

文章编号: 1008-3464 (2002) 01-0026-06

影响根癌农杆菌介导的香蕉遗传转化因素研究

陈廷速^{1,2,3}, 张军¹, 夏宁邵¹, 陈丽新³, 陈如凯², 李杨瑞³

(1 厦门大学肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 2 福建农林大学, 福建 福州 350002;
3 广西农业科学院, 广西 南宁 530007)

摘要: 以香蕉 (*Musa spp.*) 的横切薄层切片 (transverse thin cell layer, tTCL) 外植体作为转化受体, 通过对外植体 GUS 基因瞬时表达率的研究以及受体材料对抗生素的敏感性实验, 找出了较适合的外植体转化条件和培养条件。研究表明: 用低代香蕉无菌苗为材料, 横切薄层切片芽再生率高, 有较高的 GUS 基因瞬时表达率; 香蕉对头孢霉素 (Cefotaxime) 和羧苄霉素 (Carbenicillin) 不敏感, 而对潮霉素 (Hygromycin) 很敏感; 菌液的预处理是影响香蕉转化的主要因子, 重悬液中的蔗糖浓度也是影响转化的因素之一, 对遗传转化有明显的促进作用。

关键词: 香蕉; 根癌农杆菌; 遗传转化; 横切薄层切片

中图分类号: Q 785 **文献标识码:** A

Study on the influence factors of the frequency of *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation in banana (*Musa spp.*)

CHEN Ting-su^{1,2,3}, ZHANG Jun¹, XIA Ning-shao¹

CHEN Li-xin³, CHEN Ru-kai², LI Yang-ru³

(1 Tumour Cell Engineering Lab of Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2 Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

3 Guangxi Academy of Agriculture Science, Nanning 530007, China)

Abstract: In this paper, transient expression of β -glucuronidase (GUS) gene was used to optimize the biological conditions mediated by *Agrobacterium tumefaciens* for transverse thin cell layer (tTCL) of fruit banana (*Musa spp.*). It showed that low generation of *in vitro* plantlets had greater shoot regeneration and higher GUS gene transient expression when transverse thin cell layer (tTCL) was used. Cefotaxime and carbenicillin were insusceptible while hygromycin was rather sensitive to banana. The pretreatment of *Agrobacterium* liquid was one of the most important factors in banana genetic transformation, and it included the concentration of sucrose.

Key words: banana; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation; transverse thin cell layer (tTCL)

收稿日期: 2001-08-15

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (C9910004); 厦门凯立生物制品有限公司资助项目

作者简介: 陈廷速 (1966-), 男 (壮族), 广西上思人, 广西农科院助理研究员, 博士研究生; 夏宁邵为联系通信人

农杆菌介导的香蕉遗传转化研究虽然已有报道^[1,2], 但其是结合基因枪才将报告基因或外源基因导入香蕉, 并获得了转基因植株。有关利用农杆菌进行香蕉遗传转化是国内外研究的热点。已有用基因枪来进行转化并获得转基因植株^[3]或利用基因枪来研究转化条件, 未获得转基因植株^[4], 基因枪转化同时带来转化体的遗传稳定性问题。因此, 香蕉遗传转化条件还需作进一步优化。我们在进行利用香蕉表达医药蛋白的研究中, 对香蕉的遗传转化受体材料进行了较深入的探讨, 以期找到最佳的受体材料以提高转化效率, 为香蕉转化工作积累经验。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试香蕉品种为威廉斯 (William s) 的低代香蕉试管苗, 由广西农科院生物所提供。

1.2 农杆菌菌株与质粒

根癌农杆菌菌株为 EHA 105, 植物表达载体 p1301hEGF (含有 GUS 基因、NPT II 基因、HPT 基因、人表皮生长因子基因 hEGF), 结构如图 1。

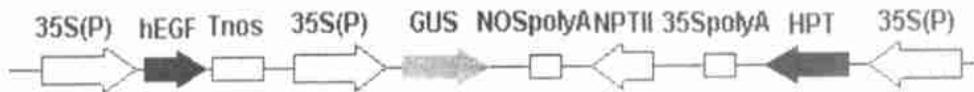


图 1 p1301hEGF 质粒结构图

Fig 1 Construction of p1301hEGF

1.3 农杆菌在转化前的预处理

取菌液接种于 YEB + Kan (Kanamycin) 25 mg/L 的培养基中, 在 28 ℃ 和 180~250 r/min 条件下振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.8~1.0。将培养好的菌液在 4500 r/min 条件下离心 10 min, 然后将菌体重悬于 BM 3 培养基中 (1:1), 28 ℃ 条件下振荡培养 10~12 h 用于转化。

1.4 培养基及培养条件

(1) 横切薄层切片芽诱导培养基 (BM 1): 改良的 MS 培养基 + BA 4.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L; (2) 丛芽增殖培养基 (BM 2): 改良的 MS 培养基 + BA 3.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L; (3) 重悬菌液的培养培养基 (BM 3): 1/2 改良的 MS 培养基 + AS (acetosyringone) 80 μmol/L + 蔗糖 100 g/L, 不加琼脂, pH 5.0; (4) 共培养阶段的培养基 (BM 4): BM 1 + AS 80 μmol/L, 培养温度为 24~26 ℃; (5) 筛选培养基 (BM 5): BM 1 + Cef (Cefotaxime) 400 mg/L + Hyg (Hygromycin) 10 mg/L。以上培养基以及培养条件如不加以说明均附加蔗糖 3%, 琼脂 0.56%, pH 5.8, 均进行暗培养, 培养温度为 30 ℃。

1.5 香蕉横切薄层切片与农杆菌共培养

将低代香蕉试管苗除去假茎和褐化的组织, 仅留顶芽和有分化能力的组织并将之横切成 1~2 mm 的薄层切片。将其移入准备好的菌液中, 在 28 ℃、120 r/min 条件下振荡 8~10 min, 取出薄层切片转入 BM 4 培养基中培养 4 d, 再转入 BM 5 进行筛选。

1.6 实验方法

从田间取回健壮的香蕉吸芽, 经过一定的处理并在超净工作台上剥取顶芽, 接种在培养基 (BM 1) 上, 每 20 d 继代一次; 之后转接在增殖培养基 (BM 2) 进行增殖即为所用的材料。

在进行抗生素的敏感性实验时, 通过预实验我们确定头孢霉素和羧苄霉素的浓度为: 300, 600, 1000 mg/L; 卡那霉素和潮霉素的浓度为: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/L; AgNO₃ 的浓度为: 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 mg/L; 每 5 d 对实验进行观察并记录生长情况, 每个实验设计 3 个重复, 40 d 统计结果。

1.7 GUS 报告基因的检测

取经转化的薄层切片用 X-Gluc 染液 (参考改进的 Jefferson 方法^[5]), 37 ℃ 温水浴 12 h, 镜检观测 GUS 基因表达的蓝斑。瞬时表达率 (%) = (GUS 基因瞬时表达的外植体数/总外植体数) × 100%。

2 结果和分析

2.1 抗生素对香蕉横切薄片切片芽分化的影响

在植物基因工程中,一般使用两种抗生素即抑菌性抗生素和选择性抗生素。抑菌性抗生素主要用在筛选转化体的过程中抑制农杆菌的生长但又不影响外植体的生长;选择性抗生素主要用来筛选转化细胞或植株。在香蕉的转化研究中,抑菌性抗生素我们用头霉素和羧苄霉素,选择性抗生素用卡那霉素和潮霉素,从抗生素敏感性实验结果(表1、表2、表3)可明显看出:香蕉对头霉素和羧苄霉素不敏感,在其浓度很高情况下仍有芽分化;而香蕉对卡那霉素和潮霉素都敏感,尤其对潮霉素更敏感,在潮霉素浓度为 5 mg/L 时很明显地抑制薄片切片的芽分化,在 10 mg/L 时前期薄片切片能长芽,但随后开始出现白化现象,35 d左右可使切片及幼芽褐化死亡。因此,我们以这浓度为筛选压力。卡那霉素可使薄片切片分化的植株白化,最后也褐化死亡,但这个抑制过程较长,需要50 d以上。

表1 头霉素和羧苄霉素对香蕉横切薄片切片芽分化的影响

Table 1 Effect of cefotaxime and carbenicillin on shoot regeneration of banana transverse thin cell layer

统计项目 Statistical items	头霉素浓度 Cefotaxime/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$				羧苄霉素浓度 Carbenicillin/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			
	ck	300	600	1000	ck	300	600	1000
薄片切片总数 No. of tTCL	50	50	50	50	50	50	50	50
出芽的薄片数 No. of tTCL with shoots	40	38	37	39	36	35	33	36
不定芽数 No. of shoots	85	76	70	73	85	87	85	81
芽分化率/% Percentage of shoot regeneration	80	76	74	78	72	70	66	72

表2 卡那霉素对香蕉横切薄片切片芽分化的影响

Table 2 Effect of kanamycin on shoot regeneration of banana transverse thin cell layer

统计项目 Statistical items	卡那霉素处理浓度 Kanamycin concentration/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$							
	0	5	10	15	20	25	30	
薄片切片总数 No. of tTCL	50	50	50	50	50	50	50	
出芽外植体数 No. of tTCL with shoots	43	37	35	36	30	30	25	
正常不定芽数 No. of normal shoots	90	75	0	0	0	0	0	
白化苗总数 No. of chlorotic shoots	0	0	60	64	55	45	40	
芽分化率 Percentage of shoot regeneration/%	86	74	70	72	60	60	50	

表3 潮霉素对香蕉横切薄片切片芽分化的影响

Table 3 Effect of hygromycin on shoot regeneration of banana transverse thin cell layer

统计项目 Statistical items	潮霉素处理浓度 Hygromycin concentration/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$							
	0	5	10	15	20	25	30	
薄片切片总数 No. of tTCL	50	50	50	50	50	50	50	
出芽外植体数 No. of tTCL with shoots	39	30	24	24	18	0	0	
正常不定芽数 No. of normal shoots	66	51	0	0	0	0	0	
白化苗总数 No. of chlorotic shoots	0	0	38	33	30	0	0	
芽分化率 Percentage of shoot regeneration/%	78	60	48	48	36	0	0	

2.2 AgNO₃ 对香蕉横切薄片切片芽分化的影响

关于 AgNO₃ 在植物离体培养中的作用机理, 有的研究认为 AgNO₃ 能提高外植体不定芽分化率^[6,7]。研究发现, AgNO₃ 对甘蓝、桑树的遗传转化有促进作用, 可能 Ag⁺ 抑制农杆菌的生长, 可以减轻组织褐化死亡的程度^[8,9]。我们研究 AgNO₃ 对香蕉横切薄片切片芽分化影响的结果说明在一定浓度范围内, AgNO₃ 能提高香蕉横切薄片切片芽再生率和不定芽的分化率。

2.3 外植体条件对 GUS 基因瞬时表达率的影响

植物的遗传转化随着遗传转化机理研究不断深入以及转化方法的改进得以迅速发展, 已在不同植物上用叶片、叶柄、子叶、胚轴、茎、茎尖分生组织、根、幼胚等作外植体进行转化。不同物种所要求的外植体种类可能不同, 即使同一物种, 不同的外植体转化效率也有差别。外植体的年龄是影响转化频率的重要因素之一, 在对黄瓜、甜瓜、西瓜的遗传转化研究中, 发现采用顶端幼嫩组织或 4~5 d 苗龄的子叶转化效果好^[10]。这说明不同发育时期的外植体, 其器官或胚胎发生的潜力有明显的差别, 同时也表明不同发育时期的外植体, 对农杆菌存在着一个最佳感受态问题。香蕉是单子叶植物并且组织褐化严重, 从我们进行香蕉的试管苗的长期生产和研究中发现, 利用暗培养可以提高丛芽的分化率, 芽组织的酚类物质较少。在利用横切薄片切片对香蕉芽分化的研究中, 建立了较好的薄片切片的植株再生体系。采用这种方法可提高外植体芽的分化率, 与用假茎进行的薄片培养通过愈伤组织再诱导芽分化^[11]相比, 能较快地建立再生体系。我们研究发现: 利用香蕉低代材料进行的转化得到的 GUS 基因瞬时表达率最高 (图 2), 而用代数高或其它材料不仅瞬时表达率低, 而且组织褐化十分严重。我们认为在低代材料中, 叶原基的分生组织较多, 有较大潜在的芽分化能力。

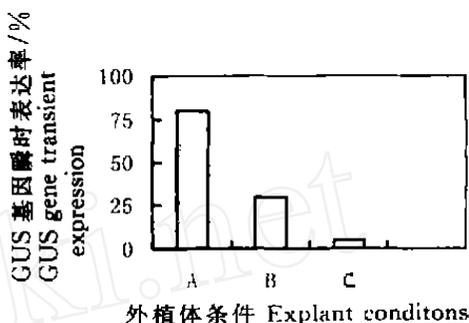


图 2 外植体条件对 GUS 基因瞬时表达率的影响

Fig 2 Influence of explant conditions on GUS gene transient expression

A- 低代试管苗; B- 高代试管苗; C- 生根试管苗。

A - Low generation; B - High generation;

C - Plantlet with roots

2.4 农杆菌重悬液中蔗糖浓度对 GUS 基因瞬时表达率的影响

农杆菌 vir 基因的诱导, 除酚类化合物和重悬液 pH 值外, 还有其它影响因素。培养基中糖浓度可促进 vir 基因的表达。在水稻的转化中使用高浓度的糖能提高转化效率^[12]。我们曾以蔗糖和葡萄糖的不同组合来研究瞬时表达, 但没有单纯用蔗糖效果明显。因此我们以不同的蔗糖浓度详细研究瞬时表达 (图 3), 在蔗糖浓度 100 g/L 条件下, 薄片切片的 GUS 基因瞬时表达最好。

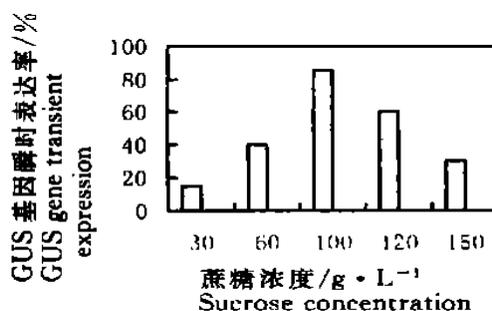


图 3 蔗糖浓度对 GUS 基因瞬时表达率的影响

Fig 3 Effect of sucrose concentration on GUS gene transient expression

3 讨论

在进行香蕉遗传转化研究中, 受体系统和转化方法是外源基因能否导入香蕉的基础。在已有的获得香蕉转基因植株的报道中^[1~3], 都是利用基因枪或间接于基因枪才获得转基因植株, 对其遗传稳定性需要进一步的研究。因此, 开展有关影响农杆菌介导的香蕉转化的因素的研究有着理论和应用的价值。

单子叶和双子叶植物的创伤反应不同, 在单子叶植物的伤口附近往往发生木质化或硬化, 而且没

有明显的细胞分裂发生,因而两者的转化机理有较大的区别。在对一些已成功用农杆菌转化的单子叶植物的研究中,除了菌株和质粒的选择,以及对促进 vir 基因的活化的因素进行优化之外,研究所选择的转化体系(受体系统)需具备较高的感染率、芽分化率和转化植株易于再生为所首先考虑的条件。在我们进行的利用香蕉表达医药蛋白的研究中,对影响农杆菌的一系列因子做了系统的研究并得到很高的报告基因的瞬时表达;特别在受体材料的选择方面,有着独特的一面,所用的低代材料不仅芽生长点多,其周围的组织都具有潜在的芽分生能力(图4-1,2)^[13],而且我们采用的横切薄层培养切片利于农杆菌对材料的吸附。同时,横切薄层培养切片的芽分化率高,缩短了对转化体筛选的时间,最重要的是瞬时表达率较高(图4-3,4,5)。

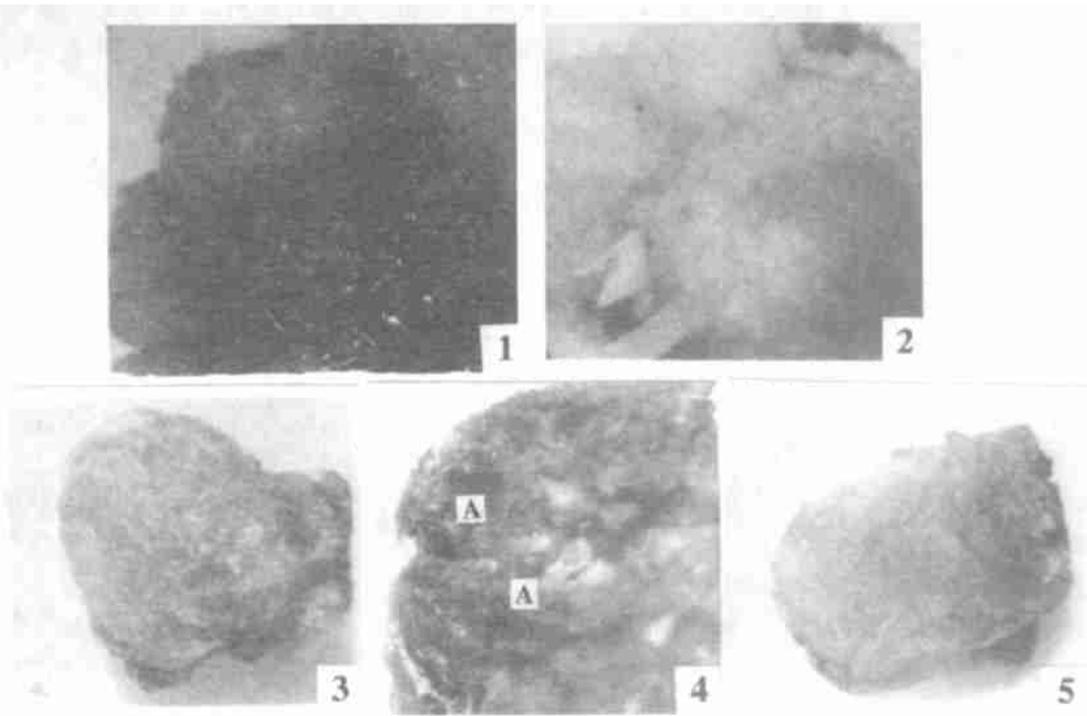


图4 香蕉横切薄层切片芽分化及转化情况

Fig 4 The result of bud regeneration and transformation of banana tTCL

1. 香蕉横切薄层切片暗培养3 d芽分化情况,其中边缘突出部分为已分化的芽点;
 2. 继续培养5 d之后芽分化的情况;
 3. 用农杆菌进行转化但无GUS基因瞬时表达的香蕉横切薄层切片;
 4. 用农杆菌进行转化有GUS基因瞬时表达的香蕉横切薄层切片,其中A部分为GUS蓝斑;
 5. 没有用农杆菌进行转化但进行GUS检测的香蕉横切薄层切片。
1. The shoots regenerate under dark culture in three days. Those projecting beside the tTCL are buds;
 2. It shows that the buds develop into shoots after 5 days;
 3. The tTCLs of Banana treated with *Agrobacterium tumefaciens* without GUS gene transient expression;
 4. The tTCLs of Banana treated with *Agrobacterium tumefaciens* and the GUS gene transient expression that showed A;
 5. The tTCLs of Banana without treated with *Agrobacterium tumefaciens* but examined with GUS solution.

我们的研究结果说明香蕉对抑菌性抗生素(头孢霉素和羧苄霉素)很不敏感。在许多文献中,一些研究者在共培养之后往往用500 mg/L的抑菌性抗生素来杀菌,而有的材料即使在筛选培养基加上抑菌性抗生素也很难彻底抑制农杆菌的生长。我们用800~1000 mg/L抑菌性抗生素来处理就得到很好的效果。目前选择性抗生素一般都选择卡那霉素和潮霉素,但香蕉对卡那霉素不敏感,用植株做敏

感性实验时, 需要筛选 150 d 才得到结果; 而用横切薄层切片做敏感性实验时, 得到相似的结果也要 50 d 左右。香蕉对潮霉素很敏感, 在 10 mg/L 浓度下芽生长受到抑制, 筛选所用的时间短。

此外, $AgNO_3$ 在低浓度下能促进香蕉芽的分化, 至于对转化的作用机理有待进行探讨。我们在研究重悬液的成分对农杆菌介导香蕉转化的影响时, 研究了葡萄糖和蔗糖的作用。结果仅有单独用蔗糖且在 100 g/L 时才得到较高的 GUS 基因的瞬时表达。这可能是含有蔗糖的重悬液经过高温灭菌之后, 蔗糖转变为一些单糖类物质, 它们对 vir 基因有活化作用, 其作用机制需进一步的研究。

参考文献:

- [1] GREGORY D May, ROWNAK Afza, HUGH S Mason, et al Generation of transgenic banana (*Musa acum inata*) plant via *Agrobacterium* \bar{m} -mediated transformation [J] Biotechnology, 1995, 13: 486~ 492
- [2] 李华平, 胡晋生, 王敏, 等 香蕉茎尖遗传转化法研究 [J] 热带作物学报, 2000, 21 (4): 33~ 38
- [3] LA SZLO Sagi, BART Panis, SERGE Remy, et al Genetic transformation of banana and plantain (*Musa spp.*) via Particle Bombardment [J] Biotechnology, 1995, 13: 481~ 485
- [4] 王鸿鹤, 黄霞, 邱国华, 等 基因枪法转化香蕉薄片外植体的参数优化 [J] 中山大学学报 (自然科学版), 2000, 39 (2): 87~ 91
- [5] JEFFERSON R A. A ssaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system [J] Plant Molecular Biology Reports, 1987, 11: 38~ 47.
- [6] BOYER E M. A potent inhibitor of ethylene action in plants [J] Plant Physiology, 1976, 58: 268~ 271.
- [7] 张鹏, 傅爱根 $AgNO_3$ 在植物离体培养中的作用及可能的机制 [J] 植物生理学通讯, 1997, 33 (5): 376~ 379
- [8] 卫志明, 黄健秋, 余淑平, 等 甘蓝下胚轴的高效再生和农杆菌介导的基因转化甘蓝 [J] 上海农业科学, 1998, 14 (2): 11~ 18
- [9] 钟名其, 楼程富, 周金妹, 等 农杆菌介导的桑树遗传转化条件的研究 [J] 蚕桑通报, 1999, 30 (4): 16~ 18
- [10] 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣主编 植物遗传转化技术手册 [M] 北京: 中国科学技术出版社, 1994
- [11] 黄霞, 黄学林 果用香蕉薄片培养再生植株 [J] 植物生理学通讯, 1998, 34 (4): 268
- [12] AM ITABH Mohanty, SARMA N P, AKH LESH K T. *Agrobacterium* \bar{m} -mediated high frequency transformation of an elit indica variety *Pusa Basm ati I* and transformation of the transgenes to R2 progeny [J] Plant Science, 1999, 147: 127~ 137.
- [13] 陈廷速, 张军, 夏宁邵, 等 香蕉横切薄层培养 (tTCL) 及植株再生 [J] 福建果树, 2001, 117 (3): 22

(责任编辑 梁健)

本刊荣获“第四届广西十佳科技期刊”

本刊继 1999 年在教育部组织的“全国优秀高等学校自然科学学报及教育部优秀科技期刊评比”中荣获二等奖后, 2001 年再次双喜临门: (1) 入选“中国期刊方阵”。“中国期刊方阵”是由国家新闻出版总署组织, 并经全国各省、市、自治区的新闻出版局、中央国家机关期刊管理部门和解放军总政宣传部、新闻出版局以及科技部等部门组织专家对我国现有的 8725 种期刊进行严格筛选后产生的, 共有 1500 余种期刊入选。其中广西入选的科技期刊有 9 家, 社科类期刊有 18 家。(2) 被评为“第四届广西十佳科技期刊”。经广西壮族自治区党委宣传部、自治区新闻出版局、自治区科学技术厅联合组织专家对全区报刊社送评的报纸和期刊进行综合评审, 共评选出第四届广西优秀报刊 68 种。我校主办的三种期刊均榜上有名, 其中:《广西农业生物科学》被评为“第四届广西十佳科技期刊”;《广西大学学报 (哲学社会科学版)》被评为“第四届广西十佳社科期刊”;《广西大学学报 (自然科学版)》被评为“第四届广西优秀期刊”。

(梁健)