

# 白菜抗虫基因转化受体体系的建立

谢建坤<sup>1</sup> 崔海瑞<sup>1</sup> 舒庆尧<sup>1</sup> 夏英武<sup>1</sup> 寿森炎<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学原子核农业科学研究所, 杭州 310029; <sup>2</sup> 浙江大学园艺系, 杭州 310029)

摘要: 就白菜基因转化受体系统的诸多因素进行了试验, 初步建立了良好的白菜抗虫基因转化受体体系。

关键词: 白菜; 子叶; 抗虫基因; 转化; 受体体系

中图分类号: S 634; Q 785 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2001) 02-0175-02

## 1 目的、材料与方法

白菜〔(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino)〕是我国南方的主要蔬菜, 长期以来由于病虫害的危害, 产量下降, 品质变劣。由于白菜资源中抗虫材料的缺乏, 无法通过常规手段培育出抗虫品种。通过转基因技术, 把苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 杀虫晶体蛋白基因导入植物, 产生稳定表达杀虫晶体蛋白的转基因植物, 为培育抗虫品种开辟了一条新途径。白菜离体再生困难, 基因转化受体体系的建立较难, 其基因转化进展缓慢。从 1998 年起, 我们开展了农杆菌介导法培育抗虫白菜的研究, 并就基因转化受体体系的诸多条件进行了探索, 以期建立良好的白菜抗虫基因转化的受体体系。

试验所采用的品种为‘油冬儿’、‘高华白菜’、‘香港菜心’、‘苏州青’、‘矮蒲头’、‘矮抗青’、‘五月蔓’、‘四月蔓’等。所采用的农杆菌菌株由渥太华大学生化系提供。无菌苗的培养、愈伤组织诱导、不定芽诱导、农杆菌培养及感染均参见文献〔1〕。

## 2 结果与分析

2.1 抗虫基因转化受体系统的选择 我们比较了愈伤组织再生系统和直接分化再生系统两种成苗途径, 结果表明参试的 8 个品种在 MS+ BA 4 mg/L+ NAA 0.1 mg/L 的诱导培养基上均难以通过愈伤组织分化成苗, 其成苗率最高仅为 5%; 而通过直接分化成苗则较易, 特别是子叶直接分化成苗可以得到较高的分化频率, 最高达 38%, 下胚轴次之。因此可以选择以子叶为外植体的直接分化再生系统作为基因转化的受体系统, 进行基因转化。

2.2 子叶高频再生体系的建立 我们对影响子叶直接分化再生的诸多因素进行了试验, 结果表明在所选用的基因型中, 采用 BA 与 NAA 的搭配对不定芽诱导的效果较好, 且以 MS+ BA 6 mg/L+ NAA 0.05 mg/L 获得的不定芽发生频率较高。在 MS+ BA 6 mg/L+ NAA 0.05 mg/L 的培养基上添加一定浓度的 AgNO<sub>3</sub> 能显著地提高芽苗的再生, 且这种效应在参试的各品种上反应基本一致。以添加 AgNO<sub>3</sub> 5 mg/L 的效果最佳, 可使品种油冬儿芽的再生频率提高 1 倍, 达到 55.6%, 高华白菜则提高 1 倍多, 达到 58.3%。

以品种油冬儿为材料, GA<sub>3</sub> 对芽的诱导作用明显。通常在不含 GA<sub>3</sub> 的分化培养基中, 由子叶诱导出不定芽所需时间约为 10~ 20 d, 而当培养基中添加一定浓度的 GA<sub>3</sub> 时, 7 d 后可以看到子叶切口处有小芽产生, 随后每个外植体产生出多个不定芽, 最高达 16 个。

收稿日期: 2000-09-04; 修回日期: 2001-01-16

基金项目: 国家科技部九五重点科技攻关项目 (96015 01)

在提高芽的诱导频率上  $GA_3$  的作用亦十分明显, 在培养基中添加  $GA_3$  3 mg/L 时, 芽的发生频率最高, 为 77.8%, 较对照增加了 22.2%。

5~9 日龄苗的外植体可以获得较高的芽苗再生频率, 苗龄过长、过短对不定芽的形成均不利。品种油冬儿以 7 日龄的子叶对不定芽的诱导效果最佳, 5 日龄的次之; 高华白菜亦以 7 日龄的最好, 9 日龄的次之; 香港菜心则以 9 日龄的外植体最适于不定芽的诱导, 5~7 日龄的外植体不定芽发生频率亦较高。

根据上述试验结果, 我们以 5~9 日龄苗子叶为外植体, 以  $MS+BA$  6 mg/L +  $NAA$  0.05 mg/L +  $AgNO_3$  5 mg/L +  $GA_3$  3 mg/L 为诱导分化培养基建立了白菜子叶离体再生体系, 并以油冬儿、苏州青、高华白菜、香港菜心等 8 个品种进行验证, 结果表明该再生体系能较好地诱导出不定芽, 苏州青不定芽诱导频率最高, 为 77.1%。

将分化的不定芽移至  $1/2 MS+ NAA$  0.1 mg/L 的生根培养基上, 10 d 左右开始长根, 20 d 后植株叶片展开, 长势良好。开瓶炼苗 5 d 左右移至网室营养钵, 苗生长正常。

**2.3 抗生素敏感性试验** 根据我们的农杆菌中携带的抗生素抗性基因及抑制农杆菌生长的抑菌抗生素, 我们选用了 Hygromycin (10, 20, 40, 60, 80 mg/L), Kanamycin (25, 50, 100, 125 mg/L), Carbencillin (150, 300, 450 mg/L), Ticarcillin (250, 500, 750 mg/L) 四种抗生素进行试验, 结果表明在含有 Carbencillin (150, 300, 450 mg/L) 的培养基上, 芽的诱导频率随浓度增大而提高, 表明 Carbencillin 可以促进芽的形成。500 mg/L 的 Carbencillin 能较好的抑制农杆菌的生长。不同浓度的 Ticarcillin 对芽的形成有抑制作用, 因而应选择 500 mg/L 的 Carbencillin 来抑制共培养后农杆菌的生长。Kanamycin 对芽的形成具有更明显的抑制作用, 浓度高于 100 mg/L 时不能产生芽, 而且尽管浓度在 100 mg/L 或以下时有芽形成, 但均为白化芽。Hygromycin 对芽的形成具有强烈的抑制作用, 当浓度高于 20 mg/L 时, 基本上不能诱导芽的产生。从试验的结果看, 子叶对 Hygromycin 的敏感性高于 Kanamycin。因此就试验采用的转化菌株而言, 选择浓度为 20 mg/L 的 Hygromycin 作为选择压更合适, 在此浓度下可杀死绝大多数非转化体, 而又不至于影响转化体的生长。

**2.4 农杆菌株对子叶的感染效果** 在以上试验结果的基础上, 我们建立了白菜的抗虫基因转化受体系统, 并用农杆菌进行感染, 用 20 mg/L 的 Hygromycin 对分化的不定芽进行筛选, 获得了 52 株抗性苗。对这些抗性苗进行 GUS 检测, 20% 为 GUS 阳性植株, 表明该转化受体系统可以有效地进行基因转化。转化体的分子检测及后代的遗传与表达以及转基因食用安全性问题等, 有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- 1 项友斌. 苏云金杆菌杀虫基因 *cryIAb* 和 *cryIac* 的密码子改良与构建以及菜薹与水稻抗虫转基因植株的培育: [博士学位论文]. 杭州: 浙江农业大学, 1998. 105~106

## The Establishment of Receptor System for Insect resistant Gene Transformation of *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino

Xie Jiankun<sup>1</sup>, Cui Hairui<sup>1</sup>, Shu Qingyao<sup>1</sup>, Xia Yingwu<sup>1</sup>, and Shou Senyan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029; <sup>2</sup>Horticulture Department, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

**Abstract:** Several factors influencing receptor system for gene transformation of *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino were studied and a good receptor system of gene transformation were established.

**Key words:** *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino; Cotyledon; Zoophobous gene; Transformation; Receptor system