

根瘤农杆菌 T-DNA 结合蛋白 VirD2 和 VirE2 在水稻中的亚细胞定位研究

颜廷祥, 罗美中*

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要:根瘤农杆菌侵染植物过程中,至少有5种毒性蛋白(Vir)进入宿主细胞发挥作用,而其中VirD2与VirE2的作用最为关键,研究二者在水稻中的亚细胞定位,对农杆菌介导的水稻遗传转化机制的阐明具有重要意义。利用水稻叶鞘原生质体瞬时表达系统,发现3种冠瘿碱型的VirD2均只定位于细胞核中,与在拟南芥中相同;而3种冠瘿碱型的VirE2均主要定位于细胞核中,但在细胞质中仍有较多分布,与在拟南芥中的定位不同。因此,推测不同冠瘿碱型的农杆菌对水稻侵染能力的差异与VirD2和VirE2亚细胞定位的关系不大;同时表明根瘤农杆菌介导的拟南芥及水稻遗传转化机制存在相似性,但也有不同之处。

关键词:水稻;根瘤农杆菌;VirD2;VirE2;原生质体;亚细胞定位;冠瘿碱型

doi:10.3969/j.issn.1008-0864.2012.05.04

中图分类号:S188,S511

文献标识码:A

文章编号:1008-0864(2012)05-0022-06

Subcellular Localization of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA Binding Proteins VirD2 and VirE2 in Rice

YAN Ting-xiang, LUO Mei-zhong*

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract:In the process of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated infection of plants, at least 5 virulence (Vir) proteins play roles by entering the host cells, among which VirD2 and VirE2 are the key factors. Consequently, studying the sub-cellular localization of VirD2 and VirE2 in rice is crucial to understand the mechanism of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated rice genetic transformation. Using the transient expression system of rice sheath protoplasts, we found that the VirD2 proteins of all 3 kinds of opine *Agrobacterium* are completely located in the nucleus, which is the same as in *Arabidopsis*; and the VirE2 proteins of all 3 kinds of opine *Agrobacterium* are mainly located in nucleus, but are also distributed in the cytoplasm, which is different from those in *Arabidopsis*. Therefore, we propose the different efficiency among the 3 kinds of opine *Agrobacterium* strains for rice genetic transformation is not mainly determined by sub-cellular localization of VirD2 and VirE2. In addition, our results demonstrate that the mechanism of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation in rice and *Arabidopsis* share some similarities, but keep some differences.

Key words:rice; *Agrobacterium tumefaciens*; VirD2; VirE2; protoplast; sub-cellular localization; opine type

农杆菌是自然界的遗传工程师,它所介导的植物遗传转化是目前获得转基因植株最普遍且最有效的方法。农杆菌介导的拟南芥遗传转化分子机制已研究的比较清楚,并报道了多种可提高拟南芥转化效率的分子生物学方法^[1,2]。相对于拟

南芥,人们对提高农杆菌介导的水稻遗传转化效率的愿望更加迫切,但是至今鲜有关于农杆菌介导的水稻遗传转化分子机制的研究。目前用于提高水稻遗传转化效率的措施,主要局限于优化愈伤培养转化条件及选择合适的载体和菌株等,效

收稿日期:2012-04-05;接受日期:2012-05-31

基金项目:国家自然科学基金项目(30971748)资助。

作者简介:颜廷祥,硕士研究生,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail:lxz_119@163.com。*通讯作者:罗美中,教授,博士生导师,主要从事植物基因组学和叶绿体功能研究。Tel:027-87284213; E-mail: mzl原因@ mail. hzau. edu. cn

果比较有限,而可大幅提高水稻遗传转化效率的分子生物学方法至今仍无报道。

根瘤农杆菌介导的拟南芥遗传转化分子机制的阐明,最初主要依靠对农杆菌 T-DNA 结合蛋白 VirD2 和 VirE2 的亚细胞定位及其机制研究。VirD2 在拟南芥中完全定位于细胞核中^[3,4],它先被 CAK2Ms 磷酸化,然后通过磷酸酶 PP2C 去磷酸化,并由核转移输入蛋白转运到核中^[3,5~7];VirE2 在拟南芥不同类型的细胞中存在细胞质和细胞核两种完全不同的定位^[3],VirE2 可通过与 VIP1 (VirE2- interacting protein 1) 结合进入细胞核^[8~10],而 VIP1 被 MPK3 磷酸化是进入细胞核的必要条件^[11],所以不同类型细胞中 VirE2 定位的差异,很可能受 VIP1 在这些细胞中的磷酸化状态影响^[3,12]。

目前转基因水稻主要通过农杆菌介导的遗传转化获得,但至今水稻转化尤其是籼稻转化以及大片段 DNA 转化仍存在较大限制,对水稻农杆菌介导的遗传转化机制进行研究有望为解除这些限制提供理论基础。

实践发现不同冠瘿碱型农杆菌对水稻的侵染效率相差较大,考虑到 VirD2 与 VirE2 的核靶向运输在农杆菌介导的植物遗传转化中起到非常关键的作用^[3],推测侵染效率的差异可能是由它们 VirD2 和 VirE2 亚细胞定位的不同造成。据此本文对不同冠瘿碱型农杆菌的 VirD2 和 VirE2 在水稻中的亚细胞定位进行了比较研究,对农杆菌介导的水稻遗传转化机制进行了初步探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 水稻 粳稻品种中花 11 (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica* cv. *Zhonghua11*) 原种,由本室保存,用于提取水稻原生质体。

1.1.2 菌株和载体 大肠杆菌菌株 DH10B,根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 农杆菌型菌株 EHA105 (含有辅助质粒 pTiBo542)、章鱼碱型菌株 LBA4404、胭脂碱型菌株 GV3101 由本室提供,亚细胞定位瞬时表达载体 PM999-GFP、PM999-YFP、PM999-CFP 由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室须健教授提供,PXDR 载

体由湖南农业大学王国梁教授馈赠。

1.2 主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司;ExTaq DNA 聚合酶购自 Takara 公司;水稻原生质体提取及转化试剂 (NaCl、KCl、BSA 等) 购自上海生工生物技术公司;CaCl₂、MgCl₂、D-Mannitol、MES、PEG3350 购自 Sigma 公司。Cellulase R-10 (Yakult) 和 macerozyme R-10 (Yakult) 购自北京鼎国公司。

1.3 方法

1.3.1 3 种冠瘿碱型 VirD2 和 VirE2 基因的克隆以及亚细胞定位瞬时表达载体的构建 分别以 3 种农杆菌 EHA105 (农杆菌型)、LBA4404 (章鱼碱型) 和 GV3101 (胭脂碱型) 的 Ti 质粒为模板进行 PCR 扩增,引物如表 1 所示。PCR 体系为:2 μ L 10 $\times$ ExTaq buffer, 2 μ L dNTP (2 mmol/L), 1 μ L 模板,上下游引物 (10 mmol/L) 各 0.4 μ L, 0.2 μ L ExTaq (5 U/ μ L), 14 μ L ddH₂O。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增出 3 种 VirD2 (*HVD2*、*LVD2*、*CVD2*), 及 3 种 VirE2 (*HVE2*、*LVE2*、*CVE2*) 编码区的全长片段,按照常规方法分别将 3 种 VirD2 克隆到 PM999-YFP, 将 3 种 VirE2 克隆到 PM999-GFP 上。

1.3.2 瞬时亚细胞定位载体的中量提取 使用 QIAGEN 质粒中提试剂盒,按照说明书提取 30 mL 培养过夜的含有亚细胞定位载体的大肠杆菌 DH10B 菌液,最后溶于 150 μ L ddH₂O,使其终浓度大于 0.5 μ g/ μ L,利用凝胶电泳检测其浓度。

1.3.3 水稻中花 11 原生质体的提取 实验步骤参考了王宏斌等^[13]方法,并按照本实验室的实际情况做了改进。将水稻去壳后,以 70% 酒精清洗 2 min,再以 0.5% 氯化汞清洗 15 min,然后种植于 1/2 MS 培养基,28 $^{\circ}$ C 暗培养 8~14 d。取幼苗,把根切下后浸在 0.6 mol/L 甘露醇中,用无菌刀片切成 0.5 mm 的小块,放入 10 mL 酶解液 [2.5% cellulase R-10 (Yakult), 0.75% macerozyme R-10 (Yakult), 0.6 mol/L D-甘露醇, 10 mmol/L MES (pH 5.7)], 55 $^{\circ}$ C 加热 10 min,此时颜色变为深棕色,自然冷却之后再加入 0.1% BSA、10 mmol/L CaCl₂,加 ddH₂O 至 10 mL,于 150 mL 三角瓶中

表 1 本研究所用 PCR 引物
Table 1 PCR primers used in this study.

基因 Gene	模板菌株 Template strain	引物名称 Primer name	序列 Sequence
<i>HVD2</i> (农杆菌型 <i>VirD2</i>)	EHA105	HVD2-F	5'-GACGAATTCGGAGAAAATTGGATGCCCG-3'
		HVD2-R	5'-CAGCCATGGTCTGGTCCCCCGCGCC-3'
<i>LVD2</i> (章鱼碱型 <i>VirD2</i>)	LBA4404	LVD2-F	5'-GACGAATTCGGAGAAAATTGGATGCCCG-3'
		LVD2-R	5'-CAGCCATGGTCTGGTCCCCCGCGCC-3'
<i>CVD2</i> (胭脂碱型 <i>VirD2</i>)	GV3101	CVD2-F	5'-GACGGTACCATGCCGATCGAGCTCAAGT-3'
		CVD2-R	5'-CAGGAGCTCTCTCTATTTCCCCCAGC-3'
<i>HVE2</i> (农杆菌型 <i>VirE2</i>)	EHA105	HVE2-F	5'-GACTCTAGAATGGATCCGTCTAGCAAT-3'
		HVE2-R	5'-CAGTCTAGAGGAACGAAAGCTGTT-3'
<i>LVE2</i> (章鱼碱型 <i>VirE2</i>)	LBA4404	LVE2-F	5'-GACTCTAGAATGGATCTTTCTGGCAAT-3'
		LVE2-R	5'-CAGTCTAGAGGAACGAAAGCTGTTGAC-3'
<i>CVE2</i> (胭脂碱型 <i>VirE2</i>)	GV3101	CVE2-F	5'-GACTCTAGAATGGACCCGAAGGCCGAA-3'
		CVE2-R	5'-CAGTCTAGAACGCAGACTGTTACGGTTGG-3'

注:下划线所示为酶切位点

Note: The restriction enzyme sites were underlined.

28℃、50 r/min避光孵育 4~5 h。孵育结束后加入等体积的 W5 solution [154 mmol/L NaCl, 125 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L KCl 和 2 mmol/L MES (pH 5.7)], 轻轻摇匀使原生质体充分释放。用 150 目不锈钢细胞筛将液体过滤到干净的培养皿中, 再用电动移液器小心转移至 50 mL 圆底离心管中, 4℃、100 g 吊篮离心 8 min 收集原生质体。余少量上清将沉淀轻轻摇散, 小心以 4 mL W5 solution 将原生质体重新冲洗悬浮, 4℃、100 g 吊篮离心 4 min。去上清, 小心地以 4 mL Mmg solution [0.4 mol/L D-甘露醇, 20 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L MES (pH 5.7)] 将原生质体重新冲洗悬浮, 4℃、100 g 吊篮离心 4 min。去上清, 以 2 mL Mmg solution 重新悬浮 (此时取 20 μL 悬浮液做镜检)。

1.3.4 水稻中花 11 原生质体的 PEG 转化 将提取的水稻原生质体冰浴 30 min。23℃、100 g 吊篮离心 2 min, 去上清。用转化数 $N \times 100 \mu\text{L}$ Mmg solution 重新悬浮原生质体, 以备转化。2 mL 离心管中先加入 10 μL 亚细胞定位载体, 以及 10 μL 细胞核指示载体 *Ghd7*-CFP 或 *PXDR-OsH2A* 混匀, 再用剪口枪头吸取 100 μL 悬浮原生质体轻弹混匀, 最后加入 120 μL 40% PEG3350 [0.4 mol/L D-甘露醇, 100 mmol/L CaCl₂, 40% (V/V) PEG3350] 轻弹混匀, 室温孵育 20 min。加入 500 μL W5

solution 混匀终止反应, 23℃、100 g 吊篮离心 2 min。去掉大部分上清, 将沉淀转移至有 1.5 mL W5 solution 的 12 孔板中, 28℃ 暗培养过夜 (16 h 以上)。次日将培养液转移到 2 mL 离心管中 23℃、100 g 吊篮离心 2 min, 去掉大部分上清, 用激光扫描共聚焦显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 3 种冠瘿碱型 *VirE2* 和 *VirD2* 亚细胞定位载体的构建

为了解侵染效率的差异是否由 *VirD2* 以及 *VirE2* 亚细胞定位的不同造成, 将来自于 3 种农杆菌 EHA105、LBA4404 和 GV3101 的 *VirE2* (分别命名为 *HVE2*、*LVE2*、*CVE2*) PCR 产物回收之后, 直接用 *Xba* I 大量酶切, 酶切完全后回收产物, 与 PM999-GFP 载体 (*Xba* I 单酶切, 脱磷) 连接转化大肠杆菌细胞 DH10B。酶切和琼脂糖凝胶电泳结果表明, 3 个 *VirE2* 同源基因片段均已连接到 PM999-GFP 载体上 (图 1 中泳道 1~3), 选取含有目的条带的克隆测序, 选择正向连接载体, 成功构建 3 个 *VirE2*-GFP 载体。

同样, 来自于上述 3 种农杆菌的 *VirD2* (分别命名为 *HVD2*、*LVD2*、*CVD2*) PCR 产物回收之后, 用 *EcoR* I 和 *Nco* I 大量双酶切, 酶切完全后回收

产物,与 PM999-YFP 载体连接后,转化大肠杆菌细胞 DH10B。酶切和琼脂糖凝胶电泳结果表明,3 个 *VirD2* 同源基因片段均已连接到 PM999-YFP 载体上(图 1 中泳道 4~6),3 个 *VirD2*-YFP 载体构建成功。

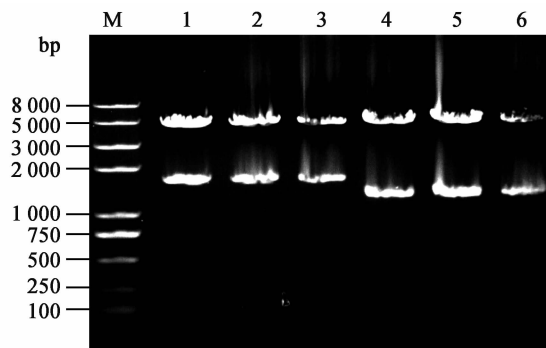


图 1 3 种 *VirE2*-GFP 和 *VirD2*-YFP 载体的酶切检测

Fig. 1 Digestion detection of 3 kinds of *VirE2*-GFP and *VirD2*-YFP constructs.

M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker; 1: *HVE2*-GFP/*Xba* I; 2: *LVE2*-GFP/*Xba* I; 3: *CVE2*-GFP/*Xba* I; 4: *HVD2*-YFP/*EcoR* I + *Nco* I; 5: *LVD2*-YFP/*EcoR* I + *Nco* I; 6: *CVD2*-YFP/*EcoR* I + *Nco* I

2.2 提取超螺旋质粒浓度凝胶电泳检测

当超螺旋质粒浓度大于 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时,水稻原生质体转化效率较高^[14],因此需测定质粒浓度。以已知浓度的 λDNA (图 2 中的 M1、M2、M3)估测中量提取质粒的浓度。中量提取的 6 种质粒均稀释 5 倍后上样 $2 \mu\text{L}$ 。琼脂糖凝胶电泳结果表明,3 种 *VirE2*-GFP(图 2 中泳道 1~3)以及 3 种 *VirD2*-YFP(图 2 中泳道 4~6)的中量提取物中,超螺旋质粒浓度均达到了 $0.6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,符合水稻原生质体转化要求。

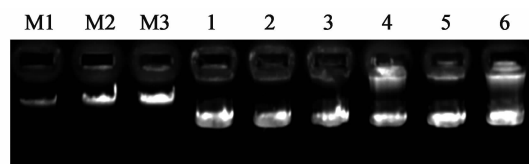


图 2 3 种 *VirE2*-GFP 以及 *VirD2*-YFP 质粒中量提取浓度检测

Fig. 2 Concentration detection of 3 kinds of *VirE2*-GFP and *VirD2*-YFP mid-extracted plasmids.

M1: $60 \text{ ng}/\mu\text{L}$ λDNA ; M2: $120 \text{ ng}/\mu\text{L}$ λDNA ; M3: $240 \text{ ng}/\mu\text{L}$ λDNA ; 1: *HVE2*-GFP; 2: *LVE2*-GFP; 3: *CVE2*-GFP; 4: *HVD2*-YFP; 5: *LVD2*-YFP; 6: *CVD2*-YFP.

2.3 水稻原生质体提取镜检

水稻原生质体的密度以及活力对转化效率影响较大^[15],因此需检测提取水稻原生质体的数量及活力。水稻原生质体提取完成之后冰浴之前,取 $20 \mu\text{L}$ 悬浮液于 $40\times$ 物镜明场下观察(图 3),发现原生质体数量较多,近乎标准的球形,说明活力良好,符合转化要求。



图 3 提取的水稻原生质体($40\times$)

Fig. 3 The rice protoplasts extracted ($40\times$).

2.4 3 种冠瘿碱型 VirE2 的亚细胞定位

分别将 $10 \mu\text{L}$ 的 *HVE2*-GFP、*LVE2*-GFP、*CVE2*-GFP 与 $10 \mu\text{L}$ PXDR-*OsH2A*(合成 DsRed1,发红色荧光,用于指示细胞核的位置)中量提取质粒混匀,用 PEG 法转化水稻原生质体,培养过夜(16 h 以上),次日利用蔡司激光扫描共聚焦显微镜观察。

结果发现,*HVE2*-GFP(图 4, A~D)绿色荧光主要位于细胞核中,但细胞质中仍有较多存在;*LVE2*-GFP(图 4, E~H)细胞核内有较强绿色荧光,而细胞质内有较多荧光;*CVE2*-GFP(图 4, I~L)细胞核内有较强绿色荧光,而细胞质内也有较强荧光;PM999-GFP 空载体(图 4, M~P)在整个细胞内都可观察到荧光,没有明显的亚细胞定位特异性。3 种冠瘿碱型的 *VirE2* 在水稻中的亚细胞定位几乎完全相同,但与 *VirE2* 在拟南芥中的定位差异较大。

2.5 3 种冠瘿碱型 VirD2 的亚细胞定位

分别将 $10 \mu\text{L}$ 的 *HVD2*-YFP、*LVD2*-YFP、*CVD2*-YFP 与 $10 \mu\text{L}$ 的 PM999-CFP-*Ghd7*(合成青色荧光蛋白,发蓝青色荧光,用于指示细胞核的位置^[16])中量提取质粒混匀,用 PEG 法转化水稻原生质体,培养过夜(16 h 以上),次日利用 Leica Sp2 激光扫描共聚焦显微镜观察。

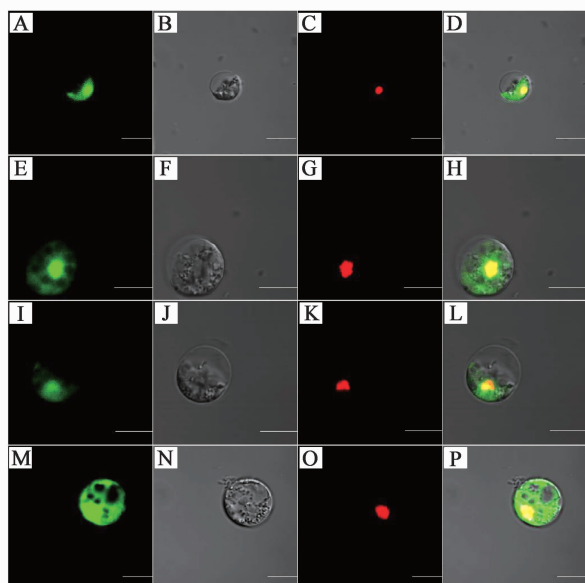


图4 VirE2-GFP 在水稻原生质体中的亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of VirE2-GFP in the protoplasts of rice.

注:A~D为HVE2-GFP的细胞核与细胞质定位;E~H为LVE2-GFP的细胞核与细胞质定位;I~L为CVE2-GFP的细胞核与细胞质定位;M~P空载体GFP的亚细胞定位。(A,E,I,M)为绿色荧光;(B,F,J,N)为明场;(C,G,K,O)为DsRed1-OsH2A,发红色荧光;(D,H,L,P)为叠加图。标尺=10 μm

Note: A~D: Nuclear and cytoplasm localization of HVE2-GFP; E~H: Nuclear and cytoplasm localization of LVE2-GFP; I~L: Nuclear and cytoplasm localization of CVE2-GFP; M~P: Subcellular localization of free GFP. (A,E,I,M) are GFP; (B,F,J,N) are bright; (C,G,K,O) are DsRed1-OsH2A, which appear red; (D,H,L,P) are merge images. bar = 10 μm.

结果发现,HVD2-YFP(图5,A~D)、LVD2-YFP(图5,E~H)、CVD2-YFP(图5,I~L)的绿色荧光(绿色为假色,其实是黄色荧光)均只定位于细胞核中。3种冠瘿碱型的VirD2在水稻中的亚细胞定位完全相同,并且与VirD2在拟南芥中的定位也完全相同,均只定位于细胞核中。

3 讨论

不同冠瘿碱型农杆菌对水稻转化效率差别很大,同时VirD2与VirE2的核靶向运输在农杆菌介导的植物遗传转化中起到非常关键的作用,所以之前推测不同冠瘿碱型VirD2与VirE2亚细胞定位的差异可能是造成其转化效率差异的一个重要原因。但本实验结果表明:3种VirD2均完全

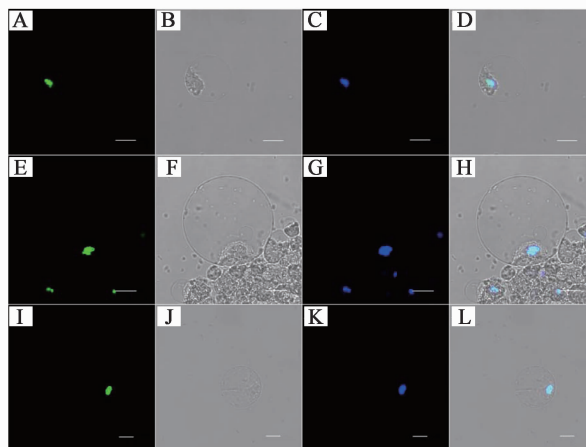


图5 VirD2-YFP 在水稻原生质体中的亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of VirD2-YFP in the protoplasts of rice.

注:A~D为HVD2-YFP的细胞核定位;E~H为LVD2-YFP的细胞核定位;I~L为CVD2-YFP的细胞核定位。(A,E,I)为黄色荧光,但用假色绿色显示;(B,F,J)为明场;(C,G,K)为蓝青色荧光;(D,H,L)为叠加图。标尺=10 μm

Note: A~D: Nuclear localization of HVD2-YFP; E~H: Nuclear localization of LVD2-YFP; I~L: Nuclear localization of CVD2-YFP. (A,E,I) are YFP, YFP is green; (B,F,J) are bright; (C,G,K) are CFP, CFP is blue; (D,H,L) are merge images. bar = 10 μm.

定位于细胞核中,不同冠瘿碱型之间没有差异,因此不同冠瘿碱型的农杆菌对水稻侵染能力的差异与VirD2亚细胞定位的关系不大;3种冠瘿碱型的VirE2在水稻中的亚细胞定位几乎完全相同,均主要定位于细胞核中,但是胞质中也有较多存在。由此表明不同冠瘿碱型的农杆菌对水稻侵染能力的不同与VirE2亚细胞定位的关系也不大。

目前研究表明,农杆菌介导的拟南芥的遗传转化机制是一个由农杆菌Vir蛋白以及多种植物蛋白进行复杂合作才完成的一个工程。其中VirD2的亚细胞定位及其机制已研究得比较清楚:其在拟南芥中完全定位于细胞核中,本实验表明,VirD2也完全定位于水稻细胞核中,从而可以推测VirD2在水稻中的核定位机制及其在农杆菌介导的水稻遗传转化中所起的作用,很可能与在拟南芥中类似,受到植物信号刺激之后,VirD2结合到T-DNA的5'端,形成帽子结构,引导T-DNA穿过IV型分泌系统进入水稻细胞,先被水稻细胞中的CAK2Ms同源蛋白磷酸化,之后被水稻细胞中的PP2C同源蛋白去磷酸化,并且与各种核转移输入蛋白结合,在它们的引导下穿过核孔,将

T-DNA 运输进细胞核中^[3,5~7]。

科研工作者对 VirE2 的亚细胞定位及其在拟南芥遗传转化中的作用机制进行了广泛深入的研究,作用机制研究得已经比较清楚,但其亚细胞定位一直存在争议,有的结果定位于细胞质中,有的结果定位于细胞核中,分析其可能与不同类型细胞中 VIP1 的磷酸化水平有关^[3,11,12]。本研究发现,VirE2 在水稻细胞核与细胞质中皆有较多分布,与拟南芥中的两种结果均有差异,可能有两种原因:①水稻中 VIP1 的同源基因磷酸化程度与拟南芥中的不同,导致可能与其结合的 VirE2 的定位与拟南芥中有较大差异;②另一个原因可能是拟南芥为双子叶植物,是农杆菌的天然宿主,而水稻为单子叶植物,不是农杆菌的天然宿主,前者的转化效率远比后者高。两者的遗传背景差异巨大,有可能水稻已经进化出另一套参与农杆菌遗传转化的系统,我们目前正在进行进一步的研究。

相对于拟南芥,人们对提高农杆菌介导的水稻遗传转化效率,尤其是籼稻转化和大片段 DNA 转化效率有更高的迫切性,而这很大程度上依赖于水稻遗传转化分子机制的研究,遗憾的是至今鲜有相关报道。本实验通过对根瘤农杆菌 VirD2 与 VirE2 蛋白在水稻中亚细胞定位的研究,对农杆菌介导的水稻遗传转化分子机制进行了初步探索。结合前人对农杆菌介导的拟南芥遗传转化机制的报道,我们发现农杆菌介导的水稻及拟南芥的转化机制存在相似性,但也存在一定的差异。所以对农杆菌介导的水稻遗传转化机制进行研究时,可以部分参考但不能全盘照搬拟南芥的转化机制,将据此进行更加深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Tzfira T, Vaidya M, Citovsky V. Increasing plant susceptibility to *Agrobacterium* infection by overexpression of the *Arabidopsis* nuclear protein VIP1[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99(16): 10435 - 10440.
- [2] Tenea G N, Spantzel J, Lee L Y, et al.. Overexpression of several *Arabidopsis* histone genes increases *Agrobacterium*-mediated transformation and transgene expression in plants[J]. Plant Cell, 2009, 21: 3350 - 3367.
- [3] Gelvin S B. Finding a way to the nucleus[J]. Curr. Opin. Microbiol., 2010, 13: 53 - 58.
- [4] Citovsky V, Warnick D, Zambryski P. Nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 and VirE2 proteins in maize and tobacco[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91: 3210 - 3214.
- [5] Gelvin S B. *Agrobacterium* in the genomics age[J]. Plant Physiol., 2009, 150: 1665 - 1676.
- [6] Gelvin S B. Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation[J]. Annu. Rev. Phytopathol., 2010, 48: 45 - 68.
- [7] Bhattacharjee S, Lee L Y, Oltmanns H, et al.. IMP4, an *Arabidopsis* importin α isoform, is preferentially involved in *Agrobacterium*-mediated plant transformation[J]. Plant Cell, 2008, 20: 2661 - 2680.
- [8] Ward D V, Zupan J R, Zambryski P C. *Agrobacterium* VirE2 gets the VIP1 treatment in plant nuclear import[J]. Trends Plant Sci., 2002, 7(1): 1 - 3.
- [9] Citovsky V, Kapelnikov A, Oliel S, et al.. Protein interactions involved in nuclear import of the *Agrobacterium* VirE2 protein *in vivo* and *in vitro*[J]. J. Biol. Chem., 2004, 279(28): 29528 - 29533.
- [10] Tzfira T, Vaidya M, Citovsky V. VIP1, an *Arabidopsis* protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity[J]. EMBO J., 2001, 20(13): 3596 - 3607.
- [11] Djamei A, Pitzschke A, Nakagami H, et al.. Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling[J]. Science, 2007, 318: 453 - 456.
- [12] Liu Y K, Kong X P, Pan J W, et al.. VIP1: linking *Agrobacterium*-mediated transformation to plant immunity[J]? Plant Cell Rep., 2010, 29: 805 - 812.
- [13] Zhang Y, Wang H B, Su J B, et al.. A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes [J]. Plant Methods, 2011, 7: 30.
- [14] Bart R, Chern M, Park C J, et al.. A novel system for gene silencing using siRNAs in rice leaf and stem-derived protoplasts[J]. Plant Methods, 2006, 2: 13.
- [15] 侯岁稳,贾敬芬. 一种简易的植物原生质体计数方法[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(1): 57.
- [16] Hou S W, Jia J F. A simple method to count plant protoplasts[J]. Plant Physiol. Comm., 2002, 38(1): 57.
- [17] Xue W Y, Xing Y Z, Weng X Y, et al.. Natural variation in Ghd7 is an important regulator of heading date and yield potential in rice[J]. Nat. Genet., 2008, 40(6): 761 - 767.