

野生型农杆菌 Ti 和 Ri 质粒对马铃薯的双转化研究

朱永莉¹, 戴朝曦²

(1. 上海商学院 艺术设计学院 上海 200235; 2 甘肃农业大学 农学院 甘肃 兰州 730070)

摘 要:用不同的野生型根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) T37, B6, TFA16YE 和发根农杆菌 (*Agrobacteriu . rhizogenes*) TR105, 15834, A4 对马铃薯普通栽培种品种“甘农薯 1 号”的块茎圆片、茎段采用两步侵染法和一步侵染法进行了双转化实验。结果表明: 两步侵染法效果较好, 并得到了分化苗。试验证明, Ti 和 Ri 质粒上的 T-DNA 可进入同一个受体细胞并进行表达, 2 种 T-DNA 上的不同激素在受体细胞中表达可以使受体细胞建立新的激素平衡, 从而提高了转化细胞分化苗的能力, 可以克服野生型农杆菌难以分化苗的缺点, 为今后用野生型质粒作载体以及同时向一个受体细胞中转移多个基因打下了基础; 此外不同菌种组合的效果不同, 分化植株的形态差异也很大; 试验还发现, T-DNA 在整合到受体细胞染色体上时, 可以引起某些基因发生突变。因此, 今后只要用双转化法能使野生型农杆菌双转化的细胞分化出正常植株, 则野生型农杆菌就可以作为一种重要的诱变源为育种提供较多的变异。

关键词: 马铃薯; 野生型农杆菌; Ti 质粒; Ri 质粒; 双转化

中图分类号: S 532; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)09-0203-04

马铃薯具有丰富的营养, 又是重要的粮菜兼用型农

第一作者简介: 朱永莉(1970-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 植物育种与观赏园艺。
收稿日期: 2007-05-31

作物, 当前影响马铃薯生产发展的主要因素是品种问题, 由于马铃薯普通栽培种基因库贫乏, 用常规的育种方法选育出的品种, 在抗病性和抗逆性以及高蛋白含量等性状方面, 很难有新的突破^[1]。近年来发展起来的基因工程技术, 可以创造或引进新的基因, 从根本上改变

表 1 4 种培养基对火棘无菌苗诱导的效果

激素组合 /mg · L ⁻¹	外植体 /个	萌芽 数	萌芽 率/%	成苗 数	成苗 率/%	苗高 /cm	茎节 数
MS+6-BA0.5+NAA1.0	100	20	20	3	3	0.4	—
MS+6-BA0.5+NAA0.5	100	73	73	68	68	1.9	1.4
MS+6-BA0.5	100	87	87	75	75	2.2	2.6
MS+6-BA1.0	100	154	100	120	100	3.9	4.7

以 MS+6-BA 1.0 mg/L 培养基诱导的试管苗茎段作为增殖快繁材料, 在 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5

表 2 火棘茎段在不同激素组合培养基中连续转代培养的表现

激素组合 /mg · L ⁻¹	外植体 /个	第 1 代/30d		第 2 代/60d		第 3 代/90d	
		苗高/cm	茎节数	苗高/cm	茎节数	苗高/cm	茎节数
MS+6-BA0.5+NAA0.5	80	1.6	1.1	1.1	0.8	绝大部分茎段腋芽不能萌发, 茎基部有少量愈伤组织	
MS+6-BA0.5	80	2.0	2.1	1.7	1.3	有少量茎段腋芽萌发, 叶片小而黄, 后期脱落。	
MS+6-BA1.0	80	4.1	4.7	3.9	4.6	4.1	4.8

2.3 火棘的生根

将火棘试管苗切段接种于生根培养基上, 结果见表 3。表 3 表明, 生根培养以 1/2MS+NAA 0.2 mg/L 培养基效果最佳, 生根率达 90% 以上, 且根粗壮, 植株生长旺盛。

表 3 不同浓度 NAA 对火棘试管苗生根的影响^[5]

激素/mg · L ⁻¹	无根苗/株	生根率/%	根生长情况
1/2MS+NAA0.1	50	40	根生长较慢
1/2MS+NAA0.2	50	96	根生长较快
1/2MS+NAA0.4	50	64	根生长较慢

2.4 火棘的练苗与移栽

将生根试管苗的玻璃瓶置于培养室自然光(避免太阳光直射)下打开瓶口练苗 7 d, 然后小心取出试管苗, 洗

mg/L、MS+6-BA 0.5 mg/L、MS+6-BA 1.0 mg/L 3 种培养基上, 以 30 d 为周期进行连续转代培养试验, 结果见表 2。表 2 表明, 经 3 代连续培养, MS+6-BA1.0 mg/L 培养基表现为苗高、茎节数稳定, 繁殖系数高, 茎秆健壮、茎节腋芽明显, 能满足离体快繁的需要。其他激素组合经转代后, 苗高逐渐下降, 叶片很小, 茎秆纤细; 在连续培养 2 代后, 大部分都丧失成苗的能力, 可能与外源激素浓度偏低有关。

净根部培养基, 栽植于含水量为 60% 的珍珠岩的育苗盘中, 喷洒 1 : 700 的多菌灵药液, 保持适当的温、湿度, 14 d 后, 苗成活率达 90% 以上。

3 结论

综上所述, 适宜火棘无菌苗的诱导和继代增殖的培养基为 MS+6-BA1.0 mg/L; 适宜生根的培养基为 1/2MS+NAA 0.2 mg/L。

参考文献

[1] 李玉奇, 邓光华. 观赏植物火棘研究进展[J]. 江西林业科技, 2005(1): 39-41.
[2] 曾明颖, 罗学刚. 火棘的开发利用[J]. 绵阳经济技术高等专科学校学报, 1999(4): 31-34.

植物的遗传性,特别是在抗病或者抗逆性育种方面具有重要的应用价值,在马铃薯育种中具有重要的意义^[2]。

植物基因工程的发展要求建立一种简便、快速、有效的遗传转化系统,把外源基因导入受体细胞,并进而从转化的细胞中再生出完整的工程植株。在这一实验体系中,一方面要求探寻合适的外源基因载体及相应的受体,另一方面还应摸索建立切实可行的转化系统。根癌农杆菌(*Agrobacterium. tumefaciens*)和发根农杆菌(*Agrobacterium. rhizogenes*)是应用于植物遗传转化的两大类农杆菌,它们中分别含有 Ti(诱瘤)质粒和 Ri(诱根)质粒,在农杆菌感染植物受伤部位时, Ti 和 Ri 质粒内的一特定片段(即可转移 DNA, 分别称为 Ti T-DNA 和 Ri T-DNA)能共价地整合到植物染色体上进行复制、转录和表达。T-DNA 上有生长素和细胞分裂素合成基因,当它们转移到植物中后,能进行表达产生大量植物激素,从而使植物产生冠瘿瘤(Crown gall)或产生大量毛根(hairy root)^[3]。

近年来,大多数的研究都忽视了野生型 Ti、Ri 质粒的作用,主要原因是由于野生型农杆菌 Ti 质粒诱导的瘤组织难以分化成苗, Ri 质粒诱导的毛根虽然能分化出植株,但多为畸形,植株矮小,叶片皱缩,且长出的根仍保持平行或向上生长特性,难以成活。而野生型农杆菌的一个最大优点是可以用无激素的培养基进行筛选,无需引入分解抗生素基因等选择标记基因。Ti 质粒的 T-DNA 上含有细胞分裂素基因,有些菌株(如 T37)的瘤组织可以分化成苗,但不能生根(畸胎瘤类型),而 Ri 质粒的 T-DNA 含有生长素基因,有利于根的形成,如果把两者结合起来,进行双转化,使两类 T-DNA 中的激素基因达到平衡,则有可能分化出正常植株。此外,由于农杆菌 T-DNA 在植物染色体上的整合位置不是固定的^[4,5],因而整合后可以引起许多不同的突变,如果这些突变是有利的,而且分化植株又正常,则野生型农杆菌可以作为一种诱变因素。因此,野生型农杆菌还有待进一步挖掘、利用。试验通过不同的根癌农杆菌和发根农杆菌菌株对马铃薯普通栽培品种“甘农薯 1 号”的块茎圆片、茎段进行了双侵染试验,旨在摸索行之有效的转化系统,为今后同时向一个细胞中转移多个基因以及用野生型农杆菌质粒获得生长正常的转化植株打基础,为诱变育种提供一种新的手段。

1 材料和方法

1.1 材料的来源及繁殖

1.1.1 块茎 试验所用块茎为甘肃农业大学农业生物工程研究所培育的新品种“甘农薯 1 号”,为四倍体普通栽培种,块茎贮藏于 4℃冰箱中 2~5 个月备用。

1.1.2 试管苗 试管苗为“甘农薯 1 号”,用它提供所需的茎段材料。试管苗用单节切段法保存和繁殖,即将带有一个腋芽的茎段扦插于 MS 培养基中,置于 25℃左右,室内散射光下培养和保存,每隔 30~50 d 继代繁殖一次。所用扦插培养基为:MS+0.5 mg/L IAA+3%蔗糖+0.6%琼脂(pH=5.8)。

1.2 细菌培养和菌液制备

1.2.1 菌落培养 所用发根农杆菌野生菌株为 TR105、A4、15834,根癌农杆菌野生菌株为 TFA16YK、TFA16YE、B6、T37,农杆菌均在固体培养基(YEM 或 YEB)上进行培养,具体方法是:将保存的菌种在 YEM(YEB)培养基上用接种针进行平板划线法接种,每 24~48 h 划线一次,连续划 2~3 次,以纯化菌种。划好的菌种置于 25~28℃恒温箱中黑暗培养。

1.2.2 菌液的制备 将连续培养 48 h 的具有农杆菌特征的新鲜透明菌落,用接种针挑于预先配备好的 PBS 溶液或不加琼脂的 YEB(YEM)溶液中,一般每 15~20 mL 中挑 5~6 个菌落,在旋涡混匀器上粉碎后,在 25℃黑暗条件下振荡培养 6 h 过夜,此时细菌正好处于生长对数期。细菌的浓度用血球计数板或分光光度计测定。一含有细菌 10^8 个/mL。所用培养基配方如下:①YEM: K_2HPO_4 0.5 g/L + $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L + NaCl 0.1 g/L + 甘露醇 10 g/L + 酵母提取物 0.4 g/L + 0.8%琼脂(pH=6.9);②YEB:牛肉浸膏 5 g/L + 酵母浸膏 1 g/L + 蛋白胨 5 g/L + 蔗糖 5 g/L + $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L + 0.8%琼脂(pH=7.2);③PBS 溶液: KH_2PO_4 430 mg/L + Na_2HPO_4 1 480 mg/L + NaCl 720 mg/L(pH=7.2)。

1.3 转化方法

选用发根农杆菌 TR105、15834、A4 分别与根癌农杆菌 TFA16YE、B6、T37 进行双侵染试验。用“一步侵染法”和“两步侵染法”进行了试验,步骤如下:

1.3.1 一步侵染法 将含有根癌农杆菌和发根农杆菌的菌液等浓度混合,调整浓度到细菌 10^8 个/mL。设置两种对照,一种是用同样浓度的这两个细菌分别单独地接种;另一种是用无任何细菌的 PBS 溶液浸泡。然后将预先准备好的块茎圆片或茎段放入菌液中,浸泡 15~20 min 并不断轻轻摇动,然后将块茎圆片或茎段取出放于无菌吸水纸上吸干菌液,将块茎圆片接于水琼脂培养基上,将茎段接于无糖 MS 培养基上共培养 48 h 后再转入 0.5 g/L 羧苄青霉素(Cb)的无激素 MS 培养基上生长,培养条件同前,培养 30~40 d 后,对结果进行统计并做出冠瘿碱分析。

1.3.2 两步侵染法 将块茎圆片按前述方法接种发根农杆菌。接种 12~14 d 以后,有许多平行或向上生长的

负向地性毛根从块茎盘产生。将毛根剪下根尖,在含有 0.5 g/L Cb 的无激素 MS 培养基上继代繁殖 2~3 次,每 2 周一次,得到无菌毛根后,将它在不含 Cb 的无激素 MS 培养基上保存。大约 3 个月以后,将毛根剪成 0.3~0.5 cm 的切段,用根癌农杆菌菌液浸泡 15~20 min,取出后用 PBS 缓冲液或无菌水冲洗 4~5 次,再在无菌吸水纸上吸干水分,放于无糖和无激素的 MS 培养基上以诱导癌瘤,每 2 周转移一次,经过 3~4 次,将得到无菌癌瘤转到分化培养基上培养以诱导苗的分化,对结果进行统计,并对分化苗或癌瘤进行冠瘿碱分析。

1.4 冠瘿碱 (opine) 分析

按 Otten 等^[9]的方法,将新鲜组织约 0.5 g (癌瘤、茎、叶) 在冰箱中冰冻 20 min 左右取出,在研磨器中研磨压碎,挤出原液,置于离心管中,放入 6 000~7 000 rpm 的离心机上离心 15 min,取其 10^μL 上清液,用 20×30 cm 新华 1 号滤纸进行电泳,距边缘 7 cm 作起点线,样点之间距为 1.5 cm,每点一次样都用热吹风机吹干。分别用胍脂碱 (Napoline)、章鱼碱 (Octopine) 作标样,所用电泳液为甲酸:乙酸:水=5:15:80 的缓冲液,在 500 V 直流电下,电泳 1 h,将滤纸吹干后用 0.01% 的菲醌+2%NaOH 的 80%酒精溶液染色。染色后立即将滤纸吹干,在紫外光下观察。

2 结果与分析

2.1 一步侵染法试验结果

用根癌和发根农杆菌混合侵染,接种 10 d 后,癌瘤组织开始从马铃薯块茎表面或茎段两端形成,12~15 d 左右,根开始发生。有两种不同类型的毛根产生,一种是白色、纤细和多根毛的,它们直接从块茎 (茎段) 表面产生,是由 Ri 质粒单转化引起的,因为 Opine 分析表明无章鱼碱存在;另一类根是由癌瘤组织上长出的粗壮和少根毛的毛根,它们都是由 Ti 质粒与 Ri 质粒细胞双转化产生的,因为对两种根进行 Opine 分析的结果表明,第二类根中有章鱼碱存在,表明这种根是由致癌农杆菌侵染后得来的。用 PBS 无菌溶液浸泡的对照既无癌瘤形成,也无毛根发生。从复合转化形成癌瘤及根的数量上看,加入发根农杆菌后,对于致癌农杆菌的致癌作用无显著影响,但加入致癌农杆菌后,对发根农杆菌的发根能力有明显的抑制作用 (表 1)。

2.2 两步侵染法试验结果

将在无激素 MS 培养基上继代培养了 2~3 次的毛根切段用根癌农杆菌侵染 20~30 d 以后,在毛根切段的一端或两端的切口处形成了癌瘤组织。A4+T37 的处理产生的癌瘤组织为绿色,15834+T37 的处理产生的癌瘤组织为红色,这些癌瘤组织在无激素的毛根培养基上

生长缓慢,培养 2~3 个月以后,有一部分死亡,当把它们转移到补加 0.01 mg/L NAA 和 2 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上后,生长明显加快。培养一段时间后,一部分癌瘤变为白色的松软组织,但另一部分仍保持绿色或红色的坚硬状态。随机抽取两类癌瘤组织进行 opine 分析,结果表明,所有的绿色和红色坚硬癌瘤组织都是含有胍脂碱的,而白色松软的癌瘤组织则不含胍脂碱,因此绿色和红色坚硬癌瘤组织都是由 Ti 和 Ri 质粒复合转化引起的;而不含胍脂碱的白色松软组织是在有激素的培养基上发育起来的毛根愈伤组织。在 MS 培养基上,连续继代几次以后,绿色组织逐渐变软,疏松,但红色组织仍然保持坚硬、致密状态。

表 1 一步侵染法对茎段的试验结果 (侵染后 30 d)

处理	茎段数	处理	形成癌	诱导率	形成毛根的	非癌毛根
			外植体数	/ %	茎段数	诱导率/ %
混合	TR105+TFA16YE	82	25	30.5	9	11.0
侵染	TR105+B6	38	9	23.7	4	10.5
单	TR105	35	0	0	18	51.4
侵	TFA16YE	35	10	28.6	0	0
染	B6	28	6	21.4	0	0
对照	PBS 溶液	17	0	0	0	0

注:经 t 测验,在 P=0.05 水平上,双转化与对应根癌农杆菌单转化诱导率之间差异不显著,双转化与对应发根农杆菌单转化之间诱导率差异显著;处理与对照之间的差异均达极显著水平。

将红色 (15834+T37) 和绿色 (A4+T37) 癌瘤转至含有不同浓度 6-BA 和 GA₃ 的分化培养基上促使其分化,分化情况见表 2。3 周以后便可见到分化植株的出现,但两种处理的植株形态不同,15834+T37 诱导的苗比较矮粗,接近正常植株,而 A4+T37 的分化苗则类似于丛生苗,畸形。

表 2 不同浓度的 GA₃ 和 6-BA 对癌瘤组织分化的影响

菌株	6-BA	GA ₃	转接癌瘤数	分化癌瘤数	分化率/ %
	/ mg · L ⁻¹	/ mg · L ⁻¹			
A4+T37	2.25	5	40	24	60.0 a
	1.50	3	32	9	28.1 b
	6.00	5	36	23	63.9 a
	10.00	10	26	4	15.3 c
15834+T37	2.25	5	30	12	40.0 a
	1.50	3	22	2	9.0 b
	6.00	5	36	14	38.9 a
	10.00	10	17	2	11.8 b

注:1. 所用品种均为“甘农薯 1 号”,为转入分化培养基 3 个月的统计结果;2. 用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性测验,凡数字后有不同字母表示达到或超过 5% 的差异显著性水平。

3 讨论

3.1 有报道表明,野生型 Ti 质粒单转化诱导的癌瘤组织难于分化苗,Ri 质粒诱导的毛根虽然具有一定的分化苗的能力,但分化率很低,而且分化植株也多为畸形。一个受体细胞不可能同时容纳两个或更多的同一类型的 T-DNA,但可以同时容纳 Ti 和 Ri 质粒的 DNA。试

验的结果表明, 利用 Ri 质粒和 Ti 质粒各自所含激素的差异, 采用双侵染法, 使它们的 T-DNA 同时进入一个受体细胞以调节转化细胞内的激素平衡, 使生长素与细胞分裂素两类激素水平达到了平衡, 从而使转化组织易于分化苗, 虽然有些分化苗还有畸形, 但这已与野生 Ti 质粒单转化诱导的瘤瘤不分化苗形成了鲜明的对比, 使诱导转化苗的效率大大提高, 这为今后同时向一个细胞中转移多个基因打下了基础。

3.2 此外由于 T-DNA 整合到受体细胞染色体上的位置是随机的, 因此, 野生型农杆菌如果能产生出正常生长的转化苗, 则它们也可以作为一种诱变因子使受体产生突变, 为育种提供新的变异来源, 由此可见, 双转化为利用野生型农杆菌开辟了一条新的有利途径, 有待今后深入研究。

3.3 试验结果还表明, 不同菌株的组合对同一品种进行转化的结果大不相同, 转化植株生活力差异很大, 所引起一些基因(如色素基因, 叶形基因等)发生突变的情况不同, 这是由于不同菌株激素水平以及 T-DNA 在受体细胞染色体中整合位置不同的缘故。因此, 今后对不同菌种的组合还有待于进一步研究, 以便找到一个最佳组合, 获得更好的转化系统。

3.4 研究对转化组织未进行 DNA 检测, 只进行了冠瘿碱测定。因为冠瘿碱是野生型农杆菌 T-DNA 上特有基因的产物, 组织中有此类物质存在已足以证明是转化组织, 再加上它们能在无激素的培养基上生长, 转化组织的激素自主性特性始终保持很好, 也是一个有利的证明, 这正是野生型农杆菌的一大优点, 为选择转化植株提供了较为便利的条件, 也是用野生型质粒与改建质粒相比更为方便之处。

参考文献

- [1] 张俊莲, 王蒂. 我国马铃薯育种方式的变迁及其转基因育种研究进展[J]. 中国马铃薯, 2005, 19(3): 163-167.
- [2] 戴朝曦. 基因工程技术在马铃薯遗传育种研究中的应用[J]. 生物技术通报, 1992(9): 1-3.
- [3] 贾士荣, 王志兴. 农杆菌介导的植物遗传转化// 莽克强. 农业生物技术[C]. 北京: 化学工业出版社, 1998: 85-115.
- [4] 潘涛, 马惠萍, 杨全福. 用野生型农杆菌菌株 B6 转化马铃薯试管苗组织的研究[J]. 中国马铃薯, 2006, 20(3): 154-156.
- [5] 汪世平, 杨全福. 用野生型农杆菌菌株 TR105 转化马铃薯试管苗组织的研究[J]. 甘肃农业, 2006(4): 33.
- [6] Otten L A B M, Schilperoot R A. A rapid micro scale method for the detection of lysopine and nopaline dehydrogenase activities[J]. Biochem Biophys Acta, 1978, 527: 497-500.

Studies on Double Transformation by the Use of Ti & Ri plasmids of Wild Type *Agrobacteria* in Potato

ZHU Yong-li¹, DAI Chao-xi²

(1. College of Art Design, Shanghai Business School Shanghai, 200235, China; 2. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In the studies, double transformation experiments were made with *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes* on tuber discs and stem segments of *Solanum tuberosum* cv. Gannongshu No. 1, utilizing one-step infection method and two-step infection method separately. The results showed that the two-step method was better and the differentiated shoots were obtained. It was proved that T-DNA from Ti plasmid and Ri plasmid could be injected into the same recipient cells; and the different phytohormone genes on these two T-DNA could express in the same recipient cells, and the new auxin/cytokinin balance could be established. As a result, the transformed cells could differentiate shoots, which could overcome the disadvantage of wild type *Agrobacteria* in difficult shoots differentiation. This may be a new way to use the wild type *Agrobacteria* as the vector to transfer two or more genes into the same recipient cells at the same time. Besides, this experiment also showed that the different combinations of bacterium strains could produce the very different plantlets in morphology. It was also found that when T-DNA was integrated into the chromosomes of the recipient cells, some mutations could be induced. Because this course is random, if the double transformation method can produce normal plants from the double transformed cells, the wild type *Agrobacterium* species can be used as a mutagen to provide more variations for plant breeding.

Key words: Potato; Wild Type *Agrobacteria*; Ti plasmid; Ri plasmid; Double transformation