

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导的百脉根 (*Lotus corniculatus* L.) 的转化

虞剑平 邵启全

(中国科学院遗传研究所, 北京 100012)

摘 要

本文报道一个简单有效的豆科植物转化再生实验系统。百脉根(品种: 里澳)子叶外植体, 被含非致瘤性 Ti 质粒载体的根癌农杆菌感染。该载体带有一个嵌合的 *npt-II* 基因和一个胭脂碱合成酶基因。在含卡那霉素的选择培养基上, 有 40% 的外植体在 3 周内出芽。长大的芽可在生根培养基上生根并移栽成活, 开花结实。从一个切块得到了 16 个抗性再生植株。对再生植株的胭脂碱检测、NPT-II 活性检测及 DNA 分子杂交实验及种子后代的胭脂碱检测结果表明, 外源基因整合到百脉根基因组上, 获得表达并能通过有性生殖过程传递。

关键词: 植物转化, 豆科, 百脉根, 根癌农杆菌

豆科植物是人类食物和动物饲料的重要组成部分, 并具有与根瘤菌共生固氮的能力, 一直是科学研究的重点。豆科植物基因转移技术的建立, 将对提高作物产量和固氮分子机制的研究作出积极贡献。

近年来, 由于分子生物学和组织培养技术的发展, 已有多种将外源遗传物质导入受体植物的方法, 其中发展最为完善的是农杆菌-Ti 质粒载体介导的基因转移。此方法已被推广到豆科植物, 并在苜蓿^[1]、白三叶草^[2]和大豆^[3]中报道了转化和再生。这些结果预示, 基因工程技术应用于豆科植物的分子生物学研究和作物品种改良, 已为期不远。

百脉根 (*Lotus corniculatus* L.) 是温带地区重要牧草, 和常见的庭院观赏植物, 具有营养丰富、耐寒冷、耐瘠薄及牲畜食用安全等特性。它的体细胞全能性是目前豆科植物中最好的, 从其花药、分生组织和原生质体都可得到高频率的再生植株^[4], 其根的切段在不含任何激素的 MS 培养基上可再生植株^[5]。已有报道百脉根可被野生型根癌农杆菌感染^[6], 并可由发根农杆菌介导转化^[7]。本文报道利用 Ti 质粒载体将嵌合的 *nos-npt-II* 基因导入百脉根细胞, 从而为研究外源基因及调控序列在豆科植物中的表达提供了一个简单有效的实验系统, 并为

百脉根的品种改良提供了新途径。

一、材料和方法

1. 细菌菌种及其培养

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株为 C58C1 (pGV3850::neo 1103)^[10]。该

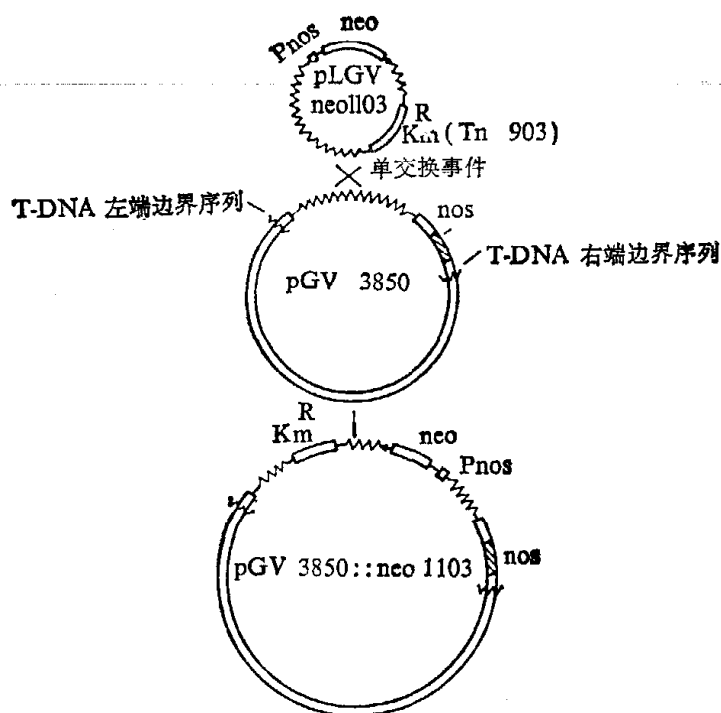


图1 pGV 3850::neo1103 构建简图

培养基上。萌发后 5—10 天取子叶进行转化。

3. 转化及培养方法

取 5—10 日龄的百脉根无菌苗子叶,剪成 2 片,浸入以消毒 MS 液体培养基稀释 20 倍的根癌农杆菌菌液中,轻摇。10min 后用消毒滤纸吸干子叶表面水份,接入 MS + 6-BA 0.1mg/n 固体培养基中。预培养 2 天后,转入选择培养基 (MS + 6-BA 0.1 mg/1 + kanamycin 100mg/1 + cefotaxime 300mg/1) 中,进行转化体的选择培养。每两周 1 次转入新鲜培养基。培养条件为 26—28℃,每天光照 10h,光照强度 1500lx。再生的芽长超过 3cm 时,切下转入无激素 MS 培养基以诱导生根。生根植株移栽至温室花盆中。

4. 胭脂碱定性测定方法

采用简化的胭脂碱合成酶测定方法^[9]。将植物组织切成 2mm 直径的小块,直接将组织液挤到 Whatman 滤纸上。在甲酸:乙酸:水 = 1:3:16 的缓冲液中电泳 45min,电压为 400V。菲醌染色,紫外灯下观察。

5. NPT-II 酶活测定方法

按 EMBO Course on Plant Molecular Biology, Gent, August 1987 进行。

6. 转化体 DNA 的提取及分子杂交

采用简单快速的微量制备法提取植物 DNA^[10]。探针 DNA 为完整的 *nos-npt-II* 基因,由翟文学同志赠送。探针标记及点杂交条件参见文献[11]。

菌株在其非致瘤性 Ti 质粒载体上含有一个 *nos-npt-II* 嵌合基因以供选择卡那霉素抗性的转化植物细胞,及一个有功能的胭脂碱合成酶基因。图 1 示该质粒的构建。

菌种在附加卡那霉素 40mg/1 的 YEB 培养基上培养。在 26—28℃ 下振荡培养过夜至细菌生长对数期,即可用于转化试验。

2. 植物材料

百脉根品种 里澳 (Leo) 种子由中国农业科学院畜牧研究所饲料室赠送。

种子用 75% 酒精浸泡 2—3min,再用 0.1% 升汞消毒 15min,无菌水冲洗 3 次,接种到含琼脂 0.65% 和蔗糖 3% 的

二、结果和讨论

1. 子叶外植体的组织培养

取 5—10 日龄的百脉根无菌苗的子叶, 剪成二片, 接种至 MS + 6-BA 0.1mg/l 培养基上。10 天后外植体增大, 伤口处膨大并开始出芽。20 天内几乎所有外植体都出芽, 约四分之三的外植体上长出多个芽。愈伤组织也可见于多数外植体上, 绿色质密。30 天时部分芽高已有 3cm, 将它们切下转入无激素 MS 培养基。10 天内全部生根达 1cm 长, 30 天内株高可达 8cm 左右, 根长 5—10cm, 根数多为 2—3 条。移栽很容易成活, 外观正常。

图版 I-1 显示一块子叶外植体经培养 8 周后长出的愈伤组织和分化的大量丛芽。

百脉根子叶外植体的培养, 取材不受季节限制, 操作简单, 便于重复, 再生快, 频率高, 移栽成活容易, 为转化-再生研究提供了理想的受体系统。

2. 子叶外植体的转化及卡那霉素抗性植株的再生和移栽

5—10 日龄的百脉根无菌苗的子叶外植体 200 个, 经根癌农杆菌感染并预培养 2 天后, 转入选择培养基。选择培养基中抗生素卡那霉素的作用是抑制非转化细胞生长, 从而筛选出对卡那霉素具有抗性的转化细胞; 头孢菌素的作用是抑制农杆菌的繁殖, 进而使植物组织达到无菌。选择培养 2 周后, 外植体增大, 切口处开始出现愈伤组织和芽。通常在切口表面可见几处起始。3 周内 40% 外植体上出芽。一般在外植体上既出芽也长愈伤组织, 但也观察到芽在伤口处出现而无愈伤组织形成。愈伤组织为绿色质密, 长出的芽外观正常(图版 I-2)。

芽高至 3cm 时被切下, 植入无激素 MS 培养基中。2 周后大多数芽能正常生根。4 周后可移栽至花盆中。很易成活, 并可开花结实。图版 I-3 显示一抗性转化再生植株经移栽成活后, 分枝生长。

以未经感染的子叶外植体作对照, 经预培养 2 天后转入选择培养基。4 周后无芽分化。部分外植体切口处出现小的褐色愈伤组织, 但不能长大。外植体逐渐死亡。这表明 100mg/l 的卡那霉素浓度有效地抑制了非转化组织的生长和再生。

3. 转化体的鉴定

(1) 胭脂碱定性测定

抽样测定了由感染的子叶外植体在含有卡那霉素的选择培养基上形成的愈伤组织、芽及再生植株, 共数十份材料, 它们都含有胭脂碱。所有非转化的对照材料中都测不出胭脂碱。这表明非选择的 T-DNA 标记基因-胭脂碱合成酶基因在百脉根转化细胞内的存在和表达。图版 I-4 是对 5 个随机抽样的转化再生芽的胭脂碱测定结果。

(2) NPT-II 酶活测定

为确证转化体对卡那霉素的抗性是否由外源基因 *npt-II* 编码的酶所产生, 从转化植株“G”的叶片及由其叶片扩增的愈伤组织取材, 以非转化百脉根为对照, 以转化烟草系 (SR1 和 W38, 由 105 组提供) 和非转化烟草为参照标准, 定性测定了 NPT-II 酶活性, 见图版 I-6。结果表明, 百脉根转化体含有迁移率与转化烟草的相同的 NPT-II 酶, 非转化对照材料都不含有这种酶。还可看出, 二种植物中都有干扰蛋白存在, 但它们具有不同的干扰蛋白迁移图谱。

(3) DNA 分子杂交

从转化体“G”的叶片及由其叶片扩增的愈伤组织提取 DNA, 用 T-DNA 特异性探针进行

点杂交。图版 I-6 结果显示,转化体 DNA 中有 *npt-II* 同源片段存在,而对照(非转化百脉根 DNA)中没有。

4. 种子后代的初步鉴定

抗性再生植株移栽成活后,大量分枝,生长茂盛。在 88 年 5 月移栽的二株中,一株于 89 年 7 月开花结实。图版 I-7 显示收获的荚果及种子。种子发芽后,从幼苗取材测定胭脂碱。图版 I-8 显示,种子后代植株含有胭脂碱。这表明外源基因已通过有性生殖过程传递到子代并得到表达。

综合以上结果,通过根癌农杆菌介导的转化, *npt-II* 基因和胭脂碱合成酶基因整合在百脉根基因组上,可表达产生有功能的酶,从而使百脉根表现出新的性状:抗卡那霉素与合成胭脂碱。新性状可通过有性生殖过程传递给种子后代。

三、结 论

本文介绍了产生转基因豆科植物的一个简单有效的转化-再生方法。常规的根癌农杆菌转化程序同百脉根极强的体细胞全能性相结合,提供了一个研究外源基因在豆科植物中表达的便利的实验系统。这一系统在本实验室已被成功地用于反义基因调节作用的研究。它也可用于百脉根的品种改良,如抗病抗虫育种。此外,本实验为百脉根导入了新的遗传标记,可用于原生质体融合、远缘杂交等工作中。

本实验的部分工作在本所负压实验室进行,得到了朱立煌、胡乃璧、翟文学等同志的大力协助。在此作者表示衷心的感谢。

参 考 文 献

- [1] Deak, M. et al., *Plant Cell Reports*, 5(1986), 97—100.
- [2] White, D. M. R., *Plant Mol. Biol.*, 8(1987), 461—469.
- [3] Conner, A., *Plant Mol. Biol.*, 2(1987), 282—288.
- [4] Lu Deyang et al., *Kexue Tongbao*, 31(1986), 1647—1650.
- [5] Rybczynski, J. et al., *Plant Science*, 51(1987), 239—244.
- [6] Webb, K. J., *Theor. Applied Genet.*, 22(1986), 53—58.
- [7] Jensen, J. S. et al., *Nature*, 321(1986), 669—674.
- [8] Hain, R. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 199(1985), 161—168.
- [9] Feng Xinhua et al., *Kexue Tongbao*, 33(1988), 951—954.
- [10] Mettler, I., *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5(1987), 346—349.
- [11] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.