

致瘤农杆菌能够转化大麦和小麦*

邓万银 林晓影 邵启全

(中国科学院遗传研究所, 北京)

摘 要

直到现在, 单子叶植物特别是禾谷类作物的基因工程还没有合适的载体系统. 本文首次报道了致瘤农杆菌 T 37, A 208 和 B 6 3 个菌种能够感染大麦和小麦的部分品种, 形成突起和肿瘤. 并且发现, 酚类化合物乙酰丁香酮对转化有促进作用. 另外, 在合适的植物组织接种农杆菌也是转化成功的关键. 文中讨论了农杆菌的宿主范围以及 Ti 质粒作为禾谷类作物基因工程载体的可能性.

关键词: 致瘤农杆菌, 大麦, 小麦, 乙酰丁香酮, 禾谷类作物转化

将外源遗传物质导入受体植物的方法很多, 目前已经建立了好几种高等植物基因转移系统. 行之有效且适用于单子叶植物的方法包括: (1) DNA 介导的原生质体转化^[1-3]; (2) 电激法^[4,5]; (3) 利用脂质体或细菌的原生质球为媒介向植物的原生质体导入外源遗传物质^[6,7]; (4) 注射法: 将遗传物质直接注入植物的细胞、原生质体和子房, 甚至处于生育期的植物体如花萼等^[8,9]; (5) 载体法: 比较完善的载体系统是致瘤农杆菌的 Ti 质粒^[10]. 前 3 种基因转移系统, 除了需要基因重组技术以外, 还需要完善的组织培养特别是原生质体培养技术, 因此它们对于组织培养相对容易的双子叶植物较为适用. 通过原生质体转化, 在单子叶植物中现仅能得到小麦、水稻和甘蔗等植物的转化愈伤组织^[1-3]. 利用电激法也只得到了小麦、高粱和玉米的转化愈伤组织^[4]. 尽管有人最近报道从电激的玉米原生质体已能再生转基因植株^[9], 但总的说来, 由于原生质体再生难度大, 限制了这些方法的运用. 采用注射花萼的方法, de la Pena 等得到了转化黑麦种子^[9]. 这种方法也能将外源遗传物质导入水稻种子中. 但是, 此方法的目的性较差, 频率也欠高, 而且受植物生育期的限制, 是否适用于所有的单子叶植物尚很难说.

由于单子叶植物基因转移存在着以上一些困难, 因此人们寄希望于找到一个合适的载体系统. 致瘤农杆菌的 Ti 质粒是目前可资利用的最好载体^[10]. 由于农杆菌能感染受伤的植物细胞而转移基因, 这就避免了原生质体再生问题. 早期的一些实验表明, 除了百合目和天南星目的部分单子叶植物以外, 农杆菌的宿主范围仅限于裸子植物和双子叶植物^[11]. 但是, 最近越来越多的证据表明, 农杆菌至少能侵染 5 个科的十多种单子叶植物^[12-15]. 这些科包括: 百合科、石蒜科、鸢尾科、薯蓣科和禾本科. 最近, 我们又证明鸭跖草科也能被农杆菌感染. 因此,

农杆菌的 Ti 质粒很可能可以作为单子叶植物和双子叶植物的通用载体。

虽然农杆菌的宿主范围比原先估计的要宽,但除了玉米之外^[12,13],其它一些重要的禾谷类作物如大麦、小麦、水稻和高粱等尚不在此列。我们在成功地转化鸭跖草的基础上,通过改进转化方法,首次证明重要的粮食作物大麦和小麦的某些品种也能被致瘤农杆菌感染。

一、材料和方法

1. 植物材料及其感染

实验所用大麦材料有 5 种:其中 3 个为西藏的地方栽培品种,它们是六棱西藏裸粒青稞品种 (*Hordeum vulgare* var. *coeleste*):长芒、黄穗、裸粒,二棱中芒长穗型西藏青稞品种 (*H. vulgare distichon*),以及二棱短芒青稞品种 (*H. vulgare distichon*),为黄粒长穗型。另外两个实验材料,一个是瑞典栽培大麦品种 Harry (*H. vulgare*),另一个是野生六棱大麦和栽培大麦的杂种 F₃ 代 (*H. agriocrithon* X *H. vulgare*)。

小麦材料为栽培品种毛颖 139 (*Triticum aestivum*)。

大麦和小麦都播种在遗传所农场实验地里,待其拔节抽穗时,用农杆菌注射感染。对照实验采用直接注射空白培养基的方法。

2. 致瘤农杆菌菌种及其培养

实验所用菌种有胭脂碱型的 A 208 和 T 37,鱈鱼碱型的 B 6。菌种在液体培养基中振荡培养,培养条件为 25—30℃, 80 r/min, 24—36 h。培养基为附加 20 μmol/L 乙酰丁香酮的 YEB 培养基 (pH 5.4)。乙酰丁香酮 (acetosyringone, 3',5'-二甲氧基, 4'-羟基苯乙酮,简称 As) 为美国 Aldrich 化学公司的产品。

3. 胭脂碱的定性检测

采用改进的微量纸电泳法^[14]。

二、结果和分析

1. 致瘤农杆菌对大麦的致瘤作用

用农杆菌的过夜培养物注射大麦的节间、穗茎、叶鞘和环绕茎结的叶鞘基部,14—21 天以后,观察并统计致瘤结果。实验中发现,节间和叶鞘部位由于分化程度高,含水量少,老化较快,对农杆菌无反应。穗茎虽然在注射时较嫩,但中空,与节间组织有相似的特点,因此对农杆菌也不太敏感。只有叶鞘基部的组织能较长时间地保持鲜嫩,且具有一定的分生能力,对农杆菌的侵染较为敏感。这说明,农杆菌容易侵染那些鲜嫩的、分化程度低且具有一定分生能力的组织。对照实验中未见形成肿瘤。

供试的 5 个大麦品种都具有茎秆比较肥厚的特点,西藏品种在北京晚熟。实验发现,这 5 个大麦材料的叶鞘基部都对农杆菌有不同程度的敏感,其中二棱短芒青稞最为敏感。A 208, T 37 和 B 6 3 个菌种都能使这些材料的叶鞘基部形成可见的突起,甚至冠瘿瘤,最大瘤的直径可达 3.5 mm (见图版 I-1—3)。农杆菌对二棱短芒青稞的致瘤效果可参见表 1,其它材料未列出。

2. 农杆菌对小麦品种毛颖 139 的致瘤效果

与大麦实验相似,我们选取刚抽穗的植株进行注射。这些植株的组织都较幼嫩,而且有的,

表1 农杆菌对二棱短芒青稞的致瘤效果

菌种	培养条件	注射部位	致瘤比率 (瘤或突起数/接种部位数)	瘤的大小 (直径: mm)
T 37	YEB + As	叶鞘基部	6/15(40%)	1—2
B 6	YEB + As	叶鞘基部	7/17(41.18%)	2—3.5
A 208*	YEB	叶鞘基部	3/16(18.75%)	0.5—1.5
	YEB + As	叶鞘基部	10/21(47.62%)	1—2

* 对 A 208 菌种 As 处理和未处理对照的致瘤数据进行了卡平方统计分析, 前者致瘤数与后者有极显著差异 ($p < 0.01$).

毛颖 139 植株刚抽穗时穗茎中是中空的。因此,除了用农杆菌注射叶鞘基部以外,我们也注射了部分穗茎。结果发现,跟大麦中一样,节间和叶鞘对农杆菌不敏感,而穗茎对农杆菌的感染比叶鞘基部还要敏感,三星期内,就能形成较大的肿瘤(直径 2—3 mm)(见图版 I-4—6)。而那些已经中空的较老的穗茎对农杆菌没有反应。农杆菌对小麦毛颖 139 的致瘤效果见表 2。对照实验中未形成肿瘤。

表2 农杆菌对小麦毛颖 139 的致瘤作用

菌种	培养条件	注射部位	致瘤比例 (瘤数/接种部位数)	瘤的大小 (直径: mm)
T 37*	YEB	叶鞘基部	3/13(23.08%)	0.5—1.5
		穗茎	2/6(33.33%)	1—1.5
	YEB + As	叶鞘基部	8/21(38.10%)	1—2
		穗茎	6/11(54.55%)	2—3
B 6	YEB + As	叶鞘基部	4/10(40.00%)	1—1.5
		穗茎	3/8(37.50%)	1—1.5
A 208	YEB + As	叶鞘基部	7/15(46.67%)	1—1.5

* 对 T 37 菌种 As 处理和未处理对照的致瘤数据进行了卡平方统计分析, 前者的致瘤数与后者相比有极显著的差异 ($p < 0.01$).

3. 小麦和大麦农杆菌感染部位的冠瘿碱测定

在接种农杆菌 2—3 个星期以后,我们对大麦和小麦感染部位所形成的瘤或突起进行了冠瘿碱测定。通常禾谷类作物在进行此类物质的检查时都有较高的本底,但是我们在实验中发现,大麦和小麦的组织中在与胭脂碱具相同迁移率的地方没有明显的本底。在 T 37 和 A 208 感染大麦和小麦后形成的瘤中都能测出较弱的胭脂碱,部分测定结果见图版 I-7 和图版 I-8。抽穗后的小麦大麦植株部分迅速老化,而且组织内含水量较少,这些条件都对瘤细胞内胭脂碱合成酶的活性有影响,因此瘤组织内胭脂碱含量低是自然的事,这也可以解释为什么在有些较干的小瘤内测不出胭脂碱。

我们也对 B 6 感染大麦和小麦后形成的瘤组织进行了鱈鱼碱的测定,但由于植物组织内有较强的本底,因此难于对结果作出判断,尽管 B 6 在大麦上诱发的冠瘿瘤是最大的。后来我们延长电泳时间,勉强能将鱈鱼碱与本底分开。从紫外灯下荧光的强度上看,瘤组织比同等重

量的对照组织要强得多(照片未列出)。因此我们认为,鱈鱼碱合成酶基因(OCS)能够在大麦和小麦的转化瘤组织中表达。

在瘤组织内检测到冠瘿碱,只能作为 T-DNA 转移并表达的指标,不能说明 T-DNA 是否已经在植物基因组中整合。由于转化组织较少,我们无法对它们进行 DNA 分子杂交分析,但从以上结果可以得出以下结论:尽管尚不知道 T-DNA 是否能够整合至大麦和小麦的核基因组中,但我们至少可以肯定,农杆菌能够侵染大麦和小麦细胞,将其 T-DNA 转移进细胞内,而且 T-DNA 上的基因能够表达。

4. 乙酰丁香酮对农杆菌转化大麦和小麦的促进作用

从表 1 和表 2 中可以看出,乙酰丁香酮(As)不仅可以提高致瘤比率,而且可以增大瘤的直径。我们对 A 208 和 T 37 两个菌种 As 处理和未处理对照的致瘤数据的卡平方统计分析亦表明,As 处理后的致瘤数与未处理对照有着极显著的差异。这说明,As 对农杆菌转化大麦和小麦的过程有促进或增强作用。这与我们在鸭跖草转化实验中观察到的结果是一致的。

由于农杆菌不经 As 处理也能转化大麦和小麦,形成一定数量的肿瘤(参见表 1, 2),因此,大麦和小麦本身应能合成某种诱导分子。这与 Usami 等人最近的研究结果吻合,他们证明小麦和燕麦的种子以及幼苗中芽与根的交接处含有能诱导农杆菌 Ti 质粒上 Vir 区基因表达的信号分子,这类信号分子与乙酰丁香酮不同,分子量较大。这说明,禾本科植物中的某些品种能合成自己的信号分子。

三、讨 论

1. 致瘤农杆菌的宿主范围

以前农杆菌的宿主范围被认为仅仅局限于双子叶植物和裸子植物,以及少数几种单子叶植物^[16]。但这些实验主要是以农杆菌能否在受体植株的接种部位产生可见的冠瘿瘤为标准来划分敏感与非敏感的,没有人对那些缺乏致瘤反应的植物的接种部位进行系统的冠瘿碱合成酶活性的分析^[16]。致瘤实验表明,农杆菌通常只能诱导单子叶植物形成小的突起(swelling),而不能形成大的冠瘿瘤^[17,20],但感染部位却能检测出特异的冠瘿碱。因此,不在接种部位检测冠瘿碱合成酶活性,很可能会低估农杆菌的宿主范围。

通过将观察肿瘤与检测特异的冠瘿碱相结合,现已证明百合科、石蒜科、鸢尾科、薯蓣科、禾本科和鸭跖草科的部分单子叶植物能被农杆菌感染^[17,20]。运用更灵敏的农杆菌介导病毒侵染(agroinfection)的方法,Grimsley 等人证明农杆菌能感染玉米^[18]。采用类似方法,Woolston 等证明农杆菌能与小麦的细胞相互作用并转移其 T-DNA^[20]。现在,我们又首次证明重要的禾本科作物大麦和小麦能被农杆菌侵染。因此,农杆菌的宿主范围比原先估计的要宽得多。

2. 影响致瘤农杆菌感染单子叶植物的因素

农杆菌感染受伤的植物细胞并转移 T-DNA 的过程,要经过许多步骤才能完成^[15]。中间任何一步发生障碍都会导致 T-DNA 转移的失败。一般认为,影响农杆菌感染单子叶植物的因素有三点^[14-16]:(1)农杆菌不能结合到单子叶植物的细胞壁上,(2)单子叶植物细胞内植物激素平衡的异常,(3)单子叶植物缺乏特异的信号分子。

然而,Graves 等人的扫描电子显微镜观察表明,农杆菌能以与在双子叶植物中相同的方

式结合到一些单子叶植物细胞的表面,其中包括玉米、小麦和唐菖蒲^[16]。最近, Usami 等人证明,小麦和燕麦亦含有能诱导 Vir 区基因表达的特异信号分子^[19]。以前人们感染禾谷类作物时,主要是用农杆菌注射幼苗和拔节后的节间。这些组织由于生长太快或分化程度高,因此不易被感染。Grimsley 等最近发现,玉米的生长锥或分生组织对农杆菌的侵染最敏感^[19]。我们在实验中选用茎秆肥厚的大麦和小麦,注射其生长较慢但有一定分生能力的叶鞘基部和穗茎,也转化成功。我们在培养农杆菌时加入了乙酰丁香酮,它能够诱导 Vir 区基因表达并促进 T-DNA 转移^[17]。有人发现,它能大幅度提高农杆菌转化拟南芥菜的频率。另外, Schäfer 等人也证明,马铃薯抽提物中的某些成分能促进农杆菌对单子叶植物黄独的转化^[15]。我们在实验中也发现,乙酰丁香酮对农杆菌转化大麦和小麦有促进作用。以上事实说明,转化单子叶植物的障碍可以通过感染适当的植物组织和改进转化方法而加以克服。

Ti 质粒作为双子叶植物基因载体系统已日趋完善^[15]。最近的一些实验表明, T-DNA 及其所携带的基因在转移至单子叶植物的植株或细胞中后,也能正常表达,稳定整合进核基因组并传递^[10,15,18]。而且,已经证明重要的禾谷类作物如玉米、大麦和小麦等也对农杆菌敏感。这些事实说明, Ti 质粒也可能作为单子叶植物特别是禾谷类作物基因工程的载体系统。

目前,我们正采用改进的转化方法,看水稻、高粱等农作物能否被农杆菌感染,并希望通过感染合适的大麦和小麦组织,得到转基因植株。这些实验的结果,对于运用植物基因工程的手段来改良禾谷类作物,必将具有一定的意义。

参 考 文 献

- [1] Lörz, H. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 199(1985), 178—182.
- [2] Potrykus, I. et al., *ibid.*, 199(1985), 183—188.
- [3] Uchimiya, H. et al., *ibid.*, 204(1986), 204—207.
- [4] Fromm, M. E. et al., *Nature*, 319(1986), 791—793.
- [5] Rhodes, C. A. et al., *Science*, 240(1988), 204—207.
- [6] Deshayes, A. et al., *EMBO J.*, 4(1985), 2731—2737.
- [7] Baba, A. et al., *Plant Cell Physiol.*, 27(1986), 463—471.
- [8] Zhou, G. Y. et al., *Meth. Enzymol.*, 101(1983), 433—481.
- [9] de la Peña, A. et al., *Nature*, 325(1987), 274—276.
- [10] Zambryski, P. et al., In: *Genetic Engineering—Principles and Methods* (Eds. Setlow, J. K. & Hollaender, A.), Plenum Press, 6(1984), 253—278.
- [11] Declercq, M. & Deley, J., *Botanical Rev.*, 42(1976), 389—466.
- [12] Graves, A. C. F. & Goldman, S. L., *Plant Mol. Biol.*, 7(1986), 43—50.
- [13] Grimsley, N. et al., *Bio/technology*, 6(1988), 185—189.
- [14] Feng, X. H. et al., *Kexue Tongbao*, 33(1988), 951—954.
- [15] Schäfer, W. et al., *Nature*, 327(1987), 529—532.
- [16] Graves, A. E. et al., *J. Bacteriol.*, 170(1988), 2395—2400.
- [17] Stachel, S. E. et al., *Nature*, 318(1985), 624—629.
- [18] Bytebier, B. et al., *PNAS, USA*, 84(1987), 5345—5349.
- [19] Usami, S. et al., *ibid.*, 85(1988), 3748—3752.
- [20] Woolston, C. J. et al., *Plant Mol. Biol.*, 11(1988), 35—43.