

# 农杆菌介导的汉麻遗传转化影响因素的研究进展

赵 越<sup>1</sup>, 魏国江<sup>1</sup>, 潘冬梅<sup>1</sup>, 韩承伟<sup>1</sup>, 韩喜财<sup>1</sup>, 徐 磊<sup>2</sup>

(1. 黑龙江省科学院 大庆分院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 黑龙江省农业科学院 大庆分院, 黑龙江 大庆 163319)

**摘要:**遗传转化技术是培育汉麻新品种和进行功能基因组学研究的基础, 采用农杆菌介导法对汉麻进行遗传转化, 汉麻的基因型、外植体大小、农杆菌菌株、预处理时间、侵染时间、共培养时间、抗氧化剂、乙酰丁香酮等都会对遗传转化效率产生影响。分析并概括了这些影响因素及其研究进展情况, 为促进汉麻农杆菌介导的遗传转化研究提供科学依据。

**关键词:**汉麻; 遗传转化; 农杆菌介导法

**中图分类号:**S563 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)09-0157-03 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2015.09.0157

汉麻(*Cannabis sativa* L.)是我国传统的纤维作物, 早在 3 500 a 前, 我国就有种植大麻的记载<sup>[1]</sup>, 茎秆上的纤维作为纺织原料是其最主要的用途。汉麻纤维分子结构稳定、分子排列取向度好, 产生静电能力低, 作为一种环保型的纤维原料制成的纺织品具有卫生、抑菌、吸湿透气、耐热、耐晒和耐腐蚀性等优点<sup>[2]</sup>。

通过遗传转化验证某个基因功能或是根据由遗传转化产生的突变体的突变表型分析基因功能来进行功能基因组学研究<sup>[3-4]</sup>。遗传转化技术是进行功能基因组学研究和培育作物优良新品种的基础。

植物遗传转化方法主要有两类。一类是载体转化法, 也就是常见的农杆菌介导法。另一类是直接 DNA 转化法, 包括基因枪法、花粉管通道法和显微注射法等。在麻类遗传转化研究中应用较多的有农杆菌介导法、基因枪法和花粉管通道法以及结合这些方法产生的茎尖转化法等<sup>[5]</sup>。自 1983 年首次利用农杆菌介导法对烟草成功进行遗传转化后, 在目前进行遗传转化成功的植物中, 大约有 85% 都采用农杆菌介导法<sup>[6]</sup>。在自然条件下大多数双子叶植物都能被农杆菌所感染, 农杆菌通过植株受伤部位进入细胞, 将自身携带的 T-DNA 导入到植物基因组中。通过农杆菌将外源目的基因转移与整合到植物细胞中, 然后通过组织培养等技术, 再生出转化植株<sup>[7]</sup>。农杆菌有发根农杆菌和根癌农杆菌 2 个种, 通过根癌农杆

菌导入的外源基因具有拷贝数低、结构完整、整合位点稳定、表达稳定、转化机理清楚、技术成熟性好等优点。因此根癌农杆菌应用的较多。Feeney M 等<sup>[8]</sup>就采用根癌农杆菌对 4 个栽培汉麻品种的遗传转化体系进行了研究。虽然早在 1983 年 W H-T Loh 等<sup>[9]</sup>就对大麻进行了组织培养并进行了体外生物转化, 但迄今为止, 国外关于汉麻遗传转化的研究报道甚少, 国内更是未见报道。

## 1 影响汉麻遗传转化的主要因素

### 1.1 受体材料的选取及预处理

1.1.1 基因型 在农杆菌介导的遗传转化中, 基因型对转化效率起了决定性的作用, 相同作物不同基因型的转化效率存在明显差异。Donaldson 等<sup>[10]</sup>对 12 个大豆品种进行遗传转化研究发现只有品种 Accolibri 获得了遗传稳定的转基因植株。Caillot 等<sup>[11]</sup>对亚麻的研究中发现, 在相同的培养条件下, 不同品种的愈伤诱导率差异明显, 品种 Barbara 的愈伤诱导率为 52.3%, 而品种 Oliver 的诱导率却达到了 93%。姬研茹等<sup>[12]</sup>在对双亚 5 号和双亚 7 号进行组织培养时外植体的分化率分别为 89.1% 和 93.6%, 相差不大; 而经农杆菌介导后, 双亚 7 号的分化率只能达到 5.56%, 双亚 5 号的分化率却达到了 23.4%, 差异显著。

1.1.2 外植体大小 选取过大的外植体时可导致非胚性细胞增多, 难于分化; 过小则承受不了农杆菌的伤害, 不利于转化。曾黎辉等<sup>[13]</sup>研究发现直径为 5 mm 左右的荔枝愈伤组织团较适合作转化用的外植体。外植体大小的选取与植株生理状态有关, 植株越幼嫩, 对农杆菌的耐受性越低, 选取的外植体体积可越大, 增加耐受性<sup>[14]</sup>。

1.1.3 预处理 用农杆菌侵染外植体前, 通常预

收稿日期: 2015-05-13

第一作者简介: 赵越 (1985-), 女, 黑龙江省富锦市人, 硕士, 研究实习员, 从事麻类育种研究。E-mail: realzhaoyue@126.com。

先将外植体培养一段时间。这样不仅可以防止外植体出现褐化甚至腐烂现象,并且有效促进细胞分裂,使受体细胞整合外源 DNA 更加容易。梁慧敏等<sup>[15]</sup>对苜蓿叶片的研究表明,将叶片预培养 5 d 后,其 GUS 的表达率比未经预培养的叶片高出 50%,达到了 83.3%。陈鸿<sup>[16]</sup>的研究表明经预培养 2 d 的剑麻 GUS 瞬时表达效果最好。

## 1.2 农杆菌菌株的选择

研究表明不同农杆菌菌株可能会影响载体骨架序列插入的比例从而影响转化效率<sup>[17]</sup>。农杆菌根据其产生的冠瘿碱的不同,分为农杆菌型菌(如 EHA105)、胭脂碱型菌(如 C58)和章鱼碱型菌(如 LBA4404)3 类,其侵染能力逐渐降低<sup>[18]</sup>。目前,最常用的农杆菌菌株有 LBA4404、EHA101 和 EHA1053 种。M FEENEY 等<sup>[18]</sup>对汉麻的遗传转化研究采用的菌株就是 EHA101。不同作物种类及不同基因型进行遗传转化的敏感菌株不同,是否转化成功取决于受体植物最适菌株的选择。在对绿豆遗传转化的研究中,Jaiwal 等<sup>[19]</sup>用 3 种菌株对绿豆进行遗传转化研究,发现侵染效果最好的为 LBA4404,其 GUS 表达率达到了 100%,其次为 EHA105,而 C58C1 的表达率仅为 66%。张志扬<sup>[20]</sup>对亚麻白花品种分别用 LBA4404 和 EHA105 侵染,结果显示 EHA105 的侵染效果明显好于 LBA4404,前者的愈伤组织诱导率和抗性不定芽诱导率更高。

## 1.3 侵染浓度、时间及共培养时间的确定

外植体的具体侵染时间可根据外植体种类、生理状态等确定。农杆菌侵染时间越短,进入外植体的菌株数目就越少,侵染效果就越差;侵染时间长,农杆菌大量繁殖,除菌困难外植体污染严重,外植体死亡率升高,不利于转化。张志扬<sup>[20]</sup>研究发现菌液 OD600 为 0.6,侵染 30 min 时,亚麻的抗性不定芽诱导率最高。

共培养时间的确定,可依据不同品种和菌液浓度而定。研究亚麻外植体不同共培养时间对转化效率的影响,发现 96 h 为最佳共培养时间<sup>[20]</sup>。短时间的共培养,由于外植体切口处只有少数增殖不良的农杆菌生长,导致遗传转化效率降低或者农杆菌还没来得及进入伤口就被抗生素杀死。长时间的共培养,农杆菌的大量繁殖会伤害外植体,导致外植体组织坏死;并且由于外植体从培养基中无法获得充足的营养导致生活力降低,死亡率增加,不利于转化<sup>[21]</sup>。

## 1.4 提高转化效率的物质

### 1.4.1 乙酰丁香酮 宿主植物细胞能分泌某些

酚类化合物,可诱发农杆菌 Vir 区基因的活化,但有时分泌的量是不足的,可通过在共培养基中加入适合浓度的酚类物质如 AS 提高转化效率。Bolton 等<sup>[22]</sup>对根癌农杆菌的转化机制进行了研究,结果表明农杆菌 T-DNA 向宿主细胞核中转移需要 Vir 区基因的活化和表达,AS 等植物信号因子能有效激活并提高 Vir 区基因的表达,提高根癌农杆菌对宿主的敏感度和转化率。AS 被应用在植物遗传转化中取得了较好的效果。Sheikholeslam 等<sup>[23]</sup>在采用农杆菌介导法对拟南芥进行遗传转化的研究中添加了 AS,使转化效率提高了 50%~60%。

### 1.4.2 抗氧化剂

经农杆菌侵染的外植体通常会出现褐化或坏死现象,这是植物的一种防御反应。这种植物的自我保护现象通常会阻碍 T-DNA 进入细胞影响转化细胞的再生,从而导致农杆菌不侵染或是侵染效率降低。为了提高转化效率,可在培养基中加入适当浓度的抗氧化剂如 DTT、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、抗坏血酸(Vc)和 L-cys,降低植物的防卫反应,提高不同基因型对农杆菌的“敏感度”。Olhoft 等<sup>[24]</sup>在共培养基中加入一定浓度的 L-cys 之后,gus 基因的转化效率能够提高 3 倍以上。Paz 等<sup>[25]</sup>的研究也表明,L-cys 的加入有效的提高了部分不敏感的基因型的 gus 基因瞬时表达率。

### 1.4.3 表面活性剂

邱金梅等<sup>[26]</sup>在对花生的研究中,在农杆菌菌液中加入表面活性剂 MES 后,显著提高了外植体转化效率。适当添加低浓度表面活性剂减少了植物组织表面张力,一定程度上保护了植物,不仅提高了转化率还提高了存活率。

## 2 其它影响因素

K wielgus 等<sup>[27]</sup>对 3 个波兰雌雄同株汉麻品种进行研究,发现植株再生受组织培养条件影响很大,除了培养条件及上述诸多因素外,筛选抗生素以及抑菌抗生素的选择及浓度都会对遗传转化效率产生一定的影响。

筛选抗生素是有效区分转化和非转化细胞的必要条件,主要有卡那霉素、潮霉素和庆大霉素等。其种类和浓度需要根据具体试验具体确定。Banerjeer 等<sup>[28]</sup>对马铃薯苗进行转化筛选时发现 75 mg·L<sup>-1</sup>的卡那霉素最为有效。刘鹏等<sup>[30]</sup>对蓖麻子叶节遗传转化的研究发现其最适卡那霉素筛选浓度为 250 mg·L<sup>-1</sup>。筛选抗生素卡那霉素应用的较多,一般使用浓度在 50~200 mg·L<sup>-1</sup>。

在农杆菌介导的汉麻遗传转化后期,需要用

抑菌抗生素消除农杆菌对植物的影响。最适宜的浓度不仅要能有效控制农杆菌数量又要对转化体的抑制作用最小。头孢霉素、氨基糖苷类和卡那霉素为常用抑菌抗生素,通常浓度在  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  以下时对外植体的生长和分化没有明显的影响。有研究<sup>[29]</sup>表明  $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  氨基糖苷类或  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  头孢霉素是亚麻“白花”品种的最佳抑菌剂。

### 3 结论与展望

稳定、高效的遗传转化技术是汉麻功能基因组及新品种培育的核心手段之一。虽然关于汉麻遗传转化研究的报道寥寥无几,但通过借鉴其它植物尤其是麻类的遗传转化研究报道,总结了影响农杆菌介导汉麻遗传转化的主要因素,并在以后对这些因素开展更深入的研究,以确立适合汉麻农杆菌介导的遗传转化的主要影响因素。

开展汉麻功能基因组学的研究为分析基因功能,为挖掘与汉麻品质、产量、抗病及抗逆等相关基因提供了基础。目前,国际上掀起了一股研究开发汉麻的热潮。汉麻是一种四氢大麻酚含量低于 0.3% 的栽培植物。在麻类育种研究中,传统的杂交育种方法仍将长期占据主导地位,但基因工程方法作为创造基因重组的新工具在未来的育种工作中有其无可替代的作用。通过传统方法或分子生物学手段培育出低毒甚至无毒的汉麻新品种,开发出更多绿色优质汉麻产品,为人类的环境保护、生活质量的提高,做出更大的贡献。

### 参考文献:

- [1] 王殿奎,关凤芝. 黑龙江省大麻生产现状及发展对策[J]. 中国麻业, 2005(2): 98-101.
- [2] 高志勇,张万海. 大麻的生物学特征及应用研究概况[J]. 毛纺科技, 2006(6): 37.
- [3] Somerville C, Somerville S. Plant functional genomics[J]. Science, 1999, 285: 383-385.
- [4] Kaiser J. From genome to functional genomics[J]. Science, 2000, 288: 1715-1716.
- [5] 秦先超,祁健民,方平平. 麻类作物组织培养及遗传转化研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(4): 589-595.
- [6] 余永亮,梁慧珍,王树峰,等. 中国转基因大豆的研究进展及其产业化[J]. 大豆科学, 2010, 29(1): 143-150.
- [7] 刘立全,杨剑超,张衡,等. 根癌农杆菌介导的植物遗传转化研究[J]. 现代农业科技, 2009(11): 43, 147.
- [8] Feeney M, Punja Z K. Tissue culture and Agrobacterium-mediated transformation of hemp (*Cannabis sativa* L.) [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2003, 39(6): 578-585.
- [9] Loh W H-T, Hartsel S C, Robertson L W. Tissue culture of *Cannabis sativa* L. and *in vitro* biotransformation of phenols[J]. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 1983, 111(5): 395-400.
- [10] Donaldson P A, Simmonds D H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation

- in short-season soybean[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 478-484.
- [11] Caillot S, Rosiau E, Laplace C, et al. Influence of light intensity and selection scheme on regeneration time of transgenic flax plants [J]. Plant Cell Reports, 2009, 28: 359-371.
- [12] 姬研茹,赵军,刘伟伟,等. 应用直接分化再生系统进行亚麻转基因技术的研究[J]. 生物技术通报, 2008(1): 128-132.
- [13] 曾黎辉,吕柳新. 根癌农杆菌介导荔枝遗传转化研究[J]. 果树学报, 2003, 20(4): 287-290.
- [14] 熊焕英,钟伟光,张寿文. 农杆菌介导的植物遗传转化影响因素研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(17): 9214-9217.
- [15] 梁慧敏,夏阳,孙仲序,等. 根癌农杆菌介导苜蓿遗传转化体系的建立[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(2): 152-156.
- [16] 陈鸿. 剑麻再生体系的构建和遗传转化体系的初步研究[D]. 海口:海南大学, 2008.
- [17] Yin Z, Wang G L. Evidence of multiple complex patterns of T-DNA integration into the rice genome[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100: 461-470.
- [18] 胡之璧. 中药现代生物技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009: 166-168.
- [19] Jaiwal P K, Kumaria P, Ignacimuthu S, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilezek) a recalcitrant grain legume[J]. Plant Science, 2001, 16(2): 239-247.
- [20] 张志扬. 亚麻组织培养及高效遗传转化体系的建立[D]. 湖南农业大学, 2007.
- [21] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 2版. 北京:科学出版社, 2002.
- [22] Bolton G W, Nerster E W, Gordon M P. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence [J]. Science, 1986, 232: 983-985.
- [23] Sheikholeslam S N, Weeks D P. Acetosyringone promotes high efficiency of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Mol Biol, 1987, 8: 291-298.
- [24] Olhoft P M, Somers D A. L-cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary node cells[J]. Plant Cell Reports, 2001, 20: 706-711.
- [25] Paz M M, Martinez J C, Kalvig A B, et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation[J]. Plant Cell Reports, 2006, 25: 206-213.
- [26] 邱金梅,温世杰,刘海燕,等. 根癌农杆菌介导花生高效遗传转化体系的优化[J]. 中国油料作物学报, 2010, 32(2): 208-211.
- [27] Wielgus K, Luwanska A, Lassocinski W, et al. Estimation of *Cannabis sativa* L. Tissue culture conditions essential for callus induction and plant regeneration[J]. Journal of Natural Fibers, 2008, 5(3-3): 199-207.
- [28] Banerjee A K, Prati S, Hannapela D J. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation[J]. Plant Science, 2006, 170(4): 732-738.
- [29] 刘鹏,张立军,张春兰,等. 蓖麻子叶节遗传转化研究[J]. 华北农学报, 2012, 27(4): 112-117.