

农杆菌介导的芥蓝遗传转化体系的建立

黄科^{1,2,3} 叶纨芝¹ 余小林¹ 向珣¹ 卢钢¹ 曹家树^{1*}

(¹浙江大学蔬菜研究所, 杭州 310029; ²福建农林大学农产品品质研究所, 福州 350002;

³福建省农业科学院蔬菜研究中心, 福州 350013)

摘要 采用正交旋转设计方法对影响芥蓝遗传转化体系的因素进行了优化研究, 结果表明: 影响芥蓝 Kan^R 苗率的最主要因素是 Kan 浓度, 而预培养时间和共培养时间是芥蓝遗传转化的主要影响因素。最利于芥蓝遗传转化的操作程序为: 将芥蓝无菌苗下胚轴在预培养基上预培养 2 天后, 在 LBA4404 菌液中感染 8 min, 置于共培养基培养基上培养 2 天, 随后把外植体转入含 Kan 的选择分化培养基上诱导不定芽, 28 天转瓶一次, 当抗性幼苗长至 2~3 cm 时, 齐愈伤组织处切下幼苗在生根培养基上诱导不定根, 25 天左右后等不定根长成即可开瓶炼苗, 继而移栽至营养土中, 正常管理至开花结果; 经 PCR、Southern 印迹检测, 证明 *CYP86MF* 基因已经整合至转基因植株染色体中。

关键词 芥蓝; 遗传转化体系; 正交旋转组合设计

芥蓝(*Brassica oleracea* var. *alboglabra*)属于十字花科芸薹属甘蓝类蔬菜, 原产我国南方, 栽培历史悠久, 主要以肥嫩的花薹及其嫩叶供食, 品质脆嫩、风味别致、营养丰富, 是我国著名的特产蔬菜之一, 也是出口到香港、澳门等地的重要叶菜。但芥蓝的生产过程中会有病虫害和其他逆境的侵害, 给生产造成很大损失。近几年随着生物技术的发展, 已经有可能采用转基因技术对芥蓝的性状进行改良。植物转基因技术的一个重要基础是植物遗传转化体系的建立, 目前十字花科蔬菜中甘蓝、大白菜等的离体再生系统已发展得较为完善, 并有多例外源基因转入的报道, 但芥蓝遗传转化方面国内外尚未见详细报道。芥蓝遗传转化体系的建立工作一直未能取得很好效果^[1,2], 其主要原因是影响再生的因素如基因型等极大地制约了遗传转化体系的建立。

本文拟在建立芥蓝高频再生体系的基础上^[1], 采用正交旋转组合设计方法^[3-6], 将影响遗传转化体系建立的因素做最优化组合, 建立较为完善的芥蓝高效遗传转化体系, 为芥蓝的基因工程育种提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料

含有 pBI35S-*CYP86MF* 双元表达载体质粒的农杆菌菌株 LBA4404 由本实验室构建完成(图 1)。芥蓝品种‘中花’(*B. oleracea* var. *alboglabra* cv. *Zhonghua*)购于广东省种子分公司。种子用 70% 的乙

醇表面消毒 90 s, 然后用 0.1% HgCl₂ 消毒 8 min, 再播种于发芽培养基(MS 培养基)上发芽, 以供外植体的取用。卡那霉素(Kan)购自上海生物工程公司; 氨基青霉素(Amp)由石家庄制药集团有限公司生产。苄氨基嘌呤(BAP)由上海丽珠东风生物技术有限公司生产, α 萘乙酸(NAA)由上海来泽精细化学品厂生产, 所有的维生素和植物生长调节剂均为层析生物试剂, 其余的化学药剂均为分析纯。

1.2 培养基

预培养基为 MS + 0.03 mg/L NAA + 2 mg/L BAP + 1% 蔗糖 + 0.8% 琼脂 + 7.0 mg/L AgNO₃ (pH 5.8); 共培养基为 MS + 0.03 mg/L NAA + 2 mg/L BAP + 1% 蔗糖 + 0.8% 琼脂 + 7.0 mg/L AgNO₃ + 5 mg/L Kan (pH 5.8, 并在培养基表面铺一张比培养皿口径略大的灭菌滤纸); 分化培养基为 MS + 0.03 mg/L NAA + 2 mg/L BAP + 1% 蔗糖 + 0.8% 琼脂 + 7.0 mg/L AgNO₃ + 5 mg/L Kan + 400 mg/L Amp (pH 5.8); 生根培养基为 MS + 0.2 mg/L NAA + 1% 蔗糖 + 0.8% 琼脂 + 7.0 mg/L AgNO₃ + 5 mg/L Kan (pH 5.8)。植物生长调节剂在高压灭菌前加入, 抗生素和 AgNO₃ 在高压灭菌后加入, 高压灭菌的条件为 121 °C 保持 20 min, 50 °C 保温。

1.3 实验设计与方法

本实验采用 5 因素 5 水平正交旋转组合设计, 实

收稿日期: 2006-05-24 接受日期: 2006-10-24

国家自然科学基金(No.30671426)和浙江省重大科技项目(No.2005C12019-02)资助

* 通讯作者。Tel/Fax: 0571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn

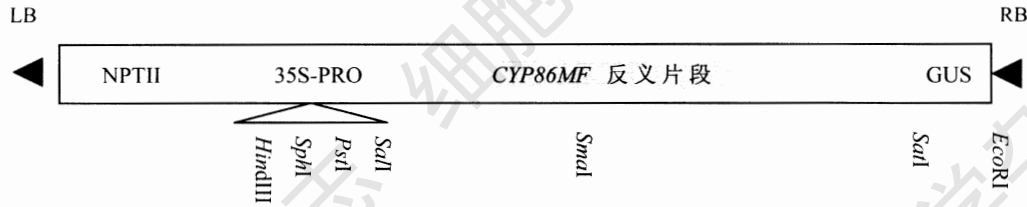


图1 pBI35S-CYP86MF 双元表达载体结构图

表1 五因素水平编码值表

P=5 M ₀ =10	预培养时间(天)	共培养时间(天)	感染时间(min)	Kan 浓度(mg/L)	Amp 浓度(mg/L)
r=2	4	4	14	9	800
1	3	3	11	7	600
0	2	2	8	5	400
-1	1	1	5	3	200
-r=-2	0	0	2	1	0
Δj	1	1	3	2	200

验零水平分别为(预培养时间 2 天, 共培养时间 2 天, 感染时间 8 min, 5 mg/L Kan, 400 mg/L Amp)各因素及水平设置见表 1, 各处理方案见表 2, 共有 36 个处理, 每处理重复 2 次。

1.4 芥蓝植株的转化

根据建立的最适芥蓝遗传转化体系, 将下胚轴在预培养基上预培养 2 天后, 在 LBA4404 菌液中感染 8 min, 置于共培养培养基上培养 2 天, 随后把外植体转入含 Kan 的选择分化培养基上诱导不定芽, 28 天转瓶一次, 当抗性幼苗长至 2~3 cm 时, 齐愈伤组织处切下幼苗在生根培养基上诱导不定根, 25 天左右后等不定根长成即可开瓶炼苗, 继而移栽至营养土中, 正常管理至开花结果。

1.5 分子检测方法

1.5.1 DNA 提取 DNA 提取参照曹家树等^[7]的方法进行。

1.5.2 PCR 检测 (1) GUS 基因 PCR 检测: 参照 GUS 基因内部 371 bp 的 uidA 片段两端序列设计 PCR 引物, 引物的序列为: PGUS1: 5'-ACG TCC TGT AGA AAC CCC AAC C-3', PGUS2: 5'-TCC CGG CAA TAA CAT ACG GCG T-3'。25 μl 的反应体系中, 含 1× PCR 缓冲液, 0.2 μmol/L dNTPs, 0.2 μmol/L 引物 (每条), 1 U Taq 酶。PCR 扩增条件为: 95 °C, 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 1 min, 72 °C 延长 45 s, 35 个循环; 72 °C 延长 10 min, 4 °C 保存。循环反应于 PE 公司生产的热循环仪上进行。PCR 扩增结束后, 分别吸取 10 μl PCR 反应产物点样于 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳, 拍照。

(2) 目的片段 PCR 检测: 参照 CYP86MF 基因片段两端序列设计 PCR 引物, 引物的序列为: Pantigene1: 5'-GCT GGA TCC ACC ATT AGG TTT TTT AGA CA-3', Pantigene2: 5'-GAT TCT AGA CC ACT AAC AAA CTT CCC TG-3'。在 25 μl 的反应体系中, 含有 1× PCR 缓冲液, 0.2 μmol/L dNTPs, 0.2 μmol/L 的引物 (每条), 1 U Taq 酶。PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 45 s, 72 °C 延长 45 s, 72 °C 延长 10 min, 4 °C 保存, 35 个循环。循环反应于 PE 公司生产的热循环仪上进行。PCR 扩增结束后, 分别吸取 10 μl PCR 反应产物点样于 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳, 拍照。

1.5.3 Southern 检测 经 PCR 检测呈阳性的植株进一步进行 Southern 印迹杂交。设非转化植株为阴性对照, 以 GUS 基因片段为探针, 用 HindIII 酶切。利用毛细管法进行 DNA 转移, 具体操作参照 Sambrook 等^[8]的方法。探针制备的操作同 GUS 基因 PCR 检测。

2 结果

实验结束后统计各处理 Kan^R 苗率(表 2)。将表 2 数据进行多元回归分析, 建立 Kan 苗率与各处理因子的二次多项式模型, 其中 Y₁ 为理论芥蓝 Kan^R 苗率, X₁、X₂、X₃、X₄、X₅ 分别表示预培养时间(天)、共培养时间(天)、感染时间(min)、Kan 浓度(mg/L)、Amp 浓度(mg/L)。

$$Y_1 = 43.9115 + 4.5833X_1 + 2.0842X_2 - 9.3058X_4 - 6.7010X_1^2 - 10.0348X_2^2 - 8.3673X_3^2 - 2.5348X_4^2 - 8.7848X_5^2 \quad (F=66.046 \quad F_{0.01}=3.87) \dots \dots \dots (1)$$

表 2 五因素五水平正交旋转组合设计方案

编号 No.	预培养时间 (天)	共培养时间 (天)	感染时间 (min)	Kan 浓度 (mg/L)	Amp 浓度 (mg/L)	Kan ^R 苗形成率 (%)
1	1	1	1	1	1	3.33
2	1	1	1	-1	-1	20.00
3	1	1	-1	1	-1	0.00
4	1	1	-1	-1	1	6.67
5	1	-1	1	1	-1	0.00
6	1	-1	1	-1	1	3.33
7	1	-1	-1	1	1	0.00
8	1	-1	-1	-1	-1	10.00
9	-1	1	1	1	-1	0.00
10	-1	1	1	-1	1	6.67
11	-1	1	-1	1	1	0.00
12	-1	1	-1	-1	-1	10.00
13	-1	-1	1	1	1	0.00
14	-1	-1	1	-1	-1	3.33
15	-1	-1	-1	1	-1	0.00
16	-1	-1	-1	-1	1	6.67
17	-2	0	0	0	0	0
18	2	0	0	0	0	46.67
19	0	-2	0	0	0	3.33
20	0	2	0	0	0	16.67
21	0	0	-2	0	0	6.67
22	0	0	2	0	0	26.67
23	0	0	0	-2	0	80.00
24	0	0	0	2	0	0.00
25	0	0	0	0	-2	10.00
26	0	0	0	0	2	20.00
27	0	0	0	0	0	43.33
28	0	0	0	0	0	40.00
29	0	0	0	0	0	43.33
30	0	0	0	0	0	46.67
31	0	0	0	0	0	40.00
32	0	0	0	0	0	40.00
33	0	0	0	0	0	43.33
34	0	0	0	0	0	40.00
35	0	0	0	0	0	46.67
36	0	0	0	0	0	43.33

试验所用外植体数均为 30。

2.1 主效应和单因子效应分析

从方程(1)一次项可以看出, 5 因素对芥蓝 Kan^R 苗率影响的大小为 X₄>X₁>X₂, 二次项 X₂>X₅>X₃>X₁>X₄, 说明 Kan 浓度是影响芥蓝 Kan^R 苗率的主要因素, 预培养时间和共培养时间也有一定的影响。

将方程(1)其他因子固定为0, 寻求一因子与Kan^R 苗率的关系, 得以下偏回归模型。

$$\begin{aligned}
 Y_1 &= 43.9115 + 4.5833X_1 - 6.7010X_1^2 \\
 Y_2 &= 43.9115 + 2.0842X_2 - 10.0348X_2^2 \\
 Y_3 &= 43.9115 - 8.3673X_3^2 \dots\dots\dots(2) \\
 Y_4 &= 43.9115 - 9.3058X_4 - 2.5348X_4^2 \\
 Y_5 &= 43.9115 - 8.7848X_5^2
 \end{aligned}$$

根据模型(2)绘制得出各单因子效应分析图(图 2)。

2.1.1 预培养时间单因子分析 由图 2A 可知, 预培养时间与芥蓝 Kan^R 苗率呈曲线相关, 预培养时间在 0~2 天时, 随着预培养时间的延长, Kan^R 苗率显著升高, 预培养时间超过 2 天后反而不利于芥蓝 Kan^R 苗的形成, 呈缓慢下降趋势。

2.1.2 共培养时间单因子分析 由图 2B 可知, 共培养时间与芥蓝 Kan^R 苗率呈对称曲线相关, 共培养时间在 0~2 天时, Kan^R 苗率随着共培养时间的延长而上升, 当共培养时间超过 2 天后, Kan^R 苗率显著下降, 可知芥蓝的最适共培养时间为 2 天。

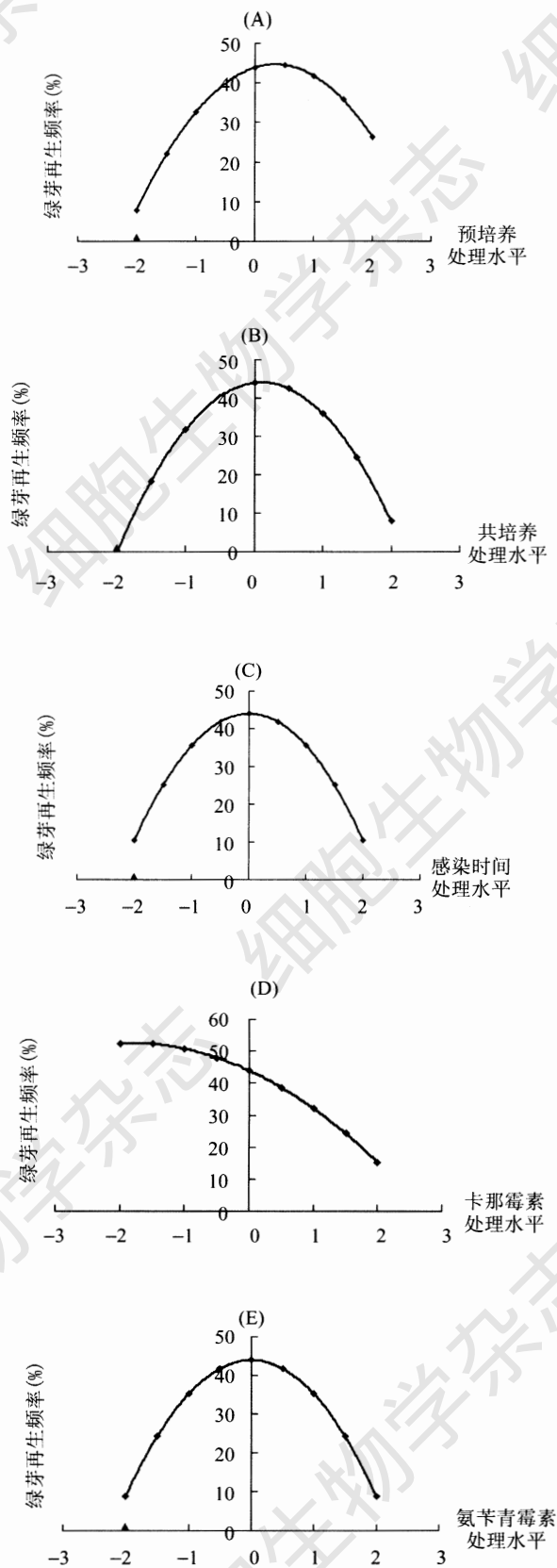


图2 芥蓝转化体系影响因素单因子分析

A: 预培养时间; B: 共培养时间; C: 感染时间; D: Kan 浓度; E: Amp 浓度。

2.1.3 感染时间单因子分析 农杆菌感染时间与芥蓝 Kan^R 苗发生频率呈曲线相关(图 2C), 感染时间在 2~8 min 时, Kan^R 苗分化频率随着感染时间的延长而急剧上升, 当感染时间超过 8 min 后, Kan^R 苗率呈下降趋势。由此, 可以确定适于芥蓝的感染时间为 8 min。

2.1.4 Kan 浓度单因子分析 实验表明, Kan 浓度对芥蓝 Kan^R 苗形成的影响最大, 随着 Kan 浓度的不断增高, Kan^R 苗的分化率急剧下降(图 2D)。说明 Kan^R 苗的分化对 Kan 最为敏感, 这就是 Kan 作为筛选抗生素的主要目的。根据半致死剂量原则, 确定 5 mg/L Kan 浓度作为遗传转化筛选浓度。

2.1.5 Amp 浓度单因子分析 Amp 浓度对芥蓝 Kan^R 苗形成的影响呈曲线相关(图 2E), 当 Amp 浓度在 0~400 mg/L 范围内时, 随着 Amp 浓度的不断增高, Kan^R 苗的分化率呈上升趋势, 当 Amp 浓度超过 400 mg/L 后, Kan^R 苗的分化率随着 Amp 浓度的升高而下降。说明 Kan^R 苗的分化对 Amp 较为敏感, 所以选择适宜的 Amp 浓度有利于构建转化体系。本实验以 400 mg/L Amp 浓度作为最适的芥蓝抑菌剂浓度。

2.2 芥蓝反义 *CYP86MF* 片段转化获得转基因植株及其分子检测

参照已建立的芥蓝遗传转化体系, 我们获得了 40 株芥蓝 Kan^R 转化植株(图 3)。

用扩增 *GUS* 基因的 PGUS1、PGUS2 引物和扩增 *CYP86MF* 基因的 Pantigene1、Pantigene2 引物, 对转基因植株的总 DNA 进行 PCR 扩增, 50% 以上的植株都能扩增到与质粒模板大小相同的 DNA 片段, 而未转化植株中未能扩增到相应片段, 证明 *CYP86MF* 基因已经整合到转基因芥蓝中(图 4A, 图 4B)。

用 ³²P 标记的 *GUS* 基因片段为探针, 分别与转基因植株、未转化植株和融合质粒 DNA 进行 Southern 杂交。结果表明, 在 PCR 检测成阳性的样品中, 所有样品在 Southern 印迹杂交中有阳性信号, 阳性率为 100%。而未转化植株中无杂交带存在, 证明转基因植株中确有 *GUS* 基因片段的插入(图 4C)。

3 讨论

3.1 外植体预培养对遗传转化的影响

外植体的预培养时间与其转化效果有明显关系, 每一种外植体均有其最佳的预培养时间。从芸薹属蔬菜作物无菌苗上切取子叶或下胚轴等外植体直接进行农杆菌感染, 会导致外植体在分化培养基上褐化

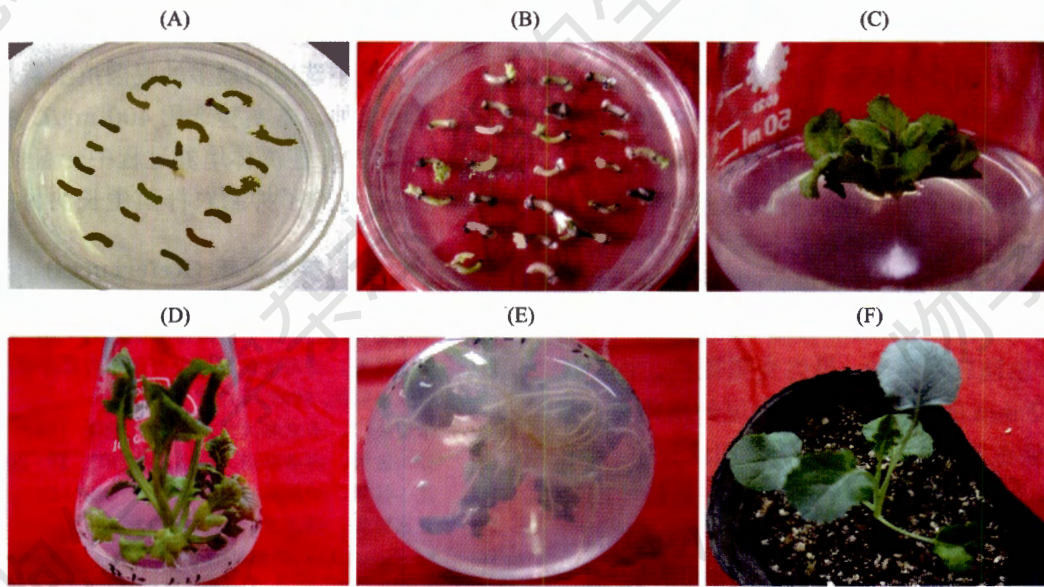


图3 芥蓝遗传转化体系的建立

A、B: 抗性芽生成; C、D: 抗性芽生长; E: 抗性幼苗生根; F: 抗性苗定植。

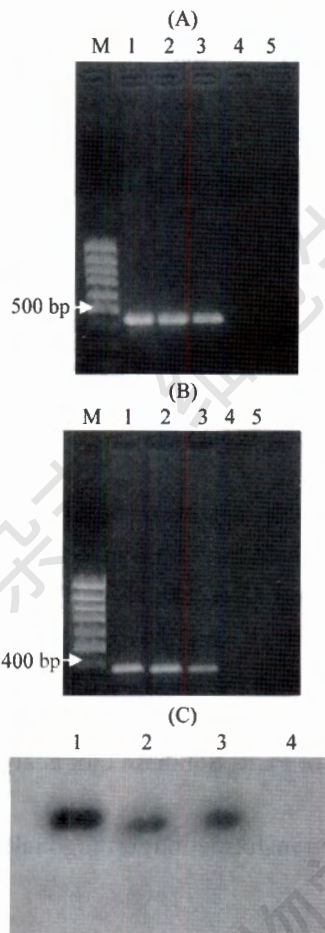


图4 芥蓝转基因植株分子检测

(A)转基因植株 *CYP86MF* 反义基因片段检测。M: marker; 1: 阳性对照; 2、3: 转基因植株; 4: 阴性对照; 5: 清水对照。(B)转基因植株 *GUS* 基因片段检测。M: marker; 1: 阳性对照; 2、3: 转基因植株; 4: 阴性对照; 5: 清水对照。(C)转基因植株 Southern 检测。1: 阳性对照; 2、3: 转基因植株; 4: 阴性对照。

死亡,为此,芸薹属作物的遗传转化一般都需要进行外植体的预培养。不同的变种间因其基因型的不同会有不同的反应特性,所以,在建立甘蓝类蔬菜作物的遗传转化体系过程中,首先要考虑预培养时间的筛选,一般预培养的时间为2~6天^[7-9]。本实验中观察到,直接将下胚轴外植体进行农杆菌感染后接种至选择培养基上筛选,外植体将逐渐变褐死亡;相反,如果外植体预培养时间过长,虽然能获得更多的分化不定芽,但非转化的不定芽也相应增加,经Kan选择后便逐渐白化死亡^[8,10,11],说明预培养时间过长,超过2天后,在以后的选择压条件下,反而不利于Kan^R苗的生长发育,从而导致了芥蓝Kan^R苗率的下降。

3.2 共培养对遗传转化的影响

考虑共培养条件时,一般首先要考虑到最佳共培养时间的选择。共培养时间是影响植物遗传转化的一个重要因素,在转化前必须针对所用菌株和外植体材料,通过实验确定合适的共培养时间。共培养时间必须长于16h,共培养时间太长,由于农杆菌的过度生长,植物细胞因受到毒害而死亡。共培养时间对转化效率有很大的影响,并且不同物种、外植体种类,农杆菌菌株的最佳共培养时间不同。确定最佳共培养时间的最终依据是获得的转化愈伤组织频率或转化不定芽频率。本实验中,‘中花’芥蓝的最佳共培养时间为2天。实验中观察到,共培养时间超过2天后,不定芽分化频率显著下降,并且出现农杆菌过度繁殖,外植体褐化死亡现象。

3.3 感染时间、Kan 筛选浓度及抑菌剂浓度对

遗传转化的影响

在进行农杆菌介导感染时,感染时间是影响遗传转化成功的重要因素。浸泡时间太短农杆菌尚未接种到伤口面,在其培养时无农杆菌生长,不能实现转化。如果外植体在菌液中浸泡时间太长,常因农杆菌毒害缺氧而软腐,造成外植体的死亡。本实验选用农杆菌浸泡 8 min 为最佳感染时间,在感染时间超过 8 min 后,不定芽发生频率明显下降,并且发现有大量外植体出现软腐症状,最终变黑死亡。而时间太短,采用 2 min 的感染时间时,发现外植体多产生白化芽,不能正常生长,直至死亡。由此说明,本实验提出的适于‘中花’芥蓝的感染时间是最佳的。

一般芸薹属蔬菜作物中选用 Kan 进行抗性筛选的较多,因为 Kan 能够抑制非转化细胞的生长,并且不会对植物外植体产生伤害。在选择抗生素浓度时,也要根据植物的特性决定最适的筛选浓度。本实验选用 5 mg/L Kan 浓度作为对转化细胞筛选的适宜浓度,经随后的分子检测结果证实,该浓度是适于‘中

花’芥蓝的最适筛选浓度。

芸薹属中选用的最多的脱菌抗生素是 Amp 和羧苄青霉素两种。本实验选用 400 mg/L Amp 作为脱菌抗生素浓度,在离体培养过程中一直使用,直至试管苗形成,达到了抑制农杆菌生长的目的。

参考文献 (References)

- [1] 黄科等. *细胞生物学杂志*, 2004, **26**: 313
- [2] 何亚文等. *热带亚热带植物学报*, 1998, **6**: 152
- [3] 唐启义等. *实用统计分析及其计算机处理平台*, 北京: 中国农业出版社, 1997, 407
- [4] 张德炎等. *东北师大学报自然科学版*, 1998, **1**: 40
- [5] 孙敏等. *西南师范大学学报*, 2002, **27**: 202
- [6] 黄科等. *中国农业科学*, 2005, **38**: 122
- [7] 曹家树等. *园艺学报*, 1995, **22**: 47
- [8] Sambrook J et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [9] 郭学兰等. *中国油料作物学报*, 2001, **23**: 7
- [10] Lim HT et al. *Plant Cell Tiss Org Cul*, 1997, **49**: 179
- [11] Xiang Y et al. *Plant Cell Rep*, 2000, **19**: 251
- [12] Narasimulu SB et al. *Plant Cell Rep*, 1988, **7**: 104
- [13] 王火旭等. *园艺学报*, 2001, **28**: 74

The Establishment of *Agrobacterium*-mediated Transformation System in *Brassica oleracea* L. var. *alboglabra*

Ke Huang^{1,2,3}, Wan-Zhi Ye¹, Xiao-Lin Yu¹, Xun Xiang¹, Gang Lu¹, Jia-Shu Cao^{1*}

(¹Institute of Vegetable Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; ²Institute of Agricultural Product Quality, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China; ³Institute of Vegetable Sciences, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract By the orthogonality design, the factors which influenced the transformation of *Brassica oleracea* L. var. *alboglabra* have been studied, the results showed that the major factor for Kan^R frequency is Kan concentration, and the major factor for Chinese kale transformation are pre-culture time and co-culture time. The best procedure for transformation is: Hypocotyl explants from 7-day-old germinated seedlings were pre-cultured for 2 d on pre-culture medium and co-cultivated for 2 d. The explants were then transferred to selection medium. Vigorous green shoot were transferred to rooted medium for 25 d when they grow at 2–3 cm. The vigorous seedlings were transplanted to vermiculite medium after exercised. In order to the results of PCR, Southern blot analyses, the gene *CYP86MF* have been transformed into the Chinese kale Kan^R plantlets.

Key words *Brassica oleracea* L. var. *alboglabra*; Chinese kale; transformation; orthogonality design

Received: May 24, 2006 Accepted: October 24, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30671426) and Key Program of Sciences and Technology of Zhejiang Province (No.2005C12019-02)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn