

根癌土壤杆菌介导转化诸葛菜子叶获得转基因植株

周冀明^{1,2} 卫志明¹ 许智宏¹ 刘世贵² 罗 鹏³

(中国科学院上海植物生理研究所植物分子遗传国家重点实验室 上海 200032¹)

(四川大学生物工程学², 四川大学生物系 成都³ 610064)

摘 要 采用诸葛菜子叶为材料,在 MS+BA 3mg/L+NAA 0.2mg/L 培养基上诱导芽的再生,1/2 MS+IBA 0.03mg/L 上诱导生根,获得完整再生植株,建立了诸葛菜组织培养高频再生系统,其再生率可达 100%。采用土壤杆菌介导转化诸葛菜子叶,在附加一定量的氨苄青霉素、头孢霉素和卡那霉素的相应培养基上进行筛选,进而培养出再生苗。获得完整植株,经 GUS 和 NPT II 酶活测定,以及 Southern blot 分析,证实为转基因植株。转化子叶的芽再生率为 51%,获得完整转基因植株的转化率为 5.53%。在国内外首次建立了以根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 为载体,诸葛菜子叶为受体的遗传操作系统。

关键词 根癌土壤杆菌, 诸葛菜, 子叶, 转基因植株

诸葛菜属十字花科诸葛菜属,主要分布于我国一些地区以及朝鲜。是一种观赏花卉植物,同时也是一种蔬菜和油料植物。近年来,由于发现其种子油的芥酸、亚麻酸含量低,亚油酸和棕榈酸含量高,是一种极为理想的优质食用油,因而有关诸葛菜生物特性的研究越来越引起人们的重视。目前在诸葛菜属的组织培养方面,仅有两篇报道^[1,2],而遗传转化方面国内外均未见有报道。本文首次报道了根癌土壤杆菌介导转化诸葛菜子叶获得转基因植株,填补遗传转化研究中的一项空白。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料:将诸葛菜种子经 3%漂白精片灭菌 15min,无菌水洗涤 3 次,于 MS0 培养基 (0.7%琼脂,2%蔗糖) 上暗发芽。待无菌苗长至 1.5~2cm 高时,切下保留部分叶柄子叶,作为组织培养和遗传转化的起始材料,见文献 [2]。

1.1.2 根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*):所用的菌株为 A208se (详见文献 [3]),其中 pROA93 质粒带有 35s 启动子驱动的 npt II 基因和 gus 基因 (见图 1)。菌种在转化试验之前挑取单菌落接种到 LB 液体培养基中,加入卡那霉素 (mg/L) 25,壮观霉素 100 和氯霉素 25,于 28℃振荡培养 (转速 200r/min) 过夜。

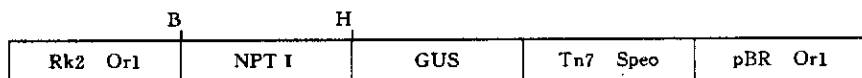


图 1 pROA93 质粒图

Fig. 1 Plasmid pROA93

B. BamHI, H. Hind III

1.2 方法

1.2.1 组织培养方法: 将子叶叶柄朝下插入分化培养基 (MS+BA 3mg/L+NAA 0.2mg/L) 上光照培养。待分化出小苗后, 从苗基部切下, 插入生根培养基 (1/2MS+IBA 0.03mg/L) 中生根。所有培养基均为固体, 含琼脂 0.7%, 蔗糖浓度 3%, 培养温度为 28℃, 光强度 1 500~2 000lx (详见文献 [2])。

1.2.2 转化方法: 切下保留部分叶柄的子叶, 在 MS 中预培养 2d 后立即浸入土壤杆菌液中 6~10min (根癌土壤杆菌预先在 LB 中培养至对数期, OD 值 0.3), 用滤纸吸掉多余的菌液, 插入分化培养基中共培养 3d。然后将子叶转入加有氨苄青霉素 250mg/L, 卡那霉素 25mg/L 的分化培养基中培养筛选, 两周继代一次, 氨苄青霉素逐渐降低至 100~150mg/L。培养 3~4 周后将长出的愈伤组织及芽切下转入相同培养基中继续培养筛选, 同样继代, 待长出 1cm 高小苗后 (约 8 周), 从苗基部切下, 插入加有头孢霉素 100mg/L, 卡那霉素 25mg/L 的培养基中生根。

1.2.3 GUS 酶活性检测: 详见文献 [4]。

1.2.4 组织化学定位: 取未转化及转化的再生苗叶片少许, 切成 1mm 宽小条, 然后加入 100~150 μ l X-Gluc, 于 37℃ 水浴保温 0.5~2h 后, 观察叶片是否染成蓝色。然后徒手切片, 显微镜下观察。

1.2.5 NPT II 酶活性测定: 参照 McDonnell 的 Dot blot 法^[5]。称取未转化及转化的再生苗叶片 0.1g 左右, 加入 0.1ml 抽提缓冲液匀浆; 在 4℃ 10 000r/min 离心 5min, 取上清液, 加入 Assay 缓冲液, 37℃ 反应 0.5h, 再离心 5min; 取上清液 15 μ l 点样在预先处理过的 P81 滤纸上, 干燥后, 于 -70℃ 压片。同位素用北京福瑞生物工程公司生产的 dATP γ -³²P。

1.2.6 Southern blot 分析: 参照 Sambrook 等的方法^[6]。按照 Mettle 的方法^[7]提取植物总 DNA; 植物总 DNA 和质粒 DNA (正对照) 经 BamH I 和 Hind III 酶切后, 琼脂糖凝胶上电泳 12h; 然后采用 Southern 法转移到尼龙膜 HybondTM-N+ (购自 Amersham 公司) 上; 转移缓冲液为 10 \times SSC。分子杂交所用探针为 Hind III/BamH I 酶切 pROA93 产生的 1kb 片段, 此片段为 NPT II 基因的一段编码顺序。探针用北京福瑞生物工程公司生产的 "Nick translation kit" 进行标记。42℃ 预杂交 2h, 杂交 16~20h, SSC 洗膜, -70℃ 压片。预杂交和杂交液含 50% 甲酰胺和 50 μ g/ml 变性鲑鱼精子 DNA。

2 实验结果

2.1 根癌土壤杆菌感染对再生芽的影响

2.1.1 组织培养结果: 诸葛菜子叶再生分化能力极强, 在多种条件下均能再生出完整植株, 组织培养全部周期为 48d 左右, 再生率 100%, 平均出芽 3.5 株^[2]。

2.1.2 起始材料抗性芽再生的影响: 用根癌土壤杆菌介导转化诸葛菜子叶对供试起始材料要求较严, 当诸葛菜无菌苗长到 1.5~2cm 高时取材的材料, 其分化再生能力和对根癌土壤杆菌感染的耐受性均较强; 而当苗超过 2cm 以后取材的材料其耐受性大大降低, 被感染后切口很快发黑死亡, 无法得到再生芽。

在转化过程中我们发现, 该材料必须先经过预培养 2~3d 后才可用根癌土壤杆菌介

导感染, 不预培养或预培养时间过长的材料用根癌土壤杆菌感染后, 在筛选培养基中均很快褐化死亡 (见表 1)。

表 1 预培养对诸葛菜子叶再生率的影响

Table 1 Effect of preculture on shoot regeneration from cotyledon explants

Time of preculture/d	0	2	5	7
Percent of shoot regeneration/%	1	51	1.5	0

2.1.3 根癌土壤杆菌感染对抗性芽再生的影响: 该材料对根癌土壤杆菌耐受性较强, 感染时要求时间较长, 一般 6~10min, 菌浓度 OD 值 0.3, 其后 28℃ 共培养 2~3d, 至肉眼可见的微小菌落出现时, 立即转入筛选培养基中。

2.2 抗性芽筛选及植株再生

2.2.1 卡那霉素对芽分化的影响: 卡那霉素对该材料分化有强烈的抑制作用, 以同样方式感染, 同样用氨苄青霉素杀菌, 经卡那霉素筛选的与在不含卡那霉素条件下培养的材料差异明显 (见表 2)。

表 2 卡那霉素 (Km) 对诸葛菜子叶生长和分化的抑制作用

Table 2 Difference of growth and shoot regeneration from cotyledon explants with or without Km

Km/mg · L ⁻¹	25	0
Time of shoots recovered/d	30	14
Shoots/%	1.5	2.5
Shoot regeneration/%	10	75
Tufted shoots frequency/%	30	85
Period of regeneration/weeks	13~14	7

2.2.2 AgNO₃ 对芽分化频率的影响: 在筛选培养中材料褐化现象严重, 大量转化材料在出现胚状体或芽点后随即褐化死亡。在培养基中加入 AgNO₃ 25mmol/L 褐化现象大为减轻, 同样以卡那霉素浓度 25mg/L 筛选, 再生率增加至 51%, 平均出芽率为每株出芽 1.5 个, 再生周期缩短至 1~2 周 (见表 3)。AgNO₃ 是一种乙烯抑制剂, 有防止褐化, 提高分化频率的作用。试验发现 AgNO₃ 对所用的根癌土壤杆菌有一定的抑制作用 (见表 4), 其原因不详。

表 3 AgNO₃ 对诸葛菜子叶植株再生的影响

Table 3 Effect of AgNO₃ on shoot regeneration

Conc. of AgNO ₃ /mmol · L ⁻¹	Shoot regeneration frequency/%	Foxiness frequency/%	Period of regeneration/week
25	51	16	12
0	10	67	13~14

表 4 AgNO₃ 对根癌土壤杆菌 A208se 的抑制作用

Table 4 The bacteriostatic effect of AgNO₃ on *Agrobacterium tumefaciens*

AgNO ₃ /mmol · L ⁻¹	25	0
Time of appearance of little colony on cocultivation/d	7~9	2~3
Minimum concentration of Ap on first selection/mg · L ⁻¹	100~150	250

2.2.3 抗性植株再生：子叶经共培养后转入含氨苄青霉素 250mg/L，卡那霉素 25mg/L 和 25mmol/L AgNO_3 的分化培养基中筛选培养，每两周继代一次，氨苄青霉素逐渐降低至 100~150mg/L。未经转化的子叶其卡那霉素耐受浓度低于 25mg/L，表现为不分化，3~4 周后褐化死亡（见图版 I-A）。经根癌土壤杆菌感染转化后对卡那霉素抗性大大提高（见表 5），在 25mg/L 浓度卡那霉素中继续生长分化，每两周继代一次，25~30d 后出现愈伤组织和少量不定芽，8~9 周后再生芽长成 1~1.5cm 高的小苗，将小苗从基部切下插入生根培养基，4 周后即可生根长成完整植株（见图版 I-B）。我们用上述方法最终得到了 55 株抗性再生植株，移栽后全部存活，生长良好（见图版 I-C）。

表 5 卡那霉素浓度对诸葛菜子叶分化的影响

Table 5 Effect of kanamycin concentration on shoot regeneration frequency

Km concentration/mg · L ⁻¹	25	50	80	100
Shoot regeneration/%	10	1.5	0	0
Number of shoots per explant	1.5	1.0	0	0

2.3 转化体的鉴定

2.3.1 GUS 酶活检测：从转化处理后 55 棵再生植株中随机选择 30 棵测定 GUS 酶活性，经组织化学染色，其中 13 株呈阳性反应，占 43.3%。显微镜镜检可见细胞质内有明显蓝色，而且整个叶片组织全部染蓝（见图版 I-E）。荧光测定法定量检测转化再生植株的酶活性较之对照高，差异明显（数据未列出）。

2.3.2 NPT I 酶活性测定：在具有 GUS 酶活性的再生植株中，均检测到强烈的 NPT I 酶活性，而无 GUS 酶活性的 5 株植株中酶活性极低，差异明显。在未加卡那霉素的样点中，对照与转化材料均测不到酶活，因而可以排除其它荧光物干扰的可能（见图 2）。

2.3.3 Southern blot 分析：pROA93 质粒经 BamH I 和 Hind III 酶切后电泳分离第一个片段，经计算其分子量为 1.03kb，证实该片段是 NPT I 核心片段，同位素标记后作探针。并以该片段作为阳性对照。

选取具有 GUS 酶活性的植株进行 Southern blot 分析，以未经转化处理的植株作阴性对照，发现经 BamH I 和 Hind III 酶切的 8 株转化再生植株 DNA 中有 2 株出现了杂交带（见图版 I-D），证明 NPT I 基因已整合到基因组中，阳性率 25%。

3 讨论

3.1 组织培养体系对转化的影响

建立高效稳定的组织培养体系是获得转基因植株的先决条件之一。贾士荣等^[8]认为

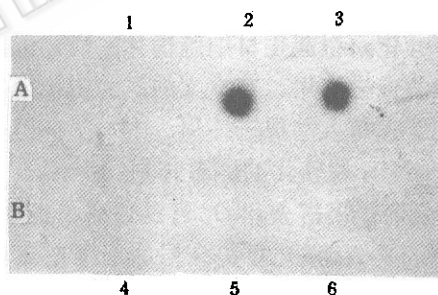


图 2 经转化处理的再生植株叶片 NPT I 酶活分析

Fig. 2 Neomycin phosphotransferase I enzyme activity Dot blot assays of leaf tissue extract

Row A. Represent reactions containing kanamycin.
Row B. Represent reactions without kanamycin.
Lane 1, 4. Negative control, Lane 2, 3, 5, 6. Regenerated plants from genetic transformation

作为好的遗传操作系统其组织培养的再生频率至少应在 80% 以上, 且每块外植体必须再生丛生芽。诸葛菜子叶组织培养再生率和丛生芽率均为 100%^[2], 经转化处理后其再生率最高只能达到 51%, 因此, 建立高效稳定的组织培养体系是必要的。

3.2 根癌土壤杆菌感染对转化的影响

该材料必须经过适当的预培养后才能进行感染。这可能是由于短暂的预培养使植物伤口部分愈合, 增强了其对根癌土壤杆菌感染的耐受性; 而预培养时间过长, 伤口愈合程度过高, 又导致根癌土壤杆菌感染困难, 外源基因难以导入, 因此不预培养或预培养时间过长都不能筛选到抗性植株。同时, 感染后共培养的时间对转化有较大影响。普通转化报道中多数共培养 2d, 然后转入抗菌素筛选^[3,9]; 而在实验中作者发现, 不能完全以时间来判断共培养是否成功, 有时因温度、菌浓度等因素影响, 2d 后并未出现微菌落, 此转入筛选培养基的材料一般不能筛选出抗性芽, 其再生率低于 1%, 而出现肉眼观察可见菌落后转的材料则具较高再生率。这可能是因为共培养时间太短, 外源 DNA 还来不及整合到植物 DNA 中; 而时间过长, 根癌土壤杆菌过度生长, 又会过度损伤植物细胞, 造成再生困难。

3.3 抗菌素对转化的影响

NPT I 基因是植物转化研究中最常用的筛选标记基因, 但对芸苔族植物而言, 它似乎不是很好的筛选标记。卡那霉素对诸葛菜的再生有强烈抑制作用。在芸苔族其它植物也有类似报道^[10]。另外程振东等^[3]曾经报道过在抑制土壤杆菌生长的抗菌素中, 头孢霉素抑制芽分化, 引起伤口细胞褐化死亡, 但能促使材料生根; 而羧苄青霉素对材料再生芽有一定的促进作用。在本文的试验中也证实了这一点, 并且发现羧苄青霉素对芽再生有类似羧苄青霉素的促进作用。

3.4 AgNO₃ 对转化的促进作用

Chi 等曾报道 AgNO₃ 可以提高小麦、玉米等植物的芽分化频率^[11,12], 在本文的试验中明确证实 AgNO₃ 可提高根癌土壤杆菌转化诸葛菜的再生频率。一般认为植物器官在体外培养过程中会产生并累积乙烯, 乙烯有抑制植物分化的作用; 而 AgNO₃ 是一种乙烯抑制剂, 它能够阻止乙烯的合成, 但具体机制尚不清楚。另外我们还发现 AgNO₃ 对所用的根癌土壤杆菌生长有明显的抑制作用, 其原因不详, 这也许是它提高抗性芽再生频率的作用机制之一。

3.5 Ti 质粒对转化的影响

我们在试验中曾采用携带 pBI121 质粒的根癌土壤杆菌进行转化研究, 但未能得到再生植株, 所有的子叶在筛选两周后褐化死亡。其原因之一可能是感染和筛选的条件不适合; 也可能是由于 pBI121 和 pROA93 质粒本身的原因。前者采用的是 NOS 启动子, 后者为 CaMV35S 启动子, 有报道认为 CaMV35S 启动子的表达强度较高^[13]。

综上所述, 本试验首次建立了以诸葛菜为受体的遗传转化系统, 获得转基因植株, 综合抗性植株再生频率以及上述三种检测阳性频率计算:

转化频率 (%) = 抗性植株再生频率 × GUS 酶活阳性频率 × NPT I 酶活阳性频率 × Southern blot 阳性频率

诸葛菜子叶组织的转化频率为 5.5%, 转化植株子一代的遗传性状正在研究之中。

参 考 文 献

- [1] 周冀明, 刘世贵, 罗 鹏. 草业学报, 1995, 5 (4): 5~8.
[2] 周冀明, 刘世贵, 罗 鹏. 草业学报, 1995, 5 (4): 9~14.
[3] 程振东, 卫志明, 许智宏. 植物学报, 1994, 36 (9): 657~664.
[4] 周冀明, 卫志明, 刘世贵等. 应用与环境生物学报, 1995, 1 (1): 8~12.
[5] Mc Donnel R E, Clark R D, Smith W A *et al.* Plant Mol Rep. 1987, 5: 380~386.
[6] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 9.31~9.38.
[7] mettler I J. Plant Mol Biol Rep, 1987, 5: 346~349.
[8] 贾士荣. 植物学通报, 1992, 9 (2): 3~15.
[9] Moloney M M, Walkr J M, Sharma K K. Plant Cell Rep., 1989, 8: 238~242.
[10] Golz C, F. Kohler, O. Schieder, Plant Mol Biol., 1990, 15: 457~483.
[11] Chi G L, Barfield D G, Sim G E *et al.* Plant Cell Rep, 1990, 9: 195~198.
[12] Purnhauser L, Medgyesy P, Czako M *et al.* Plant Cell Rep, 1981, 6: 1~4.
[13] Harpster M H, Townsend J A, Jones J D G *et al.* Mol Gen Genet, 1988, 212: 182~190.

Agrobacterium-mediated transformation of *Orychophragmus violaceus* Cotyledon and Regeneration of Transgenic Plants

Zhou Jiming^{1,2} Wei Zhiming¹ Xu Zhihong¹ Liu Shigui² Luo Peng³

(National Laboratory of Plant Molecular Genetics, Shanghai Institute
of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)¹

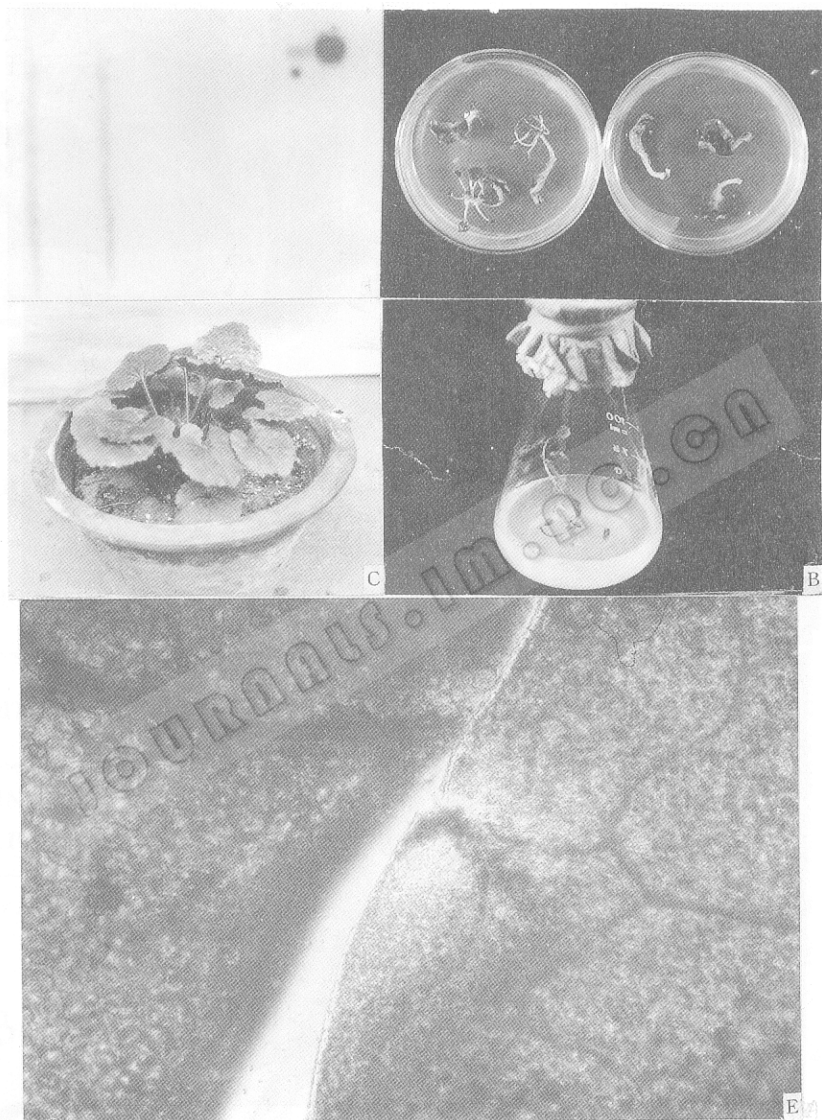
(Department of Biotechnology² and Department of Biology³
of Sichuan University, Chendu 610064)

Abstract Excised cotyledons of *Orychophragmus violaceus*, were used as explants for tissue culture. They were cultured on MS medium supplemented with BA 3 mg/L and NAA 0.2mg/L. When the regenerated buds were 2cm long, they were excised and transferred onto 1/2MS medium with IBA 0.03mg/L, then the whole plantlets were regenerated. The frequency of plant regeneration was 100%. Then we began to study the genetic transformation of *O. violaceus*, After 2~3 days of cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens* strain A208se (pTiT37 pROA93), the cotyledons were transferred onto the selection medium containing 25mg/L Km and 250mg/L Ap. After shoots emerged, they were excised and transferred onto the root medium containing 25mg/L Km and 100mg/L Cef, the roots were formed within 4~5 weeks. The whole plants were transplanted into pots and grew well. The frequency of plant regeneration was about 51%. The regenerated plants showed high enzymatic activities of β -glucuronidase and neomycine phosphotransferase I. Southern blot analysis confirmed that NPT II gene had been stably integrated into the chromosomal genome of *O. violaceus*. The transformation frequency was 5.6%. In this paper, the first transgenic plant of *O. violaceus* is being reported.

Key words *Agrobacterium tumefaciens*, *Orychophragmus violaceus*, cotyledon, transgenic plants

Orychopheagmus violaceus cotyledon and regeneration
of transgenic plants

8 7 6 5 4 3 2 1



A. Effect of kanamycin on shoot regeneration of cotyledon.

Left; Medium without kanamycin, Right; Medium with kanamycin.

B. Whole regeneration plant on rooting medium.

C. Transgenic plant in pot.

D. Southern blot analysis of regenerated plants genome DNA. Plants genome DNA were digested with Hind III / BamHI. 1~2. Positive control (1kb core fragment generated by NPT II gene after being digested with Hind III / BamHI), 3. Negative control, 4~8. Regenerated plants of cotyledons from genetic transformation.

E. GUS enzyme activity assysis of leaf.

Left; Regenerated plants from genetic transformation. Right; Negative control.