

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2021.30297

李颖, 张悦婧, 王馨, 庞海龙, 贾凌云, 冯汉青. 农杆菌菌株及其侵染浓度和时间对基于菜豆黄矮病毒表达载体瞬时表达外源基因的影响[J]. 植物科学学报, 2021, 39(3): 297-305

Li Y, Zhang YJ, Wang X, Pang HL, Jia LY, Feng HQ. Effects of *Agrobacterium tumefaciens* strain and its infection time and concentration on transient expression of foreign genes based on expression vector of bean yellow dwarf virus[J]. *Plant Science Journal*, 2021, 39(3): 297-305

## 农杆菌菌株及其侵染浓度和时间对基于菜豆黄矮病毒表达载体瞬时表达外源基因的影响

李颖, 张悦婧, 王馨, 庞海龙, 贾凌云, 冯汉青\*

(西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070)

**摘要:** 以3种常见的农杆菌菌株(GV3101、EHA105、LBA4404)和基于菜豆黄矮病毒的复制型植物表达载体为材料, 利用农杆菌介导的瞬时转化技术, 将外源绿色荧光蛋白(GFP)基因导入本氏烟(*Nicotiana benthamiana* L.)叶片中实现瞬时表达, 并对不同农杆菌菌株、侵染浓度及侵染时间对于瞬时表达水平的影响进行比较。结果显示, 3种不同的农杆菌菌株在介导转化本氏烟叶片瞬时表达GFP积累水平之间存在显著差异, 其中EHA105菌株转化效率最高, LBA4404次之, GV3101最低。此外, GV3101、EHA105和LBA4404最适侵染浓度的OD<sub>600</sub>值分别为0.5、0.3和0.3; 最佳侵染时间均为第4 d。研究结果表明农杆菌菌株染色体结构和Ti质粒的差异是影响瞬时转化过程中农杆菌侵染浓度及其外源基因瞬时表达效率的重要因素。

**关键词:** 根癌农杆菌菌株; 农杆菌介导转化; 双生病毒衍生载体; 瞬时表达

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2021)03-0297-09

## Effects of *Agrobacterium tumefaciens* strain and its infection time and concentration on transient expression of foreign genes based on expression vector of bean yellow dwarf virus

Li Ying, Zhang Yue-Jing, Wang Xin, Pang Hai-Long, Jia Ling-Yun, Feng Han-Qing\*

(College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** To explore the effects of different *Agrobacterium tumefaciens* strains and their infection time and concentration on the transient expression of foreign genes based on geminivirus expression vectors, three common *A. tumefaciens* strains and replicative plant expression vectors based on the bean yellow dwarf virus (BeYDV) were used as experimental materials. The exogenous green fluorescent protein (GFP) gene was introduced into *Nicotiana benthamiana* L. leaves to achieve transient expression by transient transformation mediated by *A. tumefaciens*. The effects of different *A. tumefaciens* strains, infection concentration, and infection time on transient expression were compared. Results showed

收稿日期: 2020-10-30, 修回日期: 2020-11-30。

基金项目: 国家自然科学基金(31870246, 31560070); 甘肃省高等学校科研项目(2015A-007); 甘肃省重点研发计划项目(18YF1NA051); 甘肃省高校基本科研业务费; 西北师范大学青年创新团队项目。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31870246, 31560070), University Scientific Research Project of Gansu Province (2015A-007), Key Research and Development Project of Gansu Province (18YF1NA051), Fundamental Research Funds for the Gansu Universities of Gansu Provincial Department of Finance, and Youth Innovation Team of Northwest Normal University.

作者简介: 李颖(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为逆境植物生理生态(E-mail: 1875718288@qq.com)。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: fenghanq@nwnu.edu.cn)。

significant differences among the three different strains of *A. tumefaciens* in the transient expression of GFP in *N. benthamiana* leaves. Among them, the transformation efficiency of strain EHA105 was the highest, followed by LBA4404, and then GV3101. In addition, the optimum infection concentrations of GV3101, EHA105, and LBA4404 were 0.5, 0.3, and 0.3, respectively, and the best infection time was 4 d. These results suggest that the differences in chromosome structure and Ti plasmid of the *A. tumefaciens* strains are important factors affecting the infection concentration of *A. tumefaciens* and the instantaneous expression efficiency of foreign genes during transient transformation.

**Key words:** *Agrobacterium tumefaciens* strain; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation; Double disease derivative vector; Transient expression

瞬时表达技术是指将目的基因导入受体细胞中以建立暂时性的高效表达体系,从而在相对较短时间内使得目的基因大量表达的技术<sup>[1]</sup>。利用植物瞬时技术表达重组蛋白时,所转化的基因无需整合到植物基因组中,节省了遗传转化和筛选等冗长过程,可在短期内便实现蛋白质的表达<sup>[2]</sup>。与稳定的转基因植株相比,瞬时表达的重组蛋白通常在转化后的 1~2 周内即可进行提取,极大缩减了蛋白质生产所需的时间<sup>[3]</sup>。尤其在病原和疾病极易突然爆发的今天,利用瞬时表达技术来表达药用蛋白或抗体等对于社会的安全和疾病治疗具有重大意义<sup>[4]</sup>。

在植物瞬时表达载体中,与非复制型载体相比,使用基于植物 DNA 病毒的复制型表达载体具有转化后目的基因拷贝数多、表达量高、表达时效快、易于操作且在多种植物中均可实施等各种优势<sup>[5]</sup>。尤其是基于植物双生病毒 DNA 所构建的表达载体是目前为止最有效的植物复制型表达载体<sup>[6, 7]</sup>。例如,菜豆黄矮病毒(bean yellow dwarf virus, BeYDV)是巨型病毒属中的双生病毒之一,其基因组为环状单链 DNA(ssDNA)基因组,大小约为 2561 bp。BeYDV 在侵染寄主植物后在宿主细胞核内以滚环复制机制快速复制到高拷贝数以完成复制过程<sup>[8, 9]</sup>。基于上述特征,将 BeYDV 基因组中的复制相关元件构建于植物表达载体中,从而构建基于 BeYDV 的复制型植物表达载体<sup>[10, 11]</sup>,实验证明该载体能够利用 BeYDV 的滚环复制机制在植物宿主细胞内高效复制并产生大量目的基因拷贝数,从而极大提高了转化效率<sup>[12, 13]</sup>。

农杆菌渗入法是介导外源基因瞬时表达最为常用的手段。在非复制表达载体的研究中发现,

影响农杆菌瞬时转化效率的因素主要有农杆菌菌株类型、侵染浓度、共培养时间以及植株的基因型和叶片的生理状态等<sup>[14]</sup>;农杆菌菌株类型和农杆菌侵染植物时的浓度对转化效率的影响最为直接<sup>[15]</sup>。然而,不同农杆菌菌株及其侵染浓度对基于双生病毒的复制型表达载体瞬时表达外源基因的影响则鲜有报道。基于此,本研究以 GV3101、EHA105 和 LBA4404 这 3 种常见的农杆菌菌株和基于 BeYDV 的复制型植物表达载体为实验材料,以绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因为表征基因,探讨了不同农杆菌菌株、侵染浓度及时间等因素对瞬时表达外源基因效率的影响,以期外源基因瞬时转化效率的影响因素及相关研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料培养

在 10 穴育苗盒中放置育苗块并浸泡在水中,静置 2~3 h 使育苗块充分吸收水分。在每个育苗块上点种 2~3 粒本氏烟草(*Nicotiana benthamiana* L.)的种子,用无色透明塑料盖覆盖,将其置于温度 28℃、湿度 50% 以及光照周期为 16 h 光照/8 h 黑暗的培养室环境中进行发芽培养。2 周后移除塑料盖,将育苗盒中剩余的水分倒出并适量施加浓度为 14.8 g/L 的营养液,继续在上述培养条件中培养,待植株长到 4 周龄时进行移苗,为植株的生长提供充足的空间,直到本氏烟草生长至 6 周龄时用作实验材料。

### 1.2 双生病毒衍生表达载体的构建和农杆菌转化

基于 BeYDV 的表达载体由亚利桑那州立大学 Mason 教授课题组馈赠。在载体中的 35S 启动子

下游构建 GFP 基因为表征基因。3 种农杆菌工程菌株分别为 GV3101、EHA105 和 LBA4404，将基于 BeYDV 的表达载体转化 3 种农杆菌，利用载体的抗生素抗性基因进行筛选并继代培养。

1.3 农杆菌菌液的制备及植物转化

在含筛选抗生素的 YEB 琼脂平板上，对 3 种农杆菌划线接种，在 28℃ 下生长 48 h。从 YEB 琼脂平板上挑取单个菌落，接种到 YEB 液体培养基中，在 28℃、180 r/min 转速的摇床中培养，将菌液转移到离心管中，以 5000 r/min 转速离心 10 min，去除上清，然后将农杆菌重悬在 MES 渗透缓冲液（10 mmol/L MES-KOH，pH 5.5、10 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、100 μmol/L 乙酰丁香酮）中洗涤<sup>[3]</sup>。重复上述离心操作，再次除去上清，将农杆菌重新悬浮在 50 mL 渗透缓冲液中，最终配制成菌株浓度 OD<sub>600</sub> 分别为 0.1、0.3、0.5、0.7 和 0.9 共 5 个浓度梯度，配制完成后需将农杆菌混合液在室温下静置 2 h。以不含有表达载体的相应农杆菌为对照。

基于注射器渗透方法<sup>[2]</sup>，选取叶片大小、长势均匀的 6 周龄本氏烟植株。在叶片下表皮整个叶片上距叶基部 1/3、离主叶脉 0.5 cm 处用注射器针头沿主叶脉方向轻轻划出一个小缺口，用不含针头的无菌注射器将含有农杆菌混合物的 2 mL 渗透缓冲液经下表皮伤口处缓缓注入叶片中，直至渗透区域停止蔓延（当叶片颜色加深时，表明已将农杆菌渗透缓冲液注入叶片内），重复渗透步骤侵染整个叶片乃至整颗植株，每个浓度重复 3 株。渗透后，将植株移回培养室，在入渗后 2 ~ 6 d 监测绿色荧光蛋白的表达。

1.4 GFP 表达量的检测

从距注射时间第 2 d 开始，将植物移到暗室，使用徕卡荧光体视显微镜（Leica）在渗透叶片的下表皮面靠近叶尖侧距注射区 1 cm 处观察并成像。观察拍照后，将植物移回培养室继续培养，在第 4 d 和第 6 d 时，分别重复上述操作。

1.5 数据分析

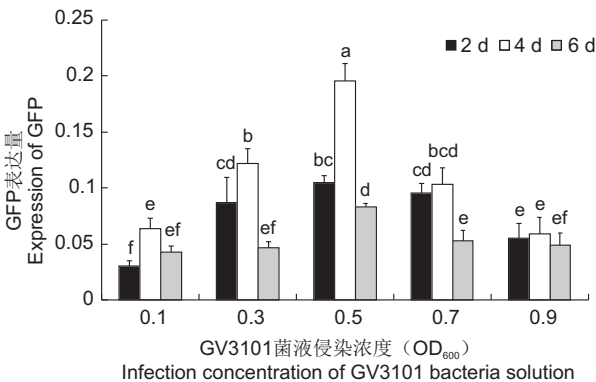
采用 Image J 软件分析 GFP 荧光图片，所得数值至少为 3 次独立实验的平均值，数据以平均值 ± 标准差（SD）表示。使用 IBM SPSS Statistics 19 软件对数据进行单因素方差分析，以  $P < 0.05$  表示显著性差异。

2 结果与分析

2.1 GV3101 菌株介导转化本氏烟叶片瞬时表达 GFP 的影响

本研究发现，在对照组的 3 种农杆菌 GV3101、EHA105 和 LBA4404 菌株渗入的叶片中没有观察到绿色荧光（图版 I：1a ~ 1c）。

其中，GV3101 菌液侵染叶片的整体荧光表达量较低（图版 I：2a ~ 2i）。随着 GV3101 菌株菌液浓度的增加，GFP 表达量整体呈现出先升高后下降的趋势（图 1）。当侵染时间为第 2 d 时，菌液浓度 OD<sub>600</sub> 范围在 0.3 ~ 0.7 的侵染处理与其它处理间存在显著差异；在第 4 d 时，菌液浓度 OD<sub>600</sub> 值为 0.5 的侵染处理荧光表达量最高（图版 I：2e）。在第 6 d 时，不同浓度处理下的 GFP 表达量几乎在同一水平（图版 I：2c，2f，2i）。在不同侵染时间下，侵染浓度 OD<sub>600</sub> 为 0.9 时，叶片 GFP 表达量无显著差异；当侵染时间为第 4 d 时各侵染浓度的整体荧光表达量最高。研究结果显示，GV3101 菌株侵染烟草叶片时的浓度和时间对外源基因的转化效率产生了不同的影响，且存在最适侵染浓度和最佳侵染时间。当 GV3101 菌株菌液浓度 OD<sub>600</sub> 为 0.5，侵染时间为 4 d 时，GFP 表达量最高。



不同小写字母表示处理间在  $P < 0.05$  水平上差异显著，下同。  
Different lowercase letters indicate significant differences at  $P < 0.05$  level, same below.

图 1 GV3101 菌液的 GFP 表达量  
Fig. 1 GFP fluorescence expression of GV3101 bacterial solution

2.2 EHA105 菌株介导转化本氏烟叶片瞬时表达 GFP 的影响

EHA105 菌液侵染叶片的整体荧光表达量较高（图版 I：3a ~ 3c，图版 II：3d ~ 3i）。随着 EHA105 菌株菌液浓度的增加，GFP 表达量整体呈

现出先增加后减小的趋势(图 2)。当侵染时间为第 2 d 时,各侵染浓度处理下荧光表达量水平较低(图版 I:3a ~ 3c);在第 4 d 时,菌液浓度 OD<sub>600</sub>为 0.3 时荧光表达量最高(图版 II:3e)。在第 6 d,较低浓度的侵染处理下的 GFP 表达效果更好。在相同的侵染浓度下,当 OD<sub>600</sub>高于 0.3 时,第 4 d 荧光表达量显著高于其它侵染时间组(图版 II:3e, 3h)。因此,当 EHA105 菌株菌液浓度 OD<sub>600</sub>为 0.3,侵染时间为 4 d 时,GFP 表达量最高。

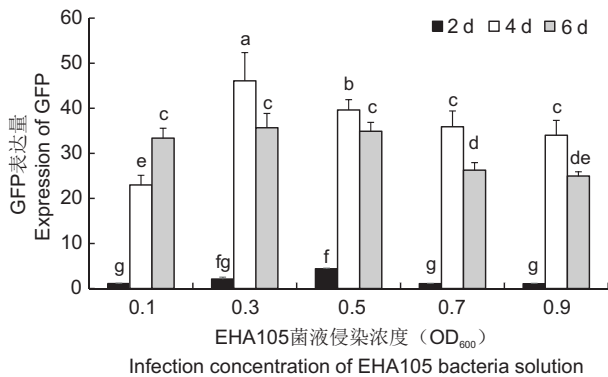


图 2 EHA105 菌液的 GFP 表达量  
Fig. 2 GFP fluorescence expression of EHA105 bacterial solution

2.3 LBA4404 菌株介导转化本氏烟叶片瞬时表达 GFP 的影响

研究表明,LBA4404 菌液侵染叶片的整体荧光表达效果较强(图版 II:4a ~ 4i)。总体上随着 LBA4404 菌株侵染浓度的增加,GFP 表达量呈现出先增加后减小的趋势(图 3)。在侵染时间为第 2 d 时,不同侵染浓度处理下荧光表达量在同一水平(图版 II:4a ~ 4c)。在第 4 d 时,不同侵染浓度处理组之间存在显著差异且菌液浓度 OD<sub>600</sub>为 0.3 时表达效果最显著(图版 II:4e);菌液浓度 OD<sub>600</sub>为 0.3 和 0.5 的侵染处理表达效果高于其它侵染浓度处理,说明本研究中 LBA4404 菌株 OD<sub>600</sub>为 0.3 ~ 0.5 是最适侵染浓度范围。在同一侵染浓度下,侵染时间为第 4 d 的整体荧光表达量显著高于其它侵染时间组(图版 II:4b, 4e, 4h)。因此,当该菌株侵染浓度 OD<sub>600</sub>为 0.3,侵染时间为 4 d 时,GFP 荧光表达量最高。

2.4 3 种农杆菌菌株介导转化本氏烟叶片瞬时表达 GFP 影响的比较

本研究在体视荧光显微镜下观察对照组与处

理组的叶片,以通过农杆菌菌株 GV3101、EHA105 和 LBA4404 检测 GFP 报告基因的表达。发现所有转化体在处理组烟草叶片中发出绿色荧光,而对照组中没有观察到绿色荧光,表明该绿色荧光是 GFP 的特征(图 4)。GV3101、EHA105 和 LBA4404 这 3 种根癌农杆菌菌株分别在上述最适侵染浓度(即 OD<sub>600</sub>为 0.5、0.3、0.3)和最佳侵染时间(均为第 4 d)下 GFP 表达量之间存在显著差异,表明在 3 种农杆菌菌株基于双生病毒衍生的表达载体在本氏烟叶片中的转化效率是:EHA105 最高,LBA4404 次之,GV3101 最低。

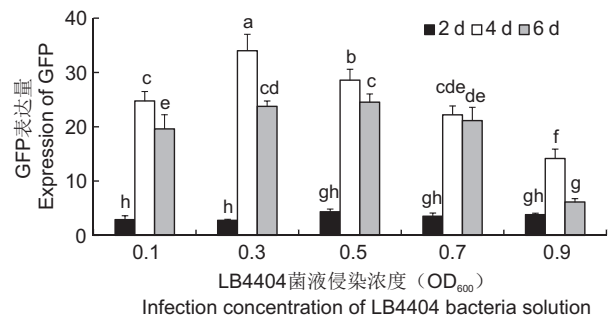


图 3 LBA4404 菌液的 GFP 表达量  
Fig. 3 GFP fluorescence expression of LBA4404 bacterial solution

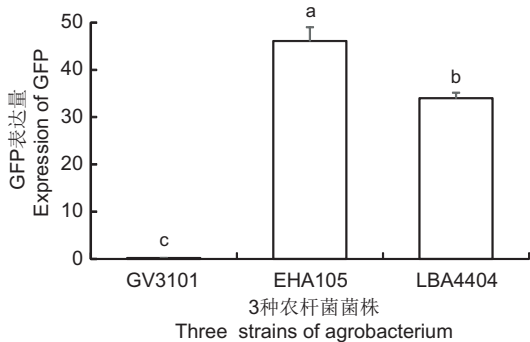


图 4 3 种农杆菌菌株最高荧光表达量差异比较  
Fig. 4 Differences in highest fluorescence expression among three *Agrobacterium* strains

3 讨论

本研究探讨了 3 种根癌农杆菌菌株 GV3101、EHA105 和 LBA4404 及其侵染浓度和时间对基于 BeYDV 的复制型表达载体瞬时表达外源基因转化效率的影响。筛选出转化效率最高的农杆菌菌株 EHA105 以及在外源基因瞬时表达量最高时不同农杆菌菌株的最佳侵染浓度和侵染时间,加速了在本氏烟草叶片上瞬时表达外源基因的遗传操作。



影响农杆菌介导转化效率的因素主要有农杆菌菌株、侵染浓度、侵染时间及植株的基因型和叶片的生理状况等<sup>[14]</sup>。本研究使用的3种农杆菌菌株,根据其Ti质粒合成冠瘿碱的种类不同分别属于胭脂碱型、琥珀碱型和章鱼碱型菌株<sup>[16]</sup>。胭脂碱和章鱼碱是由氨基酸衍生的冠瘿碱,而琥珀碱是属于单糖衍生的冠瘿碱。冠瘿碱的分解酶基因位于农杆菌的Ti质粒上,其分解产物为氨基酸和糖类,只能被农杆菌作为营养物质分解代谢<sup>[17]</sup>。由于琥珀碱型菌株具有生长迅速,在培养的过程中不易结球,转化中易操作等特点<sup>[18]</sup>。因此,我们推测EHA105菌株瞬时表达外源基因转化效率高可能与该菌株分解代谢能力强、生长速率快有关。

由农杆菌介导的T-DNA的加工和随后从农杆菌输出到植物细胞的过程在很大程度上是由Ti质粒携带的毒力(*vir*)基因的活性造成的<sup>[19]</sup>。植物在受到创伤后,创伤组织的细胞释放出的酚类化合物(如乙酰丁香酮AS)和糖类等信号分子,可诱导农杆菌*vir*基因的表达。研究表明,糖类物质在AS浓度很低的情况下可强烈诱导*vir*基因的表达,并且它们与AS之间存在协同效应,可显著提高AS诱导效果<sup>[20]</sup>。植物信号分子由农杆菌的VirA和VirG蛋白双元件信号转导调控系统进行识别,作为膜结合蛋白VirA能直接感应AS而发生自身磷酸化,随后转磷酸化VirG蛋白,磷酸化的VirG蛋白帮助激活或提高其他*vir*基因的转录水平,并在农杆菌附着蛋白的辅助下,驱动农杆菌识别受损位点并锚钉在其宿主细胞的细胞壁上<sup>[21]</sup>。在遗传转化过程中除Ti质粒上的基因参与外,还有农杆菌染色体基因,染色体基因包括*chvA*、*chvB*、*pscA*、*chvD*以及*chvE*等<sup>[22]</sup>。其中,蛋白ChvE对糖类表现出趋化性,ChvE通过结合一些单糖与VirA蛋白的跨膜区作用进而促进*vir*基因的表达,也可直接与VirA蛋白的周质区作用,大大增强AS对VirA的诱导<sup>[23]</sup>。由于EHA105菌株合成的冠瘿碱属于单糖衍生物,其分解产物为糖类物质,某些特异性单糖诱导糖结合蛋白ChvE大量表达进而引起*vir*基因高水平的表达,这可能解释了本研究所观察到的EHA105菌株在同种植物上瞬时表达效率最高的原因。目前,对章鱼碱型农杆菌Ti质粒和胭脂碱型农杆菌Ti质粒的*vir*区进行了全序列分析,发现章鱼碱型农杆菌Ti质粒的*vir*区比胭脂碱

型Ti质粒多包含了*virF*和*virH*操纵子,其中*virF*在协助T-DNA转移到宿主植物细胞中发挥作用,*virH*对植物产生的某些杀菌或者抑菌化合物起解毒作用<sup>[24]</sup>。由此我们推测造成农杆菌菌株在本氏烟叶片细胞中转化效率的差异可能与农杆菌菌株的Ti质粒结构有关。

进一步分析发现,同一植物在不同的农杆菌菌株转化效率方面存在显著性差异,这些差异的产生可能与大量参与转化过程的植物因子有关<sup>[25]</sup>。研究表明,在宿主细胞壁表面可能存在着玻连蛋白样蛋白受体在农杆菌向其宿主细胞的附着过程中发挥了重要作用,编码附着蛋白基因突变的农杆菌菌株不能向植物细胞附着的同时也降低了其与玻连蛋白的结合<sup>[26]</sup>。植物细胞表面的一些分子可能在与农杆菌的结合过程中发挥了一定的作用。农杆菌作为一种病原微生物,当与植物细胞直接接触时,必然会改变植物细胞基因的表达以响应农杆菌的侵染<sup>[27]</sup>。农杆菌侵染诱导了转化所需的植物基因的表达,同时一些植物防御和胁迫反应基因的活性受到抑制。在植物受伤后大量释放一些分子量很小的物质如酚类、糖类等信号分子,这些信号分子也参与农杆菌菌株瞬时表达外源基因的过程。因此,本研究认为植物因子和农杆菌菌株之间的相互作用是造成3种农杆菌菌株瞬时表达外源基因转化效率不同的原因之一。

综上所述,由于不同的根癌农杆菌菌株染色体结构和Ti质粒的差异,有些菌株的毒性相对较高,与宿主植物细胞相互作用的亲和力强,因此侵染效果相对明显<sup>[13]</sup>。农杆菌菌株类型不同,菌株侵染植物叶片的浓度和时间各有其阈值和特点。目前国内对于提高瞬时表达外源蛋白质的研究主要集中在设计植物病毒衍生载体<sup>[28]</sup>和修改培养基成分<sup>[29, 30]</sup>、培养条件<sup>[31]</sup>或培养过程<sup>[32]</sup>上,以便在这些系统中获得更高数量的瞬时表达外源蛋白,而本研究揭示了不同农杆菌菌株基于BeYDV复制型植物表达载体介导的瞬时表达GFP基因的转化效率之间存在显著差异,但对于不同菌株在显示最佳荧光表达量时的分子机制还有待于进一步研究。

## 参考文献:

- [1] 赵文婷,魏建和,刘晓东,高志晖.植物瞬时表达技术的主要方法与应用进展[J].生物技术通讯,2013,24(2):294-300.

- Zhao WT, Wei JH, Liu XD, Gao ZH. Advance of the main methods and applications of plant transient expression system[J]. *Letters in Biotechnology*, 2013, 24(2): 294–300.
- [2] Chen Q, Lai H, Hurtado J, Stahnke J, Leuzinger K, Dent M. Agroinfiltration as an effective and scalable strategy of gene delivery for production of pharmaceutical proteins[J]. *Adv Tech Biol Med*, 2013, 1(1): 103.
- [3] Leuzinger K, Dent M, Hurtado J, Stahnke J, Lai H, *et al.* Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins[J]. *J Vis Exp*, 2013, (77): 50521.
- [4] Peyret H, Lomonosoff GP. When plant virology met *Agrobacterium*: the rise of the deconstructed clones[J]. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(8): 1121–1135.
- [5] Abrahamian P, Hammond RW, Hammond J. Plant virus-derived vectors: applications in agricultural and medical biotechnology[J]. *Annu Rev Virol*, 2020, 7(1): 513–535.
- [6] Hefferon KL. DNA virus vectors for vaccine production in plants: spotlight on geminiviruses[J]. *Vaccines (Basel)*, 2014, 2(3): 642–653.
- [7] Rybicki EP, Martin DP. Virus-derived ssDNA vectors for the expression of foreign proteins in plants[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014, 375: 19–45.
- [8] Chen Q, He J, Phoolcharoen W, Mason HS. Geminiviral vectors based on bean yellow dwarf virus for production of vaccine antigens and monoclonal antibodies in plants[J]. *Hum Vaccin*, 2011, 7(3): 331–338.
- [9] Zaidi SS, Mansoor S. Viral vectors for plant genome engineering[J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 539.
- [10] Zhang X, Mason H. Bean yellow dwarf virus replicons for high-level transgene expression in transgenic plants and cell cultures[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93(2): 271–279.
- [11] Baltes NJ, Gil-Humanes J, Cermak T, Atkins PA, Voytas DF. DNA replicons for plant genome engineering[J]. *Plant Cell*, 2014, 26(1): 151–163.
- [12] Richter KS, Serra H, White CI, Jeske H. The recombination mediator RAD51D promotes geminiviral infection[J]. *Virology*, 2016, 493: 113–127.
- [13] Hanley-Bowdoin L, Bejarano ER, Robertson D, Mansoor S. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(11): 777–788.
- [14] 邱弼, 陶刚, 李奇科, 邱又彬, 刘作易. 农杆菌渗入法介导的基因瞬时表达技术及应用[J]. *分子植物育种*, 2009, 7(5): 1032–1039.
- Qiu R, Tao G, Li QK, Qiu YB, Liu ZY. Transient gene expression mediated by agroinfiltration and its application[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2009, 7(5): 1032–1039.
- [15] 叶文兴, 孔令琪. 影响根癌农杆菌转化效率的因素综述[J]. *中国草地学报*, 2019, 41(3): 142–148.
- Ye WX, Kong LQ. Advanced in factors influencing *agrobacterium tumefaciens*-mediates transformation efficiency[J]. *Chinese Journal of Grassland*, 2019, 41(3): 142–148.
- [16] Hellens R, Mullineaux P, Klee H. Technical focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors[J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(10): 446–451.
- [17] 王从丽, 陆柏方, 张学成, 李广旭, 王劲波, 等. 农杆菌——植物间基因转移的分子基础[J]. *生命科学*, 2002(1): 1–5.
- Wang CL, Lu BF, Zhang XC, Li GX, Wang JB, *et al.* Molecular basis of *Agrobacterium*–plant gene transfer[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2002(1): 1–5.
- [18] 李东栋, 石玮, 邓秀新, 伊华林. 不同根癌农杆菌菌株对柑橘愈伤组织遗传转化效率的影响[J]. *华中农业大学学报*, 2002(4): 379–381.
- Li DD, Shi W, Deng XX, Yi HL. Influence of different strains on *Agrobacterium*-mediated callus transformation efficiency in citrus[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2002(4): 379–381.
- [19] Gelvin SB. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67(1): 16–37.
- [20] 邹智, 卢长明. 影响农杆菌介导遗传转化的植物因子研究进展[J]. *生物技术通报*, 2008(1): 1–9.
- Zou Z, Lu CM. An Overview of plant factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(1): 1–9.
- [21] 李卫, 董文, 周菲, 郭光沁, 郑国鎔. 参与在农杆菌介导遗传转化过程中的植物因子研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2003(12): 62–67.
- Li W, Dong W, Zhou F, Guo GQ, Zhen GC. Progress of study on plant factors that participated in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation[J]. *China Biotechnology*, 2003(12): 62–67.
- [22] 郭晓丽. 根癌农杆菌介导植物遗传转化的分子机制[J]. *衡水学院学报*, 2008(1): 52–54.
- Guo XL. Molecular basis of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for plant[J]. *Journal of Hengshui University*, 2008(1): 52–54.
- [23] He F, Nair GR, Soto CS, Chang Y, Hsu L, *et al.* Molecular basis of ChvE function in sugar binding, sugar utilization, and virulence in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *J Bacteriol*, 2009, 191(18): 5802–5813.
- [24] 王根平, 张婷, 师志刚, 程汝宏. 农杆菌 T-DNA 传递相关基因研究进展[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(5): 1752–1761.
- Wang GP, Zhang T, Shi ZG, Cheng RH. Research progress

- on T-DNA transfer related genes mediated of *Agrobacterium* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(5): 1752–1761.
- [25] Gelvin SB. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, 51: 223–256.
- [26] Sun Y, Qian H, Xu XD, Han Y, Yen LF, Sun DY. Integrin-like proteins in the pollen tube: detection, localization and function[J]. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41(10): 1136–1142.
- [27] Ditt RF, Nester EU, Comai L. Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(19): 10954–10959.
- [28] Poborilova Z, Plchova H, Cеровска N, Gunter CJ, Hitzeroth II, *et al.* Transient protein expression in tobacco BY-2 plant cell packs using single and multi-cassette replicating vectors[J]. *Plant Cell Rep*, 2020, 39(9): 1115–1127.
- [29] James E, Lee JM. The production of foreign proteins from genetically modified plant cells[J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2001, 72: 127–156.
- [30] Holland T, Sack M, Rademacher T, Schmale K, Altmann F, *et al.* Optimal nitrogen supply as a key to increased and sustained production of a monoclonal full-size antibody in BY-2 suspension culture[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 107(2): 278–289.
- [31] Tsoi BM, Doran PM. Effect of medium properties and additives on antibody stability and accumulation in suspended plant cell cultures [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2002, 35(3): 171–180.
- [32] Raven N, Schillberg S, Rasche S. Plant cell-based recombinant antibody manufacturing with a 200 L orbitally shaken disposable bioreactor [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1385: 161–172.

## 图版说明

图版 I：不同根癌农杆菌菌株在不同侵染浓度和侵染时间下 GFP 的荧光强度。1a~1c：3 种阴性农杆菌 GV3101、EHA105 和 LBA4404 菌液侵染后 GFP 的表达量。2a~2c：OD<sub>600</sub> 值分别为 0.3、0.5、0.7 的 GV3101 菌液在侵染时间为第 2 d 时 GFP 的表达量；2d~2f：侵染时间为第 4 d 时不同浓度处理下 GFP 的表达量；2g~2i：侵染时间为第 6 d 时不同浓度处理下 GFP 的表达量。3a~3c：OD<sub>600</sub> 值分别为 0.1、0.3、0.5 的 EHA105 菌液在侵染时间为第 2 d 时 GFP 的表达量。

图版 II：不同根癌农杆菌菌株在不同侵染浓度和侵染时间下 GFP 的荧光强度。3d~3f：侵染时间为第 4 d 时不同浓度处理下 GFP 的表达量；3g~3i：侵染时间为第 6 d 时不同浓度处理下 GFP 的表达量。4a~4c：OD<sub>600</sub> 值分别为 0.1、0.3、0.5 的 LBA4404 菌液在侵染时间为第 2 d 时 GFP 的表达量；4d~4f：侵染时间为第 4 d 时不同浓度处理 GFP 的表达量；4g~4i：侵染时间为第 6 d 时不同浓度处理下 GFP 的表达量。

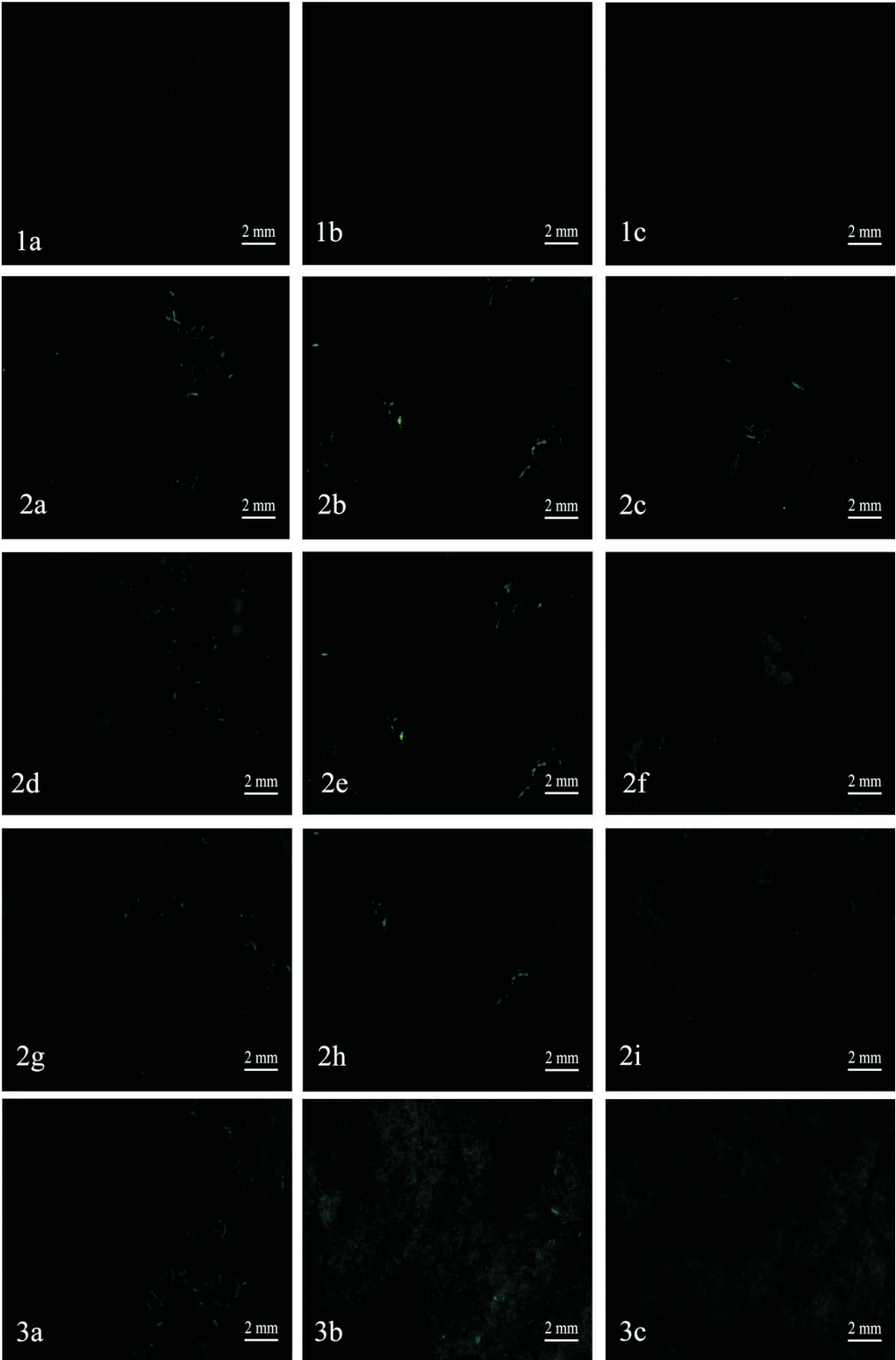
## Explanation of plate

**Plate I** : Fluorescence intensity of GFP in different *Agrobacterium tumefaciens* strains and their infection concentration and infection time. 1a–1c: GFP expression after infection by three kinds of negative *A. tumefaciens*, i. e., GV3101, EHA105, and LBA4404, respectively. 2a–2c: GFP expression of GV3101 bacterial solution with OD<sub>600</sub> values of 0.3, 0.5, and 0.7, respectively, and infection time of 2 d. 2d–2f: GFP expression under different concentrations, with infection time of 4 d; 2g–2i: GFP expression under different concentrations, with infection time of 6 d. 3a–3c: GFP expression of EHA105 bacterial solution with OD<sub>600</sub> values of 0.1, 0.3, and 0.5, respectively, and infection time of 2 d.

**Plate II** : Fluorescence intensity of GFP in different *Agrobacterium tumefaciens* strains and their infection concentration and infection time. 3d–3f: GFP expression under different concentrations, with infection time of 4 d. 3g–3i: GFP expression under different concentrations, with infection time of 6 d. 4a–4c: GFP expression of LBA4404 bacterial solution with OD<sub>600</sub> values of 0.1, 0.3, and 0.5, respectively, and infection time of 2 d. 4d–4f: GFP expression under different concentrations, with infection time of 4 d. 4g–4i: GFP expression under different concentrations, with infection time of 6 d.

李 颖等：图版 I

Li Ying *et al.*: Plate I

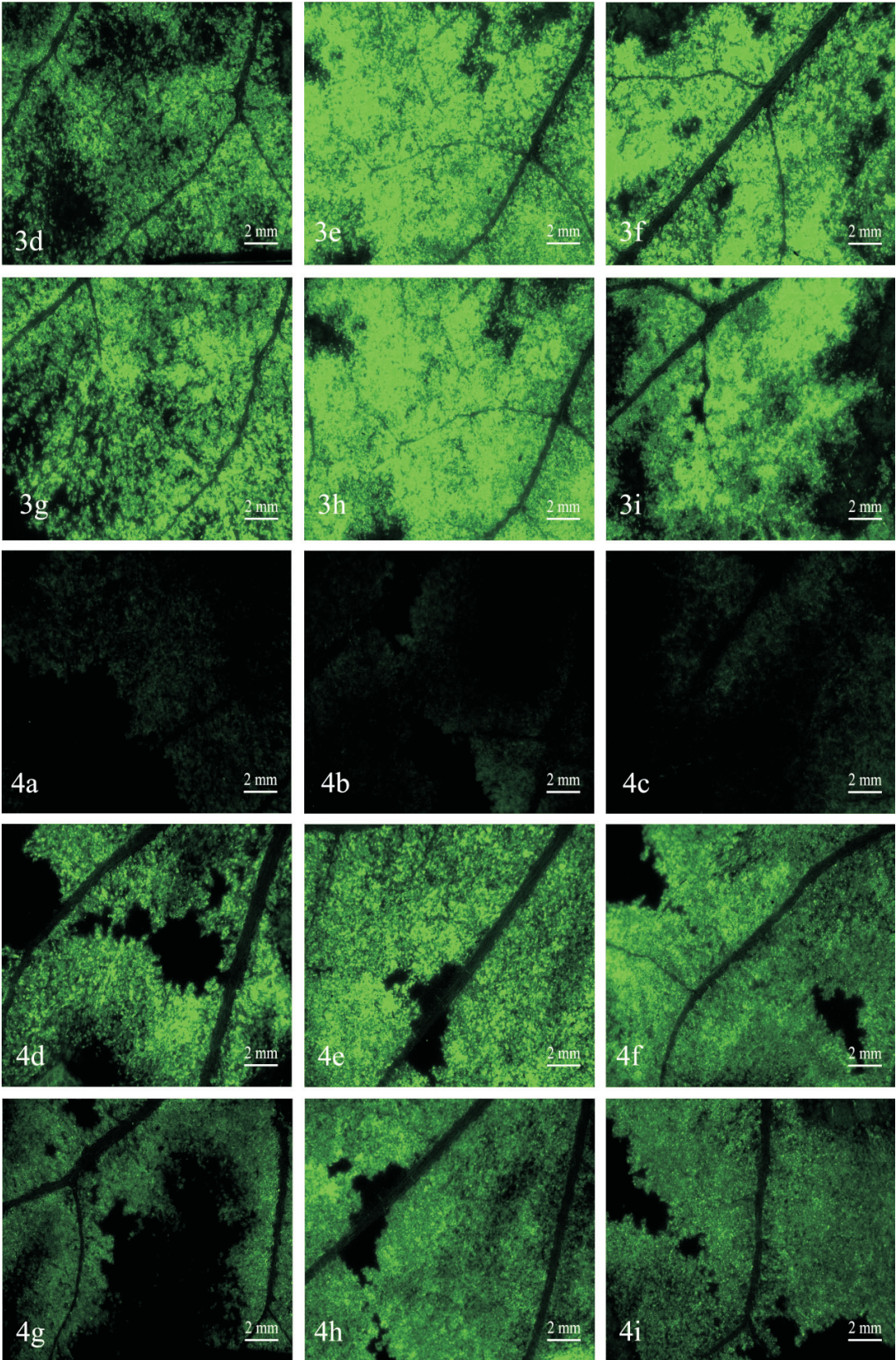


See explanation at the end of text



李颖等：图版II

Li Ying *et al.*: Plate II



See explanation at the end of text

(责任编辑：周媛)