

[文章编号]1000-2782(2000)01-0043-05

结球甘蓝外源基因转化再生时的激素条件研究

S635.103.

Q78

王晓峰^{1,2}, 鲁瑞芳¹, 彭学贤¹, 程智慧²

(1 中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

(2 西北农业大学园艺系, 陕西杨陵 712100)

[摘要] 结球甘蓝(*Brassica olerace* var. *capitata* L.)转化时,子叶柄、下胚轴受农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)感染后,芽再生的激素配比研究表明,中甘8号在激素配比为BA 4.0 mg·L⁻¹+IAA(1.0~2.0) mg·L⁻¹时,子叶柄和下胚轴芽的诱导率为100%;在BA 1.0 mg·L⁻¹+ZT 1.0 mg·L⁻¹+NAA(0.10~0.15) mg·L⁻¹时,子叶柄芽的诱导率为60%左右;在BA 1.0 mg·L⁻¹+ZT 1.0 mg·L⁻¹+NAA(0.15~0.20) mg·L⁻¹时,下胚轴芽的诱导率为100%。激素配比与品种间互作效应小,以因素主效应为主。与未感染外植体芽诱导比较,认为结球甘蓝受农杆菌感染后,离体芽诱导需要较高的生长素质量浓度。

[关键词] 结球甘蓝;遗传转化;芽再生;激素

[中图分类号] S603.4 **[文献标识码]** A

采用遗传转化的方法将外源基因导入作物品种,是克服现有作物难以满足生产上对某些品种特殊要求的一个新途径。农杆菌介导法是诸多转化方法中一种最重要的方法,已在芸薹属作物油菜、白菜、花椰菜、青花菜、羽衣甘蓝等^[1]上获得成功。Metz等^[2]报道了用结球甘蓝品种King cole转化成功。但由于结球甘蓝转化对基因型和农杆菌菌株的依赖性,及再生苗对卡拉霉素等抗生素的敏感性,结球甘蓝的转化研究相对滞后,需要建立一个成熟的转化方案。

结球甘蓝转化时,外植体受农杆菌感染后,生理状态发生了很大变化,因而对再生条件,尤其是激素质量浓度及其配比与单纯的再生不尽相同。因此,探讨外植体经农杆菌感染后再生的激素条件对成功的遗传转化是十分必要的。

1 材料与方方法

1.1 无菌苗

材料用中国农科院蔬菜花卉所选育的中甘8号、中甘11号和京丰1号。种子消毒在体积分数70%的酒精中浸2 min,在体积分数0.1%的升汞中浸10~15 min,并不时摇动,取出,用无菌水冲洗4~6次。消毒后的种子播于1/2MS无激素培养基上,在25℃黑暗条件下2 d,然后置2 000 lx光照下16 h,黑暗8 h的光周期下生长。

[收稿日期] 1999-02-25

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39670413)

[作者简介] 王晓峰(1964-),男,讲师,博士

1.2 培养基

基本培养基由 MS 无机盐和 B₅ 有机成分组成,蔗糖含量 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,琼脂含量 $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,pH 值 5.8。培养基 MS3 为 BA $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;MS4 为 BA $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;MS6 为 BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + ZT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,MS7 为 ZT $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;MS8 为 ZT $0.0219 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.53 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;MS9 为 BA $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;MS10 为 BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + ZT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;MS11 为 ZT $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。各分化培养基均含有羧苄青霉素 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 菌株和质粒

农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株为 LBA4404,质粒为 pBIGM,它是将 *gusD* 和 *mtD* 基因构建在带有 NPT I 基因的 pBin438 双价双元表达载体质粒上^[1]。

1.4 农杆菌菌液制备

选取农杆菌菌落接种于含卡那霉素 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和链霉素 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 YEB 液体培养基上,28℃ 摇菌过夜,菌液浊度 OD 值达 1.0 时,按 1:25 转接于同一液体培养基中,活化培养 4~8 h 后,在 OD 值达 0.6 时使用。

1.5 转化方法

选择 6~13 d 苗龄的无菌苗,切取带柄子叶或下胚轴,放入用水稀释 3~5 倍的农杆菌菌液中浸泡 3~5 min,捞出吸干菌液,子叶柄插入、下胚轴平放于共培养的培养基上(BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),共培养 3~5 d,然后置于加有羧苄青霉素 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 分化培养基上除菌并诱导芽再生。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比的培养基对分化的影响

培养基中激素的配比对外植体芽再生是一个关键因素。7 种培养基对中甘 8 号子叶柄的芽、愈伤、根的诱导状况不同(表 1),其中 MS10,MS9,MS6,MS4 芽诱导率较高。细胞分裂素与生长素的比值大的 MS6 和 MS10 成芽质量高。在生长素含量较高的 MS9 及 MS4 上也有较高的芽诱导率,但所生芽徒长、易畸形和玻璃化。

表 1 中甘 8 号子叶柄在不同激素配比的培养基上的诱导

培养基	外植体总数/个	成芽外植体总数/个	芽诱导率/%	愈伤状况	生根率/%
MS3	48	2	4.2	无	0
MS4	23	11	47.8	大,淡绿	82.6
MS6	36	13	36.1	小,绿	19.4
MS7	63	1	1.6	无,绿	52.4
MS8	39	3	7.7	中,绿	46.2
MS9	30	15	50.0	中,绿	0
MS10	105	62	59.0	中,绿	54.8

注:愈伤大指直径为 0.4 cm 以上,中指直径为 0.2~0.4 cm,小指直径为 0.2 cm 以下;绿,淡绿指子叶柄切面颜色;无指没有愈伤产生。

中甘 8 号下胚轴在 MS3,MS6,MS9 和 MS10 中的诱导率依次为 90.5%,87.2%,

71.8%和64.7%。MS3 诱导下胚轴芽生长最好,MS9 诱导率高但芽畸形并易于玻璃化。下胚轴在分化培养基上培养15 d 出现芽分化,20 d 接近最大值,而子叶柄25 d 才开始芽分化,30 d 接近最大值。子叶柄与下胚轴相比芽畸形多,伸长缓慢,但褐化死亡率明显低。可见,不同外植体对培养基激素配比的要求不同。

2.2 激素配比与品种双因素及其互作对芽分化的影响

中甘8号、中甘11号、京丰1号3个品种子叶柄在MS6,MS7,MS10等3种培养基上芽诱导的结果表明(表2),品种及激素对比对芽诱导率有明显影响。无论是品种还是激素对比都表现出较高的一般配合值,即对某一个品种芽诱导率高的激素对比则对其他品种的诱导率也高,同样在某一个激素对比下芽诱导率高的品种在其他激素对比下芽诱导率也相对地高。同时,激素和品种间也有一定的因子互作,中甘11号、京丰1号在MS6上再生能力强,而中甘8号在MS10上再生能力强。

表2 激素对比与品种对结球甘蓝子叶柄的芽诱导率的影响

品种	芽诱导率				平均
	MS6	MS7	MS10	%	
京丰1号	46.7	14.8	23.1		28.2
中甘11号	66.7	21.8	37.5		42.0
中甘8号	36.1	1.6	59.0		32.2
平均	49.8	12.7	39.9		34.1

2.3 培养基激素配比的优化

在结球甘蓝上转化再生时芽诱导的试验结果表明,甘蓝芽诱导细胞分裂素配比以BA1.0 mg·L⁻¹+ZT1.0 mg·L⁻¹和BA4.0 mg·L⁻¹时较好,而生长素的用量变化对芽的分化影响很大,有必要对其优化。培养基中随NAA用量加大,愈伤块愈来愈大,生根能力增强,而芽发生能力减弱(表3)。子叶柄以BA1.0 mg·L⁻¹+NAA1.0 mg·L⁻¹+ZT(0.10~0.15) mg·L⁻¹,下胚轴以BA1.0 mg·L⁻¹+ZT1.0 mg·L⁻¹+NAA(0.15~0.20) mg·L⁻¹芽诱导效果最好。对BA4.0 mg·L⁻¹+IAA(1.0~4.0) mg·L⁻¹配比优化,可知芽分化率差异不大。但由于高的生长素质量浓度所生芽多畸形和玻璃化,在IAA2.0 mg·L⁻¹以上畸形苗约占40%,玻璃化苗为20%左右,因此,子叶柄和下胚轴的芽再生配方以BA4.0 mg·L⁻¹+IAA(1.0~2.0) mg·L⁻¹为好。

表3 对“中甘8号”甘蓝生长素用量的优化

激素配比/(mg·L ⁻¹)	子叶			下胚轴	
	芽诱导率/%	根诱导率/%	根数/个	芽诱导率/%	根诱导率/%
BA1.0+ZT1.0+NAA0.10	40	100	1~2	80	0
BA1.0+ZT1.0+NAA0.15	60	100	2~3	100	0
BA1.0+ZT1.0+NAA0.20	20	100	3~4	80	40
BA1.0+ZT1.0+NAA0.30	0	100	4~6	60	80
BA1.0+ZT1.0+NAA0.50	10	100	>7	20	100
BA4.0+IAA1.0	90	0	0	100	0
BA4.0+IAA2.0	100	10	1	100	0
BA4.0+IAA2.5	90	0	0	100	0
BA4.0+IAA3.0	80	10	1	100	0
BA4.0+IAA3.5	80	10	1	100	0
BA4.0+IAA4.0	70	0	0	60	0

3 讨 论

外植体对再生条件的要求,尤其是培养基中的激素配比的要求因外植体生理状态不同而变化,而其生理状态又与基因型、外植体种类、取材部位、苗龄、生活力、生长条件等有关。进行遗传转化再生时,由于农杆菌的侵染、抗生素除菌和筛选,使外植体的生活力明显减弱,对再生的激素配比及其他再生条件要求发生变化。目前,对转化再生的研究主要通过两步进行,首先建立再生体系或利用他人建立的再生体系,然后再研究侵染农杆菌后外植体的转化条件对转化率的影响。因农杆菌侵染和抗生素的影响对激素配比的要求发生了变化,使得由此引起的再生率降低与转化条件及基因型差异引起的转化率低相混淆,通过对外植体侵染农杆菌后再生条件的研究可使后续的转化条件研究的盲目性减小。

余建明等^[4]在结球甘蓝上研究了子叶和下胚轴芽再生的最佳激素质量浓度为 BA 1.0 mg · L⁻¹ + ZT 1.0 mg · L⁻¹ + NAA (0.01 ~ 0.05) mg · L⁻¹,本研究在多个甘蓝品种上的激素质量浓度试验也表明 BA 1.0 mg · L⁻¹ + ZT 1.0 mg · L⁻¹ 时, NAA 为 0.01 ~ 0.05 mg · L⁻¹ 时芽的再生率最高,而侵染农杆菌后,子叶柄的最佳 NAA 用量需提高到 0.10 ~ 0.15 mg · L⁻¹,下胚轴需提高到 0.15 ~ 0.20 mg · L⁻¹,若添加 1 ~ 5 mg · L⁻¹ 的 AgNO₃ 效果更好。这说明结球甘蓝受农杆菌侵染后的外植体再生需要较高的生长素质量浓度。这一现象的原因及是否具有广泛性还需进一步研究。

此外,笔者还注意到,下胚轴在共培养后放在其他激素不变仅提高生长素质量浓度 (NAA 0.2 ~ 0.3 mg · L⁻¹) 的培养基上 7 d,可促进切面生长,减少褐化,提高芽再生率。这一结果与 Sharon 等^[5]在油菜 (*Brassica rape*) 上用 1.0 mg · L⁻¹ 的 2,4-D 处理共培养后的下胚轴可提高转化率似乎有共同之处。即在转化时,受农杆菌侵染的外植体需在更能促进细胞生长的培养基上生长以减少褐化死亡。当然,长时间和高质量浓度的生长素并不利于转化体成芽,只会使愈伤组织大量生长。

[参考文献]

- [1] Poulsen G B. Genetic transformation of Brassica[J]. Plant Breeding, 1996, 115: 209 ~ 225.
- [2] Metz T D, Dixit R, Elizabeth D E. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*) [J]. Plant Cell Report, 1995, 15: 287 ~ 292.
- [3] 刘俊君, 黄绍兴, 彭学贤, 等. 高度耐盐双价转基因烟草的研究[J]. 生物工程学报, 1995, 11(4): 381 ~ 384.
- [4] 余建明, 蔡小宁, 朱 祯, 等. 转化甘蓝的离体再生及基因转化条件研究[J]. 江苏农业学报, 1996, 12(3): 6 ~ 9.
- [5] Sharon E R, Joann C. Turner and Danial Facciotti [J]. Transformation and regeneration of *Brassica rapa* using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, 1992, 11: 499 ~ 505.

Studies on hormonal combinations of regeneration *in vitro* in cabbage (*Brassica olerace* var. *capitata* L.) transformation

WANG Xiao-feng^{1,2}, LU Rui-fang¹, PENG Xue-xian¹, CHENG Zhi-bui²

(¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(² Department of Horticulture, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The cotyledonary petioles and hypocotyles of cabbage *in vitro* infected by *Agrobacterium tumefaciens* regenerated in hormonal combinations on cabbage (*Brassica olerace*, var. *capitata* L.) were studied. The results showed that the shoot induction rate of cotyledonary petioles and hypocotyles was 100% with BA 4.0 mg · L⁻¹ + IAA 1.0—2.0 mg · L⁻¹ on cabbage cultivar Zhonggan No. 8; about 60% with BA 1.0 mg · L⁻¹ + ZT 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.10—0.15 mg · L⁻¹; 100% with BA 1.0 mg · L⁻¹ + ZT 1.0 mg · L⁻¹ + NAA (0.15—0.20) mg · L⁻¹. The interaction of hormonal combinations and cultivars was smaller than the main effects of them. Compared with uninfected explants by *A. tumefaciens*, it is considered that the optimal hormonal combinations of shoot induction contained higher auxin concentration on explants *in vitro* infected by *A. tumefaciens*.

Key words: *Brassica olerace* var. *capitata* L.; genetic transformation; shoot regeneration

第一届农业生物技术育种学术研讨会在西北农业大学召开

国家小麦改良中心杨陵分中心、杨凌农业生物技术育种中心第一届农业生物技术育种学术研讨会于 1999 年 12 月 9 日~10 日在西北农业大学召开。来自西安交通大学、西北大学和西北农业大学的有关领导及农业生物技术工作者、研究生、大学生等 300 余人参加了研讨会。研讨会分别由西北农业大学植物病理学家李振岐院士和副校长、杨凌农业生物技术育种中心主任魏益民教授、副主任张改生教授主持。开幕式上,魏益民副校长致开幕词。

研讨会上,著名农业生物技术育种专家、中国农科院农业生物技术所研究员范云六院士、中国科学院遗传所所长陈受宜研究员、北京大学生物技术研究中心副主任李毅研究员、西南农业大学副校长王小佳教授分别从不同研究领域介绍了国内外农业生物技术新进展、新动态、新成果和新方法。杨陵、西安地区有关农业生物技术育种方面的专家分别就自己研究领域的生物技术育种工作进行了大会交流。李振岐院士就“杨凌生物技术育种中心研究工作规划”向大会作了报告。

(朱建楚 供稿)