

离体培养植物细胞的表面与农杆菌介导基因转化频率的研究

郭晓才

(中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041)

摘要: 以玉米、黑麦、烟草为材料, 对细胞表面进行了扫描电镜观察, 研究了离体培养植物细胞的细胞壁外表面的结构及其变化与农杆菌介导转化频率之间的关系。正常继代培养的烟草细胞, 其细胞壁外表面光滑, 大部分细胞在扫描电镜下坍塌或皱折; 经处理用于农杆菌介导转化的烟草细胞, 其表面有很多颗粒状突起和纤丝状物或纤丝状网; 光滑的表面很少见到菌, 而粗糙表面则有很多菌。玉米和黑麦愈伤组织中, 浅黄色、疏松易散的胚性细胞团, 其表面细胞有很多未坍塌, 相当一部分未坍塌细胞的细胞壁外表面与烟草细胞一样, 具有很多较小的颗粒状突起和纤丝状物或纤丝状网; 白色松软的愈伤组织, 其外层细胞大多坍塌或呈柱状, 未坍塌细胞的表面光滑, 有些似有一层膜状物。对植物细胞壁上的农杆菌结合位点和基因转化频率进行了讨论。

关键词: 离体培养; 细胞壁外表面; 农杆菌介导; 转化频率

中图分类号: S188 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000- 7091(2001) 03- 0023- 05

目前, 植物基因工程应用的限制因素是基因转化技术与方法。自 1983 年第 1 例转基因植株成功以来, 植物基因转化技术方法已发展到 20 种左右^[1- 3], 其中最理想的技术仍是农杆菌介导技术。然而, 由于宿主特异性的原因, 农杆菌介导技术难以用于禾谷类植物^[4], 而对禾谷类植物^[5]进行遗传改良一直是人类奋斗的目标。

农杆菌难以转化禾谷类植物细胞的原因之一, 是认为禾谷类植物细胞的表面没有农杆菌结合位点^[6]。然而, 1992 年以来, 用农杆菌介导基因转化水稻、玉米等的技术有所突破^[7], 这说明禾谷类植物细胞的表面也有农杆菌结合位点。在我们以前的植物基因转化研究中发现, 一定的处理可使农杆菌介导的基因转化频率提高很多, 结合我们对植物细胞的表面与细胞间作用的研究结果^[8], 我们认为植物细胞表面的农杆菌结合位点是可以诱导产生的, 禾谷类植物细胞亦不例外。本试验以植物基因转化的模式植物之一烟草和主要的禾谷类植物玉米、黑麦为材料, 对细胞表面进行了观察。

1 材料和方法

1.1 材料及离体培养

所用材料有普通烟草(*Nicotiana tabacum*), 玉米(*Zea mays*) 和黑麦(*Secale cereale*) 的离

收稿日期: 1999- 12- 20

基金项目: 中国科学院生物科学与技术研究特别支持费课题(STZ- 1- 16)

作者简介: 郭晓才(1956-), 男, 博士生导师, 主要从事遗传学、细胞生物学及遗传工程研究工作。

体培养愈伤组织或细胞系。

烟草细胞为已建的稳定的愈伤组织细胞系和悬浮细胞系。烟草细胞系继代培养在含 1.0 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L NAA 和 0.2 mg/L KT 的 MS 培养基(pH 值 5.4~5.6) 上, 悬浮培养用同样成分的培养液。

玉米细胞为未成熟胚和成熟胚诱导所建立的愈伤组织培养物。玉米未成熟胚和成熟胚在含 2.0 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L 6-BA 的培养基E(MS 无机盐+ 0.5 mg/L VB₁+ 200 mg/L Asn, pH 值 5.2~5.4) 上诱导产生, 在含 1.0 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L 6-BA 的培养基 E 上继代培养。

黑麦细胞为已建的稳定愈伤组织细胞系。黑麦愈伤组织继代培养在含 2.0 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L 6-BA 的培养基N(无机盐大量元素为 N6、其余成分为 MS, pH 值 5.0~5.4) 上。

所有培养物均 20~25 d 继代一次, (26±1) °C, 16 h 光/8 h 暗, 37.9 μmol/(m²·s)。

1.2 扫描电镜观察

取不同愈伤组织, 乙醇-冰乙酸(3:1) 固定液 0~4 °C 固定 2~4 h, 常规乙醇系列脱水, 乙醚置换, 冷冻干燥, 离子溅射法镀膜, 扫描电镜观察。

2 结果与分析

2.1 烟草细胞

正常继代培养的烟草细胞, 白色(培养时间较长未继代而失水时) 或半透明(继代培养后生长旺盛、水分较多时), 疏松易散。其细胞壁外表面光滑, 常可见到皱折。细胞平均体积较大, 一般为直径 150 μm 以上, 有很大的液泡。可能是由于含水分较多, 在扫描电镜制样过程中失水而大多数细胞坍塌; 但少数未坍塌的细胞, 其细胞壁外表面仍保持光滑, 仅有极少数的细胞其细胞壁外表面有少量颗粒状突起, 极少见到纤丝状物。

用于农杆菌介导转化的烟草细胞, 其细胞壁外表面有很多颗粒状突起和纤丝状物。这些颗粒状突起均较小, 在细胞壁外表面分布较均匀。细胞壁外表面更多见到的是纤丝状物构成的网状结构。细胞的平均体积较小。可能是由于含水分较少, 未坍塌的细胞较多。

在农杆菌结合实验中, 细胞壁外表面光滑的细胞很少结合细菌, 而外表面有颗粒状突起和纤丝状网的细胞结合着很多细菌。在同一个细胞上, 这一点表现的更清楚。

2.2 玉米细胞

未成熟胚和成熟胚所产生的愈伤组织无显著差别, 均有浅黄色、质地较硬、致密的和白色、松软、含水分或黏液较多呈稀糊状的。前者经继代培养, 有一部分变得疏松易碎、无黏液、生长较快, 应属于所谓的“类型 II”愈伤组织(因未达到典型的类型 II 愈伤组织, 为方便起见我们称之为“前类型 II”愈伤组织), 一部分则变成如后者的白色松软的愈伤组织, 这种松软愈伤组织一般有较致密的“核”, 孚尔根染色较深, 为分生中心。根据我们以前的工作和经验, 类型 II 愈伤组织的细胞中有相当多的属于胚性细胞, 常用于原生质体的分离和体细胞胚的诱导, 因此认为类型 II 愈伤组织也易于用农杆菌介导进行转化。

白色松软愈伤组织的细胞, 绝大多数在扫描电镜制样中坍塌, 少数的未坍塌细胞, 其表面光滑, 有些细胞的细胞壁外表面似覆盖着一层膜状物。

前类型 II 愈伤组织的细胞同样是大多数坍塌, 而未坍塌的细胞其外表面有很多较小的颗粒状突起和纤丝状物或纤丝状网, 类似于易于转化的烟草细胞的细胞壁外表面。

有些细胞呈柱状, 即为光镜下的香蕉状等细长细胞, 其表面光滑。

2.3 黑麦细胞

所建立的黑麦愈伤组织系为较典型的类型 II 愈伤组织, 浅黄色, 疏松易散, 无黏液, 生长速度快。在扫描电镜下, 有一部分细胞未坍塌, 其细胞壁外表面有很多颗粒状突起和纤丝状物或纤丝状网。

3 讨论

Agrobacterium tumefaciens 可以感染受伤的双子叶植物, 把一段 DNA 转移并整合到植物的基因组^[1]。*Agrobacterium* 对植物的感染是目前唯一已知的天然的可进行界间基因转移的系统^[9], 其感染过程是: 在受伤植物细胞分泌的酚类化合物作用下, 农杆菌趋化运动, 接近受伤植物细胞后其 *vir* 区基因表达, 菌体结合到植物细胞, 在其他 *vir* 基因产物的作用下, 单链的 T-DNA (T strand) 从菌体内的 Ti 质粒上切下、包裹并转移进植物细胞, 由于有核定位蛋白质的引导而进入细胞核并整合到植物基因组^[10-12]。这一过程中重要的一步是农杆菌在植物细胞壁上的结合, 对植物细胞来说其细胞壁上有着特异的结合位点^[6], 但这些结合位点并不总是存在, 因此细胞受伤的另一个作用就是农杆菌“提供”结合位点, 农杆菌感染植物细胞时细胞受伤是必须的^[1, 10], 其原因就在于此。实际上, 受伤细胞除了分泌酚类物质外, 还启动了周围细胞进入细胞分裂周期, 因此有研究指出活跃分裂细胞对农杆菌介导的基因转移更为敏感^[13]。也就是说, 活跃分裂细胞的细胞壁上有着更多的农杆菌结合位点。我们的早期研究表明^[14], 活跃分裂的细胞, 其细胞壁物质分泌、沉积活动也很活跃, 很类似于原生质体细胞壁再生的情况^[15], 因此其细胞壁上也就有着丰富的农杆菌结合位点。这样, 也就解释了为什么原生质体在再生时对农杆菌介导的转化很敏感, 所谓感受态细胞正是这类细胞, 其细胞壁外表面拥有丰富的农杆菌结合位点。

禾谷类植物对农杆菌感染不敏感, 有人认为禾谷类植物细胞无受伤反应^[1], 有人认为是细胞壁上无农杆菌结合位点^[6]。禾谷类植物细胞农杆菌介导基因转化频率低, 也有人认为和基因整合有关, 但这与 DNA 直接转化成功的例子不符, 这一点我们将在研究整合机理时予以讨论。其实, 禾谷类植物是可以被农杆菌转化的, 如水稻^[13]、玉米幼苗^[5], 关键是其重复性如何。近几年, 先后在水稻、玉米离体培养材料上获得很好的重复^[7]。如何理解禾谷类植物基因转化的这些现象, 对植物基因转移技术的发展将是很有意义的。

3.1 受伤反应

禾谷类植物与双子叶植物的不同之处在于: 自然状态下, 前者不能形成大块愈伤组织; 离体培养条件下, 前者的活跃分裂细胞位于愈伤组织内部较致密的“核”中; 受伤反应或愈伤组织诱导形成的较早时期, 前者创伤表面的活跃分裂细胞少得多。

3.2 细胞壁上农杆菌结合位点

禾谷类植物细胞也有, 但由于愈伤组织的结构不同, 这类细胞被包在内部。植物细胞的细胞壁外表面的颗粒状突起和纤丝状物或纤丝状网, 其出现和分布及动态变化与细胞的分

裂、壁物质的沉积等活动有密切关系,新的壁物质的合成、分泌和沉积是农杆菌结合位点形成的基础。我们的结果表明,在一定的离体培养条件下,禾谷类植物细胞的外表面与烟草细胞的外表面无显著差别,均有光滑表面和颗粒-纤丝网状表面,区别在于:①扫描电镜下,多数禾谷类植物愈伤组织表面未坍塌细胞远远少于烟草愈伤组织表面;②禾谷类植物类型II愈伤组织难于获得;③禾谷类植物的白色松软愈伤组织,其外层多为非分生细胞,而分生细胞却因包在愈伤组织块内部未暴露而不能与农杆菌结合。

因此,要提高禾谷类植物细胞的农杆菌介导基因转化频率,就要解决以上问题,实质上是一个问题,即提高农杆菌结合位点丰富的植物细胞的比例,或者说提高感受态细胞的频率。我们的结果表明,正如双子叶植物细胞一样,禾谷类植物的感受态细胞也是可以诱导的,如何提高感受态细胞的频率,进一步的研究正在进行。

参考文献:

- [1] Potrykus I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1991, 42: 205- 225.
- [2] 贾士荣, 曹冬孙. 转基因植物[J]. 植物学通报, 1992, 9(2): 3- 15.
- [3] Songstad D D, Somers D A, Griesbach R J. Advances in alternative DNA delivery techniques[J]. Plan Cell, Tiss Org Cult, 1995, 40: 1- 5.
- [4] Zhang W, Wu R. Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants[J]. Theor Appl Genet, 1988, 76: 835- 840.
- [5] Cocking E C, Davey M R. Gene transfer in cereals[J]. Science, 1987, 236: 1259- 1262.
- [6] Hooykaas P J J, Schilperoort R A. The molecular genetics of crown gall tumorigenesis[J]. Advances in Genetics, 1984, 22: 209- 283.
- [7] Ishida Y, Saito H, Ohta S, et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Nature Biotech, 1996, 14: 745- 750.
- [8] 郭晓才, 吴伯骥, 蒋辉, 等. 离体培养植物细胞的表面与细胞粘连[J]. 应用与环境生物学报, 1996, 2(2): 109- 114.
- [9] Sheng J, Citovsky V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel[J]. Plant Cell, 1996, 8: 1699- 1700.
- [10] Stachel S E, Messens E, Van Montagu M, et al. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Nature, 1985, 318: 624- 629.
- [11] Lichtenstein C. A bizarre vegetal bestiality[J]. Nature, 1986, 322: 682- 683.
- [12] Fullner K J, Lara J C, Nester E W. Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes[J]. Science, 1996, 273: 1107- 1109.
- [13] Gheysen G, Angenon G, Van Montagu M. Transgenic plants: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and its use for crop improvement[A]. Murray J A H. Transgenesis[M]. John Wiley and Sons, Chichester. 1992, 187- 232.
- [14] 郭晓才, 蒋辉, 吴伯骥, 等. 离体培养细胞表面的扫描电镜观察[J]. 华北农学报, 1996, 11(1): 36- 43.
- [15] Burgess J, Linstead P J. Scanning electron microscopy of cell wall formation around isolated plant protoplasts

[J]. *Planta*, 1976, 131: 173– 178.

Relationship Between the Outer Surfaces of Plant Cells Cultured *in vitro* and the Frequencies of Transformation *Agrobacterium*-mediated

GUO Xiao-cai

(Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Science, Chengdu 610041, China)

Abstract: The outer surfaces of plant cells from tobacco (*Nicotiana tabacum*), maize (*Zea mays*), and rye (*Secale cereale*) cultured *in vitro* have been studied using scanning electron microscopy (SEM). The outer surfaces of cell wall (OSCW) of the cells from tobacco subcultures are smooth, and most of the cells are collapsed or crinkled after specimen prepared for SEM. In contrast, there are many protuberances or beads and/or fibres or meshwork on OSCW of the tobacco cells treated for *Agrobacterium*-mediated transformation. Bacteria crowd on the granulated surfaces of the tobacco cells, but little on the smooth surfaces. The same as tobacco cells, OSCW are granulated for the cells from pale yellow, soft and friable and fast grown embryogenic calluses of rye and from the pale yellow calluses of maize. OSCW are smooth for the cells from white and soft calluses of maize, and only a few cells haven't been collapsed in these calluses. The relationship between *Agrobacterium* attachment sites, which could be induced, on the cell wall surfaces, and the frequencies of genetic transformation mediated by *Agrobacterium* were discussed.

Key words: Culture *in vitro*; Outer surfaces of cell wall; *Agrobacterium*-mediated; Frequencies of transformation