

农杆菌介导的芸薹属作物遗传转化研究进展

张桂华, 巩振辉, 张广辉

(西北农林科技大学园艺系, 陕西杨陵 712100)

S 634.035.3

S188

〔摘 要〕 从高频再生体系的建立、农杆菌的侵染方法、导入外源基因等方面综述了芸薹属作物的遗传转化研究进展, 并对研究中存在的再生苗、转化率低和筛选方法等问题进行了讨论。

〔关键词〕 芸薹属; 农杆菌; 遗传转化; 农杆菌介导; 再生体系

〔中图分类号〕 S634.035 〔文献标识码〕 A

芸薹属(*Brassica*)包括多种重要的蔬菜和油料作物, 在农业生产中占有重要地位。近年来, 应用遗传转化方法已获得了多种芸薹属作物的转基因植株^[1], 其中应用最广泛的是农杆菌(*Agrobacterium*)介导法^[2]。农杆菌介导法具有易操作、转基因植株容易获得等优点, 对芸薹属作物更是如此^[3]。目前, 在大多数种或变种上已建立了转化体系, 获得了较高的转化率。但现有转化体系对一些难以再生的种则无能为力, 而且常规的筛选方法在芸薹属作物上效果欠佳^[4,5], 对这些问题尚需进行深入研究。

1 高频再生体系的建立

建立高频的芽再生体系是农杆菌介导遗传转化成功的前提之一。尽管芸薹属作物具有较好的组织培养基础, 但不同种、变种、品种之间存在较大差异, 而且受到外植体种类、年龄、培养基组成等多种因素的影响。因此, 建立高效、重演性强的再生体系一直是芸薹属作物遗传转化研究的焦点之一。

1.1 基因型的影响

许多研究^[6~9]表明, 甘蓝型油菜(*B. napus*)较白菜型油菜(*B. Chinensis* Var. *Oleifera* Makino et Nemoto)和芥菜型油菜(*B. juncea*)容易再生与转化, 而甘蓝及其变种(同属于*B. oleracea*)较白菜种(*B. campestris*)容易再生得多。白菜种的菜心(*B. parachinensis* Bail.)芽再生频率低, 易在愈伤组织上先形成根, 而抑制芽的形成^[10]。Murata等^[7]的研究表明, 调控芽形成的基因可能位于C基因组。因此, 具有C基因组的甘蓝和花椰菜等容易再生, 而缺少C基因组的大白菜等(具AA基因组)则困难得多。

1.2 外植体的影响

1.2.1 外植体类型 外植体必须同时具备芽再生频率高、易为农杆菌侵染等特点, 才能成为良好的转化受体。目前应用最多的外植体有无菌苗的子叶、下胚轴、根段以及大田植

〔收稿日期〕 1999-01-10

〔基金项目〕 国家自然科学基金资助项目(39770532); 国家教育部优秀青年教师基金资助项目

〔作者简介〕 张桂华(1972—), 女, 在读硕士

株的花茎切段等。同种作物的不同外植体具有不同的芽分化频率和优缺点,需要通过试验才能确定一种最佳的转化受体。Damgaard 等^[11]在甘蓝型油菜上发现,以子叶为外植体,供试的6个品种均获得转基因植株,而以下胚轴为外植体仅有1个品种获得成功。

子叶等外植体具有简便、快速等优点,但其再生植株易为嵌合体,基因型也可能是杂合的。近年来以萌动种子或植株为农杆菌转化受体的研究也取得一些进展^[12,13],其具有不需组织培养等优点,具有深入研究的价值。

1.2.2 外植体的年龄 无菌苗的子叶和下胚轴等为外植体时,苗龄显著影响芽再生频率。最常应用的苗龄为4~7 d。菜心等发芽迅速,大约在播后第3天子叶已平展,多用4~5 d龄苗;甘蓝和花椰菜等发芽则慢得多,在第5天子叶才能充分展开,多采用6~7 d龄苗。卫志明等^[14]以甘蓝为材料发现,尽管苗龄相差非常小,但对下胚轴芽分化频率影响非常大,苗龄为5 d时,再生频率仅18.07%,6 d时则为64.52%。

1.2.3 外植体极性 有研究^[15,16]表明,以下胚轴和花茎为外植体时,极性是影响芽再生的重要因素。一般认为,近根端容易产生根,远根端容易产生芽。在花椰菜上也发现,下胚轴远根端易直接产生芽,且芽数量多;近根端再生芽较困难,且多产生在愈伤组织上。但也有不同的结论。李树贤等^[17]在结球甘蓝上发现,下胚轴不定芽的发生没有明显极性。

1.2.4 外植体的部位 来自无菌苗的同种外植体,其不同部位的芽再生率也存在较大差异。一般下胚轴的上部芽再生能力强,而下部再生能力弱。Yang 等^[18]的研究表明,埃塞俄比亚芥菜下胚轴上部切段较下部切段早分化芽,芽再生率为40.4%,而下部切段仅为11.3%。在大白菜上则有相反的结论^[16]。

1.2.5 外植体的生理状态 黄菊辉等^[19]以发根农杆菌(*A. rhizogenes*)侵染茎用芥菜时发现,带芽下胚轴比不带芽下胚轴生根率要高得多。这可能与生长素的极性运输有关。

1.2.6 接种方法 许多研究^[8,16,20]表明,插植较平放芽再生率要高得多。菜心子叶柄插入培养基2 mm,芽再生率可达89%,而平放仅为46%^[8]。插植的方向对芽再生也有显著影响。花椰菜下胚轴倒插较正插易再生芽^[9]。

1.3 培养基组成

1.3.1 激素配比 寻求适当的激素配比是提高芽再生频率的重要途径。不同作物类型、品种、外植体对激素组成的要求有较大差异。BA是芸薹属作物转化中最常用的一种激素,花椰菜、甘蓝等以子叶为外植体单独使用的质量浓度以4~5 mg·L⁻¹为宜,与其他激素相结合时质量浓度则应适当减小^[21]。

脱落酸(ABA)是组织培养中很少使用的一种激素,张鹏等^[9]的研究表明,低浓度的脱落酸或与AgNO₃配合有促进菜心芽分化的作用。小白菜(*B. chinensis*)上有类似报道^[22]。ABA的作用需进一步深入研究。

1.3.2 AgNO₃的应用 由于基因型的影响,白菜种(*B. campestris*)芽再生频率极低,严重影响了遗传转化的进行。Jun 等^[23]以根癌农杆菌侵染大白菜子叶仅获得30%转化率,在白菜型油菜上转化率仅为7%~13%^[24]。Chi 等^[25,26]首先发现培养基中添加AgNO₃能显著促进大白菜、小白菜和菜薹的子叶再生成芽,类似的报道也比较多^[8,9,21,27]。应用这种方法已在白菜型油菜^[24]、青菜^[28]上获得较高的转化频率。

AgNO₃的作用机制尚未完全清楚。目前一般认为Ag⁺是较好的乙烯活性抑制剂,能

竞争性地作用于乙烯作用部位,防止外植体产生的过多乙烯对植株再生的抑制作用^[29]。

2 农杆菌侵染方法的研究

农杆菌介导的遗传转化是转化受体(外植体)与农杆菌相互作用的结果。在转化中首先要保证高侵染活力的农杆菌对受体的充分侵染,其次要求侵染后的外植体保持较高的芽分化能力,以便获得转化芽。研究表明^[14,33],侵染时间、菌液浓度、预培养和共培养时间等都显著影响着农杆菌的侵染及转化芽的再生。

农杆菌的活化 农杆菌在侵染过程中,其 *vir* 基因受植物细胞释放的酚类物质的刺激而活化,从而提高侵染能力。现多在农杆菌培养过程中加入酚类物质,提高农杆菌活力,保证充分侵染。

预培养 外植体离体后立即侵染易引起褐化、腐烂,因此多在侵染前进行 2~3 d 的预培养。石淑稳等^[30]发现,甘蓝型油菜的下胚轴在含 2,4-D 的培养基上进行 2 d 预培养后,可显著提高芽再生率,认为 2,4-D 对芽的发生具有很强的启动作用,但预培养时间不宜过长。甘蓝下胚轴经 4 d 预培养后再侵染也易腐烂、褐化、死亡^[14]。

侵染时间和菌液浓度 侵染时间过长或浓度过大,易导致外植体褐化、死亡;反之,则可能未被侵染。目前侵染时间多采用 3~5 min,菌液浓度差别非常大,一般多采用处于对数生长期(OD_{600} 约为 0.3~0.5)的农杆菌或者适当稀释一定倍数。

共培养时间 农杆菌侵染后的外植体要在不含抗生素的培养基上共培养一段时间,以利于农杆菌的充分侵染。共培养时间因作物种类、外植体类型而异。时间过长易引起外植体褐化,过短则转化率降低。以甘蓝型油菜的子叶柄为外植体时共培养时间以 60~72 h 为宜^[21]。

抑菌剂的选择 共培养后,外植体表面和内部残留的农杆菌非常容易引起污染,从而影响不定芽再生。一般采用抑菌剂来抑制农杆菌的繁殖,常用的抑菌剂有羧苄青霉素(Carbenicillin, Cb)和头孢霉素(Cefotaxime, Cef)等。良好的抑菌剂应具有仅抑制农杆菌的生长而不影响芽再生的特点。余建明等^[31]发现, Cef 抑制甘蓝下胚轴芽的再生,而 Cb 对芽再生无影响;卫志明等^[34]则发现 Cef 优于 Cb。程振东等^[4]以甘蓝型油菜子叶柄为外植体得到类似结论。因此,必须确定合适的抑菌剂及浓度。

3 导入的外源基因

目前导入芸薹属作物的外源基因主要有:苏云金芽孢杆菌的 B. t 基因^[14,16,32~35]和蛋白酶抑制剂基因^[31]、病毒外壳蛋白基因^[21,36]、雄性不育基因^[37]、雄性不育抑制基因^[38]等。这些目的基因的导入为芸薹属作物的品质改良提供了有效手段。

4 存在问题

再生成苗问题是芸薹属转化的首要难题。芸薹属作物中组培基础较好的报道主要集中在甘蓝型油菜等几个材料上,对于大白菜、菜薹等作物,由于基因型的影响,再生不定芽的频率很低,需要不断研究适合该材料不定芽再生的各种因素,以建立一个重复性高的高效再生体系。

转化率低是芸薹属转化面临的又一问题。目前,一些芸薹属作物转化率可高达 50%,

但由于转化受体不同,即使是同一作物转化率也存在很大差异。如甘蓝型油菜,以子叶为外植体进行转化,转化率为55%,而以花粉胚和小孢子为外植体,转化率仅为0.29%和0.09%。因此,如何提高转化率,建立高效重复性高的转化系统仍是今后研究的重要课题。

筛选方法问题也是芸薹属作物遗传转化过程中不容忽视的问题。应用于芸薹属作物转化的筛选剂种类很多,最常用的是卡那霉素,应用卡那霉素筛选不乏成功的报道^[4,14,21,31],但有的学者认为^[3],卡那霉素影响芸薹属作物转基因植株的获得。还有的试验表明^[16],共培养后,分化培养基中直接加入卡那霉素,阻止了外植体的分化,恢复一段时间再加入可以形成转化组织。总之,选择合适的筛选方法在芸薹属转化中十分重要。

[参考文献]

- [1] 周 音,张智奇,王少鸥,等. 十字花科植物转基因技术研究进展及存在问题[J]. 吉林农业大学学报,1996,18(1):96~102.
- [2] 贾士荣,曹冬孙. 转基因植物[J]. 植物学报,1992,9(2):3~15.
- [3] 何玉科. 发根土壤杆菌在芸薹属作物上的高效遗传转化[J]. 西北农业大学学报,1989,17(4):1.
- [4] 程振东,卫志明,许智宏. 根瘤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.
- [5] Pua E C, Mehra P, Nagy F, et al. Transgenic plants of *Brassica napus* L. [J]. Bio Technology, 1987, 5: 815~817.
- [6] 石淑稳,周永明,王新发. 影响油菜子叶外植体不定芽高频率再生的因素[J]. 西北植物学报,1998,18(1):477~482.
- [7] Murata M, Orton T J. Callus intiation and regeneration capacities in *Brassica* species[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1987, 11: 111~123.
- [8] 张 鹏,凌定厚. 提高菜心离体植株再生频率的研究[J]. 植物学报,1995,37(11):902~908.
- [9] 张 松,魏毓棠,温孚江,等. 利用乙烯抑制剂 AgNO₃ 建立大白菜高频率植株再生体系[J]. 园艺学报,1997,24(1):94~96.
- [10] 李开莲,李耿光,张兰英,等. 菜心愈伤组织的诱导与植株再生. 中国科学院华南植物研究所集刊[J]. 1990, (6): 81~86.
- [11] Damgaard O, Hollund J L, Rasmussen O S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Brassica napus* winter cultivars[J]. Transgenic Research, 1997, 6(4): 279~288.
- [12] Kenneth A, Feldmann, Marks M D. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach[J]. Mol Gen Genet, 1987, 208: 1~9.
- [13] 张广辉,孔振辉,薛万新,等. 大白菜和油菜真空渗入遗传转化法初报[J]. 西北农业大学学报,1998,26(4):1~4.
- [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] 金 波,王纪方,贾春兰,等. 甘蓝花茎培养的研究[J]. 园艺学报,1982,9(1):53~57.
- [16] 程继鸿. 抗虫基因在芸薹属蔬菜作物上的遗传转化[D]. 陕西杨陵:西北农业大学园艺系,1994.
- [17] 李树贤,陈远英. 结球甘蓝下胚轴组织培养形态发生的组织研究[J]. 西北植物学报,1993,13(4):271~275.
- [18] Yang M Z, Jia S R, Pua E C. High frequency of plant regeneration from hypocotyl explants of *Brassica carinata* [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1991, 24: 79~82.
- [19] 黄菊辉,周长久,秦凤琴,等. 发根农杆菌的 Ri T-DNA 对茎用芥菜的遗传转化[J]. 植物学报,1994,36(12):911~917.
- [20] 蓝海燕,陈正华. 农杆菌介导的芸薹属植物遗传转化技术的研究进展[J]. 生物技术通报,1999, (3): 15~18.
- [21] 卢爱兰,陈正华,孔令洁,等. 抗芜菁花叶病毒转基因甘蓝型油菜的研究[J]. 遗传学报,1996,23(1):77~83.
- [22] 张智奇,周 音,张玉华,等. 小白菜子叶诱导不定芽再生植株[J]. 上海农业学报,1998,14(2):25~28.
- [23] Juo S I, Kwon S Y, Paek K Y, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of fertile transgenic plants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cvspring flavor) [J]. Plant Cell Rep, 1995, 14(10): 620~625.
- [24] Mukhopadhyay A, Arumugan N, Nandakumar P B A, et al. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*; transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration [J]. Plant Cell Rep, 1992, 11(10): 506~513.

- [25] Chi G L, Pua E C. Ethylene inhibitors enhances *de novo* shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp *chinensis* (Chinese cabbage) *in vitro* [J]. Plant Sci, 1989, 64(2): 243~250.
- [26] Chi G L, Barfield D G, Sim G E, et al. Effect of AgNO₃ and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes [J]. Plant Cell Rep, 1990, 9(4): 195~198.
- [27] Palmer C. Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate [J]. Plant Cell Rep, 1992, 11(11): 541~545.
- [28] 蔡小宁, 余建明, 朱 祯, 等. 建立青菜 (*Brassica chinensis*) 农杆菌介导法基因转化体系 [J]. 江苏农业学报, 1997, 13(2): 110~114.
- [29] 张 鹏, 傅爱根, 王爱国. AgNO₃ 在植物离体培养中的作用及可能的机制 [J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(5): 376~379.
- [30] 石淑稳, 周永明. 甘蓝型油菜下胚轴培养和高频率芽再生技术的研究 [J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(2): 1~6.
- [31] 余建明, 蔡小宁, 朱 祯, 等. 结球甘蓝的离体再生及基因转化条件研究 [J]. 江苏农业学报, 1996, 12(3): 6~9.
- [32] 毛慧珠, 唐 惕, 曹湘玲, 等. 抗虫转基因甘蓝及其后代的研究 [J]. 中国科学 (C 辑), 1996, 26(4): 341~347.
- [33] Metz T D, Dixon R, Earle E D. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*) [J]. Plant Cell Rep, 1995, 15: 287~292.
- [34] Metz T D, Roush R T, Shelton A M, et al. Transgenic broccoli expressing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein: implication for pest resistance management strategies [J]. Molecular Breeding, 1995, 1: 309~317.
- [35] Li X B, Mao H Z, Bai Y Y, et al. Transgenic plants of rutabaga (*Brassicana napobrassica*) tolerant to pest insects [J]. Plant Cell Rep, 1995, 15: 97~101.
- [36] Passelegue E, Kerlan C. Transformation of cauliflower (*B. oleracea* var. *botrytis*) by transfer of cauliflower mosaic virus genes through combined cocultivation with virulent and avirulent strains of *Agrobacterium* [J]. Plant Science Limerick, 1996, 113(1): 79~89.
- [37] 彭仁旺, 周雪荣, 方荣祥, 等. 转基因雄性不育油菜选育简介 [J]. 遗传学报, 1996, 23(1): 84.
- [38] 彭仁旺, 周雪荣, 王峻岭, 等. 表达 *barstar* 基因及 *bar* 基因的转基因油菜的研究 [J]. 遗传学报, 1998, 25(1): 74~79.

Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Brassica* crops

ZHANG Gui-hua, GONG Zhen-hui, ZHANG Guang-hui

(Department of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this review, advances and problems on the study of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Brassica*, such as establishment of efficient plant regeneration system and infection method are represented.

Key words: *Brassica*; *Agrobacterium*; genetic transformation