

# 大白菜再生体系和转基因影响因素的研究

贺玺强,徐恒戡

(山东理工大学,山东 淄博 255049)

**摘要:**为培育抗旱白菜品种,以大白菜品种二包头为试验材料,以大白菜的带柄子叶为转化受体,研究农杆菌介导的大白菜抗旱遗传转化体系的建立。结果表明:种子消毒的方法为先用 75% 的酒精浸泡 30 s,再用 0.1% 氯化汞浸泡 10 min,出芽率较高且无菌;最佳分化培养基为 MS+6-BA 2.5 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.6 mg·L<sup>-1</sup>,不定芽分化率为 30%;最佳生根培养基为 MS+NAA 0.4 mg·L<sup>-1</sup>,根多且粗壮。大白菜的遗传转化使用农杆菌介导的叶盘转化法,将含有抗旱基因 T59 的 T-DNA 转入到外植体中去,通过 Hyg 筛选,获得了抗性苗。转基因试验研究了多种因素对农杆菌转化的影响,其中最佳的农杆菌稀释倍数为 8 倍和 16 倍,最佳的共培养时间为 2 d,最佳的脱菌抗生素组合为 400 mg·L<sup>-1</sup> Cb+200 mg·L<sup>-1</sup> Cef。

**关键词:**大白菜;离体再生;农杆菌;转基因;抗旱

**中图分类号:**S634.303

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2013)09-0009-05

大白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* Rupr.)是十字花科芸薹属芸薹种白菜亚种的一个变种,含有蛋白质、脂肪、多种维生素和钙、磷等矿物质以及大量粗纤维,栽培面积和消费量在我国居各类蔬菜之首。

基因工程、细胞工程等现代生物技术的发展极大地促进了生命科学的发展,这些技术在植物上也有广泛的应用<sup>[1-3]</sup>。尽管芸薹属作物有较好的组织培养基础<sup>[4]</sup>,甘蓝、甘蓝型油菜等的遗传转化获得了很大成功<sup>[5-8]</sup>,但由于大白菜组织培养难度较大,再生体系较难建立<sup>[9]</sup>,一定程度上制约了转基因技术在大白菜育种上的应用<sup>[10]</sup>。

我国是一个缺水严重的国家,而种植大白菜需水量大的特点对于急需节约水资源的现状来讲并不是一个好现象,故可以通过转基因的方法进行白菜的抗旱研究。该研究的目的在于利用农杆菌将含有抗旱基因 T59 的 T-DNA 转入白菜中,以期培育出白菜抗旱新品种。根癌农杆菌介导的转化法是植物转基因常用的方法<sup>[11]</sup>,该研究得到了转入 T59 基因的抗性苗,关于大白菜转基因因素的研究对于农杆菌转化大白菜的研究也具有一

定意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 大白菜的再生

1.1.1 种子消毒 选籽粒饱满、大小一致的种子,先后用 75% 的酒精和 0.1% 的氯化汞消毒。为了检测不同消毒时间对白菜种子的影响,根据消毒时间将试验分为 20 组处理。75% 的酒精消毒时间分别为 20、30、40、50、60 s,0.1% 的氯化汞消毒时间分别为 6、8、10、12 min。

无菌水洗涤 4~5 次,接种到种子发芽培养基上,28~30℃ 条件下暗培养,出芽后置于光照培养箱内,光周期:光照 16 h,黑暗 8 h。4~5 d 后获得大白菜无菌苗,并统计发芽率和污染率。

1.1.2 外植体离体再生培养 选用开始长第一片叶的幼苗,切取的外植体包含子叶和 1~2 mm 的子叶柄,将外植体插入分化培养基培养,每个培养瓶中放 6 个外植体,温室培养。

为了检测 NAA(α-萘乙酸)和 6-BA(6-苄基腺嘌呤)的比例对外植体再生的影响,将试验分为 9 组处理。NAA 的浓度分别为 0.2、0.4、0.6 mg·L<sup>-1</sup>,6-BA 的浓度分别为 2.0、2.5、3.0 mg·L<sup>-1</sup>。30 d 后计算诱伤率和不定芽的分化率。

1.1.3 不定芽生根培养 待不定芽长到 1~3 cm 时,切下不定芽并转移到生根培养基进行生根培养。当不定芽长成根系发达的再生植株时进行再生植株的移栽,再生植株移入花盆后置于温室培养。

为了选择合适的生根培养基而将试验分为 6 组

收稿日期:2013-04-17

第一作者简介:贺玺强(1988-),男,山东省日照市人,硕士,从事植物分子生物学研究。E-mail:813088248@qq.com。

通讯作者:徐恒戡(1966-),男,山东省莒南县人,博士,副教授,从事植物生物学及农业生物技术教学与研究。E-mail:xhj310@163.com。

处理。其中3组处理在生根培养基中添加 IAA(3-吲哚乙酸),浓度分别为 0.1、0.4、0.8  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,另外3组中添加 NAA,浓度分别为 0.1、0.4、0.8  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。25 d 后观察根的发生情况并计算出根率。

## 1.2 根癌农杆菌介导的大白菜的转化

1.2.1 农杆菌培养 取 $-40^{\circ}\text{C}$ 保存的含有抗旱基因的农杆菌于 LB 培养液中, $28^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜。以 1%~2%的比例接到新的含抗生素的 LB 培养液中,相同条件下培养到对数生长期( $\text{OD}_{600}=0.5\sim 0.6$ )。 $6\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃上清液,收集菌体,用 MS 培养液重新悬浮沉淀,备用。

1.2.2 外植体预培养 首先培养无菌苗,无菌苗生长 5 d 之后切取带柄子叶作为外植体,将外植体插入预培养基进行预培养 2 d。

1.2.3 农杆菌侵染与共培养 将在预培养基上培养后的外植体浸入制备好的农杆菌菌液中侵染 5 min,然后取出外植体,用滤纸吸干多余菌液,将外植体插入共培养基培养。

为了检测农杆菌浓度对转化频率的影响而将 MS 培养液重新悬浮后的菌液稀释,分别进行侵染试验,稀释倍数分别为 1、2、4、8、16、32、64、128、256、512 倍。

为了检测共培养时间对转化频率的影响而将共培养时间分为 1、2、3 d。

1.2.4 外植体脱菌 共培养之后的外植体用无菌水冲洗,然后转入含有抗生素的培养基中脱菌培养。为了检测 Cb(羧苄青霉素)和 Cef(头孢霉素)用量对脱菌效果的影响而将试验分为 4 组处理。Cb 浓度为 200、400  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,Cef 浓度分别为 0、200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.2.5 Hyg 抗性筛选 取出外植体,用无菌水冲洗,然后转入含有 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Hyg(潮霉素)的培养基上进行抗性筛选。

## 2 结果与分析

### 2.1 消毒时间对种子发芽的影响

由图 1 可以看出,大白菜种子的发芽率和污染率与 75%酒精和 0.1%  $\text{HgCl}_2$  的消毒时间有关。0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒时间为 6 min 时,发芽率较高,为 42%~70%。但是种子污染较严重,污染率 77%~100%。0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒时间为 12 min 时,发芽率较低,为 20%~30%。通过比较可以得出,0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒 10 min 时发芽率较高,为 22%~65%,且种子无污染,其中用 75%酒精消毒 30 s,0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒 10 min 时发芽率最高,为 65%。

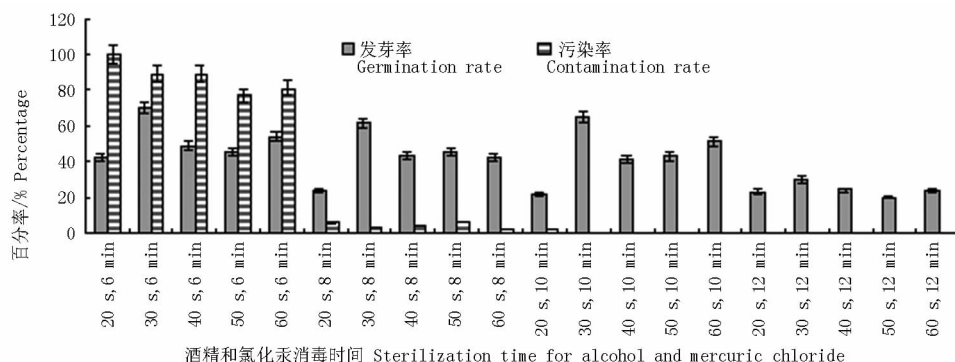


图 1 消毒剂对大白菜种子消毒的影响

Fig. 1 Effect of disinfectants on Chinese cabbage seeds

### 2.2 大白菜无菌苗生长过程

图 2 为大白菜无菌苗的生长过程,分别记录了生长 1~5 d 的白菜无菌苗幼苗,从中可以看出无菌苗的生长情况和变化情况,1 d 后少数种子开始萌发,刚萌发的种子的子叶为黄色,转入光照培养箱培养。2 d 后多数种子萌发,子叶逐渐变为绿色。生长 3 d 后部分子叶展开,不过子叶较小。生长 4~5 d 后的幼苗子叶完全展开,子叶较

大,可以用于再生试验。

### 2.3 激素对外植体再生频率的影响

将大白菜的带柄子叶作为外植体分别接种在以 MS 为基础,附加不同浓度 6-BA 和 NAA 的培养基中培养,7 d 左右开始长出愈伤组织,随后不定芽开始出现,经过 28 d 的培养和观察,得到图 3 的结果。

从图 3 可以看出,6-BA 浓度和 NAA 浓度影

响外植体的诱伤率和不定芽分化率。诱伤率随 6-BA 浓度增大而增大,6-BA 浓度为  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时诱伤率较高,为  $48.33\% \sim 51.67\%$ 。NAA 的浓度对诱伤率影响并不明显;6-BA 浓度高时,不定芽分化率低。NAA 浓度高时,不定芽分化率较高。总体来看,当 6-BA 浓度为  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,NAA 浓度为  $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,外植体的不定芽分化率最高,为  $30\%$ ,此时诱伤率也较高,为  $45\%$ 。

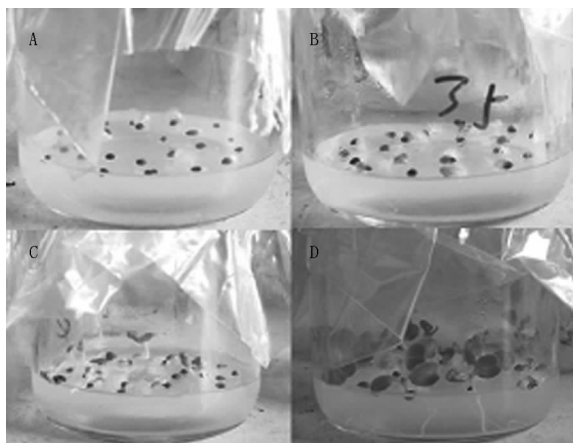


图 2 大白菜无菌苗的生长过程  
A. 1 d; B. 2 d; C. 3 d; D. 5 d

Fig. 2 The growing process of Chinese cabbage sterile plantlet

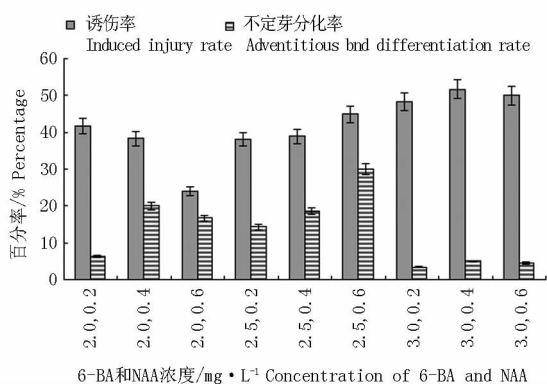


图 3 6-BA 和 NAA 对大白菜再生的影响

Fig. 3 Effect of 6-BA and NAA on regeneration of Chinese cabbage

## 2.4 外植体生长过程

子叶外植体接种后放入光照培养箱培养,起初几天外植体不断膨大,生长 7 d 左右切口处开始出现白色的愈伤组织,随培养时间增长愈伤组织逐渐变大,颜色为淡黄色或黄色。生长 15 d 左右愈伤组织上产生不定芽,同时由于 NAA 的作用愈伤组织也可能产生少量的不定根。生长 35 d

左右的不定芽可以进行生根试验。

图 4 记录了大白菜子叶外植体的生长过程,A~D 分别为刚接种的外植体,产生愈伤组织的外植体,再生的不定芽和再生植株。

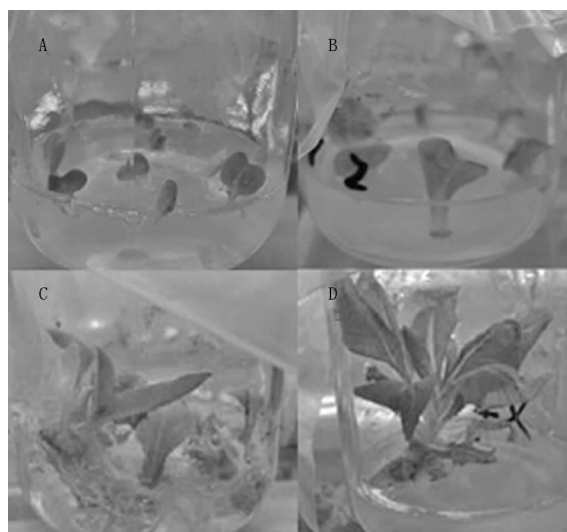


图 4 大白菜子叶外植体的再生过程  
A. 1 d; B. 10 d; C. 25 d; D. 35 d

Fig. 4 The regeneration process of Chinese cabbage explants

## 2.5 激素对不定芽生根的影响

由图 5 可以看出,在含有 IAA 的生根培养基中不定芽的诱根率随 IAA 浓度升高呈降低趋势;在含有 NAA 的生根培养基中不定芽的诱根率随 NAA 浓度升高呈先升高后降低的趋势。总体来看,含有 NAA 的培养基中生长的不定芽生根率较高,其中 NAA 为  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时诱根率最高,可达到  $78.9\%$ 。

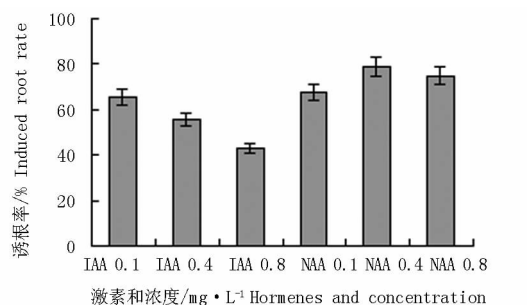


图 5 IAA 及 NAA 对大白菜生根率的影响

Fig. 5 Effect of IAA and NAA on rooting rate of Chinese cabbage

## 2.6 农杆菌菌液浓度对转化频率的影响

共培养之后用抗生素对外植体进行脱菌,以免农杆菌生长过量而造成外植体褐化死亡。脱菌

后大约7 d对外植体用 Hyg 进行抗性筛选,以杀死未转入外源基因的愈伤细胞。试验过程中,过高浓度和过低浓度的农杆菌液侵染的外植体都会在脱菌后大约 14 d 死亡。用过高浓度的农杆菌液侵染的外植体,因农杆菌生长过于旺盛,抗生素无法抑制农杆菌生长,而使外植体受农杆菌毒害作用而死亡;用过低浓度的农杆菌液侵染的外植体,可能因外源基因没有进入外植体的基因组而使外植体在抗性筛选中死亡。

从图 6 可以看出,农杆菌液的浓度对外植体的转化频率有很大影响。菌液浓度过大或过小时外植体都不会分化愈伤组织和不定芽。用稀释 8、16、32、64 倍的菌液侵染外植体后能产生愈伤组织和不定芽,其中用稀释 8 倍和 16 倍的菌液侵染后外植体的诱伤率和不定芽分化率高,诱伤率分别为 17.2% 和 18.7%,不定芽分化率均为 4.7%。稀释 32 倍和 64 倍的菌液侵染外植体后虽然诱伤率和不定芽分化率较低,但是可以产生愈伤组织和不定芽。

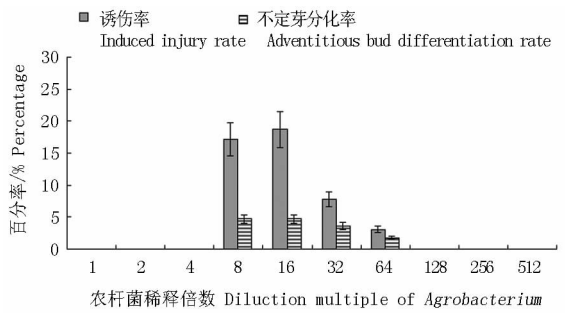


图 6 农杆菌浓度对转化率的影响  
Fig. 6 Effect of *Agrobacterium* concentration on conversion rate

## 2.7 共培养时间对转化频率的影响

共培养时间对于外源基因的转化很关键。由图 7 可以看出,共培养时间对于外源基因的转化有很大影响。共培养 2 d 时转化频率最高,诱伤率为 18.9%,不定芽分化率为 5.1%。共培养 1 d 没有愈伤组织和不定芽产生,共培养 3 d 时诱伤率和不定芽分化率较低,诱伤率为 4.25%,不定芽分化率为 1.35%。

该试验中,共培养 1 d 时,外源基因很难整合到植物基因组中,外植体可能在抗性筛选时死亡。共培养 3 d 时,农杆菌过度繁殖,抗生素无法抑制住农杆菌的生长,大量外植体因农杆菌的毒害作用而逐渐死亡。

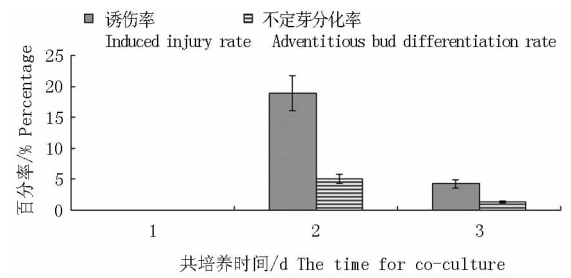


图 7 共培养时间对转化率的影响  
Fig. 7 Effect of common cultivation time on conversion rate

## 2.8 抗生素种类及浓度对脱菌效果的影响

共培养之后需用抗生素对外植体进行脱菌,以免农杆菌生长过量而造成外植体褐化死亡。抗生素用量过少无法抑制农杆菌的生长,抗生素用量过多则会加剧对外植体的伤害。

图 8 为不同抗生素及浓度对外植体脱菌的效果和对诱伤率和不定芽分化率的影响,可以看出抗生素用量对脱菌效果有很大影响,200 mg·L<sup>-1</sup> 的 Cb 和 200 mg·L<sup>-1</sup> Cb+200 mg·L<sup>-1</sup> Cef 脱菌时效果不好,因农杆菌过度生长而造成外植体无法产生愈伤组织和不定芽或外植体大量死亡。400 mg·L<sup>-1</sup> 的 Cb 脱菌时可以控制住部分外植体上农杆菌的生长,部分外植体会产生愈伤组织和不定芽。400 mg·L<sup>-1</sup> Cb+200 mg·L<sup>-1</sup> Cef 脱菌效果比较好,有 82% 的外植体上的农杆菌不会过度生长,诱伤率和不定芽分化率分别达到 17.5% 和 4.2%。当然抗生素的脱菌效果也受到农杆菌液浓度的影响,农杆菌浓度过大时即使高浓度的抗生素也无法控制农杆菌生长。

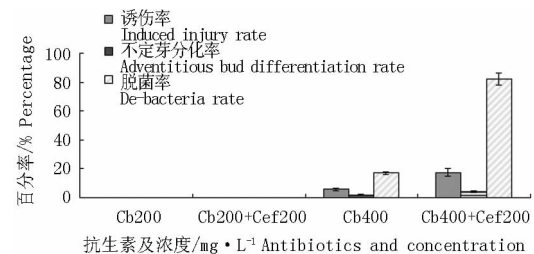


图 8 抗生素的脱菌效果  
Fig. 8 The de-bacteria effect of antibiotic

## 2.9 大白菜抗性苗的获得

农杆菌侵染外植体后农杆菌与外植体共同培养 2 d,然后用抗生素对外植体脱菌,控制农杆菌的生长,7 d 后利用 Hyg 对外植体的抗性筛选,抗性筛选后的外植体产生愈伤组织和不定芽较慢,

抗性筛选 10 d 后产生愈伤组织,再过 7 d 左右逐渐产生不定芽。

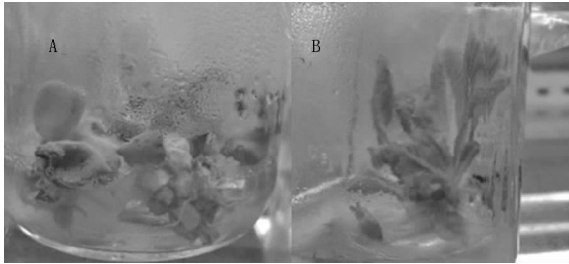


图 9 大白菜抗性苗

A. 抗性不定芽;B. 抗性苗

Fig. 9 The resistant seedlings of Chinese cabbage

A. Resistant adventitious bud;B. Resistant seedlings

### 3 结论与讨论

在植物组织培养中,污染问题能否解决关系到试验的成败。白菜种子在外界环境中产生,带有大量的外生菌和内生菌,很难消毒。资料显示,种子消毒多采用 75% 酒精和 0.1%  $\text{HgCl}_2$ ,其中 75% 酒精做短暂灭菌,一般作用时间在 30~60 s,0.1%  $\text{HgCl}_2$  作用时间则一般在 5~15 min 不等。消毒剂对组织细胞有杀伤作用,种子容易受伤害,所以该试验设置了不同的消毒时间组合,其中 75% 酒精消毒 30 s,0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒 10 min 发芽率最高且污染率极低。

基因型和激素浓度都是影响大白菜组织培养再生频率的重要因素<sup>[12-15]</sup>。不同基因型的大白菜在相同浓度激素的培养基中的再生频率一般不同,同一基因型的大白菜在不同浓度激素的培养基中的再生频率一般不同。资料显示,6-BA 浓度为 1~2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,NAA 浓度为 0.1~0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时大白菜的再生频率高,该试验中 6-BA 浓度为 2.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,NAA 浓度为 0.6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时大白菜的再生频率最高。

侵染时间对转化频率的影响很大,余小林等研究结果表明侵染时间在 3 min 内转化效果极差<sup>[16]</sup>,共培养时无农杆菌的生长迹象,在选择培养基上几乎没有什么变化。侵染时间为 5~10 min 时,分化的子叶数明显增加,获得了一定数量的抗性苗,侵染时间为 10~15 min 时,由于菌液的毒害作用转化率反而降低,难以获得抗性苗。该试验中,共培养 1 d 时,外源基因很难整合到植

物基因组中,外植体可能在抗性筛选时死亡。共培养 3 d 时,农杆菌过度繁殖,抗生素无法抑制农杆菌的生长,大量外植体因农杆菌的毒害作用而逐渐死亡。

#### 参考文献:

- [1] 张强,黄鹂,曹家树.白菜多聚半乳糖醛酶基因 *BcMF6* 的克隆、序列分析及其表达[J].园艺学报,2007,34(1):11-12.
- [2] 蒋明,曹家树.白菜花药特异基因 *BcACT* 的克隆与表达分析[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2009,35(6):591-598.
- [3] 蒋明,曹家树.白菜花药特异基因 *BcPRO* 的克隆及表达分析[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2008,34(1):1-6.
- [4] 邓智年,魏源文,吕维莉,等. MAR 序列介导野苣荬凝集素基因在白菜中的表达[J].园艺学报,2007,34(2):381-386.
- [5] Metz T D,Roush R T,Tang J D,et al. Transgenic broccoli expressing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein: implication for pest resistance management strategies[J]. Molecular Breeding,1995,1:309-317.
- [6] Christey M C,Sinclair B K,Braun R H,et al. Regeneration of transgenic vegetables *Brassica* (*Brassica oleracea* and *B. campestris*) via Ri-mediated transformation[J]. Plant Cell Reports,1997,16(9):587-593.
- [7] Prasad K V,Sharmila P,Saradhi P P. Enhanced tolerance of transgenic *Brassica juncea* to choline confirms successful expression of the bacterial cod A gene[J]. Plant Science,2000,159(2):233-242.
- [8] 沈革志,王新其,朱玉英,等. TA29 *barnase* 基因转化甘蓝产生雄性不育植株[J].植物生理学报,2001,27(1):43-48.
- [9] 谢建坤,崔海瑞,舒庆尧,等.白菜抗虫基因转化受体体系的建立[J].园艺学报,2001,28(2):175-176.
- [10] 许明,魏毓棠.白菜细胞核雄性不育基因向菜心品种早 49 的转育研究[J].沈阳农业大学学报,2006,37(2):165-168.
- [11] Pan C,Lv L T,Zhao D G. An in vitro flowering and fruiting system of transgenic tomato [J]. Molecular Plant Breeding,2010,8(4):818-821.
- [12] 夏广清. pH 和琼脂糖浓度对大白菜不定芽和胚状体诱导的影响[J].吉林农业大学学报,2007,29(6):660-663.
- [13] 余小林,叶执芝,曹家树,等.白菜高效再生系统的建立及其不定芽发生的组织学观察(简报)[J].试验生物学报,2004,37(4):151-156.
- [14] 陈敏敏,侯喜林.不结球白菜离体培养再生体系的优化[J].南京农业大学学报,2008,31(1):27-30.
- [15] 侯喜林,史永红.不结球白菜苏州青子叶离体分化[J].南京农业大学学报,2002,25(3):113-115.
- [16] 余小林,曹家树,许立奎,等.优化白菜类蔬菜遗传转化体系的研究[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2005,31(5):529-534.