

农杆菌介导转化豆科牧草百脉根影响因子*

张振霞^{1,2}, 席嘉宾¹, 张惠霞³, 储成才⁴

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275; 2. 韩山师范学院生物系, 广东 潮州 521041;
3. 广东省畜牧技术推广总站, 广东 广州 510500; 4. 中科院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘 要: 对农杆菌介导转化豆科牧草百脉根的相关影响因子进行了实验研究, 结果表明: 在百脉根农杆菌转化体系中, 以农杆菌 AGL1 菌株、子叶转化受体、3 d 共培养时间以及 25 mg/L 卡那霉素筛选质量浓度为最佳转化条件。研究还发现, 头孢霉素对农杆菌 AGL1 菌株的抑制作用要强于羧苄霉素。

关键词: 百脉根; 遗传转化; 农杆菌介导法; 影响因子

中图分类号: Q334⁺.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 04-0096-03

百脉根 *Lotus corniculatus* L. 是温带地区常见的豆科牧草, 不仅是牲畜的优良饲料, 还在土壤改良、水土保持以及生态环境保护方面发挥着积极作用。Webb^[1]早在 1986 年尝试了农杆菌转化百脉根研究, 王广立等^[2]用富含硫氨酸的 10KD 玉米醇溶蛋白、Bellucci 等^[3]用 β -玉米醇溶蛋白和 γ -玉米醇溶蛋白转化百脉根, 在转化植物的叶片中检测富含硫氨基酸的增加等等。但是至目前有关农杆菌转化百脉根各种影响因素的系统研究方面还未见相关报道。本研究将对农杆菌转化百脉根时的各种影响因素做较为系统的研究, 以构建良好的遗传转化系统, 提高百脉根的转化效率, 为进一步用转基因技术培育和改良百脉根品种的研究提供更有效的研究手段。

1 材料和方法

1.1 细菌和质粒

本研究使用了大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 株系、双元载体 pBin 19 以及农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* AGL1、EHA105 和 LBA4404 株系。

pBGA 质粒在大肠杆菌 DH5 α 中保存。本研究使用了含 CaMV 35S 启动子调控的拟南芥 GA20-氧化酶基因, 大小为 1.158 Kb, 为 *Bam*H II 酶切的片段。另外还使用了含有 pNOS 启动子控制下的 NPT2 基因, 大小为 795 bp。

1.2 植物材料与方法

供试种子由中科院遗传所吕德阳老师提供。种子处理方法为先用砂纸打磨后用 $\varphi = 70\%$ 的酒精消

毒 10 min, 然后用 $\varphi = 0.1\%$ 升汞灭菌 20 min, 再用灭菌水冲洗数次后置于 MS 培养基中。萌发后取刚展开的子叶和上胚轴以及第 2、3 片真叶以及相应的茎段作为转化受体。组织培养条件为 26 $^{\circ}\text{C}$, 每日光照 12 h, 光强 2 000 lx。

1.3 培养基

细菌培养基包括 LB 培养基^[4], 用于培养大肠杆菌; YEB 培养基^[5], 用于培养农杆菌。植物培养基包括接种培养基: MS^[5]; 共培养基; 筛选及分化培养基以及壮苗培养基几种。

1.4 转化方法

将农杆菌单菌落接种于 20 mL 的 YEB 液体培养基 (含卡那霉素 50 mg/mL) 中, 28 $^{\circ}\text{C}$ (150 r/min) 培养 2~3 d, 重悬至 OD₆₀₀ = 0.6~0.9; 将培养 6~7 d 的百脉根无菌子叶, 取 2/3 部分浸入 MS 液体培养基悬浮的农杆菌培养液中摇动 20 min 后, 取出用无菌滤纸吸干多余菌液, 将子叶接种于共培养基上进行光培养; 培养 3 d 后转入筛选培养基上, 进行转化体的筛选培养。培养条件为温度 25~26 $^{\circ}\text{C}$, 日光照 12 h, 光强 2 000 lx。4 周后统计分化率。每 4 周换一次新鲜培养基, 继代 3 次以上。最后将再生苗转入壮苗培养基以诱导生根。数周后将植株移栽至温室中。

1.5 实验处理

百脉根子叶对卡那霉素筛选剂的敏感性实验设 0、10、25、50、75、100 mg/L 6 个卡那霉素的筛选质量浓度, 培养基为 MS 培养基。实验转化以 *npt2* 基因 (neomycin phosphotransferase 2) 作为筛选基因;

* 收稿日期: 2004-06-24

基金项目: 珠海市科技计划 (PC200310026) 资助项目

作者简介: 张振霞 (1975 年生), 女, 副教授, 博士后; E-mail: zzx8411@163.com

对于头孢霉素和羧苄霉素的抑菌效果研究用 300 mg/L 的头孢霉素和羧苄霉素作为抑菌剂来研究其抑制效果；不同农杆菌菌株对百脉根分化率的影响实验采用 AGL1、EHA105、LBA4404 3 种根癌农杆菌菌株进行实验。共培养天数对百脉根分化率的影响实验设 2、3、4 d 3 个处理。不同转化受体材料设百脉根的叶、子叶、茎段和胚轴几种材料处理。

2 结果与分析

2.1 百脉根子叶对卡那霉素筛选剂的敏感性

表 1 表明，当卡那霉素的处理质量浓度为 25 mg/L 和 50 mg/L 时，百脉根子叶都具有比较理想的分化效果；而当处理质量浓度为 10 mg/L 时，90% 的分化率使得无法产生有效的筛选效果；当卡那霉素的处理质量浓度为 75 mg/L 时，百脉根子叶的分化率太低；而当卡那霉素的质量浓度升至 100 mg/L 时，百脉根子叶的外植体出现褐化、坏死现象，分化率为零。

表 1 百脉根对卡那霉素筛选剂的敏感性

Tab.1 Effect of selective agent kanamycin on cotyledon of *L. corniculatus*

卡那霉素质量浓度 / (mg·L ⁻¹)	转化数 /个	分化数 /个	分化率 /%
0	40	38	95.0±3.75
10	40	36	90.0±3.0
25	40	8	20.0±1.0
50	40	7	17.5±0.75
75	40	1	2.5±2.5
100	40	0	0

2.2 头孢霉素和羧苄霉素的抑菌效果

研究发现，筛选培养 4 d 后，在含羧苄霉素的培养基上，接种农杆菌 AGL1 和 EHA105 菌株的部分外植体发生污染，1 周后外植体全部感染，2 周后全部褐化坏死。而在含头孢霉素的培养基中，2 种菌株均未感染子叶外植体，外植体全部生长正常。同时还发现，头孢霉素对 AGL1 菌株的抑制效果要好于对 EHA105 菌株。

2.3 不同农杆菌菌株对百脉根分化率的影响

表 2 表明，接种 AGL1 菌株时，百脉根的转化率远远高于接种 EHA105 和 LBA4404 菌株，达 20%，而后两者的转化率仅分别为 7.5% 和 12.5%。

2.4 共培养天数对转化率的影响

从表 3 可以看出，在 3 个培养天数的处理中，以 3 d 的共培养效果为最好，有 20% 的外植体可以分化为再生苗，比共培养时间为 2 d 和 4 d 的分化率高 1 倍和 4 倍以上。

表 2 不同菌株对百脉根转化率的影响

Tab.2 Effect of different *Agrobacterium* strains on the transformation efficiency of *L. corniculatus*

农杆菌菌株	转化数/个	分化数/个	分化率/%
AGL1	40	8	20.0±1.75
LB4404	40	5	12.5±2.5
EHA105	40	3	7.5±1.0

表 3 不同共培养天数对百脉根转化率的影响

Tab.3 Effect of the days for co-culture with *A. tumefaciens* on the transformation efficiency of *L. corniculatus*

共培养天数/d	转化数/个	分化数/个	分化率/%
2	40	4	10.0±3.0
3	40	8	20.0±1.0
4	40	2	5.0±0.75

2.5 不同转化受体材料对转化率的影响

表 4 表明，在 4 种百脉根受体材料对转化率的影响中，以子叶作为转化受体的最终分化率为最高（达 20%），叶的次之（12.5%），而以茎段作为受体的分化率为最低（5.0%），胚轴的次低（7.5%）。

表 4 不同受体类型对百脉根转化率的影响

Tab.4 Effect of different transformation recipient on the transformation efficiency of *L. corniculatus*

受体类型	转化数/个	分化数/个	分化率/%
子叶	40	8	220.0±1.0
胚轴	40	3	7.5±1.5
茎段	40	2	5.0±0.95
叶	40	5	12.5±2.25

3 讨论

Desgagnes 等^[6]认为卡那霉素筛选浓度过高会影响转化体愈伤的发生和胚状体的诱导，百脉根子叶转化受体也有类似的反应。过高的筛选剂浓度虽然能更有效的得到转化细胞，但同时也严重影响转化细胞的生长和再生能力。通过对筛选剂质量浓度和筛选时间两方面因素的综合考虑，本研究认为选择 25 mg/L 的卡那霉素浓度作为百脉根子叶转化受体的筛选浓度比较适宜。

不同抗生素对不同农杆菌的抑菌效果与不同植物材料有一定的关系。如王丹等^[7]人的研究认为羧苄青霉素比头孢霉素更适合用于农杆菌介导的马铃薯叶圆片的遗传转化。本研究结果表明，就百脉根子叶受体而言，头孢霉素对农杆菌两个供试菌株 AGL1 和 EHA105 都有良好的抑制效果，而羧苄霉

素则效果不佳。

研究发现,3 d 时间的共培养足以使卡那霉素抗性基因 *nptII* 在百脉根植物基因组中整合并表达;2 d 的共培养时间偏短,外源基因不能完全、有效地在植物基因组上整合;但4 d 共培养时间有点偏长,农杆菌生长过于旺盛,以至转化受体转移至筛选培养基上时农杆菌已很难抑制,反而影响了转化率。这与 Chabau 等^[8]在紫花苜蓿上的研究结果相似。

本研究结果来表明,百脉根的子叶显然比其它组织有相对较强的组织分生能力,同时,就百脉根的转化而言,采用子叶作为转化外植体,一方面取材不受季节限制,操作简单,便于重复,另一方面转化体系具有再生速度快,频率高,移栽成活容易等优点。

参考文献:

- [1] WEBB K J. Transformation of forage legumes using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Theor Appl Genet, 1986, 72: 53–58.
- [2] 王广立,唐茂芝,林忠平. 富硫蛋白基因对牧草百脉根的转化[J]. 植物学报, 1994, 36 (3): 204–208.
- [3] BELLUCCI M, ALPINI A, ARCIONI S. Expression of maize γ -zein and β -zein genes in transgenic *Nicotiana tabacum* and *Lotus corniculatus* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2000, 62: 141–151.
- [4] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔, 著, 黄培堂等译. 分子克隆实验指南(第3版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 1595.
- [5] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. Plant Physiol, 1962, 15: 473–497.
- [6] DESGAGNES R, LABERGE S, ALLARD G, et al. Genetic transformation of commercial breeding lines of alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1995, 42: 129–140.
- [7] 王丹, 朱常香, 郑成超, 等. 根癌农杆菌介导的马铃薯遗传转化条件的优化[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2002, 33(1): 23–27.
- [8] CHABAUD M, PASSIATORE J E, CONNON F, et al. Parameters affecting the frequency of kanamycin resistant alfalfa obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation[J]. Plant Cell Reports, 1988, 7: 512–516.

The Factors Affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation of *Lotus corniculatus*

ZHANG Zhen-xia^{1,2}, XI Jia-bin¹, ZHANG Hui-xia³, CHU Cheng-cai⁴

(1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Department of Biology, Hanshan Normal College, Chaozhou 521041, China;

3. Guangdong Livestock Extension Services, Guangzhou 510500, China;

4. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: An optimized method for obtaining a higher frequency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Lotus corniculatus* was described. It was found that the optimum conditions for the successful transformation include the using the *Agrobacterium* strain AGL1, a 3-day co-cultivation period, cotyledon transformation recipient, and 25 mg/L of kanamycin concentration. Cefotaxime was better than carbencillin for controlling the bacterium.

Key words: *Lotus corniculatus*; genetic transformation; *Agrobacterium*-mediated method; affecting factors