

根癌农杆菌介导的金边狗牙根遗传转化条件的优化

胡繁荣

(浙江省金华职业技术学院生物工程学院, 浙江 金华 321007)

摘要: 为建立根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*, 菌株 EHA105) 介导的金边狗牙根 [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] 最佳遗传转化体系, 以葡萄糖醛酸糖苷酶 (GUS) 基因的瞬时表达率为指标, 从愈伤组织继代时间、根癌农杆菌侵染时间、负压条件及光照时间等方面进行了筛选。结果表明, 根癌农杆菌介导的金边狗牙根最佳的转化体系是: 以继代培养 2 周的愈伤组织为起始材料, 根癌农杆菌介导感染 10 min, 经负压处理 (抽拉 20 次) 并在全光条件下共培养转化。

关键词: 狗牙根; 遗传转化; 根癌农杆菌; GUS 瞬时表达频率

中图分类号: S688.4; S603.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2005)02-0015-04

Optimization of genetic transformation conditions in *Cynodon dactylon* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* HU Fan-rong (Bioengineering School, Jinhua College of Profession & Technology, Jinhua 321007, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2005, 14(2): 15-18

Abstract: Several factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 mediated genetic transformation of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. were studied based on the variance of GUS (β -glucuronidase) transient expression rate. The results indicated that the optimized conditions are as follows: using the 2-week recultured calli as the original materials, 10 min for infecting with *Agrobacterium tumefaciens*, negative pressure treatment (pull 20 times by injector), followed by co-culture under continuous light condition.

Key words: *Cynodon dactylon* (L.) Pers.; genetic transformation; *Agrobacterium tumefaciens*; GUS transient expression rate

狗牙根 [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] 为多年生暖地型草本植物, 主要分布在中国的黄河流域以南^[1]。狗牙根以其植株低矮、繁殖力强、抗旱、耐践踏、质地纤细、色泽好等优点, 被广泛用于运动场、公园及固土护坡, 系主要的运动场草坪草。金边狗牙根是运用离体诱变技术从正常绿色狗牙根中选育出的全生育期携带黄叶性状的狗牙根。

利用转基因技术将目的基因导入愈伤组织或原生质体, 获得转基因植株, 已成为草坪草育种的研究前沿^[2]。有些学者利用狗牙根幼穗成功地将 *gusA* 和 *bar* 基因导入狗牙根植株中^[3]; 而 Zhang 等则利用基因枪法获得了含 *hpt* 基因的狗牙根植株^[4]。

一个完善的基因转化系统应具有高频的转化率和较强的再生能力。为提高单子叶植物转化频率, 许多学者已经做了大量的工作, 其中最见成效的就是乙酰丁香酮 (3,5-methoxy-4-hydroxyacetophenone, AS) 的应用。另外, 大量的研究已证明农杆菌菌液的浓度、浸泡时间和共培养时间等条件的优化都会

对转化频率产生一定的影响。还有一些研究者通过在农杆菌侵染过程中的辅助处理例如表面活性剂的使用^[5]、负压处理^[5]、各种导致外植体致伤^[6]的手段等也能起到提高转化频率的效果。

本文以金边狗牙根的茎节为试材, 就根癌农杆菌介导法共培养时的光照时间、愈伤组织的继代时间及负压处理等辅助处理方法对金边狗牙根愈伤组织转化频率的影响做一些探讨, 以期为提高农杆菌介导法中单子叶植物的转化频率寻求有益帮助。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验材料为金边狗牙根。根癌农杆菌

收稿日期: 2004-12-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目“彩叶草坪草资源的评价与利用”(30370147)

作者简介: 胡繁荣 (1965-), 男, 浙江东阳人, 硕士, 副教授, 从事园艺植物生物技术研究。

(*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株为 EHA105, 由加拿大渥太华大学生化系提供。质粒 pKUC 串联排列杀虫晶体蛋白基因 *cry1Ab* (由玉米启动子 *Ubiquitin* 驱动)、卡那霉素抗性基因 *npt II*、潮霉素抗性基因 *hpt*、报告基因 *gus* (由 CaMV 35S 启动子驱动)。

1.2 愈伤组织的诱导与分化

选用含茎节长约 0.5~1.0 cm 的金边狗牙根茎段为外植体。先用自来水洗净表面, 70% 酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 0.1% 氯化汞消毒 10 min, 无菌水冲洗 3 次, 用灭菌滤纸吸干表面水分, 接种于诱导培养基 (MS + 2 mg · L⁻¹ 2,4-D + 3 mg · L⁻¹ NAA) 上, 灭菌前 pH 值调至 5.8。将培养皿置于 25℃、暗条件下培养, 继代培养 2 周, 然后转移至分化培养基 (MS + 3 mg · L⁻¹ 6-BA + 4 mg · L⁻¹ KT) 上, 置于 28℃、16 h 光照、光强 10~30 μ · Em⁻² · s⁻¹ 人工气候室分化。每 2 周以相同培养基继代 1 次, 40 d 后统计分化率。将分化小植株接于生根培养基 (MS + 0.3 mg · L⁻¹ NAA) 上, 经 2 周生根培养后移至不含激素的 1/2 MS 培养基中壮苗, 然后移栽。

1.3 根癌农杆菌培养与转化因子的研究

根癌农杆菌侵染参见项友斌等^[7]方法, 即取 OD₆₀₀ 约为 0.5 的根癌农杆菌菌液, 25℃ 浸泡 10 min, 用灭菌滤纸吸去多余菌液, 接入 MS 诱导培养基上, 暗条件共培养 2 d, 然后用含 500 mg · L⁻¹ Carb (羧苄青霉素 carbenicillin) 的无菌水清洗愈伤组织。按 Rueb^[8] 方法进行组织化学染色, 统计 GUS (葡萄糖醛酸糖苷酶 β-glucuronidase) 瞬间表达率, 并对如下转化因子进行研究:

愈伤组织的继代培养时间: 取刚诱导的愈伤组织, 继代培养 1、2、3 和 4 周。

根癌农杆菌侵染时间: 取继代 2 周的愈伤组织, 用根癌农杆菌分别侵染 5、10、15 和 20 min。

光照时间: 取继代 2 周的愈伤组织, 用根癌农杆菌侵染后, 参照 Zambre 等^[9]的方法分别置于全天光照、16 h 光照及暗条件下共培养。

负压处理: 将继代 2 周的愈伤组织与根癌农杆菌菌液混合, 置于 50 mL 注射器中, 密封一端, 参见刘志学等^[5]的方法, 分别抽拉 0、10、20、30 和 40 次, 每次抽拉距离 5 cm, 每次间隔 5 s, 浸泡 10 min, 以未抽拉为对照。

2 结果和分析

2.1 根癌农杆菌侵染时间对葡萄糖醛酸糖苷酶 (GUS) 瞬间表达率的影响

根癌农杆菌不同的侵染时间对金边狗牙根遗传转化频率有较大的影响 (见表 1)。结果表明, 用根癌农杆菌侵染 10 min, GUS 瞬间表达率达 80.6%, 而侵染 5 min 时仅为 35.4%, 侵染 15 min 虽达 92%, 但在后续进行的选择培养时难以抑制根癌农杆菌生长。因此, 金边狗牙根利用根癌农杆菌介导的侵染时间设为 10 min 为宜。

表 1 根癌农杆菌侵染时间对金边狗牙根愈伤组织 GUS 瞬间表达率的影响¹⁾
Table 1 The effect of infection time of *Agrobacterium tumefaciens* on GUS transient expression rate of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. calli¹⁾

侵染时间/min Infection time	瞬间表达率/% Transient expression rate
5	35.4
10	80.6
15	92.0
20	83.2

¹⁾ GUS: 葡萄糖醛酸糖苷酶 β-glucuronidase

2.2 愈伤组织的不同继代时间对葡萄糖醛酸糖苷酶 (GUS) 瞬间表达率的影响

金边狗牙根愈伤组织的不同继代时间对 GUS 瞬间表达率的影响见表 2。可以看出, 愈伤组织的生长状态直接影响了转化频率。经 1 周继代培养的愈伤组织质量差, GUS 瞬间表达率很低, 只有 31.2%; 经 2 周继代培养后, 愈伤组织的质地明显好转, 表面呈颗粒状突起且多为体细胞胚胎, 此时的转化频率最高, GUS 瞬间表达率达 82.6%; 继代培养 3 周后, GUS 瞬间表达率明显下降, 3 周时为 37%, 4 周时仅为 20.1%, 且因愈伤组织过分老化严重影响

表 2 金边狗牙根愈伤组织继代时间对 GUS 瞬间表达率的影响¹⁾
Table 2 The effect of reculture duration of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. calli on GUS transient expression rate¹⁾

继代时间/周 Reculture duration	瞬间表达率/% Transient expression rate
1	31.2
2	82.6
3	37.0
4	20.1

¹⁾ GUS: 葡萄糖醛酸糖苷酶 β-glucuronidase

响幼苗分化。故以2周继代培养的金边狗牙根愈伤组织进行根癌农杆菌介导转化为宜。

2.3 共培养时不同光照时间对葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS)瞬间表达率的影响

共培养时光照时间的长短对GUS瞬间表达率也有一定影响(表3)。在全天光照条件下(24 h),金边狗牙根愈伤组织GUS瞬间表达率最高,为92.3%,但与每天16 h光照处理(87.9%)差异不明显。但这2种条件下GUS瞬间表达率均明显高于暗培养(70.4%)。

表3 光照时间对金边狗牙根愈伤组织GUS瞬间表达率的影响¹⁾
Table 3 The effect of illumination condition on GUS transient expression rate of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. calli¹⁾

光照时间/h Illumination time	瞬间表达率/% Transient expression rate
0(CK)	70.4
16	87.9
24	92.3

¹⁾ GUS: 葡萄糖醛酸糖苷酶 β -glucuronidase

2.4 不同负压处理对葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS)瞬间表达率的影响

负压处理表明,抽拉次数显著影响GUS瞬间表达率(表4)。抽拉20次,金边狗牙根愈伤组织中GUS瞬间表达率达94.8%,显著高于对照(70.8%);当抽拉次数超过30次时,GUS瞬间表达率显著降低(61.2%);而抽拉40次时,GUS瞬间表达率仅为33.5%。

表4 抽拉次数对金边狗牙根愈伤组织中GUS瞬间表达率的影响¹⁾
Table 4 The effect of pull times on GUS transient expression rate of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. calli¹⁾

抽拉次数/次 Pull time	瞬间表达率/% Transient expression rate
10	76.8
20	94.8
30	61.2
40	33.5
0(CK)	70.8

¹⁾ GUS: 葡萄糖醛酸糖苷酶 β -glucuronidase

结果表明,当用根癌农杆菌侵染愈伤组织时,给予一定的负压处理一方面可以促进根癌农杆菌进入愈伤组织的深层细胞,从而使得愈伤组织中可以有更多的细胞得到转化,表现为染色的加深;另一方面,负压处理会使愈伤组织细胞产生许多细小的伤

口,导致一些酚类物质的产生并刺激T-DNA区段的剪切和转移^[8]。但抽拉次数过多则会对植物细胞本身产生较大的伤害甚至导致细胞死亡。

3 讨 论

农杆菌介导的外源基因转化是农杆菌菌株与植物细胞之间相互作用的结果,凡是能够影响植物细胞转化应答能力和农杆菌侵染能力以及转化体再生能力的各种因素都会对其转化效果产生影响。因此,农杆菌转化频率的提高依赖于对各种影响因子的优化和转化条件的改善^[10]。

植物转化受体所处的生理和生长状态也是影响转化效率的重要因素之一。具备强分裂能力的感受态细胞是转化的基本条件^[11],因此在农杆菌介导转化中,要把握受体材料的形态和生理特征,选择较适宜的感受态细胞以提高转化效率。本实验结果表明,金边狗牙根不同继代时间的茎节愈伤组织GUS瞬间表达率明显有差异,以2周继代培养的愈伤组织进行介导转化为宜。若继代时间过长,细胞分裂能力及分化能力都有所下降,不适宜于转化。刘庆法利用农杆菌介导法转化水稻时也发现胚性细胞更容易转化^[12]。

以往根癌农杆菌侵染后的共培养多在暗条件下进行,Zambre等^[9]发现全天光照共培养可显著提高愈伤组织的转化效率,本实验得出了类似的研究结果。有关光照的作用机制尚不得而知,可能是光照条件可以诱导激活Ti质粒中的T-DNA区段的剪切或促进T-DNA区段整合进植物基因组。

Zupan等^[13]认为,在农杆菌侵染外植体的过程中进行负压处理,会在外植体上形成许多细小的伤口,并从伤口处分泌出较多的酚类物质,有利于提高农杆菌的转化活力。如果在此过程中伤害太大,就会影响植株的再生,继而影响转化苗的获得,因此,在实际利用过程时需要测定负压强度。研究表明,不同植物材料适用的负压强度差别大,水稻成熟胚负压处理的抽拉强度为40次^[5];本实验确定了适合金边狗牙根茎节遗传转化的负压抽拉强度为20次,GUS瞬间表达率达94.8%。

本实验就共培养时的光照时间、愈伤组织的继代时间及负压处理等辅助处理方法对金边狗牙根愈伤组织转化频率的影响进行了初步的研究,证明上

述辅助处理方法对金边狗牙根的遗传转化有着较为积极的意义,同时对利用根癌农杆菌介导法进行其他植物的遗传转化也有很好的借鉴作用。

参考文献:

- [1] 沈健英. 狗牙根的生物学特性及其防治研究[J]. 上海农学院学报, 1995, 13(3): 187-192.
- [2] 郭振飞, 卢少云. 基因工程在草坪草育种上的应用[J]. 草地学报, 2002, 10(3): 184-189.
- [3] Li L, Qu R. Development of highly regenerable callus lines and biolistic transformation of turf-type common bermudagrass [J]. Plant Cell Reports, 2004, 22(6): 403-407.
- [4] Zhang G. Transformation of triploid bermudagrass (*Cynodon dactylon* × *C. transvaalensis* cv. TifEagle) by means of biolistic bombardment [J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(9): 860-864.
- [5] 刘志学, 马向前, 何艺园, 等. 农杆菌介导遗传转化中辅助处理方法的改良[J]. 复旦学报(自然科学版), 1999, 38(5): 601-604.
- [6] 孔英珍, 周功克, 王根轩, 等. 影响根癌农杆菌转化的因素及其在单子叶作物上的应用[J]. 应用生态学报, 2000, 11(5): 791-794.
- [7] 项友斌, 梁竹青, 高明尉. 农杆菌介导的苏云金杆菌抗虫基因 *cryIA(b)* 和 *cryIA(c)* 在水稻中的遗传转化及蛋白表达[J]. 生物工程学报, 1999, 15(4): 494-500.
- [8] Rueb S, Hensgens L A M. A improved histochemical staining for β -D-glucuronidase activity in monocotyledonous plants [J]. Rice Genetics Newsletter, 1989(6): 168-169.
- [9] Zambre M, Terryn N, Clercq J D. Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells [J]. Planta, 2003, 216: 580-586.
- [10] 张海霞, 张少英, 白薇, 等. 提高甜菜遗传转化频率的研究[J]. 中国糖料, 2005(1): 6-8.
- [11] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 499.
- [12] 刘庆法, 郝峰蝉, 沈大棱, 等. 农杆菌介导的小麦遗传转化条件的研究[J]. 复旦学报(自然科学版), 1998, 37(4): 569-572.
- [13] Zupan J R, Zambryski P C. Transfer of T-DNA for *Agrobacterium tumefaciens* to the plant cell [J]. Plant Physiology, 1995, 107: 1041-1047.

(责任编辑: 惠红)

第三届中国民族植物学学术研讨会第一轮通知

第三届中国民族植物学学术研讨会将于2006年10月在南京召开, 本次会议由江苏省·中国科学院植物研究所主办, 中国科学院昆明植物研究所、南京野生植物综合利用研究院、中国人民解放军第二军医大学、浙江大学生命科学院、内蒙古师范大学、香港浸会大学中医药学院、《中国医学生物技术应用》杂志社协办。

大会主题为“民族植物学和药用植物”。征稿内容包括: 1) 中国不同民族及不同地区药用植物发展简史, 包括药物古籍、民间药物著作的介绍和研究, 药学代表人物及其贡献的研究。2) 民族植物学和药用植物之间的关系: 药用植物的民族植物学; 药用民族植物学与药用植物资源可持续利用; 民族植物学和濒危药用植物资源保护; 不同民族和不同地区民族药物学的比较。3) 不同民族及不同地区有关药用植物的传统知识研究和应用; 不同民族及不同地区药用植物的资源调查; 药用植物的考证分类、鉴定及分布; 有特殊疗效的民族药物的介绍和研究; 传统药物现代化研究的方向和方法; 建立在民族植物学基础上的药用植物的创新研究; 药用植物传统知识的开发与当地经济发展的关系。4) 民族植物学与传统药文化: 主要是阐明民族植物学

中有关的习俗、宗教、用药禁忌、图腾崇拜、传统应用和药学文化之间的联系, 如何利用这一特殊的文化现象, 促进经济和文化的结合并发展更深层次的民族植物学。5) 国外民族植物学研究进展, 包括中外民族植物学的对比研究。6) 中国的民族植物学如何走向世界? 7) 民族植物学基础理论及有关药用植物的其他相关研究。

征文截止时间为2006年3月, 论文格式请参照《植物资源与环境学报》征稿简则, 全文字数2500~5000, 论文请提交纸质文件和磁盘或通过电子邮件发送。论文将汇编成论文集, 并收取一定的版面费。本次会议将设置“中国民族植物学研究成果”展台, 包括著作、研制成品等, 请选送单位提供名单、简介和数量等, 以便会议统一安排。

大会将安排会后考察(详情见第二轮通知)。请将第一轮回执于2005年9月20日前寄回。

通讯地址: 南京市中山门外前湖后村1号 江苏省·中国科学院植物研究所; 邮编: 210014; 电话: 025-84341505; 传真: 025-84432074; E-mail: zenghong1010@yahoo.com.cn; 联系人: 曾虹。