

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01249

农杆菌介导的玉米遗传转化系统研究进展

张素芝, 荣廷昭

四川农业大学 教育部作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室, 雅安 625014

摘要: 农杆菌介导的遗传转化由于具有独特的优点, 一直受到育种家、分子生物学家和微生物学家的重视, 因此近 10 年发展很快。玉米是重要的粮食作物, 农杆菌介导的玉米遗传转化也取得了重大成就。文章就近年来玉米遗传转化取得的进展、影响转化的重要因素作一小结, 并就目前转化存在的问题和前景作简单的讨论。

关键词: 玉米; 遗传转化; 农杆菌

Advance of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system of maize (*Zea mays* L.)

ZHANG Su-Zhi, RONG Ting-Zhao

Key Laboratory of Crop Genetic Resources and Improvement of Ministry of Education, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: The *Agrobacterium*-mediated transformation system is more and more attractive to scientists of microbiology, molecular biology and crop genetics and breeding due to its unique advantages, which promote its development rapidly in the past decade. Great success has been achieved in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system in maize (*Zea mays* L.), an important food-supply crop. This article highlights the advances of *Agrobacterium*-mediated transformation system of maize and the major factors of the transformation process. Then, comments on the problems remained and the prospects of this transformation system are made.

Keywords: maize; genetic transformation; *Agrobacterium tumefaciens*

玉米是当今世界重要的粮食作物之一, 也是重要的工业原料。1984 年, 第一例转基因植物的获得^[1], 使得利用转基因方法进行玉米性状(如产量、品质、抗病、抗虫、抗除草剂、抗旱、抗盐、抗冻)改良和基因功能研究成为可能。农杆菌介导的遗传转化系统在双子叶植物中发展迅速, 但是由于单子

叶植物尤其是禾本科植物不是农杆菌的天然宿主, 最初的农杆菌遗传转化进展缓慢。随着人们对农杆菌侵染机制的进一步了解和转化技术的不断改进完善, 农杆菌介导的遗传转化首先在水稻和玉米中取得了突破性进展^[2~4], 目前已建立了水稻、玉米、小麦等重要粮食作物高效的农杆菌转化系统。对玉米

收稿日期: 2008-03-15; 修回日期: 2008-06-02

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目“中国西部牧草、乡土草遗传及选育的基础研究”(编号: 2007CB108907)四川省公益性研究计划项目(编号: 2008NG0013), 四川省应用基础研究计划项目(编号: 2008JY0096), 四川省教育厅资助科研项目(编号: 07ZB065), 四川农业大学青年科技创新基金, 四川农业大学博士后基金资助[Supported by National Basic Research Program (973 program) of China(No.2007CB108907), Commonweal Research Program of Sichuan Provincial Science and Technology Department (No.2008NG0013), Applied Basic Research Program of Sichuan Provincial Science and Technology Department (No. 2008JY0096), the Project Supported by Scientific Research Fund of Sichuan Provincial Education Department (No. 07ZB065), Youth Innovation Project of Sichuan Agricultural University, Postdoctoral Project of Sichuan Agricultural University]

作者简介: 张素芝(1974-), 女, 博士, 研究方向: 植物基因工程与作物遗传育种。E-mail: suzhi1026@163.com

通讯作者: 荣廷昭(1936-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 作物遗传育种。

而言,除农杆菌转化法以外,还有多种转化方法也已成功的用于遗传转化,如 PEG 介导原生质体转化法、电激转化法、碳化硅晶须介导法、基因枪法。农杆菌转化法由于具有费用低、能转移大片段 DNA、外源基因拷贝数低并能稳定遗传等优点而备受青睐,目前已成为玉米、水稻、小麦、大麦等禾本科植物常用的转化方法。本文就近年来玉米农杆菌遗传转化所取得主要成就和影响转化的主要因素作一小结,并将存在的问题作简单的讨论。

1 农杆菌介导的遗传转化机理

农杆菌是从土壤中分离出来的革兰氏阴性细菌,根据宿主范围和致病症状可分为 5 种^[5],其中研究最多也最透彻的是根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*),它可将自身 Tumor-inducing(Ti)质粒的一段 DNA(T-DNA)转移到植物细胞中,从而使植物损伤部位形成冠瘿瘤^[6]。T-DNA 的转化是在 Ti 质粒上 Vir 区一系列 Vir 基因的作用下产生的。T-DNA 是质粒上一段 10~30 kb 的序列,编码 5 个与致瘤有关的生长素和细胞分裂素合成酶基因。T-DNA 左右边界各有一段高度保守的 25 bp 的同向重叠序列(Direct repeat)与 T-DNA 的转化有关。其中右边界是

VirD2 的共价结合序列及 VirD1/VirD2 内切的靶序列, VirD2 与右边界的共价结合及邻近右边界的过度驱动(Overdrive)序列导致了单链 T-DNA 由右边界剪切并转移的极性^[5],而 VirD2 与左边界的结合可能导致了载体骨架序列的转移^[7]。农杆菌侵染时,在单糖转运蛋白 ChvE 的配合下,双元组分系统的 VirA 作为感受信号的天线分子受到植物伤口产生的酚类物质和糖类的诱导而自动磷酸化,并且随后使双元组分系统的另一组分 VirG 磷酸化为活性状态,进而通过 vir-box 激活其他 Vir 基因的表达,最后由 VirD1/VirD2 剪切的单链 VirD2-T-DNA 复合体由 VirB 和 VirD4 蛋白组装成的 Type IV Secretion System(T4SS)运送到宿主细胞,另外的几个 Vir 蛋白 VirE2、VirE3、VirF、VirD5 也同时通过这个通道运送到宿主细胞质中^[8]。VirD2-T-DNA 复合体在进入宿主细胞质中不久, VirE2 就结合上去,通过 VirD2 核定位信号的引导并在几个宿主蛋白和农杆菌因子的协助下向细胞核转运,最后结合在 T-DNA 上的蛋白被降解,而 T-DNA 通过一种尚不清楚的机制整合到宿主基因组中^[9,10](图 1)。由于 T-DNA 转化不具有序列特异性,因此可用任何感兴趣的基因能代替内源的 T-DNA 基因进行转化^[11]。

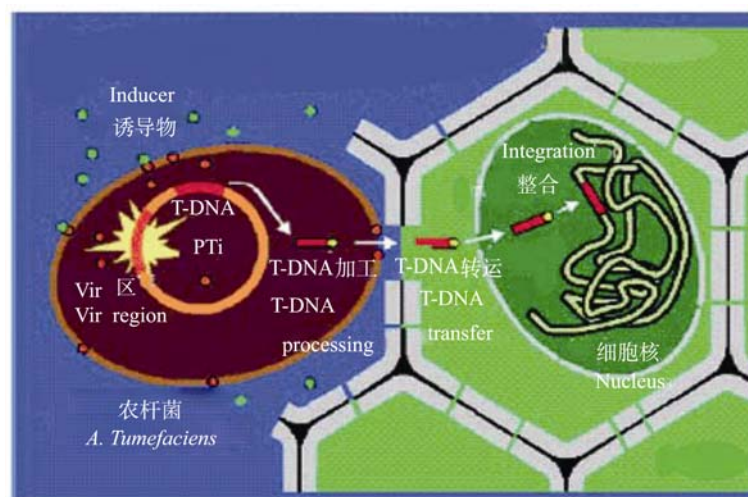


图 1 T-DNA 的加工、转运和整合的途径(修改自 Rossi *et al.* ^[12])

Fig. 1 The passage of T-DNA processing, transfer, and integration (Revised from Rossi *et al.* ^[12])

2 玉米遗传转化的发展过程

1987 年, Grimsley 等^[13]首先用胭脂碱农杆菌 C58 将玉米条纹病毒(Maize Streak Virus)的 cDNA 转化玉米幼苗分生组织或靠近生长点的部位, 98% 的玉米叶片表现了病毒感染性状, 说明 T-DNA 已经转化

到玉米细胞中, 从而给农杆菌介导的玉米遗传转化带来了一缕曙光。Schalappi 等^[14]用同样的方法感染 A188、W23 等玉米幼胚, 经过扫描镜观察也得到了类似的结果。1994 年, Shen 等^[15]用 *GUS* 作报告基因用农杆菌转化 3 个玉米自交系 GB、A188、K55 的

芽尖, 共培养 3 d 后发现 *GUS* 主要在胚芽鞘和幼叶部位表达。这些实验中虽然外源基因已在植物细胞中表达, 但并不能说明外源基因已整合到玉米基因组中。Gould^[16]用含有普通双元载体的农杆菌侵染玉米 Funk's G90 的茎尖获得了转基因玉米, 并且外源基因已整合并遗传到 R_1 代, 但其稳定性效果欠佳。农杆菌侵染单子叶植物的第一个比较成功的例子来自于 Chan 和 Hiei 的研究, 他们首次用农杆菌转化水稻的未成熟胚获得了外源基因能稳定遗传的转基因水稻^[2,3]。农杆菌介导的玉米遗传转化随后也取得了重大进展。1996 年, Ishida 等^[4]用含有 A281(对高等植物侵染力很强的菌株)*VirB*、*VirC*、*VirG* 基因的超双元载体 pSB131 和 pTOK233 转化 A188 及其杂交种的未成熟胚, 转化频率高达 5%~30%。同时外源基因能稳定整合和表达, 并且 70% 的转基因玉米可育。这个实验有力地说明农杆菌对单子叶植物和双子叶植物具有相同的转化机制, 是玉米遗传转化过程中的一个里程碑。其后用超双元载体分别转化 A188 和 Hi II 也得到类似的结果^[17-20]。此后玉米农杆菌转化的研究主要以优化转化条件, 提高转化效率为主。其中最值得关注的是 Frame 等^[21]用普通双元载体 pTF102 转化 Hi II 的未成熟胚, 在 L-半胱氨酸存在的条件下平均转化效率高达 5.5%, Southern blot 和分子鉴定 R_0 、 R_1 、 R_2 代转基因玉米表明 *GUS* 和选择标记基因 *bar* 已稳定整合到玉米基因组中并表达。虽然普通双元载体的转化效率(5.5%)^[21]远远低于超双元载体的转化效率(33%~51%)^[20], 但普通双元载体的普遍应用使得用这种载体进行农杆菌转化具有更大的潜力。农杆菌与外植体共培养条件的优化、提高 *Vir* 基因表达条件的优化和使用毒性更低的标记基因将会是提高玉米农杆菌普通双元载体转化效率的重点。外植体取材的季节限制也一直是玉米遗传转化的限制因素, 让人高兴的是这种局限性正在逐渐减少。最近, Sidorov 等^[22]用农杆菌介导法对 7~10 d 玉米幼苗诱导的 I 型愈伤进行转化, 转化频率为 2%~10%。同时由于这些转基因后代拷贝数低并符合孟德尔遗传规律, 因此这种方法可以代替未成熟胚诱导愈伤组织进行转化。Wang 等^[23]用农杆菌转化受伤的玉米籽粒也获得了较理想的转化频率, 由于这种方法受体材料取材简单方便, 因此也是一种很有希望的方法。Vega 等尝试用低盐的

N_6 培养基配合使用二硫苏糖醇和 L-半胱氨酸转化 Hi II 玉米, 发现能比较显著的提高普通双元表达载体的转化频率, 平均转化频率最高达到 18%^[24]。

国内对农杆菌介导的玉米遗传转化起步较晚, 黄璐和卫志明^[25]首次报道用农杆菌转化法获得了杂交种苏玉 1 号的转基因玉米, 张荣等^[26]用此方法获得自交系 P9-10 的转基因玉米。权瑞党等报道将农杆菌侵染和真空渗入、部分酶解及超声波处理等方法相结合, 转化玉米愈伤组织得到了转基因植株^[27]。近年来, Huang 等^[28]报道用菌株 EHA105 介导玉米优良自交系幼胚转化, 得到了比较理想的结果, 转化效率平均达到 23.8%。Yan 等^[29]通过嘌呤、嘧啶抑制剂和表面活性剂 Silwet L-77 处理提高了农杆菌对掖 515 和齐 319 的转化频率。

3 影响农杆菌转化的因素

3.1 农杆菌菌株及载体

农杆菌菌株的侵染能力在不同玉米自交系之间的差异很大, 因而在实际的遗传转化过程中, 不同的玉米自交系都对存在最为敏感的农杆菌菌株^[27]。遗传转化中常用的农杆菌菌株有 3 种类型: 胭脂碱型(以 C58 菌株为代表)、章鱼碱型(以 LBA4404 菌株为代表)和琥珀碱型(以 EH101、EHA105 菌株为代表), 菌株选择的合适与否直接影响了最终的转化效率。玉米遗传转化常用的菌株为 LB4404、EHA101 和 C58(表 1)。另外, 菌株和载体的组合对转化至关重要, 其中超双元载体 pSB131 和 pTOK233 一般用 LB4404 进行转化^[4,18,20]。Hiei 等^[30]的实验表明, 菌株和载体搭配不合适如超强菌株和超双元载体组合的转化效率比普通农杆菌与双元载体组合的效率还要低。

3.2 *Vir* 基因的活化

植物受到损伤后从伤口分泌的酚类物质能诱导农杆菌 *Vir* 基因的表达, 从而使 T-DNA 进行转移和整合。单子叶植物由于不分泌酚类物质或酚类物质含量低而不能诱导 *Vir* 基因的活化^[35], 因此可以通过添加酚类物质对单子叶植物进行转化。目前已发现多种能诱导 *Vir* 基因表达的酚类物质, 其中乙酰丁香酮和羟基乙酰丁香酮作用较强, 被广泛应用于玉米、水稻等禾谷类作物的基因转化中, 而 100 μ m 乙酰丁香酮在很多玉米转化实验中都能较强的诱导 *Vir* 基因的表达。

此外, 通过遗传改造或分离突变菌株, 使其能

表 1 农杆菌介导的玉米遗传转化

Table 1 *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in maize

基因型 Genotype	外植体 Explant	菌株/基因 Strain /gene	注解 Annotation	文献 References
Golden×Bantam	幼苗分生组织 Seedling meristem	C58/MSV	系统感染 Systemic infection	[13]
Funk's G90	芽尖 Shoot meristem	C58/ <i>p35S:gus-npt</i>	转基因植株 Transgenic plants	[16]
A188	芽尖 Shoot meristem	C58、Ach5、LBA4404/ <i>GUS</i>	瞬时表达 Transient expression	[30]
Golden×Bantam	幼苗 Seedling	C58/MSV- <i>GUS</i>	稳定表达 Stable expression	[15]
A188 及其杂交种 A188 and its hybrid	幼胚 Immature embryo	LBA4404/35S: <i>gus-p35S: bar</i>	转基因植株 Transgenic plants	[4]
苏玉 1 号、掖单 9 号和农大 60 Suyu 1, Yedan 9, and Nongda 60	愈伤组织 Callus	EHA101/35S: <i>GUS-p35S: hpt</i>	转基因植株 Transgenic plants	[25]
A188、综 3、综 31 和 P9-10 A188, Zong 3, Zong 31, and P9-10	幼胚 Immature embryo	LBA4404/ 35S: <i>GUS- 35S: hpt</i>	转基因植株 Transgenic plants	[26]
Hi II	幼胚 Immature embryo	LBA4404/35S: <i>GUS</i>	转基因植株 Transgenic plants	[21]
Hi II	幼胚 Immature embryo	LBA4404/ <i>UBI: GUS</i>	转基因植株 Transgenic plants	[32]
A188, Hi II, A188×Hi II	幼胚 Immature embryo	LBA4404/ <i>UBI: PPO</i>	转基因植株 Transgenic plants	[33]
掖 515 和掖 502 Ye515 and Ye502	愈伤组织 Callus	LBA4404/35S: <i>bet-35S: hpt</i>	转基因植株 Transgenic plants	[27]
9046 等 9046 etc.	幼胚 Immature embryo	EHA105/35S: <i>gus-p35S: bar</i>	转基因植株 Transgenic plants	[28]
H99 等 H99 etc.	愈伤组织 Callus	C58/ <i>P-e35S:OsAct1intronGFP, P-e35S: OsAct1intronGFP</i>	转基因植株 Transgenic plants	[22]

注: 部分内容摘自文献[34]。

Note: Parts of the table content are cited from reference [34].

不依赖创伤诱导物的存在就能诱导 *Vir* 基因高水平或组成型表达, 进而促进 T-DNA 转移也是提高农杆菌转化效率的有效途径。Gubba 等^[36]在 C58 菌株和 LBA4404 菌株中分别引入 *virGN54D* 突变和 *virGII06L* 突变后, *Vir* 基因高水平表达, 能将农杆菌对玉米的瞬时感染率分别从 36%~40% 提高到 78%~83% 和从 0%~15% 提高到 70%~77%。农杆菌株中质粒为高拷贝类型时能显著提高 *virGN54D* 的转化效果。多个拷贝的 *virG* 能促进 *Vir* 基因活化, 并能改变诱导 *Vir* 基因表达的 pH 值特性(中性或酸性), 这种多拷贝的 *virG* 菌株提高了水稻、芹菜胡萝卜的转化效率^[37]。玉米农杆菌转化效率低的原因还与其嫩芽分泌的一种毒性阻遏物质 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA) 有关, DIMBOA 能抑制农杆菌的生长并对 *Vir* 基因活化有抑制作用。用对 DIMBOA 具有拮抗作用的菌株 K289 和 Chry9 转化玉米 FRB73 顶端分生组织, *GUS*

的瞬时表达率提高到 21%~34%^[38]。

另外, 在共转化期间还有许多因素与 *Vir* 基因的表达有关, 这些因素包括: 酸性 pH 值、低温培养、高渗透压等。一些小分子量的糖类如半乳糖、葡萄糖等也能诱导 *Vir* 基因的表达, 当酚类物质的水平较低时, 糖类诱导 *Vir* 基因表达的效果更明显, 这些研究结果通过 Hiei 等的 *GUS* 瞬时表达系统得到了进一步证实^[3]。

除上述外部因素以外, 农杆菌自身某些基因的表达状况也与 *Vir* 基因的活化有关。章鱼碱型的 *virH(pinF)* 能减少农杆菌对玉米细胞壁的附着, 从而阻碍了 *MSV* 基因的转移^[39]。此外, 通过正向遗传学的方法还发现了一些 T-DNA 转移必需的基因: 如 *pscAa/exoC*、*chvA*、*chvB* 基因与胞外多糖的产生、修饰、分泌有关; *att* 基因则与农杆菌与植物细胞壁的附着有关; *chvD* 能调节 *Vir* 基因的诱导; *chvE* 在转运糖类的同时协助诱导 *Vir* 基因的表达^[4]。

3.3 受体材料、生长状况及基因型对遗传转化的影响

不同来源、不同发育状态和不同基因型的玉米受体材料对农杆菌的敏感性虽然不尽相同, 但保持旺盛的细胞分裂和 DNA 复制是 T-DNA 整合所必需的^[21]。可以用农杆菌进行玉米转化的受体材料有多种, 如幼胚、成熟胚、I 型愈伤组织、II 型愈伤组织、悬浮细胞系、原生质体、茎尖等。用愈伤组织和幼胚进行转化操作简单, 植株再生比较容易, 是玉米转化中最常用的受体材料(表 1)。玉米幼胚的再生能力明显高于其他部位, 其发育阶段是影响再生的重要因素。对玉米幼胚而言, 授粉后 10~15 d, 幼胚长度为 1.0~2.0 mm 时, 再生能力最强, 是理想的受体材料^[40]。Schalappi 等^[13]通过农杆菌对玉米幼胚亲和性的研究, 证明感受态的细胞是农杆菌转化所必需的, 只有那些再生和整合能力强的感受态细胞才能得到转化植株。玉米幼胚未分化的顶端分生组织不具备适合农杆菌侵染的感受态, 只有分化出 1~2 个叶原基的幼胚才适合农杆菌侵染^[13]。胚性愈伤组织有 I 和 II 两种类型^[41], 主要由幼胚诱导获得。大多数玉米自交系能形成致密的 I 型愈伤组织, 这种愈伤组织胚性差, 继代后较难再生出植株; 松脆的 II 型愈伤组织生长迅速, 可以长期继代并保持胚性。尽管玉米 II 型愈伤组织的诱导受基因型限制大, 但是由于其愈伤组织比较容易获得, 再生能力较强, 获得转化植株的周期相对较短, 仍是目前应用最广泛的受体材料之一^[42]。

限制玉米农杆菌转化的很重要的另一个因素是基因型。Wang 等^[43]用 *GUS* 和 *GFP* 瞬时表达系统筛选了玉米的 70 个自交系, 发现 10 个自交系容易被农杆菌侵染, 且这些自交系对农杆菌不同株系的敏感性不同。Ishida 等^[4]发现不同基因型之间转化效率差异显著, 最低为 0, 最高为 30%。许多实验表明大多数基因型的玉米细胞表面因缺乏感受态的细胞和可供农杆菌识别并与其附着的位点而不易转化。国外用于玉米转化的材料最常见为 A188、Hi II(来自于 A188)自交系及其杂交种。国内掖 478、太 9101、综 31、齐 319 和我所选育的 R18-599 及其杂交种也是很优良的玉米转化材料^[24, 26]。但是很多玉米骨干自交系由于基因型的限制不能用农杆菌方法进行转化, 这极大的限制了育种上对玉米品种改造要求, 因此通过调整影响转化的主要因子, 优化培养条件, 或通过正、反向遗传学和基因组学的方法筛选植物中

与农杆菌 T-DNA 转化有关的蛋白, 然后对骨干自交系进行遗传改造将是提高玉米转化效率的可行途径。Huang 等^[28]用 EH105 菌株通过优化共培养条件, 将 5 个的玉米骨干自交系的转化效率提高到 2.35%~5.26%。Nam 等^[44]和 Gelvin 研究小组^[5]分别用根转化的办法筛选出拟南芥对农杆菌转化不敏感的一系列突变体(*rat*)。这些突变体的野生型蛋白产物与农杆菌附着、细胞壁的结构、T-DNA 向核内运输有关。其中 *rat5* 是组蛋白 H2A 基因 *HTA1* 突变引起, *RAT5* 的表达与农杆菌侵染的敏感性高度相关, 并且过量表达 *RAT5* 能有效提高农杆菌的敏感性和难以转化的拟南芥的转化效率, 因此过量表达 *HTA1* 可以作为提高难转化品种转化效率的有效手段^[4]。从反向遗传学的角度出发, VirB、VirD2、VirE2、VirF 及其它几个 Vir 蛋白都可能与植物蛋白相互作用, 因此可通过酵母双杂交的方法进行筛选。目前已在拟南芥中发现了几个与 VirD2 相互作用的蛋白 *AtKAP* (Importin- α)、细胞亲环素(分子伴侣)、2C 型蛋白磷酸化酶, 与 VirE2 能相互作用的 VIP1(Rab GTP 酶)和 VIP2, 与 F-box 蛋白 VirF 相互作用的 Skp1(与 Vir 蛋白降解有关)及几个与 VirB2 作用的蛋白^[5], 通过生化方法和过量或抑制表达的方法都说明这些蛋白可能与 T-DNA 向植物细胞核的运输有关, 因此可通过过量表达或诱导表达的方式合理的利用这些基因来提高植物的农杆菌转化效率。

3.4 培养基成分

农杆菌介导的玉米遗传转化大致可以分为侵染、共培养、恢复培养、筛选培养和植株再生等几个过程。在农杆菌介导的玉米遗传转化研究历程中, 因外植体不同使用的基本培养基也不同。农杆菌介导的遗传转化主要以幼胚和胚性愈伤为受体材料, 使用的基本培养基主要是 N_6 或 MS, 或者在此基础上略加改进(表 2)。

除基本培养基外, 根据农杆菌转化的机制, 一般还在培养基中加一些特殊组分来提高农杆菌的附着能力、Vir 基因的活性和受体材料的感受态。其中乙酰丁香酮、 $AgNO_3$ ^[30]、L-半胱氨酸^[21]、硫醇类物质^[45]都能比较显著的提高玉米的转化效率。

3.5 选择性标记基因

除了有效的遗传转化以外, 高效的选择标记系统也是农杆菌转化所必须的。玉米遗传转化常用的选择标记基因主要有新霉素磷酸转移酶基因

表 2 农杆菌介导的玉米遗传转化中基本培养基的使用情况

Table 2 Application of the basic medium in *Agrobacterium*-mediated maize transformation

基本培养基 Basic medium	外植体 Explant	文献 Reference
MS	芽尖	[31]
	Shoot meristem	
MS	愈伤组织	[25]
	Callus	[25]
N ₆	幼胚	[26]
	Imature embryo	[26]
MS	愈伤组织	[27]
	Callus	[27]
CHU 盐(在 N ₆ 基础上改进)	幼胚	[18]
CHU salt (improved from N ₆)	Imature embryo	
N ₆ 盐	幼胚	[21]
N ₆ salt	Imature embryo	
LS 盐(同 MS 盐)	幼胚	[4,29]
LS salt (the same as MS salt)	Imature embryo	
N ₆ 盐	幼胚	[46,47]
N ₆ salt	Imature embryo	
N ₆ 盐 + B ₅ 维生素	幼胚	[28]
N ₆ salt + B ₅ vitamin	Imature embryo	
MS 盐	幼苗节段 型	[22]
MS salt	愈伤组织	
	Nodal sections type I callus	
MS 盐	幼胚	[48]
MS salt	Imature embryo	
Low-salt medium	Imature embryo	[49]

npt II (卡那霉素、G418 及新霉素抗性)、潮霉素磷酸转移酶基因 *hpt* (潮霉素 B 抗性)、修饰的草丁膦乙酸转移酶 *pat* (草丁膦和双丙氨膦的抗性)、草丁膦乙酸转移酶 *bar* (双丙氨膦抗性)、5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶基因 *epsps* (草甘膦抗性)。通常用 *bar* 和 *pat* 作为标记基因进行玉米胚性愈伤组织转化的筛选比用 *npt II* 效果更明显^[50]。以上通过抗生素或除草剂杀死未转化细胞进行筛选的系统都属于负向选择系统。在这种选择系统中, 虽然阳性转基因株具有抵抗筛选剂的能力, 但是标记基因的产物在一定程度上还是对阳性转基因株有一定的毒性, 因此目前人们更倾向于使用转化频率更高的正向筛选系统: 即标记基因产物通过促进特殊底物的代谢使阳性转基因株“脱颖而出”, 从而达到筛选的目的^[51]。目前, 磷酸甘露糖异构酶 *mpi* 基因 (甘露糖抗性) 已用于玉米的正向选择系统^[18]。另外, 还需要开发新的选择标记以适应多基因转化的转基因后代和高通量筛选的需要, 原卟啉原氧化酶基因 *ppo* (英拜除草剂抗性) 也许是能满足此要求的标记基因^[33]。

除以上几个主要的影响因素以外, 还有一些因

素也影响转化农杆菌转化的效率。如农杆菌的生长状态、菌液浓度、侵染方式、共培养时间和温度、pH 值、超声波、表面活性剂 Silwet L-77 等。各种影响因素的综合和优化将有助于提高玉米的转化效率。

4 前景和展望

植物基因工程自诞生以来, 已使人类的农业生产史发生了巨大的变化, 也使传统的农业种植格局不断受到挑战。据国际农业生物技术获取与应用协会 (ISAAA) 的报导, 至 2005 年在全球 21 个国家转基因植物推广应用总面积达到 9 000 万公顷, 累计种植面积已达 4.746 亿公顷 (合 71.19 亿亩), 相当于我国耕地面积的 3.75 倍。转基因玉米是商品化最早、种植面积最大的转基因作物之一, 其遗传转化的研究一直备受关注。近十几年来, 农杆菌介导的玉米的遗传转化虽然取得了巨大的成就, 但是还存在很多问题亟待解决。例如具有综合农艺性状的骨干自交系的转化受到基因型的限制、优良受体材料的取材受到季节限制, 另外, 还存在基因沉默、转化的稳定性、载体框架的转移、转基因玉米的安全性等问题。通过 *VIPI*、*HTAI* 等与农杆菌相互作用蛋白的基因的过量或抑制表达对骨干自交系进行遗传改造、发展成熟胚作受体材料^[28]、使用可去除的选择标记系统或双 T 转化系统^[52]和正向选择系统将有助于这些问题的解决。

玉米遗传工程的发展, 使得玉米已不再局限于作为粮食作物, 利用玉米作为植物反应器生产高生物技术产品已成为现实。随着比较基因组学的发展和玉米基因组测序的逐渐完成、新功能基因的分离、克隆和各种农作物高效表达技术平台的逐步建立, 国外发达国家, 尤其是美国已利用玉米植物生物反应器这种“分子农业”的方法成功地生产出多种高生物技术产品, 并从这些产品生产中获得巨大的经济效益^[53]。国内许多科技工作者也正从事这方面的研究。玉米生物反应器这种“分子农业”的出现及普及同样将会对我国现有的农作物种植结构产生显著影响, 对增强我国农产品的竞争能力、极大的提高农民的收入以及维护农业的可持续发展具有重要意义。而玉米植物反应器的发展和完善正是建立在高效的遗传转化基础之上, 因此玉米遗传转化的研究任重而道远。

参考文献 (References):

- [1] Bevan M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12(22): 8711–8721. [\[DOI\]](#)
- [2] Chan MT, Chang HH, Ho SL, Tong WF, Yu SM. *Agrobacte-*

- rium-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promoter/beta-glucuronidase gene. *Plant Mol Biol*, 1993, 22(3): 491–506. [\[DOI\]](#)
- [3] Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6(2): 271–282. [\[DOI\]](#)
- [4] Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(6): 745–750. [\[DOI\]](#)
- [5] Gelvin SB. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67(1): 16–37. [\[DOI\]](#)
- [6] Zeanen I, Van Larebeke N, Teuchy H, Van Montagu M, Schell J. Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. *J Mol Biol*, 1974, 86(1): 109–127. [\[DOI\]](#)
- [7] Wenck A, Czako M, Kanevski I, Marton L. Frequent colinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol Biol*, 1997, 34(6): 913–922. [\[DOI\]](#)
- [8] Christie PJ. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1694(1-3): 219–234. [\[DOI\]](#)
- [9] Tzfira T, Vaidya M, Citovsky V. Increasing plant susceptibility to *Agrobacterium* infection by overexpression of the *Arabidopsis* nuclear protein VIP1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(16): 10435–10440. [\[DOI\]](#)
- [10] Tzfira T, Vaidya M, Citovsky V. Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*. *Nature*, 2004, 431(7004): 87–92. [\[DOI\]](#)
- [11] Lacroix B, Tzfira T, Vainstein A, Citovsky V. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. *Trends Genet*, 2006, 22(1): 29–37. [\[DOI\]](#)
- [12] Rossi L, Tinland B, Hohn B. Roles of virulence proteins of *Agrobacterium* in the plant. In: Spaink HJ, Kondorosi A, Hooykaas PJJ, eds. *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, London, 1998.
- [13] Grimsley N, Hohn T, Davies JW, Hohn B. *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. *Nature*, 1987, 325(6100): 177–179. [\[DOI\]](#)
- [14] Schlappi M, Hohn B. Competence of immature maize embryos for *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Plant Cell*, 1992, 4(1): 7–16. [\[DOI\]](#)
- [15] Shen WH, Hohn B. Amplification and expression of the β -glucuronidase gene in maize plants by vectors based on maize streak virus. *Plant J*, 1994, 5(2): 227–236. [\[DOI\]](#)
- [16] Gould J, Devey M, Hasegawa O, Ulian EC, Peterson G, Smith RH. Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot tip. *Plant Physiol*, 1991, 95(2): 426–434.
- [17] Negrotto D, Jolley M, Beer S, Wenck AR, Hansen G. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize (*Zea mays* L.) plants via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep*, 2000, 19(8): 798–803. [\[DOI\]](#)
- [18] Zhao ZY, Gu W, Cai T, Tagliani L, Hondred D, Bond D, Schroeder S, Rudert M, Pierce D. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. *Mol Breed*, 2002, 8(4): 323–333. [\[DOI\]](#)
- [19] Zhao ZY, Gu W, Cai T, Pierce DA. Methods for *Agrobacterium*-mediated transformation. United States Patent, No. 5981840, 1999.
- [20] Zhao ZY, Gu W, Cai T, Tagliani LA, Hondred DA, Bond D, Krell S, Rudert ML, Bruce WB, Pierce DA. Molecular analysis of T₀ plants transformed by *Agrobacterium* and comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation with bombardment transformation in maize. *Maize Genet Coop Newslett*, 1998, 72(1): 34–37.
- [21] Frame BR, Shou H, Chikwamba RK, Zhang Z, Xiang C, Fonger TM, Pegg SE, Li B, Nettleton DS, Pei D, Wang K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiol*, 2002, 129(1): 13–22. [\[DOI\]](#)
- [22] Sidorov V, Gilbertson L, Addae P, Duncan D. *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(4): 320–332. [\[DOI\]](#)
- [23] Wang J, Sun Y, Li Y. Maize genetic transformation by co-cultivating germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnol Appl Biochem*, 2007, 46(Pt1): 51–55. [\[DOI\]](#)
- [24] Vega JM, Yu W, Kennon AR, Chen X, Zhang ZJ. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. transformation of seedling-derived maize callus. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(2): 287–305. [\[DOI\]](#)
- [25] HUANG Lu, WEI Zhi-Ming. Differences in regeneration capacity between five elite varieties of maize (*Zea mays* L.) and the DNA differences between embryogenic callus and nonembryogenic callus. *Acta Physiol Sin*, 1999, 25(4): 332–338.
- 黄璐, 卫志明. 不同基因型玉米的再生能力和胚性与非胚性愈伤组织DNA的差异. *植物生理学报*, 1999, 25(4): 332–338.
- [26] ZHANG Rong, WANG Guo-Ying, ZHANG Xiao-Hong, ZHAO Hu-Ji. *Agrobacterium tumefaciens* mediated maize transformation. *J Agri Biotech*, 2001, 9(1): 45–48.
- 张荣, 王国英, 张晓红, 赵虎基. 根癌农杆菌介导的玉米遗传转化体系的建立. *农业生物技术学报*, 2001, 19(1): 45–48.
- [27] QUAN Rui-Dang, SHANG Mei, ZHANG Ju-Ren. Optimization of transformation conditions in maize inbred line calli via *Agrobacterium tumefaciens*. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2003, 29(3): 245–250.
- 权瑞党, 尚梅, 张举仁. 农杆菌介导的玉米自交系愈伤组织转化条件的优化. *植物生理与分子生物学学报*, 2003, 29(3): 245–250.

- [28] Huang XQ, Wei ZM. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.). *Plant Cell Rep*, 2004, 22(11): 793–800. [\[DOI\]](#)
- [29] Yang AF, He CM, Gao F, Zhang JR. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses from maize elite inbred lines. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2006, 42(3): 215–219. [\[DOI\]](#)
- [30] Ishida Y, Saito H, Hiei Y, Komari T. Improved protocol for transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol*, 2003, 20(1): 57–66.
- [31] Hansen G, Das A, Chilton MD. Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(16): 7603–7607. [\[DOI\]](#)
- [32] Miller M, Tagliani L, Wang N, Berka B, Bidney D, Zhao ZY. High efficiency transgene segregation in co-transformed maize plants using an *Agrobacterium tumefaciens* 2 T-DNA binary system. *Transgenic Res*, 2002, 11(4): 381–396. [\[DOI\]](#)
- [33] Li X, Volrath SL, Nicholl DB, Chilcott CE, Johnson MA, Ward ER, Law MD. Development of protoporphyrinogen oxidase as an efficient selection marker for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize. *Plant Physiol*, 2003, 133(2): 736–747. [\[DOI\]](#)
- [34] YANG Ai-Guo. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system of maize calli and preliminary study on creating new transgenic male sterile lines in maize by genetic engineering method [Dissertation]. Ya'an: Sichuan Agriculture University, 2006.
杨爱国. 玉米胚性愈伤遗传转化体系优化及基因工程雄性不育系初步研究[学位论文]. 雅安: 四川农业大学, 2006.
- [35] Smith RH, Hood EE. Review and interpretation: *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocots. *Crop Sci*, 1995, 35(2): 301–309.
- [36] Gubba S, Xie YH, Das A. Regulation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene expression: isolation of a mutation that restores virGD52E function. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1995, 8(5): 788–791.
- [37] Liu CN, Steck TR, Habeck L, Meyer JA, Gelvin SB. Multiple copies of *virG* allow induction of *Agrobacterium tumefaciens* *vir* genes and T-DNA processing at alkaline pH. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1993, 6(1): 144–156.
- [38] Mohamalawari D, Sharma NC, Cristae P, Sahi SV. Transformation of maize by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzo-xazin-3(4H)-one resistant *Agrobacterium* strains. *Biotech Lett*, 2002, 24(3): 197–203. [\[DOI\]](#)
- [39] Jarchow E, Grimsley NH, Hohn B. *virF*, the host-range determining virulence gene of *Agrobacterium tumefaciens*, affects T-DNA transfer to *Zea mays*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(23): 10426–10430. [\[DOI\]](#)
- [40] Todorova L, Kruleva M, Krapchev B, Nedev T. Maize immature embryo culture. *Maize Genet Coop Newslett*, 1998, 72: 76.
- [41] Armstrong CL, Green E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta*, 1985, 164(2): 207–214. [\[DOI\]](#)
- [42] Carvalho CHS, Bohora PN, Bosdello PN, Abreu LL, Valicente FH, Bressan W, Paiva E. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. *Plant Cell Rep*, 1997, 17(1): 73–76. [\[DOI\]](#)
- [43] Wang Y, Fu S, Wen Y, Zhang Z, Xia Y, Liu Y, Rong T, Pan G. Selection of maize inbred lines with high regeneration and susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens*. *J Genet Genomics*, 2007, 34(8): 749–755. [\[DOI\]](#)
- [44] Nam J, Mysore KS, Zheng C, Knue MK, Matthyse AG, Gelvin SB. Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*. *Mol Gen Genet*, 1999, 261(3): 429–438. [\[DOI\]](#)
- [45] Olhoft PM, Lin K, Galbraith J, Nieisen NC, Somers DA. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep*, 2001, 20(8): 731–737. [\[DOI\]](#)
- [46] Shou H, Bordallo P, Fan JB, Yeakley JM, Bibikova M, Sheen J, Wang K. Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase enhances freezing tolerance in transgenic maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 3298–3303. [\[DOI\]](#)
- [47] Shou H, Bordallo P, Wang K. Expression of the *Nicotiana* protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *J Exp Bot*, 2004, 55(399): 1013–1019. [\[DOI\]](#)
- [48] Frame BR, McMurray JM, Fonger TM, Main ML, Taylor KW, Torney FJ, Paz MM, Wang K. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(10): 1024–1034. [\[DOI\]](#)
- [49] Vega JM, Yu W, Kennon AR, Chen X, Zhang ZJ. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(2): 297–305. [\[DOI\]](#)
- [50] Register III JC, Peterson DJ, Bell PJ, Bullock WP, Evans IJ, Frame B, Greenland AJ, Higgs NS, Jepson I, Jiao S, Lewnall CJ, Sillick JM, Wilson HM. Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment. *Plant Mol Biol*, 1994, 25(6): 951–961. [\[DOI\]](#)
- [51] Wenck A, Hansen G. Positive selection. *Methods Mol Biol*, 2005, 286: 227–236.
- [52] Huang S, Gilbertson LA, Adams TH, Malloy KP, Reisenbigler EK, Birr DH, Snyder MW, Zhang Q, Luethy MH. Generation of marker-free transgenic maize by regular two-border *Agrobacterium* transformation vectors. *Transgenic Res*, 2004, 13(5): 451–461. [\[DOI\]](#)
- [53] LIU De-Hu. Perspective for the plant bioreactor industry. *Biotech World*, 2004, 8: 36–41.
刘德虎. 植物生物反应器的产业前景. 生物技术世界, 2004, 8: 36–41.