

甘蓝Ri T-DNA转化根的植株再生

何玉科

(西业农业大学园艺系, 陕西杨陵)

利用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)的遗传转化作用,从甘蓝下胚轴切段上诱发产生了Ri T-DNA转化根。在无激素MS琼脂培养基上,经过长达4个月的连续培养后,有些转化根的根段组织脱分化形成愈伤组织块,然后又再分化形成茎芽。在含有激动素的MS琼脂培养基上,转化根不经过愈伤组织阶段直接分化出茎芽,其中以 $14\mu\text{mol/L}$ 激动素处理的生茎效果最佳。在MS液体培养基内加入 $4.5\mu\text{mol/L}$ BA也增加了转化根上的茎芽数。所有这些茎芽能够进一步生长,并且在生根培养基上生根,长成小植株。

关键词 甘蓝; 发根农杆菌; 转化根; 激动素; 植株再生

利用植物离体的地上器官和分生组织进行植株的再生培养在许多植物上获得成功。但是以植物根段作为外植体进行植株的再生繁殖,成功的例子还很少^[1]。Anuradha等在十字花科作物幼苗的根段上获得了幼茎和再生植株^[2]。然而,这些幼茎都是经过愈伤组织阶段再分化而来的,在再生植株中观察到了很大的变异。

发根农杆菌在植物组织上诱发的转化体首先是转化根。同根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)相比,Ri T-DNA转化根仍然保持正常的植株再生能力。在转化根上建立植株再生繁殖系统已经在马铃薯、烟草和矮牵牛等作物上实现^[3,4]。目前还没有人对包括甘蓝在内的十字花科作物转化根再生植株的问题进行专门研究。

一般来说,转化根都是一些经过培养的离体根,不同于直接从幼苗根系上切取的根段。在转化根上再生植株所遇到的困难往往比幼苗根段再生植株的困难大。与此同时,根段通过愈伤组织阶段再生植株,有可能丢失转化根内的T-DNA或者引起该T-DNA的变异,形成非转化的再

生植株。因此,为了保持转化体的遗传稳定性,有必要创造新的办法从根段上直接分化幼茎而不经愈伤组织阶段。

在发根农杆菌转化后,我们得到了大量的Ri T-DNA转化根,需要有足够数量的转化植株进行转化体抗病性鉴定和筛选。所以,建立一种转化根直接分化再生植株的系统,尽可能多地得到转化植株,对转化体的抗病性鉴定和筛选是至关重要的。

材料和 方法

(一)转化根的获得

试验采用甘蓝的Septa品种和发根农杆菌的野生菌株LBA 9402。甘蓝种子经次氯酸钠消毒和无菌水冲洗后,播种在不含激素和维生素的MS琼脂培养基上。当幼苗长到14天时,从下胚轴上切取1cm长的切段进行培养,并且在切段的切面上接

本文于1989年6月12日收到。

此项研究是在荷兰园艺植物育种研究所进行的。兰州大学郑国锷教授和贾敬芬教授对实验提出了宝贵的建议,特此致谢。

种发根农杆菌悬浮液^[5]。当接种切段上出现幼根并长到1cm长时,分别切取单根移到含有250mg/L万古霉素的培养基上培养。经过3—4代的继代培养后,用纸电泳法定性测定农杆菌碱(agropine)和甘露碱(mannopine)^[6]。保留转化根继续培养,并淘汰非转化根。

(二)转化根在无激素MS琼脂培养基上分化茎芽

从不同转化根上切取5cm长的根段40个,分别移入到10个培养皿中,放在25℃和光照下培养。使用的固体培养基是无激素MS琼脂培养基。

液体培养基灭菌后,装入100ml的三角瓶内,每瓶10ml。从转化根上切取5cm长的根段20个,分别转移到液体培养基内,在25℃和光照下振荡培养。每隔20天向每个三角瓶内添加1ml新鲜培养基。

(三)在有激素MS固体培养基上诱导茎芽

固体培养基灭菌前,加入(1)萘乙酸(NAA)0、0.5和5.0 $\mu\text{mol/L}$; (2)激动素(KT)0、0.7、7.0和70 $\mu\text{mol/L}$ 。NAA和KT互相配合形成16种浓度组合的MS固体培养基。然后以同法切取根段进行培养。每个组合的处理切取40个根段,分别移到10个培养皿内培养。

根据这一实验的结果,在激动素7—70 $\mu\text{mol/L}$ 之间设置5种浓度水平:7、14、21、28和35 $\mu\text{mol/L}$,配制新的琼脂培养基进行植株的再生培养。每个浓度处理切取40个根段,分别转到10个培养皿内培养。

(四)在含有6-苄基氨基嘌呤(BA)的MS液体培养基内诱导茎芽

在配制好的MS液体培养基内分别加入BA,使其浓度达到0.045、0.45、4.5和45 $\mu\text{mol/L}$ 。每个三角瓶中加入10ml培

养基,移入长度为5cm的根段,在25℃和光照下振荡培养。每隔20天向瓶内添加1ml新鲜培养基。

当根段上的茎芽长出并达到两片叶子时,将幼茎小心地切下来,转移到生根培养基(含有0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的MS琼脂培养基)上生根。再生的小植株转移到8×9cm的培养瓶中继续培养。

在根段生茎培养期间,观察记载茎芽分化数和幼茎生长状况。以后,从再生小植株上切取叶片,制备叶片组织提取液,用纸电泳法定性测定农杆菌碱和甘露碱。

结 果

(一)在无激素培养基上幼茎的自然发生

在MS固体培养基上,一个转化根的根段培养物经长时间培养后,在培养基表面形成一个大的根系统。这个根系统包括用作培养起始物的根段和后来陆续分生的侧根。如果连续培养这种根系统4个月左右,其间并不继代培养,就会在少数根系统上看到愈伤组织块,其中有些愈伤组织块再分化形成幼茎(图1)。不难发现,愈伤组织块的形成和幼茎的再分化部位主要在原来的根段和最早出现的侧根上。如果对根系统的切段进行继代培养,那么从根段开始培养到茎芽的自然发生也需要4个月的时间。而且,愈伤组织块和茎芽多见于最初根段的切口处或者与侧根的交叉处。

茎芽的发生过程是:首先,根的某一部分变绿增粗,继而脱分化产生表面松散的脆性愈伤组织或表面光滑的坚硬愈伤组织。脆性愈伤组织为淡黄绿色,其中央有深绿色的核,以后的茎芽从中长出。然而,坚硬愈伤组织很难再分化茎芽。

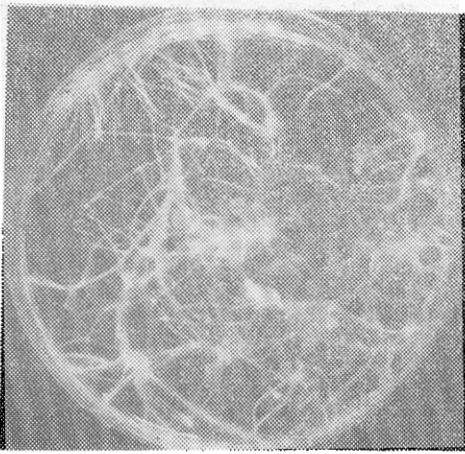


图 1 转化根在无激素固体培养基上发生愈伤组织块和幼茎

Fig.1 Callus clump and young shoots were derived from transformed roots on solid medium without hormones

在无激素固体培养基上共培养了40个根段，结果出现了18个愈伤组织块，其中有4个愈伤组织块脱分化形成了5个茎芽。

同样，转化根根段也可以在没有激素液体培养基内诱发茎芽。尽管此法发生茎芽的频率很低，但是从根段开始培养到茎芽出现所需的时间较短(大约两个月)。

(二)在有激素固体培养基上幼茎的分化

激动素是一种细胞分裂素，它对转化根上幼茎的诱导分化具有明显的促进作用。当MS琼脂培养基含0.7或7.0 $\mu\text{mol/L}$ 激动素时，有一些转化系的根段显示出不同程度的生茎能力(表1)。在此条件下茎芽的发生有两个特点：一是当激动素浓度为0.7和7.0 $\mu\text{mol/L}$ 时，根段上直接分化出茎芽，并不经过愈伤组织阶段；二是茎芽发生的速度很快，从根段转移培养到茎芽发生只需40天的时间。在三种浓度的激动素中，7.0 $\mu\text{mol/L}$ 的生茎效果最好。单独使用NAA时，根段上均无茎芽或幼茎的发生。当NAA浓度达到5 $\mu\text{mol/L}$ 时，

表 1 激动素(KT)和萘乙酸(NAA)浓度对转化根幼茎分化能力的影响

Table 1 The effects of concentrations of kinetin(KT) and NAA on shoot differentiation from transformed roots

激素浓度 Hormone concentration ($\mu\text{mol/L}$)		幼茎数 Number of young shoots
激动素 Kinetin(KT)	萘乙酸 NAA	
0	0	0
	0.5	0
	5.0	0
0.7		2
7.0		36
70		5
0.7	0.5	2
7.0	0.5	33
70	0.5	9
0.7	5.0	0
7.0	5.0	2
70	5.0	1

表中每个处理的幼茎数是40个根段培养物上幼茎数的总和

Number of young shoots per treatment is the sum of all young shoots from 40 root cultures in the Table

沿根段形成连续的块状愈伤组织。在这种黄色的愈伤组织上未分化出任何茎芽。

在含有7.0 $\mu\text{mol/L}$ 激动素的培养基中添加0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的NAA并未明显影响根段上茎芽的分化能力。高浓度(70 $\mu\text{mol/L}$)激动素配合0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的NAA，其生茎能力同单独使用该浓度激动素相比有所提高。

在激动素7 $\mu\text{mol/L}$ 和70 $\mu\text{mol/L}$ 这样宽的浓度范围内，可能存在着更为合适的浓度水平。为此，我们又进行了5种浓度(表2)的处理。表2结果表明，在激动素浓度7—35 $\mu\text{mol/L}$ 范围内，14 $\mu\text{mol/L}$ 激动素的生茎作用最强。在此浓度下，有些根段直接分化出茎芽，并不经过愈伤组织阶段(图2)。在较高浓度(35 $\mu\text{mol/L}$)的激动素作用下，根段全部变绿，并加粗生长，在某一区域出现紫色的茎芽。

表 2 细胞分裂素浓度对转化根幼茎分化能力的影响

Table 2 The effect of cytokinin concentration on plant regeneration from transformed roots

固体培养基 Solid medium	激动素浓度 Kinetin concentration ($\mu\text{mol/L}$)	7	14	21	28	35
	幼茎数 Number of young shoots	42	69	50	39	29
液体培养基 Liquid medium	BA 浓度 BA concentration ($\mu\text{mol/L}$)	0	0.045	0.45	4.5	45
	幼茎数 Number of young shoots	0	17	23	65	11

表中每个浓度处理的幼茎数是40个根段培养物上幼茎数的总和

Number of young shoots per treatment is the sum of young shoots from 40 root cultures in the Table

图 2 转化根在含有 $14\mu\text{mol/L}$ 激动素的MS琼脂培养上分化幼茎Fig.2 Young shoots are derived directly from transformed roots on solid MS medium containing $14\mu\text{mol/L}$ kinetin

(三) 在含有 BA 的液体培养基内幼茎的分化

在含有 BA 0.045 、 0.45 、 4.5 和 $45\mu\text{mol/L}$ 的液体培养基内, 每种浓度处理都有一些根段分化出茎芽(表 2)。其中, $4.5\mu\text{mol/L}$ 的 BA 促进茎芽分化的能力最强。在所有浓度 BA 的液体培养基内, 根段

上茎芽的发生是直接的, 都不经过愈伤组织阶段。

通过以上几种处理方法, 使用不同浓度的细胞分裂素和生长素, 从甘蓝 Ri T-DNA 转化根上诱导出许多幼茎。从根段培养物上切取这些幼茎, 转到含有 NAA $0.5\mu\text{mol/L}$ 的生根培养基上, 结果所有的

幼茎都能生根, 并长成小植株。这些再生的小植株中, 约有 7% 的小植株不含有农杆菌和甘露碱。其余的再生植株均含有农杆菌和甘露碱, 因而是含有 Ri T-DNA 的转化植株。如图 3 所示, 大多数转化植株具有 Ri T-DNA 转化体的典型特征: 叶缘卷曲、叶片皱缩、侧根平行或向上生长。

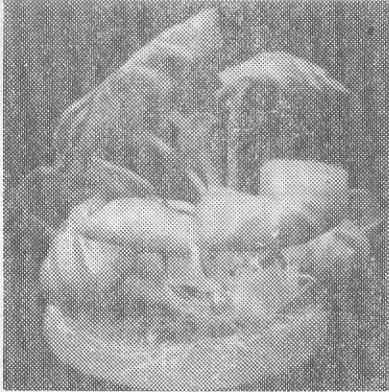


图 3 从甘蓝 Ri T-DNA 转化根上再生的转化植株
Fig. 3 Transformed plant regenerated from Ri T-DNA transformed roots of cabbage

讨 论

发根农杆菌转化的根段在无激素培养基上经长时间的培养后能自然分化愈伤组织和幼茎。这种自然分化的现象可能与光照条件的诱导和转化根内生长素基因的作用有关。在光照条件下, 转化根局部组织变绿; 在生长素基因的作用下, 转化根内逐渐合成并积累较高浓度的生长素, 引起黄绿色愈伤组织的形成。光照和生长素的

共同作用使茎芽的自然分化成为可能。这一结果对于植物器官分化的研究有重要意义, 它说明在组织培养条件下, 植物的根段不需要外源激素的诱导就可以再生植株。应当注意, 在无激素培养基上, 转化根自然分化茎芽的频率很低, 需要的时间很长, 因而还不可能作为植株再生培养的主要途径。

Anuradha 等^[2] 选用不同浓度的细胞分裂素和生长素配合, 研究油菜幼苗根段的幼茎分化, 结果发现 5mg/L 的 NAA 配合 4—7mg/L 的 BA 促进幼茎发生的效果较好。当然, 这种浓度的激素配合首先诱导产生愈伤组织, 然后经再分化形成幼茎。我们的实验结果表明, 单独使用一定浓度的细胞分裂素可使转化根直接分化茎芽, 愈伤组织的形成并不是根段上再生植株的必经阶段。利用 14 μ mol/L 的激动素配制固体培养基或者用 4.5 μ mol/L BA 配制液体培养基进行转化植株的再生培养, 是获得转化植株的一条较好途径。然而, 转化根再生植株的潜力还很大, 提高转化根根段上幼茎的发生频率还需要对培养基的成分和激素含量作进一步的研究。

再生的植株群体内有极少数植株不含有农杆菌和甘露碱, 变成了非转化植株, 其原因可能是: 再生植株群体内含有一些在愈伤组织基础上再生的植株, 愈伤组织诱导和再分化所引起的变异可能使再生植株丢失了 Ri T-DNA 或者使 Ri T-DNA 发生了变异。

参 考 文 献

- [1] Chopra, V. L. et al.: *Cruciferae Newsletter*, 11:100—101, 1986.
- [2] Anuradha, G. and Chopra, V. L.: *Cruciferae Newsletter*, 11:91, 1986.
- [3] David, C. et al.: *Biotechnology*, 2:73—76, 1984.
- [4] Durand-Tardif, M. et al.: *J.Mol.Biol.*, 186:557—564, 1985.
- [5] Mugnier, J.: *Phytopathology*, 77(4):539—542, 1987.
- [6] Petit, A. et al.: *Mol.Gen. Genet.*, 190:204—214, 1983.

PLANT REGENERATION OF Ri T-DNA TRANSFORMED ROOTS OF CABBAGE

He Yuke

(Department of Horticulture, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shanxi)

Ri T-DNA transformed roots were induced on hypocotyl segments of cabbage with *Agrobacterium rhizogenes*. On solid MS medium without hormones, some parts of a few of transformed roots were dedifferentiated into callus clump, and then redifferentiated into shoot buds since the roots had been cultured for 4 months. On solid MS medium supplemented with kinetin, shoot buds were differentiated directly along transformed roots without callus formation. Among several concentrations, 14 $\mu\text{mol/L}$ kinetin gave rise to the best results for differentiation of shoot buds. 4.5 $\mu\text{mol/L}$ at a concentration of BA in liquid MS medium also increased shoot buds from transformed roots.

All of these shoot buds grew further, and were rooted on root induction medium, developing into young plants.

Key words

Cabbage; *Agrobacterium rhizogenes*; transformed roots; kinetin; plant regeneration

书 讯

由美国技术评价办公室编著,王作明等编译的“生物技术的商品化”一书,6月份将由化工出版社出版,每册定价7.00元。欲购者请与北京和平里7区16号楼化工出版社发行部联系(邮政编码:100013)。