

84 K 杨再生和遗传转化体系的优化

李科友,樊军锋,赵 忠,周永学,高建社

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了优化 84 K 杨的再生和遗传转化体系,以 84 K 杨树叶片为外植体,采用正交试验研究了不同培养基和激素配比对芽和芽苗生根的影响,并从预培养时间、浸染菌液浓度、浸染时间、共培养时间及添加 AS(乙酰丁香酮)5 个方面,以卡那霉素抗性苗频率为衡量指标,研究了各因素对 84 K 杨遗传转化率的影响。结果表明,84 K 杨叶片最适的芽诱导培养基及激素配比为 MS+G-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L,芽苗最适诱导生根培养基及激素配比为 1/2 MS+NAA 0.05 mg/L+IBA 0.05 mg/L;优化筛选的最适转化体系为:农杆菌活化菌液用 MS 液体培养基稀释 10 倍,浸染 5 min,共培养 4 d。采用上述优化的再生和遗传转化体系,84 K 杨每片叶平均生芽数可达 20 个,芽苗生根率可达 99%,生根数为 6 条,叶盘转化率可达 35%。

[关键词] 84 K 杨;再生系统;遗传转化;转化率

[中图分类号] S792.119.04

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)07-0090-07

Prioritization of the system of regeneration and genetic transformation of Populus 84 K

LI Ke-you, FAN Jun-feng, ZHAO Zhong, ZHOU Yong-Xue, GAO Jian-she

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

Abstract: To prioritize the system of regeneration and genetic transformation of Populus 84 K, influences of different medium and proportion of hormone on bud and root of leaf-explant were studied by orthogonal designing. The impact of five aspects (pre-culture time, the concentration of agro-infection, infect time, co-culture time and addition of AS) on genetic transformation frequency of Populus 84 K was studied, with the rate of kanamycin resistance seedling as the measure index. The results demonstrated that the optimal differentiation medium and proportion of hormone for leaf-explant was MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L, and the optimal rooting medium and proportion of hormone for shoot was 1/2 MS+NAA 0.05 mg/L+IBA 0.05 mg/L. The optimal prioritization optimal system was as follows: to use MS dilute activated agro-infection for 10 times, to infect 5 minutes and to co-culture for 4 days. By adopting above prioritization system of regeneration and genetic transformation, every leaf of populus 84 K could be induced 20 buds on average, rooting rate achieved 99%, rooting number was 6, and transforming rate of leaf disc was 35%.

Key words: Populus 84 K; regeneration system; genetic transformation; transforming rate

84 K 杨(银腺杨, *Populus alba* × *Populus glandulosa*)是南韩培育成功的一个著名白杨派内

* [收稿日期] 2006-12-12

[基金项目] 科技部国家转基因植物研究与产业化专项(J Y03-B-26-02)

[作者简介] 李科友(1962-),男,陕西武功人,副教授,主要从事林木生物技术和植物化学研究。

[通讯作者] 樊军锋(1962-),男,陕西扶风人,副教授,主要从事林木遗传育种研究。

种间杂种。1984年引入我国,2000年在陕西通过林木良种审定。由于其抗逆性强,材质好,苗期生长快,在陕西及西北林业生产中占有重要地位。近年来,由于人工用材林和生态防护林种植树种比较单一,致使虫害发生严重,造成严重的经济损失。因此,培育抗逆性强的林木良种成为当务之急。采用常规育种方法改良林木抗性周期长、工序复杂、费时费工,且受气候、地域和水分等的影响,选育新品种难度大。而基因工程的发展为林木新品种的培育开辟了一条经济而有效的途径^[1]。一个高效的组培再生系统和遗传转化体系,是植物基因工程成功的先决条件。关于84 K杨再生系统和遗传转化的研究虽有报道^[2-3],但未见对其再生系统和遗传转化因子进行优化的报道。本研究对84 K杨叶片再生系统和遗传转化因子进行了优化,通过对影响遗传转化频率的几个主要因素的研究,筛选优化适合84 K杨遗传转化的因子(处理)组合,以期为提高该树种的基因转化效率提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 84 K杨无菌叶片外植体的获取 取80 cm长的健壮84 K杨越冬苗干若干段,放入27 °C温室水培,每3 d换水1次。2周后,待茎段上嫩芽长至5~10 cm时,剪取嫩茎,用1 g/L升汞消毒5~10 min或100 g/L次氯酸钠消毒10~15 min,再用无菌水冲洗3次后,放入MS培养基中培养。2个月后,取嫩茎上新长出的无菌叶片作为外植体优化再生系统,以无菌试管苗第3~5个叶片作为优化遗传转化因子的材料。

1.1.2 抗虫基因、植物表达载体及农杆菌菌株 本试验所转基因为中国科学院微生物研究所构建的Cry1Ac(部分改造的Bt基因)和API(慈菇蛋白酶抑制剂基因)双抗虫基因^[4]。植物双价双元表达载体pBtiA由中国科学院微生物研究所提供^[4],pBtiA上含有双价抗性基因Cry1Ac和API、双重增强的35S启动子、TMV“Ω”片段的翻译增强子和NPT II卡那霉素抗性标记基因。农杆菌菌株选用LBA4404,将pBtiA双价双元表达载体采用电击法转入LBA4404。

1.2 84 K杨再生系统的优化

以培养基、生长素、细胞分裂素为3个试验因素,每因素设3个水平,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,共9个处理(表1)。将无菌叶片沿主脉横切后放入以上

9个处理中,每个培养皿设置1个处理,每处理放入40片84 K杨叶片。将培养皿置于温度为25~27 °C、光照强度2 000~3 000 lx、日光照为16 h的培养间培养。每2周换1次新鲜培养基。培养8周时,统计各处理叶片切口上产生的诱导芽数量,根据诱导芽数量及生长状况筛选最佳芽诱导培养基。

用不同种培养基和不同种激素浓度,设计10种生根处理(表2)。将叶片上诱导产生的长度为1 cm左右的芽苗放入以上生根处理中。培养30 d,根据各处理生根数量、根长、根粗及芽苗底端生根处愈伤组织大小,筛选最适生根培养基及激素配比。

1.3 84 K杨转化受体系统的建立和优化

1.3.1 转化受体系统中抗生素的筛选 将无菌84 K杨叶片沿主脉横切,放入含有0,20,30,40,50和60 mg/L卡那霉素(Km)的不定芽诱导培养基MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L中培养,每处理20片叶,每10 d换1次培养基。60 d后根据叶片上不定芽分化及生长状况,筛选叶片外植体卡那霉素临界耐受质量浓度。

将长度约1 cm的40个不定芽放入含有0,20,40,60和80 mg/L卡那霉素的生根培养基1/2 MS+NAA 0.05 mg/L+IBA 0.05 mg/L中培养,每处理40个不定芽。培养30 d后,根据各处理生根状态,筛选适宜不定芽生根诱导的卡那霉素临界耐受质量浓度。

将头孢霉素(Cef)、羧苄霉素(Carb)的浓度设为200,300,500,600,800和1 000 mg/L,观察不同种类不同浓度的抑菌抗生素对农杆菌LBA4404的抑制作用。设无抗生素、Cef 300 mg/L和Carb 300 mg/L 3种处理,研究不同种类抑菌性抗生素对叶盘分化不定芽的影响。

上述试验的培养条件均为温度(25±1) °C,每天光照12~14 h,光照强度为2 000~3 000 lx。

1.3.2 转化系统的优化 转化前一天晚上,用接种环取保存在YEP半固体培养基上的含有Cry1Ac和API的LBA4404单菌落,接种到YEP液体培养基200 mL中,于28 °C、150 r/min过夜振荡培养,使农杆菌处于旺盛对数生长期。

取无菌试管苗第3~5片叶,用手术刀在叶脉处横切划痕后,浸入用10倍MS液体培养基稀释活化的LBA4404菌液中,浸泡5 min后取出,接种在不含任何抗生素的芽诱导培养基MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L中。在(25±2) °C暗室中共培养4 d后,转入MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA

0.05 mg/L + 500 mg/L Carb + 50 mg/L Km 芽诱导筛选培养基中继续培养。每 10~15 d 换 1 次筛选培养基。60 d 后,待转化芽长度达 1 cm 左右,转入生根培养基 1/2 MS + NAA 0.05 mg/L + IBA 0.05 mg/L + 60 mg/L Km 中继续培养。30 d 后,选择生长健壮的生根卡那霉素抗性植株,作为初选转化植株。

在转化因子筛选试验中,除试验因子外,其他因子处理均按上述方法进行,每处理 20 片叶。

(1) 预培养时间对转化的影响。转化前,分别设置 0(对照),1,2,3,4,5,6 和 7 d 预培养,培养基为不定芽诱导培养基。

(2) 浸染菌液浓度对转化的影响。为了简化试验程序,将每次活化农杆菌的 YEP 培养基体积确定为 200 mL,过夜振荡培养至稀奶状并无絮状沉淀产生即为对数生长期,然后对此菌液用 MS 液体培养基稀释不同倍数,以研究稀释此状态农杆菌对 84 K 杨转化率的影响。稀释倍数设置为 0,5,10,20 和 30 倍 5 个处理。

(3) 浸染时间对转化的影响。浸染时间分别设置为 1,5,10 和 15 min 4 个处理。

(4) 共培养时间对转化的影响。共培养时间分别设置为 1,2,3,4,5,6 和 7 d 7 个处理。

表 1 不同培养基及 6-BA 和 NAA 组合诱导 84 K 杨叶片外植体生芽效果比较

Table 1 Comparison of induced shoot production of leaf-explant under different 6-BA/ NAA concentration

试验编号 Experiment No.	培养基种类 Medium kinds	6-BA/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	处理叶片数 Treatment leaf number	芽点出现时间/ d Bud productive time	每叶片平 均生芽数 Every leaf average buds	芽苗状态 Bud condition
1	MS	0.1	0.01	40	21	12	生长健康, 长度大小为 0.8~1.2 cm Growth good, Long 0.8 - 1.2 cm
2	MS	0.5	0.05	40	21	20	
3	MS	1.0	0.10	40	21	18	
4	1/2MS	0.1	0.10	40	22	10	
5	1/2MS	0.5	0.01	40	22	10	
6	1/2MS	1.0	0.05	40	22	12	
7	3/2MS	0.1	0.05	40	23	8	
8	3/2MS	0.5	0.10	40	23	9	
9	3/2MS	1.0	0.01	40	23	11	
K ₁	50	30	33	T = 110			
K ₂	32	39	40				
K ₃	28	41	37				
k ₁	16.7	10	11				
k ₂	10.7	13	13.3				
k ₃	9.3	13.7	12.3				
R	7.4	3.7	2.3				

注:MS 培养基根据文献[5]配制;1/2MS 培养基中大量元素、钙元素、蔗糖用量减半,其余成分同 MS 培养基;3/2MS 培养基中大量元素、钙元素含量同 MS 培养基,其余成分增加到 1.5 倍。

Note:MS Medium reference [5] preparation;1/2MS medium macroelement ,calcium and sucrose reduce half ,others are the same as MS; 3/2MS medium macroelement and calcium are the same as MS,others increase to 1.5 time of MS.

从表 1 可知,基本培养基是影响杨树叶片分化 芽的主要因素,其次是细胞分裂素,生长素的影响较

(5) 共培养中添加乙酰丁香酮(AS)对转化的影响。AS 浓度分别设置为 0,50,100 和 200 μmol/L 4 个处理。

上述试验培养条件同 1.3.1。

转化率评价指标:以转化 30 d 后在生根筛选培养基中培养保留的卡那霉素抗性苗百分率,作为评价转化频率的指标。

转化率/ % = [(30 d 后存活的抗性苗)/(30 d 后存活的抗性苗 + 30 d 后死亡的不抗性苗)] × 100 %。

2 结果与分析

2.1 84 K 杨再生系统的优化

2.1.1 不同芽诱导处理诱导叶片外植体生芽的效果比较 将 84 K 杨叶片沿主脉横切放入按 L₉(3⁴) 正交试验设计的 9 种处理中,约 2 周后,叶片切口突起,出现肉眼可见的愈伤组织;3 周左右,部分处理愈伤组织分化产生小米粒大小芽点,部分愈伤组织体积增大,但并不分化出芽点;4 周左右,芽点伸长至 0.2~0.3 cm,并长出 1~2 片叶子;8 周左右,芽苗长度可达 0.5~1.2 cm,并出现 2~4 片叶子。此时,统计各处理平均诱导生芽数及芽生长状态,结果见表 1。

表 1 不同培养基及 6-BA 和 NAA 组合诱导 84 K 杨叶片外植体生芽效果比较

Table 1 Comparison of induced shoot production of leaf-explant under different 6-BA/ NAA concentration

试验编号 Experiment No.	培养基种类 Medium kinds	6-BA/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	处理叶片数 Treatment leaf number	芽点出现时间/ d Bud productive time	每叶片平 均生芽数 Every leaf average buds	芽苗状态 Bud condition
1	MS	0.1	0.01	40	21	12	生长健康, 长度大小为 0.8~1.2 cm Growth good, Long 0.8 - 1.2 cm
2	MS	0.5	0.05	40	21	20	
3	MS	1.0	0.10	40	21	18	
4	1/2MS	0.1	0.10	40	22	10	
5	1/2MS	0.5	0.01	40	22	10	
6	1/2MS	1.0	0.05	40	22	12	
7	3/2MS	0.1	0.05	40	23	8	
8	3/2MS	0.5	0.10	40	23	9	
9	3/2MS	1.0	0.01	40	23	11	
K ₁	50	30	33	T = 110			
K ₂	32	39	40				
K ₃	28	41	37				
k ₁	16.7	10	11				
k ₂	10.7	13	13.3				
k ₃	9.3	13.7	12.3				
R	7.4	3.7	2.3				

注:MS 培养基根据文献[5]配制;1/2MS 培养基中大量元素、钙元素、蔗糖用量减半,其余成分同 MS 培养基;3/2MS 培养基中大量元素、钙元素含量同 MS 培养基,其余成分增加到 1.5 倍。

Note:MS Medium reference [5] preparation;1/2MS medium macroelement ,calcium and sucrose reduce half ,others are the same as MS; 3/2MS medium macroelement and calcium are the same as MS,others increase to 1.5 time of MS.

从表 1 可知,基本培养基是影响杨树叶片分化 芽的主要因素,其次是细胞分裂素,生长素的影响较

小。3 种基本培养基以 MS 效果最好,优于 1/2 MS 和 3/2 MS 培养基。叶片外植体诱导生芽最适培养基及激素配比为:MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L,在此条件下每片叶平均生芽数达 20 个。

2.1.2 不同生根培养基诱导芽苗生根的效果比较
为了选择合适的生根培养基和激素,设计了 84 K 杨芽苗生根试验,结果见表 2。表 2 表明,单独使用 NAA 或 IBA,诱导生根效果较混合使用效果差;1/2 MS 培养基的生根效果优于 MS 培养基。芽苗诱导生

根时,若激素使用量小,不易诱导出根;若激素量过大,在诱导出根系的同时,常在芽苗底部生根处产生愈伤块,该愈伤块影响根系与根茎牢固结合,降低芽苗移栽成活率,故愈伤块愈小愈好。84 K 杨芽苗最佳诱导生根培养基及激素配比为 1/2 MS + NAA 0.05 mg/L + IBA 0.05 mg/L,在此条件下芽苗在培养 30 d 时的生根率可达到 99%,每个芽苗生根数平均为 6 条。

表 2 不同培养基和激素配比诱导 84 K 杨芽苗生根的效果比较

Table 2 Comparison of induced root production under different medium and NAA/ IBA concentration						
培养基种类 Medium kinds	NAA/ (mg ·L ⁻¹)	IBA/ (mg ·L ⁻¹)	每处理芽苗数 Treatment shoot number	芽苗生根率(30 d)/ % Shoot rooting rate (30 d)	每个芽苗平均生根数 Every shoot average rooting number	根系状况 Rooting condition
1/2MS	0.01	0	20	80	3.2	根细,较长,数量少 Root thin ,longer ,number little
1/2MS	0	0.01	20	65	2.5	根粗,较短,数量少,有愈伤组织 Root thick ,shorter ,number less ,callus
1/2MS	0.01	0.05	20	75	4.4	根较粗,较短,数量较少,有愈伤组织 Root thicker ,shorter ,number less ,callus tissue
1/2MS	0.05	0.01	20	86	5.1	根粗,较长,数量较多,无愈伤组织 Root thicker ,longer ,number more ,callus tissue
1/2MS	0.05	0.05	20	99	6.0	根粗,较长,数量多,无愈伤组织 Root thicker ,longer ,number much ,no callus tissue
MS	0.01	0	20	76	2.3	根细,较长,数量少 Root thin ,longer ,number little
MS	0	0.01	20	60	2.1	根粗,较短,数量少,有愈伤组织 Root thick ,shorter ,number little ,callus tissue
MS	0.01	0.05	20	73	3.3	根较粗,较短,数量少,有愈伤组织 Root thicker ,shorter ,number little ,callus tissue
MS	0.05	0.01	20	80	4.3	根粗,较长,数量较少,无愈伤组织 Root thick ,longer ,number little ,no callus tissue
MS	0.05	0.05	20	90	5.2	根粗,较长,数量较多,无愈伤组织 Root thick ,longer ,number more ,callus tissue

2.2 84 K 杨转化受体系统中抗生素的筛选

2.2.1 卡那霉素敏感性试验 84 K 杨叶片外植体不定芽诱导卡那霉素耐受性试验结果见表 3,不定芽生根诱导对卡那霉素浓度敏感性试验结果见表 4。由表 3 和表 4 可知,84 K 杨叶片不定芽诱导的卡那霉素临界耐受质量浓度为 50 mg/L,84 K 杨不定芽生根诱导的卡那霉素临界耐受质量浓度为 40 mg/L。

2.2.2 抗生素对浸染农杆菌的抑制效果 外植体与农杆菌共培养后,其表面及浅层组织中共生有大量农杆菌,为抑制或杀死农杆菌,试验选用对革兰氏阴性菌有较好抑制作用的头孢霉素、羧苄霉素作为抑菌的抗生素,观察不同种类不同浓度的抗生素对农杆菌的抑制效果,结果见表 5。表 5 表明,当头孢霉素和羧苄霉素的质量浓度达到 300 mg/L 以上时,均可抑制农杆菌 LBA4404 的生长。

2.2.3 抑菌抗生素对叶盘分化不定芽的影响 不同种类的抑菌性抗生素对叶盘分化不定芽的影响结

果见表 6。表 6 表明,培养基中附加 Carb 或 Cef 对分化率影响不大,但比对照分化率稍有下降。Carb 与 Cef 相比,培养基中附加 Cef 时分化率较高,培养基中附加 Carb 时分化系数较高,可以看到更多的丛生芽出现。

表 3 84 K 杨叶片外植体卡那霉素浓度耐受性试验的结果

Table 3 Kanamycin resistance test on leaf explants		
Km/ (mg ·L ⁻¹)	叶片数 Leaf number	叶片及芽状态(60 d) Leaf and bud condition (60 d)
0	10	叶色深绿,芽长 1.0~1.5 cm Leaf deep green ,bud length 1.0 - 1.5 cm
20	10	叶色深绿,芽长 1.0~1.5 cm Leaf deep green ,bud length 1.0 - 1.5 cm
30	10	叶色深绿,芽长 1.0~1.2 cm Leaf deep green ,bud length 1.0 - 1.2 cm
40	10	叶色浅绿,芽长 0.8~1.2 cm Leaf light green ,bud length 1.0 - 1.2 cm
50	10	叶片大部分发褐,接近死亡 Leaf most brown , nearly dead
60	10	叶片发褐,死亡 Leaf brown ,dead

表 4 84 K 杨不定芽生根诱导卡那霉素敏感性试验结果

Table 4 Kanamycin resistance test on rooted shoots			
Km/ (mg · L ⁻¹)	芽苗数 Shoot number	生根率(30 d)/ % Rooting rate (30 d)	根长(30 d)/cm Root length (30 d)
0	18	100	1.5~2.0
20	18	78	1.0~1.5
40	18	44	0.5~1.0
60	18	28	0.3~0.5

表 6 不同抑菌抗生素对 84 K 杨叶盘不定芽分化率的影响

Table 6 Influence of different antibiotics for wiping out bacteria on bud regeneration					
抗生素浓度/ (mg · L ⁻¹)	参试叶盘数	有芽叶盘数	总芽数	分化率/ %	分化系数
Antibiotics concentration	Leaf disc number	Bud leaf disc number	Total buds	Differentiation rate	Differentiation coefficient
0	32	29	206	90.6	7.0
Cef 300	41	36	180	87.9	5.0
Carb 300	43	37	222	83.7	6.0

2.3 84 K 杨转化系统的优化

2.3.1 预培养时间对转化率的影响 用农杆菌感染外植体前,外植体是否要进行预培养,目前的研究结果很不一致,通常认为要依据植物种类和培养系统而定^[6]。一般认为,预培养可促进细胞分裂,处于分裂状态的细胞更易整合外源 DNA,因而可提高外源基因的短暂表达和稳定整合率^[7]。Villemont 等^[8]研究发现,植物细胞分裂处于 S 期最适 T-DNA 转移,处于 M 期最适 T-DNA 整合;如果转化所用叶片属已分化的组织,细胞处于 G0 期,为促进 T-DNA 转移与整合,必须使伤口细胞在共培养时已脱分化进入旺盛分裂状态。本试验结果表明,预培养时间较短(0~3 d),对 84 K 杨转化率的影响不大;预培养 4 d 以上时,转化率明显降低。这可能是由于长时间的预培养,使叶片伤口细胞再次由脱分化状态进入分化状态,故不利于外源 DNA 的进入与

表 5 抗生素对感染杨树叶片农杆菌的抑制效果

Table 5 Effects of antibiotics on inhibiting Agrobacterium in poplar							
抗生素	浓度/ (mg · L ⁻¹)						Concentration
Antibiotics	200	300	400	500	600	800	1 000
Cef	+	-	-	-	-	-	-
Carb	+	-	-	-	-	-	-

注:“+”表示农杆菌生长;“-”表示农杆菌未生长。
Note:“+”represents that there are Agrobacterium.“-”represents that there are no Agrobacterium.

整合。因此,84 K 杨遗传转化时可省去预培养。
2.3.2 菌液浓度对转化率的影响 在植物的遗传转化中,活化后的菌液必须稀释至一定浓度后再感染,因为农杆菌浓度过高,会使外植体产生过敏反应而丧失分化不定芽的能力。菌液稀释浓度对 84 K 杨转化率的影响结果见图 1。图 1 表明,84 K 杨对农杆菌感染比较敏感,直接用活化后的菌液感染,由于农杆菌浓度过高,叶片产生过敏反应,在培养中会逐渐褪绿坏死,褪绿首先发生在最易产生不定芽的叶脉切口处,最后蔓延至整个叶片,完全不能产生不定芽。随着菌液稀释倍数的增加,叶片坏死减少,不定芽数量增加,但转化率却呈下降趋势。综合考虑叶片不定芽诱导数量及转化率两个因素,最后确定将活化的菌液(单菌落接种于 200 mL YEP 液体培养基)稀释 10 倍后再感染,效果比较理想。

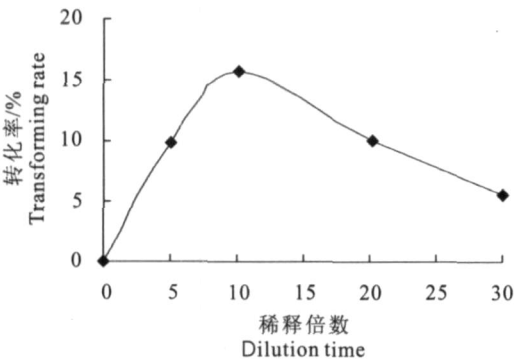


图 1 菌液浓度对 84K 杨转化率的影响

Fig.1 Influence of the concentration of agroinfection on transforming rate

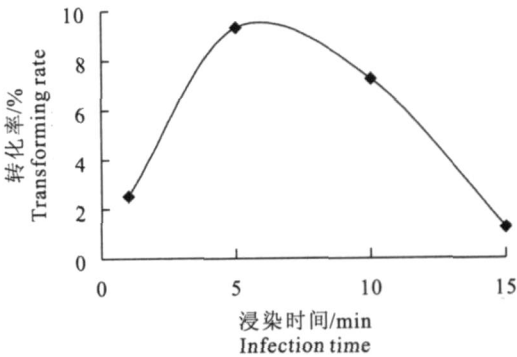


图 2 感染时间对 84K 杨转化率的影响

Fig.2 Influence of infection time on transforming rate

2.3.3 感染时间对转化率的影响 84 K 杨是农杆菌的天然宿主,易产生过敏反应而导致外植体切口

处白化坏死,加之农杆菌在活化时所加的卡那霉素对叶片也具毒害作用,叶片创伤又比较严重,所以应

采用较短的浸染时间。图2结果表明,84 K杨叶片浸染时间不同,则其转化率也不同,浸染5 min时转化率最高,可达到9.33%。

2.3.4 共培养时间对转化率的影响 遗传转化中,农杆菌附着、T-DNA的转移与整合都是在共培养时间内完成的,共培养时间太短或太长,会导致农杆菌附着不足或过度生长,最终引起转化率下降。因此,共培养时间对转化率影响很大,而且不同物种、外植体种类和农杆菌菌株的最佳共培养时间不同。试验结果(图3)表明,共培养4 d内,随着共培养时间的延长,转化率明显增加,共培养4 d时的转化率最高,为13.70%;4 d以后,由于农杆菌生长旺盛,Carb很难抑制其生长,导致叶片逐渐死亡,转化率明显下降。

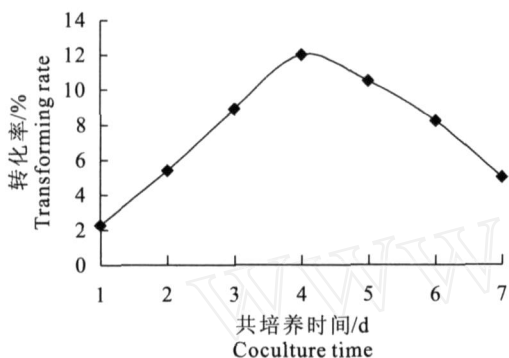


图3 共培养时间对84 K杨转化率的影响

Fig.3 Influence of the coculture time on transforming rate

3 结论与讨论

基因转化的效率与组织培养的效率和基因转化系统相关,筛选方法也是其中重要的一环。为促进转化细胞的分裂生长,抑制非转化细胞,必须对培养的细胞施加选择压^[11]。本试验通过正交试验,筛选出84 K杨叶片外植体诱导生芽最适培养基及激素配比为:MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L,最适芽苗诱导生根培养基为:1/2 MS+NAA 0.05 mg/L+IBA 0.05 mg/L。通过卡那霉素耐受性试验,确定了84 K杨叶片芽诱导Km的临界耐受质量浓度为50 mg/L,不定芽生根Km的临界耐受质量浓度为40 mg/L。

预培养对84 K杨转化率没有显著影响,这与Confalonieri等^[12]对欧洲黑杨的研究结果相似,但Leple等^[13]对杂种杨(*P. tremula* × *P. alba*)的研究表明,预培养2 d可以提高转化率。因此,是否要进行预培养,应依据不同的植物种类和培养系统而定。

2.3.5 AS对转化率的影响 研究表明,农杆菌对一系列植物酚类化合物具有趋化性,其可以使农杆菌质粒上的vir基因活化和表达^[6]。在遗传转化中,研究和应用最多的酚类化合物是乙酰丁香酮(AS)。AS可提高遗传转化率已在许多植物种上有报道,在杨属树种中,郝贵霞等^[9]在毛白杨的遗传转化中、诸葛强等^[10]在新疆杨的遗传转化中均发现,向共培养基中添加适当浓度的AS可显著提高转化率。

本研究结果(图4)表明,向共培养基中添加AS对84 K杨叶片转化率没有明显影响,而且随着AS浓度的增加,叶片褐化加重,产生不定芽的能力下降,转化率降低。

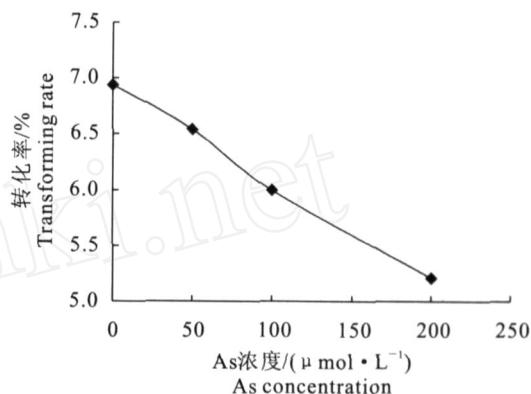


图4 添加AS对84 K杨转化率的影响

Fig.4 Influence of adding AS on transforming rate

向共培养基中添加AS对84 K杨叶片转化率也没有明显影响,分析其原因,可能是由于AS是一种酚类化合物,氧化后变成醌类物质而对植物产生了伤害,再加上植物受伤后本身容易产生酚类物质,使伤害加重;此外,AS对农杆菌的生长可能也有一定的伤害作用。

在遗传转化中,植物种类和外植体不同,采用的菌液浓度和浸染时间差别很大。一般处理原则是,对农杆菌比较敏感的植物和外植体,宜采用较低的菌液浓度和较短的浸染时间。在以往的研究中,对浸染菌液的浓度是用OD₆₀₀值来确定的,活化菌液稀释后必须测定其浓度,这样做不但麻烦而且不利于无菌操作。本试验采用固定活化培养基体积,并使活化菌液呈一定状态——稀奶状,最后用对此菌液稀释不同倍数的方法,确定最适转化菌液浓度,既方便又易于操作。

适宜的共培养时间也非常重要,共培养时间过短,农杆菌不能充分浸染切口细胞,转化率低;共培

养时间过长,农杆菌生长过多,会导致转化叶片死亡。Han 等^[14]认为,共培养时间至少需 48 h。在实际操作中,最佳共培养时间应以培养皿中转化叶片与培养基接触处出现肉眼可见菌落时为宜^[15]。

浸染菌液浓度(稀释倍数)、浸染时间、共培养时间是影响 84 K 杨叶盘遗传转化的主要因素,优化筛选的 84 K 杨叶盘最适转化系统为:200 mL 农杆菌活化菌液用 MS 稀释 10 倍,浸染 5 min,共培养 4 d。在后续试验中,按此方法 84 K 杨叶盘转化频率(卡那霉素抗性苗频率)可达 35 %。

影响遗传转化的因素很多,各因素之间可能存在交互作用,而且叶片、农杆菌状态会影响转化效果^[16]。因此,优化试验中试验设计的科学性、合理性,以及对叶片及农杆菌状态的控制十分重要。本研究所用叶片全部来自无菌试管苗第 3~5 片叶,农杆菌为卡那霉素筛选、活化的同一世代农杆菌,从而保证了试验材料的一致性和结果的可比性。为了消除交互作用对试验结果的影响,降低分析的难度,试验设计中采用了固定其他因素,仅变化一个因素水平来筛选该因素的方法,后续试验证明这种方法是十分有效的。本试验结果为 84 K 杨工厂化育苗及用叶盘法开展基因转化研究奠定了良好基础。

[参考文献]

- [1] 闫新甫. 转基因植物[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2003: 426.
- [2] 樊军锋, 李 玲, 韩一凡, 等. 84 K 杨叶片外植体再生系统的建立[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(2): 33-36.
- [3] 樊军锋, 韩一凡, 李 玲, 等. 84 K 杨耐盐基因转化研究[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(4): 33-37.
- [4] 田颖川, 郑均宝, 虞红梅, 等. 转双抗虫基因杂种 741 毛白杨的研究[J]. 植物学报, 2000, 42(3): 263-268.
- [5] 杨增海. 园艺植物组织培养[M]. 北京: 农业出版社, 1987: 342.
- [6] 贾士荣, 王志兴. 农杆菌介导的植物遗传转化[C] // 莽克强. 农业生物工程. 北京: 化学工业出版社, 1998: 85-115.
- [7] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002: 392.
- [8] Villemont E, Dubois F, Rajbir S, et al. Role of the host cell cycle in the agrobacterium-mediated genetic transformation of petunia: Evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer[J]. Planta, 1997, 201: 160-172.
- [9] 郝贵霞, 朱 桢, 朱之梯. 毛白杨遗传转化系统优化的研究[J]. 植物学报, 1999, 41(9): 936-940.
- [10] 诸葛强, 王婕琛, 黄敏仁, 等. 新疆杨高效遗传转化系统的建立[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(4): 6-10.
- [11] 杨敏生, 李志兰, 王 颖, 等. 双抗虫基因对三倍体毛白杨的转化和抗虫性表达[J]. 林业科学, 2006, 42(9): 61-68.
- [12] Confalonieri M, Allegro G. Genetic transformation of *Populus nigra* by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Reports, 1994, 13(7): 256-261.
- [13] Leple J C, Jordan M L, Svante P K, et al. Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs [J]. Plant Cell Reports, 1992, 11(1): 137-141.
- [14] Han K H C, Meilan R, Ma C, et al. An *Agrobacterium* transformation protocol effective in a variety of cottonwood hybrids (*genus populus*) [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 315-320.
- [15] 周冀明, 卫志明, 许智宏, 等. 根癌农杆菌介导转化诸葛菜获得转基因植株[J]. 植物生理学报, 1997, 23(1): 21-28.
- [16] Confalonieri M, Balestrazzi A, Bisoffi S, et al. *In vitro* culture and genetic engineering of populus spp.: synergy for forest tree improvement[J]. Plant-Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 72: 109-138.