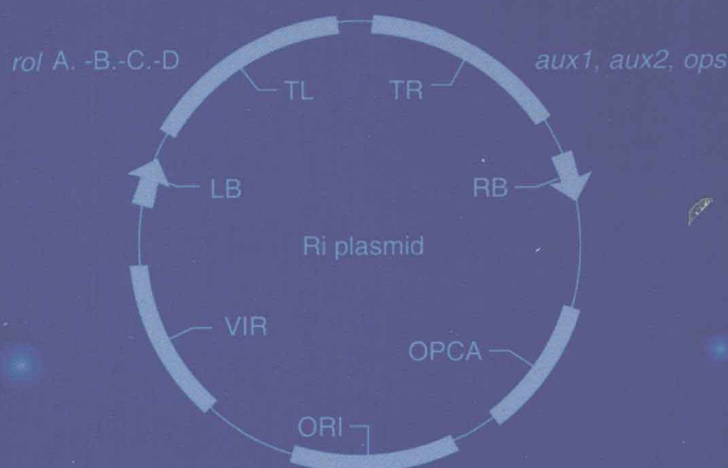




药用植物

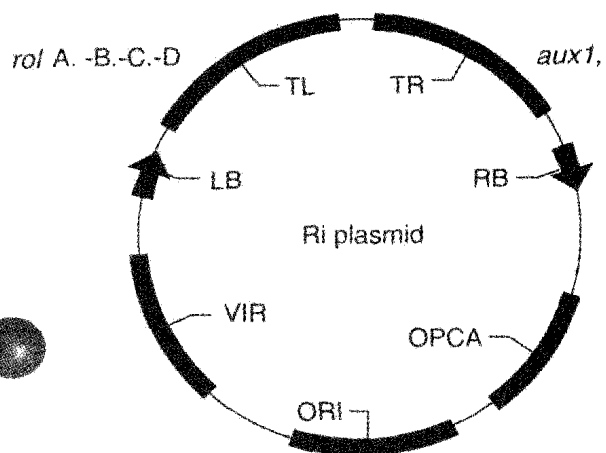
YAOYONG ZHIWU MAOZHUANGGEN
PEIYANG YU YINGYONG

毛状根培养与应用

主编 孙敏



西南师范大学出版社
国家一级出版社 全国百佳图书出版单位



药用植物 毛状根培养与应用

YAOYONG ZHIWU MAOZHUANGGEN
PEIYANG YU YINGYONG

主 编 孙 敏



西南师范大学出版社

国家一级出版社 全国百佳图书出版单位

图书在版编目(CIP)数据

药用植物毛状根培养与应用/孙敏主编.--重庆:
西南师范大学出版社,2010.12
ISBN 978-7-5621-5101-2

I. ①药… II. ①孙… III. ①药用植物—根毛—培养
(生物) IV. ①Q949.95

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 219341 号

药用植物毛状根培养与应用

主 编:孙 敏

副 主 编:张 来 张显强 孙一铭

责任编辑:杜珍辉

书籍设计:周 娟 唐拾珂

出版发行:西南师范大学出版社

(重庆·北碚 邮编:400715

网址:www.xscbs.com)

印 刷:重庆科情印务有限公司

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:14.75

字 数:286 千字

版 次:2011 年 5 月第 1 版

印 次:2011 年 5 月第 1 次

书 号:ISBN 978-7-5621-5101-2

定 价:45.00 元

生态学国家重点(培育)学科和
“面向三峡库区生态安全”211工程建设项目资助

编委会 *Editorial Board*

主 编 孙 敏

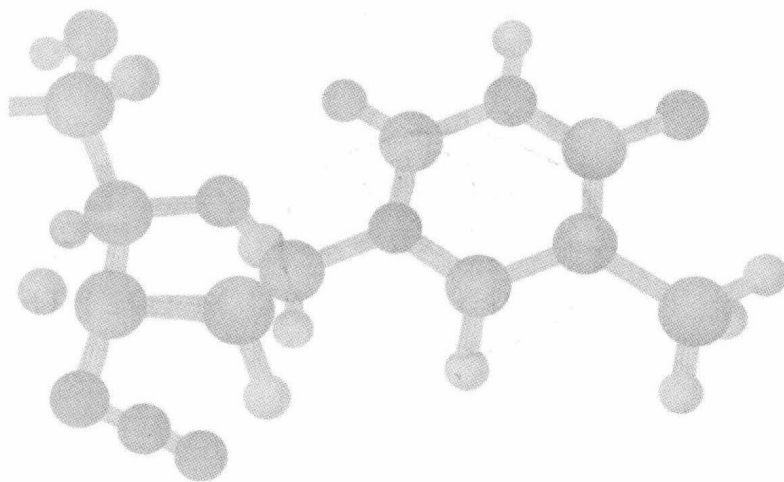
副主编 张 来 张显强 孙一铭

参编人员

彭 江 饶 灿 李想韵 宋 锋 李 鹏

雷 桅 汪 洪 陈 敏 杨 蕊 张继栋

杨雪清 李风华 王淑芳



目 录

第一章 发根农杆菌 Ri 质粒介导的植物遗传转化	001
第一节 发根农杆菌的分类和结构特征	001
第二节 发根农杆菌 Ri 质粒介导的植物遗传转化原理及过程	005
第三节 Ri 质粒诱导产生毛状根的特点	014
第四节 毛状根的培养与检测	015
第五节 毛状根培养的应用和展望	017
 第二章 药用植物毛状根培养的实验技术	023
第一节 受体转化体系的构建	023
第二节 毛状根的诱导与培养	027
第三节 毛状根 DNA 的提取及 PCR 检测	029
第四节 药用植物毛状根中次生代谢产物的测定	034
第五节 药用植物毛状根离体培养及植株再生	036
第六节 药用植物毛状根 <i>rol</i> 基因的克隆	038
第七节 发根农杆菌介导的目的基因转化	047
 第三章 药用植物毛状根培养与次生代谢产物的获得	049
第一节 理论基础	049
第二节 应用实例	071
 第四章 药用植物毛状根形态与植株再生	151
第一节 药用植物毛状根的形态结构	151
第二节 药用植物毛状根植株再生理论	158
第三节 药用植物毛状根植株再生实例	167
 第五章 代表性成果	189

第一章

发根农杆菌 Ri 质粒介导的植物遗传转化

发根农杆菌诱导植物产生毛状根的现象最早可追溯到 1907 年, 该年 Smith 和 Townsend 发现发根农杆菌能够诱导植物产生毛状根, 1934 年 Hildebrand 在对苹果树的研究中再次阐述了发根现象。1982 年 Chilton 报道在发根农杆菌侵染植物的过程中, 感染部位或附近产生大量的发状根, 它是由 Ri 质粒(Root inducing plasmid)引发产生的。20 世纪 80 年代以后, Ri 质粒及其发根机制的研究得到了高度重视, 尤其是日本、美国和欧洲一些发达国家, 在 Ri 质粒及转化特点上取得了重大突破。在国内外近 20 年的研究中, 先后从人参、短叶红豆杉、杜仲等 240 多种植物中成功诱导出毛状根, 多数集中在菊科、十字花科、茄科、豆科、旋花科、伞形科、石竹科、蓼科等植物。目前, 发根农杆菌在植物品种改良、栽培以及基因工程生产植物次生代谢产物等领域得到了广泛的运用。本章将对发根农杆菌的结构特点、转化机理以及实际应用作全面介绍。

第一节 发根农杆菌的分类和结构特征

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)属于根瘤菌科(Rhizobiaceae)农杆菌属(*Agrobacterium*), 是一种革兰氏阴性好氧型细菌, 外形呈杆状, 具鞭毛, 最适生长温度为 28℃, 能够感染大多数双子叶植物和少数单子叶植物以及个别裸子植物。常用于实验的发根农杆菌有 ATCC15834、ATCC39207、G58PGV3296、A4、NCPB2659、R1500、R1601、LBA9402、TR105 等菌株, 这些菌株中均含有致根质粒(Root inducing plasmid, Ri)。

一、发根农杆菌的分类

在具有完整 T-DNA 的 Ri 质粒诱导植物转化的细胞中, 能检测到一类特殊的非蛋白态的氨基酸——冠瘿碱(opines)。根据被转化植物体所产生冠瘿碱的不同类型, 通常将发根农杆菌及 Ri 质粒分为 4 类: 农杆菌型(agropine type)、甘露碱型(mannopine type)、黄瓜碱型(cucumopine type)和异黄瓜碱型(mikimopine type)。它们的 Ri 质粒类型及代



表菌株见表 1-1。一般来说,发根农杆菌 Ri 质粒的类型决定了其宿主的范围,Petit 等研究发现含农杆菌型 Ri 质粒的发根农杆菌较甘露碱型、黄瓜碱型和异黄瓜碱型有更为广泛的宿主范围。

表 1-1 Ri 质粒类型及代表菌株

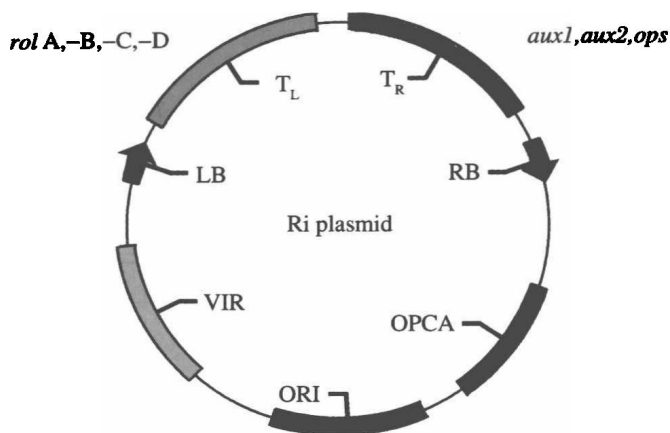
发根农杆菌类型 <i>Agrobacterium</i> type	合成的冠瘿碱种类 Opines type	代表菌株 Strains	质粒 Plasmid
农杆菌型	农杆菌碱 农杆菌碱酸 甘露碱 甘露碱酸 农杆菌碱素 A	1855	pAr15834a
		15834	pAr15834a
			pRi15834
			pAr15834c
		A4	pArA4a
			pRiA4
			pArA4c
甘露碱型	甘露碱 甘露碱酸 农杆菌碱酸 农杆菌碱素 C	HRI	pRiHRI
		TR105	Ri105
		8916	pAr8196a
			pRi8196
			pAr8196c
黄瓜碱型	黄瓜碱	TR107	Ri107
		NCPPB	
异黄瓜碱型	异黄瓜碱	2659	pRi2659
		NCPPB 2657	pRi2657
异黄瓜碱型	异黄瓜碱	MAFF0-301724	pRi1724
		MAFF0-301725	
		MAFF0-301726	
		A13	

二、发根农杆菌的结构特征及功能

Ri 质粒是独立存在于发根农杆菌细胞染色体外的双链共价闭合环状基因组 DNA (cccDNA),与 Ti 质粒一样均属于巨大质粒,大小在 200~800kb 范围内,并且具有独立的遗传复制能力,一个菌体中可能同时存在几种质粒。

Ri 质粒的结构按其不同功能主要分为以下几个部分(如图 1-1 所示):T-DNA 区

(Transfer-DNA region)、Vir 区 (Virulence region)、Ori 区 (Origin of replication) 以及冠瘿碱代谢功能区 (OPCA, Opine catabolism region)。根据近年研究结果,对 Ri 质粒各部分的主要功能作如下介绍。



T_L : Left T-DNA border; T_R : Right T-DNA border; ORI: Origin of replication;
VIR: Virulence region; OPCA: Opine catabolism.

图 1-1 农杆菌型 Ri 质粒示意图

1. T-DNA 区 (Transfer-DNA region)

即 DNA 转移区,它是发根农杆菌侵染植物后从 Ri 质粒上转移到植物基因组中的 DNA 区域,能够被植物的 RNA 聚合酶 II 催化转录。T-DNA 上的一部分基因决定肿瘤的表现型;此外 T-DNA 上还存在冠瘿碱合成基因,这些基因只能在真核细胞中转录而不能在农杆菌中转录,因为植物基因组上存在启动冠瘿碱合成基因的启动子而农杆菌中不存在这类启动子,冠瘿碱合成基因能够利用植物的营养成分诱导合成相关类型的冠瘿碱,冠瘿碱可作为农杆菌唯一分解利用的碳源和氮源。

农杆菌型菌株的 T-DNA 两端各有 25bp 的重复序列,它是限制性酶从 Ri 质粒上切下 T-DNA 的识别位点,缺此序列则不能形成毛状根。农杆菌型菌株的 T-DNA 由两段不连续的序列组成,即 T_L -DNA 和 T_R -DNA 区(如图 1-2 所示),它们都可以分别插入寄主植物基因组 DNA 中, T_R -DNA 区域的存在与农杆菌(ags)合成相关的基因群和生长素(IAA)合成相关的基因群(相当于 Ti 质粒上的 $Tms-1$ 和 $Tms-2$ 基因)有关,因此转化生成的毛状根为激素自养型。研究表明 T_R -DNA 区域存在三叶草式的碱基结构时侵染效率极高。而 T_L -DNA 区域的存在与农杆菌素(ags)合成有关的基因以及形成和决定毛状根及其形态特征的 Rol A-D 基因群(称 core T-DNA)有关,据已有的资料表明,各种 Ri 质粒均有 core T-DNA,它是决定毛状根生成和再生植株部分形态特征的基因群。而甘露碱型、黄瓜碱型和异黄瓜碱型菌株 T-DNA 只有一个单一的边界区,即



为连续的不含生长素合成基因,故由它们诱导的毛状根的生长培养对生长素有依赖性。甘露碱型、黄瓜碱型和异黄瓜碱型与农杆菌型 Ri 质粒的 T-DNA 没有明显的同源性,但在 T_L -DNA 区域具有高度同源的片断,它们的转化机理可能也和农杆菌型 Ri 质粒的 T_L -DNA 相似,这有待进一步论证。

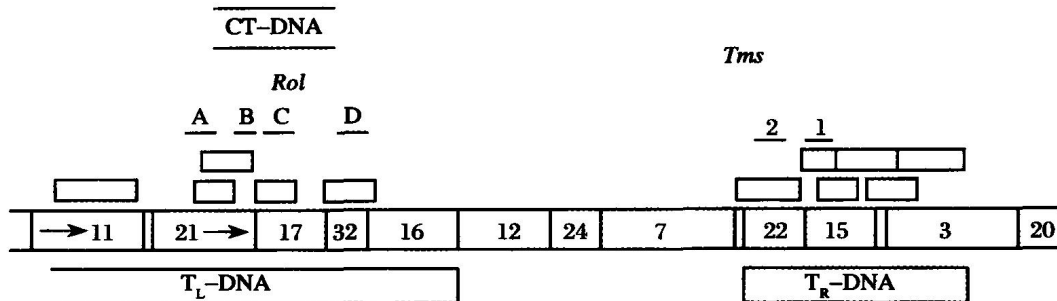


图 1-2 农杆菌型 Ri 质粒(pRiA4b)T-DNA 上的基因座位酶切图谱

2. Vir 区 (Virulence region)

Vir 区即毒区,该区域的基因能激活 T-DNA 转移,使农杆菌表现出毒性。Vir 区位于复制起点区和 T-DNA 区之间,由 Vir A、B、C、D、E、F、G 共 7 个基因组成,上述 4 种类型的质粒的 Vir 区均具有较高的保守性,它们在转化过程中虽然不发生转移,但对 T-DNA 的转移起着重要作用。一般情况下,除 Vir A 外的 6 个基因都处于抑制状态。当寄主植物被农杆菌侵染时,植物损伤部位细胞会合成小分子酚类化合物如乙酰丁香酮、羟基乙酰丁香酮等,并与 Vir A 基因产物结合,诱导其他基因活化,进而引发感染过程。研究发现,Vir A 和 Vir G 基因对其他联合基因有启动和调节作用。Vir D 基因能将 T-DNA 两端的 25bp 的重复序列切断后使其发生转移。其他基因尚不明确其功能。另外, Ri 质粒与 Ti 质粒在 Vir 区基因群具有高度同源性,其功能也相似,说明两者的进化关系特别密切。

3. Ori 区 (Origin of replication)

Ori 区即复制起始区,此区域基因调控 Ri 质粒的自我复制。

综上所述,Ri 质粒最重要的两个功能区域是 T-DNA 转移区和 Vir 区,在 Vir 区的调控作用下,最终使含有目的基因的 T-DNA 片段整合到植物基因组,使植物表现出发根症状。

第二节 发根农杆菌 Ri 质粒介导的植物遗传转化原理及过程

近 30 年来,国内外众多植物研究者们对发根农杆菌 Ri 质粒诱导植物产生毛状根的机制以及毛状根的生产应用进行了大量的研究,利用毛状根成功进行植株再生,促进植物生根、增强植物抗逆性以及生产次生代谢产物,并带来了一定的经济效益。然而,对于发根农杆菌诱发植物产生毛状根的详细机理目前尚不明确,但是其原理都集中体现在 Ri 质粒的功能特点上,其中一些关键环节已研究得十分透彻。本节将重点介绍发根农杆菌介导的植物遗传转化机制以及转化策略。

一、发根农杆菌 Ri 质粒介导的遗传转化机理

发根农杆菌介导的植物细胞遗传转化是农杆菌和植物细胞相互作用的结果。农杆菌侵染植物时,首先是在发根农杆菌染色体上的毒基因 *Chv* 的参与下吸附到植物细胞的细胞壁上,然后, *Vir A* 的产物(一个具有感受蛋白功能的跨膜蛋白能感受植物损伤细胞所传达的信号,如酚类化合物等),自身发生磷酸化,进而将磷酸基团转移到 *Vir G* 蛋白保守的天冬氨酸残基上,使 *Vir G* 蛋白活化,活化的 *Vir G* 蛋白以二体或多体的形式结合到其他的 *Vir* 基因启动子的特定区域,从而激活其他基因转录和表达。*Vir D2* 蛋白可专一性地切割松弛状态的 T-DNA 两端 25bp 的重复序列,使 T-DNA 成激活状态。之后, *Vir D2* 蛋白结合在 T-DNA 的 5'端,该端不被核酸外切酶降解,并通过 C-末端含有的细胞核定位信号引导 T-DNA 穿过农杆菌细胞膜上的特定“孔道”进入宿主植物细胞核,进而使 T-DNA 整合到植物基因组当中,经转录与翻译,发挥其功能,使植物表现出病症。

目前,对于根癌农杆菌 Ti 质粒转化机制的认识已比较深入,首先在农杆菌染色体基因的作用下,农杆菌附着在植物的细胞壁上,损伤的植物细胞会释放出酚类化合物激活 *Vir* 基因的表达。*Vir A* 基因的产物可能是植物信号分子的环境敏感因子,它直接或间接感受植物细胞释放的酚类物质信号,并通过激活细胞内 *Vir G* 的表达,进一步诱导 *Vir* 区其他基因的表达,其中 *Vir D* 可编码分子量为 16.2kDa 和 4.7kDa 的两个多肽,这两个多肽共同作用表现活性,专一性识别 T-DNA 边界两个 25 bp 的重复序列,并在这两个部位剪切形成游离的 T-DNA。游离的 T-DNA 在其他 *Vir* 基因产物的协同作用下以某种方式转移并整合到植物核基因组中。由此可见 Ri 质粒的转化过程和 Ti 质粒的转化过程存在很大的相似性,至此,我们可参考根癌农杆菌 Ti 质粒介导的转化信号传导机制(如图 1-3)来更好地理解农杆菌在植物遗传转化中的具体过程。

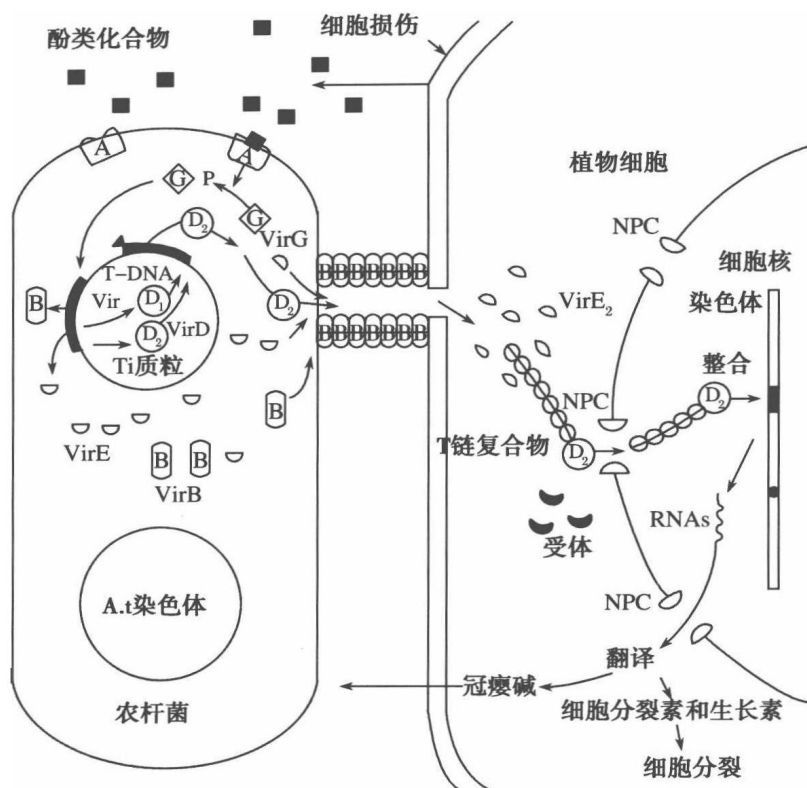


图 1-3 根癌农杆菌介导的基因转化示意图

在 Ri 质粒的几个分区中,只有 T-DNA 区最终转移到植物体内并整合到寄主的基因组中,可见 T-DNA 是引发植物产生毛状根的核心,尤其是 T_L -DNA 中 *Rol* 基因的作用最重要。目前对农杆菌型 Ri 质粒的 T-DNA 的研究相对较多。White 等通过插入与缺失诱变处理对农杆菌型发根农杆菌 A4 的 T-DNA 进行功能分析表明,在 T_L -DNA 上至少存在 4 个与毛状根诱导形成相关的基因位点,它们分别被命名为 *Rol*(root loci)A、B、C 和 D。后来,Slightom 等对 T_L -DNA 进行核酸序列分析发现 T_L -DNA 区上存在 18 个基因的 ORF(开放阅读框),其中,ORF10、ORF11、ORF12 和 ORF15 分别对应 *Rol*A、*Rol*B、*Rol*C 和 *Rol*D 这四个基因。同时 Hansen 等还通过实验验证在 T_L -DNA 上还存在新的基因位点 ORF13a。已证实与毛状根诱导有关的这些 *Rol* 基因的大小、编码蛋白功能及其在植物体内表达部位等均有所差异(见表 1-2)。

表 1-2 农杆菌型 Ri 质粒的 *rol* 基因的基本特性

<i>Rol</i> 基因	大小(bp)	氨基酸个数	蛋白质功能	表达特异性
<i>RolA</i>	300	100	增加原生质体对生长素的敏感性; 改变多胺的代谢	——
<i>RolB</i>	777	259	导致细胞产生高度的生长素敏感性; 体外能水解吲哚糖苷; 具有蛋白质酪氨酸酯酶活性	所有组织的原始细胞, 韧皮部与木质部的薄壁细胞; 胚胎发生期; 茎形成层区和韧皮部射线
<i>RolC</i>	540	180	增加原生质体对生长素的敏感性; 体外能水解细胞激素糖苷	茎、叶、根的韧皮部细胞, 伴胞细胞; 胎细胞发育期; 根尖的中柱鞘细胞及侧根原基
<i>RolD</i>	1032	344	——	根韧皮组织

Capone 等通过 *Rol* 基因转化烟草的研究表明, *RolB* 是诱导毛状根形成并控制其形态的主要因素, *RolA* 和 *RolC* 主要影响毛状根的生长速度与形态。 *RolA*、*RolB* 和 *RolC* 均能单独诱导出毛状根, 但三者结合起来能达到更好的诱导效果。当 *RolA* 位点突变时可形成又直又长的根; *RolB* 位点突变则会削减乃至丧失致根能力; *RolC* 位点突变则阻滞根的生长; 而 *RolD* 突变则加快愈伤组织生长, 形成与 Ti 质粒诱导类似的肿瘤。 *RolB* 基因在植物不同器官中的表达程度不同, 强弱关系为: 根 > 茎 > 叶, 这已在胡萝卜、烟草等植物中得到验证。与 *RolB* 基因相比, *RolA* 和 *RolC* 单独作用不能使高凉菜属植物诱导出毛状根。此外, *RolA* 基因在植物不同器官中的表达强弱为: 茎 > 叶 > 根, 而 *RolC* 基因在植物不同器官中的表达强弱为: 根 > 茎 > 叶。

T_R -DNA 只有在真核细胞基因组相应的启动子作用下才能转录表达, 其合成的冠瘿碱是 Ri 质粒转化成功的标志之一, 而另外合成的生长素能更好地促进毛状根的生长。通常认为 T_R -DNA 只是起到供给转化植物体生长素的功能, 而 *RolB* 基因则在植物细胞产生毛状根的过程中起到关键作用, 但这种说法也存在争议。Vilaine 等用 T_L -DNA 和 T_R -DNA 分别成功转化植物, 但 T_R -DNA 在烟草茎上诱导出的根与 T_L -DNA 诱导出的根在表型上是不同的: 前者在缺乏生长调节物质的培养基上不能生长, 即使有弱小的生长也不会表现高度分枝的特点。他们还发现 pRiA4 质粒的一个可能含有 *Aux* 基因的仅 6 kb 的 T_R -DNA 片段可以诱导出与全长 T_R -DNA 诱导发根表型一致的烟草发根。另外 McInnes 等也发现 T_R -DNA 区可以单独转化黄瓜, 诱导出的毛状根具有多根毛、能合成冠瘿碱等表型特征。Vilaine 根据自己的研究结果提出可能存在 T_R -DNA 和 T_L -DNA 两种不同的转化分子机制。但是由于 T_L -DNA 区的诱导效率较高, 其转化产物在生长和表型方面更具优势, 因而通常认为多数转化的毛状根是 T_L -DNA 的转化结果而没有 T_R -



DNA单独转化的毛状根。 T_R -DNA 和 T_L -DNA 共同作用的转化能力远远大于单独作用的转化能力,可以推断它们应该存在一定的协同作用。在 T-DNA 随机整合到植物基因组的过程中,一个农杆菌可通过两种途径转化得到多转化体,一种是两种 T-DNA 进行转化,另一种是多个菌体共同转化,通常前者更有效,因此被认为是多 T-DNA 整合的主要途径。

二、发根农杆菌 Ri 质粒介导的基因转化策略

作为植物遗传转化的载体必须是能进入宿主细胞,并进行复制和表达的核酸分子。目前的载体系统有病毒的载体系统和质粒的载体系统两大类。Ti 质粒的 T-DNA 具有致病性,其表达与植物再生是不相容的,所以必须解除“武装”(Disarmed)后才能用于植物转化。而 Ri 质粒上的 T-DNA 基因表达不影响植物再生,所以野生型的 Ri 质粒可以直接用于转化。Ri 质粒与 Ti 质粒在转化程序上基本上是相同的。一般包括以下几个步骤:(1)构建中间表达载体,将目的基因导入 T-DNA 区;(2)构建 Ri 质粒转化载体,将中间载体导入发根农杆菌;(3)用发根农杆菌工程菌液转化植物受体细胞,诱导毛状根;(4)对毛状根进行除菌、筛选和检测;(5)从毛状根诱导转基因植株。对于构建转化载体通常有以下两种转化策略。

1. 共整合载体系统转化

共整合载体(integrated vector)系统也叫一元载体系统,该方法常采用三亲杂交进行重组,见图 1-4。将含有已导入目的基因的中间载体(如 pBR322、pBI121 和 pBI101 等)的大肠杆菌作为供体菌,含有天然 Ri 质粒的野生型发根农杆菌作为受体菌,同时还需要含有一种协助供体菌质粒进行接合转移的质粒的大肠杆菌,称之为 helper 菌,常用含 pRK2013 质粒的 *E. coli* HB 101。三种菌混合共培养,helper 菌中的 pRK2013 质粒游动进入大肠杆菌内,提供游动(*mob*)和转移(*tra*)功能,把供体的重组质粒转移进农杆菌中。该系统中重组的载体质粒需要带有一个特定的转移起始点(*oriT*)和活化位点(*bom*),以协助质粒的 *mob* 和 *tra* 基因对它起作用,被驱动转移。中间载体中插入目的基因的 T-DNA 通过与发根农杆菌中 Ri 质粒上的 T-DNA 进行同源重组,而使目的基因和选择标记转移到 Ri 质粒的 T-DNA 中。由于中间载体在发根农杆菌中不能复制,故可自动丢失,最后利用选择标记基因筛选出其 Ri 质粒已导入目的基因的发根农杆菌。用这种带有目的基因重组 Ri 质粒的发根农杆菌液去感染宿主植物细胞,通过 Ri 质粒上 T-DNA 的转移功能,可将目的基因整合到宿主植物基因组中。但这种方法构建困难,整合体形成率低,一般不常用。

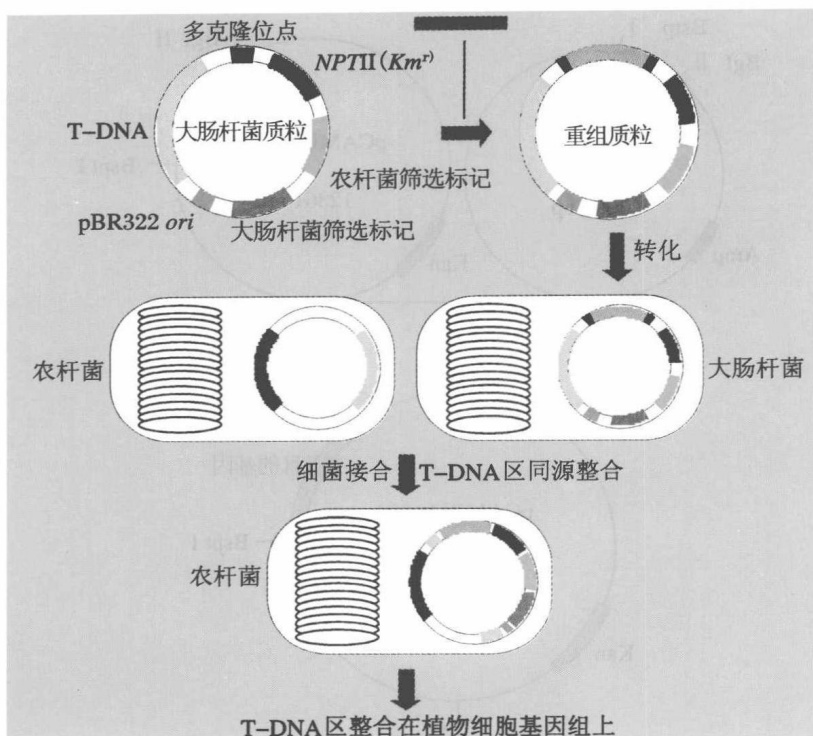


图 1-4 Ri 质粒共整合载体转化示意图

2. 双元载体系统转化

双元载体(binary vector)系统是目前 T-DNA 转化植物细胞的标准方法,构建程序和 Ti 质粒基本相同,它的原理主要是 Ri 质粒的 *Vir* 基因在反式条件下同样能驱动 T-DNA 转移,即 *Vir* 区基因和 T-DNA 分别在两个 Ri 质粒上同样能执行上述功能。双元载体系统包含两个质粒,一个是用于克隆外源基因片段的中间表达载体质粒,可在大肠杆菌及根瘤土壤杆菌中复制,容易操作,并可在二者间转移,也是一种穿梭质粒。在 T-DNA 序列外,还有细菌选择标记基因,在 T-DNA 的 LB 至 RB 内有一个多克隆位点及植物选择标记基因。如由廖志华等改造构建的 pCambia1304 中间表达载体,它具有原核生物的卡那霉素抗性基因(*Kan*)作为细菌选择标记,真核生物的潮霉素抗性基因(*hpt*)作为植物的选择标记。双元载体系统的另一个质粒,是非致病 Ri 质粒,该质粒没有 T-DNA 序列,具有 Ri 质粒的毒性基因,毒性基因表达的产物以反式调控方式控制穿梭质粒上 T-DNA 的转移,如由廖志华等改造构建的发根农杆菌 C58C1(disarmed and harboring pRiA4)中的 pRiA4 质粒。由这两个质粒构建的双元载体过程如图 1-5 所示。将上述两质粒分别导入速冻的发根农杆菌感受态细胞,经发根农杆菌介导,中间表达载体中的 T-DNA 转移到植物基因组中。相比之下,双元载体系统构建的操作过程比较简单,而且对植物外源基因的转化效率也高于一元载体。

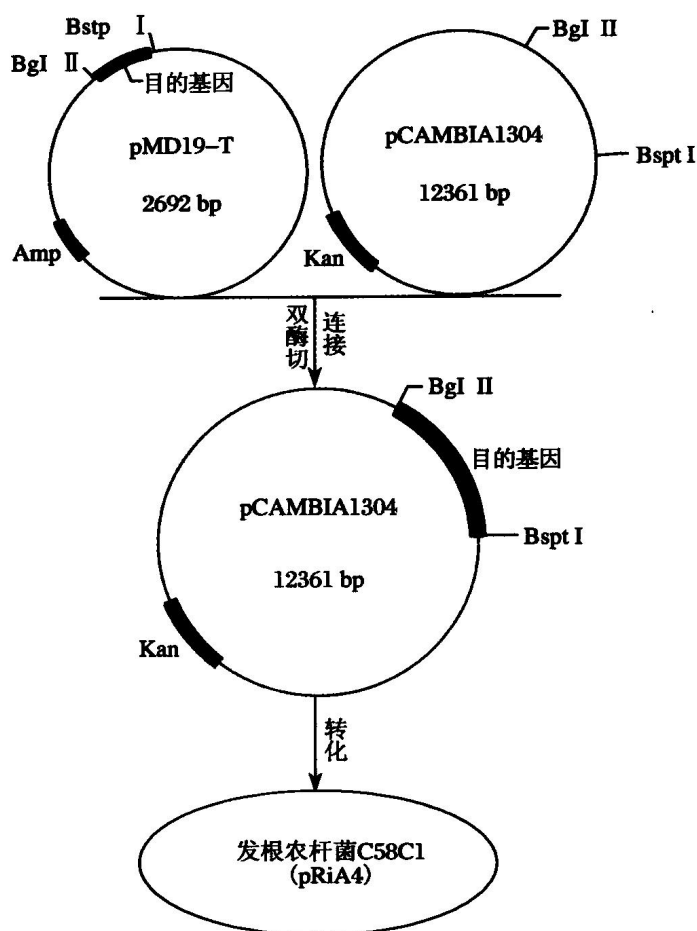


图 1-5 二元表达载体构建示意图

三、发根农杆菌 Ri 质粒介导的转化方法

植物遗传转化方法可分为两大类：一类是直接基因转移技术，直接导入外源基因包括化学转化法(PEG 法和脂质体介导法)、物理转化法(电激法和基因枪法)、整株导入法(花粉管通道法、微针注射法、浸胚法、花粉浸渗法、生物场转化法等)，其中基因枪转化法是代表性方法。另一类是由生物介导的转化方法，主要有农杆菌介导和病毒介导两种转化方法，其中农杆菌介导的转化方法操作简便、成本低、转化率高，广泛应用于双子叶植物的遗传转化。

PEG 法、电激法、微针注射法的优点是适用于各种植物，通过原生质体转化获得的再生植株无嵌合体发生，有利于生产实践的应用，但是原生质体培养比较困难，再生频率低，重复性差。基因枪法除具有上述直接转化系统的特点外，还克服了以原生质体

为受体细胞的缺点,适用于任何植物的材料,但该技术目前尚不成熟,外源 DNA 整合的机理尚不清晰。花粉管通道法是基因工程技术与常规杂交育种相结合的方法,其直接以花粉粒为媒体,操作简单、方便,但该技术的转化机制目前尚有异议。1985 年,Hooykass 等创立了农杆菌介导的“叶盘法”转基因系统,大大简化了以往利用原生质体为受体的转基因系统,具有里程碑意义,这个系统至今仍被采用。各种基因转化方法的特点见表 1-3。

表 1-3 常用植物基因转化方法特点的比较

项目	农杆菌法	PEG 法	电激法	注射法	基因枪法	花粉管法
受体材料	完整细胞	原生质体	原生质体	原生质体	完整细胞	卵细胞
寄主范围	有	无	无	无	无	有性繁殖植物
组培条件	简单	复杂	复杂	复杂	简单	不需要
转化率	$10^{-2} \sim 10^{-1}$	$10^{-5} \sim 10^{-4}$	$10^{-5} \sim 10^{-4}$	$10^{-3} \sim 10^{-2}$	$10^{-3} \sim 10^{-2}$	$10^{-1} \sim 10^2$
嵌合体	有	无	无	无	多	无
操作要求	简单	简单	复杂	复杂	复杂	简单
设备要求	便宜	便宜	昂贵	昂贵	昂贵	便宜
转化工作率	高	低	低	低	高	低
单子叶转化	少	可行	可行	可行	广泛	广泛

虽然发根农杆菌转化的方法很多,但是它们都包括以下几个基本过程:①发根农杆菌的纯化、活化培养;②植物材料的处理,包括预培养和切割;③接种农杆菌于植物材料以及共培养(cocultivation);④毛状根的分离及培养;⑤毛状根转化体的鉴定和选择;⑥转化体毛状根的植物再生及培养;⑦转化体毛状根及植株的代谢物质含量测定及分析。下面对常用的几个方法作较详细的概述。

(1) 植物体直接接种法

首先对植物种子消毒处理后,接种到合适的培养基让其萌发并长出无菌幼苗。取茎尖继续培养,直到无菌植株生长到一定时期,将其茎尖和叶片切去,剩下茎秆和根部作为侵染材料,在茎秆上用针刺一些伤口,将带 Ri 质粒的农杆菌接种在伤口处,接种后继续培养所侵染的植株。培养一段时间后,在接种部位会产生毛状根。这种方法最为简便,但仅适合于可用茎尖继代培养的植物。

(2) 外植体共感染接种法

常用的外植体有胚轴、子叶、子叶节、幼叶、肉质根、块茎及未成熟的胚、叶片、茎段和叶柄等,通过消毒处理后,与农杆菌共同培养 2~3d,再将外植体转移到含有抗生素的选择培养基上进行筛选培养,每隔 5d 左右进行继代培养,农杆菌被杀死,转化细胞产生愈



伤组织或产生毛状根。下胚轴切段倒插法是一种较为常见的方法。另外,叶盘法也是常用的方法,需注意的是叶盘侵染后应叶背面朝上放在培养基上,在叶圆片切口周围可见长出的毛状根。

(3)原生质体共培养法

将植物的愈伤组织按常规方法处理制备成原生质体,原生质体再生壁细胞与农杆菌混合共培养,农杆菌对原生质体进行转化。在含有抗生素的选择培养基上对转化细胞进行筛选得到转化体,最后通过分化培养基得到完整植株。该方法要求原生质体有较高的再生率,此方法难以用于那些原生质体培养还没有成功或再生率很低的植物。

四、发根农杆菌介导基因转化的影响因素

(1)农杆菌菌株属性差异对转化的影响

长期以来,科学工作者们对发根农杆菌菌株的选择和处理进行了深入研究以期望更佳的转化效率,这是因为发根农杆菌菌株的属性对转化是否成功具有决定性的影响。不同菌株对不同植物或同一植物的不同组织所表现的侵染能力是不相同的。相比其他菌株而言,农杆菌型菌株具有更广的寄主范围和更强的侵染力,可能是由于农杆菌型菌株 T_R -DNA 上具有 *aux* 基因。在柑橘的离体转化研究中,发根农杆菌 A4 菌株的致根力较 R1000 大,而 pRi15834 致根力最弱;桔梗叶片更合适用于接受 pRi2659 菌株的感染,而 pRi15834 和 pRiA4 诱导能力较低。对蓝猪耳的转化研究表明:R1000 的转化率最高,A4 次之,而 R1601 最低。由此可见,发根农杆菌的致根特性与其所带质粒类型有关。另外,菌株活力的保持与菌株的保存与活化方法密切相关,保存不当容易使质粒变异或丢失,进而丧失致病力;菌株活力(浓度)影响农杆菌向植物细胞的聚集与附着以及 Vir 区基因的表达,处于对数生长期的菌株活力最强。

(2)植物基因型及外植体对转化的影响

在 Ri 质粒转化过程中寄主植物本身的参与极为重要,几乎所有的研究结果都表明:同一菌种侵染不同植物或者侵染同一植物的不同生长部位的转化结果都存在差异,有的甚至局限于某种植物的某一基因型。因此在进行转化之前有必要对植物的基因型进行选择。通常认为基因型的特异性与细胞的生理状态存在一定关系,具体来说与细胞受伤后的生理反应(如小分子酚类化合物的分泌)、细胞内源激素的水平(影响细胞的生长、分化)、细胞壁的结构(细菌吸附)等有关。对莴苣、拟南芥、马铃薯的转化表明基因型的差异表现比菌种的差异大。

(3)再生植株的细胞起源对转化的影响

将外源基因导入那些具有再生能力的细胞是成功转化的关键。农杆菌主要作用于植物表层细胞,如果再生植株细胞起源于深层细胞,则转化很难进行,就算得到转化株,