

农杆菌介导的花椰菜遗传转化体系研究^{*}

张桂华, 巩振辉

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西杨陵 712100)

[摘要] 以花椰菜栽培品种“春秋”无菌苗的子叶和下胚轴为外植体, 在携带 CaMV Bari-1 基因VI的根癌农杆菌菌种 GV 3101 的介导下, 对影响花椰菜遗传转化的诸因素进行了研究, 建立了较为完善的转化体系, 其转化率分别达 2.31% 和 2.56%。在这一转化体系中, 首先将过夜培养的农杆菌用 MS 无机盐液体培养基稀释 5 倍或 10 倍, 感染经 2~3 d 预培养的子叶和下胚轴外植体 30 s, 然后进行黑暗共培养 1 d, 外植体经表面灭菌后转接到含 500 mg/L 羧苄青霉素的分化培养基上。3 周后, 将分化的不定芽切成 0.5 cm 见方的小块, 接种在选择培养基上, 经筛选的转化芽再诱导成苗。

[关键词] 花椰菜; 农杆菌介导; 遗传转化体系

[中图分类号] Q 785; S635.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)05-099-04

花椰菜含有多种维生素, 营养丰富, 风味鲜美, 是我国广泛种植的蔬菜种类之一。随着现代农业技术的发展, 利用常规育种方法已不能满足现代农业对花椰菜品种改良的需求。现代生物技术的发展, 为选育转化重要园艺性状基因的突破性品种提供了可能。然而, 国内外关于花椰菜遗传转化的技术还很不成熟, 难以适应花椰菜分子育种的要求。David 和 Srivastava 等^[1,2]曾用野生型根癌农杆菌和发根农杆菌转化花椰菜, 获得的转化株大多不正常, 何玉科等^[3]、陈晓邦等^[4]、Christey 等^[5]和 de Block M 等^[6]虽将报告基因, 程继鸿^[7]、华学军等^[8]和 Wagoner 等^[9]将 B. t 基因和 S-腺苷甲硫氨酸水解酶 (SAMase) 基因分别导入花椰菜, 获得了转化外源基因的基因的花椰菜植株, 但转化率极低, 并已成为转化外源基因花椰菜新品种选育的瓶颈。本试验试图通过农杆菌介导法对影响花椰菜遗传转化率诸因素的探索、分析, 建立较为完善的花椰菜高效遗传转化体系, 为花椰菜分子育种提供技术和理论支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料与农杆菌菌种

供试植物材料为花椰菜栽培品种“春秋”, 由天津市蔬菜研究所科技开发中心提供; 所用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌种 GV 3101 携带

CaMV Bari-1 基因VI和潮霉素磷酸转移酶基因的构建参考文献[10]。

1.2 无菌苗培养

花椰菜种子经 850 mL/L 酒精浸泡 3 s 后, 用体积分数为 2% 的次氯酸钠 (滴加 1 滴吐温 80) 表面消毒 25 min, 无菌水冲洗 3 次, 每次 3~5 min, 然后播种于萌发培养基 (1/2 MS 无机盐 + B₅ 维生素 + 8 g/L 琼脂), 在 (24±2) °C、光照 16 h 下培养成苗。

1.3 菌种活化

在进行转化的前 1 d, 取划线培养的单菌落接种在 YEB 液体培养基中, 于 28 °C 振荡 (150 r/min) 培养约 20 h, 然后用灭过菌的 MS 无机盐液体培养基分别稀释 5 倍和 10 倍, 用于转化。

1.4 培养基

预培养培养基 (MS₀): MS 无机盐 + B₅ 维生素 + 30 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂; 分化培养基: MS₀ + 4 mg/L 6-BA; 选择培养基: 分化培养基 + 500 mg/L Cb + 20 mg/L 潮霉素; 生根培养基: 1/2 MS 无机盐 + B₅ 维生素 + 300 mg/L Cb + 8 g/L 琼脂。以上各培养基均调至 pH 5.8。

1.5 Cef 和 Cb

(1) 子叶和下胚轴经 2 d 预培养后, 转接在羧苄青霉素 (Cb) 或头孢霉素 (Cef), 质量浓度分别为 0, 300, 400, 500, 600 mg/L 的分化培养基上。

^{*} [收稿日期] 2000-10-12

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (39770522); 科技部杨凌生物育种中心资助项目 (1999-18); 陕西省自然科学基金资助项目 (2001SM11)

[作者简介] 张桂华 (1972-), 女, 河北冀州人, 在读博士。主要从事蔬菜生物技术研究。

(2)经预培养 2 d 的子叶和下胚轴于菌液(稀释 10 倍)中浸染 30 s, 用无菌滤纸吸干表面多余菌液后, 转接在 Cb 或 Cef 质量浓度分别为 0, 300, 400, 500, 600 mg/L 的分化培养基中, 观察抑菌效果。

1.6 子叶外植体预培养

将子叶和下胚轴接种在含 2, 4-D (0.1 mg/L) 的预培养基上, 培养 0, 1, 2, 3, 4 d, 再用菌液感染 30 s, 随后用无菌滤纸吸干多余菌液接种在分化培养基上与农杆菌共培养 1 d 后, 经灭菌转接到分化培养基上培养, 3 周后统计不定芽分化频率。

1.7 农杆菌菌液浓度与感染时间

将对数生长期的农杆菌分别稀释 5 倍和 10 倍, 预培养 2 d 的外植体分别在稀释 5 倍的菌液中感染 30 s, 在稀释 10 倍的菌液中感染 30, 60, 120 和 180 s, 然后用无菌滤纸吸干多余菌液, 接种到分化培养基上, 共培养 1 d 后, 经灭菌转接到含 500 mg/L Cb 的分化培养基上培养, 以寻找适宜的感染方法。

1.8 共培养时间

将经 2 d 预培养的子叶和下胚轴感染农杆菌 (30 s) 后, 吸干多余菌液接种在分化培养基上, 与农杆菌黑暗中共培养 1, 2, 3 d 后, 经灭菌转接到含 500

mg/L Cb 的分化培养基(若为子叶, 再添加 4 mg/L AgNO₃) 上, 3 周后统计不定芽分化频率。

1.9 转化芽的筛选与生根

将分化的不定芽切成 0.5 cm 见方的小块, 接种在选择培养基上, 筛选转化芽, 统计转化率。

2 结果与分析

2.1 Cef 和 Cb 的影响及抑菌效果

在农杆菌介导的基因转化试验中, 常采用 Cef 或 Cb 抑制农杆菌在培养基上的进一步繁殖, 以免污染受体细胞, 影响不定芽分化。从表 1 可以看出, 不同质量浓度的 Cef 和 Cb 均抑制不定芽分化, 但 Cb 的抑制作用较小; 随着质量浓度增加, 抑制作用逐渐增强, 当 Cef 和 Cb 质量浓度增加到 600 mg/L 时, 芽分化率降低到 64.6% 和 69.2%。从不同质量浓度 Cef 和 Cb 的抑菌效果看, 500 和 600 mg/L 的 Cef 或 Cb 均能很好抑制农杆菌的生长, 考虑到抑菌素的使用不仅能有效地抑制农杆菌的繁殖, 而且还要保持外植体具有较高的分化率, 因此, 采用质量浓度为 500 mg/L 的 Cb 作为抑菌剂较好。

表 1 不同浓度 Cef 和 Cb 对子叶和下胚轴芽再生的影响及抑菌效果

Table 1 Effects of different concentration of Cef and Cb on bud differentiation of Cauliflower cotyledon and hypocotyl and Agrobacterium inhibition effect

抑菌素种类 Type of antibiotics	抑菌素质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration of antibiotics		接种数 Number of explants		分化芽外植体数 Number of differentiated explants		分化芽率/% differentiation percentage		抑菌效果 Inhibition effect	
	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl
Cef	0	0	46	59	45	33	97.8	62.7	++++	++++
	300	300	57	61	48	28	84.2	45.9	+++	+++
	400	400	45	59	36	25	80.0	42.4	++	++
	500	500	54	66	42	25	77.8	37.9	+	+
	600	600	48	63	31	19	64.6	30.2	+	+
Cb	0	0	46	59	45	33	97.8	62.7	++++	++++
	300	300	43	56	40	31	93.0	55.4	+++	+++
	400	400	39	63	36	34	92.3	54.0	++	++
	500	500	35	66	31	34	88.6	51.6	+	+
	600	600	39	61	27	29	69.2	47.5	+	+

注: 子叶取自 5 d 的无菌苗, 下胚轴取自 6 d 的无菌苗; +, ++, +++ 和 ++++ 分别示抑菌效果好、较好、差、最差; 结果在接种后 20 d 统计。

Note: Cotyledons and hypocotyls come from 5 day and 6 days old sterile seedlings respectively. +, ++, +++ and ++++ show the inhibition effect is best, better, poor and poorest respectively. The result was observed 20 days after planting.

2.2 预培养对转化子叶芽再生的影响

试验表明, 外植体在感染农杆菌以前, 进行 2~3 d 预培养, 可以显著提高感染后外植体的不定芽分化率(子叶分别为 69.9% 和 72.4%, 下胚轴分别为 36.2% 和 99.2%), 降低褐化率。但预培养 4 d

时, 芽分化率反而下降(子叶为 45.9%, 下胚轴为 27.3%), 褐化率增加。未经预培养的子叶在农杆菌感染后芽分化率仅为 39.2%, 下胚轴为 23.9% (表 2)。

表 2 预培养天数对子叶和下胚轴再生不定芽的影响

Table 2 Effects of preculture days on bud regeneration of Cauliflower cotyledon and hypocotyl

预培养天数/d Precul- ture days	接种数 Number of explants		分化芽的外植体数 Number of differentiated explants		芽分化率/% Bud differentiation percentage	
	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl
0	79	71	31	17	39.2	23.9
1	67	77	38	19	56.7	24.7
2	83	69	58	25	69.9	36.2
3	76	74	55	29	72.4	99.2
4	61	77	28	21	45.9	27.3

注: 子叶取自 5 d 的无菌苗, 下胚轴取自 6 d 的无菌苗; 接种后 30 d 统计结果。
Note: Cotyledons and hypocotyls come from 5 and 6 days old sterile seedlings respectively. The result was observed 30 days after planting

2.3 菌液浓度与侵染时间的影响
试验表明, 菌液浓度和侵染时间是影响转化芽再生的关键因素之一。由表 3 可以看出, 当感染时间为 30 s 时, 菌液稀释 5 和 10 倍对子叶外植体的伤害程度差异不大, 为最佳菌液浓度和感染时间。当菌液稀释 10 倍时, 随侵染时间增长, 侵染致死率升高。此外, 在相同菌液浓度和相同感染时间下, 下胚轴较子叶对农杆菌侵染的耐受力强, 侵染致死率低。

表 3 菌液浓度与感染时间对子叶和下胚轴的侵染致死情况

Table 3 Effects of number of A. tumefaciens and time infected by A. tumefaciens on survival of cotyledon and hypocotyl

菌液稀释倍数 Diluted times of A. tumefaciens liquid	感染时间/s Infected time	接种数 Number of explants		侵染致死数 Number of dead		侵染致死率/% Dead percentage	
		子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl
5	30	63	58	23	18	36.5	31.0
10	30	78	61	27	17	34.6	27.9
10	60	61	69	32	25	52.5	36.2
10	120	77	59	58	30	75.3	50.8
10	180	64	61	56	38	87.5	62.3

注: 子叶取自 5 d 的无菌苗, 下胚轴取自 6 d 的无菌苗; 接种后 14 d 统计结果。
Note: Cotyledons and hypocotyls come from 5 day and 6 day old sterile seedlings respectively. The result was observed 14 days after planting

2.4 共培养时间对转化芽再生的影响
外植体与农杆菌共培养是保证充分侵染的重要环节, 但必须根据作物种类确定共培养时间。众多试验表明, 共培养时间以 2~3 d 为宜, 在花椰菜上的试验表明, 外植体与农杆菌共培养 1 d 后, 以表面消毒转接到含 500 mg/L Cb 的分化培养上, 可以较好地抑制农杆菌的进一步生长, 利于不定芽再生。而共培养 2~3 d, 易使培养基污染, 外植体极易褐化腐烂, 很难抑制农杆菌的生长。

2.5 转化芽的筛选与生根
在接种选择培养基上的 78 个不定芽小块中, 共获得绿芽 18 个, 转化率达 23.1%; 来自下胚轴的绿芽共 13 个, 转化率为 26.5%。将这些绿芽转入生根培养基上, 均能萌发生根, 但与未经转化的小植株相比, 不定根生长缓慢, 短粗, 侧根少。

3 讨论

头孢霉素和羧苄青霉素都能抑制农杆菌的生长

和繁殖, 在农杆菌介导的遗传转化试验中添加一定浓度的这两种抑菌素的任何一种均能起到除菌作用。头孢霉素对甘蓝型油菜的子叶和下胚轴外植体的不定芽分化有抑制作用, 而羧苄青霉素则有促进作用^[11~13]。卫志明等^[14]认为在甘蓝下胚轴的转化过程中采用头孢霉素优于羧苄青霉素。本试验在以花椰菜栽培品种“春秋”为试材, 在遗传转化过程中分别添加头孢霉素和羧苄青霉素后, 发现这两种抑菌素对花椰菜子叶和下胚轴外植体不定芽分化均有不同程度的抑制作用, 羧苄青霉素较头孢霉素更利于不定芽分化。故认为在农杆菌介导的花椰菜基因转化研究中以羧苄青霉素作为抑菌剂为宜。
试验表明, 花椰菜子叶和下胚轴外植体感染农杆菌前在培养基中添加低浓度的 2, 4-D 进行 2~3 d 预培养有利于转化芽的再生。这可能是由于预培养能够减少伤害胁迫而利于农杆菌的侵染^[15]。石淑稳等^[16]在甘蓝型油菜下胚轴的转化中, 用含低浓度 2, 4-D 的培养基进行 2 d 预培养后, 显著提高了芽

再生率。本试验在花椰菜上也得到了类似的结论。但 Narasimhulu 等^[17]报道,在埃塞俄比亚芥茎的转化过程中,用含 6-BA 和毒莠定的培养基对茎进行 2 d 预培养,提高了逃脱选择的绿芽率。因此,在农杆菌介导的芸薹属作物转化中,提高转化细胞再生率的方法尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] David C, Tempe J. Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. Var. *Botrytis*) by *Agrobacterium rhizogenes*[J]. Plant Cell Rep, 1988, 7(2): 88- 91.
- [2] Srivastava V, Reddy A S, Mukherjee G S. Transformation and regeneration of *Brassica oleracea* mediated by an oncogenic *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Cell Rep, 1988, 7(7): 504- 507.
- [3] 何玉科, 巩振辉, 王 飞, 等. 含有二元载体 Bin19 的发根农杆菌在芸薹属作物上的遗传转化[J]. 生物工程学报, 1991, 7(4): 382- 385.
- [4] 陈晓邦, 华学军, 黄其满, 等. 农杆菌介导的 Intron-GUS 嵌合基因转入花椰菜获得转基因植株[J]. 植物学通报, 1995, 12(增刊): 50- 52.
- [5] Christey M C, Sinclair B K, Braun R H, et al. Regeneration of transgenic vegetable brassicas (*B. Oleracea* and *B. campestris*) via Ri-mediated transformation[J]. Plant Cell Rep, 1997, 16(9): 587- 593.
- [6] de Block M, de Brouwer D. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expressing of the bar and neo genes in the transgenic plants[J]. Meded Fac Landbouwwet Rijksuniv Gent, 1989, 54(4): 1267- 1276.
- [7] 程继鸿. 抗虫基因在芸薹属作物上的遗传转化[D]. 陕西杨陵: 西北农业大学园艺系, 1994.
- [8] 华学军, 陈晓邦, 范云六. *Bacillus thuringiensis* 杀虫基因在花椰菜愈伤组织的整合与表达[J]. 中国农业科学, 1992, 25(4): 82- 87.
- [9] Wagoner W, Stamp J, Mathews H, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of cauliflower for control of flower senescence[J]. Hortiscience, 1994, 29(5): 499.
- [10] Cecchini E, Gong Zhenhui, Geric, et al. Transgenic *Arabidopsis* lines expressing gene V I from cauliflower mosaic virus variants exhibit a range of symptom-like phenotype and accumulate inclusion bodies[J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 1997, 10(9): 1094- 1101.
- [11] 程振东, 卫志明, 许智宏. 芸薹属作物的遗传转化[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(3): 161- 164.
- [12] 程振东, 卫志明, 许智宏. 根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化及转基因植株的再生[J]. 植物学报, 1994, 36(9): 657- 663.
- [13] 程振东, 卫志明, 许智宏. 用 PEG 法把外源基因导入甘蓝型油菜原生质体再生转基因植株[J]. 实验生物学报, 1994, 27(3): 341- 351.
- [14] 卫志明, 黄健秋, 徐淑平, 等. 甘蓝下胚轴的高效再生和农杆菌介导 B. t 基因转化甘蓝[J]. 上海农业学报, 1998, 14(2): 11- 18.
- [15] Mchughen A, Jordan M, Feist G A. Preculture period to *Agrobacterium* inoculation increase production of transgenic plants[J]. J Plant Physiol, 1989, 135: 245- 248.
- [16] 石淑稳, 周永明, 孙学成, 等. 甘蓝型油菜遗传转化体系的研究[J]. 华中农业大学学报, 1998, 17(3): 205- 210.
- [17] Narasimhulu S B, Kirti P B, Mohapatra T, et al. Shoot regeneration in stem explants and its amenability to *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer in *Brassica*[J]. Plant Cell Reports, 1992, 11: 359- 362.

Studies on genetic transformation system of cauliflower mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

ZHANG Gui-hua, GONG Zhen-hui

(College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Effects of some factors on transformation were studied with cotyledon and hypocotyl from *Brassica Oleracea* Var. *botrytis* cv. “ChunQiu” by *Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101 containing CaMV Bari-1 gene V I. Genetic transformation system was established and the transformation frequency was 2.31% and 2.56% respectively. In this transformation system, *agrobacterium* grown overnight was diluted at a ratio of 1:5 or 1:10 with MS salts liquid medium, and cotyledons and hypocotyls precultured for 2 or 3 days were inoculated for 30 s in it, and then cocultivated for 1 d in the dark. Inoculated explants were placed on the differentiation medium containing Cb 500 mg/L after sterilization. After 3 weeks cut the bud into pieces of 0.5 cm³ and place them on the selective medium, and the transformation bud was regenerated into plantlet.

Key words: cauliflower; *Agrobacterium* mediation; genetic transformation system