

青花菜农杆菌遗传转化影响因素研究

于 娅, 段 威

(武汉生物工程学院 生物科学与技术系, 湖北 武汉 430415)

摘 要:以青花菜“绿秀”为试材,以带柄子叶为外植体,采用根癌农杆菌 LBA4404 菌株进行农杆菌遗传转化,研究了影响青花菜遗传转化的主要因素。结果表明:乙酰丁香酮浓度、OD₆₀₀ 值、侵染时间等对瞬间表达均有一定的影响。其中,OD₆₀₀ 值影响最大,AS 浓度影响次之,再次是侵染时间。最适宜的试验条件为:乙酰丁香酮浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 、OD₆₀₀ 值为 0.3、侵染时间为 5 min。抗性植株经 PCR 检测、Southern 杂交和 GUS 组织化学染色法,表明目的基因已整合到青花菜基因组中并得到了很好的表达。

关键词:青花菜;遗传转化;PCR;GUS

中图分类号:S 635.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)12-0093-04

青花菜(*Brassica oleracea* L. var. *italica*)属十字花科芸薹属甘蓝种,又名西兰花、绿菜花、茎椰菜、木立花椰菜、意大利芥蓝等,是以绿色花球为产品的 1、2 a 生草本植物^[1]。原产于地中海沿岸,19 世纪末叶传入我国。由于其鲜绿脆嫩的质地,清爽适口的风味,丰富的维生素 A 和维生素 C,以及含量可观的维生素 B₁、B₂、B₆、钙和铁等物质。青花菜还有很好的抗癌效果,最主要的抗癌活性成分是异硫氰酸盐,这种物质具有高度的生物活性,能诱导人肝癌细胞和胃腺癌 SGC-7901 细胞凋亡^[2],可通过日常饮食达到防癌的效果。另外,还能够增强肝脏的解毒能力^[3],提高免疫力^[4]。受到消费者的青睐,消费势头日益上升,栽培面积越来越大。青花菜栽培历史较短,但发展很快,在我国已成为一些地区出口创汇的重要优质蔬菜种类之一。

蔬菜生长中的病虫害和干旱、冻害等生物性和非生物性胁迫所造成的经济损失令人惊叹。传统的病害防治主要是依靠化学农药和培育抗性品种,但传统育种周期长,费时费力;而化学农药的残留,严重破坏了生态平衡,限制了农药的大面积使用。现代生物技术的发展,为选育具有优良农艺性状基因的品种提供了可能。从 20 世纪 80 年代起,人们开始利用农杆菌转基因技术培育抗性植株来预防病虫害,并收到了良好的效果^[5]。然而,国内外关于青花菜遗传转化的技术还很不成熟,难以适应青花菜分子育种的要求。该试验拟以报告基因

(GUS)进行农杆菌遗传转化,探讨其在青花菜作物上的整合与表达,以期为其基因工程研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试青花菜品种“绿秀”购于中国农业科学院。

农杆菌菌株 EHA105 购于北京鼎国生物有限公司。

外源基因:GUS, β -葡萄糖醛酸酶基因。

1.2 试验方法

1.2.1 青花菜离体再生体系的建立 挑选饱满的青花菜种子,用 2% NaClO(v/v)消毒 8 min,无菌水冲洗 3~4 次,每次 5 min,然后播种于 MS 培养基上,(25 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$,光照 16 h/d 条件下培养成苗。培养 6~7 d 后,选取无菌苗的带柄子叶作为外植体,接种于培养基 MS+ZT 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L,用于不定芽的诱导。

1.2.2 GUS 基因瞬时表达正交实验 针对乙酰丁香酮(AS)浓度、OD₆₀₀ 值、侵染时间 3 个影响因素,进行 L₉(3⁴)正交实验,具体方案见表 1。

1.2.3 转基因植株的 PCR 检测 CTAB 法微量提取青花菜 DNA,用相应的引物进行 PCR,以鉴定基因是否导入青花菜基因组中。按照标准反应程序进行 PCR 扩增,扩增体系为 1 μL DNA,各 1 μL 的引物(1 μmol),10 μL 的 ExTaq Premix 7 μL ddH₂O。反应体系 20 μL ,反应结束后,取 10 μL PCR 产物,进行琼脂糖电泳,凝胶经 EB 染色后在紫外灯下观察照相。GUS 引物:5'-GCG TCG CAG AAC ATT ACA-3',5'-GCA ACT GGA CAA GGC ACT-3',反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。目的带:680 bp。

第一作者简介:于娅(1976-),女,博士,讲师,研究方向为植物遗传转化育种与基因工程。E-mail:yuy1025@163.com。

基金项目:湖北省教育厅科研资助项目(B20104602)。

收稿日期:2013-03-19

表 1 GUS 基因瞬时表达正交实验设计

水平	A AS 浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	因素 B OD ₆₀₀ 值	C 侵染时间/min
1	0	0.3	1
2	200	0.8	5
3	100	0.1	15

2 结果与分析

2.1 青花菜农杆菌转化体系的优化

该试验研究了影响遗传转化体系的 4 个因素:乙酰丁香酮 AS 浓度、OD₆₀₀ 值和侵染时间瞬间表达(图 1)。由表 2 和表 3 可知,最适宜的试验条件为 A₃B₁C₂,即乙酰丁香酮浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 、OD₆₀₀ 值为 0.3、侵染时间为 5 min。*R* 值由大到小的排列顺序为 B>A>C,最重要的影响因素是 OD₆₀₀ 值,AS 浓度影响次之,再次是侵染时间。其中农杆菌侵染浓度 OD₆₀₀ 值对转化结果达到显著差异。

表 2 GUS 基因瞬时表达
正交实验结果与直观分析Table 2 The analysis of the design from
the orthogonal test L₉(3⁴) from the histochemical analysis of
GUS transient expression in broccoli

试验号	A AS 浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	因素 B OD ₆₀₀ 值	C 侵染时间 /min	D(空白)	转化率/%
1	1	1	1	1	31.5
2	1	2	2	2	22.4
3	1	3	3	3	18.6
4	2	1	2	3	72.5
5	2	2	3	1	34.6
6	2	3	1	2	22.1
7	3	1	3	2	74.3
8	3	2	1	3	25.6
9	3	3	2	1	34.2
K1	24.167	59.433	26.400	33.433	
K2	43.067	27.533	43.033	39.600	
K3	44.700	24.967	42.500	38.900	
<i>R</i> 值	20.533	34.466	16.633	6.167	

在农杆菌介导的遗传转化中,适当的菌液浓度是转化成败的关键问题之一,菌液浓度过低时,由于农杆菌数目不足影响对愈伤组织的侵染,因而外植体转化效率降低;但当菌液浓度过高时,过度繁殖的菌体对植物细胞易造成毒害,引起褐化,从而引起转化效率下降。因此,适当菌液浓度是农杆菌转化率提高的主要因素。肖军等^[6]认为当菌液浓度在 OD₆₀₀ 值 0.8 以下时,*GUS* 基因瞬时表达频率随着菌液浓度的增加而升高,菌液浓度在 OD₆₀₀ 值超过 0.7 时,转化频率开始下降。该试验中适当的菌液浓度为 OD₆₀₀ 值为 0.3~0.4。乙酰丁香酮浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$,这与前人研究的结论基本一致。乙酰丁香酮是植物伤口释放出来的信号因子,在共培养

过程中加入能有效的促进转化效率。侵染时间对转化率也有比较大的影响,不同植物种类对农杆菌的敏感性不同。青花菜外植体对农杆菌非常敏感,因此不适宜用较长的时间进行侵染。

表 3 正交设计的方差分析

Table 3 The analysis of variance of the orthogonal test L₉(3⁴)

变量	偏差平方和	自由度	F 比	F _{0.05} 临界值	显著性
A(AS 浓度)	781.496	2	11.425	19.000	
B(OD ₆₀₀)	2 212.149	2	32.340	19.000	*
C(侵染时间)	536.162	2	7.838	19.000	
D(e)	68.40	2			

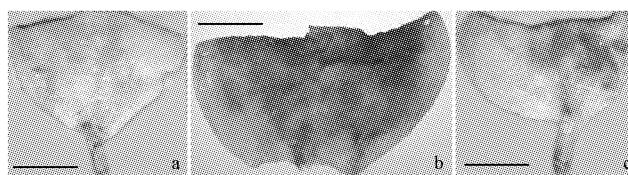


图 1 青花菜带柄子叶的瞬间表达

注:a~c:带柄子叶的瞬间表达;bar=1 cm。

Fig. 1 Histochemical analysis of GUS transient expression with
cotyledons in broccoli

Note:a~c: Histochemical analysis of GUS transient expression with
cotyledons; bar=1 cm.

2.2 青花菜 GUS 基因的农杆菌遗传转化研究

随机选择抗性植株 11 株进行 PCR 检测,图 2 结果表明,8 株均有阳性信号产生,条带大小为 680 bp。再进一步进行 Southern 杂交检测,由图 3 可知,6 株有阳性信号产生,拷贝数多为单拷贝,少数为 2~3 个拷贝。再对转化植株的叶片、叶柄和根进行了 GUS 组织化学染色(图 4),结果表明转化植株的各个器官均有比较高的表达量。

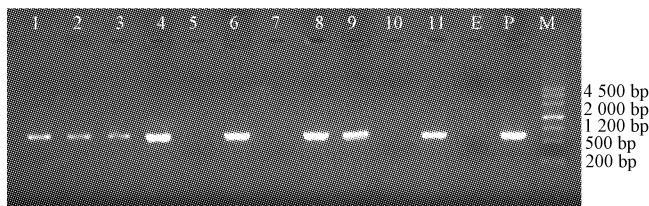


图 2 青花菜转化植株的 PCR 检测

注:泳道 1~6:抗性转化植株;E:阴性对照;P:阳性对照,M:Marker。

Fig. 2 PCR analysis of kanamycin-resistant plantlets in broccoli

Note:Lane 1~6: The plantlet resistant to kanamycin; P: The amplification
from the plasmid DNA; E: The untransformed plants serving the control;
Lane M: Marker III.

3 讨论

3.1 乙酰丁香酮对转化率的影响

农杆菌 Ti 质粒的 Vir 区基因对 T-DNA 的转移起

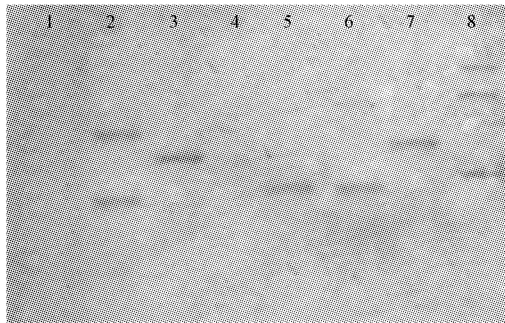


图3 青花菜转化植株的 Southern 杂交分析

注:泳道 1:阴性对照;2~8:抗性转化植株。

Fig. 3 Southern hybridization analysis of kanamycin-resistant plantlets in broccoli

Note: Lane 1: The untransformed plant; Lane 2~8: Genomic DNA of putative transformants.

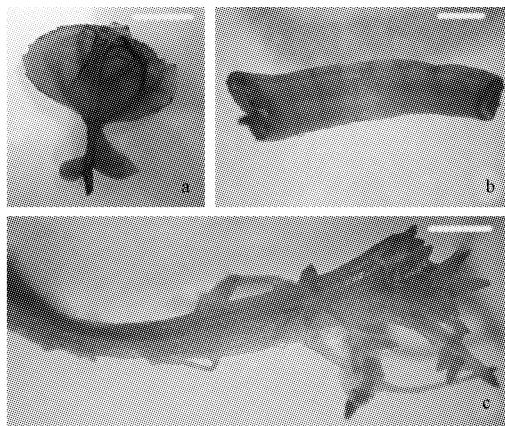


图4 青花菜转化植株 GUS 组织化学染色分析

注:a:抗性苗叶片的组化染色;b:转化苗叶柄的组化染色;c:转化苗根的组化染色。

Fig. 4 Histochemical staining of GUS activity of leaves, petioles and roots of transgenic broccoli

Note: a: Histochemical staining of GUS activity of leaves of transgenic plantlets, bar=1 cm. b: Histochemical staining of GUS activity of petiole of transgenic plantlets, bar=5 mm. c: Histochemical staining of GUS activity of roots of transgenic plantlets, bar=3 mm.

到介导作用。当农杆菌在生长培养基中培养大量繁殖时,所有 Vir 基因均处于非转录活性状态。已有大量研究表明^[7]酚类化合物对 Vir 区基因的活化具有重要作用。受伤细胞产生的一些低分子的酚类化合物可以明显刺激农杆菌 Vir 基因表达。常用的 Vir 基因诱导物是乙酰丁香酮(AS)和羟基乙酰丁香酮(OH-AS),其中 AS 效果最好。AS 能够诱导农杆菌 Vir 基因的表达,对单子植物的遗传转化起着重要的作用;但在双子叶植物中,不同的植物种类却有不同的要求^[8]。很多双子叶植物由于植物组织和器官受伤后可以分泌类似酚类或酮类

的物质,因此对 AS 没有很强的依赖性,在没有 AS 存在的情况下依然可以获得一定的转化效率^[9]。该试验在共培养过程中添加 AS 没有得到明显的效果,可能是因为青花菜外植体在器官受伤后产生较多的酚类物质的缘故,蒋细旺^[10]和吴延军^[11]也有同样的报道。另外,陈李森等^[12]、钱雪艳等^[13]也报道,在适宜的乙酰丁香酮浓度下,超声波辅助农杆菌介导,转化效果更佳。

3.2 选择方法对转化率的影响

在植物遗传转化过程中,选择的最终目的是把真正转化体选择出来。按照选择压加入时期不同可以分为 3 种,即前期选择、延迟选择和后期选择^[8]。前期选择是在外植体与农杆菌共培养后,立即转入选择培养基,即先选择后再再生。据报道,前期选择有利于转化细胞对非转化细胞的竞争,提高转化率。但是有的植物采取前期选择不能得到转化植株。延迟选择是在不定芽诱导一段时间后再加入选择压。后期选择是不定芽诱导过程中不加入选择压,当不定芽形成后再将其转入选择培养基进行筛选,即先再生后选择。不同的植物对选择压的敏感性不同,有的植物前期选择能够得到较多的转化植株^[14];而 Choi 等^[15]认为,共培养后立即选择会造成大量非转化细胞褐化并产生多酚类化合物,影响转化细胞的生长。Sullivan 等^[16]在对枫香木进行遗传转化的过程中发现,延迟选择才能形成愈伤组织和植株再生,如立即选择则无愈伤组织形成。夏秀英^[17]在对樱桃砧木的遗传转化时发现,共培养后立即进行筛选不利于转化细胞的再生,而延迟 7~14 d 选择可以显著提高叶片的转化率。Nehra 等^[18]在对草莓进行转化时,将侵染后的外植体先在不加抗生素的培养基中培养 10 d,然后再加入选择压进行筛选,最终获得了较高的转化频率。袁维凤等^[19]对草莓的报道认为,不同基因型对不同选择方式表现不同的结果,“土特拉”脱分化和再分化所需时间较长,不利于转化细胞的生长,因而未能获得转化芽。而采取延迟筛选或后期选择的方式均得到了一定的转化率。对于“丰香”,3 种选择方式均得到了一定的转化率。蒋盛军^[20]对甘薯悬浮细胞进行转化时发现,延迟选择 5~8 d 得到了较高的转化率,立即选择或延迟选择时间过短会杀死部分转化细胞。延迟选择时间过长会导致大量假阳性愈伤组织的形成,这些愈伤组织生长速度快于转化细胞,抑制了转化细胞的正常生长。对于青花菜的研究发现,延迟选择 5~7 d 有利于转化植株的再生,因为青花菜下胚轴和带柄子叶 2 种外植体对农杆菌和卡那霉素都非常敏感,与农杆菌侵染后立即筛选,会造成大量外植体褐化死亡;而延迟选择可以让转化细胞进行一些分化,再适时加入选择压,这样转化细胞对于非转化细胞竞争增强,这样可以极大减轻外植体的褐化率,提高转化效率。

参考文献

- [1] 肖永清,田孟强. 西兰花的高产栽培技术[J]. 中国农技推广, 2004(4):49-62.
- [2] 邹翔,郎朗,武晓丹,等. 西兰花中葡萄糖异硫氰酸盐诱导人胃腺癌 SGC-7901 细胞凋亡的初步研究[J]. 中草药, 2007, 38(2):228-231.
- [3] 王晓梅,崔坤,陆艳玲,等. 中国西兰花应用价值及生产、出口前景分析[J]. 农业信息科学, 2008, 24(11):478-480.
- [4] 胡彩虹,钱仲仓,刘海洋,等. 西兰花茎叶粉对绿牧快大型草鸡生长性能和肉质的影响[J]. 动物营养学报, 2010, 22(1):194-200.
- [5] Cao J, Tang J D, Strizhov N, et al. Transgenic broccoli with high levels of *Bacillus thuringiensis* Cry1C protein control diamondback moth larvae resistant to Cry1A or Cry1C[J]. Mol Breeding, 1999, 5:131-141.
- [6] 肖军,石太渊,郑秀春,等. 根瘤农杆菌介导的高粱遗传转化体系的建立[J]. 杂粮作物, 2004, 24(4):200-203.
- [7] Stachel S E, Zambryski P C. Vir A and Vir G control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*[J]. Cell, 1986, 46:325-333.
- [8] 王关林,方宏筠. 植物基因工程(第2版)[M]. 北京:科学出版社, 2002.
- [9] 董喜才,杜建中,王安乐,等. 乙酰丁香酮在植物转基因研究中的作用[J]. 中国农学通报, 2011, 27(5):292-299.
- [10] 蒋细旺. 根瘤农杆菌介导的 Bt 与 GNA 基因转化菊花品种的研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2003.
- [11] 吴延军. 桃组织培养及遗传转化研究[D]. 杭州:浙江大学, 2004.
- [12] 陈李森,田星星,单志慧,等. 利用农杆菌介导法转化大豆子叶节的影响因素研究[J]. 大豆科学, 2012, 31(1):17-23.
- [13] 钱雪艳,郭东全,杨向东,等. 超声波辅助农杆菌介导转化大豆未成熟胚的研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(2):658-661.
- [14] Delbreil B, Guerche P, Jullien M. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Asparagus officinalis* L. long-term embryogenic callus and regeneration of transgenic plants[J]. Plant Cell Rep, 1993, 12:129-132.
- [15] Choi P S, Soh W Y, Kim Y S, et al. Genetic transformation and plant regeneration of watermelon using *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Cell Reports, 1994, 13(6):344-348.
- [16] Sullivan J, Lagrimini L M. Transformation of *Liquidambar styraciflua* using *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Cell Reports, 1993, 12:303-306.
- [17] 夏秀英. 樱桃砧木的离体再生及抗菌肽基因的转化研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2000.
- [18] Nehra N S, Chibbar R N, Kartha K K, et al. Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system[J]. Plant Cell Reports, 1990, 9:293-298.
- [19] 袁维凤,金万梅,尹淑萍. 生长调节物质对草莓叶片再生不定芽的影响[J]. 植物生理学通讯, 2004(4):447-449.
- [20] 蒋盛军. 甘薯胚性悬浮细胞的遗传转化和转基因植株的有效再生[D]. 北京:中国农业大学, 2003.

Study on the Factors Affecting the *Agrobacterium* Mediated Transformation of *Brassica oleracea* var. *botrytis*

YU Ya, DUAN Wei

(Department of Bioengineering, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415)

Abstract: Taking *Brassica oleracea* var. *botrytis* variety 'Lvxiu' as material, cotyledons with petiole as explants, *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 were used to transformation system, and the factors affecting the *Agrobacterium* mediated transformation of *Brassica oleracea* var. *botrytis* were studied. The results showed that the concentration of acetosyringone, OD₆₀₀ value, infection time had certain effect on transient expression. Among which OD₆₀₀ value had the most influence, followed by the concentration of acetosyringone and infection time. The optimum condition was 100 μmol/L acetosyringone, OD₆₀₀ value 0.3, infection time 5 min. The resistant plants demonstrated by PCR, Southern hybridization analysis and GUS staining showed that the target gene had been integrated into the broccoli genome and had been well expressed.

Key words: broccoli; transformation; PCR; GUS