

酚类物质对葡萄遗传转化效率的影响

吴迪 周长梅 朱延明*

(东北农业大学生命科学学院植物生物工程研究室, 哈尔滨 150030)

摘要: 利用携带质粒 pBI1301 (含有 *GUS* 和 *NPTII*) 的根癌农杆菌转化葡萄胚性愈伤组织, 对比 5 种酚类物质对遗传转化效率的影响。结果表明: 阿魏酸与乙酰丁香酮相比, *GUS* 点数无显著差异, 最佳浓度为 150 mg/L。芥子酸和丁香酸的效果也显著高于不添加酚类物质的对照。

关键词: 葡萄; 农杆菌; 转化效率; 酚类物质

中图分类号: S 663.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2003) 01-0077-02

1 目的、材料与方法

乙酰丁香酮在农杆菌介导植物遗传转化中能大大提高转化效率^[1,2], 但价格昂贵。在大量预备试验基础上, 利用携带 pCambia1301 (含有 *GUS* 和 *NPTII*, 由本研究室保藏) 质粒的农杆菌 LBA4404 转化葡萄品种 Semillon 的胚性愈伤组织, 系统探讨 5 种酚类物质 (见表 1) 对遗传转化的影响, 确定最佳种类和浓度, 找出价格低廉、能显著提高遗传转化效率、可替代乙酰丁香酮的酚类物质及使用浓度。采用常规方法活化菌株, 菌液离心弃上清液, 等量液体 YEB 培养基悬浮培养。取胚性愈伤组织, 用直径约 1.1 mm 的钢丝网破碎过筛, 菌液侵染 15~20 min, 无菌滤纸吸干。侵染后接种于共培养基培养基上, (26 ±1)、暗培养 3 d。转到除菌液体培养基 (添加头孢噻肟钠 250 mg/L), 120 r/min 悬浮振荡除菌 2 h。采用组织化学染色法^[3]检测 *GUS* 基因的瞬时表达情况, 利用 SPSS 分析软件进行差异显著性测定。

2 结果与分析

2.1 不同酚类物质对遗传转化效率的影响

共培养 3 d, 以 50 mg 愈伤组织为一个统计单位, 统计 5 种酚类物质和对照 [乙酰丁香酮 (3, 5-dimethoxy-4-hydroxyacetophenone, AS)] 各浓度 *GUS* 染色点数的平均值 (表 1), 其中阿魏酸效果最佳, 50 mg 愈伤组织 *GUS* 染色点数总计达 159.75 个, 150 mg/L 处理染色点数最高, 达 108.37 个; 其次是对照 I, *GUS* 染色点数达 147.62 个, 但与阿魏酸差异不显著, 二者与对照 II (不添加酚类物质) 处理相比差异显著。对羟基苯甲酸和邻苯二酚染色点数很少, 与对照 II 相比差异不显著。芥子酸和丁香酸 *GUS* 染色点数分别为 73 个和 57.87 个, 最佳添加浓度均为 100 mg/L。二者对提高遗传转化效率有一定的作用, 但与对照 II 相比差异不显著。

阿魏酸设计 150、200 和 250 mg/L 3 个浓度梯度试验。*GUS* 染色点数分别为 52.00、49.00 和 18.67 个, 表明 150 和 200 mg/L 时的 *GUS* 染色点数相近, 可以确定最佳且经济添加浓度为 150 mg/L。

阿魏酸能显著提高农杆菌介导葡萄遗传转化的转化效率, 效果优于乙酰丁香酮, 且价格低廉, 可以作为替代乙酰丁香酮的首选添加物。丁香酸、芥子酸对提高葡萄的转化效率作用均较好, 最佳使用浓度为 100 mg/L; 对羟基苯甲酸、邻苯二酚对葡萄遗传转化没有促进作用。

收稿日期: 2002-01-21; 修回日期: 2002-05-13

基金项目: 国家教育部资助优秀年轻教师项目

*通讯作者 (Author of correspondence)。E-mail: ymzhu2001@hotmail.com

2.2 酚类物质对农杆菌及植物细胞的协同作用

根癌农杆菌感染植物细胞分泌释放可扩散的诱导物。作者认为, 酚类化合物是通过活化启动 Vir 区基因的酶类来实现提高转化效率功能的。

酚类物质在植物细胞受到农杆菌伤害后可抑制细胞防御机制启动, 使浸染变得容易。高等植物酚类物质的生物合成是通过莽草酸途径实现的, 苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 是形成酚类物质的一个重要调节酶。其合成或活性易受内外条件影响, 作者认为, 农杆菌侵染造成植物细胞的损伤, 影响 PAL 合成, 使酶活性下降, 影响了木质素的生物合成。而木质素有阻止病菌的进一步入侵的作用。这些合成木质素的前体都可以作为农杆菌介导的植物遗传转化的酚类添加物^[3], 究其原因就是这些外源添加的酚类化合物同这一反应的中间产物相同, 木质素的生物合成反应由于中间产物过量而抑制了反应的正常进行, 同时又削弱了关键酶 (PAL) 的活性。从而使细胞对病菌的抵抗作用减弱, 打开了农杆菌侵染植物细胞的通道。从木质素的生物合成途径上可以看到, 阿魏酸是一个距离 PAL 作用位置最近的中间产物, 也就是说它对 PAL 活性的影响作用是最直接的。所以就本试验来讲, 阿魏酸对提高遗传转化效率效果最显著。

表 1 不同酚类物质对葡萄遗传转化效率的影响

Table 1 Effect of phenolic compounds on efficiency of genetic transformation in grape

酚类化合物 Phenolic compounds	浓度 Concentration (mg/L)	GUS 染色点数 * GUS stains *
羟基苯甲酸 p-Hydroxybenzoic acid	50 100 150	0.55c 1.76c 0.93c
邻苯二酚 Brenzcatechin	50 100 150	0.44c 2.42c 0.55c
阿魏酸 Trans-ferulic acid	50 100 150	16.37c 35.01c 108.37a
丁香酸 4-Hydroxy-3,5-dimethoxy-benzoic acid	50 100 150	6.83c 33.30bc 17.74c
芥子酸 Erucic acid	50 100 150	6.34c 60.48b 6.18c
乙酰丁香酮 (对照 I) AS (Control I)	50 100 150	27.05bc 62.96b 57.61b
不添加酚类物质 (对照 II) Phenolic compound free (Control II)		5.56c

注: * 每 50 mg 愈伤组织 GUS 染色点数; 共培养 3 d; 显著水平 P = 0.05。

Note: * GUS stains per 50 mg callus; Co-culture 3 days; The significant level is P = 0.05.

参考文献:

- 1 Scott E, Stachel Patricia C, Zambryski. *VirA* and *virG* control the plant-induced activation of the t-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. Cell, 1986, 46: 325 ~ 333
- 2 George W Bolton, Eugene W, Nester, et al. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* Loci needed for virulence. Science, 1986, 232: 983 ~ 985
- 3 王关林. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社, 1998. 585 ~ 590

Effect of Phenolic Compounds on Efficiency of Genetic Transformation in Grape

Wu Di, Zhou Changmei, and Zhu Yanming

(Life Science College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In order to find out more efficient and cheaper phenolic compounds instead of 3, 5-dimethoxy-4-hydroxyacetophenone (AS) to improve efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation into grape, this research utilized *Agrobacterium* strain LBA4404 carrying pBI1301 with *GUS* and *NPTII* to transfer embryogenic callus of grape. The results showed that, compared with AS, trans-ferulic acid was better than AS, with the best concentration of 150 mg/L; 4-Hydroxy-3, 5-dimethoxy-benzoic acid and erucic acid also had a significant efficiency of genetic transformation than control II (phenolic compound free).

Key words: Grape; *Agrobacterium*; Efficiency of transformation; Phenolic compounds