

专论与综述

发根土壤杆菌及其应用研究进展

李用芳 周延清

(河南师范大学生命科学学院 新乡 453002)

摘要: 简要介绍了发根土壤杆菌的致病机理及其影响因素, 重点综述了发根土壤杆菌在用于获得转基因植物、生产次生代谢产物和促使植物生根等方面的应用。

关键词: 发根土壤杆菌, Ri 质粒, 毛状根, 转基因植物

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 03-0079-04

土壤杆菌是一类侵染性非常广泛的 G⁻ 杆菌, 土壤杆菌质粒介导的基因转移系统是植物基因工程中比较完善与有效的基因转移方法。与植物基因转化有关的有两种类型, 一为根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*), 它含有 Ti 质粒, 能诱导被侵染的植物细胞形成冠瘿瘤; 二为发根土壤杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*), 它含有 Ri 质粒, 侵染植物后能诱发植物细胞产生毛状发根, 即发根瘤。80% 的转基因植物是由土壤杆菌介导转化的, 其中大部分是用 Ti 质粒介导法获得的。近年的研究发现 Ri 质粒介导法比 Ti 质粒法具有一些优越性而被广泛重视和研究, 用它转化获得转基因植物和生物有效成分的报道愈来愈多。本文主要讨论发根土壤杆菌 Ri 质粒的特性、Ri 质粒所致发根瘤的特征及应用 Ri 质粒所取得的成就。

1 Ri 质粒的特性及致病机理

Ri 质粒上含有负责发根瘤自主性生长和冠瘿碱合成的基因^[1], 结构与 Ti 质粒相似, 主要有 T-DNA 区、Vir 区及冠瘿碱合成功能区和复制起始区等。根据合成冠瘿碱的不同可将 Ri 质粒分为 3 类: 农杆菌型、甘露碱型、黄瓜碱型。甘露碱型与黄瓜碱型 Ri 质粒的 T-DNA 是一个连续的 DNA 片段, 而农杆菌型 Ri 质粒的 T-DNA 是由左、右两个片段组成, T_R-DNA 上带有编码生长素合成酶的基因 (*tms-1*, *tms-2*) 与农杆菌合成酶的基因 (*ags*)。与根的形态发生及再生植株形态特征有关的基因群 *rolA*、*B*、*C*、*D* 位于 T_L-DNA 上, T_R-DNA 上的生长素合成基因给含 T_L-DNA 的植物细胞提供生根所必须的植物激素。T-DNA 区可以插入寄主植物基因组中, 使其所带的基因在植物中得到表达。*vir* 区不插入寄主植物基因组中, 但与 T-DNA 的转移有关。*vir* 区域基因群由 7 个 (A-G) 联合基因组成, *vir A* 为组成型表达, 其它 6 个基因通常处于抑制状态。发根土壤杆菌感染寄主植物时, 受伤的植物细胞释放的低分子酚类化合物诱导 Ri 质粒 *vir* 区域的基因群活化, 使 T-DNA 被切割、插入并整合进植物基因组 DNA 中, 并转录、转

译,发挥其机能使宿主植物产生发根。与致病有关的还有染色体毒性基因(*cht*),它的活化表达与发根土壤杆菌和植物细胞壁的附着有关,是致病早期阶段的必要步骤。

与根癌土壤杆菌相比,发根土壤杆菌在植物转化方面具有明显的优越性。首先,用 Ri 质粒作为基因载体时,不需要“解除武装”;其次由 Ti 质粒产生的瘤组织有可能是转化细胞与非转化细胞所构成的嵌合体,而由发根土壤杆菌转化植物产生的发根来源于同一个植物细胞;第三,发根的无性系可以通过激素的自主性进行选择;第四,与 Ti 质粒相比,Ri 质粒产生的发根分化为正常植株的分化率高,倍性稳定。由发根再生的植株经常表现出节间短、顶端优势比较弱、叶皱等特征,有利于植物转化体的筛选。

2 影响发根土壤杆菌致病的因素

影响发根土壤杆菌致病的因素很多,如菌株、植物种类和理化因子等。许多研究表明,发根土壤杆菌的致病性与其所含 Ri 质粒的类型有密切的关系。农杆菌型 Ri 质粒比甘露碱型和黄瓜碱型 Ri 质粒有更广泛的宿主范围。以前认为土壤杆菌只能感染双子叶植物,事实上,土壤杆菌也能侵染许多单子叶植物和少数裸子植物。目前已有 160 多种植物感染 Ri 质粒后产生发根,大多数为双子叶植物,裸子植物和单子叶植物较少,草本植物对质粒的敏感性强于木本植物,即使是同一种植物,不同器官的敏感性也不同,Estelle^[2]等的研究表明被感染细胞所处的相位对转化也起着重要作用。此外理化因子如酚类化合物、光照等对发根的诱导也有影响。

3 发根土壤杆菌介导的基因转移

借助发根土壤杆菌介导转移基因的方法,除了直接注射法与用野生型 Ri 质粒感染植物以外,为了克服 Ri 质粒太大、拷贝少等缺点,人们从分子水平对其加以改造,一为中间载体(Intermediate Vector),在该载体系统中,通过能在大肠杆菌中复制的小质粒(如 pBR322)和 Ri 质粒进行同源重组,将小质粒上所携带的目的基因克隆到 Ri 质粒的 T-DNA 区,再由 Ri 质粒将外源基因整合到植物细胞的染色体 DNA 中。二为二元载体(Binary Vector),Ri 质粒的 T-DNA 边缘序列位于一个既能在大肠杆菌中复制又能在发根土壤杆菌中复制的质粒上,而 Vir 区位于受体菌的不含 T-DNA 区 Ri 质粒或野生型 Ri 质粒上,Vir 区基因的产物可以反式作用于表达载体质粒上的 T-DNA 区(含目的基因),使其转移到植物核基因组中,并且稳定地整合于其中。近年来,科学家们又构建出一种超级二元载体(Superbinary Vector),主要用于土壤杆菌对单子叶植物的转化。

4 发根土壤杆菌的应用

4.1 用于获得转基因植物和培育作物新品种 对 Ri 质粒 T-DNA 进行改造,可以构建出新的具有目的基因和标记基因的 Ri 质粒,用含改造型 Ri 质粒的发根土壤杆菌感染植物细胞,可将目的基因导入植物组织,并可再生出转基因植物。早在八十年代,国外学者用发根土壤杆菌感染油菜、胡萝卜、烟草、牵牛、牛角花、番茄、黄瓜、苜蓿、莴苣、豌豆、参薯、薯蓣的子叶或叶片等,获得了它们的发根和转基因植物。1991年,Roest 用发根土壤杆菌 9402 侵染英国柞节茎外植体,获得了表达 *gus* 基因的转化根和愈伤组织。1992年,Yosgimatsu 等用发根土壤杆菌感染罂粟下胚轴小断,建立了转化培养

物, 转化苗有较宽的叶子、较长的节间; Lambert 用发根土壤杆菌 A_4 对苹果砧木 M_{26} 进行转化, 获得再生植株。1996年, Otani^[3] 等用含二元载体的发根土壤杆菌感染常春藤的子叶外植体, 获得发根和含 *npt II* 和 *gus* 基因的转基因植株; 1997年, Sevon^[4] 等用发根土壤杆菌转化天仙子获得发状根, 并由发状根的原生质体再生出成熟植株, PCR 证实具明显表型差异的转化植株含有 *rol* 基因; Christey^[5] 等用含二元载体的发根土壤杆菌 A4T 转化白菜, 获得了可育的转基因白菜。1999年, Henzi^[6] 等用发根土壤杆菌 A4T 转化椰菜, 获得了发状根和可育的转基因椰菜, 并用 PCR 和 southern blot 证实了 T-DNA 的整合; Momcilovic^[7] 等用发根土壤杆菌 ACTT15834 和 A4M70GUS 感染 4 个龙胆品种, 获得了两个品种的转基因植物, 转基因植物具有短节间和皱叶等典型形态。

4.2 用于生产次生代谢产物 利用植物细胞培养技术生产次生代谢物时, 由于细胞生长缓慢, 次生代谢物含量低, 有些还需激素维持, 生产能力不稳定等, 因此成本太高, 难以工业化生产。而发根能合成植物特征的次生代谢物, 而且其含量往往比植物的含量还高, 尤其是它的稳定性和生长迅速的特点是工业化生产所需求的, 因此发根培养技术将成为次生代谢物生产的一条可靠和有效途径。

国外在这方面的研究较深入, 如紫草、甜菜、胡萝卜、长春花等的发根已能进行工业化生产。人参悬浮培养细胞及再生根中人参皂甙含量较高, 但其生长需激素维持, Yoshikawa 和 Furuya^[8] 通过人参愈伤组织诱导出发根, 在无外源激素的条件下, 人参皂甙 (Rb 和 Rg) 含量高达干重的 0.95%, 高于再生根 (0.91%) 和天然栽培根 (0.4%)。Tada^[9] 等用发根土壤杆菌诱导芳香植物罗勒获得的发根在无激素的培养基上生长良好, 并积累 *rosmarinic acid*, 而相关的酚类化合物很少; Laurain^[10] 等用发根土壤杆菌 A_4 感染银杏雌性原叶体获得转化胚芽, 转化胚芽中银杏苦内脂和白果内酯的浓度高达 0.087% (干重), 高于未转化的同源细胞培养物 (0.065%); Kittipongpatana^[11] 等研究发现 *Solanum aviculare* Forst 的发根中澳洲茄胺的含量高达 6.2mg/g, 高于愈伤组织 (1.4mg/g) 和细胞悬液 (0.7mg/g); Inokova^[12] 等发现不同菌株对紫云英无菌苗诱导发根的能力、发根生长速度有影响, 对皂甙的产量也有影响。

国内学者在利用发根土壤杆菌获得转基因植物和生产次生代谢物方面也取得了可喜的成绩, 获得了油菜、赛茛苳、中果咖啡、甘草、甘蓝、萝芙木、金荞麦、绞股兰、丹参、番茄、桔梗、芥菜、决明、青蒿、黄瓜、西洋参等植物的发根, 有的还得到了转基因植物, 有的在发根中检测到了次生代谢物。天花粉蛋白是由多年生栝楼的块根制成, 近年来的研究表明它能选择性地抑制 HIV 的复制, 并能抑制绒毛膜上皮癌细胞的生长, 邱德有等用发根土壤杆菌 R1601 建立了栝楼发根的离体培养系统, 每克鲜重栝楼发根中天花粉蛋白的含量达 8.16mg; 紫杉醇是从红豆杉的树皮和针叶中分离的一种抗癌药物, 植物体中的含量极低, 国内外许多实验室都在开展利用发根生产紫杉醇的研究, 由于其市场潜力很大, 许多研究结果没有公开发表, 黄遵锡等报道了发根土壤杆菌 A_4 对短叶红豆杉芽外植体的转化, 并检测到发根中紫杉醇的含量为愈伤组织的 1.3~8.0 倍, 且发根在悬浮培养过程中, 还可向培养液中分泌 0.01~0.03mg/L 的紫杉醇; 刘春朝和刘本叶等对青蒿发根青蒿素的培养条件和生物合成动态进行了研究; 郑志和等对黄芪发根的大量培养和发根中化学成分及免疫功能活性进行了研究。

4.3 促使植物生根 Ri 质粒能诱导转化植物产生大量发根, 已引起人们的高度重视, 被人们广泛使用。1985年它被应用于苹果与扁桃的插条以改善生根状况, 从而有益于对干旱的抵抗。Hatta^[13]等发现发根土壤杆菌能诱导枣树的插条生根; Rinallo^[14]等报道发根土壤杆菌的 T-DNA 能促进榆树生根。Ri 质粒的这一特性对于难生根植物生根、存活具有重要意义。

另外, 还可以用 Ri 质粒作为载体通过发根土壤杆菌向植物基因组插入外源基因来生产外源基因产品, Stougaard^[15]等用含大豆血红蛋白基因的农杆菌型质粒 pRi15834 (中间载体) 诱发牛角花产生发根, 并由发根获得基因表达的再生植株。

发根培养技术的发展历史虽然较短, 但 Ri 质粒作为植物基因工程载体已显示出其可行性与方便性, 随着研究的深入, 它将会成为比 Ti 质粒更理想的基因转移系统, 更多的次生代谢物将会通过发根培养系统来生产, 并被用于难以插活植物的生根和生产外源基因产品。

参 考 文 献

- [1] Chilton M D. *Nature*, 1992, 295: 432 ~ 434.
- [2] Estelle V, Frederic D, Rajbir SS, *et al.* *Planta*, 1997, 201: 160 ~ 172.
- [3] Otani M, Shimada T, Kamada H, *et al.* *Plant Science*, 1996, 116 (2): 169 ~ 175.
- [4] Sevon N, Draeger B, Hiltunen R, *et al.* *Plant Cell Reports*, 1997, 16 (9): 605 ~ 611.
- [5] Christey M C, Sinclair B K, Braun R H, *et al.* *Plant Cell Reports*, 1997, 16 (9): 587 ~ 593.
- [6] Henzi Christey M C, McNeil D L, Davies K M. *Plant Science*, 1999, 143 (1): 55 ~ 62.
- [7] Momcilovic I, Grubisic D, Kojic M, *et al.* *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, 50 (1): 1 ~ 6.
- [8] Yoshikawa T, Furuya T. *Plant Cell Rep.* 1987, 6: 449 ~ 453.
- [9] Tada H, Murakami Y, Omoto T *et al.* *Phytochemistry*, 1996, 42 (2): 431 ~ 434.
- [10] Laurain D, Tremouillaux-Guiller J, Chenieux J C *et al.* *Phytochemistry*, 1997, 46 (1): 127 ~ 130.
- [11] Kittipongpatana N, Hock R S, Porter J R. *Plant Cell Tissue Org Culture*, 1998, 52 (3): 133 ~ 143.
- [12] Ionkova I, Kartnig T, Alfermann W. *Phytochemistry*, 1997, 45 (8): 1597 ~ 1600.
- [13] Hatta M, Beyl C A, Garton S, *et al.* *Journal of Horticultural Science*, 1996, 71 (6): 881 ~ 886.
- [14] Rindllo C, Mitterperger L, Prugis G, *et al.* *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 1999, 74 (4): 502 ~ 506.
- [15] Stougaard J, Abildsten D, Marck K A. *Mol Gen Genet*, 1987, 207: 251 ~ 255.