

通过植株原位真空渗入遗传转化获得转基因芥菜*

金万梅^{1,2}, 巩振辉¹, 宋正旭¹, 宋献军¹, 严慧玲¹

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 2 北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093)

[摘要] 以芥菜(*B. rassaica juncea* Coss)雪里蕻和圆叶芥为试材, 在携带潮霉素磷酸转移酶基因和 CaMV Bari-1 基因VI的根癌农杆菌菌株 GV 3101 的介导下, 采用植株原位真空渗入遗传转化技术, 将外源基因潮霉素磷酸转移酶基因和 CaMV Bari-1 基因VI导入芥菜。采收 T₁ 种子, 经潮霉素抗性筛选和 PCR 分子检测, 证实获得了转基因植株。

[关键词] CaMV 基因VI; 真空渗入法; 遗传转化; 根癌农杆菌; 芥菜

[中图分类号] Q 785; S636 403 6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)05-0039-04

芥菜(*B. rassaica juncea* Coss)是我国一种重要的加工和鲜食蔬菜。近年来, 花椰菜花叶病毒(CaMV)已发展成为芸薹属蔬菜作物上不可忽视的重要病害, 受到蔬菜育种学家的广泛关注。利用常规育种方法选育抗 CaMV 新品种的主要障碍是抗源缺乏和抗源所携带的不良园艺性状难以改造。植物遗传转化技术的发展为解决这一问题开辟了新途径。巩振辉等^[1]曾将 CaMV 弱株系 Bari-1 基因VI导入拟南芥, 所获得的9个转基因系对 CaMV Cabb-BJ I 强株系表现出了较高的遗传工程交叉保护作用。关于芥菜的遗传转化国内外已有成功的报道, 但转化率较低^[2~4]。植株原位真空渗入遗传转化法是拟南芥遗传转化的常用方法^[5,6], 且已成功地应用于芸薹属经济作物上^[7,8], 但在芥菜上尚未见报道。为此, 本试验以叶用和根用2种生态型的芥菜“雪里蕻”和“圆叶

芥”为试材, 采用植株原位真空渗入遗传转化法, 试图将 CaMV Bari-1 基因VI导入芥菜, 获得芥菜转基因植株, 为优化芥菜真空渗入遗传转化体系及开展 CaMV 遗传工程交叉保护作用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试植物材料为叶用和根用2种生态型的芥菜, 品种分别为“雪里蕻”和“圆叶芥”, 均由河北邢台华丰种子公司提供。

1.2 根癌农杆菌菌株

GV 3101 由陕西省分子生物学重点实验室保存, 其构建参照文献^[5], 携带 CaMV Bari-1 基因VI和潮霉素磷酸转移酶基因。基因图谱见图1。

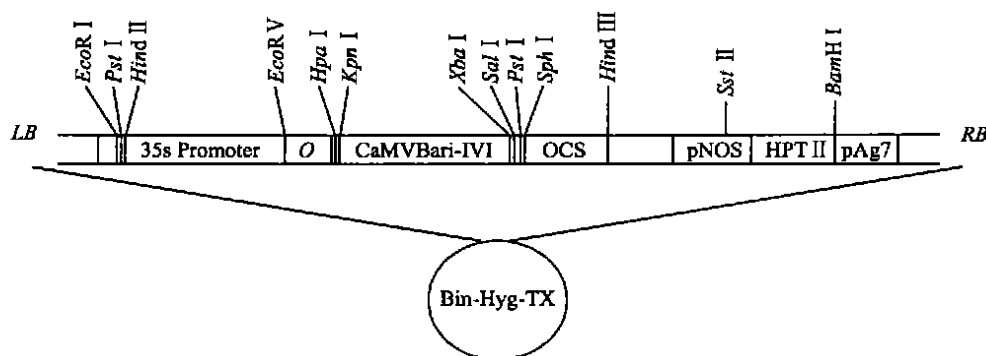


图1 CaMV Bari-1 基因VI图谱

Fig 1 CaMV Bari-1 gene VI map

* [收稿日期] 2002-10-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39770522); 教育部优秀年轻教师资助项目; 科技部杨凌生物育种中心基金资助项目的部分内容(1999-18B)

[作者简介] 金万梅(1971-), 女, 甘肃靖远人, 硕士, 主要从事植物遗传转化研究。

[通讯作者] 巩振辉(1957-), 男, 陕西礼泉人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事蔬菜生物技术及种质资源与育种研究。

1.3 芥菜植株遗传转化适宜苗态的建成

芥菜种子经 50℃温烫 10 min, 23℃浸种 2~6 h, 催芽 20 h, 置于 0~4℃低温下处理 25 d, 或露地 9 月下旬和次年 2 月下旬播种, 均易形成原位真空渗入遗传转化体系的适宜苗态^[9]。

1.4 芥菜植株原位真空渗入遗传转化

根癌农杆菌菌株 GV 3101 在真空渗入前 2 天开始培养繁殖。LB 培养基用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调至 pH 7.0, 并经 121~126℃高压灭菌 20 min。冷却至 55℃时加入 kan 50 mg/L 和 Gen 25 mg/L, 用于菌株 GV 3101 的繁殖。挑取单菌落接种于 400 mL LB 液体培养基中, 28℃黑暗条件下 300 r/min 振荡培养 36 h, 达到对数生长平台期, 4 000 r/min 离心 10 min; 用灭菌的 pH 7.0 的 1/2 M S 无机 + B₅ 有机物渗入培养基稀释, 将农杆菌浓度稀释至 OD₆₀₀ = 0.8。将配制好的渗入培养菌在 300 r/min 的振荡器上培养活化 2 h 备用。取植物材料倒浸于含农杆菌的渗入培养基中, 真空处理后, 取出植物材料, 用塑料薄膜覆盖保湿, 黑暗培养 12 h^[5, 6, 10]。然后移至温室培养, 覆盖纱网, 待植株开花结籽, 收获并干燥 T1 代种子, 标记备用。

1.5 芥菜 T1 代种子的筛选

筛选培养基 (1/2 MS 培养基) 经 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调 pH 至 7.0, 高压灭菌后, 冷却至 55℃加入不同浓度的潮霉素。试验设 0, 15, 20, 25, 30, 35 μg/mL 等 6 个不同浓度处理。未经处理的芥菜种子用体积分数 70% 酒精消毒 30 s, 体

积分数 2% 的次氯酸钠浸泡 25 min, 无菌水冲洗 3 次, 每次 5 min, 接种在培养基中, 观察记录子叶和根的生长发育状况, 确定芥菜筛选的最佳浓度和最佳筛选时期。

将芥菜 T1 代种子经以上消毒处理后接种于含 25 μg/mL 潮霉素的筛选培养基中, 进行抗性筛选。潮霉素为 Sigma 公司产品。

1.6 转基因植株的分子检测

随机取 7 株抗性苗, 取幼嫩叶片 0.05 g, 微量 DNA 提取方法参照文献^[11]。用 CaMV Bari-1 基因 VI 3 和 5 端作引物进行 PCR 扩增^[15]。引物 1: CTTCTTTA TCTA GA GGAA GGGT; 引物 2: ACA TCTCTG GTA CCT GA GAAAA TCA GACCTC。

在冰上建立反应体系, 反应液总体积为 20 μL。模板 (10~200 ng) 1 μL; dNTP (各 1.25 mmol/L) 5 μL; 10×缓冲液 2 μL; 引物 1 (20 pmol) 2.06 μL, 引物 2 (20 pmol) 2.86 μL; Tag 酶 (2 U) 0.4 μL; 去离子水补足 20 μL, 加矿物油 20 μL; 扩增程序: 94℃ 4 min, 30 循环 (94℃ 30 s, 55℃ 1.5 min, 72℃ 1.5 min), 72℃ 7 min。扩增引物, Tag 酶, 10×缓冲液, Mg⁺ 等均为 Sangon 产品。

2 结果与分析

2.1 转化体的筛选与培养

潮霉素对雪里蕻和圆叶芥种子萌发及其生长发育的影响结果见表 1。

表 1 潮霉素对雪里蕻和圆叶芥种子萌发及其生长发育的影响

Table 1 Effects of hyg on the germination and growth of Cv Xuelihong and Yuanyejie

生态型 Ecotype of mustards	潮霉素浓度/ (μg·L ⁻¹) Concentration of hyg	接种数 No. of inoculated seeds	发芽率/% Germination percentage	8 d 根长/cm Root length 8 d	8 d 下胚 轴长/cm Hypocotyl length 8 d	16 d 根长/cm Root length 16 d	16 d 下胚 轴长/cm Hypocotyl length 16 d	发侧根 时间/d Appear lateral root time	真叶出现 时间/d Leaf bud time appearing	黄化率/% Etio lation percentage (f)
雪里蕻 Xuelihong	0(CK)	100	98	1.5	3.2	3.6	5.3	8	10	0
	15	100	98	1.3	2.7	2.1	3.8	11	12	15
	20	100	97	1.1	1.9	1.6	2.6	17	15	48
	25	100	98	1.0	1.3	1.4	2.0	-	-	100
	30	100	97	0.8	1.0	0.9	1.2	-	-	100
	35	100	98	0.6	1.0	0.7	1.1	-	-	100
圆叶芥 Yuanyejie	0(CK)	100	98	1.6	3.1	3.8	5.6	9	12	0
	15	100	97	1.4	2.8	2.2	3.7	14	14	12
	20	100	98	1.3	2.0	1.7	2.7	17	15	53
	25	100	98	1.1	1.3	1.4	2.0	-	-	100
	30	100	97	0.7	0.9	0.8	1.0	-	-	100
	35	100	98	0.7	0.8	0.8	0.9	-	-	100

表 1 表明, 在供试潮霉素质量浓度范围内, 不同浓度的潮霉素对雪里蕻和圆叶芥的萌发影响不显

著, 发芽率均高达 97% 以上。但对其生长发育具有明显的抑制作用, 随着浓度的增加, 其抑制作用加

强。与对照相比,潮霉素质量浓度为 15 和 20 mg/L 时,雪里蕻和圆叶芥侧根和真叶出现的时间晚 2~9 d,黄化率分别为 15% 和 12% 及 48% 和 53%。当潮霉素质量浓度为 25, 30 和 35 mg/L 时,幼苗均没有侧根和真叶发出,黄化率均达 100%。潮霉素浓度为 25 mg/L 时,雪里蕻和圆叶芥的生长势与 20 mg/L 的相比差异不显著,而质量浓度为 30 mg/L 和 35 mg/L 的幼苗生长主要在 8 日龄之前,以后生长几乎停滞。综上分析认为,25 mg/L 为雪里蕻和圆叶芥潮霉素筛选的最佳质量浓度,筛选时间从 16 日龄开始。T1 代种子接种在筛选培养基上,潮霉素对其萌发影响不显著,但对生长发育具有明显抑制作用。潮

霉素是一种原核和真核细胞中蛋白质的抑制剂,潮霉素磷酸转移酶基因表达潮霉素磷酸转移酶,该酶可将潮霉素磷酸化,从而使转基因植株表达潮霉素抗性。T1 代种子播种在筛选培养基上,非转化体黄化死亡,而只有转化体能生根、长叶,正常生长发育。将筛选出的转化体移栽至营养钵中,覆盖塑料膜保湿保温。3~5 d 后,逐步通风,最后揭去塑料,给予充分光照和水肥条件。

表 2 表明,在供试的 2 种芥菜生态型中,经筛选共获得抗潮霉素苗 135 株,其中雪里蕻 72 株,圆叶芥 63 株,转化率分别达 0.56% 和 0.52%。

表 2 植株原位真空渗入遗传转化不同生态型芥菜的抗性筛选结果

Table 2 Summary of the different ecotypes transformation result by the plant in situ vacuum infiltration			
生态型 Ecotype	接种 T1 代种子数 No. of T1 seeds	抗潮霉素苗数 No. of hygromycin resistance seedlings	转化率/% Transformation frequency
雪里蕻 Xuelihong	12 750	72	0.56
圆叶芥 Yuanyejie	12 150	63	0.52

2.2 转基因植株的分子检测

为进一步从分子水平验证 CaMV Bari-1 基因 VI 是否转入受体植株,随机选取 4 株雪里蕻和 3 株圆叶芥共 7 株抗潮霉素芥菜植株,取幼嫩叶片提取基因组 DNA,用于 PCR 扩增的模板 DNA。结果在琼脂糖凝胶电泳上,扩增出了片段大小为 1.4 kb 的目的基因,这说明 CaMV Bari-1 基因 VI 已整合在芥菜植株染色体组中(图 2)。



图 2 转基因芥菜 PCR 扩增结果

1. Marker; 2. 阴性对照; 3. 阳性对照; 4~10. 转基因植株

Fig. 2 PCR products amplified

1. M marker; 2. The non-transgenic mustards as negative; 3. Plasmid with target gene as positive; 4-10. The transgenic mustards plants

3 讨论

芥菜是一种易通过春化的蔬菜作物,易培养出适宜真空渗入遗传转化的适宜苗态。和甘蓝相比较,芥菜植株表面蜡质层、角质层较薄,经真空处理,容易造伤使农杆菌感染;芥菜单株产种量大,在纱网内天然自交产种量也高,真空渗入处理 1 株,即可获得转化体 1~5 株。此外,与叶盘法相比,真空渗入法不需要建立植株再生体系,大大简化了操作程序。因此,真空渗入遗传转化方法是芥菜较为理想的遗传转化体系。

在供试芥菜的 2 个生态型中,转化率不同,说明真空渗入遗传转化技术与材料的基因型有关。在获得的转基因材料中,外源基因在转基因植物中的遗传特性如何,需要做进一步的研究。此外,本试验所获得的转化 CaMV Bari-1 基因 VI 的植株,为进一步研究该基因的遗传工程交叉保护奠定了基础。

[参考文献]

[1] 巩振辉, Milner J J, 何玉科, 等. CaMV 基因 VI 在拟南芥上的遗传交叉保护[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(4): 6-12.
[2] Mathews H, Bharathan N, Litz R E, et al. Transgenic plants of mustard *B. brassica juncea* (L.) Czern and Coss[J]. Plant Sci, 1990, 72: 245-252.
[3] Banga S K, Beclin C, Charlot F, et al. Experiments with exogenous DNA uptake in *B. brassica juncea* (L.) Coss [J]. Plant Mol Biol, 1993, 22: 491-506.
[4] 黄菊辉, 周长久, 秦凤琴, 等. 发根农杆菌的 Ri T-DNA 对茎用芥菜的遗传转化[J]. 植物学报, 1994, 36(12): 678-681.
[5] 巩振辉, Milner J J, 何玉科. 拟南芥基因转移新方法——真空渗入法的研究[J]. 西北植物学报, 1996, 16(3): 277-283.
[6] Cecchine E, Gong Z H, Geri C, et al. Transgenic *A. thaliana* lines expressing gene VI from cauliflower mosaic virus variants exhibit a

- range of symptom-like phenotype and accumulate inclusion bodies[J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 1997, 10(9): 1094- 1101.
- [7] 张广辉, 巩振辉, 薛万新, 等. 大白菜和油菜真空渗入遗传转化法初报[J]. *西北农业大学学报*, 1998, 26(4): 1- 4
- [8] CAO Ming-qing, LIU Fan, YAO Lei, et al. Transformation of pakchou (*B. rassica rapa* L. ssp. *chinensis*) by *Agrobacterium* infiltration[J]. *Molecular Breeding*, 2000, (6): 67- 72
- [9] 金万梅, 巩振辉. 芥菜真空渗入遗传转化体系适宜苗态的建成[J]. *西北农业学报*, 2000, 9(4): 22- 25
- [10] Bechtold N, Ellis J, Pelletier G. *In Planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants[J]. *Cell Tissue Res*, 1993, 268: 1194- 1199
- [11] 巩振辉, Cecchini E, Millner J J. 以 PCR 鉴定转基因植株的微量 DNA 提取方法[J]. *西北农业大学学报*, 1997, 25(1): 45- 48

Transformation of mustards (*B. rassica juncea* Coss.) by the plant in situ vacuum infiltration

JIN Wan-mei^{1, 2}, GONG Zhen-hui¹, SONG Zheng-xu¹, SONG Xian-jun¹, YAN Hui-ling¹

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Forestry and Pathology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100093, China)

Abstract: Mustards (*B. rassica juncea* Coss.) ecotype Xuelihong and Yuanyejie were transformed with in planta vacuum infiltration by an *Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101 carrying hygromycin resistance gene and CaMV Bari-1 gene VI. The T1 seeds of mustards were screened through medium with 25 mg/L hygromycin and some resistant seedlings were obtained. PCR molecular analyses showed that target genes were transferred to the plant cells.

Key words: CaMV gene VI; In planta vacuum infiltration; genetic transformation; *Agrobacterium tumefaciens*; *B. rassica juncea*

(上接第 38 页)

The kinetics of nitrogen released from the coated controlled-release fertilizers

WANG Xiao-li, ZHOU Jian-bin, DUAN Jian-jun, ZHAI Jun-hai

(College of Resources and Environment, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Seven-day no-shaking method and soil incubation experiment were used to study the nutrient release dynamics of polymer-coated-released fertilizers. The result shows that the N released from seven kinds of coated fertilizers were increasing as the prolonging of incubation time and reached a remarkable or much-remarkable level, with a preliminary solubility less than 12.0% and a differential solubility between 0.26% and 2.49%. The gradients of nutrient release curves of seven combinations of controlled-release fertilizers (CRF) and urea all decreased with time increasing during soil incubation period. It can be divided into three groups: the lowest gradients were the two kinds of CRF and their combinations; the highest was urea treatment; and urea combined with CRF was in between of the two groups. The first-order kinetics equation could be used to fit the nutrient release characteristics of different treatments. Both the nitrogen release rate and their combining effective can be reflected by velocity coefficient. In comparison with applying two kinds of CRF separately or their combinations, applying urea combined with CRF significantly increased the rate of nitrogen released, with the increase of 65.4% to 164.5%, and decreased the nitrogen release period by 11 to 44 days.

Key words: coated controlled-release fertilizer; nutrient release; nutrient dissolved percentage; kinetic equation