

## 农杆菌介导的果树转基因研究进展

刘松瑜, 谢深喜, 陶爱群, 周亚洲, 周力, 沈程清

(湖南农业大学园艺园林学院, 长沙 410128)

**摘要:** 农杆菌介导法在果树遗传改良中有广阔的应用前景, 农杆菌介导法的受体系统有原生质体、愈伤组织、直接分化芽和胚状体受体系统等; 影响农杆菌转化频率的因素有侵染力, 抗生素, 基因型等; 常用检测方法有GUS活性检测, PCR技术, 杂交检测, 免疫学检测。从农杆菌介导法在果树中的各种转化受体系统、影响果树基因转化的主要因素和转化植株的检测等方面进行综述, 为不同果树建立高效的基因转化体系提供参考。

**关键词:** 受体系统; 农杆菌; 侵染力; 检测

中图分类号: S663.9 文献标识码: A

### Research Progress of Gene Transformation in Fruit Tree Using *Agrobacterium tumefaciens*

Liu Songyu, Xie Shenxi, Tao Aiqun, Zhou Yazhou, Zhou Li, Shen Chengqing

(Horticulture and Landscape College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

**Abstract:** *Agrobacterium*-mediated method has broad application prospects in the genetic improvement of fruit trees. The *Agrobacterium*-mediated receptor system has protoplast receptor systems, callus receptor systems, direct bud differentiation receptor system and embryoid Body systems. The factors of affecting the frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation include infection, antibiotics; genotype. Commonly methods of testing include GUS activity detection, PCR technology, hybridization, and immunological detection. This article is reviewed on the *Agrobacterium*-mediated in a variety receptor system of fruit trees, transforming ways, main factors affecting transformation of fruit genes and the detections and so on, and provide references for different fruit trees to establish highly efficient gene transfer systems.

**Key words:** receptor system, *Agrobacterium*, infective ability, detection

转基因技术是从分子水平上用人工方法, 有目的地将外源基因或DNA导入植物细胞内, 使与染色体整合、表达、遗传的综合生物技术<sup>[1]</sup>。自20世纪80年代初科学家们首次利用土壤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)将外源基因导入植物细胞并获得抗卡那霉素的植株以来, 已经发展出多种植物转基因技术<sup>[2]</sup>, 植物转基因的方法主要有农杆菌介导法、基因枪法、激光法、花粉管通道法等<sup>[3]</sup>。在植物上转化成功的例子中, 80%是由农杆菌介导转化的<sup>[4]</sup>。自1988年首例使

用农杆菌转化成功的转基因果树—核桃诞生以来<sup>[5]</sup>, 在全世界果树研究者的努力下, 已取得不小的成就, 应用此法在葡萄、欧洲李、苹果砧木M26、杏、草莓、柑橘等树种上也相继得到了转基因植株。农杆菌介导法以其简便、高效成为应用最广泛的转化方法<sup>[6]</sup>。

农杆菌是一种革兰氏阴性土壤杆菌。现已发现, 与植物基因转化有关的有两种类型: 一为根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*), 它含有Ti质粒, 能诱导被侵染的植物细胞形成肿瘤, 即诱发冠瘿瘤; 二为发根农

基金项目: 湖南省重点课题“转基因rol在梨树上的表达及效应研究”(04TT1007)。

第一作者简介: 刘松瑜, 男, 1983年出生, 硕士, 果树学专业, 分子生物学方向。通信地址: 410128 湖南农业大学1872信箱, E-mail: liusongyu1@126.com。

通讯作者: 谢深喜, 男, 教授, 博士生导师。通信地址: 410128 湖南农业大学园艺园林学院果树教研室。

收稿日期: 2009-01-09, 修回日期: 2009-03-25。

杆菌(*Agrobacterium riurhizogenes*),它含有 Ri 质粒,能够诱导被侵染的植物细胞产生毛状根。Ti 质粒(包括 Ri 质粒)上有一段转移 DNA(transferDNA, 又称 T-DNA),在农杆菌侵染植物时,这段 DNA 可以插入到植物基因组中,使其携带的基因在植物中得以表达。由于 T-DNA 能够进行高频率的转移,而且 Ti 质粒和 Ri 质粒上可插入大到 50 kb 的外源基因。因此,农杆菌介导法是利用根癌农杆菌和发根农杆菌将目的基因导入植物细胞和组织,Ti 质粒和 Ri 质粒就成为植物基因转化的理想载体系统<sup>[7]</sup>。

### 1 果树农杆菌介导法转化的受体系统

目前,农杆菌介导法的受体系统有原生质体受体系统,愈伤组织受体系统,直接分化芽受体系统,胚状体受体系统等。

原生质体作为受体系统在柑橘中得到很多应用,柑橘的原生质体分离及再生技术较其他物种成熟,柑橘转基因研究最先以原生质体及胚性悬浮细胞为外植体,用原生质体作外植体,可以避免转化嵌合体的出现,从而简化随后的筛选步骤。

愈伤组织受体系统和直接分化芽受体系统在许多果树中得到应用:在草莓遗传转化研究中,以草莓的叶片、叶柄和愈伤组织等为外植体,经农杆菌浸染后,通过抗生素筛选、器官发生获得再生植株<sup>[8]</sup>。1990年,Nehra等<sup>[9]</sup>在建立草莓叶片直接高频再生体系的基础上,以草莓品种‘Redcoat’的愈伤组织和叶盘为外植体,用农杆菌介导法将 *gus* 和 *nptII* 基因导入草莓,分别得到 3%和 6.5%的转化率。

关于直接分化芽受体系统,Mullins等、Berres等先后以葡萄叶柄、叶片、茎段、茎尖碎片与农杆菌共培养,再生的不定芽也均为嵌合体<sup>[9-10]</sup>。李秀梅等以金花梨花后 65 天的成熟胚子叶为外植体。研究了不同培养基、BA 浓度、暗培养条件及  $AgNO_3$  浓度对子叶不定梢再生的影响<sup>[11]</sup>。核果类最常用的外植体为叶片、未成熟合子胚、体细胞胚、下胚轴和茎:Miguel 等用离体培养的叶片外植体为起始材料首次建立了表达 *nptII* 和 *gus* 基因的扁桃品种 Boa Casta 转基因克隆<sup>[12]</sup>。Rugini 在苹果上发展了一种“双重再生体系”,以不定芽为外植体,该技术已成功地用于樱桃品种 Stella 的转化<sup>[13]</sup>。

胚状体发生途径不仅使细胞与农杆菌充分接触,产生大量的转化细胞,还能和抗生素更好地紧密接触,减少逃脱筛选的细胞。迄今为止,转基因植物大多是通过胚状体发生途径获得的。但胚状体的诱导比不定

芽的诱导困难。Tsvetkov I J 等提出一种适合葡萄遗传转化的方案:胚的诱导有两个外植体来源,一种是无籽葡萄(*Vitis vinifera* L.)未成熟胚珠合子胚,一种是砧木品种(*Vitis rupestriscv Rupestris du Lot*)的叶片组织<sup>[14]</sup>。

### 2 影响农杆菌转化频率的因素

常见的影响农杆菌转化频率的因素有三大类:侵染力,抗生素,基因型。

#### 2.1 侵染力

农杆菌作为植物转化的工具,长期以来人们在转化过程中都将研究重点放在对农杆菌的选择和处理上。农杆菌的侵染力取决于本身的特性及其受体植株的敏感性。细菌的菌株对转化频率的影响很大。最常用的致瘤农杆菌菌株是 LBA4404, EHA105 和 EHA101,也常用 A208SE, A136, C58/Z707,最常用的发根农杆菌菌株则是 1855NCPB 和 ATCC15834。共培养的时间为 24~36 h,此后,须向再生培养基中加入抗生素如羧苄青霉素以抑制细菌的生长。同一果树,不同农杆菌对其的转化效率也不同。对于亚洲杜梨属子叶为受体,Kaneyoshi 等<sup>[15]</sup>,发现几种农杆菌对其的侵染性不同,AKE10TC1 的侵染力强于 AKE10,而采用 Oct 型(章鱼碱型)工程菌 LBA4404 则不能获得转基因植株。张志宏对于苹果的研究发现,不同菌株对乔纳金叶片的转化效率相差极显著,琥珀碱型菌株 EHA105 的转化率远高于章鱼碱型菌株 LBA4404<sup>[16]</sup>。

#### 2.2 抗生素

抗生素的浓度,种类对转化都会产生影响。常用的卡那霉素,用量 50~100  $\mu\text{g/ml}$ ,因物种不同而异,卡那霉素的浓度和加入时间须根据外植体和物种的不同进行预先实验。研究表明,卡那霉素强烈抑制苹果叶片再生,5 mg/L 即完全抑制芽再生<sup>[17]</sup>。对于梨的转基因研究中,新霉素磷酸转移酶(Npt)基因是梨遗传转化中最常用的一种选择标记基因,在转化砧木品种 PS217 时,潮霉素磷酸转移酶(hpt)基因比新霉素磷酸转移酶基因更为有效<sup>[18]</sup>。

#### 2.3 基因型

基因型是影响果树遗传转化率的重要因素,其特异性一般认为与材料的生理状态有关,不同株系间进行转化有差别,且同一属间差异也往往较大。转化细胞能否高效再生是基因转化的主要障碍,受到所用组织的很大影响。梨树转基因研究目前获得的转基因植株中仅有欧洲梨及少量砧木品种,而砂梨、白梨、新疆梨等东方梨系还未成功,且同一属间差异往往也大<sup>[18]</sup>:

苹果中的M26,皇家嘎拉再生能力强于其他品种,因此成为苹果基因转化的模式品种和类型<sup>[19]</sup>。

### 3 果树转基因植物的检测

通过农杆菌介导法转化后,先通过抗性筛选获得抗性芽后生成植株,再对抗性植株进行检测,检测阳性的植株才是真止的转基因植株。分别从整合、转录、翻译水平检测外源基因的行为。常用的检测方法有GUS活性检测,PCR技术杂交检测,免疫学检测。

#### 3.1 GUS活性检测

GUS基因是研究外源基因瞬时表达转化试验中的报告基因。GUS活性检测多采用组织化学染色法,转化组织与对照组织相比呈可区分的蓝色。GUS活性检测是柑橘转基因植株检测的一种常规方法,在柑橘转基因植株鉴定中有着广泛应用<sup>[20]</sup>。

#### 3.2 PCR技术

PCR技术是近几年发展起来的一种体外扩增特异性DNA片段的技术,主要有常规定性PCR技术、多重PCR技术(MPCR)、PCR-GeneScan、实时荧光定量PCR(RT-FPCR)、电化学发光PCR(ECL-PCR)、PCR-ELISA法。PCR已成功用于柑橘转基因植株的检测<sup>[20]</sup>。根据植物表达载体上的已知序列,如gus基因和卡那霉素抗性基因,以及插入到表达载体中的目的基因设计合适的引物,通过PCR扩增验证这些已知序列是否存在,为外源基因整合的检测提供了便利条件,从而判断某植株是否是转基因植株。杨东燕<sup>[21]</sup>等采用PCR技术,建立对抗环斑病毒转基因番木瓜55—1进行品系鉴定的检验方法。

#### 3.3 杂交检测

外源基因导入植物后,转基因植株在DNA、RNA及蛋白质水平上均与对照存在差异,这三种水平的差异可分别通过Southern杂交、Northern杂交和Western杂交得到检测。通过Southern杂交可以检测基因是否整合,大多数转基因植株都采用Southern杂交这种方法检测。在柑橘,杏的转基因检测中得到广泛应用<sup>[22]</sup>。而通过Northern或Western杂交则可以检测基因是否表达,Northern杂交于草莓中得到广泛应用<sup>[22]</sup>。

#### 3.4 免疫学检测

ELISA法原理是利用抗原和抗体的特异性结合。酶联免疫法(ELISA)也是蛋白质水平的一种检测方法,在柑橘转基因植株鉴定中也有应用<sup>[20]</sup>。

### 4 农杆菌介导法在果树中的应用

目前,梨的遗传转化普遍采用了农杆菌介导法(Ti质粒法),Mourgues等首次通过农杆菌法成功地将gus及nptII基因导入康弗伦斯,并获得高达42.7%的遗传转化率<sup>[23]</sup>。此后,这种方法在梨转基因中得到了广泛应用。目前康弗伦斯、帕西、杜康Doyenne du Comice、Bourre Bosc等西洋梨品种已成功实现转基因并获得了转基因植株<sup>[24]</sup>。汤绍虎等<sup>[25]</sup>以‘雪青’梨叶片愈伤组织为外植体,经根癌农杆菌介导将CaMV35S启动子调控下的CryIac基因导入‘雪青’梨。

草莓的基因转化重点应用了根癌农杆菌介导法,在草莓转基因研究探索了以草莓的叶片、叶柄和愈伤组织等为外植体,经农杆菌浸染后,通过抗生素筛选、器官发生获得再生植株,并提出许多重要方法与思路。James等<sup>[26]</sup>利用双元Ti质粒载体pB1N6(含noslnptII基因)和pSSI(含nptWipt基因)转化草莓的叶片和叶柄,获得了再生植株。E1-Mansouri I等<sup>[27]</sup>用农杆菌LBA4404将含noslnptII基因导入草莓中,再生芽能在含25 mg/L Kan的生根培养基中生根,并成功移栽到大田中。Mathews等<sup>[28]</sup>在前人研究的基础上,采用了逐步提高筛选压力和保持选择压力不变两种方法继代转基因芽,经gus组织染色、PCR和Southern检测表明,逐步提高选择压力没有嵌合体的产生,为今后进行转基因研究提供了一种新的思路。美国的Oosumi等<sup>[29]</sup>用农杆菌介导法将潮霉素磷酸转移酶基因hpt导入草莓,获得了100%的转化率,为导入有经济价值的目的基因奠定了坚实的基础。

在柑橘转基因上,Hidaka等<sup>[30]</sup>于1990年首次用农杆菌介导的转化法获得了一株华盛顿脐橙的转基因植株,以后农杆菌感染法在柑橘转基因中得到广泛应用。Fisk等成功地将gus基因导入里斯本和尤力克柠檬,Wong等在柑橘中成功地反义导入ACC合成酶基因<sup>[31]</sup>,华中农业大学邓秀新<sup>[32]</sup>小组成功地将新型的报告基因—绿色荧光蛋白导入印度酸橘,并实现了柑少籽转基因,美国研究者Costa等将类胡萝卜素合成基因导入了葡萄柚。Gentile等<sup>[33]</sup>获得了5个转rolA、rolB、rolC组合基因系<sup>[31]</sup>。

1990年首例报道成功得到转基因葡萄再生植株<sup>[34]</sup>,脱毒根癌农杆菌已成为在葡萄细胞中引入外源DNA的最常用的方法之后,之后的研究使用了报告基因,在葡萄的体细胞胚,愈伤组织和其他器官,转入目的基因上不断取得进展。Krastanova等通过农杆菌系

LBA4404 将 GFLV-FB 的 CP 基因导入了沙地葡萄和 110Richter 花粉的胚性愈伤组织和成熟胚的下胚轴碎片中,得到再生植<sup>[35]</sup>。Yamamoto 等把 RCC2(属于 Class I 几丁质酶)通过农杆菌侵染引入葡萄(*Vitis vinifera* L. cv *Neo Muscat*)的体胚,获得了 2 株转化植株,提高了对白粉病的抗性<sup>[36]</sup>。

### 5 果树农杆菌介导法转基因研究展望

传统的果树品种的改良工作主要是通过杂交育种,这需要漫长的时间。通过农杆菌介导法转化得到一些抗虫、抗逆、抗病毒、改良果实品质等转基因植株,并通过组织培养、嫁接或其他无性繁殖方式大量繁殖,可以稳定地保留该基因并缩短了育种年限,在果树的应用中已取得很大的成绩,对果树育种具有重大的理论意义和实践意义。

迄今为止,转基因植物大多是通过胚状体发生途径获得的,但胚状体的诱导比不定芽的诱导困难。因此,可研究采用其他受体系统如愈伤组织、直接分化芽和原生质体受体系统,如受体系统用原生质体作外植体,在柑橘中得到很多应用,可以避免转化嵌合体的出现。另外,在提高农杆菌侵染力上,针对不同受体系统研究选择适宜菌株,和合适浓度的抗生素,可提高转化的效率。

综上所述,随着研究手段的不断更新和改进,以及细胞生物学和分子生物学等理论与技术的发展,农杆菌介导法作为转基因技术的一个重要部分,将在果树抗虫、抗逆、抗病毒、改良果实品质等方面发挥更大的作用。

### 参考文献

- [1] 王中英,王艺,童德中. 生物技术在果树上的应用. 世界农业,1997,12:20-23.
- [2] 黄铃,包巨南. 转基因技术的发展及其社会影响. 化工时刊,2007,21(04):50-55,77.
- [3] 贾士荣,曹冬孙. 转基因植物. 植物生理学通讯,1992,9(2):315.
- [4] 陈丽梅,潘俊松,何欢乐,等. 农杆菌介导的基因转化研究进展. 甘肃科学学报,2005,6(2):61-63.
- [5] McGranahan GH, Leslic CA, Uratsu SL. *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Bio/Technology*, 1988,6:800-804.
- [6] 陶兴林. 甜瓜高效再生体系、转化体系的建立与优化[D]. 兰州:甘肃农业大学,2005:17-18.
- [7] 秦永华,张上隆. 草莓转基因研究进展. 遗传 HEREDITAS,2007,29(2):150-156.
- [8] MULLINS MICHAEL G, ARCHIE TANG F C, FACCIOTTI DANIEL. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevines: transgenic plants of *Vitis rupestris* Scheele and nuds of *Vitis vinifera* L.. *Bio/Technology*,1990,8:1041-1045.
- [9] BERRES R, OTTEN L, THNLAND B, et al. Transformation of vitis by different strains of *Agrobacterium tumefaciens* containing the T-6b gene. *Plant Cell Reports*,1992,11:192-195.
- [10] 李秀梅,汤浩茹,罗娅. 金花梨子叶不定梢再生研究. 果树学报 2004,21(4):295-297.
- [11] Miguel CM, Oliverian MM. Transgenic almond plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf explants. *Plant Cell Rep*, 1999, 18:387-393.
- [12] Rugini E, Muganu M. A novel strategy for the induction and maintenance of shoot regeneration from callus derived from established shoots of apple (*Malus domestica* Borkh) cv. Golden Delicious. *Plant Cell Rep*,1998,17:581-585.
- [13] TSVEKOV I J, ATANASSOV A I, TSOLOVA V M. Gene transfer for stress resistance in grapes. *Acta Horticulturae*,2000,528:389-394.
- [14] Mourgues F, Chevreau E, Lambert C, et al. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell Reports*, 1996, 16: 215-219.
- [15] 张志宏. 苹果叶片离体再生不定芽及遗传转化研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,1996.
- [16] 师校欣,王斌,杜国强,等. 根癌农杆菌介导豇豆胰蛋白酶抑制剂基因转入苹果主栽品种. 园艺学报,2000,27(4):282-284.
- [17] 刘翠琼,汤浩茹. 梨叶片培养与转基因研究进展. 果树学报,2003,20(5):374-378.
- [18] 邵建柱,马宝焜. 转基因苹果研究进展. 果树学报,2003,20(1):49-53.
- [19] 陈成忠. 荧光原位杂交技术及其应用. 生物学教学,2007,32(1): 2-4.
- [20] 蒋迪,徐昌杰,陈大明,等. 柑橘转基因研究的现状及展望. 果树学报,2002,19(1):48-52.
- [21] 杨冬燕,杨永存,邓平建. 抗环斑病毒转基因番木瓜 55—1 的 PCR 检测. 中国公共卫生,2007,(1):91-92.
- [22] 宫雪超,于丽杰,高金秋. 转基因植物的检测与鉴定. 牡丹江师范学院学报,2007,(1):15-17.
- [23] Mourgues F, Chevreau E, Lambert C, et al. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell Reports*,1996,16: 215-219.
- [24] Zhu LH, Welander M. Adventitious shoot regeneration of two dwarfing pear rootstocks and the development of a transformation protocol. *J Hort Sci&Biotech*,2000,75(6):745-752.
- [25] 汤绍虎,孙敏,廖志华,等. 根癌农杆菌介导 CryIAc 基因转化‘雪青’梨获得转基因植株. 园艺学报,2007,34(1):59-62.
- [26] James DJ, Passey AJ, Barbara DJ. *Agrobacterium*-mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria ananassa* Duch) using disarmed binary vectors. *Plant Sci*,1990,69:79-94.
- [27] El-Mansouri I, Mercado JA, Valpuesta V, et al. Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fragaria vesca* L.

- Plant Cell Rep.1996,15(8):642-646.
- [28] Mathews H, Dewey Wagoner W Bestwick RK. Molecular and cellular evidence of chimaeric tissues in primary transgenic and elimination of chimaerism through improved selection protocols. *Transgenic Research*,1998,7(2):123-129.
- [29] Oosumi T, Gruszewski HA, Blischak LA, et al. High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta*,2006,223(6):1219-1230.
- [30] Hidaka T, Omura M, Ugaki M, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweer orange and regeneration of transgenic plants. *Plant cell Rep*,1995,14:616-619.
- [31] 杨莉,徐昌杰,陈昆松. 果树转基因研究进展与产业化展望. *果树学报*,2003,20(5):331-337.
- [32] 石玮,李东栋,邓秀新,等. 根癌农杆菌介导绿色荧光蛋白基因转化印度酸橘的研究. *园艺学报*,2002,29(2):109-122.
- [33] 胡春华,邓子牛,A.Gentile,等. 转rol基因枳橙分子鉴定及部分生物学的观测. *园艺学报*,2006,33(1):130-13.
- [34] MULLINS MICHAEL G, ARCHIE TANG F C, FACCIOTTI DANIEL. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevines:transgenic plants of *Vitis rupestris* Scheele and nuds of *Vitis vinifera* L.. *Bio/Technology*,1990,8:1041-1045.
- [35] KRASTANOVA S, PERRIN M, BARBIER P, et al. Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of grapevine fanleaf nepovirus. *Plant Cell Reports*,1995,14:550-554.
- [36] YAMAMOTO T, IKETANI H, IEKI H, et al. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Reports*,2000,19:639-646.