

豇豆胰蛋白酶抑制剂基因转化花椰菜的研究

吕玲玲^{1,3}, 雷建军², 宋明¹, 曹必好², 陈国菊², 曾国平²

(1 西南农业大学园艺学院, 重庆 400716; 2 华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642;

3 南亚热带作物研究所, 广东 湛江 524091)

摘要:通过根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导, 将豇豆胰蛋白酶抑制剂 (CpTI) 基因导入花椰菜无菌苗的下胚轴和子叶中, 卡那霉素 (Kan) 的筛选质量浓度为 15 mg/L, 抑制农杆菌生长的抗生素选用羧苄青霉素 (carbencillin), 质量浓度为 500 mg/L. 对所获得的转基因植株进行 PCR 扩增, 结果显示大多数为阳性; PCR-Southern 及 Southern 分子检测分析, 结果证明 CpTI 基因已被整合到花椰菜植株的基因组中. 转基因植株叶片的离体饲虫初步试验结果表明, 对鳞翅目害虫菜青虫的生长发育有一定的抑制作用.

关键词:花椰菜; 农杆菌介导; 遗传转化; 胰蛋白酶抑制剂 (CpTI) 基因; 转基因植株

中图分类号: S635.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2004) 03-0078-05

Transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) with cowpea trypsin inhibitor gene

LÜ Ling-ling¹, LEI Jian-jun², SONG Ming¹, CAO Bi-hao², CHEN Guo-ju², ZENG Guo-ping²

(1 College of Horticulture and Landscap, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China;

2 College of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

3 South Subtropical Crop Research Institute, Zhanjiang 524091, China)

Abstract: The cowpea trypsin inhibitor (CpTI) gene was transferred into the cotyledons and hypocotyls of cauliflower mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. In the selective medium, the kanamycin concentration was 15 mg/L. Carbencillin (500 mg/L) was used to inhibit growth of agrobacterium. The regenerated transformant plants were assayed by PCR, PCR-Southern blot and Southern blot, and the target band was observed in most of the plants assayed. So the integration of the CpTI gene into cauliflower genome DNA was confirmed. *In vitro* leaf testing for evaluating resistance to cabbage worm (*Pieris brassicae* L.) was made, and the results showed that the transgenic plants were more resistant than non-transgenic plants.

Key words: cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*); agrobacterium-mediated; genetic transformation; cowpea trypsin inhibitor (CpTI) gene; transgenic plant

有关花椰菜的再生和转化 Bt 基因已有报道^[1-4], David 等^[5]和 Srivastava 等^[6]曾用野生型根癌农杆菌和发根农杆菌转化花椰菜, 获得的转化株大都不正常; 何玉科等^[7]、陈晓邦等^[8]和 de Bloch 等^[9]报告了基因导入花椰菜, 获得转化植株, 但转化率极低. 转化效率低是转化方面的一个重要限制因子, 如何提高转化效率成为一个急待解决的问题.

花椰菜 *Brassica oleracea* var. *botrytis* 属于十字花

科芸薹属, 含有多种维生素, 营养丰富, 风味鲜美, 在全国范围内都有种植. 在其生长和育种过程中, 极易受到鳞翅目昆虫菜青虫、小菜蛾等的危害. 传统的育种技术只能利用有限的基因资源进行育种, 其开发利用很有限, 已不能满足现代农业对花椰菜品种改良的需要. 胰蛋白酶抑制剂 (CpTI) 基因对鳞翅目昆虫有良好的抗性, 本试验将 CpTI 基因导入花椰菜中, 获得转基因植株, 这为虫害防治、选育新一代绿

收稿日期: 2003-05-19

作者简介: 吕玲玲 (1977-), 女, 硕士研究生. 通讯作者: 雷建军 (1957-), 男, 教授, 博士.

基金项目: 广东省农业攻关项目 (2002A2070301)

色环保型蔬菜新品种提供了技术保证。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试花椰菜品种为白富士白雪花椰菜(编号0116)和白雪花50 d(编号0115)花椰菜。种子用体积分数为75%的乙醇浸泡30 s,在0.001 kg/L HgCl₂溶液中消毒14~15 min,无菌水冲洗3~5次,接种于不含激素的MS固体培养基上,种子萌发后,取4~6 d苗龄的下胚轴和子叶作外植体。

1.2 根癌农杆菌与质粒

供试根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 的菌株 LBA4404,其所含的质粒为 pGA643,将 CpTI 基因构建在该质粒上,成为 pGACpTI,该质粒携带 CaMV 35S 启动子和 Nos 终止子,并与具有卡那霉素(Kan)抗性的 NPT-II 基因相连。

1.3 花椰菜高频再生体系的建立

以4~6 d花椰菜的子叶,下胚轴为外植体,MS为基本培养基,通过加入不同浓度和不同组合的6-BA、NAA,筛选外植体不定芽分化的最适培养基,并比较两种不同外植体的分化能力。

1.4 花椰菜外植体高频转化体系的建立

将无菌苗的下胚轴切段、子叶切成两半,接种到再生培养基(MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA)上,温度为(25±1)℃,每日光照14 h;分别预培养2、3 d。

在进行转化前从划线培养平板上挑取单菌落,接种于25 mg/L Str 的 YEB 液体培养基中,28℃下振荡培养过夜。取2 mL 过夜活化的菌液接种于50 mL 含 Str 的 YEB 液体培养基中,同样条件下培养至 $D_{600\text{nm}}$ 为0.3~0.5,用液体 YEB 培养基将菌液稀释10倍,将经过预培养的外植体浸泡在准备好的菌液中0.5~1 min 和5~10 min,滤纸吸去外植体表面多余的菌液,在再生培养基上黑暗条件下各共培养1,2,3 d;转到脱菌培养基(再生培养基+500 mg/L Carb)中7~10 d,以抑制农杆菌的生长;最后转到筛选培养基(脱菌培养基+15 mg/L Kan)中诱导芽的再生。

1.5 抗性植株的再生与移栽

将筛选培养基中分化出的小芽切下,在筛选培养基中进行继代培养,芽长至3 cm左右时,将小芽切下,分别插入生根培养基 I(再生培养基+250 mg/L Cef+15 mg/L Kan)和生根培养基 II(MS+0.2 mg/L NAA+15 mg/L Kan)中生根。形成完整的植株后,选取根系生长情况良好的转化植株移栽至沙中,前几

天注意保湿,然后可于室外自然条件下生长。

1.6 PCR 扩增检测

Taq 聚合酶购自上海生工公司,采用25 μL 的反应体系。PCR 循环为95℃变性4 min,58℃复性1 min,72℃延伸1 min,2个循环;92℃变性1 min,58℃复性1 min,72℃延伸1.5 min,33个循环;72℃延伸10 min。所设计的 CpTI 基因两端引物为:5'端:5'-GATGATGGTGCTAAAGGTGT-3';3'端:5'-CTTACTCAT-CATCTTCATCC-3'。扩增的 DNA 长度约为326 bp。

1.7 Southern 杂交分析

参看萨姆布鲁克等^[10]的方法。用 EcoRI 酶切转化植株总 DNA,酶切过夜后,将酶切产物和 PCR 产物用0.01 kg/L 的琼脂糖凝胶电泳。采用毛细管转移法将 DNA 转移到尼龙膜上,分子检测方法按照 DIG 标记检测试剂盒说明(购自 Roche 分子生物化学公司);质粒 pGA643 进行 PCR 扩增,电泳后回收其扩增产物(即目的片段)做为探针,探针标记方法按照 DIG 标记检测试剂盒进行。

2 结果与分析

2.1 花椰菜外植体的再生

2.1.1 不同外植体分化能力的比较 植物不同的部位再生能力有强有弱,有些甚至得不到完整植株。一般来说,幼嫩组织的再生能力强于衰老组织的再生能力。在本试验中,用4~6 d 苗龄花椰菜的下胚轴和子叶作为外植体,32 d 后统计分化率。结果显示:2个品种的2种外植体均能分化形成芽,但其分化能力有差别,但都是下胚轴的分化能力比子叶强(见表1)。

表1 花椰菜不同外植体的再生能力比较

Tab. 1 Comparison of regeneration capacity of explants types of cauliflower

材料编号 No. of material	外植体类型 explant types	外植体总数 No. of explant	分化的外植体数 No. of differentiated explant	分化率 percent of differentiation /%
0115	子叶 cotyledon	50	31	62.0
	下胚轴 hypocotyl	50	37	74.0
0116	子叶 cotyledon	90	60	66.7
	下胚轴 hypocotyl	100	75	75.0

2.1.2 激素对花椰菜外植体分化的影响 通过不同激素及不同的浓度组合来试验其对外植体芽分化的影响(见表2),32 d 后统计结果表明,当在基本的 MS 培养基中添加2.0 mg/L BA,0.2 mg/L NAA 时,外植体的芽分化率最高,与其他几个配方相比,优势较明

显.同时,通过表1和表2可以看出,所采用的2个品种间的芽分化率差异不大.

2.2 花椰菜外植体的转化

2.2.1 卡那霉素(Kan)对外植体不定芽分化的影响 花椰菜的下胚轴和子叶对Kan非常敏感,在含有0、5、10、15、30、50 mg/L Kan的再生培养基上,外植

体的芽分化差异很大;5 mg/L下有些外植体形成愈伤组织,并有少量绿芽存活;10 mg/L下,大多数外植体不形成愈伤组织就白化死亡,但仍有少量愈伤组织呈绿色;15 mg/L及以上的质量浓度下,所有的外植体不分化就白化死亡(表3).因此,本试验采用15 mg/L Kan作为筛选时的选择压(图1,2).

表2 不同激素及不同的浓度组合对外植体分化的影响

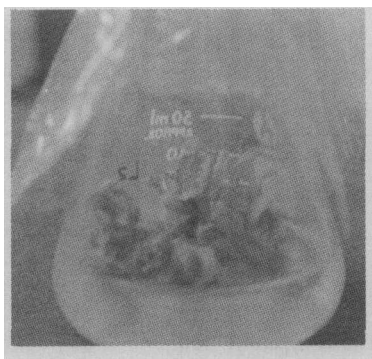
Tab. 2 Effects of different hormone compositions on the bud differentiation of explants in *Brassica oleracea* var. *botrytis*

培养基 medium	分化率 percent of differentiation/%			
	0115		0116	
	子叶 cotyledon	下胚轴 hypocotyl	子叶 cotyledon	下胚轴 hypocotyl
MS+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA	65.0	75.0	66.7	75.0
MS+3.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA	33.3	66.7	35.0	71.4
MS+2.0 mg/L BA+0.1 mg/L NAA	45.4	66.7	50.0	71.4
MS+3.0 mg/L BA+0.1 mg/L NAA	44.4	71.4	57.1	58.3

表3 Kan质量浓度对外植体芽分化的影响

Tab. 3 Effects of Kan mass concentration on callus induction and bud differentiation of explants in *Brassica oleracea* var. *botrytis*

$\rho(\text{Kan})$ /(mg·L ⁻¹)	外植体 总数 No. of explant	形成愈伤组织 的外植体数 No. of explant with callus	分化出芽的 外植体数 No. of explant with bud-differentiation
0	40	40	30
5	40	15	6
10	40	10	0
15	40	0	0
30	40	0	0
50	40	0	0



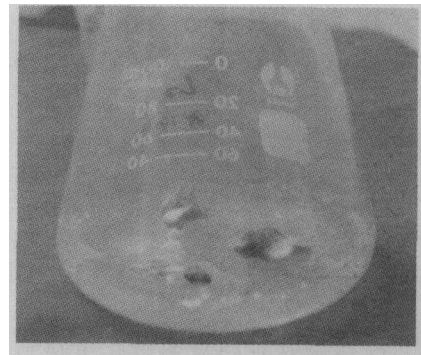
$\rho(\text{Kan}) = 15 \text{ mg/L}$

图1 筛选培养基中分化出再生芽

Fig. 1 Differentiation in screening medium

2.2.2 预培养对外植体分化的影响 在花椰菜的转化过程中,未经预培养的外植体(对照)感菌后,在伤口处产生褐化,细胞坏死,严重影响外植体的芽分化,尤其是子叶.本试验分别预培养2和3 d后再进

行农杆菌感染,与对照相比大大降低了褐化率,并以预培养3 d的效果为好.



$\rho(\text{Kan}) = 15 \text{ mg/L}$

图2 非转化外植体在筛选培养基中死亡

Fig. 2 Non-transformant in screening medium

2.2.3 感菌时间及共培养时间对芽分化的影响 结果显示感菌5~10 min的外植体污染现象严重,且芽分化率远远低于感菌0.5~1 min的,所以随后的试验采用感菌0.5~1 min;另外,菌液浓度的大小也影响农杆菌的侵入和外植体的分化,菌液浓度过小,不利于农杆菌的附着,但菌液浓度过大,外植体易受毒害致死,以菌液 $D_{600 \text{ nm}} = 0.3 \sim 0.5$ 为宜.由试验结果可看出,共培养1和2 d的芽分化率差异不大,在这种情况下,感菌时间长有利于细菌的侵入,再综合外植体污染情况及分化率高低得出最佳共培养时间为2 d(表4).

2.3 抗性植株的获得

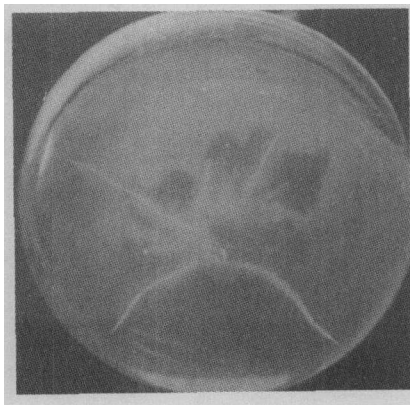
从接种到筛选培养基上的305个绿芽中,获得转化植株14株,经PCR,Southern杂交检测均呈阳性的转化植株有8株,转化率为2.65%.将筛选培养基

上的小芽切下,转入新的筛选培养基中进行二次筛选,淘汰假转化体,并扩大繁殖,逐渐降低 Carb 的质量浓度至 200 mg/L. 当经过再次筛选的再生芽长至 3 cm 左右时,移入生根培养基,在生根培养基 I 中,需要 20 d 左右才能生根,而在生根培养基 II 中,只需 7~10 d 就可长根. 挑选根系生长良好的植株移栽到沙中. 用 Hoagland' 营养液浇灌,共移栽 120 株转化植株,成活 24 株,成活率为 20%(图 3,4).

表 4 共培养时间对芽分化的影响

Tab. 4 Effects of co-cultivation time on the bud differentiation of explants in *Brassica oleracea* var. *botrytis*

t(共培养) co-cultivation time/d	污染情况 contamination	外植体总数		外植体芽分化率	
		No. of explant		No. of explant/%	
		子叶 cotyledon	下胚轴 hypocotl	子叶 cotyledon	下胚轴 hypocotl
1	无	40	40	35	40
2	无	40	40	31.3	33.3
3	有	40	40	12.9	13.5



$\rho(\text{Kan}) = 15 \text{ mg/L}$

图 3 抗性再生苗在生根培养基中生根

Fig. 3 Rooting of transformant in rooting medium



$\rho(\text{Kan}) = 15 \text{ mg/L}$

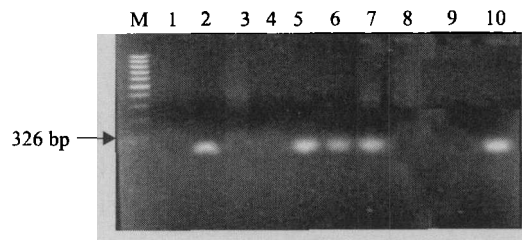
图 4 转化植株在生根培养基中生长良好

Fig. 4 Plantlet in rooting meidum

2.4 转化植株的鉴定

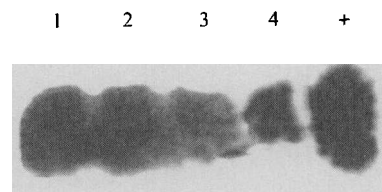
2.4.1 PCR 扩增 提取非转化植株和转化植株的总 DNA,同时提取质粒 pGA643 作为阳性对照,采用 25 μL 的反应体系进行 PCR 扩增. 电泳结果显示:质粒 pGA643 DNA 和转化植株的大部分都扩增出 326 bp 的特异条带;而非转化植株和无模板的阴性对照未扩增出特异条带(图 5).

2.4.2 Southern 杂交检测 选择 PCR 检测结果呈阳性的转化植株用于 Southern 杂交检测,以质粒 pGA643 的 PCR 产物作为阳性对照. 分别将其 PCR 产物和植物 DNA 酶切产物用于分子杂交. 结果显示,所检测的转化植株都产生了杂交条带,这表明 CpTI 基因已被整合到花椰菜转化植株细胞的基因组中(图 6).



M: 标准, 1: 非转化植株 DNA, 2: pGA643 质粒 DNA(阳性对照), 3: 非模板(阴性对照), 4~10: 转化植株 DNA
M: mol. wt. Marker, 1: non-transformed plant DNA, 2: pGA643 plasmid DNA (postive control), 3: non-template (negetive control), 4-10: transformed plant DNA

图 5 转 CpTI 基因 Kan 抗性再生植株的 PCR 检测
Fig. 5 PCR assay of transformant with resistance to Kan



1~4: 用 *EcoR* I 酶切的转化植株 DNA
+: pGA643 质粒 PCR 产物(阳性对照)
1-4: transformed plant DNA digested with *EcoR* I
+: plasmid pGA643 PCR products as postive control

图 6 转 CpTI 基因 Kan 抗性再生植株 Southern 杂交检测
Fig. 6 Southern blot of transformant with resistance to Kan

2.5 初步抗虫试验

取转基因花椰菜植株和非转化植株的同一部位的叶片,从中切取大小约相同的叶块,分置于塑料盒子两边,内垫双层湿润滤纸;各取 1~2 龄菜青虫幼虫 10 条接种到叶片上,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、自然光照条件下培养 2~3 d,观察叶片受损情况,进行初步的抗虫试

验. 结果表明,非转化植株的对照叶片受损严重,而转化植株的叶片相对受损较少,说明转化植株对菜青虫具有一定的抗性.

3 讨论

在整个的转化过程中,有很多因素会影响转化效率:首先,花椰菜的分化率比较低,本试验通过添加一定质量浓度的 BA 和 NAA,使其分化率达到 70%左右;其次,感菌后花椰菜外植体的褐化现象严重,通过预培养 3 d,使菌液浓度为 $D_{600\text{nm}} = 0.3 \sim 0.5$,感菌时间为 0.5~1 min,共培养 2 d,可大大降低褐化率. 第三,花椰菜外植体对 Kan 很敏感,15 mg/L 的 Kan 可完全抑制其分化,因而本试验采用先培养 7~10 d 后再加入 Kan 进行筛选,这样有利于芽的分化,从而提高转化效率. 最后,将经筛选后的小芽移入生根培养基时,在生根培养基 I 中,需要 20 d 左右才能生根,而在生根培养基 II 中,只需 7~10 d 就可长根,尽管王关林等^[11]认为在芽分化时采用 Carb 作为抑菌剂,而在根系生长时以头孢霉素(Cef)作为抑菌剂效果较好,但本试验结果说明 Cef 的加入对根系生长仍具有一定的抑制作用.

参考文献:

- [1] 董五辈,唐桂芬,兰尊海,等. 花椰菜高频再生系统的研究[J]. 河南科学,1997,15(1):70-73.
- [2] 蔡荣旗,孙德岭,赵前程,等. 根癌农杆菌介导 B.t 杀虫基因对花椰菜的转化初报[J]. 天津农业科学,2000,6

(4):9-12.

- [3] 华学军,陈晓邦,范云六. B.t 杀虫基因在花椰菜愈伤组织的整合和表达[J]. 中国农业科学,1992,25(4):82-87.
- [4] 程继鸿. 杀虫基因在芸薹属作物上的遗传转化[D]. 陕西杨陵:西北农业大学园艺系,1994.
- [5] DAVID C, TEMPE J. Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) by *Agrobacterium rhizogenes*[J]. Plant Cell Rep, 1988,7(2):88-91.
- [6] SRIVASTAVA V, REDDY A S, MUKHEJEE G S. Transformation and regeneration of *Brassica oleracea* mediated by an oncogenic *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Rep, 1988,7(7):504-507.
- [7] 何玉科,攻振辉,王飞,等. 含有二元载体 Bin19 的发根农杆菌在芸薹属作物上的遗传转化[J]. 生物工程学报,1991,7(4):382-385.
- [8] 陈晓邦,华学军,黄其满,等. 农杆菌介导的 Intron-GUS 嵌合基因转入花椰菜获得转基因植株[J]. 植物学通报,1995,12(增刊):50-52.
- [9] de BLOCH M, de BROWWER D. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expressing of the bar and neo genes in the transgenic plants[J]. Medee Fac Landbouwwer Ri Jksuniv Gent, 1989, 54(4):1 267-1 276.
- [10] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 金冬燕,黎孟枫,等译. 北京:科学出版社,1999. 474-490.
- [11] 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,1998,194-232.

【责任编辑 柴 焰】