

大白菜和油菜真空渗入遗传转化法初报

张广辉 巩振辉 薛万新 陈启林

(西北农业大学园艺系,陕西杨凌 712100)

摘 要 在携带 CaMV Cabb B-JI 株系基因 VI 的根癌农杆菌菌株 GV3101 的介导下,对大白菜、油菜幼苗生理状态、真空渗入时间及不同处理部位和叶面造伤等的处理与遗传转化效果的关系进行了比较研究。结果表明,经自然春化后,大白菜、白菜型油菜植株长至 4~5 片叶,甘蓝型油菜、芥菜型油菜植株长至 7~9 片叶,花薹已抽出时,为真空渗入最适苗态。大白菜自然春化植株移栽缓苗 (3 d),或者黑暗处理 (8 h) 均可显著提高其转化率。在吸力为 $14.4 \text{ m}^3/\text{h}$ 的真空泵下处理 1 min 后,迅速打开真空泵气阀升压变常压,再关闭阀门抽真空 30 s 的转化效果较好。仅处理叶片转化率可高达 11.20%,叶面造伤处理对转化率没有明显影响。

关键词 遗传转化,真空渗入法,大白菜,油菜

分类号 S634.035

真空渗入法是一种简便、快速、可靠且无需经过组织培养阶段即可获得大量转化植株的新的基因转移方法。在拟南芥上的试验表明,其转化效果受植株发育时期、真空渗入时间、接种体光密度等多种因素的影响^[1],应用这种方法将花椰菜花叶病毒 (CaMV) 基因 VI 导入拟南芥中,获得了众多对 CaMV 具有抗性的转基因株系^[2]。目前,这种方法的应用还仅局限于拟南芥。本试验旨在探索影响大白菜、油菜高效遗传转化的真空渗入的有关因子,为寻找芸薹属作物乃至十字花科作物高效遗传转化的非组织培养方法提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 供试材料与 CaMV Cabb B-JI 基因的构建

供试大白菜品种为丰抗 70,白菜型油菜、甘蓝型油菜、芥菜型油菜品种分别是 NW₁、NW₂ 和 NW₃,由陕西省农科院特作所油菜课题组提供。该试验所采用的根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 GV3101 (pMp90) B-JI 菌株携带 CaMV Cabb B-JI 基因 VI,其构建见参考文献 [3]。

1.2 基因转移与筛选

方法同文献 [1] 所作用的真空泵为 2X Z-4 型旋片式真空泵,极限压力 0.06 Pa,吸力为 $14.4 \text{ m}^3/\text{h}$,接种体 OD₆₀₀ 为 0.8。所获得 T₁ 种子经选择培养基 (1/2× MS, 8 g/L 琼脂, K₂B₄ 维生素,潮霉素浓度 35 mg/L) 筛选,两周后将抗潮霉素植株移栽至温室。

2 结果与分析

2.1 处理幼苗生理状态与转化效果

大白菜、油菜真空渗入处理前是否通过春化直接影响其遗传转化率。和拟南芥一

收稿日期 1998-02-16

课题来源 国家自然科学基金资助项目,39770522

作者简介 张广辉,男,1973 年生,硕士

样^[1],春化处理可有效地提高大白菜、油菜的转化率。大白菜、白菜型油菜在陕西关中露地 10月 25日至 11月 8日播种,出苗后覆盖一层塑料薄膜防冻苗,次年 2月 20日除去覆盖物,4月 10日至 4月 15日待植株长至 4~ 5片叶,花薹已抽出时,是基因转移的最适苗态;甘蓝型油菜、芥菜型油菜在关中露地 10月 5日至 10月 10日播种,冬前覆盖一层塑料薄膜或麦草越冬防冻苗,次年 2月 20日除去覆盖物,3月 20日至 3月 25日,待植株长至 7~ 9片叶,花薹已抽出时,摘除主薹,刺激侧枝发育,一周后为基因转移的最适苗态。经自然春化的大白菜幼苗,移栽后缓苗 3 d较对照(未缓苗)可明显提高其转化率;定量浇灌缓苗水亦利于转化率的提高,直径 9 cm的营养钵,移栽秧苗 3株,加缓苗水 100 mL较 50 mL转化率提高 210.8% (表 1)。这可能与适量的缓苗水,使处理秧苗能迅速恢复并保持较强的生理代谢有关。同时,试验还发现,秧苗移栽后经 8 h黑暗处理,较光照处理有利于提高其转化率。经黑暗处理植株发生了哪些适宜于遗传转化的生理变化,尚待进一步研究。

表 1 不同幼苗生理状态对大白菜转化率的影响

幼苗生理状态	所筛选 T ₁ 种子数/粒	抗潮霉素苗数/株	转化率/%
A	146	6	4.11
B	411	8	1.95
CK	241	3	1.24
D	263	4	1.52
L	359	0	0

注:① A表示移栽后缓苗 3 d,加缓苗水 100 mL; B表示移栽后缓苗 3 d,加缓苗水 50 mL;对照未缓苗。
② D表示移栽苗在黑暗下 8 h; L表示移栽苗在日光灯下 8 h。
③ 以上各处理均为真空渗入 1 min后,迅速打开真空泵气阀升压变常压,再关闭阀门抽真空 30 s。

2.2 真空渗入时间与转化效果

白菜型油菜不同真空渗入时间对转化率有明显影响,其中以真空渗入 1 min后,迅速打开真空泵气阀升压变常压,再关闭阀门抽真空 30 s(简记断续处理 1 min+ 30 s,下文相同)效果最好,转化率达 2.1%,断续处理 2 min+ 30 s次之,转化率为 0.83% (表 2)。在拟南芥上的研究表明,在相同渗入时间下,断续处理的转化效果较连续处理好,且以断续处理 2 min+ 30 s效果最好,转化率最高^[1]。这可能与植物种类有关,此外所使用真空泵的吸力也可能是影响适宜真空渗入时间的重要因素之一。在拟南芥真空渗入时采用吸力为 1.7 m³/h 的真空泵,而本试验所采用的真空泵吸力为 14.4 m³/h,这是否说明在一定范围内真空泵的吸力与处理时间成反比。在拟南芥真空渗入时采用吸力为 0.8 m³/h 的真空泵,即使渗入时间延长到 20 min,其转化率仍很低,而吸力为 1.7 m³/h 的真空泵断续处理 2 min+ 30 s会产生大量的变异植株^[1]。在甘蓝型油菜的试验中也发现,如果真空渗入时间从断续处理 2 min+ 30 s延长到断续处理 4 min+ 30 s则会引起大部分筛选植株黄化、生长发育缓慢等变异。黄化严重的筛选植株移栽后很难长出真叶,最后缓慢死亡。因此,掌握真空渗入时间与真空泵吸力的关系对提高转化率极为重要。适宜的渗入时间因不同植物种类有别,也因所使用的真空泵吸力而异。一般来说,真空泵吸力越大,所需渗入时间越短。若渗入时间过短,其转化率明显降低;反之,渗入时间过长,则容易引起转化植株移

栽后缓苗时间延长,并使大量叶片枯黄、脱落,植株生长受阻,转化率降低。良好的渗入外观特征是叶片由绿色变为黄绿色,并呈水渍状

表 2 不同真空渗入时间对白菜型油菜转化率的影响

真空渗入时间	所筛选 T ₁ 种子数 粒	抗潮霉素苗数 株	转化率 %
1 min+ 30 s	380	8	2.11
2 min+ 30 s	488	4	0.82
3 min+ 30 s	895	0	0
5 min+ 30 s	775	1	0.13

注: 1 min+ 30 s, 2 min+ 30 s, 3 min+ 30 s, 5 min+ 30 s 分别表示真空渗入 1, 2, 3, 5 min 后, 迅速打开真空泵气阀升压变常压, 再关闭阀门抽真空 30 s。

2.3 处理部位与转化效果

为探讨真空渗入处理部位与转化效果是否有关,在大白菜真空渗入前用塑料薄膜将花序包住,仅使叶片与渗入菌液接触,其转化效果显著高于同时处理叶片和花序的处理,前者转化率高达 11.20% (表 3)。这一结果似乎表明,农杆菌感染大白菜的有效部位是叶片,而处理花蕾反而抑制了大白菜的遗传转化。本试验所采用的大白菜品种类型较少,因此关于大白菜真空渗入的有效部位还有待于进一步研究。

表 3 不同真空渗入部位对大白菜转化率的影响

真空渗入部位	所筛选 T ₁ 种子数 粒	抗潮霉素苗数 株	转化率 %
A	366	41	11.20
B	93	0	0

注:① A 表示处理前用塑料薄膜包裹幼苗花序仅使叶片与菌液接触; B 为对照。
② A、B 均为真空渗入 2 min 后, 迅速打开真空泵气阀升压变常压, 再关闭阀门抽真空 30 s。

2.4 叶面造伤处理与转化效果

对大白菜、甘蓝型油菜的试验均表明,叶面造伤处理较对照差异不显著。对越冬后 7~9 片叶的甘蓝型油菜幼苗造伤处理反而引起其转化率降低 (表 4)。其原因尚待进一步探讨。

表 4 叶面造伤对转化率的影响

处理	所筛选 T ₁ 种子数 粒	抗潮霉素苗数 株	转化率 %
H ₁	355	0	0
CK ₁	1019	8	0.79
H ₂	130	0	0
CK ₂	76	0	0
H ₃	364	1	0.27
CK ₃	309	1	0.32

注:① H₁、H₂ 分别是自然春化,具 7~9 片叶和 3~6 片叶甘蓝型油菜的叶面造伤处理。CK₁、CK₂ 分别为 H₁、H₂ 的对照。H₃ 为白菜型油菜,对照 CK₃。
② 各处理均为真空渗入 3 min 后, 迅速打开真空泵气阀升压变常压, 再关闭阀门抽真空 30 s。

人们一直在探索高效、简便、快速的基因转移方法。真空渗入法是一种非组织培养法的基因转移新方法。其最突出的优点是操作简便,在一般实验室均可进行;转化率高,解决

了长期以来经济作物遗传转化率低,难以发挥基因工程在作物品种改良中的重要作用的关键问题;避开了组织培养阶段,排除了组织培养中因体细胞变异为目的基因的正确表达及分子遗传学研究带来的极为不利的遗传背景,同时为一些组织培养不易成苗的作物种类提供了基因转移的有效新方法。真空渗入法的这些特点决定了它将在作物基因转移上具备广阔的研究与应用前景。

参 考 文 献

- 1 巩振辉, Miliner J J, 何玉科. 拟南芥基因转移新方法——真空渗入法的研究. 西北植物学报, 1996, 16(3): 277~ 283
- 2 巩振辉, Miliner J J, 何玉科, 等. CaMV 基因VI在拟南芥上的遗传转化及交叉保护. 西北农业大学学报, 1997, 25(4): 6~ 12
- 3 Cecchini E, Gong Z H, Geri C, et al. Transgenic *Arabidopsis* lines expressing gene VI from cauliflower mosaic virus variants exhibit a range of symptom-like phenotype and accumulate inclusion bodies. Molecular Plant Microbe Interactions, 1997, 10(9): 1094~ 1101

Vacuum Infiltration Genetic Transformation Method in Chinese Cabbage and Rape

Zhang Guanghui Gong Zhenhui Xue Wanxin Chen Qilin

(Department of Horticulture, North western Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract The effects of the physiological state of seedling, vacuum infiltration time, parts of vacuum infiltration and artificial hurt on transformation were studied with the GV 3101 strain of *Agrobacterium tumefaciens* carrying CaMV Cabb B-JI VI in Chinese cabbage (*B. campestris* spp. *pekinensis*) and rape. It showed that it was the most suitable physiological state when the bolt had appeared and the naturally vernalized seedlings had 4~ 5 leaves in Chinese cabbage and *B. campestris*, and 7~ 9 leaves in *B. napus* and *B. juncea*. Both recuperating from the shock of transplanting and putting seedlings in darkness could increase the transformation frequency of naturally vernalized Chinese cabbage seedling. The transformation frequency was highest when drawing a vacuum for 1 min with the suction capacity of the vacuum pump was $14.4 \text{ m}^3/\text{h}$. Only with the leaves treated the frequency of transformants could reach 11.20%. Then releasing vacuum very rapidly, and closing the pump valve to draw a vacuum for another 30 seconds in *B. campestris*. Only the leaves treated could reach transformation frequency at 11.20%. Artificial hurt had no effect on the transformation frequency.

Key words genetic transformation, vacuum infiltration method, Chinese cabbage, rape