

## 影响 T-DNA 转移的寄主植物细胞因子

赵文锋 杨清\* 陈敏

南京农业大学生命科学学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095

### Host Cell Factors Influencing the Transfer of T-DNA to Plant

ZHAO Wen-Feng, YANG Qing\*, CHEN Min

National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

**提要** 在农杆菌介导的植物遗传转化过程中, 寄主细胞因子参与农杆菌细胞与寄主细胞的识别与附着、毒性基因的表达以及 T-DNA 的跨膜运输和整合等过程。文章就这几方面的研究进展进行了综述。

**关键词** 植物遗传转化; 寄主细胞因子; T-DNA

在目前不同的植物基因转化方法中, 农杆菌介导的转化方法具有简单易行、无需昂贵设备、费用低、转化频率较高且拷贝数少等优点而被广泛地使用, 特别是在双子叶植物上, 获得了很大的成功。

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 及相关的种, 如发根农杆菌 (*A. rhizogenes*)、农杆菌葡萄瘤菌 (*A. vitis*) 等是迄今为止发现的唯一能将自身遗传物质转移, 并稳定整合到寄主细胞染色体的一类植物病原菌, T-DNA 在这一转移整合过程中起关键性作用。由于 T-DNA 与寄主细胞染色体可以非同源重组, 所以将 T-DNA 整合到寄主细胞, 即可改变寄主细胞的遗传基础, 改变寄主的性状。

Tzfira和Citovsky<sup>[1]</sup>将农杆菌的转化过程分为7步: (1) 农杆菌与寄主细胞的识别与附着; (2) 农杆菌对植物信号的感受; (3) 毒性基因的激活; (4) 可移动 T-DNA 复合体形成; (5) T-DNA 从细菌细胞输出; (6) T-DNA 导入植物细胞核; (7) T-DNA 整合到寄主基因组。农杆菌基因组 DNA 及 Ti 质粒编码的与转移整合相关的蛋白质研究已比较清楚: 由细菌基因组基因 *Chv A*、*Chv B*、*psc A*、*att R* 等编码的蛋白参与识别寄主细胞, Ti 质粒编码的毒性蛋白 *Vir A*、*Vir G* 对植物信号作出反应, 激活其它一系列毒性基因表达; 在这些毒性蛋白中, *Vir D2*、*Vir D1*、*Vir E* 参与形成 T-转移复合体 (T-transfer complex), 而 *Vir D4* 及 *Vir B* 系列的蛋白质组装成毒性菌毛, 毒性菌毛与寄主细胞接触后打开 T-复合体转移通道, T-DNA 复合体跨过膜转移到寄主细胞, 在 *Vir D2* 与 *Vir E2* 的协助下, T-DNA 进入核内整合到寄主细胞染色体组上。

在上述转化过程中, 不同植物种对农杆菌感染的敏感性差异很大, 同一个种内不同的栽培品种或生态型也常表现出巨大差异<sup>[2]</sup>。尽管转化频率差异可能是环境或生理因素造成的, 但在许多植物种中, 遗传背景差异对农杆菌转化频率的影响非常明显。越来越多的研究表明寄主细胞因子影响着农杆菌转化的整个过程。本文从细菌细胞与寄主细胞的识别与附着、毒性基因的诱导与表达、T-复合体运输及 T-DNA 整合几个过程, 对影响转化的寄主细胞因子的研究进展作一评述。

#### 1 类玻连蛋白、RBP 及 AGP 与细菌的粘附

农杆菌识别并附着到寄主细胞是侵染早期必经过程。在此阶段, 酚类与糖类物质诱导农杆菌细胞趋化性, 从而引导农杆菌向植物受伤组织聚集。农杆菌与植物细胞粘附过程分两步: 首先, 由细菌 *att R* 位点合成的乙酰化酸性荚膜多糖介导的粘附; 然后, 细菌合成的纤维素丝将细菌细胞束缚在植物细胞表面。细菌与植物细胞的附着具有饱和性, 这种附着可能与植物细胞表面的一类对蛋白酶敏感的分子有关, 如类玻连蛋白 (vitronectin-like protein)、粘附素结合蛋白 RBP (rhicadhesin-binding protein) 及糖蛋白 AGP (arabinogalactanprotein) 等<sup>[2]</sup>。

类玻连蛋白属于玻连蛋白家族 (vitronectin protein family)。在动物细胞内, 玻连蛋白存在于胞外基质中, 许多细菌用之为特异受体与细胞发生

收稿 2003-12-24 修定 2004-05-20

资助 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室研究基金。

\* 通讯作者 (E-mail: qyang19@njau.edu.cn, Tel: 025-84395221)。

作用。而植物细胞中, 有与玻连蛋白类似的分子, 可能影响农杆菌与植物细胞的粘附<sup>[3]</sup>。Wagner 和 Matthyse<sup>[4]</sup>在共培养体系中加入人体细胞玻连蛋白会大大降低农杆菌与胡萝卜细胞的结合效率, 用去垢剂抽提胡萝卜悬浮细胞表面蛋白进行分析的结果显示抽提物中存在类玻连蛋白分子; 在体外试验中, 农杆菌可与放射性标记的玻连蛋白结合, 而不能与玻连蛋白结合的农杆菌突变株与植物细胞的结合能力明显降低。这些结果表明农杆菌可能利用植物细胞表面类玻连蛋白作为与寄主细胞结合的受体。

RBP 是一种粘附素结合蛋白。Swart 等<sup>[5]</sup>从豌豆根细胞壁上纯化出 RBP 蛋白。研究发现, 由农杆菌编码的粘附蛋白(adhesion protein)可与 RBP 特异性结合, 这种结合可促进农杆菌与寄主细胞的附着作用。

Nam 等<sup>[6]</sup>以不同拟南芥 T-DNA 插入突变株 *rats*(resistant to *Agrobacterium* transformation)为材料, 研究 *GUS* 基因的瞬时表达。其中, *rat1* 突变株中不能检测到 *GUS* 活性, 对这一突变株进行分析时发现是由于 T-DNA 插入阿拉伯半乳糖糖蛋白(AGP)基因引起的突变。AGP 能分泌到胞外, 用一种与 AGP 特异性结合试剂  $\beta$ -glucosyl Yariv 处理野生型拟南芥根切段, 再与农杆菌共培养, 则转化被阻断; 若用不与 AGP 结合的 mannitol Yariv ( $\beta$ -glucosyl Yariv 的类似物)处理, 则不影响转化; 检测根切段与农杆菌结合能力的结果表明 *rat1* 与农杆菌 C58 的结合明显低于野生型。这些结果表明 AGP 影响农杆菌与寄主细胞的结合。

Nam 等<sup>[7]</sup>用 *GUS* 基因检测 2 个抗农杆菌转化的拟南芥生态型(B1-1和Petergof)时, 发现在转化早期被阻断, 这 2 个生态型根的切段与农杆菌结合能力明显低于其它生态型。推测这 2 种生态型也是由于不能被农杆菌正确识别与附着而导致转化失败, 但具体起作用的细胞因子还不明确。

## 2 酚类及糖类物质与毒性基因的表达

T-DNA 的转移是由农杆菌细胞接受受伤的植物细胞中酚类或糖类物质等信号而启动的。这些物质包括由植物合成的植保素及木质素等, 它们作为农杆菌毒性基因的诱导物, 诱导 *Vir* 基因的表达。

植物细胞的酚类与糖类代谢物诱导毒性基因的表达通过两种不同途径进行。植物伤口产生的酚类物质, 如黄酮类前体等都可作为信号分子, 其中对乙酰丁香酮的研究最为清楚。乙酰丁香酮是单环酚类分子, 它首先与农杆菌染色体编码的

P10、P21 蛋白结合, 引起跨膜传感蛋白 Vir A 磷酸化, 这种磷酸化不稳定, 随后转移磷酸基团到 Vir G 的天冬氨酸残基上, 磷酸化的 Vir G 可作为一种转录调节因子激活其它 *Vir* 基因表达<sup>[8,9]</sup>。不同酚类对不同菌株的诱导效应不一样, 如 KU12 菌株的毒性基因可被 4-羟基苯乙酮、苯酚激活, 然而这些酚类对 A6 菌株毒性基因的诱导效应极微弱<sup>[10]</sup>。

寄主植物细胞的糖类代谢物质, 如受伤组织中的葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、岩藻糖、木糖等, 可以作为农杆菌毒性基因表达的信号分子。Cangelosi 等<sup>[11]</sup>发现, 在无乙酰丁香酮或低浓度的乙酰丁香酮下, 这些单糖强烈诱导毒性基因的表达; 而且糖类的诱导与乙酰丁香酮有协同效应, 在低浓度的乙酰丁香酮( $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )时, 这些单糖可以将毒性基因的表达量提高 60~200 倍; 除单糖具有诱导作用外, 含葡萄糖残基的二糖(如纤维二糖)也能促进毒性基因的表达。

糖类诱导毒性基因表达时首先与农杆菌染色体基因编码的半乳糖/葡萄糖结合蛋白(galactose/glucose-binding protein)Chv E 结合, 再将这一信息传给 Vir A, 随着 Vir A、Vir G 依次磷酸化, 激活 *Vir* 基因表达<sup>[11]</sup>。Peng 等<sup>[10]</sup>发现糖类诱导 Chv E 的大量表达可引起毒性基因高水平表达, 扩大农杆菌的寄主识别范围。

许多植物细胞的分泌物也可作为农杆菌感受机制的阻遏因子, 从而导致某些植物种对农杆菌侵染的抗性。Zhang 等<sup>[12]</sup>发现玉米幼苗根部的主要分泌物 MDIB0A(2-hydroxy-4, 7-dimethoxy-benzoxazin-3-one)能够抑制毒性基因的表达。这一抑制机制目前尚不清楚, 但可依此推断对农杆菌转化具有抗性的植物种可能都分泌这种类似物。

## 3 核脱辅酶素类、亲环素类蛋白及某些磷酸酶与 T-复合体的入核运输

许多证据表明, T-复合体的 2 种蛋白质 Vir D2 和 Vir E2 可介导 T-复合体入核运输。Vir D2 有 2 个核定位信号(nuclear localization signals NLS)<sup>[13]</sup>, 分别位于肽链的 2 个末端; 而 Vir E2 分子的中部序列介导 T-DNA 与核膜的结合及入核运输<sup>[14]</sup>, 这种核输入可被 Vir D2 与 Vir E2 专一性抑制剂阻断<sup>[15]</sup>。胭脂碱型农杆菌 Vir E2 的核定位具有植物特异性, 在动物和酵母中不具定位作用<sup>[14,16,17]</sup>, 而章鱼碱型农杆菌 Vir E2 在体外可进入动物细胞核<sup>[18]</sup>。

Vir D2 与 Vir E2 介导 T-DNA 入核运输离不开寄主细胞因子的协助。Deng 等<sup>[19]</sup>在拟南芥中发现亲环素蛋白 Roc A、Roc 4 及 Cyp A 可与 Vir D2 发

生作用, 环孢菌素可抑制 Vir D2 与 Cyp A 的结合, 从而阻断农杆菌在拟南芥与烟草上的致癌作用; 在这类亲环素蛋白中很多都具有肽基脯氨酸异构酶的活性, 是一种分子伴侣, 在 T-DNA 入核运输过程中, Roc A、Roc 4 及 Cyp A 可能维持了 T-复合体的正确构象。

Ballas 和 Citovsky<sup>[20]</sup>发现, 介导核输入的核脱辅酶素 a 家族蛋白 AtKAPa 与酵母及动物的 NLS 结合蛋白具有同源性, 此家族的蛋白能介导含有 NLS 区域的蛋白质向核内运输。AtKAPa 可促进荧光标记的 Vir D2 在渗透性酵母细胞核内的积累, 在体内与体外都能与 Vir D2 特异结合, 这种结合依赖于分布在 Vir D2 两边的 NLS, 单个 NLS 末端无法与 AtKAPa 结合。在农杆菌侵染的过程中 AtKAPa 识别 Vir D2, 并推动 T-复合体的入核运输。Zhu 等<sup>[21]</sup>从拟南芥的 T-DNA 插入突变库 (libraries of T-DNA insertion mutants) 中发现另外 2 种核脱辅酶素类蛋白 importin-a7 和 importin-b3 也与 T-复合体的入核运输有关, 编码这 2 个蛋白的基因插入突变后都产生 *rat* 表型, 这些蛋白可能与 T-复合体正确的核定位有关。

Vir E2 不与 AtKAPa 作用, 但可与拟南芥的另外 2 个蛋白 VIP1 和 VIP2 作用。遗传鉴定与聚焦显微分析入核运输时发现, 在酵母中表达 VIP1 可导致胭脂碱型农杆菌 Vir E2 的入核运输; 而且在动物细胞内 VIP1 也可促进 GFP-Vir E2 的入核运输; 采用转基因手段研究 VIP1 在 T-复合体的入核运输中作用的结果表明, 反义抑制 VIP1 表达可大大降低农杆菌的致癌性, 同时还发现抑制 VIP1 表达会阻遏 GUS-Vir E2 融合蛋白的入核运输, 而 GUS-Vir D2 的入核运输却不受影响<sup>[17, 22]</sup>。体外实验证明, VIP1 不与单链 DNA 结合, 但可与 Vir E2-ssDNA 复合体结合, 形成 VIP1-Vir E2-ssDNA 三元复合体<sup>[23]</sup>。VIP1 具有亮氨酸拉链结构, 与动物和酵母中的蛋白没有同源性, 可见 VIP1 是一种与 Vir E2 蛋白入核运输相关的植物特异性蛋白<sup>[22]</sup>。由于 VIP1 自身能够定位到动物、酵母及植物细胞核, 因而有人认为 VIP1 通过一种“肩负机制” (piggy back mechanism) 引导 Vir E2 的核定位过程。在此过程中, VIP1 可能也与核脱辅酶素  $\alpha$  家族蛋白如 AtKAPa 相互作用, VIP1 在 Vir E2 的入核运输过程中起到一种转接器的功能<sup>[23, 24]</sup>。VIP2 也与 Vir E2 结合, 这结合与 T-复合体定位和寄主细胞染色质结构的变化有关。VIP2 C 端序列类似于果蝇的 Rga 蛋白, 在酵母双杂交系统中 VIP2 不仅与

Vir E2 作用, 也与 VIP1 作用, 因此 VIP1、VIP2 和 Vir E2 形成多蛋白复合体而行使双重功能: 首先使 Vir E2 的核定位更容易, 其次参加 Vir E2 在核内的运输, 并连接到核染色体的疏松区域, 使 T-复合体到达整合位点<sup>[1, 22]</sup>。

Meyer 等<sup>[25]</sup>用农杆菌侵染拟南芥 *abi1* 突变株, 发现该突变株的转化率比野生型祖先高 2~4 倍, 而转化率的增高与突变基因 *abi1* 编码的 2C 型丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 (type 2C serine/threonine protein phosphatase, PP2C) 类似物丧失蛋白磷酸酶活性有关。这表明 PP2C 影响农杆菌转化。在烟草上的研究发现, PP2C 基因在烟草 BY2 原生质体中过度表达可阻遏 GUS-VirD2 融合蛋白在核内的积累, 暗示 PP2C 在核输送过程中有负调控效应; 这种负调控效应与 Vir D2 两边的 NLS 区丝氨酸残基磷酸化有关, 不论在体外还是在 BY2 细胞中, 磷酸化丝氨酸残基对核定位都很重要, 在没有 PP2C 蛋白表达情况下, 丝氨酸被丙氨酸替代后也使 GUS-Vir D2 融合蛋白的入核运输受阻, 可见 Vir D2 NLS 区丝氨酸残基的磷酸化促进了 Vir D2 的入核运输, 而由 PP2C 引起的脱磷酸化抑制入核运输<sup>[2]</sup>。此外, 一种小分子 GTPase Ran 也与入核运输有关, 因为不可水解的 GTP 类似物抑制了 Ran 的入核运输, 同时也阻断了 Vir D2 与 Vir E2 的入核运输<sup>[26]</sup>。

#### 4 DNA 复制与转录因子、组蛋白及损伤修复因子影响 T-DNA 整合

对很多种或生态型的植物来讲, T-DNA 的整合是农杆菌转化的限制步骤。T-DNA 都是以单链形式进入寄主细胞核, 寄主细胞 DNA 聚合酶可能参与单链 T-DNA 转变为双链的过程。此外, 在整合过程中涉及到 DNA 的断裂与连接, Vir D2 在整合的过程中起作用, 但它不具有连接酶活性, 因此, 在 T-DNA 的连接过程中必然有寄主细胞连接酶的参与<sup>[27, 28]</sup>。

Van Attikum 等<sup>[29]</sup>用农杆菌侵染拟南芥的 *AtLIG4*<sup>-/-</sup> (*AtLIG4* 是酵母与哺乳动物 DNA 连接酶 IV 的直系同源基因) 植株和野生型植株, 发现转化率没有差异, 表明 *AtLIG4* 连接酶对 T-DNA 整合没有影响, 而是其它连接酶参与 T-DNA 整合过程。Villemont 等<sup>[30]</sup>用细胞周期特异性阻碍剂研究细胞分裂不同时期 T-DNA 的整合, 发现 T-DNA 整合首先发生在植物细胞分裂的 S 期。这表明 DNA 复制可能是 T-DNA 整合的前提条件。由于复制中会产生 DNA 损伤, 所以在损伤修复过程中

可能伴随着T-DNA整合。连接酶I在DNA损伤修复中起作用,因而推断DNA连接酶I与T-DNA的整合有关。

Van Attikum等<sup>[31]</sup>还发现酵母中非同源末端连接基因RAD50、MRE11、XRS2、YKU70及LTG4与T-DNA整合有关。在植物中,也发现RAD50、MRE11、YKU70的直系同源基因,当在这些基因中插入T-DNA后,即表现出*rat*表型<sup>[32~35]</sup>。

寄主细胞内转录相关因子也与T-DNA整合有关。拟南芥*rat17*突变株是类Myb转录因子(Myb-like transcription factor)基因的T-DNA插入突变,由于T-DNA的插入导致该基因不能正常表达。但类Myb转录因子是否直接与T-DNA整合有关,或者是与其它一些编码与整合相关的蛋白基因转录有关,目前还不清楚<sup>[2, 7]</sup>。

T-DNA整合涉及DNA的重组与修复,所以植物在重组修复中有缺失,则T-DNA整合也会有缺失,这类突变体对DNA变性因子(如UV、 $\gamma$ -射线及博来霉素等)敏感<sup>[36]</sup>。Sonti等<sup>[37]</sup>研究对辐射高度敏感的拟南芥突变株的农杆菌转化响应时,发现*uvh1*与*rad5*两突变株不能形成冠瘿瘤,也不表现Kan<sup>r</sup>;用携有GUS基因的T-DNA转化这些植株后,可检测到GUS活性的瞬间表达,因此认为这些突变体在T-DNA整合中有缺失。Nam等<sup>[38]</sup>重新检测*uvh1*的结果表明,虽然根切段对农杆菌侵染表现抗性,但用花的真空渗入法进行转化时,发现*uvh1*的转化率与野生型一样。推测这两种不同组织细胞中都有不同的细胞因子参与T-DNA整合过程,在花器官细胞中,T-DNA可以通过与根部细胞中不同的整合途径整合到寄主细胞染色体中。除了对辐射高度敏感的*rad5*和*uvh1*突变株外,Nam等<sup>[6]</sup>还检测到一种对辐射稍敏感的拟南芥生态型UE-1对农杆菌也有抗性。分析瞬间GUS活性与稳定GUS活性表明,在生态型UE-1中瞬间GUS活性强度比高转化生态型Aa-0高出2倍,而GUS活性的稳定表达明显比Aa-0低。可见,UE-1植株抑制T-DNA的整合。

组蛋白影响寄主细胞染色体结构,因而与T-DNA整合相关。Nam等<sup>[6]</sup>发现拟南芥*rat5*突变株有2个T-DNA顺接拷贝插入到组蛋白H2A基因3'非翻译区,H2A基因在拟南芥中是一个多基因家族,至少由6个H2A基因组成,编码的蛋白质具有90%以上的同源性,T-DNA的插入影响其中一个基因(*H2A-1*)的表达,说明*H2A-1*基因的表达影响T-DNA整合<sup>[6, 39]</sup>。用纯合*rat5*突变株与野生

型Ws植株杂交,突变株的表型表现为显性,杂合后代细胞中能检测到*H2A-1*基因表达,但表达量比野生型低;将*H2A-1*基因插入农杆菌的T-DNA区并侵染*rat5*突变株的根切段,可以检测到*H2A-1*基因的瞬间表达,同时可以获得稳定转化植株;预先用植物激素处理野生型拟南芥根切段,*H2A-1*基因的表达量增加后,可提高农杆菌的转化效率。这些结果表明*rat5*突变株抗农杆菌转化的表型具有剂量效应,只有H2A-1蛋白表达量降到农杆菌转化所需量之下后,植株才表现出抗转化表型<sup>[39]</sup>。组蛋白H2A-1影响T-DNA整合的分子机制还不清楚,推测该蛋白可能改变寄主细胞染色体上T-DNA定位区的染色质结构,导致T-DNA不能准确定位,使T-DNA的整合受阻<sup>[6, 39]</sup>。

虽然采用根段共培养方法很难获得*rat5*突变株的稳定转化,但Mysore等<sup>[40]</sup>用真空渗入法转化*rat5*突变株的花蕊,获得稳定转化植株,转化效率与对照没有差异。他们认为一些对转化所必需的因子出现在雌配子体中,而在体细胞组织中却没有这些整合相关因子,可能T-DNA整合在体细胞和雌配子体中是通过不同的途径完成。

Zhu等<sup>[21]</sup>从拟南芥的T-DNA插入突变库中鉴定了2类T-DNA整合有缺陷的*rat*突变。一类是中心组蛋白的插入突变,包括5个H2A组蛋白基因、2个H2B组蛋白基因、2个H3组蛋白基因以及2个H4组蛋白基因。另一类是染色质修饰基因的插入突变,包括4个组蛋白脱乙酰基酶基因、5个组蛋白乙酰基转移酶基因和3种其它染色质修饰蛋白基因。在这些突变株中报告基因的瞬间表达正常,但很难获得稳定表达的转化植株。

T-DNA是以核蛋白复合体形式被定位到寄主细胞染色体的,在整合前需降解某些与T-DNA结合的蛋白质,寄主细胞Ask蛋白以及农杆菌毒性蛋白Vir F协同作用,可促进T-复合体中蛋白质降解<sup>[41, 42]</sup>。Vir F由农杆菌毒性基因编码,可通过农杆菌的转运系统输送到寄主细胞,其F-box区与寄主细胞蛋白Ask1、Ask2和Ask10结合,Ask蛋白再与植物细胞中的cullin结合,形成一种具有蛋白水解酶活性的复合体。推测这种蛋白水解酶的底物是VIP1,因为在体外酵母双杂体系中,Vir F可与VIP1特异结合<sup>[42]</sup>。在核内T-复合体蛋白的水解部位发现Vir F-Ask1-cullin复合体的成份,这支持了水解底物是VIP1的推测<sup>[43]</sup>。有些植物种在农杆菌侵染过程中无需Vir F蛋白参与,在这些植物的T-DNA整合过程中,T-复合体蛋白

的水解可能由植物内源F-box蛋白协助完成<sup>[24]</sup>。

不同的组织对T-DNA在染色体组上的整合范围与方式有差异。Grevelding等<sup>[44]</sup>报道,以拟南芥根进行转化时,T-DNA的插入是单拷贝的;而若以叶片为转化材料,T-DNA的插入是多拷贝。可见,在不同植物的组织细胞中有不同的因子影响T-DNA插入的拷贝数,这种影响可能发生在整合过程中。

### 5 与农杆菌转化相关的其它寄主细胞因子

农杆菌侵染影响寄主细胞内基因的表达模式。Ditt等<sup>[45]</sup>用cDNA-AFLP技术发现农杆菌的侵染可特异性诱导4个基因的表达,其中2个是类结瘤素蛋白(nodulin-like protein)和类凝集素蛋白激酶(lectin-like protein kinase)。前者是一种诱导产生根瘤的蛋白,它影响细胞的分裂与分化<sup>[46]</sup>;而后者对寡糖信号作出反应执行细胞识别功能<sup>[47]</sup>。这些基因由于农杆菌侵染而诱导表达,可能与T-DNA的转移有关。

Kandasamy等<sup>[48]</sup>发现根部组织细胞的2类肌动蛋白(actin-2和actin-7)基因和驱动蛋白(kinesin)基因的插入突变也导致对农杆菌转化的抗性。Vir D2与Vir E2能在体外与聚合的肌动蛋白发生作用,表明植物细胞骨架在农杆菌转化过程中起作用,可能是帮助T-复合体在细胞质中的转运。

Zhu等<sup>[21]</sup>分析大量*rat*突变株,发现*rat 4*突变株是由于T-DNA插入类纤维素合酶基因(cellulose synthase-like gene)*Cs1A-09*而抑制其表达,这种突变株表现为侧根数量减少;一些涉及信号转导的基因,如类似受体的蛋白激酶(receptor-like protein kinase)基因(*rat T8*与*rat T9*)和2A型磷酸蛋白磷酸酶(type 2A phosphoprotein phosphatase)基因的插入突变,在农杆菌转化实验中也表现*rat*表型;还有许多*rat*突变株是由于T-DNA插入与基因表达过程和蛋白功能相关的基因而造成,这些因子在T-DNA转移过程中的作用还不清楚。

### 6 结束语

农杆菌介导植物遗传转化一直是植物基因工程领域的研究热点,细菌细胞因子在转化过程中的功能与机制已经基本明确,但对影响转化的寄主植物细胞因子的研究则相对落后。许多问题需要研究,如Vir D4-Vir B转移通道是否与特异的寄主细胞膜上的受体相互作用,T-复合体如何识别整合位点并整合到染色体,降解T-复合体中蛋白质的过程中有哪些寄主细胞因子参与了作用等。深入研究寄主细胞因子可以帮助人们在实践中控制

转化各个阶段,提高转化效率,从而推动植物基因工程的发展,并广泛应用于有关的理论研究与生产实践。

### 参考文献

- 1 Tzfira T, Citovsky V. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Mol Plant Pathol*, 2000, 1: 201~212
- 2 Gelvin SB. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, 51:223~256
- 3 Paulsson M, Wadstrom T. Vitronectin and type-I collagen binding by *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative streptococci. *FEMS Microbiol Immunol*, 1990, 65: 55~62
- 4 Wagner VT, Matthyse AG. Involvement of vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells. *J Bacteriol*, 1992, 174:5999~6003
- 5 Swart S, Logman TJJ, Smit Get al. Purification and partial characterization of a glycoprotein from pea (*Pisum sativum*) with receptor activity for rhicadhesin an attachment protein of *Rhizobiaceae*. *Plant Mol Biol*, 1994, 24: 171~183
- 6 Nam J, Mysore KS, Zheng C et al. Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*. *Mol Gen Genet*, 1999, 261:429~438
- 7 Nam J, Matthyse AG, Gelvin SB. Difference in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. *Plant Cell*, 1997, 9: 317~333
- 8 Stachel SE, Messens E, Van Montagu M et al. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cell that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 1986, 318:624~629
- 9 Jin SG, Roitsch T, Ankenbauer RG et al. The Vir A protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphorylated and is essential for Vir gene regulation. *J Bacteriol*, 1990, 172:525~530
- 10 Peng WT, Lee YM, Nester EW. The phenolic recognition profiles of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein are broadened by a high level of the sugar binding protein Chv E. *J Bacteriol*, 1998, 180:5632~5638
- 11 Cangelosi GA, Ankenbauer RG, Nester EW. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:6708~6712
- 12 Zhang J, Boone L, Kocz R et al. At the maize/*Agrobacterium* interface: natural factors limiting host transformation. *Chem Biol*, 2000, 7: 611~621
- 13 Howard EA, Citovsky V. The emerging structure of the *Agrobacterium* T-DNA transfer complex. *Bioessays*, 1990, 12: 103~108
- 14 Citovsky V, Warnick D, Zambryski P. Nuclear import of *Agrobacterium* Vir D2 and Vir E2 proteins in maize and tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:3210~3214
- 15 Zupan J, Citovsky V, Zambryski P. *Agrobacterium* Vir E2 protein mediates nuclear uptake of ssDNA in plant cells. *Proc Natl*

- Acad Sci USA, 1996, 3:2392~2397
- 16 Citovsky V, Zupan J, Warnick D et al. Nuclear localization of *Agrobacterium* Vir E2 protein in plant cell. *Science*, 1992, 256: 1803~1805
- 17 Rhee Y, Gurel F, Gafui Y et al. A genetic system for detection of protein nuclear import and export. *Nature Biotechnol*, 2000, 18: 433~437
- 18 Ziemienowicz A, Gorlich D, Lanka E et al. Import of DNA into mammalian nuclei by proteins originating from a plant pathogenic bacterium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:3729~3733
- 19 Deng W, Chen L, Wood DW et al. *Agrobacterium* Vir D2 protein interacts with plant host cyclophilins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:7040~7045
- 20 Ballas N, Citovsky V. Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 10723~10728
- 21 Zhu Y, Nam J, Humara JM et al. Identification of *Arabidopsis* *rat* mutants. *Plant Physiol*, 2003, 132:494~505
- 22 Tzifira T, Citovsky V. VIP1, an *Arabidopsis* protein that interacts with *Agrobacterium* Vir E2, is involved in Vir E2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity. *EMBO J*, 2001, 20: 3596~3607
- 23 Doyle VW, John R, Zupan et al. *Agrobacterium* Vir E2 gets the VIP1 treatment in plant nuclear import. *Trends Plant Sci*, 2002, 7:1~3
- 24 Tzifira G, Citovsky V. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol*, 2002, 12:121~129
- 25 Meyer K, Leube MP, Grill E. A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 1994, 264:1452~1455
- 26 Ziemienowicz A, Merkle T, Schoumacher F et al. Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of Vir D2 and Vir E2 proteins. *Plant Cell*, 2001, 13:369~384
- 27 Ziemienowicz A, Tinland B, Bryant J et al. Plant enzymes but not *Agrobacterium* Vir D2 mediate T-DNA ligation *in vitro*. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 6317~6322
- 28 Bravo-Angel AM, Gloeckler V, Hohn B et al. Bacterial conjugation protein MobA mediates integration of complex DNA structures into plant cell. *J Bacteriol*, 1999, 181: 5758~5765
- 29 Van Attikum H, Bundock P, René M et al. The *Arabidopsis* *AtLIG4* gene is required for the repair of DNA damage but not for the integration of *Agrobacterium* T-DNA. *Nucl Acids Res*, 2003, 31:4247~4255
- 30 Villemont E, Dubois F, Sangwan RS et al. Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium* mediated genetic transformation of petunia: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta*, 1997, 201:160~172
- 31 Van Attikum H, Bundock B, Hooykaas PJJ. Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. *EMBO J*, 2001, 20: 6550~6558
- 32 Bundock P, Hooykaas PJJ. Severe development defects hypersensitivity to DNA-damaging agents and lengthened telomeres in *Arabidopsis* MREII mutants. *Plant Cell*, 2002, 14: 2451~2462
- 33 Bundock P, Van Attikum H, Hooykaas PJJ. Increased telomere length and hypersensitivity to DNA damaging agents in an *Arabidopsis* KU70 mutants. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 3395~3400
- 34 Riha K, Watson JM, Parkey J et al. Telomere length deregulation and enhanced sensitivity to genotoxic stress in *Arabidopsis* mutants deficient in KU70. *EMBO J*, 2002, 21: 2819~2826
- 35 Gallego ME, White CI. RAD50 function is essential for telomere maintenance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 1711~1716
- 36 Jiang CZ, Yen CN, Cronin K et al. UV- and gamma-radiation sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genet*, 1997, 147: 1401~1409
- 37 Sonti RV, Chiruzzo M, Wong D et al. *Arabidopsis* mutants deficient in T-DNA integration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 11786~11790
- 38 Nam J, Mysore KS, Gelvin SB. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of the radiation hypersensitive *Arabidopsis thaliana* mutants *uvh1* and *rad5*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1998, 11: 1136~1141
- 39 Yi H, Mysore KS, Gelvin SB et al. Expression of the *Arabidopsis* histone H2A-1 gene correlates with susceptibility to *Agrobacterium* transformation. *Plant J*, 2002, 32:285~298
- 40 Mysore KS, Kumar CT, Gelvin SB. *Arabidopsis* ecotypes and mutants that are recalcitrant to *Agrobacterium* root transformation are susceptible to germ-line transformation. *Plant J*, 2000, 21:9~16
- 41 Regensburg-Tuink AJ, Hooykaas PJ. Transgenic *N. glauca* plants expressing bacterial virulence gene *Vir F* are converted into hosts for nopaline strains of *A. tumefaciens*. *Nature*, 1993, 363: 69~71
- 42 Schranmeijer B, Risseuw E, Pansegrau W et al. Interaction of the virulence protein Vir F of *Agrobacterium tumefaciens* with plant homologs of the yeast Skp1 protein. *Curr Biol*, 2001, 11: 258~262
- 43 Xiao W, Jang JC. F-box protein in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 2000, 5:454~457
- 44 Grevelding C, Fantes V, Kemper E et al. Single-copy T-DNA insertion in *Arabidopsis* are the predominant form of integration in root-derived transgenics whereas multiple insertions are formed in leaf discs. *Plant Mol Biol*, 1993, 23: 847~860
- 45 Ditt RF, Nester EW, Comai L. Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:10954~10959
- 46 Stougaard J. Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiol*, 2000, 124:531~540
- 47 Herve C, Dabos P, Galaud JP et al. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* gene that defines a new class of putative plant receptor kinases with an extracellular lectin-like domain. *J Mol Biol*, 1996, 258:778~788
- 48 Kandasamy MK, Gilliland LU, McKinney EC et al. One plant actin isoform, ACT, is induced by auxin and required for normal callus formation. *Plant Cell*, 2001, 13: 1541~1554