

小白菜植株原位真空渗入遗传转化相关因子的研究^{*}

宋正旭, 巩振辉

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 在GV 3101和LBA 4404 2个农杆菌菌株的介导下,以3个品种小白菜(*B. rassaica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis* Tsen et Lee)为试材,对影响小白菜植株原位真空渗入遗传转化效率的相关因子进行了研究。结果表明,不同小白菜基因型的转化效率不同,其中黄心乌的转化率最高;不同菌株的转化效率亦有差异,LBA 4404的转化效率高于GV 3101;植株打薹后10 d转化率高于其他几个时期;植株大小对转化率的影响不显著。

[关键词] 小白菜;遗传转化;植株原位真空渗入法

[中图分类号] S634.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)02-0112-03

植株原位真空渗入遗传转化方法是近年来基因工程领域的一种新的遗传转化方法,其优点是操作简单,成本低廉且无须组织培养,已在多种芸薹属作物上获得成功^[1~3]。在拟南芥和大白菜上的试验表明^[1~2],转化效率受植株发育时期、真空渗入时间、渗入培养基孢子体光密度以及处理部位等多种因素的影响。然而,关于小白菜植株原位真空渗入遗传转化方法尚未见报道。本研究旨在探索影响小白菜植株原位真空渗入遗传转化的相关因子,为建立和优化小白菜乃至芸薹属作物的高效遗传转化体系奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材 料

3个供试小白菜品种“上海青”、“黄心乌”和“四月慢”分别由西北农林科技大学农城种业科技推广中心、南京市蔬菜种子站和杭州市种子公司提供。菌株GV 3101携带CaMV Bari-1株系基因V I和hpt基因,其表达载体构建参考文献[1]。菌株LBA 4404携带npt II基因和gus报告基因,其表达载体构建参考文献[4]。

1.2 基因转移及筛选

方法同文献[1]。所使用真空泵为2XZ-4型直联式真空泵,极限压力为0.06 Pa,抽气速率为4 L/s。获得的T1种子播于筛选培养基(1/2 MS, 8 g/L琼

脂,潮霉素或卡那霉素50 mg/L)进行筛选,20 d后将抗性植株移栽于温室。

1.3 不同农杆菌菌株和不同植物基因型对转化的影响试验

农杆菌菌株分别为GV 3101和LBA 4404,材料为处于薹期初期的黄心乌、上海青和四月慢3个小白菜品种,渗入菌液OD₆₀₀ = 0.82。

1.4 植株不同发育时期对转化的影响试验

菌株为LBA 4404,材料为处于薹期初期的四月慢,渗入菌液OD₆₀₀ = 0.80,分别取花芽分化前(解剖镜下观察)、花芽分化后抽薹前、抽薹后和打主薹后10 d(主薹高3~5 cm时打掉主薹后10 d)的植株进行真空渗入。

1.5 植株不同大小对转化的影响试验

菌株为LBA 4404,材料为处于薹期初期的四月慢,渗入菌液OD₆₀₀ = 0.76,分别取3种不同形态大小的植株进行真空渗入处理。

1.6 PCR 检测

DNA提取参考文献[4]进行。pBI121中含有CaMV 35S启动子,用PCR进行检测。2个引物分别为5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3'和5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3',产物长度为184 bp。反应在50 μL体系中进行,循环参数为94℃ 10 min,40个循环(94℃ 30 s,56℃ 50 s,72℃ 50 s),72℃ 8 min。PCR反应结束后电泳检查各个抗性植株是

* [收稿日期] 2002-04-22

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39770522);陕西省自然科学基金资助项目(2001SM11);科技部杨凌生物育种中心基金资助项目;陕西省农业分子生物学重点实验室基金

[作者简介] 宋正旭(1977-),男,山东即墨人,博士,主要从事蔬菜植物生物技术研究。现在青岛市农业科学研究所工作,邮编266100。

否含有 CaMV 35S 启动子。

2 结果与分析

2.1 小白菜不同品种及不同农杆菌菌株的转化效率

小白菜不同品种的转化效率有明显差异。结果(表 1)表明, 用 2 种菌株进行转化, 黄心乌的转化效

率均最高, 分别达 1.49% 和 1.16%; 四月慢的转化率最差, 分别为 0.85% 和 0.72%。同时, 表 1 还表明, 不同农杆菌菌株对转化效率有明显的影响, LBA 4404 的转化效果优于 GV 3101。这与采用叶盘法和下胚轴法进行遗传转化获得的结果一致^[5]。

表 1 小白菜不同品种和不同农杆菌菌株对转化效果的影响

Table 1 Effects of different varieties of pakchoi and different strains of *Agrobacterium tumefaciens* on the frequency of transformant

农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	品种 Variety	所筛选种子数 No. of screening T1 seeds	抗性苗数 No. of resistance seedlings	转化率/% Percentage of transformant
GV 3101	黄心乌 Huangxinwu	1 124	13	1.16
	上海青 Shanghaiqing	1 120	9	0.80
	四月慢 Siyueman	958	7	0.72
LBA 4404	黄心乌 Huangxinwu	1 135	17	1.49
	上海青 Shanghaiqing	1 300	12	0.93
	四月慢 Siyueman	1 174	10	0.85

2.2 植株不同发育时期的转化效率

由表 2 可见, 用不同生长发育时期的植株进行遗传转化都获得了转化种子。其中未通过花芽分化的植株转化效果最差, 转化率仅为 0.27%; 花芽分化后到开花前的植株转化率逐渐升高, 打主薹后 10

d 的植株转化率达到 1.04%。这说明植株不同生长发育时期显著影响其转化效果, 小白菜在薹期比其他时期对农杆菌介导更为敏感。这与在拟南芥、大白菜和油菜上得到的结果一致^[1~2]。

表 2 植株不同发育时期对转化效果的影响

Table 2 Effects of different development stages of pakchoi plants on the frequency of transformant

发育时期 Development stage	所筛选种子数 No. of screening T1 seeds	抗卡那霉素苗数 No. of resistance Kanamycin seedlings	转化率/% Percentage of transformant
花芽分化前 Period before flower bud differentiation	723	2	0.27
抽薹前 Period before bolts	607	4	0.65
初抽薹 Period of emerging bolts	2 059	20	0.97
打主薹后 10 d 10 days after clipping emerging bolts	1 106	12	1.04

作者等曾用花期植株进行真空渗入处理, 结果处理后植株缓苗严重, 生长不良, 未能获得转基因种子。同时进行浸花处理, 得到了转基因种子, 但转化率较低。Clough 等^[6]在氮南芥上进行浸花试验, 获得了转基因植株。由此可见, 花期植株对农杆菌介导是敏感的。花期进行真空渗入未能得到转化种子, 可能是由于真空渗入处理对花期伤害较大。浸花有可能是一条有希望的遗传转化途径。

2.3 不同大小植株的转化效果

不同大小植株对转化效果影响不显著。表 3 显示, 3 种不同形态大小的植株转化率在 0.97%~1.00%, 无明显差异。从能否获得较多转化种子的角度看, 应采用生长健壮、高大的植株作为试验材料。试验中, 还使用了高达 36 cm 的植株进行处理, 结果由于植株太大, 渗入时侧薹易断折, 最后收获种子也

较少。因此, 建议真空渗入时应根据渗入容器的大小, 选用大小适中、生长健壮的植株。

表 3 不同大小植株对转化效果的影响

Table 3 Effects of different plant in size on the frequency of the transformant

不同大小植株 Different plant in size	所筛选种子数 No. of screening T1 seeds	抗卡那霉素苗数 No. of resistance kanamycin seedlings	转化率/% Percentage of transformant
a	201	2	1.00
b	2 059	20	0.97
c	403	4	0.99

注: a 类植株株高为 20.6 cm, 叶片数为 18.5; b 类植株株高为 16.3 cm, 叶片数为 13.5; c 类植株株高为 10.9 cm, 叶片数为 8.0。

Note: a Plants having a height of 20.6 cm and 18.5 leaves; b Plants having a height of 16.3 cm and 13.5 leaves; c Plants having a height of 10.9 cm and 8.0 leaves

2.4 PCR 检测

从卡那霉素抗性苗中随机挑选 10 株进行 PCR

检测, 其中 5 株得到了 184 bp 的目标条带(图 1)。扩增结果初步说明外源基因已整合到植物基因组中。



图 1 转基因植株的 PCR 检测

1 标准分子量; 2 质粒阳性对照; 3 四月慢阴性对照; 4~7 四月慢卡那霉素抗性植株; 8 上海青阴性对照; 9~12 上海青卡那霉素抗性植株

Fig. 1 PCR detection of transgenic plant

1 DNA marker; 2 The positive control; 3 Siyueman negative control; 4~7 Kan resistance plant of Siyueman;

8 Shanghaiqing negative control; 9~12 Kan resistance plant of Shanghaiqing

3 讨 论

影响植株原位真空渗入遗传转化的因素众多。巩振辉等^[1,2]研究表明, 真空渗入时间、接种体孢子浓度和植株不同发育时期是影响植株原位真空渗入遗传转化的重要因素。本试验中发现, 小白菜基因型和农杆菌菌株对转化率有重要影响, 是影响植株原位真空渗入遗传转化的两个重要因素。在试验所用的 2 个农杆菌菌株中, LBA 4404 感染力最强。苏军等^[7]使用 A GL -1, EHA 105 和 LBA 4404 进行研究,

结果表明, A GL -1 感染力最强, EHA 105 次之, LBA 4404 最弱。因此, 试验前有必要对农杆菌菌株进行选择。

植株不同发育时期是影响植株原位真空渗入遗传转化的重要因素。根据植株不同发育时期和不同大小植株对转化效果的影响, 可以确定植株原位真空渗入遗传转化的适宜苗态, 即小白菜通过春化, 在打主薹 10 d 后, 此时植株生长健壮, 可选择真空渗入所用容器能够容纳且不受损伤的高大、叶片数多的植株。

[参考文献]

- [1] 巩振辉, Milner J J, 何玉科. 拟南芥基因转移新方法——真空渗入法的研究[J]. 西北植物学报, 1996, 16(3): 277- 283
- [2] 张广辉, 巩振辉, 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
- [3] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusion: β glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in high plants[J]. EMBO J, 1987, 6: 3901- 3907.
- [4] Marks L i, Peter Brodmann, Ford T L, et al. Lupac collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried power[J]. Journal of AOAC International, 1999, 82(4): 923- 938
- [5] 李洪清, 李美茹. 影响农杆菌介导植物基因转化的因素问题[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(2): 145- 151.
- [6] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* -mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 1998, 16(6): 735- 743
- [7] 苏 军, 段榕琦, 胡昌泉, 等. 农杆菌介导的小白菜的 *gus* 基因瞬时表达[J]. 福建果树, 2000, (2): 3- 5

In-planta agrobacterium mediated transformation with vacuum infiltration in pakchoi

SONG Zheng-xu, GONG Zhen-hui

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

Abstract: Factors on genetic transformation of plant in situ vacuum infiltration mediated by two strains of *Agrobacterium tumefaciens* were investigated in three varieties of pakchoi. It showed that Huang xinwu was the best one for vacuum infiltration in the three varieties; LBA 4404 strain excelled GV 3101 strain in transformation; 10 days after clipping emerging bolt was the optimum stage for vacuum infiltration; there was no difference in transformation ratio between several plants with different size.

Key words: pakchoi; genetic transformation; vacuum infiltration