

农杆菌介导的药用植物遗传转化

张家辉 杨蕊 (西南大学生命科学学院, 重庆 400715)

摘要 利用根癌农杆菌、发根农杆菌介导药用植物的遗传转化。对转化过程中转化方法及转化后的鉴定、影响植物遗传转化的因素与次生代谢产物以及转基因药用植物的获得等方面进行综述。

关键词 农杆菌; Ti 质粒; R 质粒; 药用植物

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)23-6136-02

Gene transformation of *Agrobacterium* mediated in the Medical Plant

ZHANG Jia-hui et al (School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715)

Abstract The gene transformation of medical plant was mediated by *agrobacterium tumefaciens* and *agrobacterium rhizogenes*. In this report the transformed method of agrobacterium, the appraisal after transformation, the element affecting the induction of transformation and acquirement of secondary metabolites and plant regeneration were reviewed.

Key words *Agrobacterium*; Ti plasmid; R plasmid; Medical plant

1 农杆菌及其作用机理

农杆菌可分为根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)和发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)，农杆菌是一种革兰氏阴性菌，能侵染大多数的双子叶植物、少数单子叶植物^[1]及个别的裸子植物^[2]，它诱发被感染植物的受伤部位长出冠瘿瘤和毛状根。农杆菌的这种特性是基于它具有能诱导冠瘿瘤产生的 Ti 质粒和毛状根产生的 R 质粒，Ti 质粒与 R 质粒是农杆菌染色体外的巨大质粒，在这两种质粒上，存在与转化有关的 2 个主要功能区，即 T-DNA(转移区)和 Vir(致病区)。Vir 区基因并不发生转移，但它对 T-DNA 的转移非常重要。当农杆菌感染植物时 Ti 质粒和 R 质粒上的 T-DNA 可以转化并插入到植物细胞基因组中，其整合和表达的结果导致了大量冠瘿瘤和毛状根的产生。

农杆菌侵染植物形成的冠瘿瘤和毛状根经离体培养能够再生植株，并且许多植物的毛状根在离体培养条件下表现出次生代谢产物的合成能力，产物产量较正常植物及悬浮培养细胞的要高，因此 R 质粒可应用于有价值的次生代谢产物的生产^[2]。近十几年来的研究发现，R 质粒转化系统比 Ti 质粒转化系统具有一定的优越性而被广泛重视，但是由根癌农杆菌转化植物后从冠瘿瘤快速获得转基因再生植株也是育种的有效途径。

2 R、Ti 质粒转化药用植物诱导毛状根及植株再生

2.1 转化方法 农杆菌感染植物的方法通常有 3 种，即外植体共培养接种法、原生质体共培养转化法和活体接种法^[3]。在药用植物转化方面，应用最多的是外植体共培养接种法，此方法操作简便，易于转化，主要包括 5 个主要过程：外植体预培养、外植体的农杆菌接种、农杆菌与外植体共培养、外植体的脱菌培养、转化体的选择培养^[4]。

2.2 转化与鉴定

2.2.1 转化。应用农杆菌 Ti、R 质粒转化植物时既可以将 T-DNA 上所携带的基因直接转入植物基因组中，又可以先对质粒进行遗传操作，通过中间载体或二元载体将外源基因导入质粒中，再进行遗传转化。经农杆菌侵染后的外植体，经

过一定的诱导培养和连续的抑菌培养，即可得到脱菌的毛状根或冠瘿瘤。绝大多数转化根具有典型毛状根特征：具大量白色根毛，分支多，向上、贴壁向上或沿培养基水平生长，失去向地性。与一般毛状根不同的是墨旱莲毛状根为绿色^[5]。经转化后获得的冠瘿瘤在激素作用下再生出植株，使众多植物遗传改造成为可能，也使植物改良方法更趋简单。

2.2.2 鉴定。为获得真正的转基因植株或毛状根，进行基因转化后的第 1 步工作是筛选转化细胞。在含有选择压力的培养基上诱导转化细胞分化，形成转化芽或毛状根。第 2 步是对转化植株或毛状根进行分子生物学鉴定，通过 Southern 杂交证明外源基因在植物染色体的整合；原位杂交确定外源基因在染色体上整合的位点；Northern 杂交证明外源基因在植物细胞内是否正常转录，生成特异的 mRNA。第 3 步是进行性状鉴定及外源基因的表达调控研究。

2.3 影响转化的因素

2.3.1 菌株的影响。不同菌株对转化频率有一定的影响。孙敏等^[6]发现，在相同的转化条件下，A4 的转化频率高于 R1000；刘峻等^[7]在人参转化过程中，使用菌株 1601、LBA91-8、R1000、A4、R15834 分别侵染，然而只有 15834 菌株可转化人参毛状根，这说明不同的菌株具有不同的致根能力。刘明志^[8]在根癌农杆菌转化苜蓿中，菌株 C58 比 T37 具有强致癌作用。许多试验证实，农杆菌型菌株(如 A4、1601、LBA9402、15834 等)比甘露碱型菌株往往具有更广泛的寄主范围，农杆菌型菌株之所以具有较强的生根能力，可能与 T-DNA 存在生长素基因有关。

2.3.2 外植体材料来源及生理状态的影响。不同植物的同一外植体、同一植物的不同外植体以及同一外植体的不同发育阶段的转化效率都有明显的差异。从外植体选择来看，应选择幼年型的外植体，同时，还应选择增殖能力强、遗传稳定性好的外植体。刘传飞等^[9]用 R1601 菌株感染 3 种葛属植物，结果表明，三裂叶葛叶片外植体产生毛状根的几率为 28%，而野葛和山葛叶片外植体分别为 15%、17%。王莉等^[10]用发根农杆菌 LBA9402 对何首乌叶、叶柄和茎切段感染诱导，发现无菌苗小植株叶的诱导率高达 100%，而叶柄和茎的诱导率分别为 66.7%、46.7%。陈丙春等^[11]用根癌农杆菌介导蓝竹耳的转化中，茎段作为外植体，其转化芽诱导率要高于叶盘的转化芽诱导率，而且其转化比叶盘的转化芽健壮。这些都表明，幼嫩的

生长旺盛的组织对农杆菌更敏感,它们被感染后,伤口附近的细胞较易脱分化形成较多的感受态细胞,从而有利于农杆菌介导植物转化。

2.3.3 预培养和共培养时间的影响。预培养和共培养时间对转化效率也有较大的影响,农杆菌感染外植体后,伤口处的细胞因为过敏反应而导致褐化,严重影响转化效率。通过一定时间的预培养,能够较好地解决褐化问题,并且外植体通过预培养能适应试管离体培养的条件,保持活跃的生长代谢状态。同时,预培养也减少外植体转化过程中的杂菌污染率。孙敏等^[6]在研究长春花毛状根的转化时,发现预培养0~7 d后转化的外植体有不同的转化频率,预培养2 d转化频率最高为44.44%。转化后的外植体共培养0~5 d具有不同的转化频率,共培养2 d转化频率最高为50.70%。郑秀芳等^[12]在研究根癌农杆菌介导的马铃薯遗传转化研究结果表明:随着预培养时间的延长,得到抗性愈伤比率随之增高,以4 d最高。

2.3.4 活化因子的影响。植物受伤害后产生的酚类物质能够激活 *Vir* 基因,促使农杆菌质粒向植物细胞转移。在实际应用中,可以人为地在转化系统中加入某种酚类物质,起到促进基因转化的作用^[13]。目前已经发现有9种这样的信号分子,其中乙酰丁香酮(AS)和羟基乙酰丁香酮(OH AS)作用最强。在转化药用作物中,大多使用AS。如刘峻等^[14]在人参带叶幼茎转化过程中,利用100 $\mu\text{mol/L}$ 的AS处理明显提高转化率并缩短时间。但是,AS浓度过高反而会降低转化频率,这是因为过量的AS会对外植体产生毒害作用。

2.3.5 外源激素及抗生素的影响。在共培养阶段加入适量的外源激素对转化有一定的影响。王冲之等^[15]用添加2,4-D 1 mg/L、KT 0.1 mg/L的MS琼脂培养基,未能诱导出毛状根,而使用添加NAA 6 mg/L的MS琼脂培养基进行农杆菌与外植体共培养,成功地获得了毛状根。另外,选用不同的抗生素对植物转化效率也有一定的影响,一般在分化阶段使用羧苄青霉素抑制农杆菌的生长,而发根阶段则使用头孢霉素。毛状根可在不加外源激素的培养基上生长,采用抗生素除菌培养能使其更好地生长^[16]。

2.3.6 温度的影响。温度是组织培养中的一个关键因素。对于农杆菌接到的植物遗传转化,早期实验研究表明,高温对根癌农杆菌的发育是有害的^[17]。一般而言,农杆菌介导的植物转化培养温度为 ± 25 。

3 次生代谢产物的产生和植物再生

3.1 次生代谢产物的产生快速高效获得药用植物有效成分的有效途径是用发根农杆菌转化药用植物获得毛状根,再通过HPLC等方法提取毛状根中的药用成分。近年来,利用毛状根转化技术获得次生代谢产物的研究,主要集中在提高一些价格高、产量低、需求量大的药物成分上。据不完全统计,国内外目前已对26科92种药用植物进行了毛状根诱导的研究,建立了长期的毛状根培养系统和获得了次生代谢产物。通过毛状根培养可生产的次生代谢产物有生物碱类(如吲哚生物碱、莨菪烷生物碱等)、甙类(如人参皂甙、甜菜甙等)、黄酮类、醌类(如紫草宁等)、多糖类、蛋白质(如天花粉蛋白等)和一些重要的生物酶(如超氧化物歧化酶)等。孙敏等^[18]用发根农杆菌ATCC15834感染萝芙

木的节间部分,叶片、叶柄等部位诱导产生毛状根,并对转化毛状根的4个无性系测定生物碱-利血平和阿马碱,4个毛状根无性系的利血平和阿马碱的含量均比原植物要高。张磊等^[19]将克隆到的东莨菪碱生物合成途径中的2个限速酶基因(上游:PMT基因,下游:HBH基因)以单转PMT、双转PMT和HBH、单转HBH方式转化药用植物天仙子,结果显示,转入的PMT和HBH基因能在毛状根中快速表达并获得比野生型和单转入PMT或HBH基因的毛状根中多的生物碱,其中最好的一组双基因转化毛状根的次生代谢产物东莨菪碱是野生型的9倍、单基因转化毛状根中的2倍。2000年,常振战等^[20]用容量5 L的生物反应器培养决明发根合成游离蒽醌进行了研究,结果发现在36 d培养期内收获决明发根761 g,发根鲜重增殖42倍。从而证明采用生物反应器培养植物发根比锥形瓶悬浮培养优越,可以在较短的培养期内获得较大的生物量。药用植物转化毛状根生产药用成分,为工业化生产某些药用植物、经济植物的有效成分开辟了新途径。

3.2 植株再生自1984年首次获得转基因烟草以来,随着农杆菌介导植物遗传转化技术的发展,科学家们已成功地创造了耐除草剂、抗病虫害、延迟果实成熟、雄性不育及作为生物反应器等具有新性状的转基因植物。例如,张磊等^[21]构建了以CaMV35S为启动子,新霉素磷酸转移酶(Npt^{II})为选择标记,带有半夏凝集素基因PTA的pCAMP A2200植物双元表达载体,应用根癌农杆菌EHA105遗传转化四倍体菘蓝以获得鳞翅目昆虫抗性。菘蓝外植体植株再生率达到95%以上,转化率为10%,建立了以6-BA和NAA为主要激素组合的四倍体菘蓝离体分化再生系统和农杆菌介导的转化系统。

利用发根农杆菌转化药用植物也可获得转基因药用植物。例如,刘伟华^[22]等用发根农杆菌的不同菌株通过叶盘法对药用植物桔梗进行转化获得毛状根,再进一步分化获得了转基因再生植株。利用R质粒转化还获得了龙胆、丹参、菘蓝等转基因植株,这些在育种上有进一步利用与开发的價值。

4 展望

近年来,农杆菌介导的药用植物遗传转化的研究取得了长足的进展,尤其在生产次生代谢产物方面得到广泛应用。但从总体来看,转化成功的药用植物主要集中在大多数双子叶植物上,转化效率不高、再生频率低、基因型依赖性强、对农杆菌侵染不敏感等问题阻碍了研究进展。今后研究的重点集中在进一步完善转化技术,例如:培养条件的优化,建立高效的遗传转化体系,毛状根和冠瘿组织的共培养,抗生素除菌和温度法相结合等。相信通过农杆菌介导药用植物的遗传转化工作能为全球的医疗事业提供强大的后背保障。

参考文献

- [1] LAMS. Genetic information on the R plasmid of *Agrobacterium rhizoz2* genes host specificity[J]. *Hort Sci Lett*, 1984, 34(3): 345-352.
- [2] 黄遵锡,慕跃林,周玉敏,等.发根农杆菌对短叶红豆杉的转化及毛状根中紫杉醇的产生[J].*云南植物研究*,1997,19(3):292-296.
- [3] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学出版社,1998.
- [4] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].北京:科学出版社,2002.

2.4.2 抗倒性。由表2可知,H4-1-1和H4-5-1的抗倒性最强,H04-21和H4-2-2的抗倒性较强,H04-28和CK的抗倒性

中等;而H04-22的抗倒性最弱。

表2 参试油菜新品种(系)主要性状的比较

品种 (H组合)	主要经济性状			生育期		菌核病			抗倒性	抗寒性	生长一致性			不育株 %
	角果数	角粒数	千粒重 g	成熟期	较CK± d	发病率 %	病指 %	苗期			薹期	成熟期		
H04-21	494.67	20.13	3.253	05-16~18	-2.0	28.92	19.12	强	54.2	较齐	较齐	齐	1.22	
H04-22	388.63	18.40	3.317	05-13~16	-3.0	33.22	18.95	较强	51.5	中	中	齐	2.01	
H04-28	448.20	16.03	3.293	05-12~15	-4.0	30.56	15.96	中	52.5	齐	齐	较齐	1.68	
H4-1-1	488.23	22.90	3.904	05-14~17	-2.33	18.11	9.75	强	54.9	齐	较齐	齐	1.78	
H4-2-2	404.07	22.10	3.255	05-12~17	-3.0	19.56	10.08	较强	53.6	较齐	较齐	较齐	2.88	
H4-5-1	443.50	18.60	3.443	05-15~18	-1.67	14.78	6.86	强	55.2	齐	齐	齐	2.01	
皖油14(CK)	473.23	17.93	3.199	05-16~20	-	20.89	10.66	中	46.6	齐	齐	齐	2.68	

2.4.3 抗寒性。由表2可见,各参试新品种(H组合)平均受冻率都较CK严重,其中H4-5-1冻害最为严重,受冻率为55.2%。

2.5 生长一致性 由表2可见,H04-28、H4-5-1和CK植株的生长一致性都较好,其余较好或中等。

2.6 不育株 由表2可见,除H4-2-2外,其他5个品种的平均不育株率均低于CK的2.68%。

3 品系简介

3.1 H4-1-1 3个试验点平均产量2961.7 kg/hm²,比皖油14(CK)增产12.13%,达极显著水平,居参试品种(H组合)首位。该品系品种主效最大,3个点都增产,是个丰产性好、适应性强的品种。成熟期平均比对照早2.33 d;单株有效果平均488.23个,角粒较多,为22.10粒,千粒重较重,为3.904 g;不育株率1.78%,菌核病发病率18.11%,平均病指9.75%;抗倒性强。建议推广种植。

3.2 H4-2-2 3个试验点平均产量2909.40 kg/hm²,比皖油14(CK)增产10.21%,达极显著水平,居参试品种(H组合)第2位。该品系品种主效第2,2个点增产,丰产性好,但对地区适应性有一定的要求。成熟期平均比对照早3 d;单株有效果平均404.07个,角粒较多,为22.90粒,千粒重为3.255 g;不育株率平均为2.88%,菌核病发病率19.56%,平均病指10.08%;抗倒性较强。建议推广种植。

3.3 H4-5-1 3个试验点平均产量2859.4 kg/hm²,比皖油14(CK)增产7.97%,达极显著水平,居参试品种(H组合)第

3位。该品系品种主效第3,3个点都增产,表现较好的丰产性,对地区的适应性较好。成熟期平均比对照早1.67 d;单株有效果平均443.50个,角粒数18.60粒,千粒重3.443 g;不育株率平均为2.01%,菌核病发病率14.78%,平均病指6.86%;抗倒性强。建议推广种植或参加生产性试验。

3.4 H04-21 3个试验点平均产量2785.0 kg/hm²,比皖油14(CK)增产5.45%,达极显著水平,居参试品种(H组合)第4位。表现较好的丰产性,地区适应性强。但该品系品种主效为负值。成熟期比对照早2 d;单株有效果平均494.67个,角粒数20.13粒,千粒重3.255 g;不育株率平均1.22%,菌核病发病率28.92%,平均病指19.12%;抗倒性一般。建议继续进行试验。

3.5 H04-28 3个试验点平均产量2490.0 kg/hm²,比皖油14(CK)减产5.69%,达极显著水平,居参试品种(H组合)第6位。表现较好的丰产性,对地区的适应性差。成熟期比对照早4 d;单株有效果平均448.20个,角粒数16.03粒,千粒重3.293 g;不育株率平均1.68%,菌核病发病率30.56%,平均病指15.96%;抗倒性差。建议继续参加试验1年。

3.6 H04-22 3个试验点平均产量2453.3 kg/hm²,比皖油14(CK)减产7.09%,达极显著水平,居参试品种(H组合)最后1位。丰产性较差,对地区的适应性差。成熟期比对照早3 d;单株有效果平均388.68个,角粒数18.4粒,千粒重3.317 g;不育株率平均2.01%,菌核病发病率33.22%,平均病指18.95%;抗倒性差。建议不再试验。

(上接第6137页)

[5] 张汉明,许铁锋,丁如贤,等.发根农杆菌RT-DNA对墨旱莲的遗传转化[J].中草药,2001,32(10):924-926.

[6] 孙敏,汪洪,王颖,等.长春花转化毛状根诱导及培养条件的优化[J].西南师范大学学报:自然科学版,2002,27(4):549-552.

[7] 刘峻,丁家宜,徐红,等.R质粒人参转化系统的建立及鉴定[J].中国中药杂志,2001,26(2):95-98.

[8] 刘明志.根癌农杆菌对苜蓿的转化及其特性[J].广西植物,2005,25(2):121-124.

[9] 刘传飞,李玲,施和平,等.野葛毛状根的诱导及离体培养[J].中国中药杂志,2000,25(9):525-527.

[10] 王莉,于荣敏,张辉,等.何首乌毛状根培养及其活性成分的产生[J].生物工程学报,2002,18(1):69-73.

[11] 陈丙春,齐一伯,唐宇,等.根癌农杆菌介导蓝猪耳的遗传转化[J].农业生物技术学报,2005,13(3):299-303.

[12] 郑秀芳,缪为,李名扬.根癌农杆菌介导的马铃薯遗传转化体系的研究[J].兰州大学学报:自然科学版,2005,41(3):41-44.

[13] RICHARD N. Culture Taxus tissues as a source of taxol, related taxanes and other novel anti-viral compounds[J].PCI/WO93/23,555,1993.

[14] 刘峻,丁家宜,徐红,等.R质粒人参转化系统的建立及鉴定[J].中国中药杂志,2001,26(2):95-98.

[15] 王冲之,丁家宜.R质粒转化西洋参的研究I.西洋参毛状根培养系统的建立及鉴定[J].药物生物技术,1999,6(2):80-84.

[16] 胡亚忱,曲德业.发根农杆菌诱导植物毛状根的发生及次生代谢物生产的研究进展[J].吉林师范大学学报:自然科学版,2005,2(1):31-35.

[17] 高武军,魏开发,孙富丛,等.温度对根癌农杆菌转化效率的影响[J].华北农学报,2004,19(2):81-83.

[18] 孙敏,汤绍虎.转化毛状根获得萝芙木生物碱的研究[J].生物工程学报,1993,9(3):287-290.

[19] LIH ZHANG, RUIAN DING. Engineering tropane biosynthetic pathway in *hyoscyamus niger* hairy root cultures[J]. PNAS,2004,4(27):6786-6791.

[20] 常振战,果德安,郑俊华,等.用生物反应器培养决明发根合成游离葱醌化合物[J].北京医科大学学报,2000,32(2):142-144.

[21] 张磊,许铁峰,唐克轩,等.四倍体菘蓝转抗虫基因研究I.根癌农杆菌介导的转基因菘蓝[J].中草药,2003,34(3):258-261.

[22] 刘伟华,姜静,谢桂芹,等.R质粒转化桔梗再生植株的研究[J].生物技术,1994,4(2):24-29.