

大白菜 AB-81 高频再生系统的建立及 *gus* A 基因瞬时表达的研究

王火旭¹ 王关林¹ 王晓岩² 方宏筠¹ 贾士荣³ 唐益雄³ 魏毓棠⁴

(¹ 辽宁师范大学生物工程研究所, 大连 116029; ² 大连市种子子公司, 大连 116033; ³ 中国农业科学院生物技术中心, 北京 100081; ⁴ 沈阳农业大学园艺系, 沈阳 110161)

摘要: 以大白菜自交系 AB-81 的子叶和真叶切块为外植体, 建立了高频不定芽离体再生系统。在 MS 附加 TDZ 0.2 mg/L, NAA 2.0 mg/L, AgNO₃ 10 mg/L 和 ABA 0.25 mg/L 的再生培养基上, 子叶和真叶的不定芽再生频率分别达到 93.3% 和 90.0%, 每块外植体的不定芽数达 3~6 个, 最多达 21 个。以 EHA105/pMOG410 为载体转化侵染大白菜 AB-81 的子叶, 获得较高 *gus* A 基因瞬时表达频率的条件为: 子叶预培养 2~3 d; 侵染的工程菌液的浓度 OD 0.3~0.5; 侵染时间 2~10 min; 共培养时间 2~3 d。

关键词: 大白菜; 子叶; 真叶; 再生; *gus* A 基因

中图分类号: Q 786; S 634 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 01-0074-03

1 目的、材料与方法

- 葡萄糖苷酶基因 (*gus* A) 的瞬时表达测试是优化转化系统条件的快速有效方法, 特别是采用 *gus* A-intron 基因, 保证了 *gus* A 基因只能在植物细胞中表达, 不能在原核细胞中表达, 可避免农杆菌转化中假阳性的出现, 增加实验的可靠性。为了进行大白菜的遗传转化, 首先应建立其高频再生和高效转化系统。经过许多学者的研究, 迄今已利用大白菜的子叶一柄建立了转化系统^[1]。本试验中以大白菜 AB-81 的子叶 (去除子叶柄) 切块及真叶切块为外植体, 建立高频不定芽再生系统, 并以该系统研究 *gus* A-intron 基因在大白菜 AB-81 中瞬时表达的影响因素, 为建立大白菜高效目的基因转化系统奠定基础。

取大白菜自交系 AB-81 无菌籽苗 4 日龄的子叶及 20 日龄的真叶, 沿四周切割, 并垂直于中脉切 2~3 道切口, 接于 MS 附加不同浓度的 AgNO₃、TDZ、BA、NAA、IAA 和 ABA 的再生培养基上, 每个处理 3 次重复, 每次重复 15~20 个外植体。所有培养基均在灭菌前将 pH 调至 5.8。外植体培养温度为 25 左右, 光照强度 2 900 lx, 光照时间 12 h。外植体接到再生培养基 30 d 左右统计不定芽再生频率。

所用菌株为根癌农杆菌 EHA105 (pMOG410), 携带 *gus* A-intron, 辽宁师范大学生物工程研究所实验室保存。工程菌液的制备及转化方法参见方宏筠等^[2]的方法。

子叶中 *gus* A 基因瞬时表达的检测参照 Shi-rong Jia 等^[3]的方法。瞬时表达频率 (transient expression frequency, TEF) 为有 *gus* A 基因表达的外植体数占总外植体数的百分率。

2 结果与分析

2.1 大白菜子叶和真叶不定芽高频再生体系的建立及其影响因素 试验结果见表 1。大白菜 AB-81 的子叶和真叶在 MS 单独附加 AgNO₃ 或生长素、细胞分裂素、ABA 的培养基上, 均不能

收稿日期: 2000-04-25; 修回日期: 2000-09-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39570381)

再生不定芽。在附加生长素和细胞分裂素但不附加 AgNO_3 或 ABA 的培养基上，也不能再生不定芽或不定芽的再生频率极低。 AgNO_3 5 ~ 15 mg/L 与细胞分裂素及生长素配合使用，能大幅度提高子叶及真叶不定芽的再生频率。ABA 0.1 ~ 0.25 mg/L 对不定芽的再生也具有促进作用，并能改善不定芽的质量，减少玻璃化芽的产生。ABA 与 AgNO_3 配合使用优于单独使用，二者具有协同增效作用，其中 AgNO_3 是关键因子。

大白菜 AB-81 对 TDZ 比较敏感，再生不定芽所需的浓度较低，对 BA 的敏感性较差，再生不定芽所需的浓度较高。TDZ 的效价大约是 BA 的 10 ~ 20 倍。NAA 对大白菜 AB-81 不定芽再生的作用优于 IAA。在 MS 附加 TDZ 0.2 mg/L，NAA 2.0 mg/L， AgNO_3 10 mg/L 和 ABA 0.25 mg/L 的组合上，可使子叶及真叶获得高频再生，子叶再生频率可达 93.3 %，真

表 1 培养基中的附加成分对大白菜 AB-81 子叶不定芽再生的影响

Table 1 Effects of supplemented components in the medium on shoot regeneration from cotyledons of Chinese cabbage AB-81

MS 培养基附加成分 Supplemented components in the medium (mg/L)						不定芽再生频率 Percentage of shoot regeneration (%)	
AgNO_3	TDZ	BA	NAA	IAA	ABA	子 叶 Cotyledons	真 叶 Leaves
0		1	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0.25	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1	1	0	0	26.7 ±5.78	
5	0	1	1	0	0	53.3 ±8.16	
10	0	1	1	0	0	56.7 ±5.17	0
15	0	1	1	0	0	50.0 ±6.23	
20	0	1	1	0	0	48.3 ±7.53	
25	0	1	1	0	0	23.3 ±5.16	
10	0.1	0	1	0	0	73.7 ±4.78	63.5 ±7.24
10	0.5	0	1	0	0	74.5 ±5.99	68.3 ±5.31
10	1.0	0	1	0	0	61.7 ±7.64	42.6 ±9.66
10	0	0.5	1	0	0	20.5 ±4.23	0
10	0	2.0	1	0	0	51.7 ±7.50	0
10	0.2	0	0.5	0	0	67.8 ±2.55	57.2 ±6.56
10	0.2	0	1.0	0	0	79.1 ±3.78	66.7 ±8.67
10	0.2	0	2.0	0	0	87.8 ±9.70	80.6 ±4.37
10	0.2	0	4.0	0	0	59.9 ±4.86	47.4 ±3.42
10	0.2	0	0	0.5	0	0	0
10	0.2	0	0	1	0	0	0
10	0.2	0	0	2	0	0	0
	0.2	0	2.0	0	0.5	40.0 ±7.37	
10	0.2	0	2.0	0	0.25	93.3 ±3.25	90.0 ±8.97
10	0.2	0	2.0	0	0.5	92.2 ±5.62	
10	0.2	0	2.0	0	1.0	82.0 ±4.61	

叶再生频率可达 90.0 %，每块外植体不定芽数一般可达 3 ~ 6 个，最长达 21 个，并且从外植体的近轴端、中部以及远轴端切口均能再生出不定芽。

大白菜不同基因型的再生应答反应不同。11 个基因型的子叶在不同再生培养基上的再生频率为 15.8 % ~ 93.3 %，其中 AB-81 的再生能力最强。

2.2 *gus* A 基因在 AB-81 中瞬时表达的影响因素 试验结果见表 2。预培养能提高大白菜 AB-81 子叶细胞中的 *gus* A 基因的瞬时表达频率。未预培养和预培养 1d 的子叶，

表 2 转化因素对 *gus* A 基因瞬时表达频率的影响

Table 2 Effects of factors on transient expression of *gus* A gene

预培养时间 Preculture time (d)	菌液浓度 Bacterial density (OD)	侵染时间 Infection time (min)	共培养时间 Coculture time (d)	瞬时表达频率 TEF (%)
0	0.3 ~ 0.5	2	3	10
1	0.3 ~ 0.5	2	3	20
2	0.3 ~ 0.5	2	3	100
3	0.3 ~ 0.5	2	3	100
4	0.3 ~ 0.5	2	3	60
5	0.3 ~ 0.5	2	3	30
3	0.000 6 ~ 0.001	5	3	30
3	0.006 ~ 0.01	5	3	60
3	0.06 ~ 0.1	5	3	80
3	0.3 ~ 0.5	5	3	90
3	0.3 ~ 0.5	10	3	90
3	0.3 ~ 0.5	2	2	100
3	0.3 ~ 0.5	2	4	90
3	0.3 ~ 0.5	2	5	80
3	0.3 ~ 0.5	2	6	70

共培养结束后, 子叶切口褐化比较严重, 说明大白菜子叶伤口未愈合时易受农杆菌的伤害。预培养 2 d 以上, 子叶伤口处已形成少量愈伤组织, 共培养结束后, 子叶状态较好, 伤口未发生明显褐化。预培养时间超过 4 d, *gus* A 基因的瞬时表达频率明显下降。可能是由于此时子叶的伤口细胞不能提供足够量的诱导农杆菌贴壁的受体, 也可能是由于细胞的分裂速度减慢, 进入细胞核的 T-DNA 量减少。

菌液浓度能明显影响大白菜子叶细胞中 *gus* A 基因的瞬时表达频率。对数生长期的菌液不稀释 (OD 为 0.3~0.5) 或稀释倍数较低 (OD 为 0.06~0.1), 子叶的瞬时表达频率较高。菌液的浓度过低 (稀释 50 倍以上, OD < 0.01), 接菌量不足, 共培养 3 d 后, 外植体的切口边缘只有很少的农杆菌生长, *gus* A 基因的瞬时表达频率较低, 说明农杆菌的 T-DNA 向植物细胞的转移机率较低。

侵染时间在 2~10 min 内, 对瞬时表达频率无明显影响。

共培养 2 d, *gus* A 基因的瞬时表达频率即可达到 100%, 共培养至第 3 天时, 瞬时表达频率可继续保持在 100%, 第 4 天开始下降。共培养时间超过 4 d, 由于农杆菌的过度增殖, 大白菜外植体的伤口细胞受到农杆菌的伤害而褐化死亡的现象逐渐加重。

综上, 在以根癌农杆菌介导的大白菜转化中, 子叶应预培养 2~3 d; 用于侵染的工程菌液的浓度以 OD 0.3~0.5 为佳; 侵染时间可选用 2~10 min; 共培养时间以 2~3 d 为宜。

参考文献:

- 1 Se Il Jun, Seok Yoon Kwon, Kee Yoeup Paek, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of fertile transgenic plants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. spring flavor). *Plant Cell Reports*, 1995, 14: 620~625
- 2 方宏筠, 王关林, 王火炬, 等. 抗菌肽基因转化樱桃矮化砧木获得抗根癌病的转基因植株. *植物学报*, 1999, 41 (11): 1892~1898
- 3 Jia Shirong, Yang Mei-zhu, Russ Ott, et al. High frequency transformation of *Kalanchoe laciniata*. *Plant Cell Reports*, 1989, 8: 336~340

Establishment of Efficient Shoot Regeneration System of Chinese Cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) Inbred Line 'AB-81' and Studies of Transient Expression of *gus* A Gene

Wang Huoxu¹, Wang Guanlin¹, Wang Xiaoyan², Fang Hongjun¹, Jia Shirong³, Tang Yixiong³, and Wei Yutang⁴

¹Bioengineering Institute of Liaoning Normal University, Dalian 116029; ²Dalian seed company, Dalian 116033;

³Biotechnology center of the Chinese Agriculture Academy of Science, Beijing 100081; ⁴Department of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

Abstract: An efficient shoot regeneration system was established using cotyledon and leave cuts of the inbred line 'AB-81' as explants. On the MS medium supplemented with 10 mg/L AgNO₃, 0.2 mg/L TDZ, 2 mg/L NAA and 0.25 mg/L ABA, the regeneration frequency of the cotyledon and leave explants was up to 93.3% and 90% respectively. The mean number and the most number of shoots per explant was 3-6 and 21 respectively. Cotyledons of AB-81 were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 containing pMOG410 carrying *gus* A-intron gene. The optimum conditions for the transient expression of *gus* A gene were as follows: preculture time of 2-3 days, bacterium density of OD 0.3-0.5, infection time of 2-10 min, and coculture time of 2-3 days.

Key words: Chinese cabbage [*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson]; Cotyledons; Leaves; Regeneration; *Gus* A gene