

胡萝卜遗传转化研究进展

张琳, 李翔宇, 林彦萍, 王康宇, 王义, 张美萍

(吉林农业大学 人参基因资源工程研究中心, 吉林 长春 130118)

摘要:综述了胡萝卜遗传转化的研究进展,主要介绍了农杆菌介导法和 DNA 直接转化方法(包括基因枪法、电击法和 PEG 介导法)的分子机制和进展,并对遗传转化中受体基因型、外植体类型和菌株类型等影响因素进行阐述,以期建立一个高效胡萝卜遗传转化体系提供理论依据。

关键词:胡萝卜;遗传转化;转化方法;影响因素

中图分类号:S 631.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)13-0201-04

胡萝卜(*Daucus carota*)属伞形科萝卜属二年生草本植物,是全球性十大蔬菜作物之一,是人类饮食中维生素 A 的主要来源。其肉质根富含维生素 A 和植物纤维,具有益肝明目、清热解毒、利膈宽肠、降糖降脂等功效。

胡萝卜是植物组织培养中的模式植物之一,有良好的组织培养和遗传转化基础,具有潜在的器官发生和体细胞胚胎发生的特点,使其更适合作为模式植物用于研究植物形态发生、体细胞胚胎发生、体细胞无性系变异

及原生质体复苏的生物学过程。20 世纪 80 年代以来,转基因技术用于研究胡萝卜基因组功能和调控、植物代谢及农艺性状和品质等。但由于胡萝卜组织培养和遗传转化效率受诸多因素影响,如受体基因型、外植体类型、转化菌株类型和转化后培养基的选择、预培养时间(温度)、共培养时间(温度)、抗生素浓度筛选等,所以建立一个高效再生遗传转化体系十分重要。现对胡萝卜遗传转化方法的分子机制和进展以及影响转化的因素进行了综述,以期以胡萝卜为受体的基因改造提供理论依据。

1 不同遗传转化方法的研究

植物遗传转化是利用基因工程手段将外源基因导入受体植物基因组中,并在后代中表达的过程。该技术实现了特定基因在不同种属间的转化,打破了传统常规育种的界限,加快了育种进程,为种质资源创新及育种提供理论基础和技术手段^[1]。近年来,大部分遗传转化

第一作者简介:张琳(1990-),女,硕士研究生,研究方向为功能基因组学。E-mail:1181351498@qq.com.

责任作者:张美萍(1964-),女,博士,教授,博士生导师,现主要从事系统基因组学研究与应用等研究工作。E-mail:mpzhang@tam.u.edu.

基金项目:中国科学技术部 863 计划资助项目(2013AA102604-3)。

收稿日期:2016-03-07

Advance in Applications of Virus-induced Gene Silencing (VIGS) Technology to Ornamental Plants

CHEN Zheng, XIN Liqin, WU Chaoqun, WANG Qingqing, HE Shaoyun

(College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract: Virus-induced gene silencing (VIGS) technology is widely used in identifying the functions of genes related to plant growth and development, resistance, metabolism and so on. VIGS technology has many merits, such as short period, low cost, no need for genetic transformation, high throughput. Ornamental plants have higher economical values, and it is expected VIGS technology can be widely used in them. This paper reviewed the mechanism, establishment and development of VIGS technology, factors affecting the efficiency of VIGS technology in ornamental plants, and applications of VIGS technology to ornamental plants. In addition, the prospects of VIGS technology in the applications to conservation and molecular breeding in ornamental plants were also discussed.

Keywords: virus-induced gene silencing(VIGS); ornamental plants; gene function; virus vector

方法已经应用于胡萝卜的研究,可分为2类,一类为利用载体的转化,主要为农杆菌介导法,包括根癌农杆菌和发根农杆菌介导的遗传转化;另一类为直接转化法,包括基因枪法、电击法和PEG介导法等。

1.1 农杆菌介导法

农杆菌携带Ti质粒或Ri质粒,其含有与遗传转化相关的组成成分即Vir区和T-DNA区,其中,Vir区决定农杆菌对植物细胞的侵染能力,促进T-DNA向受体细胞的转移,农杆菌T-DNA和Vir蛋白经细胞壁、鞭毛和细胞膜转移到植物细胞中,形成T-DNA复合体,T-DNA复合体在植物细胞质中转运进入细胞核,最后,Vir蛋白从T-DNA复合体中解体,T-DNA整合到植物基因组中^[2-3]。1989年,SCHMVLING等^[4]发现发根农杆菌中*rolA*、*rolB*和*rolC*基因对转基因植物具有调控作用。加利福尼亚大学ZAMBRYSKI^[5]报道,根癌农杆菌T-DNA两边序列极其精确,T-DNA可准确插入并整合到植物基因组中。农杆菌介导的遗传转化具有操作简单、技术成熟、成本较低、外源基因表达较稳定、拷贝数低等优点。利用农杆菌介导法转化胡萝卜,生产次生代谢产物成为了可能。

1987年,SCOTT等^[6]首次报道利用农杆菌介导法转化胡萝卜,经体细胞悬浮培养获得再生植株。目前,转基因胡萝卜在疫苗、蛋白质、多肽药物、抗体等的研究已有报道。王凌健等^[7]将携带有结核杆菌分泌蛋白MPT64基因根癌农杆菌LBA4404转化胡萝卜子叶和胚轴,通过体细胞胚胎发生的途径获得抗性植株,经PCR、Southern检测为阳性植株,Western检测抗性植株种子蛋白,结果为阳性,该研究为转基因植物生产口服疫苗和研制防治肺结核的新型疫苗提供材料。张娅等^[8]将口蹄疫病毒VP1基因转入胡萝卜愈伤组织细胞中,PCR-Southern、Dot-ELISA和ELISA检测结果证明口蹄疫结构蛋白VP1基因在胡萝卜基因组中成功表达。YAU等^[9]利用农杆菌介导法将绿色荧光蛋白GFP基因转入胡萝卜愈伤组织中,发现转化后的愈伤组织光照3周可以加速其生长。张丽华等^[10]将胸腺肽基因导入胡萝卜基因组中,RT-PCR检测胸腺肽基因在转录水平上表达。

迄今为止,农杆菌介导的遗传转化有30多年,已经广泛应用于植物遗传转化过程中,它的应用推动了植物分子生物学和转基因生物技术的发展,为分子农业的发展带来了美好前景。

1.2 DNA直接转化法

1.2.1 基因枪法 又名微弹轰击法,由美国Cornell大学SANFORD等提出的基因转移方法。该方法是将目的基因包被在金属微粒表面,在高压作用下,高速运动的金属微粒穿过受体细胞壁,释放外源基因,随机整合到植物基因组中。操作简便快速,不受受体材料和靶细胞的限制,可进行多细胞共转化。但是其价格昂贵,转化率低,外源基因往往多拷贝插入,易发生重排现象,还

可能造成转基因沉默,并且后代遗传不稳定。基因枪法转化大豆、小麦、玉米、高粱等作物也成功报道,然而对于基因枪法转化胡萝卜的研究较少。DEROLES等^[11]利用基因枪法将GUS基因导入胡萝卜愈伤组织中,GUS染色初步确定为阳性。KUMAR等^[12]将甜菜碱醛脱氢酶BADH基因转入胡萝卜子叶、根及悬浮细胞中,转基因植株表现出高水平耐盐性。张丽华等^[13]用基因枪法对胡萝卜愈伤组织进行降钙素基因转化,PCR、Southern杂交检测结果说明该基因整合到胡萝卜基因组中。以胡萝卜为受体材料,基因枪法较适合转化愈伤组织细胞。

1.2.2 电击法 在高压脉冲作用下,电击穿孔原生质体膜形成瞬间通道,质粒DNA导入原生质体中,进而整合。植物原生质体是除去细胞壁,被质膜包围,有生活力的细胞,其具有结构简单、群体数量大、发育同步性、DNA分子容易进入细胞、并获得纯合性转化子等特点,解决了种间不亲和的问题,便于进行遗传转化。1972年,KAMEYA等^[14]首次建立了胡萝卜原生质体培养方法,并从原生质体中分离出胚状体,获得再生植株。1985年,LANGRIDGE等^[15]从胡萝卜悬浮培养的细胞中分离出原生质体,利用电击法,将pTiC58质粒DNA转入胡萝卜原生质体中,转化后的原生质体能够使细胞壁复苏,并在固体培养基中发育成抗性植株,首次实现了电击法转化胡萝卜原生质体且可以稳定遗传。电击法转化过程中,电击参数如电压、电容、脉冲大小和电击距离等因素影响原生质体的活力、原生质体膜通透性及DNA转移效率,此外,DNA构象也可能影响转化效率。因此,建立一个最优的电击转化体系是必要的^[16]。

1.2.3 PEG介导法 胡萝卜原生质体也可以用聚乙二醇(PEG)处理后转化。聚乙二醇(PEG)是一种化学诱导剂,可以破坏膜的完整性,通过电荷间的相互作用,与DNA形成复合物,原生质体通过内吞作用,直接吸收外源DNA并进入细胞核整合到受体基因组中。1992年,DROGE等^[17]将原生质体与质粒DNA融合后,经PEG处理,接种到MS+0.4 mol·L⁻¹甘露醇+1 mg·L⁻¹2,4-D+0.1 mg·L⁻¹6-BA培养基中,8周后获得抗性愈伤组织,并进一步获得转基因植株。与电击法相比,PEG介导法不需要任何复杂的仪器,但是,由于原生质体再生植株比较困难,以原生质体为受体进行的遗传转化,转化效率偏低,PEG介导的胡萝卜遗传转化鲜有报道。此外,植物遗传转化方法还包括花粉管通道法、脂质体法、超声波法、显微注射法和纳米载体包埋法等。

2 影响遗传转化的因素

利用胡萝卜材料生产次生代谢产物,建立高效遗传转化体系是成功转化的关键。在遗传转化过程中受体基因型、外植体选择、菌株的类型及化学诱变剂等因素影响转化效率。BARANSKI等^[18]认为菌株类型和植物基因型是影响胡萝卜遗传转化最主要因素。

2.1 菌株类型

转化效率与菌株类型及所携带的质粒类型有关。GILBERT 等^[19]用菌株 MOG101 和 EHA105 转化 2 个胡萝卜品种,前者转化率分别为 5.1% 和 1.8%,后者分别为 0.5% 和 12.1%。1992 年 PAWLICKI 等^[20]报道胡萝卜遗传转化效率与菌株 C58C1 携带质粒类型有关。不同类型的菌株侵染能力存在差异,一般认为,农杆菌碱型侵染能力最强,胭脂碱型次之,章鱼碱型最弱。但是,2002 年 LIU 等^[21]研究表明,章鱼碱型 *VirG* 基因插入到胭脂碱型的农杆菌转化胡萝卜愈伤组织,*GUS* 基因瞬时表达增强,而插入到农杆菌质粒中则无差异。试验表明胡萝卜遗传转化不仅与菌株有关,受体材料也影响植物遗传转化效率。

2.2 受体基因型

GILBERT 等^[19]分别以 3 个品种胡萝卜的上胚轴为外植体与农杆菌共培养,结果表明,‘Nanco’转化率最高为 12.1%,‘Golden’次之为 6.1%,‘Danvers Half Long’最低为 1.8%。TAKAICHI 等^[22]以 ‘Kurodagosan’ 和 ‘Nantes Scarlet’ 2 个品种下胚轴为外植体,利用农杆菌介导法进行遗传转化,以 C58C1 菌株转化时,2 个品种转化率分别为 6.8% 和 6.1%;LBA4404 菌株转化时,2 个品种转化率分别为 1.2% 和 11.8%。张娅等^[23]选择 3 个栽培品种,建立高频愈伤组织诱导体系,筛选出 ‘Carol’ 品种愈伤组织诱导率最高,并以此为外植体进行遗传转化。郭芝香等^[24]以 2 个基因型胡萝卜下胚轴为外植体,将人源白细胞介素-2 基因导入其中,结果表明,共培养后不同基因型胡萝卜分化对激素浓度的反应不同。

2.3 外植体选择

2002 年,郑回勇等^[25]分别对胡萝卜子叶、下胚轴和愈伤组织进行侵染,愈伤组织转化率高子叶和下胚轴,但愈伤组织难除菌,子叶易除菌但生长缓慢且诱导出的愈伤组织质量差,下胚轴转化率相对较高,愈伤组织诱导容易且质量较好,故选择下胚轴为遗传转化受体。CHEN 等^[26]将携带 pCambia 双元质粒载体 LBA4404 转入下胚轴和叶柄中,结果表明,叶柄比下胚轴抗性愈伤组织诱导率高,分别为 3.3% 和 1.4%。张娅等^[23]以下胚轴和愈伤组织为受体材料,利用农杆菌 LBA4404 介导转化质粒 PBI121,下胚轴抗性愈伤组织诱导率为 33.9%,得到抗性植株周期长;愈伤组织转化效率为 53.1%,与下胚轴相比,得到抗性植株时间缩短一半,但转化植株假阳性较高。农杆菌介导法转化愈伤组织在抗生素筛选时,愈伤组织中存在着转化和未转化细胞,可能由于转化细胞对未转化细胞的交叉保护,使得未转化细胞在抗性筛选过程中逃逸^[5]。

试验也发现,不仅外植体类型影响转化效率,选择无菌苗的成长天数对试验也具有一定的影响,PAWLICKI 等^[20]发现以 3 周无菌苗下胚轴为外植体进行转化,其转化率是培养 2 周的 2 倍,但是 3 周以上的无菌苗转

化率降低。

2.4 化学诱变剂

乙酰丁香酮(AS)为酚类物质,可以诱发农杆菌中 Ti 或 Ri 质粒 DNA 上 *Vir* 基因的活化和表达,促进 T-DNA 向宿主细胞核的转移,进而提高转化效率^[27]。一般认为,酚类物质是农杆菌介导转化单子叶植物所必需的,双子叶植物在受伤后,自身会形成酚类物质,因而转化双子叶植物可以不外加酚类物质。刘明志^[28]在农杆菌培养基中加入 AS 进行处理,转化胡萝卜悬浮细胞,AS 对农杆菌活化预处理后,转化率明显提高。郑回勇等^[25]研究表明,低浓度的 AS 对胡萝卜转化具有一定促进作用。杨秀荣等^[29]认为 AS 的作用效果与培养基的 pH 有关。HARDEGGER 等^[30]发现在遗传转化过程中添加 AS,对 ‘Nantaise’ 品种转化率无影响。所以选择最适 AS 浓度对胡萝卜遗传转化至关重要,有效使用浓度一般为 50~200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 其它因素

合适的预培养时间使酚类物质积累,活化 *Vir* 区基因,促使农杆菌更容易进入宿主细胞^[31-32]。高金秋等^[33]在侵染前对外植体进行预培养,使外植体保持活跃生长代谢状态,促进外源基因转移和整合,提高转基因瞬时表达和转化率。石琰璟等^[34]、WURTELE 等^[35]认为农杆菌介导的遗传转化中 Kan 对植株再生有较强的抑制作用;在抗性植株生根阶段,Kan 浓度的增高,根毛生长迟缓,数量逐渐减少^[36];此外,培养基成分、农杆菌菌液浓度、侵染时间、共培养时间、共培养温度等因素也会影响外源基因的转化。

3 讨论

随着转基因技术日益成熟,利用植物受体为生物反应器生产蛋白质、多肽药物和其它次生代谢产物已经成为可能,构成了近年来提出的分子农业的主体。目前,植物生物反应器种类主要包括拟南芥、烟草、番茄、马铃薯、油菜、胡萝卜等。

与动物和微生物相比,胡萝卜作为生物反应器具有一定的优越性,如生产成本低、遗传操作简单、通过自交后代遗传性状稳定、产物易储藏和安全性好等,但其植物再生较难,培养周期相对较长,以及转化过程中植物系统自身对外源基因的排斥,导致转基因沉默等制约着遗传转化的进程。所以,对于不同基因型的不同外植体选择合适的转化方法,对于不同的转化方法筛选最适转化条件、建立高效稳定简便快速的胡萝卜遗传转化体系是今后胡萝卜遗传转化的重要课题。

参考文献

- [1] 王关林. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 赵佩, 王轲, 张伟, 等. 参与农杆菌侵染及 T-DNA 转运过程植物蛋白的研究进展和思考[J]. 中国农业科学, 2014(13): 2504-2518.
- [3] GELVIN S B. Plant proteins involved in *Agrobacterium* - mediated genetic transformation[J]. Annual Review of Phytopathology, 2010, 48: 45-68.
- [4] SCHMULLING T, SCHELL J, SPENA A. Promoters of the *rolA*, *B*,

and C genes of *Agrobacterium* rhizogenes are differentially regulated in transgenic plants[J]. The Plant Cell, 1989, 1(7): 665-670.

[5] ZAMBRYSKI P. Fundamental discoveries and simple recombination between circular plasmid DNAs led to widespread use of *Agrobacterium tumefaciens* as a generalized vector for plant genetic engineering[J]. Int J Dev Biol, 2013, 57: 449-452.

[6] SCOTT R J, DRAPER J. Transformation of carrot tissues derived from proembryogenic suspension cells; a useful model system for gene expression studies in plants[J]. Plant Molecular Biology, 1987, 8(3): 265-274.

[7] 王凌健, 倪迪安, 陈永宁, 等. 利用转基因胡萝卜表达肺结核疫苗[J]. 植物学报, 2001(2): 132-137.

[8] 张娅, 曾君社, 陈耀锋, 等. 口蹄疫病毒 VP1 基因在胡萝卜中的表达[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007(3): 75-80.

[9] YAU Y Y, DAVIS S J, IPEK A, et al. Early identification of stable transformation events by combined use of antibiotic selection and vital detection of green fluorescent protein(GFP) in carrot(*Daucus carota* L.) callus[J]. Agricultural Sciences in China, 2008, 7(6): 664-671.

[10] 张丽华, 程智慧, 陈杭, 等. 胸腺肽基因对胡萝卜的遗传转化[J]. 农业生物技术学报, 2007, 14(4): 639-640.

[11] DEROLIS S, SMITH M A L, LEE C. Factors affecting transformation of cell cultures from three dicotyledonous pigment-producing species using microprojectile bombardment[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2002, 70(1): 69-76.

[12] KUMAR S, DHINGRA A, DANIELL H. Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance[J]. Plant Physiology, 2004, 136(1): 2843-2854.

[13] 张丽华, 程智慧, 陈杭, 等. 降钙素基因对胡萝卜的遗传转化[J]. 生物技术通讯, 2005(5): 512-514.

[14] KAMEYA T, UCHIMIYA H. Embryoids derived from isolated protoplasts of carrot[J]. Planta, 1972, 356-360.

[15] LANGRIDGE W H R, LI B J, SZALAY A A. Electric field mediated stable transformation of carrot protoplasts with naked DNA[J]. Plant Cell Reports, 1985, 4(6): 355-359.

[16] BOSTON R S, BECWAR M R, RYAN R D, et al. Expression from heterologous promoters in electroporated carrot protoplasts[J]. Plant Physiology, 1987, 83(4): 742-746.

[17] DROGE W, BROER I, PUHLER A. Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin(glufosinate) differently from untransformed plants[J]. Planta, 1992, 187(1): 142-151.

[18] BARANSKI R, KLOCKE E, RYSHKA U. Monitoring the expression of green fluorescent protein in carrot[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2007, 29(3): 239-246.

[19] GILBERT M O, ZHANG Y Y, PUNJA Z K. Introduction and expression of chitinase encoding genes in carrot following *Agrobacterium*-mediated

transformation[J]. In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 1996, 32(3): 171-178.

[20] PAWLICKI N, SANGWAN R S, SANGWAN-NORREEL B S. Factors influencing the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of carrot (*Daucus carota* L.)[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1992, 31(2): 129-139.

[21] LIU C N, LI X Q, GELVIN S B. Multiple copies of *VirG* enhance the transient transformation of celery, carrot and rice tissues by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Molecular Biology, 1992, 20(6): 1071-1087.

[22] TAKAICHI M, OEDA K. Transgenic carrots with enhanced resistance against two major pathogens, *Erysipheheraclei* and *Alternaria dauci*[J]. Plant Science, 2000, 153(2): 135-144.

[23] 张娅, 曾君社, 周志勇, 等. 胡萝卜组织培养和高效遗传转化体系的建立[J]. 植物学通报, 2005(S1): 37-42.

[24] 郭芝香, 弭晓菊, 崔继哲, 等. 农杆菌介导胡萝卜转化体系的诱导培养基优化[J]. 中国农学通报, 2007, 23(12): 93-97.

[25] 郑回勇, 郑金贵, 黄碧芳. 人乳铁蛋白基因转化胡萝卜研究初报[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2002(2): 215-217.

[26] CHEN W P, PUNJA Z. Transgenic herbicide-and disease-tolerant carrot (*Daucus carota* L.) plants obtained through *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Plant Cell Reports, 2002, 20(10): 929-935.

[27] 邓艺, 曾炳山, 赵思东, 等. 乙酰丁香酮在农杆菌介导的遗传转化中的作用机制及应用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(5): 2229-2232.

[28] 刘明志. 酚类化合物促进含双元载体农杆菌对胡萝卜悬浮细胞的转化和植株再生[J]. 植物学报(英文版), 1996, 38(3): 203-208.

[29] 杨秀荣, 陈永文, 方平, 等. 乙酰丁香酮对根癌农杆菌介导的甘薯遗传转化的影响[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2002, 27(5): 751-754.

[30] HARDEGGER M, STURM A. Transformation and regeneration of carrot (*Daucus carota* L.)[J]. Molecular Breeding, 1998, 4(2): 119-127.

[31] BALESTRAZZI A, CARBONERA D, CELA R. Transformation of *Daucus carota* hypocotyls mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. J Genet Breed, 1991, 45: 135-140.

[32] TOKUJI Y, FUKUDA H. A rapid method for transformation of carrot (*Daucus carota* L.) by using direct somatic embryogenesis[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1999, 63(3): 519-523.

[33] 高金秋, 于丽杰, 陶雷. 白细胞介素-4 基因转化胡萝卜的研究[J]. 北方园艺, 2012(24): 115-119.

[34] 石琰琛, 沙广利, 黄粤. 胡萝卜高效再生和遗传转化体系的建立[J]. 青岛科技大学学报(自然科学版), 2005, 26(3): 197-200.

[35] WURTELE E S, BULKA K. A simple, efficient method for the *Agrobacterium*-mediated transformation of carrot callus cells[J]. Plant Science, 1989, 61(2): 253-262.

[36] 郭蓉, 李霞, 张金文, 等. 农杆菌介导胡萝卜遗传转化体系的建立与转基因胡萝卜栽培试验[J]. 华北农学报, 2006(6): 6-10.

Research Progress of Carrot Genetic Transformation

ZHANG Lin, LI Xiangyu, LIN Yanping, WANG Kangyu, WANG Yi, ZHANG Meiping

(Research Center for Ginseng Genetic Resources Development and Utilization, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: The development of genetic transformation of carrot was reviewed in this research. This paper mainly introduced the molecular mechanisms and progress of the *Agrobacterium*-mediated methods and direct DNA transformation methods including particle bombardment, electroporation and PEG-mediated method. Some influencing factors in genetic transformation were described, for example, the receptor gene type, explant type, strain of the type and so on. It provided theoretical basis for the establishment of an efficient carrot genetic transformation system.

Keywords: carrot; genetic transformation; transformation methods; influencing factors