

# 秦烟遗传转化体系的优化

孔娜, 朱锦辉, 陈耀锋, 任慧莉, 郭东伟

(西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100)

**【摘要】** **【目的】** 优化烟草的高效遗传转化体系。**【方法】** 以陕西地区广泛种植的烟草品种秦烟 98 为试材, 采用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*, LBA4404)介导法, 将从酿酒酵母细胞中克隆到的具有较强耐盐表型的 *HAL1* 基因进行遗传转化, 对农杆菌介导的遗传转化条件及其影响因素进行研究。**【结果】** 用 50 mg/L 卡那霉素(Kan)筛选转化外植体用 800 mg/L 羧苄青霉素(Cb)除菌可以获得理想的筛选和除菌效果。以优化的农杆菌介导烟草叶片的遗传转化条件为: 将未经过预培养(预培养 0 d)的外植体用稀释 150 倍的农杆菌菌液( $OD_{600} = 0.5$ )浸泡 1 min, 转至 MS1 培养基上共培养 48 h, 用无菌水冲洗后于体积分数 2% NaClO 中浸泡 15 min, 用无菌水冲洗 4~5 次, 置 800 mg/L Cb+质量分数 0.1% 的甘露醇中浸泡约 12 h 除菌。**【结论】** 获得了农杆菌介导烟草叶片遗传转化的最佳优化条件, 有效地减少了外植体的污染率, 提高了抗性芽分化率。

**【关键词】** 烟草; *HAL1* 基因; 根癌农杆菌介导法; 秦烟 98

**【中图分类号】** S572.035.3

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2008)09-0071-05

## Study on optimization of transformation system for the Qin tobacco

KONG Na, ZHU Jin-hui, CHEN Yao-feng, REN Hui-li, GUO Dong-wei

(College of Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** **【Objective】** The study was to optimize the efficiency of tobacco genetic transformation system. **【Method】** With the Qinyan 98 extensively planted in the region of Shaanxi as test materials, using the traditional *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404)-mediated, the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation conditions and factors with the gene from yeast cells were studied to clone the table with strong salt-tolerant gene of the *HAL1*. **【Result】** Ideal result was obtained after scanning the explants with 50 mg/L kanamycin (Kan) and degerming with 800 mg/L carboxymethyl benzylpenicillin (Cb). The optimization conditions of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation were: dipping the explants which were not been pre-trained (pre-culture 0 d) in the diluted 150 times *Agrobacterium bacilli* ( $OD_{600} = 0.5$ ) for 1 min, then transferred the explants to the medium MS1. After culturing for 48 h, the explants were washed with sterilized distilled water and then dipped into volume scores 2% NaClO for 15 min. The explants, rinsed with sterilized distilled water four to five times, were dipped into 800 mg/L Cb+ quality scores of 0.1% mannitol about 12 h. **【Conclusion】** The best optimum conditions of the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of tobacco leaves were obtained, which effectively reduced pollution rate of the explants and increased the differentiation rate of resistance bud.

**Key words:** tobacco; *HAL1* gene; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated; Qinyan 98

\* [收稿日期] 2007-09-04

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2003K03-G1-O4)

[作者简介] 孔娜(1982-),女,河南新乡人,在读硕士,主要从事农业生物技术研究。E-mail:kongna1226@126.com

[通讯作者] 陈耀锋(1956-),男,陕西岐山人,教授,博士,博士生导师,主要从事农业生物技术研究。E-mail:chenyf3828@126.com

成功、高效率的高等植物遗传转化,首先依赖于良好的植物受体系统以及适合研究对象的转化条件。但转化过程中所涉及的因素较多,如基因型、外植体生理状态及不同部位的选择,转化过程中侵染液的 OD 值、共培养时间等,均会影响转化效率<sup>[1]</sup>。为了减少假阳性苗的频率,提高转化效率,需要对转化前受体材料的耐性进行筛选并在转化过程中对转化条件进行优化。目前,尽管烟草遗传转化技术比较成熟<sup>[2-6]</sup>,但对秦烟品种遗传转化的研究还未见报道。为此,本研究以陕西地区广泛种植的烟草品种秦烟 98 为试材,将从酿酒酵母细胞中克隆到的具有较强耐盐表型的 *HAL1* 基因<sup>[7]</sup>通过农杆菌介导的方法进行遗传转化,并对遗传转化的条件及其影响因素进行研究,以期建立秦烟的高效遗传转化体系,为耐盐转基因烟草新品种的选育奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 试剂与培养基 组织培养用试剂和其他化学试剂为国产分析纯产品。卡那霉素(Kanamycin sulfate, Kan),母液浓度 50 mg/mL;利福平(Rifampicin, Rif),母液浓度 50 mg/mL;羧苄青霉素(Carbenicillin, Cb),母液浓度 50 mg/mL;农杆菌感染液:MS 基本培养基的无机盐,30 g/L 蔗糖, pH 5.8;MS1 培养基:MS+1.0 mg/L 6-BA(6-苄基嘌呤)+0.1 mg/L NAA(萘乙酸)+30 g/L 蔗糖+5.5 g/L 琼脂, pH 5.8;YEB 培养基:蛋白胨 5.0 g/L+酵母提取物 1.0 g/L+牛肉膏 5.0 g/L+硫酸镁 2.0 mmol/L, pH 7.0。

1.1.2 受体材料 受体材料为陕西省烟草公司唐永红研究员提供的烟草品种秦烟 98。2007-03 于西北农林科技大学农学院光照温室中种植烟草苗,取生长健壮烟苗的幼嫩叶片,用流水冲洗干净,经常规消毒后切分成 0.5 cm<sup>2</sup> 的组织块(外植体)备用。

1.1.3 质粒和菌株 质粒 ProK II(含 NPT II 标记基因和 *HAL1* 基因),由中国科学院上海植物生理研究所何玉科研究员提供。根癌农杆菌 LBA4404(含利福平标记基因)、三亲杂交辅助质粒 pRK2013(含卡那霉素标记基因),均为西北农林科技大学农学院细胞工程实验室保存。利用三亲杂交法获得含质粒 ProK II 的根癌农杆菌 LBA4404。

### 1.2 方 法

1.2.1 烟草品种耐卡那霉素水平的敏感性测验 将烟草外植体在 MS1 培养基中分别预培养 5 和 10

d 后,接种于分别添加 30,40,50,60,70,80,90,100 mg/L Kan 的 MS1 培养基中,以不加 Kan 为对照,每处理接种 5 瓶,每瓶接种 8~10 块,接种后的培养瓶于 (25±2) °C,1 500~2 000 lx 光照条件下培养(12~14 h/d)。4 周后观察、记录筛选结果,计算外植体出芽率和外植体有效出芽率。外植体出芽率/%=出芽叶片数/接种叶片数×100%;外植体有效出芽率/%=产生绿芽叶片数/接种叶片数×100%。

1.2.2 烟草品种耐羧苄青霉素(Carbenicillin, Cb)的敏感性测验 将烟草植株的外植体,接种于分别添加 300,400,500,600,700,800,900 mg/L Cb 的 MS1 培养基中,以不加 Cb 为对照,处理方法及培养条件同 1.2.1。统计不定芽分化率。

1.2.3 农杆菌介导烟草叶片遗传转化体系的建立

(1)外植体预培养时间的确立。将外植体置于 MS1 培养基上进行预培养,预培养时间分别为 0,1,2,3 和 4 d,每处理接种 50 瓶,每瓶接种 8~10 块,预培养条件为:温度(25±2) °C,光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间 12~14 h/d。

(2)农杆菌菌液稀释倍数和浸泡时间的确定。将农杆菌活化并培养至 OD<sub>600</sub> 为 1.0~1.2,菌体于 4 000 r/min 离心 10 min 后重悬于感染液中,OD<sub>600</sub> 调整至 0.5。将上述调整好 OD<sub>600</sub> 值的农杆菌分别用感染液按体积比稀释 30,50,100,150,200 倍后,将外植体置于菌液中分别浸泡 0.5,1,3,5 min 后取出,用无菌滤纸吸干菌液,然后转至 MS1 培养基上共培养 48 h。处理方法及培养条件同上。

(3)农杆菌和外植体共培养时间的确定。将外植体用稀释 150 倍的农杆菌菌液浸泡 1 min 后,转至 MS1 培养基上进行黑暗共培养,共培养的时间分别为 24,48,72,96 h。其他处理方法同上。

(4)除菌方式的确定。试验设置了 6 种除菌方式:①无菌水冲洗后于 800 mg/L Cb 中浸泡 30 min;②无菌水冲洗后于 800 mg/L Cb 中浸泡 1 h;③无菌水冲洗后于体积分数 75%乙醇中迅速漂洗 1 次,然后在质量分数 0.1% HgCl<sub>2</sub> 中浸泡 4~5 min,用无菌水冲洗 4~5 次,置 800 mg/L Cb 中浸泡 1 h;④无菌水冲洗去除表面农杆菌后,置于体积分数 2%次氯酸钠(NaClO)中浸泡 10 min,再用无菌水冲洗 4~5 次,置 800 mg/L Cb 中浸泡约 12 h;⑤无菌水冲洗后于体积分数 5% NaClO 中浸泡 20 min,用无菌水冲洗 4~5 次,置 800 mg/L Cb 中浸泡约 12 h;⑥无菌水冲洗后于体积分数 2% NaClO 中浸泡

15 min,用无菌水冲洗 4~5 次,置 800 mg/L Cb+质量分数 0.1%甘露醇中浸泡约 12 h。除菌结束后,将经转化的外植体叶片转移到选择脱菌培养基(MS1+50 mg/L Kan+800 mg/L Cb)中,于 25 ℃、2 000~3 000 lx 光照条件下培养(光照时间12~14 h/d),统计污染和分化抗性芽的外植体数,计算污染

率及抗性芽分化率。

## 2 结果与分析

### 2.1 秦烟 98 耐卡那霉素的敏感性测验结果

秦烟 98 外植体在含 Kan 的 MS1 培养基中培养 3 周后,诱导结果见图 1 和图 2。

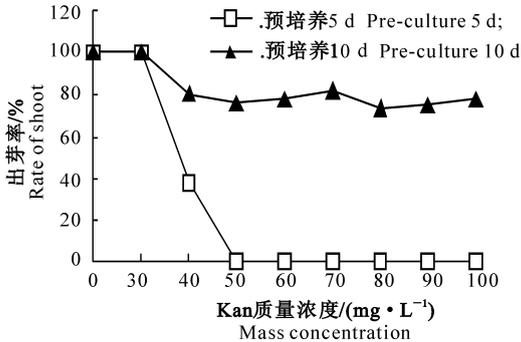


图 1 不同质量浓度 Kan 对秦烟 98 叶片出芽率的影响

Fig. 1 Effect of different Kan-concentrations on the rate of the Qinian 98 shoot

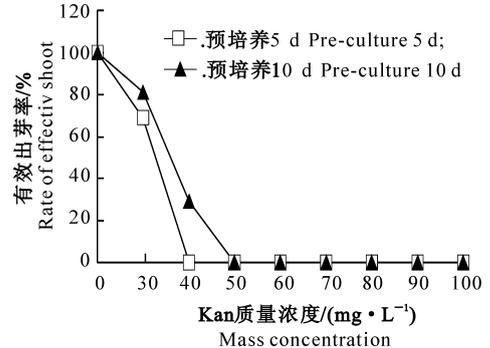


图 2 不同质量浓度 Kan 对秦烟 98 叶片有效出芽率的影响

Fig. 2 Effect of different Kan-concentrations on the rate of the Qinian 98 effective shoot

从图 1 和图 2 可以看出,培养基中 Kan 质量浓度  $\geq 50$  mg/L 时,预培养 5 d 的外植体不能诱导出芽;预培养 10 d 的外植体虽然大部分可诱导出芽(出芽率为 80%左右),但均为极短的白化畸形芽。Kan 质量浓度为 40 mg/L 时,预培养 5 d 的部分外植体产生了很短的白化畸形芽,出芽率约为 40%,有效出芽率为 0%;预培养 10 d 的少数外植体形成黄绿色的小芽,出芽率和有效出芽率分别为 80%和 30%,筛选 4 周后叶片全部黄化。Kan 质量浓度为 30 mg/L 时,预培养 5 d 和 10 d 的外植体出芽率虽然与对照相同,但有效出芽率均低于对照,且丛芽生长缓慢,随着筛选时间的增加从基部开始逐渐黄化。

由此可见,烟草外植体再生时对 Kan 很敏感,Kan 抑制外植体再生的临界质量浓度为 50 mg/L。

### 2.2 秦烟 98 耐羧苄青霉素的敏感性测验结果

由表 1 可见,当 Cb 质量浓度为 0~500 mg/L 时不定芽分化率较高,为 93.1%~100%;Cb 质量浓度为 600~800 mg/L 时对不定芽分化影响不大,不定芽分化率为 85.4%~87.1%;当 Cb 质量浓度为 900 mg/L 时不定芽分化率明显降低。表明高质量浓度 Cb 对不定芽的再生有一定的抑制作用。因此,本试验采用 800 mg/L Cb 作为转化时的最佳除菌浓度。

表 1 不同质量浓度 Cb 对秦烟 98 叶片出芽率的影响

Table 1 Effect of different Cb-concentrations on the rate of the Qinian 98 shoot

Cb 质量浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> ) Cb mass concentration	外植体 接种数 No. of explant	芽分化数 No. of shoot	不定芽 分化率/% Rate of shoot	Cb 质量浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> ) Cb mass concentration	外植体接种数 No. of explant	芽分化数 No. of shoot	不定芽 分化率/% Rate of shoot
0	158	158	100	600	155	135	87.1
300	160	160	100	700	169	145	85.8
400	160	160	100	800	158	135	85.4
500	145	135	93.1	900	160	95	59.4

### 2.3 农杆菌介导烟草叶片遗传转化条件的优化

2.3.1 外植体预培养时间对转化效果的影响 由表 2 可见,预培养 0,1,2,3 d 时外植体的抗性芽分化率为 34%~37.6%,差异较小,表明外植体未经过预培养(0 d)与预培养 1,2,3 d 对转化效果无明显

影响;预培养 4 d 时外植体的抗性芽分化率为 13.7%,明显低于未经过预培养的外植体,这可能是因为预培养时间过长,创伤部位有愈合和封闭的趋势,不利于农杆菌的附着及 T-DNA 的转移所致。

2.3.2 农杆菌菌液稀释倍数和浸泡时间对转化效

果的影响 表 3 表明,菌液稀释倍数 $\leq 50$ 时,抗性芽分化率较低;菌液稀释 100~150 倍时转化效果较好,其中在稀释 100 倍时抗性芽分化率最高达 32.1%,稀释 150 倍时最高达到 33.3%。菌液稀释倍数较小时(30~100 倍),随着浸泡时间的延长,抗

性芽分化率降低;而稀释倍数较大时(150 和 200 倍),随着浸泡时间的延长,抗性芽分化率增大。可见,适宜的菌液稀释倍数和浸泡时间是转化成败的关键。综合分析认为,烟草转化时,菌液稀释 150 倍,浸泡 1 min 时转化效果较好。

表 2 外植体预培养时间对秦烟 98 转化效果的影响

Table 2 Effect of pre-culture time on transformation of Qinyan 98

预培养时间/d Time	外植体接种数 No. of explant	抗性愈伤数 No. of explant producing Kan-resistant callus	抗性出愈率/% Rate of explant producing Kan-resistant callus	芽分化数 No. of shoot	抗性芽分化率/% Rate of shoot
0	512	226	44.1	193	37.6
1	500	214	42.8	175	35.0
2	500	215	43.0	187	37.4
3	489	198	40.4	166	34.0
4	499	132	26.4	68	13.7

表 3 农杆菌菌液稀释倍数及外植体在菌液中的浸泡时间对秦烟 98 转化效果的影响

Table 3 Effect of delusioned times of bacterial and dipping time on transformation of Qinyan 98

浸泡时间/min Dipping time	抗性芽分化率/% Rate of shoot				
	30×	50×	100×	150×	200×
0.5	3.8	12.4	30.9	21.4	6.7
1	3.8	10.5	32.1	33.3	11.9
3	0	8.7	17.5	30.2	13.0
5	0	0	19.0	30.4	18.4

2.3.3 农杆菌和外植体共培养时间对转化效果的影响 试验结果(表 4)表明,共培养时间较短(24 h)时,虽然可以有效抑制农杆菌的生长,但不能产生大量的转化细胞,故其抗性芽分化率较低,为 26.6%;共培养 48 h 时,抗性芽分化率最高,达到 38.4%;共培养 72 h 时外植体的抗性芽分化率又下降至 11.7%;共培养 96 h 时,无抗性芽分化。表明共培养时间过长,会使农杆菌过量增殖,不仅增加了除菌难度,而且导致抗性芽分化率急剧降低,因此,外植体与农杆菌共培养时间以 48 h 为宜。

2.3.4 除菌方式对转化效果的影响 除菌方式对秦烟 98 转化效果的影响见表 5。

表 4 农杆菌和外植体共培养时间对秦烟 98 转化效果的影响

Table 4 Effect of Co-culture time on transformation of Qinyan 98

共培养时间/h Co-culture time	外植体接种数 No. of explant	芽分化数 No. of shoot	抗性芽分化率/% Rate of shoot
24	312	83	26.6
48	308	118	38.4
72	345	40	11.7
96	296	0	0

表 5 除菌方式对秦烟 98 转化效果的影响

Table 5 Effect of bacteria removing way on transformation of Qinyan 98

除菌方式 Way of removing bacterial	外植体数 No. of explant	污染外植体数 No. of polluted explant	污染率/% Rate of pollution	分化抗性芽外植体数	
				No. of explant producing Kan-resistant	抗性芽分化率/% Rate of Kan-resistant shoot
①	60	60	100.0	0	0.0
②	60	59	98.3	0	0.0
③	61	20	32.7	2	4.8
④	58	10	17.2	13	27.0
⑤	57	4	7.0	4	7.5
⑥	62	6	9.6	18	32.1

由表 5 可见,处理①和②中 800 mg/L Cb 无抑菌作用,外植体几乎全部污染,无抗性芽分化;处理③的农杆菌污染时间较处理①和②延迟 1~2 d,污染率明显降低,但外植体边缘褐化严重,抗性芽分化率仅为 4.8%;在处理④和⑤中的 NaClO 有较强的

抑菌作用,但处理⑤中 NaClO 含量过大,浸泡时间过长对外植体危害较大,抗性芽分化率较低,仅为 7.5%;处理⑥的污染率相对较低,抗性芽分化率最高,达 32.1%。这可能是由于甘露醇的渗透作用使 NaClO,尤其是 Cb 发挥了自身的功效,渗入到外植

体表层及深层,达到除菌目的。因此,烟草转化有效的除菌方式是:无菌水冲洗后于体积分数 2% NaClO 中浸泡 15 min,用无菌水冲洗 4~5 次,置 800 mg/L Cb+质量分数 0.1% 甘露醇中浸泡约 12 h。

### 3 讨 论

在烟草转基因研究中,Kan 质量浓度的确定对转基因植株的获得非常重要。合适的 Kan 质量浓度既不影响转化细胞的正常生长,又能有效抑制非转化细胞的生长,并使之缓慢死亡。所以在转化前需先确定各烟草品种的 Kan 抗性临界质量浓度。一般是将共培养后的叶片直接转入含高质量浓度 Kan(100 mg/L<sup>[8-11]</sup>或 150 mg/L<sup>[12]</sup>)的培养基中筛选。也有报道将共培养后的叶片在无 Kan 培养基上诱导生芽后,再将小芽置于含 Kan 的培养基上生根<sup>[13]</sup>。本研究结果表明,烟草叶片的再生对 Kan 很敏感,预培养 5 d 的叶片在 Kan 质量浓度  $\geq 50$  mg/L 的诱导培养基上不能产生抗性芽。所以在烟草转化中,Kan 质量浓度以 50 mg/L 为宜。

农杆菌遗传转化中,菌液稀释倍数、外植体预培养时间<sup>[14-15]</sup>及其在菌液中的浸泡时间是遗传转化的又一关键因素。本研究发现,秦烟 98 较适合的条件是:用稀释 150 倍的农杆菌菌液( $OD_{600} = 0.5$ )浸泡不经过预培养的外植体 1 min,能产生相对较高的抗性出愈率和抗性芽分化率。外植体与农杆菌共培养时间也会影响抗性芽的分化率。共培养时间过长,会引起农杆菌的过度生长,使得植物细胞因受到毒害而死亡;共培养时间过短,不足以诱导有效的 T-DNA 转移。本研究结果表明,烟草转化时外植体与农杆菌共培养的时间以 48 h 为宜。

农杆菌感染植物体后,选择什么样的除菌方式,使之既能有效抑制菌体的生长,同时又对抗性芽分化的影响最小,这是农杆菌介导的遗传转化中经常遇到的问题。本试验探索出了一个高效率的除菌方式,即在共培养结束后将外植体用无菌水冲洗后于体积分数 2% NaClO 中浸泡 15 min,再用无菌水冲洗 4~5 次,然后置 800 mg/L Cb+质量分数 0.1% 甘露醇中浸泡约 12 h。该除菌方式将 NaClO、Cb 和甘露醇结合起来,在甘露醇的渗透作用下使 NaClO,尤其是 Cb 发挥自身的功效,渗入到外植体的表层及深层,以达到彻底除菌的目的。

### [参考文献]

[1] 蔡 丹,郑易之,兰 英.大豆 LEA 蛋白 Em 的表达可提高大

肠杆菌和烟草耐盐性[J].深圳大学学报:理工版,2006,23(3):232-238.

Cai D,Zheng Y Z,Lan Y. Expression of Em gene (LEA) from soybean imma ture seeds confers salt tolerance to *Escherichia coli* and tobacco plants [J]. Journal of Shenzhen University: Science and Engineering Edition,2006,23(3):232-238. (in Chinese)

[2] Ahl G P,Duesing J H. From pots to plots:genetically modified plants on trial [J]. Bio-Tech,1995,13:454-459.

[3] Moralejo F J,Cardoza R E,Gutierrez S,et al. Thaumatin production in *Aspergillus awamori* by use of expression cassettes with strong fungal promoters and high gene dosage [J]. Appl Environ Microbiol,1999,65(3):1168-1174.

[4] Richard L B,Ralph S,Chinnathambi S,et al. Transformation of 'Beune Bose' pear with the nolC gene [J]. J Amer Soc Hort Sci,1999,124(6):570-574.

[5] Ulker B, Sonmieh I E. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function [J]. Curr Opin Plant Biol,2004,7(5):491-498.

[6] Wu K L,Guo Z J,Wang H H. The WRKY family of transcription factors in rice and Arabidopsis and their origins [J]. DNA Res,2005(12):9-26.

[7] Eulgem T,Rushton P J,Robatzek S,et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. Trends Plant Sci,2000(5):199-206.

[8] 刘秋云,贺竹梅,曹 俊,等.利用农杆菌系统将超甜基因导入烟草[J].遗传,1998,20(1):24-27.

Liu Q Y,He Z M,Cao J,et al. Introduction of thaumatin gene into tobacco through *Agrobacterium*-mediated System [J]. Hereditas,1998,20(1):24-27. (in Chinese)

[9] 李永华,高玉萍,杨芳绒,等.小麦甜菜碱醛脱氢酶基因在烟草中的转化及表达[J].河南农业大学学报,2007,41(1):12-14,20.

Li Y H,Shang Y P,Yang F R,et al. Transformation and expression of *Nicotiana tobaccum* L. with a gene encoding for the Betaine Aldehyde Dehydrogenase(BADH) from *Triticum aestivum* L. [J]. Journal of Henan Agricultural University,2007,41(1):12-14,20. (in Chinese)

[10] 余建明,梁流芳,张保龙,等.农杆菌介导法获得草地早熟禾转 Bt 基因植株 [J].江苏农业学报,2005,21(2):102-105.

She J M,Liang L F,Zhang B L,et al. Acquirement of Bt transgenic plants by *Agrobacterium tumefaciens* in Kentucky Bluegrass (*Poa pratensis* L.) [J]. Jiangsu J of Agr Sci,2005,21(2):102-105. (in Chinese)

[11] 任春梅,高必达,洪亚辉,等.细菌几丁质酶基因转化烟草的研究 [J].烟草科技,2002(8):3-6.

Ren C M,Gao B D,Hong Y H,et al. Study on transformation of tobacco with a Chitinase ChiA gene from *serratia marcescens* [J]. Tobacco Science & Technolog,2002(8):3-6. (in Chinese)

(下转第 80 页)