

# 农杆菌介导的病毒侵染(Agroinfection)方法在植物和病毒分子生物学基础研究中的应用

施 骏 许 耀

(中山大学生物工程中心, 广州, 510275)

农杆菌-病毒侵染(Agroinfection), 是指农杆菌 Ti 质粒载体将病毒或类病毒分子导入植物并形成侵染, 它是由 Grimsley 等人于 1986 年首次建立并逐步发展起来的<sup>[1]</sup>。近年来, 这一方法已受到学者们的重视, 并已开始用来研究植物及病毒分子生物学中的一些基础问题。本文试就农杆菌-病毒侵染及其可能的应用作一探讨和展望。

## 一、农杆菌-病毒侵染方法简介

农杆菌-病毒侵染是利用农杆菌 Ti 质粒上的 T-DNA 区, 能将插在外源基因转移到植物细胞中的特性而设计的<sup>[2,3]</sup>, 将一个或多个病毒 DNA 分子克隆到 T 区, 通过农杆菌介导使病毒基因组进入植物细胞, 随后发展成系统侵染。

Grimsley 等<sup>[1]</sup>将一个以上的病毒基因组串联并插入 Ti 质粒的 T-DNA 中, 然后利用含有这一质粒的农杆菌感染受体植株。由于载体中存在完整的病毒基因组, 重复的基因组可以发生同源重组产生环状、完整的病毒 DNA, 或通过 T-DNA 的复制产生完整的病毒粒子, 于是在受体植株中发生病毒的系统侵染(图 1)。利用这一方法将病毒或类病毒导入植物细胞的优点是不必制备核酸或由昆虫介导。而且效率极高, 比直接用核酸感染高许多数量级。Grimsley 等<sup>[1]</sup>将 1.4 个 CaMV 基因组插在 T-DNA 中, 通过农杆菌-病毒侵染的方法使芜菁发生了病毒感染。但把 CaMV 基因组置于其它质粒之中时, 它则不能发生感

染, 说明病毒感染是由于 T-DNA 的转移所致。

含病毒基因组的 T-DNA 转移到植物细胞, 使植物发生病毒感染的另一种可能方式则是通过整合过程。即 T-DNA 整合至植物基因组中, 转化的细胞增殖并分化形成转基因植株。这样转化植株的每个细胞核 DNA 都会携带有病毒序列。随着植物基因组的复制转录, 就会产生具活性的病毒粒子, 脱离植物基因组而发生系统感染。烟草花叶病毒(TMV)是 RNA 病毒。Yamaya 等<sup>[4]</sup>将 TMV 的 cDNA 克隆通过农杆菌-病毒侵染的方法转化烟草, 在转化植株中观察到了正常的 TMV。表明整合的 TMVcDNA 通过植物启动子转录后, 产生出具有病毒活性的 RNA 分子, 从植物基因组中脱离出来。

由于农杆菌-病毒侵染方法具有高效率、高灵敏度等优点, 目前人们已利用它来研究一些分子生物学的基础问题。

## 二、农杆菌-病毒侵染在植物分子生物学研究中的应用

### 1. 病毒可作为 T-DNA 转移的标记物

在农杆菌的转化实验中, 过去常以肿瘤特性(激素自主性生长特性)、冠瘿碱合成等作为分析 T-DNA 转移的指标。近几年来, 人们则主要以标志基因的抗性或报告基因(如 GUS、CAT、NPT II 等)的表达作为指标。而农杆菌-病毒侵染则提供了一个非常灵敏的方法。因为从理论上讲, 利用这一方法转化后, 只要能形成一个完整的病毒粒子, 即可使植物发生系统感

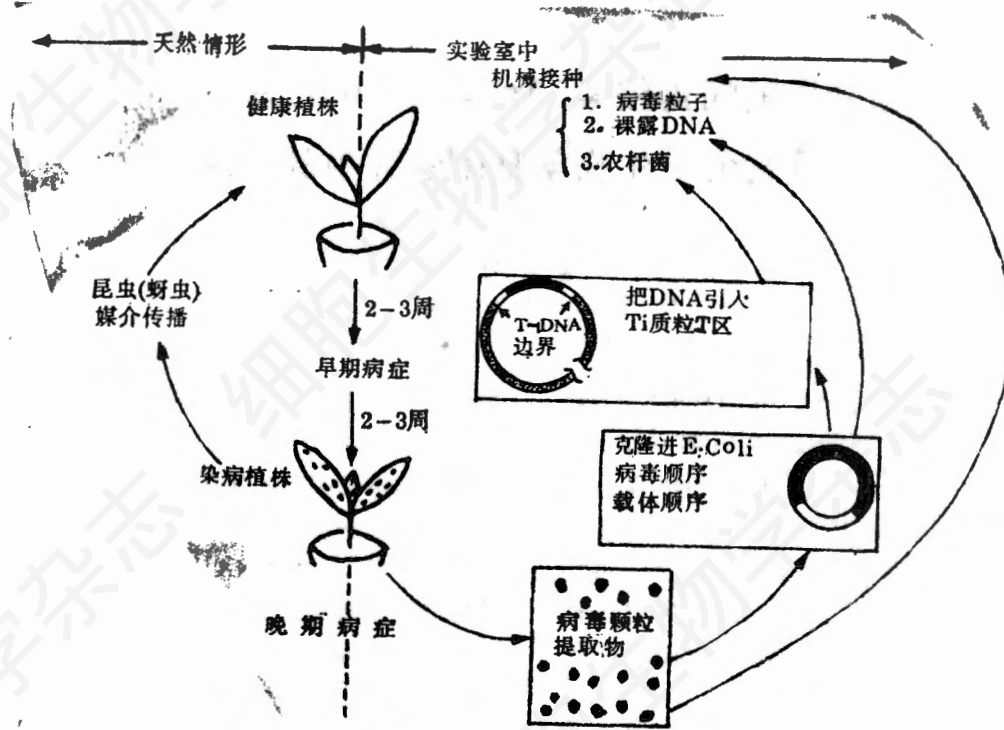


图1 CaMV 病毒的感染途径

左边为天然情况下CaMV正常的感染途径和生活史。右边为实验室中3种机械接种途径。其中第三种途径即为农杆菌-病毒侵染。

染。这样人们可用可见的病毒症状表现作为标记,来快速判断T-DNA是否成功地转移了。不过,由于农杆菌-病毒侵染不需将T-DNA整合进植物基因组,病毒即可脱离出来发生系统感染。因此,这一方法适于快速鉴别T-DNA的转移,但不能说明T-DNA的整合过程。

## 2. 用于研究农杆菌宿主范围的问题

长期以来,人们普遍认为农杆菌不能感染禾谷类单子叶作物。然而,利用农杆菌-病毒侵染所获的结果表明,根癌农杆菌也能感染禾谷类作物。例如,Grimsley等<sup>[5]</sup>把串联的MSV基因插入到T-DNA中,然后感染玉米植株。结果观察到被感染的植株中表现出了病毒症状,并且还发现分生组织对农杆菌-病毒侵染最敏感<sup>[6]</sup>。类似的,利用该方法,在水稻和小麦中也观察到了病毒侵染现象<sup>[7,8]</sup>。这些结果至少说明,T-DNA是能够转移到单子叶

植物细胞中去的。也许是由于单子叶植物基因组在进化上的特殊性,使得转进的T-DNA不易整合,或不易表达而无明显表型。

## 3. 用于研究T-DNA转移的机制

如前所述,由于病毒可以作为T-DNA转移的标记物,所以,农杆菌-病毒侵染可被用来研究T-DNA的转移机制。

Grimsley等<sup>[9]</sup>通过农杆菌-病毒侵染将玉米条纹病毒(MSV)DNA和CaMV DNA分别转移到玉米和芜菁中。他们的工作表明,T-DNA转移至芜菁和玉米的过程基本上是相似的,只是T-DNA转移至玉米中virC蛋白的作用是绝对必需的,而转移至芜菁的过程中,virC的作用并非绝对必需。而且,不需外加诱导物即能使T-DNA转移至单子叶植物玉米,使玉米发生病毒感染。

目前人们偏向于接受T-DNA转移的中间形式是单链T-DNA核酸蛋白复合体的观点。

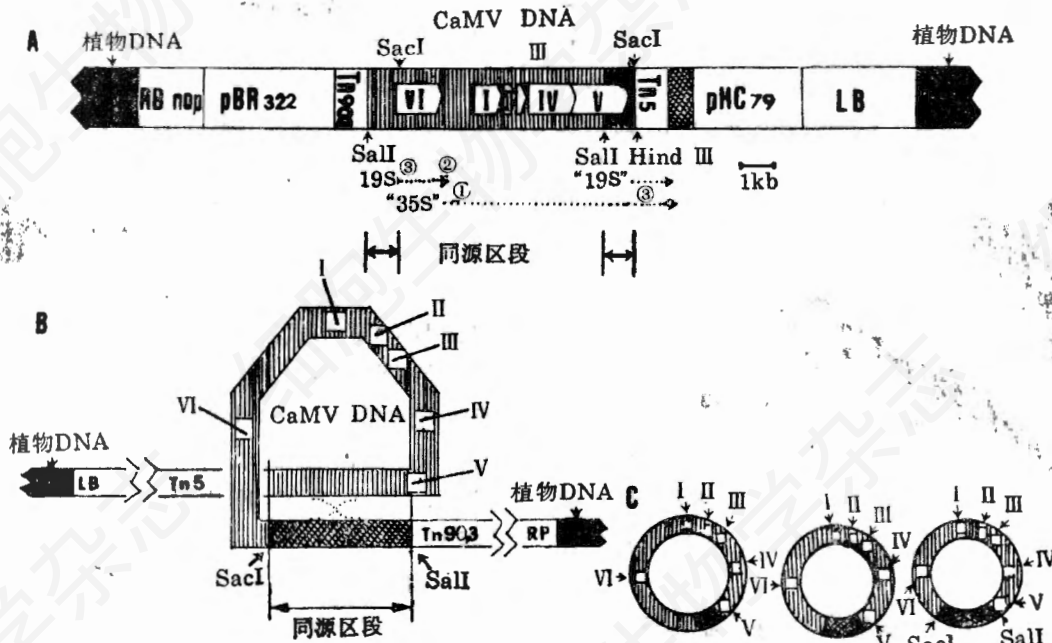


图 2 A. 携带有 CaMV 基因组的 T-DNA 整合进植物基因组后的结构<sup>[10]</sup>。

CaMV 顺序分别表示为：▨▨▨ (D/H 株)；▩▩▩ (4184 株) 和 ▧▧▧ (S 株)，其中的空箭头表示 CaMV 开放读格基因。--> 表示用病毒启动子可能得到的转录本。

B. 通过分子内同源重组形成活性病毒的一个可能结构。

C. 由同源区不同部位发生重组后所形成的不同结构的病毒 DNA。

然而, Grimsley 等发现, pEAP 37 和 pEAP 38 (两者仅 MSV 基因组取向相反) 却具有相同的功能, 这或者说明该病毒的“+”“-”链具有相同的功能, 或者则是 T-DNA 的转移是以双链形式进行的。这些都尚需进一步的研究。

#### 4. 用于研究基因重组

Gal 等<sup>[10]</sup>首次报道了以 CaMV 系统来研究高等有机体中的染色体重组。他们将来自不同株系的 CaMV 基因片段克隆至 pEAP 21 中, 通过农杆菌-病毒侵染将病毒基因组整合到蔓菁基因组中, 由重组产生了有活性的 CaMV 病毒粒子(图 2)。这一系统可以通过病毒症状的出现来统计重组频率。由于同源区段来自两个不同的 CaMV 株系, 因此不同的重组后病毒也就可能根据不同的症状来区分。它较以前的其他系统确有一些明显的优点, 如具有明显的表型、通过肉眼可统计重组事件的发生、检测较灵敏及易于区分不同的重组等。这些优点使我

们能分析不同的交换事件及推测重组的中间结构。

#### 5. 用于抗病毒植物的研究

卫星病毒为 RNA 分子, 它只有在相应的辅助病毒存在下才能复制, 而同时卫星病毒又能减缓辅助病毒本身的致病作用。Harrison 等<sup>[11]</sup>将黄瓜花叶病毒(CMV)卫星 RNA 的 cDNA 通过农杆菌-病毒侵染将其转移并整合到烟草基因组中。在转化的烟草植株上接种 CMV 病毒。结果卫星 RNA 在植株中传播, 而 CMV 的复制大大降低, 在转化植株和有性后代中病毒症状也大大地减轻。因此, 人们可以利用病毒卫星 RNA, 通过遗传工程的手段, 来提高植物的抗病性。

#### 6. 用于研究外源基因的瞬间表达

目前在瞬间表达研究中, 多采用直接导入 DNA 的方法, 如 PEG 法, 电激导入法等<sup>[12]</sup>。常以原生质体或培养的细胞及细胞团为受体,

通过检测报告基因的表达来了解相连基因的表达情况及有关 DNA 序列在基因表达中的作用。一般常用的报告基因有 cat 基因、neo 基因、GUS 基因等。对报告基因的评价通常以灵敏度和检测难易为指标。由于农杆菌-病毒侵染可以将病毒 DNA 引入细胞,并使植物发生系统感染,产生肉眼可见的症状,因此可以病毒基因为报告基因研究病毒基因或克隆至病毒分子中的外源 DNA 的瞬间表达。构建含部分或全部蕃茄金黄花叶病毒(TGMV)A 组分基因组的质粒,通过农杆菌-病毒侵染在矮牵牛叶盘中可检测到病毒蛋白的瞬时表达<sup>[13]</sup>。由于农杆菌-病毒侵染可以植株为受体,所以还可以研究外源基因在不同器官、不同发育时期的特异性表达。

### 三、农杆菌-病毒侵染在病毒学研究中的应用

由于农杆菌-病毒侵染可以不依靠昆虫载体或制备核酸而使植物发生病毒感染,因此该系统为病毒学的研究开辟了一条新途径。

双子座病毒具有成双的颗粒,它是一类单链 DNA 植物病毒<sup>[14]</sup>。这类病毒中有的具有两种不同的分子,成双颗粒中的每一个都只携带病毒基因组中的一种组成分子,只有当它的两种 DNA 混合时才具有感染力。应用农杆菌-病毒侵染技术可研究两种组成分子各自的作用。Rogers 等<sup>[15]</sup>将含有 TGMV 基因组任一组分(即 TGMVA 或 TGMVB)的 Ti 质粒 DNA 转化矮牵牛的组织,经培养再生了形态正常的植株。Southern 斑点杂交分析表明,在 TGMVA 植株中,除了在其核基因组中具有串联重复的 TGMVA 序列之外,还有游离的(非整合的)单链或双链的 TGMVA 单体环形分子。将 TGMVA 和 TGMVB 植株进行杂交,子代中 1/4 植株出现明显的病毒症状。这些实验表明, TGMVA 编码着有关病毒复制的全部功能,而 TGMVB 则编码表现病毒症状的功能,但它的复制则需要 TGMVA 的参与,同时还表明已整合的病毒基因组可以以某种方式重组并脱离核基因组。

最近, Klinkenberg 等<sup>[16]</sup>用农杆菌-病毒侵染将非洲木薯花叶病毒(ACMV)DNA 导入本塞姆氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)。病毒分布于茎、叶和根, DNA A 的量达到同时用 DNA A、B 感染的 5%,在新生叶中也发现病毒粒子。说明 DNA B 不是病毒包装所必需的。大多数的病毒 DNA 是单链形式的,它们可能是包裹在病毒粒子中,在新生叶中还存在双链 DNA 的形式。这些结果与以前报道的把 ACMV DNA 通过农杆菌-病毒侵染导入克利夫兰氏烟草(*N. Clevelandii*)的结果不同。在以前的报道中,若植物中不含 ACMV DNA B 组分,则在新生叶中无法检测到 ACMV DNA<sup>[17]</sup>。

在应用农杆菌-病毒侵染技术以前,要把克隆了的双子座病毒 DNA,如玉米条纹病毒(MSV)、小麦矮化病毒(WDV)或马唐属条纹病毒(DSV)重新引入各自的宿主植物是不可能的,因为它们裸露的 DNA 不能感染植物。所以尽管这些病毒 DNA 的核酸顺序已被确定<sup>[8,18-21]</sup>,但却不知道这些克隆了的 DNA 是否具有生物活性,而且也不可能用体外突变技术来研究病毒生活史。1987年, Grimsley 等<sup>[5]</sup>首次应用农杆菌-病毒侵染成功地将克隆的 MSV DNA 重新导入玉米。随后克隆的 DSV、WSV DNA 也通过这一技术成功地重新引入各自的宿主植物<sup>[8,22]</sup>,证明了这一方法的可行性。克隆了的双子座病毒的单体可引回其宿主,开辟了以下研究的可能性:(1)用体外突变技术研究病毒生物学;(2)用双子座病毒研究禾谷类基因的表达;(3)研究农杆菌和禾谷类的相互作用。

在自然界中,水稻东格鲁病是由两种病毒引起,即水稻东格鲁球形病毒(RTSV)和水稻东格鲁杆状病毒(RTBV)。Dasgupta 等<sup>[7]</sup>将一个基因组单位长度的 RTBV DNA 拷贝克隆在农杆菌双质粒载体 pBin 19 上,转化水稻植株。含有 RTBV DNA 的水稻表现了明显的东格鲁病症,存在着病毒 DNA 和杆状颗粒。

若绿色叶蝉先吃了RTSV感染的植株再吃RTBV感染的植株,病毒粒子还可通过它传播到健康植株上。这些结果说明,RTBV可以独立于RTSV复制,在植株内传播并产生病症,而RTSV则负责病毒在植物间的传播。

应用农杆菌-病毒侵染技术把RTBV引入水稻使植物发生感染要比常规地通过昆虫传播简单得多。感染后的水稻可以作为病毒源生产特异的抗血清,是传统抗血清生产的一大改进。农杆菌-病毒侵染技术还开辟了RTBV基因组体外突变分析的可能性,今后它将成为RTBV和东格鲁病基因分析的重要手段。

#### 四、农杆菌-病毒侵染系统应用的展望

目前农杆菌-病毒侵染技术已比较成功地应用于植物分子生物学及病毒学研究的一些领域。由于应用这一技术能使禾谷类发生病毒感染,因此农杆菌转化重要粮食作物也是可能的。这一方法今后的发展将着重于细菌和植物的相互作用及病毒学的研究。随着这些基础问题的深入研究,将能够使我们构建高效表达、超感染的病毒载体,而且还可以通过转化编码病毒控制顺序或反义mRNA的病毒基因组来使植物获得抗性。那时,病毒将是一个有用的基因资源,它可指导目的基因的高效表达。

#### 摘 要

农杆菌-病毒侵染即为农杆菌Ti质粒介导的病毒基因组向植物细胞中的转移,并使其发生系统感染。它具有高敏、高效和易于检测等特点,已被用来研究农杆菌T-DNA转移机制、农杆菌宿主范围、基因重组、外源基因瞬间表达及病毒分子生物学等方面的基础理论问题。本文综述了该方法用于植物和病毒分子生物学基础研究的进展情况,并讨论了其应用前景。

#### 参 考 文 献

- [1] Grimsley, N. H. et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 3282—3286.
- [2] Koukilikova-Nicola, Z. et al., 1987, *Plant Gene Res.: Plant Plant DNA Infectious Agents* (T. Hohn and J. Schell, eds), pp. 109—148, Springer-Verlag, NY. ISBN 3-211-81995-9.
- [3] Melchers, L. S. et al., 1987, *Oxford Surveys of Plant Mol. Cell. Biol.*, 4: 167—220.
- [4] Yamaya, J. et al., 1988, *Mol. Gen. Genet.*, 211: 520—525.
- [5] Grimsley, N. H. et al., 1987, *Nature*, 325: 177—179.
- [6] Grimsley, N. H. et al., 1988, *Bio/Technology*, 6: 185—189.
- [7] Dasgupta, I. et al., 1991, *J. Gener. Virology*, 72: 1215—1221.
- [8] Woolston, C. J. et al., 1988, *Plant Mol. Biol.*, 11: 35—43.
- [9] Grimsley, et al., 1989, *Mol. Gen. Genet.*, 217: 309—316.
- [10] Gal, S. et al., 1991, *EMBO J.*, 10: 1571—1578.
- [11] Harrison, B. D. et al., 1987, *Nature*, 328: 799—802.
- [12] 杨仲南、许智宏, 1991, *植物生理学通讯*, 27(5): 321—326.
- [13] Hanley-Bowdoin, L. et al., 1988, *Nucl. Acids Res.*, 16: 10511—10528.
- [14] Davies, J. W. et al., 1987, *Plant Gene Res.: Plant Plant DNA Infectious Agents* (T. Hohn & J. Schell, eds), pp. 31—52, Springer-Verlag, NY. ISBN 3-211-81995-9.
- [15] Rogers, S. G. et al., 1986, *Cell*, 45: 593—600.
- [16] Klinkenberg, F. A. et al., 1990, *J. Gen. Virol.*, 71(6): 1409—1412.
- [17] Morris, B. A. M. et al., 1988, *Plant Mol. Biol.*, 11: 795—803.
- [18] Howell, S. H., 1984, *Nucl. Acids Res.*, 12: 7359—7375.
- [19] Lazarowitz, S. G., 1988, *Nucl. Acids Res.*, 16: 229—249.
- [20] MacDowell, S. W. et al., 1985, *EMBO J.*, 4: 2173—2180.
- [21] Mullineaux, P. M. et al., 1984, *EMBO J.*, 3: 3063—3068.
- [22] Donson, J. et al., 1988, *Virol.*, 162: 248—250.