

含有二元载体Bin19的发根农杆菌 在芸苔属作物上的遗传转化

何玉科 巩振辉 王飞 王鸣

(西北农业大学园艺系, 陕西杨陵)

发根农杆菌是一种寄主非常广泛的土壤细菌, 能够侵染几乎所有的双子叶植物和少数单子叶植物。在自然状况下, 发根农杆菌通过伤口主要侵入植物的茎基部, 导致不定根和侧根的大量发生, 以致出现毛根病的症状^[3]。在此过程中, 发根农杆菌对植物器官、组织或细胞的侵染伴随着其RiT-DNA向植物基因组内的转移^[4]。

利用发根农杆菌的这一转化作用, Yoshikawa和Furuya 在人参愈伤组织上得到了侧根分生能力极强、生长速度很快的转化根, 而Kamada 等在许多植物上实现了阿托品、东莨菪碱等大批次代谢产物的高产^[5]。与此同时, Ooms在烟草 RiT-DNA 转化植株上接种烟草花叶病毒(TMV)^[6], Mugnier在甘蓝RiT-DNA 转化根上接种包括根肿菌(*Plasmodiophora brassicae*)在内的多种寄生菌, 以探讨 RiT-DNA 转化体对这些病菌的侵染反应^[7-8]。

我们通过野生发根农杆菌的转化作用, 已经在芸苔属作物上得到了大量的转化根和转化植株, 并且已用于抗病性鉴定和筛选^[1, 2, 9], 为了提高转化频率, 加快遗传转化的进度, 我们试图利用Bin19 二元载体引入抗卡那霉素基因等标志基因, 建立更为有效的RiT-DNA 转化系统。

材 料 和 方 法

(一)发根农杆菌悬浮液的制备

试验所用发根农杆菌菌株为LBA9402Bin19。首先将贮藏的发根农杆菌取出来, 在28℃的温度下培养两天, 然后选取新菌落边缘的发根农杆菌接种到YMB琼脂培养基上, 使它们增殖。每升YMB增殖培养基含0.5gK₂HPO₄、0.2gMgSO₄·

7H₂O、0.1gNaCl、10g甘露醇和0.1g酵母提取物, 培养基的pH为7.0。待新菌落形成后, 转接到含有30mg/L利福平的YMB液体培养基内, 在28℃的黑暗条件下振荡培养。两天后, 在转速为4000rpm的离心机上离心, 然后弃去上清液, 保留离心管底部的发根农杆菌, 用不含蔗糖的MS液体培养基悬浮, 使发根农杆菌的浓度达到10⁹/ml。

(二)无菌苗的获得

用于发根农杆菌转化的芸苔属作物有甘蓝(*Brassica oleracea*)、油菜(*B.napus*)和花椰菜(*B.oleracea var.botrytis*)。将种子装入种子消毒器中, 浸入85%的酒精中约3秒钟, 随即取出来放入100ml 2%的次氯酸钠溶液中, 加入一滴吐温80(Tween-80)溶液处理15min。消毒的种子在灭菌的蒸馏水中冲洗三遍, 每遍3min, 然后播种在MS琼脂培养基上。该培养基不含维生素、肌醇和植物生长调节剂, 只加入20g/L蔗糖。

(三)发根农杆菌转化操作

待幼苗长到14天时, 从下胚轴上切取1.0-1.5cm的切段, 将切段倒插入MS琼脂培养基上, 用微量注射器将发根农杆菌悬浮液接种在切段的切面上, 每个切面的接种量为2μl。随后将接种发根农杆菌的下胚轴切段置于2000Lux的光照和25℃的温度下进行共培养。同时, 以没有接种发根农杆菌的下胚轴切段作为对照在同样的条件下培养。

接种发根农杆菌后两天, 待农杆菌侵入植物

本文于1990年4月6日收到。

国家自然科学基金资助课题。

组织后, 为了防止农杆菌进一步生长所造成的污染, 将下胚轴切段转移到含有250mg/L万古霉素的MS琼脂培养基上培养。该培养基不含有任何植物生长调节剂。

其培养20天后, 当下胚轴切段诱发出许多幼根时, 切取切段顶部1—2mm的发根部位, 连同它们上面已着生的全部幼根转接到含有100mg/L万古霉素的培养基上, 注意让新切面紧贴培养基表面^[11]。大约培养10天后, 逐个切取幼根进行单根培养。

(四) 抗卡那霉素转化根的筛选

配制含有0、25、50、75、100、125、150、175、200mg/L卡那霉素的9种MS固体培养基, 将下胚轴切段上发生的幼根(1cm以上)分别接种到这些培养基上进行幼根的单根培养。用于每种卡那霉素浓度处理的甘蓝和花椰菜幼根各50条, 油菜幼根15条。

在根的第四次继代培养后, 当根无性系生长到一定量时, 用纸上电泳法测定它们的农杆菌碱和甘露碱。

结果和讨论

(一) 发根农杆菌侵染后的根诱导

发根农杆菌LBA9402 Bin19含有二元载体Bin19。Bin19质粒上载有卡那霉素抗性基因和RK₂复制起点^[10]。通过根癌农杆菌与发根农杆菌的接合转移, 将前者的Bin19质粒引入发根农杆菌LBA9402的细胞内, 结果形成了LBA9402 Bin19菌株。

经过5—10天的共培养后, 接种发根农杆菌的下胚轴切段陆续发根。发根的部位是发根农杆菌的侵染部位, 亦即下胚轴切段的切面。有些接种切段具有较强的发根能力, 切面上可见到30条幼根; 有些接种切段的发根能力较弱, 不发根或切面上只见到3—5条幼根。在20天的共培养期间, 接种切段上幼根的数量和长度是逐渐增加的, 但是, 接种发根农杆菌后20天, 延长下胚轴切段的培养时间, 幼根的数量和长度不再明显增加。在此之前, 我们以同法用野生发根农杆菌侵染芸苔属作物下胚轴切段, 其幼根发生时间、部位及幼根生长状况同本实验中观察到的这一现象基本一致^[11]。这说明, 引入二元载体Bin19以后,

发根农杆菌LBA9402的转化能力并未改变。

(二) 卡那霉素抗性基因的表达

在根癌农杆菌介导的芸苔属作物遗传转化中, 用于判断和筛选抗卡那霉素标志性的卡那霉素浓度往往是50mg/L^[12]。在含有该浓度卡那霉素的培养基上存活和生长的培养物被看作是转化体, 否则被视作非转化体。

在我们的实验中, 发根农杆菌转化处理后, 甘蓝、油菜和花椰菜单根培养的幼根在50mg/L卡那霉素浓度下的存活率分别是84%、80%和72%(图1)。很明显, 这些存活的幼根是带有卡那霉素抗性基因的转化根, 而那些死亡的幼根是非转化根, 由此可见, 发根农杆菌诱发的幼根并不都是转化根, 下胚轴切段上发生的根群中, 还有一些非转化根。

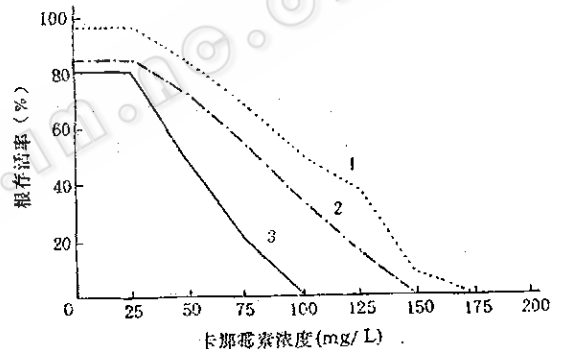


图1 LBA9402 Bin19诱发的幼根对卡那霉素的反应
1. 甘蓝 2. 花椰菜 3. 油菜

在不含卡那霉素的MS培养基上, 大多数幼根继续生长, 有少数幼根停止生长或死亡。当卡那霉素浓度上升到50mg/L时, 存活的幼根数明显减少; 继续增加卡那霉素的浓度, 死亡的幼根数越来越多。

从图1中看出, 不同作物幼根群体中, 转化根个体间对卡那霉素的抗性水平有差异。有些转化根在高浓度(75—175mg/L)卡那霉素培养基上能够存活, 而另一些不能存活。于是, 在转化根群体水平上, 随着卡那霉素浓度的升高, 存活的转化根逐渐减少。这说明, 卡那霉素抗性基因的作用范围是有限的, 超过这个限度, 转化根会受到卡那霉素的毒害而死亡。

由此可见, 同根癌农杆菌转化后的效果一

样,发根农杆菌转化后植物转化根内的卡那霉素基因也是能够表达的,在发根农杆菌细胞内引入的卡那霉素抗性基因可以作为RiT-DNA转化体的标志基因,由该基因所控制的抗卡那霉素性状可用于转化根的筛选。

(三)发根农杆菌LBA9402Bin19的转化效果

在发根农杆菌侵染后,甘蓝、油菜和花椰菜的下胚轴切段表现出不同的发根能力和转化效果。其中,花椰菜切段的发根能力最强,其发根切段百分率(发根的切段数占所处理切段数的百分率)和根诱导频率(切段上的平均幼根数)最高,分别达到97%和3.7(表1)。甘蓝切段的发根能力次之,分别为92%和2.6。但是,发根能力最强的切段并不一定根转化频率最高。甘蓝的发根能力虽低于花椰菜,但是它的根转化频率(切段上的平均转化根数)却高于花椰菜。这是因为在花椰菜和甘蓝的幼根中,转化根所占的比例是不同的,前者为70%,后者为30%。

(四)转化根内农杆菌和甘露碱合成酶活性

在无激素MS琼脂培养基上培养经卡那霉素筛选的转化根,结果发现,所有的转化根都能迅速分生侧根和伸长生长,并且在多次继代培养后形成各自的转化系。

为了确认农杆菌和甘露碱合成酶基因的表达,我们随机选取了20个甘蓝转化系,定性测定农杆菌和甘露碱。在总共50个转化系中,有48个

表1 LBA9402Bin19菌株在芸苔属作物上的转化效果

植 物	发根切段百分率		根诱导频率		根转化频率	
	NRS/NTS	百分率	NIR/NTS	频率	NTR/NTS	频率
甘 蓝	30/36	83	95/36	2.6	51/36	1.4
油 菜	2/25	8	5/25	0.2	3/25	0.1
花椰菜	34/35	97	130/35	3.7	39/35	1.1

1. 表内NTS指处理切段数,而NRS、NIR和NTR分别表示发根切段数、幼根数和转化根数

2. 在接种发根农杆菌20天测定发根切段百分率和根诱导频率

3. 转化根数是指抗卡那霉素的幼根数

转化系表现出农杆菌和甘露碱合成酶活性。然而,1个甘蓝转化系和1个花椰菜转化系未检测出这两种酶的活性。这说明,RiT-DNA和二元载体向植物基因组内的转移不是完全连锁的。

由此得出如下结论:1. LBA9402 Bin19菌株向芸苔属作物转入了二元载体Bin19的卡那霉素抗性基因,同时也至少转入了RiT-DNA上的生长素合成基因和农杆菌、甘露碱合成酶基因。2. 这些基因在芸苔属作物的转化根上都得到了表达。转化根至少具备了三个标志性状:抗卡那霉素、在无激素培养基上迅速生长和具有农杆菌、甘露碱合成酶活性。3. 二元载体与RiT-DNA的转移并不是完全同步的或同样稳定的。个别转化系抗卡那霉素,但缺失农杆菌和甘露碱合成酶活性就说明了这一点。

参 考 文 献

- [1] 何玉科, Voorrips, R. E., 西北农业大学学报, 17(4): 1—8, 1989.
- [2] 何玉科, 西北植物学报, 10(1): 61—66, 1990.
- [3] Hedgecock, G. C., U. S. Department of Agri. Bur. Plant Indus. Bull., 131: 21—23, 1905.
- [4] Tepfer, D., Molecular Genetics of Bacteria Plant Interaction (ed. Nuler), Springer, 248—258.
- [5] Kamada, H. et al., Plant Cell Reports, 5: 239—242, 1986.
- [6] Ooms, G. et al., Plant Science Letter, 35: 169—173, 1984.
- [7] Mugnier, J., Phytopathology, 77(7): 1045—1050, 1987.
- [8] Mugnier, J., Phytopathology, 77(4): 539—542, 1987.
- [9] 何玉科, 中国科学B辑, 4: 382—387, 1991.
- [10] Beven, M., Nucleic Acids Res., 12: 8711—8721, 1986.
- [11] 何玉科, 西北农业大学学报, 18(2): 20—27, 1990.
- [12] Shahin, E. A., Theor. Appl. Genet., 72: 770—777, 1986.

Transformation Efficiency of *Brassica* Crops with *Agrobacterium rhizogenes* Harboring the Binary Vector Bin19

He Yuke, Gong Zhenhui, Wang Fei, Wang Ming

(Department of Horticulture, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi)

Strain LBA9402Bin19 of *Agrobacterium rhizogenes*, harboring binary vector of Bin19, incited roots *in vitro* on hypocotyl segments of cabbage, oilseed rape and cauliflower. Among these roots, the transformed roots containing Kn^r gene were resistant to kanamycin and grew on the medium containing 50mg/L kanamycin, whereas untransformed roots were not resistant to kanamycin and abandoned.

Among three genotypes of *Brassica* crops tested, cauliflower had the highest root induction percentage while cabbage produced the highest root transformation frequency. Within the population of 50 transgenic lines, The introduction of Kn^r gene from binary vector Bin19 was not always synchronized with that of *ags* and *mas* genes from Ri T-DNA.

Key words

A. rhizogenes; binary vector; *Brassica*; kanamycin

更正

本刊7卷3期201页中Donald, L.C.应改为Court, D.L.