

影响根癌农杆菌介导的香蕉基因 转化早期的主要因素*

黄霞, 黄学林, 李哲, 陈云凤, 李筱菊

(中山大学生命科学学院 // 基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 用含质粒载体 pCAMBIA2301 的根癌农杆菌 (*Agrobacterium inoculation*) 转化“641”香蕉 (*Musa* AAA Cavendish subgroup cv. 64-1) 的薄片外植体, 通过测定 GUS 基因瞬时表达率, 对转化早期的主要影响因素进行了研究。结果表明: 农杆菌 EHA105 较适合于介导转化。将薄片置于固体高渗培养基上培养 4 h 后, 通过真空减压法使农杆菌接种于其上, 获得了较高的瞬时表达率 (41.67%), 是对照 (8.33%) 的 5 倍, 农杆菌悬液稀释 5 倍用于转化较好, 共培养 3 d 为宜。薄片外植体越靠近根部, 瞬时表达率越高。而外植体预培养会降低瞬时表达率。

关键词: 香蕉 (*Musa* spp.); 农杆菌; 转化; 瞬时表达

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 05-0068-05

香蕉 (*Musa* spp.) 是最重要的热带水果之一, 但病害的侵袭使香蕉生产遭受严重的损失^[1], 用传统的育种方法培育抗病、抗逆的优质香蕉比较困难, 而利用组织培养结合基因工程技术可望实现这一目的。国外通过电激或基因枪转化获得了少数几个香蕉品种的转基因植株^{2,3}, 但这些转化方法难于获得单拷贝插入的转基因植株, 不利于外源基因的稳定存在和遗传, 而且所需仪器设备昂贵。根癌农杆菌介导的香蕉基因转化能克服这些缺点, 但香蕉有如其它单子叶植物那样难于用农杆菌介导转化, 目前仅在以花序为外植体建立的悬浮细胞体胚发生体系中取得过成功, 而这一体系所需时间极长 (约 10~12 个月), 实验技术要求也较高⁴。国内仅有关于基因枪法转化香蕉得到瞬时表达的报道⁵。我们已建立了可望用于基因转化的香蕉薄片培养再生植株的体系⁶, 本文就利用该体系进行农杆菌转化, 通过扫描电镜观察并进行 GUS 瞬时表达的比较, 对影响根癌农杆菌介导基因转化早期的重要因素进行研究。由于该转化体系获得转基因再生植株所需时间短, 有望成为一重要的、高效的香蕉外源基因转化体系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

“641”香蕉试管苗薄片外植体作为基因转化受体, 同一组试验中外植体供体植株的培养代数和培

养时间均相同。薄片的切取参照文献 [6]。二元载体 pCAMBIA2301 (携带一个嵌合的 CaMV35S, NPT II 基因和一个嵌合的 CaMV35S, GUS, INT 基因) 为表达载体。

1.2 培养基

(1) 芽诱导培养基 (MST): 采用 MS 无机盐, 参照文献 [6] 方法添加维生素、氨基酸和植物激素。

(2) 共培养培养基 (MST⁹): MST+100 μmol/L AS。

(3) 农杆菌活化继代培养基: YEB^[7]+50 mg/L 卡那霉素。

1.3 方 法

转化实验的基本步骤如下: 挑取农杆菌单菌落接种于含 50 mg/L 卡那霉素的 YEB 液体培养基, 28 °C, 180 r/min 振荡培养 24 h, 再按 φ=1% 接种量将菌液转移到新鲜的 YEB 液体培养基, 继续培养至对数生长期。菌液离心后用 10 倍体积的 MST 液体培养基重悬菌体, 然后将薄片外植体浸泡于其中 30 min (试验组合 2 后的试验均通过真空减压法将菌接种到薄片外植体上), 取出薄片后置于 MST⁹ 固体培养基上黑暗培养 3 d。

共培养 3 d 的外植体用无菌水清洗 3 次, 参照文献 [7] 方法进行组织化学染色, 然后压片、镜检观察 (图 1), 计算 GUS 基因的瞬时表达率。

$$\text{瞬时表达率} = \frac{\text{有 GUS 基因瞬时表达的外植体数}}{\text{总外植体数}} \times 100\%$$

* 收稿日期: 2002-02-01

基金项目: 广东省科技厅科技攻关资助项目 (2KM03310N); 广东省自然科学基金资助项目 (701126)

作者简介: 黄霞 (1974 年生), 女, 博士, 讲师, 通讯联系人; 黄学林; E-mail: ls17@zsu.edu.cn

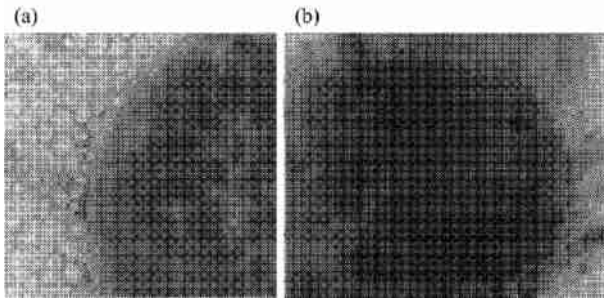


图 1 GUS 基因在香蕉薄片中的瞬时表达

Fig. 1 The transient expression of GUS gene in the micro-cross section explant

(a) 对照; (b) 转化外植体 GUS 基因的瞬时表达

对于转化早期的一些影响因素, 设计了 9 组试验:

(1) 农杆菌感染香蕉薄片及其相互作用: 分别采用 LBA4404 和 EHA 105 介导转化。

(2) 外植体接种农杆菌方法: 处理 1 为对照 (即普通浸泡 30 min); 处理 2 采用抽拉注射器 (30 min 内 30 次) 产生负压的辅助方法 [8]; 处理 3 则为真空减压处理 10 min 后静置 20 min。

(3) 外植体前处理: ①对照 (即不经前处理); ②在 MST+0.2 mol/L 甘露醇液体培养基中, 120 r/min 培养 4 h; ③在 MST+0.2 mol/L 甘露醇固体培养基上培养 4 h; ④超声处理 20 s。

(4) 农杆菌再悬浮液稀释倍数: 分别稀释 1, 2, 5, 10, 20 倍。

(5) 共培养培养基 pH: pH 分别为 5.4, 5.8, 6.2, 7.0。

(6) 共培养时间: 分别共培养 2, 3, 4 d。

(7) 薄片外植体所处生理位置: 所取薄片外植体按与根部的距离由近到远, 编号为 1—6。

(8) 外植体预培养: ①对照 (即不经预培养); ②在 MST 固体培养基上培养 1 d; ③在 MST 固体培养基上培养 2 d。

(9) 脱菌抗生素: 分别采用氨基青霉素、先锋 V 和羧苄青霉素脱菌。

2 结果与讨论

2.1 农杆菌感染香蕉薄片及其相互作用

农杆菌的侵染能力与转化率有着直接的关系, 也是转化成败的主要因素, 不同农杆菌对植物的侵染能力也不同。

取分别与 LBA4404 和 EHA105 共培养 3 d 的薄片进行扫描电镜观察。结果显示大量农杆菌附着于薄片切口处, 其中 LBA4404 多联结成簇, 之间的

小纤丝相对较少 (图 2(a)); EHA105 则多通过大量的小纤丝联系成片 (图 2(c))。它们均可产生小纤丝固定于细胞壁上 (图 2(b) 和 (d))。有文献报道^[9], 农杆菌附着到植物细胞感受器后, 通过相互作用, 细菌形成小纤丝将其“固定”在植物细胞壁上, 小纤丝还可将其它农杆菌聚集起来附着于细胞表面, 以利于 T-DNA 转移。由本实验结果可知, 农杆菌转化香蕉薄片的第一步已实现了。

而通过 GUS 基因瞬时表达比较, 我们又发现 LBA4404 侵染香蕉薄片外植体, 其瞬时表达率为 0; 而 EHA105 侵染香蕉薄片外植体, 其瞬时表达率为 $(5.42 \pm 0.38) \%$ 。

由上可知, 在本转化体系中 EHA105 为合适的菌株。它是 Hood 等 1993 年宣布获得的具强致病性的菌株, 侵染能力比较强, 应用于多种植物的转化中, 效果优于其它菌株^[7]。扫描电镜观察发现 LBA4404 也可以附着在薄片切口处的细胞上, GUS 基因的瞬时表达之所以为 0 可能是因为 T-DNA 的转移受阻, 这尚需进一步实验提供证据。

2.2 外植体接种农杆菌方法对瞬时表达的影响

农杆菌介导植物转化时, 必须将菌液与植物材料进行一定时间的混合培养, 使农杆菌接种到植物细胞表面, 这一过程对转化频率的影响较大, 发现在此过程进行负压处理大大提高了瞬时表达率 (图 3)。其中, 抽拉注射器产生负压的方法使瞬时表达率比对照提高了 1.2 倍; 而真空减压法则使瞬时表达率比对照提高了 2.2 倍。刘志学等^[8]使用抽拉注射器产生负压的方法, 在水稻愈伤组织转化中也得到了满意的结果。他们认为负压处理在转化材料上形成许多细小的伤口, 并导致组织液大量外流, 这种“伤流液”中可能含有较多的酚类物质, 大大刺激农杆菌的转化活力, 此外, 大量细小伤口的存在为农杆菌的感染提供了更多的机会。

2.3 外植体前处理对瞬时表达的影响

DNA 直接导入技术多对外植体进行前处理 (常为高渗处理) 以提高转化率^[7]。为了进一步提高农杆菌感染率, 作者也对外植体进行了前处理。由图 4 可知, 外植体在 MST+0.2 mol/L 甘露醇固体培养基上高渗处理 4 h 后再接种农杆菌, 其瞬时表达率最高, 为 41.67%。高渗处理使细胞失水形成内高外低的渗透压梯度, 有利于植物细胞在极短时间内吸收其周围的农杆菌, 其与负压处理结合可使农杆菌接触较深层次的植物细胞, 对转化有利。

2.4 农杆菌再悬浮液稀释倍数对瞬时表达的影响

从图 5 可看出, 在 1~5 倍范围内, 随着菌液稀释倍数的增加, 瞬时表达率也升高; 但稀释超过

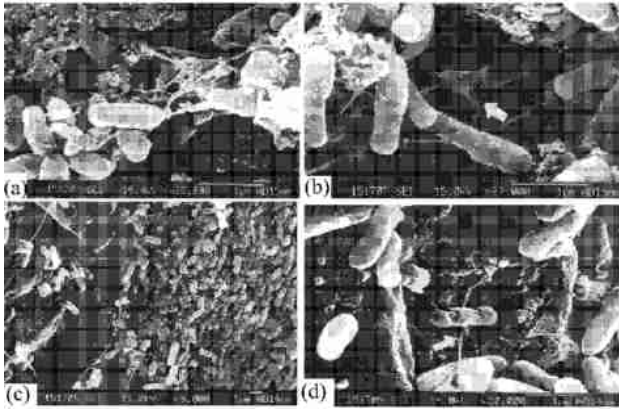


图 2 农杆菌与香蕉薄片相互作用的扫描电镜观察

Fig. 2 Scanning electron microscopic observation of the interaction between *Agrobacterium tumefaciens* and the micro-cross section explants

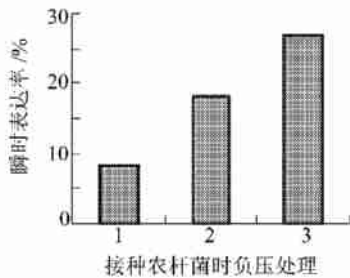


图 3 外植体接种农杆菌方法对瞬时表达的影响

Fig. 3 Influence of the methods of *Agrobacterium* inoculation on transient expression

- 1 对照 (即普通浸泡 30 min);
- 2 采用抽拉注射器 (30 min 内 30 次) 产生负压的辅助方法;
- 3 真空减压处理 10 min 后静置 20 min

5 倍后, 瞬时表达率开始下降。原因可能是: 植物细胞上的农杆菌结合位点是有限的, 农杆菌密度过大时, 由于竞争激烈, 反而不利于菌体与植物细胞结合, 而且菌液浓度太高, 对植物材料的毒害也较大, 因此瞬时表达率也低; 但菌液浓度过低, 又会因农杆菌数目不足而使瞬时表达率降低。

2.5 共培养培养基 pH 对瞬时表达的影响

共培养培养基 pH 对瞬时表达率的影响在不同的转化试验中有不同的结果。有人认为^[10] 较低 pH 对转化有利, 原因是偏酸性的培养条件有利于农杆菌 vir 区基因的表达。也有人认为^[11] pH 7.0 对转化有利, 原因是 pH 7.0 有利于农杆菌生长, 可缩短共培养时间, 减轻农杆菌对植物材料的毒害, 从而有利于转化材料生长。本实验发现, pH 7.0 时, 瞬时表达率较低, 可能是由于 EHA105 本来就生长

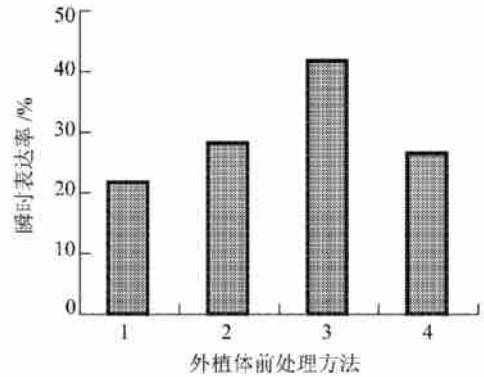


图 4 外植体前处理对瞬时表达的影响

Fig. 4 Influence of the pre-treatment of explants on transient expression

- 1 对照 (即不经前处理);
- 2 在 MST+0.2 mol/L 甘露醇液体培养基中, 120 r/min 培养 4 h;
- 3 在 MST+0.2 mol/L 甘露醇固体培养基中培养 4 h;
- 4 超声处理 20 s

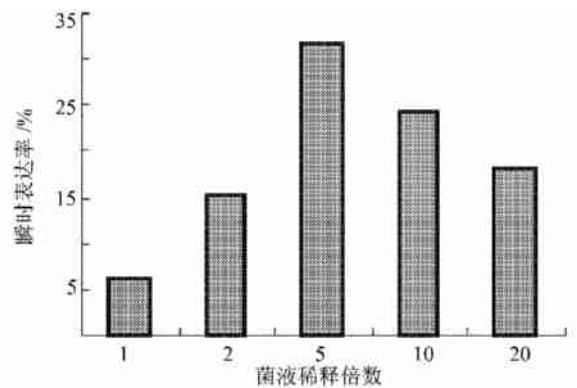


图 5 农杆菌再悬浮液稀释倍数对瞬时表达的影响

Fig. 5 Influence of the dilution multiple of *Agrobacterium* on transient expression

快, 较高 pH 只会使其过量繁殖, 而且 pH 7.0 不适合植物生长。本系统最合适的 pH 为 5.4 (图 6)。

2.6 共培养时间对瞬时表达的影响

农杆菌接种到外植体上后不能立即转化, 只有在创伤部位生存了 16 h 后才把 T-DNA 转移到植物细胞内^[7]。因此共培养时间必须长于 16 h。但共培养时间太长, 农杆菌过度生长, 就会抑制植物细胞的正常生长, 甚至使其死亡。由图 7 可知, 共培养 3, 4 d 时瞬时表达率较高, 而共培养 4 d 虽比共培养 3 d 时的瞬时表达率略高 ($P > 0.05$), 但共培养 4 d 时, 农杆菌覆盖整个香蕉薄片, 难以除去, 不利于植物材料随后的生长。因此该转化试验的共培养时间以 3 d 为宜。

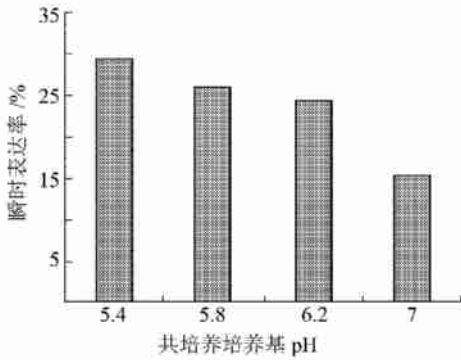


图 6 共培养培养基 pH 对瞬时表达的影响

Fig 6 Influence of the pH of co-culture medium on transient expression

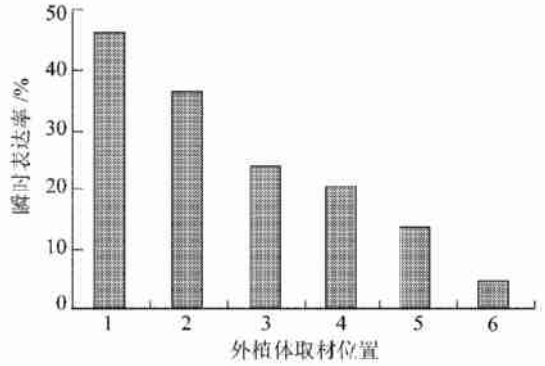


图 8 取自假茎不同部位的

薄片外植体对瞬时表达的影响

Fig 8 Influence of the micro-cross section explants cut from different position of plantlets in transient expression 位置 1—6: 数字越大表示外植体与根部的距离越远

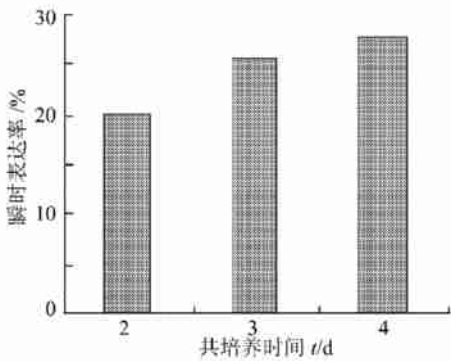


图 7 共培养时间对瞬时表达的影响

Fig 7 Influence of the time of co-culture on transient expression

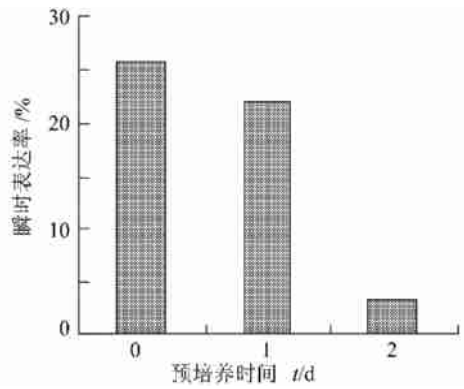


图 9 外植体预培养对瞬时表达的影响

Fig 9 Influence of the pre-culture of explants on transient expression

2.7 薄片外植体所处生理位置对瞬时表达的影响

外植体的生理状态是转化试验能否成功的关键。由图 8 可知,受体材料越靠近根部,其瞬时表达率越高,而在另一实验中,发现 2—4 位置的薄片外植体的出芽率较高(具体数据略)。农杆菌介导转化时,既需高瞬时表达率也需高再生频率,因此选用 2—4 位置的薄片作转化受体较合适。

2.8 外植体预培养对瞬时表达的影响

一般认为外植体在转化前进行预培养,不但促进细胞分裂,而且便于伤口的酚类物质释放与积累,利于 T-DNA 转移并整合到植物细胞基因组,因而提高外源基因的瞬时表达和转化率。但也有相反的结果^[7]。本试验就发现外植体预培养降低瞬时表达率(如图 9 所示)。经预培养 2 d 后的薄片外植体在与农杆菌共培养时,周围生长的菌体很少,可能是预培养过程中薄片外植体积累了一些有害物质,抑制农杆菌生长,从而影响转化。

2.9 脱菌抗生素对转化的影响

共培养后,外植体表面及浅层组织中共生有大量的农杆菌,为使外植体更好地生长发育,必须进行脱菌培养。常用的脱菌抗生素有羧苄青霉素、头孢霉素和氨苄青霉素等。这些抗生素不仅对农杆菌有杀伤或抑菌作用,而且对植物细胞同样有一定的生物效应,对不同植物的不同外植体产生的影响不同^[7]。因此,选择合适的脱菌抗生素才有可能获得转基因再生植株。由表 1 可知,1 000 mg/L 先锋 V(头孢霉素类)可完全抑制细菌生长且薄片外植体形成的芽也较多,为本实验体系理想的脱菌抗生素。

通过以上试验,瞬时表达率最高可达 41.67%。但瞬时表达和稳定表达之间还有一定的距离,如何获得稳定表达的转基因香蕉植株将是下一步的工作重点。进一步的转化工作正在进行中。

表 1 不同抗生素的脱菌效果及其对薄片外植体植株再生的影响

Tab 1 Influence of the antibiotics on removing bacterium and shoot regeneration

抗生素类型	$c(\text{氨基青霉素})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$		$c(\text{先锋 V})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$		$c(\text{羧苄青霉素})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	
	500	1 000	500	1 000	500	1 000
杀菌效果	+	+	+	-	+	-
出芽频率/%	0	0	0	67.50	0	47.50
出芽指数	0	0	0	3.11	0	2.32

“+”: 农杆菌仍在增殖;“-”: 农杆菌已被除掉。

参考文献:

- [1] ROUT G R, SAMANTARAY S, DAS P. Biotechnology of the banana a review of recent progress[J]. Plant Biol, 2000 (2): 512-524.
- [2] SAGI L, PANIS B, REMY S, et al. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment[J]. Bio/Technology, 1995, 13: 481-485.
- [3] BECKER D K, DUGDALE B, SMITH M K, et al. Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv 'Grand Nain' via microprojectile bombardment[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 229-234.
- [4] INIBAP. Networking of banana and plantain; INIBAP annual report[J]. International Network for the Improvement of Banana and Plantain. Montpellier, France, 1998, 13-15.
- [5] 王鸿鹤, 黄霞, 黄学林, 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.
- [6] 黄霞, 黄学林, 王鸿鹤, 等. 果用香蕉薄片外植体植株再生的研究[J]. 园艺学报, 2001, 28(1): 19-24.
- [7] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [8] 刘志学, 马向前, 何艺园, 等. 农杆菌介导遗传转化中辅助处理方法的改良[J]. 复旦学报(自然科学版), 1999, 38(5): 601-604.
- [9] 李宝健, 欧阳学智, 许耀. 应用农杆菌 *Ti* 质粒系统将外源基因转入籼稻细胞研究[J]. 中国科学 B 辑, 1990 (2): 144-149.
- [10] 刘志学, 张旭, 徐亚南, 等. 用 LBA4404/pCAMBIA 系列转化水稻的最佳条件[J]. 复旦学报(自然科学版), 1999, 38(4): 439-443.
- [11] 张克忠, 鲍雪珍, 白永延. 苏云金杆菌内毒素蛋白基因转入葡萄胚性愈伤组织细胞及转基因植株再生的研究[J]. 实验生物学报, 1997, 30(3): 304-309.

Factors Affecting the Early Phase of *Agrobacterium* - mediated Genetic Transformation of Banana

HUANG Xia, HUANG Xue lin, LI Zhe, CHEN Yun feng, LI Xiao ju

(School of Life Sciences, Sun Yat sen(Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Micro cross sections of '641' banana (*Musa* AAA Cavendish subgroup cv. 64-1) were used as the receptors for transformation by *Agrobacterium tumefaciens* containing pCAMBIA2301. By detecting the transient expression of GUS gene, the factors affecting the early phase of *Agrobacterium* mediated transformation of banana (*Musa* spp.) were investigated. The results indicated that in comparison with LBA4404, EHA 105 was the more suitable strain for the transformation. The transient expression rate of GUS gene was increased 5 folds when the explant was pretreated with 0.2 mol/L mannitol and the *Agrobacterium* inoculation was disposed by negative pressure produced by vacuum pump. Also, 3 day-coculture and 5 times dilution of the bacterium suspension were more suitable for the transformation. In addition, the explant, micro cross section, obtained from closer to the root showed higher transient expression rate. But the preculture of explant was unfavourable for the banana transformation.

Key words: banana (*Musa* spp.); *Agrobacterium tumefaciens*; transformation; transient expression