

根癌农杆菌对巴戟天遗传转化的影响因素

贺红, 林小桦, 张桂芳, 徐鸿华

(广州中医药大学中药学院, 广东广州 510405)

摘要: 以巴戟天带节茎为材料, 研究了根癌农杆菌对巴戟天遗传转化的影响因素。结果表明: 外植体感染前先进行 2 d 预培养, 对转化有一定促进作用; 外植体与农杆菌共培养时间以 3 d 为宜; 乙酰丁香酮能提高转化效率, 抗性芽分化率可达 18.0%; 外植体与农杆菌共培养后延迟 4 d 选择, 抗性芽分化率有所提高; 硝酸银能抑制外植体表面农杆菌的生长, 提高 GUS 阳性芽的比例, 硝酸银浓度 2 mg/L 时, GUS 阳性芽比例最高(42.9%)。

关键词: 巴戟天; 农杆菌; 遗传转化

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)05-0411-03

Factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Morinda officinalis*

HE Hong, LIN Xiao-hua, ZHANG Gui-fang, XU Hong-hua

(College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

Abstract: The explants used for transformation were the nodular stem segments from *Morinda officinalis* How. The factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation were studied. The results were as follows: 2-day precultivation enhanced shoot regeneration. Adopted time of cocultivation was 3 d. With the presence of acetosyringone during cocultivation, the efficiency of transformation could be enhanced, and the regenerated frequency of resistant shoot rose as high as 18.0%. After the explants were cocultivated with *Agrobacterium*, 4-day delayed selection could stimulate shoot regeneration. AgNO₃ could inhibit the growth of strain EHA 101. AgNO₃ at a concentration of 2 mg/L gave the highest frequency of GUS-positive shoot(42.9%).

Key words: *Morinda officinalis*; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation

巴戟天(*Morinda officinalis* How)为茜草科藤本植物, 以肉质根入药, 具有补肾壮阳、强筋骨、祛风湿的功效(《中国药典》, 2000)。巴戟天为广东地道药材, 四大南药之一(徐鸿华, 2001)。目前影响巴戟天产量和品质的主要因素之一是病虫害的危害, 解决这一问题的根本途径是抗病虫新品种的选育。随着现代生物技术的发展, 采用转基因技术向植物定向转移有价值的目的基因成为可能, 目前在重要农作物及经济作物方面有重大突破(许智宏, 1998; 闫新甫, 2003), 但在药用植物方面的研究较少报道。本

试验以巴戟天带节茎为材料, 对于影响转化的一些因素作了系统的研究, 初步建立了一套根癌农杆菌介导的外源基因转入方法。

1 材料与方法

1.1 植物材料

巴戟天(*Morinda officinalis* How)来源于国家科技部巴戟天规范化种植(GAP)德庆基地。采取巴戟天植株的顶芽或侧芽, 消毒培养无菌苗, 当苗长

收稿日期: 2003-10-08 修订日期: 2003-12-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(30070924); 广东省自然科学基金项目(984117)。

作者简介: 贺红(1967-), 女, 江西永新人, 博士, 研究员, 从事中药资源学及中药生物技术的研究工作。

至一定大小时,切取约 1 cm 长的带节茎,用作转化外植体。

1.2 离体再生培养

在 MT+BA 1 mg/L 培养基上诱导出芽,待芽长到 2~3 cm 时,置于生根培养基 MT+NAA 0.2~0.5 mg/L 诱导生根(贺红等,2000)。

1.3 细菌菌株及培养

工程农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens* strain)EHA 101 的 Ti 质粒上插入了 GUS、NPT II 基因。农杆菌划线培养在含有 50 mg/L 卡那霉素的 YEP 培养基上,28 °C 条件下黑暗培养,待长出菌落后,挑取单菌落接于 YEP 液体培养基中,28 °C 条件下振荡 20~25 h,达到菌对数生长期,OD=0.8~1 左右,培养物即可用于感染(贺红等,2002)。

1.4 外植体的转化

将巴戟天带节茎切段浸入到准备好的菌液中 20 min,随后转到无菌滤纸上以吸掉多余的菌液,将外植体接种于不含卡那霉素(Kanamycin, Km)及头孢霉素(Cefotaxime, Cx)的 MT 培养基上共培养后,再转到含 Km 50 mg/L 和 Cx 300 mg/L 的选择培养基上,诱导抗性芽的产生。乙酰丁香酮(acetosyringone, As)处理中,在用于感染的农杆菌悬液及共培养基中分别加入相应浓度的 As。硝酸银(AgNO₃)处理中,在选择培养基中添加不同浓度的 AgNO₃。

1.5 GUS 活性检测

采用组织化学染色法(傅荣昭等,1994)。

2 结果与分析

2.1 预培养对转化的影响

对于新鲜切割的外植体设置不同预处理:直接接种农杆菌,及感染前外植体先进行不同天数的预培养。实验发现,适当时间的预培养对转化有一定促进作用(表 1)。未预培养时,抗性芽分化率为 8.8%;预培养 2 d 时略高,为 11.5%;继续延长预培养期,抗性芽分化率不但没有增加,反而显著下降,预培养 6 d 时,仅为 3.3%。试验还观察到,未经预培养的处理,感染后,部分外植体变黄、死亡,而经预培养的外植体普遍生长较好。预培养可能便于伤口的酚类物质释放与累积,利于 T-DNA 转移并整合到植物细胞基因组。但是,过长的预培养使伤口愈合,不利于 T-DNA 转移进入细胞,致使农杆菌感染后,转化细胞数量减少,相应地,抗性芽分化率也下降。

表 1 预培养对农杆菌转化后抗性芽分化的影响
Table 1 Effect of precultivation on the regenerated frequencies of resistant shoots by *Agrobacterium*-mediated transformation

预培养天数 Days of pre-culture(d)	外植体数 No. of explants	产生芽的外植体数 No. of explants with shoots	抗性芽分化率 Frequency of resistant shoots (%)
0	148	13	8.8
2	165	19	11.5
4	156	10	6.4
6	150	5	3.3

表 2 共培养时间对抗性芽分化的影响
Table 2 Effect of cocultivation time on the regenerated frequency of resistant shoots

共培养天数(d) Days of cocultivation	GUS 基因瞬时 表达 GUS transient expression	抗性芽分化率(%) Frequency of resistant shoots
1	+	1.3
2	++	4.2
3	+++	10.6
4	+++	12.6

+表示 GUS 基因瞬时表达弱; ++表示 GUS 基因瞬时表达中等; +++表示 GUS 基因瞬时表达强。
“+”indicates a weak transient expression of GUS gene; “++”indicates a medium transient expression of GUS gene; “+++”indicates a strong transient expression of GUS gene.

2.2 共培养时间对转化的影响

外植体预培养 2 d 后,与农杆菌共培养不同时间(1~4 d)后,取部分外植体小块检测 GUS 基因的瞬时表达活性,其余转入选择培养基,1.5 个月后测定其抗性芽分化率(表 2)。结果表明:共培养 1 d 时,GUS 表达频率弱,抗性芽分化率最低,为 1.3%;共培养 2 d 时,GUS 表达频率中等,抗性芽分化率为 4.2%;共培养 3 d 与 4 d 时,GUS 表达频率及抗性芽分化率均表现较高,分别为 10.6%及 12.6%。试验还观察到,共培养 3 d 与 4 d 时,部分外植体变褐、死亡,尤以 4 d 时更为明显,可能由于农杆菌的作用时间长,对外植体本身有一定不良的影响。抗性芽的长势,以共培养 3 d 的外植体上长出的芽较好,叶色深绿,生长健壮。因此共培养时间以 3 d 为宜,既有较高的抗性芽分化率,又能获得较为健壮的芽。

2.3 乙酰丁香酮对转化的影响

外植体预培养后,设 4 种处理:对照(未感染)、感染但未加 As、感染并加入 10 mg/L As、感染并加入 20 mg/L As。在选择培养基上观察的结果表明:

对照无芽形成, 而经农杆菌感染的外植体, 1 个月后, 部分开始出芽, 无 As 时抗性芽分化率为 11.3%, 加入 10 mg/L As 及 20 mg/L As 的处理, 抗性芽分化率有一定的提高, 分别为 16.7% 及 18.0%。说明乙酰丁香酮可提高农杆菌的转化效率。

2.4 延迟选择对转化的影响

在以上试验的基础上, 采用几种不同的选择方案。一种是共培养后立即选择; 另一种是共培养后延迟选择, 即先在加有 Cx 的培养基上 2~6 d, 再转入加有 Km 及 Cx 培养基中选择培养。结果见表 3。对照(未感染)时, 抗性芽分化率为 0, 试验还观察到, 延迟选择 6 d 时, 对照在培养前期有少量芽产生, 随着培养时间的延长, 芽很快变白、死亡。感染处理中未延迟选择时(0 d), 抗性芽分化率为 17.5%, 随着延迟选择天数的增加, 抗性芽分化率也升高, 延迟选择 4d 时, 达到最高(24.7%), 继续延长选择时间, 并不能增加芽的形成频率, 反而大为下降。对获得的抗性芽进行 GUS 检测, 发现各处理差异不大。因此延迟选择时间以 4 d 为好。

表 3 延迟选择对转化效率的影响

Table 3 Effect of delayed selection on transformed efficiency

延迟选择天数 Days of delayed (d)	抗性芽分化率 Frequency of resistant shoots (%)		GUS 阳性芽频率 Frequency of GUS- positive of resistant shoots (%)
	对照 (未感染) Control	处理 Treatment	
0	0	17.5	21.4
2	0	18.8	20.0
4	0	24.7	22.5
6	0	9.4	18.8

2.5 硝酸银对转化的影响

硝酸银对转化效率的影响如表 4。选择培养基中添加不同浓度的硝酸银(0、1、2 mg/L), 抗性芽分化率分别为 11.0%、9.7%、10.7%, 可见硝酸银对抗性芽的发生没有明显的影响。试验还观察到, 未加硝酸银的对照, 选择培养时, 农杆菌仍少量生长, 而添加硝酸银的处理, 培养基保持透明, 未见农杆菌生长, 说明硝酸银能抑制外植体表面农杆菌的生长。对获得的抗性芽进行 GUS 检测, 发现添加硝酸银的处理, GUS 阳性芽的比例有所增高, 硝酸银浓度为 2 mg/L 时, GUS 阳性芽频率为 42.9%, 而对照为 22.7%。说明, 添加硝酸银能降低“假阳性”转化体的比例。

表 4 硝酸银对转化效率的影响

Table 4 Effect of AgNO₃ on transformed efficiency

AgNO ₃ (mg/L)	抗性芽分化率 Frequency of resistant shoots (%)	GUS 阳性芽频率 Frequency of GUS-positive (%)
0	11.0	22.7
1	9.7	36.8
2	10.7	42.9

3 讨 论

有关酚类化合物在根癌农杆菌转化中的研究较多, 已有的研究表明, 乙酰丁香酮等酚类物质可提高 Ti 质粒对多种植物的转化率, 如洋葱、金鱼草、拟南芥、颠茄及油菜等(Sheikoleslam 和 Weeks, 1987)。但乙酰丁香酮却不能使 Ach₅ 菌株对油菜和大豆产生致瘤毒性。可见, 对于不同的农杆菌菌株, 乙酰丁香酮的作用效果也有差异。同时也说明其它的一些因素也可能参与了农杆菌与寄主植物之间的相互作用。我们的结果表明乙酰丁香酮可在一定程度上提高根癌农杆菌对巴戟天的转化效率。

硝酸银对遗传转化的作用, 前人在用根癌农杆菌转化油菜(De Block 等, 1989)及桑树(钟名其等, 2002)中, 发现硝酸银能促进抗性芽分化、提高外源基因转化频率, 尤其能减少“假阳性”转化体的比例。我们的试验结果表明, 硝酸银对巴戟天抗性芽的发生没有明显影响, 但能抑制农杆菌的生长, 增加 GUS 阳性芽的比例, 从而提高转化效率。

参考文献:

- 中华人民共和国药典委员会. 2000. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 广州: 广东科技出版社, 61.
- 许智宏. 1998. 植物生物技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 319-364.
- 闫新甫. 2003. 转基因植物[M]. 北京: 科学出版社, 214-465.
- 徐鸿华. 2001. 南方药用植物栽培技术[M]. 广州: 南方日报出版社, 65-70.
- 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 1994. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 168-170.
- De Block M, De Brouwer D, Tenning P. 1989. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants[J]. *Plant Physiol*, **91**: 694-701.
- He H(贺 红), Xiao SE(肖省娥), Xian JC(冼建春), et al. 2000. In vitro culture and plant regeneration of *Morinda* (下转第 395 页 *Continue on page 395*)

- 张宏达文集编辑组. 1995. 张宏达文集[M]. 广州: 中山大学出版社, 676—714.
- 彭少麟, 陈万成. 2003. 广东珍稀濒危植物[M]. 北京: 科学出版社, 25.
- 傅立国. 1992. 中国植物红皮书(第一册)[M]. 北京: 科学出版社, 94—95.
- Chen HF(陈红锋), Yan YH(严岳鸿), Xing FW(邢福武), et al. 2003a. Survey on original vegetation in Shimentai Nature Reserve, Guangdong(广东石门台自然保护区原生植被的调查)[J]. *Journal of South China Agricultural University*(华南农业大学学报), 24(2): 22—26.
- Chen HF(陈红锋), Yan YH(严岳鸿), Xing FW(邢福武), et al. 2003b. A study on characteristics of *Ixonanthes chinensis*-*Castanopsis eyrei* community in Shimentai Nature Reserve, Guangdong(广东石门台自然保护区粘木—甜锥群落特征研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 23(6): 488—494.
- Du DL(杜道林), Liu YC(刘玉成), Shu J(苏杰). 1996. A preliminary study on the structure and dynamic of *Pinus kwangtungensis* population in Karst mountain of Maolan, China(茂兰喀斯特山地广东松种群结构和动态初步研究)[J]. *Acta Phytocologica Sinica*(植物生态学报), 20(2): 159—166.
- Gu YK(古炎坤), Xiao MY(肖绵韵), Lin SN(林书宁). 1993. The virgin forest structural characters and dynamic analysis for *Pinus kwangtungensis* and *Tsuga longibracteata* growing in subtropical mountain in Ruyang area, Guangdong Province(广东乳阳山地广东松、长苞铁杉原生林的结构特征和动态分析)[J]. *Journal of South China Agricultural University*(华南农业大学学报), 14(2): 84—90.
- Li ZK(李镇魁), Ye XB(叶向斌), Feng ZJ(冯志坚), et al. 1999. A preliminary report on the rare and endangered plant resource of Shimentai Nature Reserve, Yingde City, Guangdong Province(广东省英德市石门台自然保护区珍稀濒危植物资源调查初报)[J]. *Journal of South China Agricultural University*(华南农业大学学报), 20(4): 94—97.
- Miao SY(缪绅裕), Wang HL(王厚麟), Huang LS(黄林生), et al. 2002. Studies on plant flora of Huashuishan mountain, Yingde city, Guangdong(广东英德滑水山植物区系研究)[J]. *Journal of Guangzhou University(Natural Science Edition)*(广州大学学报, 自然科学版), 1(2): 27—32.
- Miao SY(缪绅裕), Dai KY(戴克元), Wang HL(王厚麟), 2003a. A study on vegetation forms of Huashuishan mountain, Yingde city, Guangdong(广东英德滑水山植被类型研究)[J]. *Journal of Guangzhou University(Natural Science Edition)*(广州大学学报, 自然科学版), 2(1): 20—26.
- Miao SY(缪绅裕), Wang HL(王厚麟). 2003b. A preliminary study on similarity of some reserves forest communities in north and northeast of Guangdong Province, China(粤北与粤东北部分自然保护区森林群落的相似性探讨)[J]. *Guihaia*(广西植物), 23(6): 481—487.
- Su ZY(苏志尧), Chen BG(陈北光), Wu DR(吴大荣). 2002. Vegetation types and community structure of Shimentai Nature Reserve, Yinde, Guangdong(广东英德石门台自然保护区的植被类型和群落结构)[J]. *Journal of South China Agricultural University*(华南农业大学学报), 23(1): 58—62.
- Wang XP(王献溥), Li XX(李信贤). 1989. The study of the phytocoenological features of *Pinus kwangtungensis* forest in Huanjiang County, Guangxi(广西环江县石灰岩山地广东松林群落学特点的研究)[J]. *Bulletin of Botanical Research*(植物研究), 9(3): 77—86.
- Wu DR(吴大荣), Zhu ZD(朱政德). 2003. Preliminary study on structure and spatial distribution pattern of *Phoebe bournei* in Luobaoyan Nature Reserve in Fujian Province(福建省罗卜岩自然保护区闽楠种群结构和空间分布格局初步研究)[J]. *Scientia Silvae Sinica*(林业科学), 39(1): 23—30.
- Wu ZY(吴征镒). 1991. The areal-types of Chinese genera of seed plants(中国种子植物属的分布区类型)[J]. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究), 增刊 IV: 1—139.
- Wu ZY(吴征镒), Zhou ZK(周浙昆), Li DZ(李德铎), et al. 2003. The areal-types of the world families of seed plants(世界种子植物科的分布区类型系统)[J]. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究), 25(3): 245—257.
- Xu XH(徐祥浩), Zhong ZC(钟章成), Wang LZ(王灵昭), et al. 1958. The plant community of Yingde Huashui Mountain, Guangdong Province(广东英德滑水山的植物群落)[J]. *Acta Phytocology Geobotany*(植物生态学与地植物学资料丛刊), (2): 1—59.

(上接第 413 页 Continue from page 413)

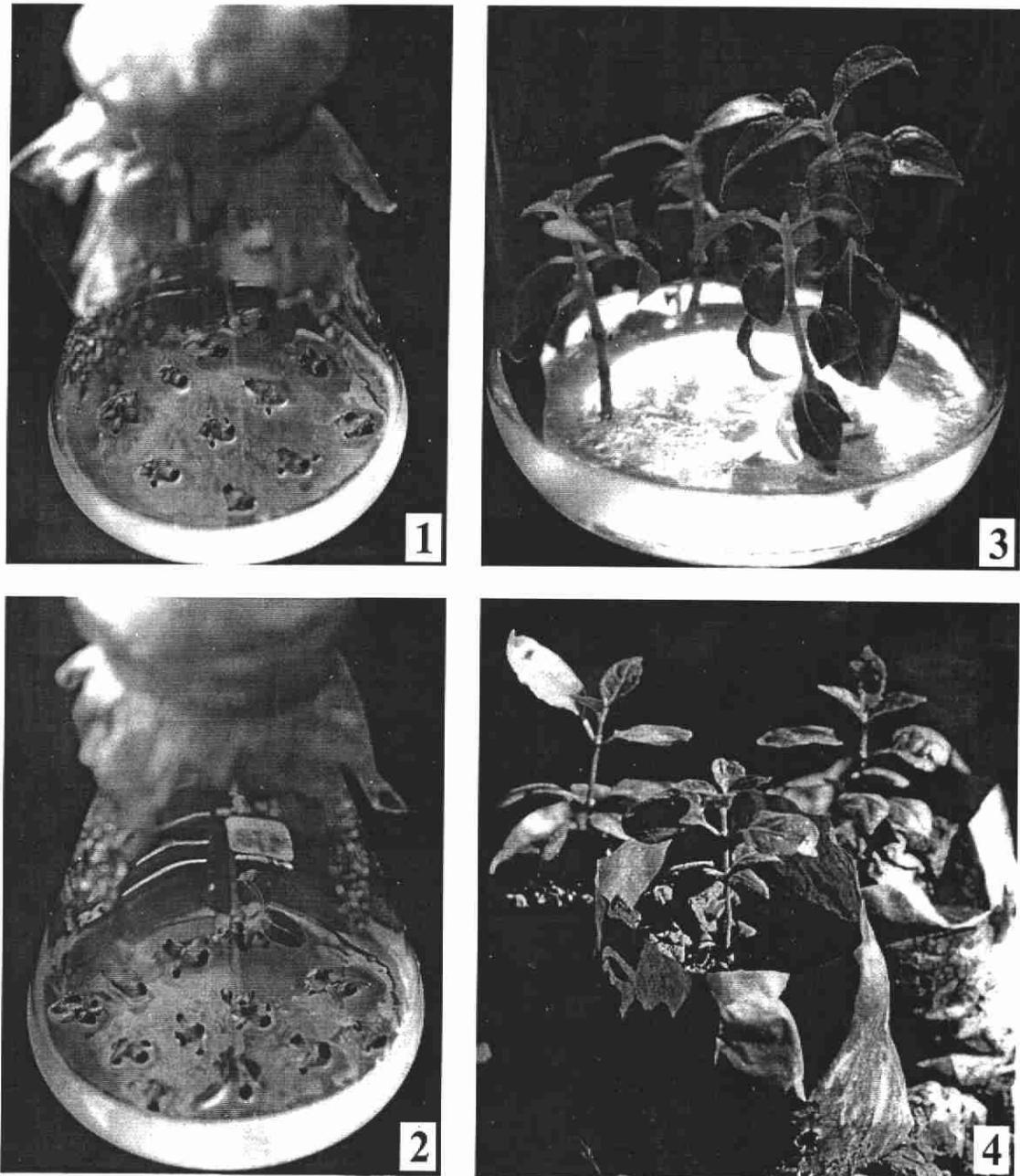
- officinalis How(巴戟天离体培养及植株再生的研究)[J]. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*(广州中医药大学学报), 17(4): 353—354.
- He H(贺红), Xu HW(徐鸿华). 2002. *In Vitro* culture and the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Morinda officinalis* How(巴戟天离体再生及农杆菌介导的遗传转化)[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*(中国中药杂志), 27(10): 733—735.
- Sheikoleslam SN, Weeks DP. 1987. *Acetosyringone* Promotes High Efficiency Transformation of *Arabidopsis Thaliana* Explants by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Mol Biol*, 8: 291—298.
- Zhong MQ(钟名其), Lou CF(楼程富), Tan JZ(谈建中), et al. 2002. The effect of silver nitrate on genetic transformation in White Mulberry (*Morus alba* L.) (硝酸银对桑树遗传转化的作用)[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*(热带亚热带植物学报), 10(1): 74—76.

贺 红, 等: 根癌农杆菌对巴戟天遗传转化的影响因素

HE Hong, et al.: Factors Affecting *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of *Morinda officinalis*

图版 I

Plate I



巴戟天抗性植株的筛选 1. 经农杆菌感染的外植体; 2. 在选择培养基上获得的抗性芽; 3. 抗性芽从外植体上切下继续筛选; 4. 抗性植株。

Selection on resistant plantlet of *Morinda officinalis* 1. Explants infected by *Agrobacterium*; 2. Resistant shoots formation from the explants on selection medium; 3. Selection culture of resistant shoots; 4. Resistant plants.