

根癌农杆菌介导遗传转化研究的若干新进展

李卫 郭光沁* 郑国铭

(兰州大学细胞生物学研究所, 兰州 730000. *联系人. Email: xbyjs@lzu.edu.cn)

摘要 综述了根癌农杆菌介导的遗传转化近几年获得的新进展. 在转化机理方面, 对农杆菌自身转录与调控的研究已相当深入, 而对有关的植物编码因子的研究也已取得了实质性进展; 在转化范围上, 对真菌与裸子植物的转化取得了不少进展, 单子叶植物尤其是一些有重要经济价值的禾谷类作物应用农杆菌介导相继获得了转化植株; 在转化方法方面, 发展了新的简单有效的整体植株感染法, 并将 T-DNA 转移和整合原理结合到基因枪等 DNA 直接转移方法上; 细菌人工染色体与农杆菌的联合应用赋予了其大片段 DNA 转化的功能. 针对上述领域, 指出了其中仍然存在的一些问题并提出了一些构想.

关键词 根癌农杆菌 遗传转化 真菌 单子叶植物 大片段 DNA

在植物基因工程的发展中, 研究最清楚和应用最成功的是根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的遗传转化, 在已获得的近 200 种转基因植物中约 80%是由该菌介导完成的^[1]. 起初, 人们认为农杆菌仅能转化双子叶植物、裸子植物以及少数几种单子叶植物; 而近几年, 由于在一些重要的单子叶植物以及在真菌中应用农杆菌转化获得了成功^[2,3], 该方法以转基因低拷贝、遗传稳定以及能够转化大片段 DNA^[4,5]等优点又受到了人们极大的关注. 本文对农杆菌介导遗传转化的机理、方法、范围以及策略等方面的新进展和动向做一评述, 并提出有价值的研究方向.

1 农杆菌介导的遗传转化机理

农杆菌转化的详细机理已有大量综述^[1,6~9], 这里不拟详述, 只给出其大略过程(见图 1), 并介绍新进展. 野生型根癌农杆菌能够将自身的一段 DNA 转入植物细胞. 因为转入的这一段 DNA 含有一些激素合成基因, 因而导致转化细胞自身激素的不平衡从而产生冠瘿瘤. 这些致瘤菌株都含有一个约 200 kb 的环状质粒, 被称为 Ti(tumor inducing)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 部分. 其中与冠瘿瘤生成有关的是 Vir 区和 T-DNA 区. 前者大小为 30 kb, 分 *virA~J* 等至少 10 个操纵子, 决定了 T-DNA 的加工和转移过程. T-DNA 可以将携带的任何基因整合到植物基因组中, 但这些基因本身与 T-DNA 的转移与整合无关, 仅左右两端各 25 bp 的同向重复序列为其加工所必需, 其中 14 bp 是完全保守的, 分 10 和 4 bp 不连续的两组. 两边界中以右边界更为重要.

VirA 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他 *vir* 基因启动子区上游的一个叫 *vir* 框(*vir box*)的序列, 启动这些基因的转录. 其中, *virD* 基因产物对 T-DNA 进行剪切, 产生 T-DNA 单链. 然后以类似于细菌接合转移过程的方式将 T-DNA 与 VirD2 组成的复合物转入植物细胞^[10], 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)^[11,12]. 在此过程中 VirE1 作为 VirE2 的一个特殊的分子伴侣具有协

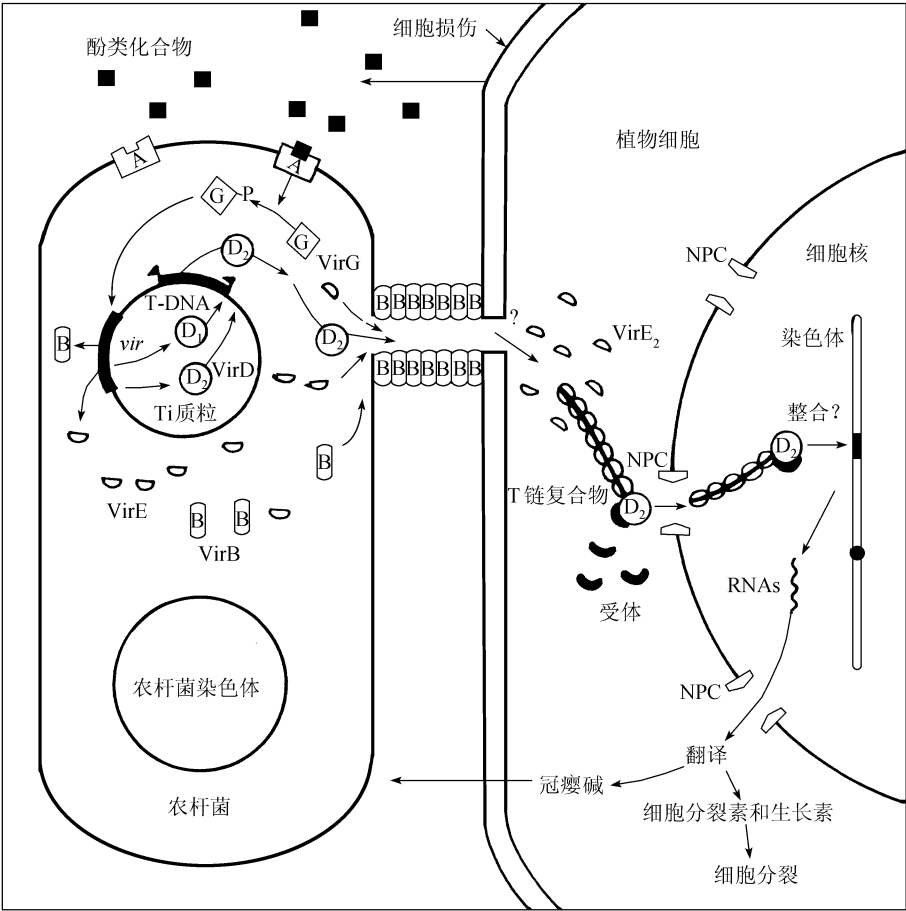


图 1 农杆菌介导植物细胞转化过程示意图

助 VirE2 转运和阻止它与 T-DNA 链结合的功能^[13,14]。实验表明, 转基因植物产生的 VirE2 蛋白分子也能在植物细胞内与 VirD2-T-DNA 形成 T 链复合物^[15]。之后, 这一复合物在 VirD2 和 VirE2 核定位信号(NLS)引导下以 VirD2 为先导被转运进入细胞核。转入细胞核的 T-DNA 以单或多拷贝的形式随机整合到植物染色体上。研究表明 T-DNA 优先整合到转录活跃区, 而且在 T-DNA 的同源区与 DNA 的高度重复区 T-DNA 的整合频率也比较高^[6,16]。整合进植物基因组的 T-DNA 也有一定程度的缺失、重复、填充和超界等现象发生, 例如在用真空渗透法转化的拟南芥中有 66% 出现超界现象, 甚至有整个 Ti 质粒整合进植物基因组的报道^[17], T-DNA 超界转移现象的机理尚不完全清楚, 可能与其左边界周边序列有关。

现在, 对农杆菌感染过程中其本身因子的转录与调控已研究得相当深入, 但是对被感染植物细胞中有关的分子过程以及作用机理知之甚少, 尽管已经有许多工作表明农杆菌的侵染与植物的基因型有关^[1,18]。最近人们用拟南芥菜(Arabidopsis)研究这一问题, 取得了可喜的成就。利用 T-DNA 插入突变, 有人分离出一些农杆菌感染缺陷的拟南芥菜突变体。在这些突变体中, 农杆菌感染的阻断有的发生在感染早期, 表现为农杆菌向根部附着的频率降低, 有的则

发生在随后 T-DNA 向植物细胞核转运和整合的过程中^[19]。对这些突变体做进一步的研究,无疑对弄清植物细胞在农杆菌侵染过程中所参与的因子有很大的帮助。利用酵母双杂交系统(yeast two hybrid system),研究者从拟南芥菜 cDNA 文库中分离出了和 VirD2 和 VirE2 特异互作的蛋白质,如 AtKAP α ^[20]和 VirD2 的核定位信号(NLS)特异结合,转运 T-链复合物到细胞核中;另有几种被称为亲环素(cyclophilins),能和 VirD2 和 VirE2 的非 NLS 结合,详细功能尚不十分清楚^[21]。关于 T-DNA 向基因组的整合,虽然拟南芥菜 *uvh1* 基因一度被认为与此有关,但是近来 Preuss 等人^[22]证明, *uvh1* 突变体在 T-DNA 的整合上与野生型农杆菌没有什么区别;需要注意的是前者使用根为外植体,而后者在拟南芥菜开花期使用真空渗透法,被感染的是生殖细胞,因此它们之间很可能并非是简单的否定关系,而仅仅反映了有关的基因产物具有组织表达的特异性。由这些结果看来,不少植物因子直接参与了 T-DNA 在植物细胞中的转移和整合过程。由于农杆菌在转化很不相同生物(真菌、裸子植物和单、双子叶被子植物)时自身内的转录调控过程基本相同,因此发生在被感染细胞中的分子过程就成为决定农杆菌转化能否成功的最终因素,所以对其进行研究对扩大农杆菌宿主范围具有重要意义。

2 农杆菌转化应用范围和方法的拓展

自然状况下,普通农杆菌仅能够感染双子叶植物、裸子植物和少数几种单子叶植物。其中双子叶植物,尤其一些模式植物,农杆菌介导的遗传转化现在已经成为一项常规技术,而对其他一些双子叶植物遗传转化的研究正随着组培工作的进行在逐步展开。不过目前大多数非模式双子叶植物的转化效率并不很高,离有效地应用尚有一段距离,因而探索提高其效率仍然有一定的意义。近几年来,农杆菌转化在真菌^[3]、裸子植物^[23]和单子叶植物^[1]转化方面取得了可喜的进展,其中以单子叶植物,尤其是禾谷类作物的成功转化最为引人注目。同时在转化方法上也有一定的突破。

2.1 真菌的转化

近几年人们利用农杆菌转化技术实现了酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[3,24]、木霉(*Trichoderma reesei*)、曲霉(*Aspergillus awamori*)、镰孢霉(*Fusarium venenatum*)、刺盘孢菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、脉胞菌(*Neurospora crassa*)以及伞菌(*Agaricus bisporus*)等多种丝状真菌的转化^[25]。进一步的研究发现,农杆菌转化真菌时,同样需要 *vir* 基因的活化(如添加 AS)、T-DNA 边界、*virD1/virD2* 以及控制转移复合体形成的 *virB* 或 *virD4* 的存在^[24];外源基因可以通过同源重组^[26]或非同源重组^[27]整合进真菌的基因组中,并且多为单或低拷贝;插入的基因和高等植物中的情况类似,同样含有缺失或填充等现象。这些都证明农杆菌转化高等和低等真核生物的机理一致,具有保守性^[25]。但是控制农杆菌向植物细胞附着的 *chvA*, *chvB* 及 *exoC* 基因在酵母的转化中并非必不可少。对原生质体和分生孢子进行的转化与常规原生质体转化法相比频率提高了 600 倍,已报道的农杆菌对真菌的最高转化频率为 10^{-3} ^[24]。最近, Bundock 等人^[28]转化了酵母 *Kluyveromyces fragilis*, 证明农杆菌介导的遗传转化中 T-DNA 通过同源重组实现的基因打靶是电击穿孔法的 10 倍,且具有拷贝低和遗传稳定等优点。真菌转化成功的意义不仅仅在于找到了一种新的进行真菌基因工程改造的方法,还在于这可能找到了一个研究宿主与 T-DNA 转化互作关系的详细分子过程的体系。

2.2 裸子植物的转化

虽然裸子植物是农杆菌的天然宿主,而且早已知道从松树中提取的松柏醇(coniferyl alcohol)能够促进农杆菌对裸子植物的感染。但是长期以来由于受外植体培养、转化和选择频率等的影响,农杆菌介导裸子植物的转化一直受到限制。最近 Wenck 等人^[23]使用含有附加拷贝 *virG* 和(*virG* + *virB*)基因(均来自 pTiBo542)的农杆菌来转化挪威云杉,获得了 100 多个 Gus 表达株系,结果能够将转化频率提高 1 000 倍。同样的方法也可以用于松树等其他裸子植物。从而建立了农杆菌介导的裸子植物遗传转化体系。

2.3 单子叶植物的转化

单子叶植物转化最早获得成功的是石刁柏。Bytebier 等人^[29]用含 *nos-npt II* 基因的重组 Ti 质粒感染石刁柏愈伤组织,获得抗卡那霉素的再生植株,并获得了外源基因整合的分子证据。此前虽然有农杆菌转化单子叶植物的报道,但分子和遗传方面的证据不够充分^[30]。直到 1993 年才有农杆菌成功转化水稻的报道^[2]。这之后在玉米^[31]、小麦^[32]、大麦^[33]、甘蔗^[34]等重要经济作物中均获得了农杆菌介导的转基因植株,并具有分子和遗传方面的证据。据统计已有共 7 科 20 多种单子叶植物利用农杆菌转化获得成功^[1]。而且在水稻、玉米、甘蔗等重要农作物中的转化频率最高已达 30%,接近双子叶植物。进一步分析 T-DNA 在单子叶植物基因组中的整合状况、遗传稳定性等,发现该过程与在双子叶植物中十分相似。对转基因水稻的 *gus* 和 *hpt* 两个基因在 R0-R4 代的分析均未发现有丢失现象,证明其遗传稳定^[35,36]。

早期的研究表明,农杆菌对植物细胞的转化需要两方面的先决条件:一是植物细胞受损伤后分泌足够浓度的诱导物;二是细胞正在进行活跃的 DNA 合成或分裂。单子叶植物与双子叶植物的创伤反应不同,在单子叶植物的伤口附近往往发生木质化或硬化,而且没有明显的细胞分裂发生,因而大多数单子叶植物不是农杆菌的天然宿主^[18],所以基于创伤反应的叶圆盘法不适合单子叶植物转化。农杆菌转化单子叶植物困难的原因比较复杂,总结这些年的研究可以认为,实现农杆菌对单子叶植物成功转化的关键因素主要包括下述几个方面:

(1) 选择活跃分裂的功能细胞。一个成功的农杆菌遗传转化体系需具备较高的感染率和转化植株易于再生两方面的先决条件。最初,Grimsley 等人^[37]以 Ti 质粒 T-DNA 上携带有玉米条纹病毒(MSV)DNA 的农杆菌注入玉米分生组织或靠近生长点的部位,得到大量具有条斑病毒性状的植株(该法被称为“农感染”法,Agroinfection),而注入非分生组织处感染很少出现。Graves 等人^[38]也证明玉米盾片结节和中胚轴最易被农杆菌感染或转化。某些分生组织虽然具有较高的农杆菌感染率,但植株再生并非理想,因而也不是最佳起始感染组织^[18,38,39]。生长和分裂旺盛的胚性愈伤组织被认为是获得单子叶植物转化成功的关键因素之一^[2,40]。已获得的单子叶植物的成功转化实例表明:幼胚及来自成熟或未成熟胚经诱导所产生的胚性愈伤组织是农杆菌转化和再生的良好系统^[2,18,31 ~ 33,35,40 ~ 42]。但是有人报道活跃增殖的悬浮培养细胞系并不适用于转化,因为其转化效率与转化后的 *Gus* 活性均较低,而在固体培养基上预培养几天才能够获得较高的转化频率^[18,35]。

(2) 促进 *Vir* 基因的活化。在单子叶植物中既有农杆菌转化抑制物^[43],也有诱导物存在^[44]。因而要使农杆菌转化单子叶植物,首先就是要解除单子叶植物分泌物对农杆菌的抑制;其次是增加诱导物的浓度及有效成分以促进农杆菌 *vir* 区基因的活化与表达。Stachel 等人首先从

烟草中分离出两种农杆菌侵染诱导物乙酰丁香酮(AS)和羟基乙酰丁香酮(HO-AS)。后来发现邻苯二酚、没食子酸等40多种酚类物质对VirG都有诱导活性^[1]。许耀等人^[45]的研究表明,多种酚类复合物较单一酚类物质的诱导活性更高。D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖醛酸、L-阿拉伯糖醛酸也具有较强的VirG诱导活性。VirG活性能被AS或HO-AS大大加强,甚至在某些植物如小麦和大麦的转化中是必不可少的^[46]。Hiei等人^[35]证明在水稻的转化中100 $\mu\text{mol/L}$ 的AS是转化成功的关键。用AS对农杆菌进行前处理也能在一定程度上提高农杆菌转化的效率^[42]。虽然也有在没加酚类化合物的情况下转化愈伤组织获得成功的报道^[47],但是毫无疑问在农杆菌介导的单子叶植物转化中,酚类化合物的添加至关重要。

另一种方法是对*virA*和*virG*这一双因子调控系统进行遗传改造或分离其突变体,使其能够不依赖于创伤诱导物的存在就能诱导被调控的*vir*基因高水平和组成型地表达,从而促进T-DNA转移。如将VirA的C末端区删除就能使*virB*完全成为组成型表达^[48];又如含*virA*突变G665D的菌株能在缺少AS的情况下导致*virB*的表达水平与野生型农杆菌在存在AS情况下相同;而含G471E的则仅约为50%的野生型表达水平。在有葡萄糖存在情况下,在含G665D突变的菌株中*virB*的表达水平达到野生型的1500倍^[49]。类似地含*virG*突变*virG54D*的菌株也能提高50~100倍的*virB*表达水平^[48]。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%^[50]。这一方法不需要添加诱导物就能使*vir*区基因高效转录,相应对转化抑制物也不敏感,因而有望发展成为一种能在单子叶以及其他难于转化的植物中实现有效转化的新途径。

此外,较低的pH值、低于28℃的温度、较高的渗透压、适当浓度的冠瘿碱及一些糖类等都能有效地增强*vir*基因的表达。糖类在不含酚类化合物的情况下效果较明显,但是糖类和AS同时存在时却没有明显的协同效应^[18],其机理尚待研究。

(3) 菌株的选择与质粒的构建。在一大批被分离的农杆菌株中,仅有少数几种被改造并应用于单子叶植物转化。其中A281是具有超毒Ti质粒、宿主范围广、转化率高的一个菌株,这些性状都是由于该菌中的Ti质粒pTiBo542所决定的。由此发展起来了两个转化系统:一个是由pTiBo542衍生出来的卸甲辅助Ti质粒pEHA101;另一个是将其*virB*、*virC*和*virG*引入普通双元载体中建立起来的超级双元载体系统。两者在单子叶植物的转化中发挥了重要作用。

Hiei等人^[35]测试了两个菌株(LBA4404和EHA101)和3个双元载体质粒(pIG121Hm, pBin19和pTOK233)在水稻转化中的效率。结果表明LBA4404(pTOK233)较LBA4404(pIG121Hm)和EHA101(pIG121Hm)均高,而EHA101(pTOK233)甚至比普通农杆菌与双元质粒组合对水稻的转化率还低。在小麦和大麦的转化中,EHA101(pIG121Hm)相对于LBA4404(pTOK233)和GV3101(pPCV6NFHGusInt)是最有效的^[46]。而Cheng等人^[32]对小麦的转化甚至没有用超毒菌株而代之以通常的菌株和双元载体同样获得了成功。可见菌株和质粒的组合与选择在特定单子叶植物的转化中至关重要。此外在质粒构建过程中可以考虑应用农杆菌型质粒、超驱动序列(overdrive sequence)、内含子和核基质附着区(MAR)等来增加单子叶植物对农杆菌的敏感性,提高转化效率,增强外源基因表达活性和降低变异,从而建立一些新的高效转化体系。

植物种类和基因型的不同决定了所用愈伤组织培养基中成分的不同,相应地农杆菌转化

的技术体系也应该做适当的调整^[18,30]。此外很多实验还表明农杆菌液的浓度、细菌的生长状态也是转化成功的关键因素。事实上,有相当多的因素都能对农杆菌的转化产生不同程度的影响,而成功的转化则往往需要针对特定植物和组织对诸多因素进行优化^[18,46]。

2.4 转化方法

在长期的基因工程实践中,人们已经注意到不同的植物由于受基因型、发育状态、组培难易程度等因素所决定,相应地应该采取不同的方法,包括原生质体与农杆菌共培养法、叶盘法和整株感染法。原生质体与农杆菌共培养法转化效率高,无嵌合体;但操作复杂,必须有良好的原生质体培养及植株再生技术,因而在许多重要作物中的应用受到限制。叶盘法的出现大大推动了农杆菌介导转化方法的应用,成为现在广为应用的方法之一,但在叶片再生困难的植株如马铃薯、禾谷类等中的应用则仍然受到限制。整株感染法最初是直接利用对数生长期的野生型农杆菌处理植物受伤的部位,肿瘤形成后,切下置于含抗生素的无激素培养基上培养并除菌,以获得转化肿瘤细胞系。该方法经改良后可用于难以组织培养的植物,用除去了致瘤基因的农杆菌直接感染叶腋或顶端芽基处伤口。之后,激素诱导分蘖,检测分蘖后枝条或枝条开花结实后的后代,可获得转化植株^[51]。以拟南芥菜的开花植株通过真空渗入农杆菌的方法,在经处理的每个植株的后代中平均可以得到5个转化植株。该方法经改造后省去真空渗入,将发育中的花组织直接浸入含5%蔗糖和500 $\mu\text{L/L}$ 表面活性剂 Silwet L-77 的农杆菌液中,在其后代中就可获得高频率的转化^[52]。整株感染法省去了组织培养的繁琐步骤,克服了某些植物再生的困难,因而具有不可替代的优势。但目前该方法仍局限在拟南芥菜中,其他植物中尚少见报道。此外有人基于农杆菌转化机理结合基因枪法创建了“农杆菌枪法”(Agrolistic),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%^[53]。该方法集中了农杆菌转化方法中精确切割转移和低拷贝整合等特性以及基因枪法中无宿主范围限制的优点,因而是一种有发展前途的新思路。用玉米原生质体直接转化法同样证明了上述结论,并且表明另外再导入 VirE2 基因,可以进一步提高典型 T-DNA 整合的频率^[54]。应用类似的方法, Ziemienowicz 等人^[55]在体外构建了一个由农杆菌毒性蛋白 VirD2, VirE2 和单链 DNA 组成的复合物,能够快速有效地将 DNA 转运到哺乳动物的细胞核中。长期以来,向哺乳动物细胞核中引入 DNA 的效率都不很高,这一技术的发明极大程度地拓展了基于农杆菌的遗传转化范围,对动物基因工程和基因的治疗发展产生一定的推动作用。

从近年农杆菌的应用情况,尤其是在禾谷类和真菌中的应用情况来看,农杆菌介导的遗传转化绝对不仅限于原先认为的那些属种。通过适当的筛选和改造,尤其是与其他方法相结合以后,可应用于更为广阔的范围。

3 农杆菌转化的新策略——大片段 DNA 转移

植物的一些性状,如抗病、抗虫、抗逆、高产优质等,或者为数量性状,或者相关的基因往往成簇排布,定位在较大的 DNA 片段。这些性状的改造就需要一个能将大片段 DNA 转入植物细胞并稳定表达的体系。另外大片段 DNA 转化也能极大方便基因的图位克隆(positional cloning)。双元细菌人工染色体(binary bacterial artificial chromosome, 简称 BiBAC)的构建使这一设想成为可能。1996 年 Hamilton 等人^[4]第一次将携带 150 kb 人类基因片段的

BiBAC 载体导入烟草中, *npt II*, *hpt* 以及 150 kb DNA 特异探针杂交结果表明获得了完整 T-DNA 转移的植株(完整转移率为 63%)。同时为了评价转基因植株的遗传稳定性, 对 R1 代进行了分析, 证明符合 Mendel 分离规律。在此基础上他们构建了适于植物转化的 BiBAC 系统^[56]。最近 Liu 等人^[5]又结合 PAC 载体和双元载体的特点, 构建了一个具转化功能的人工染色体(transformation-competent artificial chromosome, TAC)pYLTAC7, 在大肠杆菌和农杆菌中都能复制和稳定保持, 并能够将 40~80 kb 的 DNA 片段转入拟南芥菜中。这些体系的建立无疑对突破常规植物基因工程中外源基因片段的限制(<30 kb)具有重要意义。目前该方法的应用还仅限于烟草、拟南芥等少数几种植物, 若能够实现向禾谷类作物中转入大片段 DNA, 将对这些重要粮食作物的遗传改造产生深远影响。目前基因枪法虽然能很方便地获得禾谷类的基因转化, 但对大片段 DNA 的转化却显得无能为力。我们实验室正在进行这方面的研究。

4 问题、构想与展望

近几年, 农杆菌介导的遗传转化在转化机理、转化方法、转化范围以及转化策略等方面都获得了很大的发展, 其应用已日臻成熟; 但仍存在着许多尚待解决的问题。

(1) 转化机理方面。在转化过程中, 农杆菌本身的分子调控已研究比较深入, 但对有关植物因子的了解尚处于初期阶段。此外, 农杆菌介导的转化中 T-DNA 何以往往是单或低拷贝整合? 如前所述, 这种特性在多种亲缘关系很远的被转化生物中非常相似, 因此很可能仅取决于农杆菌一方的因素或者是农杆菌和这些生物中相当保守的因子的相互作用; 另外也不排除存在着农杆菌和植物两方面参与的反馈抑制途径的可能。拟南芥菜农杆菌侵染突变体的分离和酵母的成功转化可能为该问题的解决提供了一个契机。

(2) 转化范围方面。农杆菌的转化范围正在日益扩大, 似乎不受太大的宿主范围的限制, 因此原则上还可以继续探索该菌介导其他类群植物如藻类、苔藓和蕨类植物的可能性。此外, 叶绿体的转化正成为当今基因工程的热点之一, 但其转化方法均为物理转化法, 仪器昂贵, 操作复杂, 转移和整合无选择性, 不易得到“纯”的转化体(即无核基因同时被转化的“污染”)。目前蛋白质转运到线粒体和叶绿体各自所需的信号肽序列(signal peptide)都已研究得比较清楚, 是否可以改变 VirE 和 VirD2 的信号序列, 使 T-DNA 复合物导向叶绿体或线粒体, 从而实现农杆菌介导的细胞器转化。这仅仅只是一个设想, 可能会涉及较为复杂的问题, 但却很值得研究。

(3) 转化方法方面。对易于组培植物的转化已基本成熟, 但是操作方法仍较为复杂。因而无论对哪种植物探讨花粉或种质介导, 不需要组培而直接获得转基因植株的方法将十分有意义。现今农杆菌介导的单子叶禾谷类植物的转化基本以幼胚为起始材料, 取材受生长周期限制很大, 因此实践上迫切需要发展一些容易并且能够经常大量获得的外植体(如芽或叶)的农杆菌转化体系。

(4) 转化策略方面。通过同源重组向植物基因组特定位点引入目的基因(gene targeting)的研究才刚刚起步^[57], 效率极低, 有时还需要在植物体内先引入某些序列(如 *loxP*)才能实现, 因而新的基因靶位操作体系亟待建立。向植物体内导入大片段 DNA 的工作有待深入, 尤其是向有重要经济价值的禾谷类和豆科植物中转入大片段 DNA 的工作还未见报道。

上述问题的解决必将极大地促进植物基因工程的发展, 它不仅使众多植物的遗传改造成

为可能,而且使植物改良方法更趋简化,由单基因控制性状的转化向多基因转化方向发展,使人类能更好地按自己的意图实现对植物的改造与利用.要解决新世纪人类所面临的粮食问题可能在很大程度上要依赖于农杆菌转化等生物工程技术的发展.

Mysore 等人^[58]最近的研究证明,组蛋白 H2A(真核生物进化中的一个高度保守的蛋白质)和 T-DNA 与植物核基因组的整合有关.

致谢 景文野同志为本文绘制插图,特此感谢.

参 考 文 献

- 1 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术.北京:科学出版社,1998
- 2 Chan M T, Chang H H, Ho S L, et al. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene. *Plant Mol Biol*, 1993, 22: 491 ~ 506
- 3 Bundock P, Den D -R, Beijersbergen A, et al. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium* to *Saccharomyces Cerevisiae*. *EMBO J*, 1995, 14(3): 3206 ~ 3214
- 4 Hamilton C M, Frary A, Lewis C, et al. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 9975 ~ 9979
- 5 Liu Y G, Shirano Y, Fukaki H, et al. Complementation of mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 6535 ~ 6540
- 6 Zambryski P C. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43: 465 ~ 490
- 7 Hooykaas P J J, Schilperoort R A. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol Biol*, 1992, 19: 15 ~ 38
- 8 Hooykaas P J J, Beijersbergen A G M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annu Rev Phytopathol*, 1994, 32: 157 ~ 179
- 9 Zupan J R, Zambryski P C. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol*, 1995, 107: 1041 ~ 1047
- 10 Fullner K J, Lara J C, Nester E W. Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science*, 1996, 273: 1107 ~ 1109
- 11 Sundberg C, Meek L, Carroll K, et al. VirE1 protein mediates export of the single-stranded DNA-binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J Bacteriol*, 1996, 178(4): 1207 ~ 1212
- 12 Lee L Y, Gelvin S B, Kado C I. pSa causes oncogenic suppression of *Agrobacterium* by inhibiting VirE2 protein export. *J Bacteriol*, 1999, 181(1): 186 ~ 196
- 13 Deng W, Chen L, Liang X, et al. VirE1 is a specific molecular chaperone for the exported single-stranded-DNA-binding protein VirE2 in *Agrobacterium*. *Mol Microbiol*, 1999, 31(6): 1795 ~ 1807
- 14 Sundberg C D, Rean W. The *Agrobacterium tumefaciens* chaperone-like protein, VirE1, interacts with VirE2 at domains required for single-stranded DNA binding and cooperative interaction. *J Bacteriol*, 1999, 181(21): 6850 ~ 6855
- 15 Gelvin S B. *Agrobacterium* VirE2 proteins can form a complex T strands in the plant cytoplasm. *J Bacteriol*, 1998, 180(16): 4300 ~ 4302
- 16 Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Nawrath C, et al. T-DNA integration: a model of illegitimate recombination in plants. *EMBO J*, 1991, 10(3): 679 ~ 704
- 17 Wenck A, Coako M, Kanevski I, et al. Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol Biol*, 1997, 34: 913 ~ 922
- 18 Hiei Y, Komari T, Kubo T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol*, 1997, 35: 205 ~ 218
- 19 Nam J, Mysore K S, Zheng C, et al. Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*. *Mol Gen Genet*, 1999, 261(3): 429 ~ 438
- 20 Ballas N, Citovsky V. Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 10723 ~ 10728
- 21 Deng W Y, Chan L H, Wood D W, et al. *Agrobacterium* VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. *Proc Natl Acad*

- Sci USA, 1998, 95(12): 7040 ~ 7045
- 22 Preuss S B, Jiang C Z, Baik H K, et al. Radiation-sensitive *Arabidopsis* mutants are proficient for T-DNA transformation. Mol Gen Genet, 1999, 261(4-5): 623 ~ 626
- 23 Wenck A R, Quinn M, Whetten R W, et al. High efficiency *Agrobacterium* mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*). Plant Mol Biol, 1999, 39(3): 407 ~ 416
- 24 Piers K L, Heath J D, Liang X Y, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 1613 ~ 1618
- 25 de Groot M J A, Bundock P, Hooykaas P J J, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nat Biotechnol, 1998, 16: 839 ~ 842
- 26 Gouka R J, Gerk C, Hooykaas P J J, et al. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. Nat Biotechnol, 1999, 17(6): 598 ~ 601
- 27 Bundock P, Hooykaas P J J. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 15272 ~ 15275
- 28 Bundock P, Mrczek K, Winkler A A, et al. T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. Mol Gen Genet, 1999, 261(1): 115 ~ 121
- 29 Bytebier B F, Deboeck F, Greve H D, et al. T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plants of the monocotyledon *Asparagus officinalis*. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 5345 ~ 5349
- 30 Smith R H, Hood E E. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. Crop Science, 1995, 35(2): 301 ~ 309
- 31 Ishida Y, Saito H, Ohta S, et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nat Biotechnol, 1996, 14(6): 745 ~ 750
- 32 Cheng M, Fry J E, Pang S Z, et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol, 1997, 115: 971 ~ 980
- 33 Tingay S, McElroy D, Kalla R, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. Plant J, 1997, 11(6): 1369 ~ 1376
- 34 Enriquez O G A, Vazquez P R I, Prieto S D L, et al. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum Officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*- mediated transformation. Planta, 1998, 206(1): 20 ~ 27
- 35 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. Plant J, 1994, 6: 271 ~ 282
- 36 Hiei Y, Komari T. Stable inheritance of transgenes in rice plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. In: Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium, Manila. Philippines: International Rice Research Institute, 1995. 131 ~ 142
- 37 Grimsley N, Hohn T, Davis J W, et al. *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. Nature, 1987, 325: 177 ~ 179
- 38 Graves A C F, Goldman S L. The transformation of *Zea mays* seedlings with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol Biol, 1986, 7: 43 ~ 50
- 39 Park S H, Pinson S R M, Smith R H. T-DNA integration into genomic DNA of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoot apices. Plant Mol Biol, 1996, 32: 1135 ~ 1148
- 40 Zhang J, Xu R J, Elliott M C, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of elite *indica* and *japonica* rice cultivars. Mol Biotechnol, 1997, 8(3): 223 ~ 231
- 41 Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, et al. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *Indica* rice. Plant Cell Rep, 1996, 15: 727 ~ 730
- 42 Aldemita R R, Hodges T K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Japonica* and *Indica* rice varieties. Planta, 1996, 199: 612 ~ 617
- 43 Sahi S V, Chilton M D, Chilton W S. Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 3879 ~ 3883
- 44 许耀, 施骏, 李宝健. 单、双子叶植物的代谢调节物调节农杆菌 *vir* 区基因表达的研究. 遗传学报, 1993, 20(1): 59 ~ 67
- 45 许耀, 贾敬芬, 郑国辑. 酚类化合物促进根癌农杆菌对植物离体外植体的高效转化. 科学通报, 1988, 33(22):

1745 ~ 1748

- 46 Guo G Q, Maiwald F, Lorenzen P, et al. Factors influencing T-DNA transfer into wheat and barley cells by *Agrobacterium tumefaciens*. Cereal Research Communications, 1998, 26(1): 15 ~ 22
- 47 Raineri D M, Bottino P, Gordon M P, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). Bio/Technology, 1990, 8: 33 ~ 38
- 48 Gubba S, Xie Y H, Das A. Regulation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene expression: isolation of a mutation that restores *virGD52E* function. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1995, 8(5): 788 ~ 791
- 49 McLean B G, Greene E A, Zambryski P C. Mutants of *Agrobacterium* VirA that activates *vir* gene expression in the absence of the inducer acetosyringone. J Biol Chem, 1994, 269(4): 2645 ~ 2651
- 50 Hansen G, Das A, Chilton M D. Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 7603 ~ 7607
- 51 李卫, 陈亮, 蔡得田, 等. 柑橘基因转化的新方法. 植物学报, 1997, 39(8): 782 ~ 784
- 52 Clough S J, Bent A F, Dip F. A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J, 1998, 16(6): 735 ~ 743
- 53 Hansen G, Chilton M D. "Agrolistic" transformation of plant cells: Integration of T-strands generated *in planta*. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 14978 ~ 14983
- 54 Hansen G, Shillito R D, Chilton M D. T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 11726 ~ 11730
- 55 Ziemienowicz A, Gorlich D, Lanka E, et al. Import of DNA into mammalian nuclei by proteins originating from a plant pathogenic bacterium. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(7): 3729 ~ 3733
- 56 Hamilton C M. A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA. Gene, 1997, 200: 107 ~ 116
- 57 Vergunst A C, Jansen L E T, Hooykaas P J J. Site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* mediated by Cre recombinase. Nucleic Acids Res, 1998, 26(11): 2729 ~ 2734
- 58 Mysore K S, Nam J, Gelvin S B. An *Arabidopsis* histone H2A mutant is deficient in *Agrobacterium* T-DNA integration. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 948 ~ 953

(1999-09-14 收稿, 2000-01-17 收修改稿)