

# 农杆菌及基因枪在禾谷类作物 遗传转化中的应用

李慧芬 张晓明 宋凤斌 李殿申

(吉林农业大学生物技术研究所, 长春 130118)

**提 要** 目前,外源基因导入植物细胞的方法有多种,常用的有农杆菌法和基因枪法。本文对农杆菌转化禾谷类作物的基本原理及最新动态作了简明扼要的概述,同时对基因枪类型、原理及使用方面也作了简要的介绍。

**关键词** 禾谷类作物;基因枪;农杆菌;遗传转化

禾谷类作物是世界上最重要的作物种群,在世界经济乃至人类生存等方面占据着极其重要的地位。因此,对禾谷类作物进行遗传改良一直是生物学家极为关注的焦点。近 10 年来,生物技术的日新月异,植物基因工程的飞速发展,也推动了禾谷类作物进行遗传转化的进程。到目前为止,已建立起多种外源基因导入受体细胞的方法。根据是否采用基因载体为介导,可归纳为两类:一是农杆菌介导的遗传转化,包括根瘤农杆菌介导和发根农杆菌介导的遗传转化;二是直接的基因导入,包括化学共培养法(PEG)(Lorz 等,1985)、子房注射法(Dela Pena 等,1987)、种胚吸收 DNA 法(Topfer 等,1989,1990)、花粉管通道法(Luo and Wu, 1988;Langridge, 1992)、碳化硅纤维法(Kaepler 等,1990,1992)、组织电击法(D'Halluin 1992; Xu and Li 等,1994)和基因枪法(Sanford 等,1988; Klein 等,1992; Christou 等,1993; Morrish 等,1993; Wan 等,1995)。其中基因枪法是最引人注目和有效的方法。而农杆菌在单子叶植物,尤其在禾谷类作物的转化上已显示出广阔的前景。以下主要介绍农杆菌介导的遗传转化和基因枪的遗传转化。

## 1 农杆菌介导的遗传转化方法

农杆菌介导的植物遗传转化方法具有简单易行、不需昂贵的设备、费用低、转化频率较高以及拷贝数少等优点,一直是双子叶植物遗传转化的首选方法。近几年来,农杆菌遗传转化在单子叶植物,尤其是在禾谷类作物上已取得了突破性进展,因而倍受世界各国科学工作者的广泛关注。

根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)为一种革兰氏阴性的土壤杆菌,于 1907 年被发现。植物被农杆菌侵染后,形成冠瘿瘤(crown gall),冠瘿瘤细胞可产生正常细胞所不能产生的冠瘿碱(opines),被农杆菌作为碳源利用。1974 年,人们在农杆菌中发现一种环形的 Ti 质粒(> 200 kb),该质粒含有一段 T-DNA 和 vir 基因。T-DNA(Transfer DNA)包含有生长素基因和细胞分裂素基因,它可插入植物基因组,引起细胞特性的变化。此后,人们试图利用这种

天然的遗传转化体系,将外源基因转至植物细胞,并利用植物细胞的全能性,经过细胞或组织培养,由一个转化细胞再生成植株。*vir* 区大小为 30 kb,分 *vir* A、B、C、D、E、G、H 7 个操纵子,共 24 个基因,起共同调控作用(*co-regulation*),总称调控子(*regulon*),它们与 T-DNA 的加工和转移有关。

根瘤农杆菌侵染双子叶植物细胞,大体包括两个连续的过程。首先是农杆菌通过植物伤口和宿主细胞接触,并有效地附着、结合到宿主细胞上;然后受伤的植物细胞通过分泌或释放一种可扩散的诱导物,活化农杆菌的 *vir* 基因,诱导其顺次表达,进而实现对 T-DNA 的酶切、环化、运载,并插入宿主细胞的基因组中。通常认为,多数单子叶植物对农杆菌不甚敏感,其中重要原因之一,可能是在这类作物中缺乏与农杆菌 *vir* 基因活化诱导有关的那种可扩散性物质,或其含量不足。Stachel 等(1985)首先证明双子叶模式植物烟草中所含的 *vir* 诱导物质是乙酰丁香酮类物质。Bolton 等(1985)进一步用 *vir:lacZ* 融合基因系统检测了 40 多种酚类物质,发现 7 种(儿茶酚、没食子酸、焦性没食子酸、对羟基苯甲酸、原儿茶酚、间二羟基苯甲酸和香草醛)可以诱导农杆菌 *vir* 基因的活化,并确定了最佳浓度范围。Usami 等(1987)证明禾谷类作物幼苗浸出液不能诱导 T-DNA 的酶切环化,进而推断禾谷类作物中缺少能诱导 *vir* 基因活化的可扩散性物质。近些年来已有一些利用农杆菌转化禾谷类作物的报道(Gould 等, 1991; Schafer 等, 1987; Chan 等, 1993; Hiei 等, 1994; Ishidal 等, 1996; Rashid 等, 1996),多数研究者认为,加入 *vir* 区活化物质有助于农杆菌的转化。

Grimsley 等(1987)首次以玉米为材料,用农杆菌将玉米条纹病毒的 cDNA 导入玉米植株中;Gould 等(1991)用玉米芽尖的分生组织与农杆菌共培养,得到了几株转化植株;Hiei 等(1994)用含有 *gus/hpt* 质粒的根瘤农杆菌与水稻芽尖分生组织、悬浮系、幼胚盾片以及愈伤组织等共培养,得到了转化的再生植株;Ishida 等(1996)以玉米 A188 幼胚为材料,将含有 *hpt/gus*、*bar/gus* 基因的农杆菌与幼胚共培养,得到正常可育的转化植株,转化频率为 5% ~ 30%。

## 2 基因枪的遗传转化方法

80 年代中、末期,由于基因枪的发明,使植物转基因技术进入一个新的阶段。Klein (1987)、Christon (1988)及 Morikawa(1989)等的先驱工作,使基因枪导入技术逐渐发展并臻成熟起来。90 年代以来,玉米、水稻、小麦、大麦等禾谷类作物的基因转化已有成功的报道。基因枪法主要的优点是外源基因可以直接进入致密的再生的细胞团中,只需要良好的组织培养技术,而不必经过复杂的原生质体的制备和培养阶段,减少了由于原生质体长期继代培养,造成再生植株的变异。另一个优点是扩大了受体组织或器官的范围,无明显的宿主限制,再生频率较高的组织或器官都可以用基因枪,如胚性细胞悬浮系(Fromm 等, 1990; Gordon-Kamm 等, 1990; Cao 等, 1992; Somer 等, 1992)、愈伤组织(Bower and Birch, 1992; Vasil 等, 1992)、未成熟胚(Christou 等, 1991; Casas 等, 1993; Weeks 等, 1993; Wan and Lemaux, 1994, 1995)、分生组织(Bilang 等, 1993; Ritala 等, 1994)、花粉(Twell 等, 1989; Hamilton 等, 1992)、小孢子胚(Creissen 1990; Wan and Lemaux, 1994)及幼穗(Dupuis and Pace, 1993)等,为植物的基因转化工作提供了一套更为简化的手段。另外,基因枪转化技术还被应用于现代分子生物学的许多领域,如植物基因的转化和调控、基因导入植物细胞器等方面。

基因枪法是利用火药爆炸、高压放电或高压气体作为驱动力,加速金属粒子(微弹)使其

进入带壁细胞的一种方法。在此过程中,质粒 DNA 首先沉淀在微弹(钨粉、金粉等)表面(通常以氯化钙、亚精胺作为沉淀剂来促进 DNA 与微弹结合),通过动力,将包被微粒上的 DNA 分子,直接导入靶细胞中,其中一部分基因整合到植物染色体中,就可得到稳定的转化体。根据基因枪不同的动力系统,可将它们分为三类:第一类为火药式基因枪,它是最先出现的一种基因枪,由美国康奈尔大学(Sanford 等,1987)设计制造,1990 年美国杜邦公司推出的 PDS-1000 系统、国产 JQ-700 型基因枪(中国科学院生物物理研究所研制)均属于这种类型。结合有 DNA 的金属微粒被称之为微载体(Microcarrier)或微弹,携带载有微弹的尼龙或塑料弹头被称之为载体(Macrocarrier)或微弹载体。这种基因枪是利用弹膛中火药爆炸产生的动力,驱动载有微弹的微弹载体高速运动(328 ~ 656 m/s),当微弹载体抵达弹膛时被带有穿孔的挡板所拦截,而微弹由于惯性作用继续高速运动并击中靶细胞。这种基因枪自使用以来,已取得洋葱表皮细胞转化成功,这一技术很快又被用于烟草、水稻、玉米和小麦等多种植物,并得到瞬间或稳定表达。第二类为放电式基因枪(Electric arc discharge)。它的工作原理是通过高压放电引起水滴气化产生的冲力,驱动微弹载体连同微弹加速运动,使其行驶一定距离后,微弹载体被阻挡网挡住,而微弹则穿过阻挡网继续向前运动,轰击真空中的靶细胞或组织。1988 年 Christou 等用它转化了大豆愈伤组织,并得到了再生的转基因植株。1991 年他们又得到转化的籼稻和粳稻植株。第三类为气动式基因枪。气动式基因枪中具有代表性的是 Bio-Rad 公司出售的 PDS-1000/He 气动式基因枪,它也是由美国康奈尔大学 Sanford 等人(1991)在火药式基因枪的基础上设计的。气动式基因枪的动力来源是高度压缩的氦气、氮气或其它气体的爆炸性释放,作为微弹加速动力。PDS-1000/He 利用由不同厚度的聚苯均四甲酰亚胺(Kapton)薄膜制成的可裂圆片(Rupture disk)来调控氦气压力(450 ~ 2 200 Psi)。当氦气压力达到可裂圆片的临界承受压力时,可裂圆片破裂并产生强烈的气流,使微弹载体(2 mm 或 0.051 mm 厚的聚苯均四甲酰亚胺膜)携带微弹高速运动,遇到刚性的阻挡网,微弹载体被阻遏,而微弹利用惯性继续向前高速运动,轰击靶细胞或组织。PDS-1000/He 基因枪已将抗虫基因(Barnason 等,1991; Koziel 等,1993; Armstrong 等,1995)和抗病毒基因(Marsh 等,1993; Murry 等,1993)导入玉米中去,在改进植物育性、加强植物营养等方面的研究工作正在进行中。

总之,随着生物技术的不断完善和蓬勃发展,转基因技术也朝着高效、重复性高、简单、快速、适用性广等方向发展。有理由相信,今后会有更简便易行的外源基因导入方法发展和完善起来。

## 参 考 文 献

- 1 安韩冰,朱 楨. 基因枪在植物遗传转化中的应用. 生物工程进展,1997,17(1):18 ~ 26
- 2 傅荣昭,孙勇如等. 植物遗传转化技术手册. 北京:中国科学技术出版社,1994
- 3 Casas A M. Cereal transformation through particle bombardment. Plant Breeding Reviews. 1995,13:235 ~ 265
- 4 Hiei Y, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. The Plant J., 1994,6(2):71 ~ 282
- 5 Ishida Yuji, et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Bio. Technology, 1996,14:745 ~ 750

(英文摘要下转第 76 页)

- 6 盖国强. 张扬梨乡精神, 振兴阳信经济, 交流材料。  
 7 王宇霖. 世界果树栽培发展新趋势. 西北园艺, 1996, 3: 52 ~ 53  
 8 孟宪玺等. 东北地区西部生态环境脆弱带研究. 北京: 科学出版社, 1996

## How to Realize Collective and Lasting Development of Pomology in Jilin Province

ZHANG Maojun

(*Pomology Institute, Jilin Academy of Agri. Sci., Gongzhuling 136100*)

**Abstract** According to the cultivated character of fruit tree itself and successful experience of pomology development in the world, it is indicated that the collective road of lasting development should be taken in Jilin Province to develop pomology steadily, and the correlative ways were discussed.

**Key words** Pomology, Lasting development

(责任编辑: 任 禾)

.....  
(上接第 34 页)

## Application of Genefic Transformation in Gramineous Crops by Agrobacterium and Biolistics

LI Huifen, ZHANG Xiaoming and SONG Fengbin et al.

(*Institute of Biotechnology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118*)

**Abstract** At present, agrobacterium and biolistics are often used among various transformation methods for foreign genes into plant cells.

In this paper, the basic principle and the latest development of agrobacterium transformation for gramineous crops were narrated concisely. In the meantime, types, principle and application of particle gun was introduced briefly.

**Key words** Gramineous crops, Agrobacterium, Particle gun, Transformation

(责任编辑: 张 瑛)