confalonieri等使用卡那霉素作为转基因银白杨的筛选同时使用除草剂进行进一步的选择,从7株卡那霉素抗性植株中得到4株除草剂抗性植株^[33]。Igasaki等首次成功地使用除草剂在杨树转化中作为直接选择,没有得到逃逸植株和嵌合体转基因植株,并且所

获得的转基因植株在形态上没有明显的异常^[36]。王树耀等将G:NHX1基因转化到84K杨时,选用除草剂抗性基因作为筛选标记基因,并认为它是一种理想的筛选标记基因^[37]。

2.6 转化受体 转化受体也是一个重要的影响因素,建立一个好的受体系统是基因转化的先决条件。转化受体通常来自于植物的原生质体和外植体组织。外植体组织包括子叶、子叶柄、下胚轴、茎段。杨树的遗传转化中大多选用子叶、茎段。大量的杨树转基因研究表明,杨树叶片是最好的受体材料^[11-12,31]。但是,也有一些研究发现,茎段的诱导率高于叶片^[33,38-39]。因此,植物转化中最适的受体材料随着植物的种类不同而不同^[36]。

2.7 其他因素 除上述因素外,共培养温度、预培养时间、培养基中附加的植物激素和抑菌抗生素成分等因素都对农杆菌的转化效率有影响。王树耀等指出在用根癌农杆菌转化植物细胞时,常用头孢霉素和羧苄青霉素控制根癌农杆菌的过量生长,而且两者除了抑制根癌农杆菌的生长外,还影响植物的生长发育^[37]。过量头孢霉素易引起伤口细胞褐化、死亡,抑制芽的分化;而羧苄青霉素则促进芽分化,抑制生根。因此,在不同生育阶段应附加不同的抑菌剂。

3 小结

影响农杆菌转化杨树的因素很多。克服影响转化效率的障碍因子,选择与农杆菌菌株相适应的基因型植株,建立高效的杨树转化再生体系,仍是研究的重点。

参考文献

- [1] BRADSHAW HD, GEULEMANS R, DAMS J, et al. Emerging nodal systems in plant biology: poplar (populus) as a model forest tree [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2000, 19: 306-313.
- [2] TAYLOR G. Populus arabidopsis for forestry. Do we need a model tree [J]. *Annals of Botany*, 2002, 90: 681-689.
- [3] BRUNER A M, BUSOV V B, STRAUSS S H. Poplar genome sequence: functional genomics in ecologically dominant plant species [J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9: 49-56.
- [4] 张勇, 张守攻, 齐力旺, 等. 杨树——林木基因组学研究的模式物种 [J]. *植物学通报*, 2006, 23(3): 286-293.
- [5] 郝贵霞, 朱祯, 朱之梯. 杨树基因工程进展 [J]. *生物工程进展*, 2000, 20(4): 6-10.
- [6] 赵华燕, 卢善发, 晁瑞堂. 杨树的组织培养及其基因工程研究 [J]. *植物学通报*, 2001, 18(2): 169-176.
- [7] 闫新甫. 转基因植物 [M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [8] CONFALONIERI M, BALESTRAZZI A, CELLA R. Genetic transformation of Populus deltoides and P. xeuramericana clones using Agrobacterium tumefaciens [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 1997, 48: 53-61.
- [9] 郝贵霞, 朱祯, 朱之梯. 毛白杨遗传转化系统优化的研究 [J]. *植物学报*, 1999, 41: 936-940.
- [10] 赵华燕, 魏建华, 路静, 等. 利用反义CGAOMT基因培育低木质素含量毛白杨的研究 [J]. *自然科学进展*, 2004, 14(9): 1067-1071.
- [11] CONFALONIERI M, BALESTRAZZI A, BISOFFI S. Genetic transformation of Populus nigra by Agrobacterium tumefaciens [J]. *Plant Cell Rep*, 1994, 13: 256-261.
- [12] DE BLOCK M. Factors influencing the tissue culture and the Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones [J]. *Plant Physiol*, 1990, 93: 1110-1116.
- [13] MA C, STRAUSS S H, MELAN R. Agrobacterium mediated transformation of the genome sequenced poplar clone, Nisqually 1 (Populus trichocarpa) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2004, 22: 1-9.
- [14] 樊军锋, 韩一凡, 李玲, 等. 84K杨树耐盐基因转化研究 [J]. *西北林学院学报*, 2002, 17(4): 33-37.
- [15] THAKUR A K, SHARMA S, SRIVASTAVA DK. Plant regeneration and genetic transformation studies in petiole tissue of Himalayan poplar (Populus ciliata Will.) [J]. *Current Science*, 2005, 89(4): 664-668.
- [16] 张冰玉, 苏晓华, 李义良, 等. 转抗鞘翅目害虫基因银腺杨的获得及其抗虫性的初步研究 [J]. *北京林业大学学报*, 2006, 28(2): 102-105.

- [17] HANK H, MILAN R, MAC, et al. An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*) [J]. *Hort Cell Reports*, 2000, 19(3): 315-320.
- [18] TZIFRA T, JENSEN C S, WANG W, et al. Transgenic *Populus tremula*: a step by step protocol for its *Agrobacterium* mediated transformation [J]. *Molecular Biology Reporter*, 1997, 15: 219-235.
- [19] 赵世民, 祖国诚, 刘根齐, 等. 通过农杆菌介导法将免防御素 NP 1 基因导入毛白杨 [J]. *遗传学报*, 1999, 26(6): 711-714.
- [20] 饶红宇, 陈英, 黄敏仁, 等. 杨树 NL-80106 转 B 基因植株的获得及抗虫性 [J]. *植物资源与环境学报*, 2000, 9(2): 1-5.
- [21] 樊军锋, 韩一凡, 李玲, 等. 84K 杨树耐盐基因转化研究 [J]. *西北林学院学报*, 2002, 17(4): 33-37.
- [22] CONFALONERI M, BALESTRAZZI A, BISOFFI S, et al. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation in several black poplar clones [J]. *Hort Cell Tissue Organ Culture*, 1995, 43: 215-222.
- [23] 付永彩, 成卓敏. 农杆菌介导的禾本科作物遗传转化新进展 [J]. *农业生物技术学报*, 1999, 10(3): 1-5.
- [24] HUANG F H, LI X Y. Effects of concentration of acetosyringone and *Agrobacterium tumefaciens* on *Gus* gene transformation efficiency of *Populus* [J]. *In Vitro*, 1994, 30: 67.
- [25] 王树耀, 田宗城, 王云, 等. G₁NHX1 基因转化 84K 杨 [J]. *湖南文理学院学报: 自然科学版*, 2005, 17(1): 60-63.
- [26] 刘斌, 李红双, 王其会, 等. 反义磷脂酶 D 基因转化毛白杨的研究 [J]. *遗传*, 2002, 24(1): 40-44.
- [27] 孟亮, 李双红, 金德敏, 等. 转几丁质酶基因黑杨的获得 [J]. *生物技术通报*, 2004, 3: 48-51.
- [28] 韩琳娜, 周春江, 崔德才, 等. 转 BC2 基因黑杨植株的获得 [J]. *山东农业大学学报: 自然科学版*, 2004, 35(3): 375-378.
- [29] 赵强, 赵志文, 张延婷, 等. 豇豆胰蛋白酶抑制剂 (GpT) 基因转化欧美杨的研究 [J]. *生物技术通报*, 2005(4): 54-58.
- [30] 王关林, 方宏筠. *植物基因工程* M. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [31] HILLATI J J, KISER J, ROSE R, et al. Efficient transfer for a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector [J]. *Bio Technology*, 1987, 5: 726-730.
- [32] BRASILEIRO A C M, TOURNEUR C, LEPLE J C, et al. Expression of the mutant *Arabidopsis thaliana* acetate synthase gene confers chlorosulfuron resistance to transgenic poplar plants [J]. *Transgenic Res*, 1992, 1: 133-141.
- [33] CONFALONERI M, BELENCH B, BALESTRAZZI A, et al. Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. 'Villafranca' and evaluation of herbicide resistance [J]. *Hort Cell Rep*, 2000, 19: 978-982.
- [34] 邹维华, 赵强, 崔德才, 等. 反义磷脂酶 D 基因与几丁质酶基因转化美洲黑杨 G2 [J]. *林业科学*, 2006, 42(1): 37-42.
- [35] MOHRI T, IGASAKI T, FUTAMURA N, et al. Morphological changes in transgenic poplar induced by expression of the rice homeobox gene OSH1 [J]. *Hort Cell Rep*, 1999, 18: 816-819.
- [36] IGASAKI T, ISHIDA Y, MOHRI T, et al. Transformation of populus alba and direct selection of transformants with the herbicide bialaphos [J]. *Bulletin of FFPRI*, 2002, 1: 235-240.
- [37] 王树耀, 陈其军, 王文龙, 等. 转 G₁NHX1 基因耐盐 84K 杨的培育 [J]. *科学通讯*, 2005, 50(2): 140-144.
- [38] 于志水, 高胜军, 赵继海, 等. 杨树转化系统再生初步研究及卡那霉素敏感性测定 [J]. *辽宁林业科技*, 2003, 5: 9-10.
- [39] 孙宇飞, 高秀华, 赵彦修, 等. 欧美 107 杨组织培养再生系统的建立 [J]. *山东师范大学学报: 自然科学版*, 2004, 19(2): 85-87.