

## 专论与综述

## 高等植物在发根农杆菌介导下的遗传转化

何玉科 巩振辉

(陕西杨陵西北农业大学园艺系)

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)同根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)一样可介导高等植物的遗传转化。人们对于 Ri T-DNA 与 Ti T-DNA 同源性(homology)的研究,逐渐丰富和发展了发根农杆菌转化的理论,促进了发根农杆菌的开发和利用。

## 一、发根农杆菌的生物学特性

发根农杆菌是一种寄主非常广泛的土壤细菌,能够侵染几乎所有的双子叶植物和少数单子叶植物<sup>[1]</sup>。在自然状况下,发根农杆菌通过伤口主要侵入植物的茎基部,导致了不定根和侧根的大量发生,出现毛状根(hairy root)的症状<sup>[2]</sup>。毛根病的症状明显不同于根癌农杆菌侵染植物组织引起的冠瘿瘤。

根据来源的不同,人们将发根农杆菌分为 8196 和 A<sub>4</sub> 两大类。前者是从苹果树上分离得到的,致毒力较弱,后者是从玫瑰植株上分离得到的,致毒力较强。A<sub>4</sub> 型菌株引致的转化组织合成各种农杆菌碱(agropine),8196 菌株引致的转化组织合成与农杆菌碱有关的其他冠瘿碱<sup>[3]</sup>。因此,通常把 A<sub>4</sub> 型菌株叫作农杆菌型菌株。而把 8196 型菌株叫作甘露碱(mannopine)型菌株。除了农杆菌型菌株和甘露碱型菌株外,不久前又发现一种叫作甜瓜碱(cucumopine)的冠瘿碱<sup>[4]</sup>。

发根农杆菌 Ri 质粒上的 T-DNA 包括左边界(T<sub>L</sub>-DNA),右边界(T<sub>R</sub>-DNA)和中间大约 15 kb 的核心 DNA。T<sub>R</sub>-DNA 上有两个非常重要的基因是生长素合成基因 tms 1 和 tms 2,它们指导 IAA(吲哚乙酸)的合成。Cardarelli 构建了含有不同 T-DNA 基因的发根

农杆菌,并用它们侵染胡萝卜肉质根圆片<sup>[5]</sup>。

在农杆菌,甘露碱和甜瓜碱 3 种 Ri 质粒中,只有农杆菌质粒的 T<sub>R</sub>-DNA 上含有生长素基因,其他两种质粒均不含有生长素基因。甘露碱和甜瓜碱型 Ri 质粒的 T<sub>R</sub>-DNA 与农杆菌型 Ri 质粒的 T<sub>R</sub>-DNA 没有明显的同源性,却与它的 T<sub>L</sub>-DNA 具有同源的碱基序列<sup>[4]</sup>。不寻常的是,这些缺乏生长素基因的 T-DNA 也能产生毛状根。在甘露碱型菌株侵染后,胡萝卜肉质根圆片的顶面(面对根尖)着生毛状根,在农杆菌型菌株侵染后,圆片的顶面和基面同时生根。

Ri 质粒 T<sub>R</sub>-DNA 不仅具有编码生长素合成的基因,而且也载有编码农杆菌碱合成和甘露碱合成的基因<sup>[6]</sup>。这样, Ri T-DNA 和 Ti T-DNA 的同源序列至少包括生长素合成基因和农杆菌碱、甘露碱合成基因。值得注意的是, Ri T-DNA 上定位和能够分离的基因都在 T<sub>R</sub>-DNA 区域。

## 二、发根农杆菌的遗传转化操作

目前,用于发根农杆菌转化的方法很多,但转化的基本程序是一致的:(1)发根农杆菌菌株的分离与培养;(2)被转化植物材料的培养和切取;(3)发根农杆菌在植物外植体上的接种和共培养(cocultivation);(4)诱导根的分化和培养;(5)转化体的确认和选择;(6)转化体毛状根的植株再生培养;(7)转化体的生物测定和分析。在发根农杆菌介导的转化实验中,作为受体的植物材料通常有下胚轴切段、茎切段、叶圆片、肉质根和块茎圆片、悬浮培养的植物细胞以及原生质体。下胚轴切

段倒插法是一种较为常用的方法<sup>[7-10]</sup>。何玉科和 Voorrips 发现,单根培养之前,切取切段生根的顶端部分在新鲜培养基上再培养 10 天可显著提高转化频率。

茎切段一般取自大田和温室里的植株。将经过表面消毒的茎切段插入培养基,用沾有发根农杆菌悬浮液的刀片穿刺或切伤茎切段的任何部位,结果在这些刺伤和切伤的部位着生毛状根<sup>[11]</sup>。肉质根和块茎圆片法适合胡萝卜、马铃薯、甜菜、芜菁、辣椒等地下器官植物。在肉质根或块茎表面消毒后,切成 5 cm 厚的圆片,摆放在琼脂培养基上培养,接种一定量的发根农杆菌悬浮液于圆片的切面上,其结果在接种发根农杆菌的部位形成毛状根。叶圆片法同肉质根和块茎圆片法相似。新鲜的植物叶片经表面消毒后被切成圆片,侵入细菌悬浮液,接种发根农杆菌。然后在无菌滤纸上干燥叶圆片,以顶部朝上摆放在培养基上。为了保持叶圆片的生长活力,提高转化频率(transformation frequency),有人用悬浮培养的植物细胞作为看护培养(nurse culture)层,夹在接种的叶圆片与培养基中间。根的发生部位常常在叶圆片周围的切口处。叶圆片法最易引起植物组织周围发根农杆菌的过生长和培养基的污染,导致叶圆片的黄化和死亡。

利用原生质体进行遗传转化适用于那些原生质体容易再生植株的植物<sup>[12]</sup>。这种方法大多采用裸露的质粒,而不是发根农杆菌本身。将微量的质粒 DNA 加入原生质体悬浮液中,通过一段时间的转化培养,就有可能得到转化的植物原生质体。这些转化的原生质体可发育成转化细胞和愈伤组织,并进而分化转化根或再生转化植株。

### 三、Ri T-DNA 转化体的形态特征

尽管发根农杆菌转化所采用的植物材料不同,但它们最初的转化体绝大多数是转化根。转化根的特征是:(1)能够在无激素培养基上生长;(2)分生不定根和侧根的能力极强,呈

现毛状根的特征;(3)趋向于水平生长,根生长的向地性全部或部分地消失;(4)多数含有相应的冠瘿碱。

不同植物在转化根的生长习性上有很大差异,同一种植物的同一品种内也可产生根生长方式明显不同的转化系<sup>[13]</sup>。同时,转化植株在形态生理以及生长发育特性上也表现出一系列的异常变化。许多植株在发根农杆菌转化后叶缘缺刻变浅、叶片皱缩、节间缩短、顶端优势减弱、侧根和不定根分生能力增强、向地性生长的能力弱化、柱头异长、雄性可育能力降低<sup>[14]</sup>。另外,一些转化植株的渗透势降低、细胞汁液中的  $K^+$  减少,呼吸速率降低。

值得注意的是,这些转化植株异常的表现和它们的 Ri T-DNA 是永久性的遗传变异或遗传信息,可通过减数分裂传递给子代<sup>[15]</sup>。Tepfer 的实验结果显示,转化体异常的形态生理特征可遵循孟德尔遗传规律进行遗传,而且大多数为显性<sup>[16]</sup>。

不论是发根农杆菌转化后的转化体,或者是它们自交或杂交后的子代,转化植株在形态生理各方面的异常表现均呈现植物种间、品种间以至个体间的差异<sup>[13]</sup>。例如,在不同植物之间,胡萝卜和烟草转化植株的种子生产量减少,而牵牛花转化植株的种子生产量没有变化<sup>[16]</sup>。在牵牛花不同转化系之间,有些转化系植株的开花期延迟,开花频率提高,而一些转化系转化植株的开花期则正常或提前。即使是同一转化系的不同个体间,有时也出现微小的差异。

引起转化根和转化植株异常表现的直接原因是发根农杆菌导入的 T-DNA,其中包括:

(1)发根农杆菌向植物组织的不同细胞转入了不同的 T-DNA;(2)T-DNA 的不同片段插入到不同植物细胞的基因组内;(3)T-DNA 在不同植物细胞基因组内插入位置的不同,引起植物基因功能的变化;(4)T-DNA 的构造不同,在不同植物细胞里插入方式不同。有时候,T-DNA 的插入会干扰植物细胞基因组内相邻基因,从而返过来调节 T-DNA 的作用,

以间接的方式发挥作用。转化体 T-DNA 的结构组成与形态生理特征之间的这种相关性有助于人们对植物形态生理基本现象的研究。

#### 四、发根农杆菌转化的利用

令人欣慰的是,转化体内的 T-DNA 基因以及异常的形态生理表现对植物本身并没有明显的害处。相反,有些 T-DNA 基因以及由它们指导的形态特征有利于作物的改良和生产。在这方面, T-DNA 上的生长素基因应用最多,含有生长素基因的转化体由于具有强大的生根能力可用于根用作物的快速生产。

日本人 Yoshikawa 和 Furuya 用发根农杆菌接种人参的愈伤组织,结果得到了带有 T-DNA 的转化根<sup>[17]</sup>。正常的人参根系在无激素培养基上不生长或生长很慢,而转化根在此条件下分生侧根的能力极强、生长速度很快。据测定,在同样的条件下,人参转化根的生长速度是其正常根的两倍,但两者的皂甙(saponin)含量基本一致。由于人参植物的根是珍贵的药品和滋补品,在自然界里生长很慢、产量很低。人参转化根的出现为人参在组织培养条件下的大规模生产带来了新希望。

在制药工业和食品工业中,有些生物碱和色素等次生代谢产物(secondary metabolites)很难采用常规的方法生产。kamada 在 *Atropa belladonna* 植物上用发根农杆菌转化,发现了一批转化根,实现了阿托品(atropine)和东莨菪碱(scopolamine)的高效生产<sup>[18]</sup>。Hamill 从 *Beta Vulgaris* 和 *Nicotiana rustica* 植株中选择出一些迅速生长的转化根,用于甜菜碱(betalain)和烟碱的高效生产。利用转化根快速生长的特性,已经开始生产多种生物碱和色素<sup>[19,20]</sup>。

由于转化体具有异常的形态表现,也由于不同转化系之间在形态生理各方面有差异, Ri T-DNA 的转移在植物遗传育种上可作为一种选择筛选优良性状的系统。将 Ri T-DNA 的生长素基因转入石刁柏等难于生根的植物中,可以使这些植物获得生根的性状,同时促

进这些植物的扦插成活,将有性繁殖植物变为无性繁殖植物。胡萝卜是两年生植物,它的一些转化系失去了两年生的性状转变为一年生。根据这一现象,在大量的转化群体中可望发现其他性状都优良的一年生胡萝卜<sup>[21]</sup>。烟草不同转化系中,有些转化系杂交后代的植株丧失了雄性可育能力,利用这一点,可选择雄性不育株和雄性不育系。

许多植物转化后侧根分生能力大为增强,在这些根系发达的植株中,可以选择抗旱能力较强的品系和单株。Moore 早在 1979 年就报道,发根农杆菌侵染苹果树后使苹果树的抗旱性增强<sup>[2]</sup>。另一方面,许多植物转化后根系生长的向地性不明显,根群分布在浅土层中,这样,在这些根系分布较浅的转化植株中,又可选择抗涝性的作物品种<sup>[21]</sup>。很明显, Ri T-DNA 在增强植物的抗逆性上有很大的潜力。

事实上,同一植物不同转化系之间在性状表现上有差异,这种差异是由转化体内 T-DNA 片段的差异和结构效应引起的。因此,在同一种植物或同一品种之间出现形态不同的转化系是不足为奇的。形成不同转化系的不同植物细胞本来就可以吸收不同的 T-DNA 片段。在这种情况下,人们很难指望所有的转化体象人们要求的那样都带有目标基因和目标性状。通过发根农杆菌转化,要获得具有某种目标性状的新品种或新类型,往往需要时间选择和筛选。

有关发根农杆菌转化的研究还有一个活跃的方面,那就是农杆菌和植物之间的进化关系。一些研究结果显示,植物染色体 DNA 和 Ri T-DNA 的某些碱基序列是完全相同的。也就是说,植物和发根农杆菌含有一些相同的基因,编码同样的酶类,也可能控制一些相同性状的表现。问题是,这种同源的 DNA 片段最初来源于农杆菌,还是植物。结合前人的研究成果可以推断,这两种可能性都存在。在植物漫长的进化过程中,农杆菌通过侵染植物,向植物转入它的 T-DNA 基因,因而促进了植物

的变异和进化。另一方面,在农杆菌长期的进化过程中,农杆菌也吸收了植物的一些基因。尽管后一种的可能性还缺乏足够的证据,但是有许多迹象表明,微生物现在所具有的一些性状最初来自植物<sup>[21]</sup>。如果植物参与了农杆菌的进化,那么,将植物基因转移给农杆菌则是可能的。这样农杆菌就可同时容纳它自己本身的遗传信息和一些植物的遗传信息。因此,用农杆菌转化植物,就等于进行农杆菌与植物及植物之间的远缘杂交。

同根癌农杆菌的Ti质粒一样,发根农杆菌的Ri质粒也可以成为共整合的中间载体或二元载体。在Ri T-DNA上插入新霉素磷酸转移酶(NPT II)基因能够使转化体表现出抗卡那霉素的性状。抗卡那霉素的性状是一种比较理想的标志性状,即使质粒载体中不含有冠瘿碱合成基因和生长素基因,转化体中抗卡那霉素基因的存在也表明了植物组织的转化。目前,二元载体中常用的标志基因(marker gene)和报告基因(report gene)有 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶( $\beta$ -Gus)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、 $\beta$ -半乳糖苷酶、潮霉素磷酸转移酶(HPT)合成基因。

迄今为止,用于植物基因转移的外源有用基因大多来自不同种类的细菌,还没有一种来自高等植物的基因。这主要是因为,当今所掌握的生物技术还无法定位和分离植物体内的有用基因。因此,植物染色体上存在的有用基因至少在目前还不能借助Ri质粒或Ti质粒从一种植物转移到另一种植物中去。探索遗传转化的应用价值,仍然以野生发根农杆菌为主,而且主要是发掘原始T-DNA的有用基因。

正因为如此,有些人开始观察研究Ri T-DNA对寄主抗病性、抗虫性的影响<sup>[22]</sup>。Ooms通过发根农杆菌的转化作用,观察烟草转化体抗TMV性状的变化<sup>[23]</sup>、何玉科、Mugnier在甘蓝Ri T-DNA转化根上接种包括根肿菌在内的多种专性寄生菌,观察寄主对这些病菌的侵染反应<sup>[24-26]</sup>。

## 摘 要

本文介绍了发根农杆菌的生物学特性、遗传转化的操作技术、Ri T-DNA转化体的形态特征以及发根农杆菌转化的利用。与根癌农杆菌不同,农杆菌型发根农杆菌的Ri T-DNA含有生长素合成基因、农杆菌碱、甘露碱合成基因,不含有细胞分裂素合成基因,它的转化体首先是转化根。发根农杆菌介导的植物遗传转化,在次生代谢产物生产,植物抗逆性育种以及细菌与植物进化关系的研究等方面具有广泛的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Ark P. A., Thompson J. P., 1961, *Phytopathology*, 51: 69-71.
- [2] Moore L. et al., 1979, *Plasmid*, 2: 617-626.
- [3] Srielmann A. and Simpson R. B., 1986, *Mol. Gen. Genet.*, 205: 34-41.
- [4] Combard A. et al., 1987, *Plasmid*, 17: 137-148.
- [5] Cardarelli M. et al., 1987, *Mol. Gen. Genet.*, 209: 475-480.
- [6] De Poalis A. et al., 1985, *Plasmid*, 13: 1-7.
- [7] 何玉科, R. E. Voorrips, 1989, 西北农业大学学报, 17 (4): 1-8.
- [8] 何玉科, 1990, 西北农业大学学报18 (2): 21-28.
- [9] He Y. K. (何玉科), 1989, Beijing International Conference on Biotechnology, pp. 111.
- [10] 何玉科, 1990, 生物工程学报, 6 (2).
- [11] Ooms G. et al., 1985, *Theor. Appl. Genet.*, 71: 325-329.
- [12] Wei Z. M. et al., 1986, *Plant Cell Reports*.
- [13] 何玉科, 1990, 西北植物学报, 10 (1): 61-66.
- [14] White F. F. and Sinka V. P., 1987, Springer-Verlag Wein New York, pp. 147-179.
- [15] Budar F. et al., 1986, *Genetics*, 114: 303-313.
- [16] Tepfer D., 1984, *Cell*, 37: 956-967.
- [17] Yoshikawa T. and Furuya T., 1987, *Plant Cell Reports*, 6: 449-453.

- [18] Kamada H. et al., 1986, *Plant Cell Reports*, 5: 239—242.
- [19] Jung J., Tepfer D., 1987, *Plant Science*, 50: 145—151.
- [20] Mano Y. et al., 1986, *Agric. Biol. Chem.*, 50: 2715—2722.
- [21] Tepfer D., 1983, *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction* (A. Pühler ed.). New York, Springer-Verlag, pp. 248—258.
- [22] Paul H. et al., 1987, *Plant Cell Reports*, 6: 379—381.
- [23] Ooms G. et al., 1984, *Plant Science Letter*, 35: 169—173.
- [24] He Y. K. 1989, Beijing International Conference on Biotechnology, pp. 174.
- [25] Mugnier J., Mosse B., 1987, *Phytopathology*, 77 (7): 1045—1050.
- [26] Mugnier J., 1987, *Phytopathology*, 77(4): 539—542.

## P 物质免疫调节作用的研究现状

童 强 葛锡锐

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

近年来,人们日益认识到神经系统与免疫系统之间存在着密切的联系<sup>[1]</sup>,它们相互影响,相互调节。在此过程中,神经肽起了重要作用。现在已知具有免疫调节功能的神经肽包括:P物质、血管活性肠肽、生长激素释放和抑制因子、 $\beta$ -内啡肽、脑啡肽、促肾上腺皮质激素、生长激素等等。本文将着重论述P物质的免疫调节作用的研究进展<sup>[2]</sup>。

### 一、P 物质

P物质(substance P, SP), 1931年由瑞典学者 Von Euler 和 Graddum 发现。1971年, Chang 等人定出 SP 为十一肽,其氨基酸顺序为: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>。

SP 广泛存在于脊椎动物的中枢及外周神经组织中,并在哺乳类、鱼类、蛙类等肠道中存在。在脊椎中和外周的自主传入、传出神经以及C-类感觉神经纤维中,都有 SP 存在。SP 在神经系统中的功能还不很清楚,但有证据表明,SP 在对痛觉等伤害性刺激的感觉传递中起作用<sup>[3]</sup>。

一系列研究表明:SP 具有广泛的功能<sup>[3]</sup>。它能促进外周动脉血管扩张、降低血压;刺激

平滑肌收缩;刺激唾液腺、胰腺分泌;利尿、促钠排泄。SP 还能促进人垂体分泌催乳素和生长激素。其他与免疫有关的功能将在后面详述。

SP 属于一类叫速激肽(Tachykinin)的家族。该族结构上的共同点是它们羧基端氨基酸顺序为: Phe-X-Gly-leu-Met-NH<sub>2</sub>, 其中 X 是芳香族或带分枝的脂肪族氨基酸。该族包括:章鱼涎肽(eledosin), 南美蟾蜍皮肤肽(physalamin), 澳洲蟾蜍皮肤肽(Uperolein), Kassinin, 此外还有:从脊髓等神经组织中发现的K物质(Substance K, 又名 Neuromedin L, Neurokinin A, Neurokinin  $\alpha$ ) 和 Neurokinin B(又名 Neurokinin  $\beta$ , Neuromedin K), 新近又发现了 Neuropeptide K。

产生 SP 的前体分子为前速激肽原(Preprotachykinin), 通过 cDNA 克隆研究发现该类前体分子有 3 种, 它们来源于  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  3 种 mRNA, 而这 3 种 mRNA 是同一个基因的 mRNA 经不同拼接而形成的。 $\alpha$  型的 mRNA 只编码 SP,  $\beta$  型编码 SP、SK 及 Neuropeptide

本文的写作和发表受到本所研究生办公室吕幼翔同志的支持和帮助,特此志谢。