

## 金鱼草基因转化和转基因植株再生

余迪求 邓庆丽 沈亚楠 李宝健

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

**摘要** 本实验采用根癌农杆菌 LBA4404 (p35SGUSINT) 与金鱼草下胚轴切段共培养, 将 GUS 基因导入金鱼草细胞, 通过不定芽发生途径获得抗 G418 再生植株。经 DNA/DNA 斑点杂交及 GUS 活性原位组织检测初步证实外源基因 GUS 已整合进金鱼草基因组并得到表达。

**关键词** 农杆菌; 金鱼草; 基因转化; GUS 基因

## GENE TRANSFORMATION AND TRANSGENIC PLANTS REGENERATION OF *ANTIRRHINUM MAJUS* WITH *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Yu Diqiu Deng Qingli Shen Yanan Li Baojian

(Biotechnology Research Centre, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

**Abstract** In this paper, G418-resistant regenerated plants were obtained from hypocotyl segments which had cocultivated with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (p35SGUSINT) via adventitious bud regeneration. DNA/DNA dot hybridization and GUS histochemical assay revealed that the foreign GUS gene from *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 had been integrated into genome of *Antirrhinum majus* and expressed in the cells.

**Key words** *Agrobacterium tumefaciens*; *Antirrhinum majus*; Gene transformation; GUS gene

金鱼草 (*Antirrhinum majus* L.) 是世界广泛栽培的草本花卉之一。近年来, 已成为遗传学和分子生物学, 特别是转座子、花色素发育与调控和花型发育研究的重要经典材料<sup>[1,2]</sup>。至今, 金鱼草基因转化仅二篇报道<sup>[3,4]</sup>。虽然 Handa 曾用发根农杆菌 Ri 质粒介导金鱼草茎段转化, 并获得转基因植株<sup>[3]</sup>, 但更加有效的根癌农杆菌 Ti 质粒介导金鱼草转化尚未见报道。我们曾采用金鱼草下胚轴为外植体, 建立高频率不定芽发生系统<sup>1)</sup>。在此基础上, 我们进一步以下胚轴为转化受体, 利用根癌农杆菌 LBA4404 (p35SGUSINT) Ti 质粒介导法将 GUS 基因导入金鱼草细胞, 成功地获得开花的转基因植株。

中山大学基础性前沿研究项目资助

1) Yu D Q (余迪求), Li B J (李宝健). High frequency adventitious shoot regeneration from hypocotyl explants in *Antirrhinum majus* L.. Developmental & Reproductive Biology, 1996 (in press)

1995-12-11 收稿; 1996-06-06 修回

## 1 材料与方 法

**植物材料** 金鱼草 (*Antirrhinum majus* L.) 75<sup>#</sup>、98<sup>#</sup> 由英国 John Innes 研究所 Carpenter 博士提供。金鱼草种子经 15% 次氯酸钠表面消毒 10min, 然后无菌水冲洗 3-5 次, 接种于 MS<sub>0</sub> 固体培养基上。培养温度为 21±1℃, 每天光照 14h, 光强度 1200Lx。将萌发 15d 的无菌苗下胚轴切成 0.5-1.0cm 的切段作为转化外植体。

**菌种** 根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (p35SGUSINT, pAL4404 Km<sup>r</sup> Sm<sup>r</sup>) 由本实验室尹中朝博士提供。

**金鱼草下胚轴内源抗性测定** 分别将在 MS<sub>3</sub> 培养基<sup>[5,1]</sup> 上培养 0d、3d、10d 的外植体接种至 G418 浓度分别为 0.5、7.5、10、15 和 20μg ml<sup>-1</sup> 的 MS<sub>3</sub> 培养基上培养, 测定下胚轴内源抗性。

**金鱼草下胚轴外源基因转化** 将在 MS<sub>3</sub> 培养基上预培养 3d 的下胚轴, 与根癌农杆菌 LBA4404 (p35SGUSINT) 共培养 2d 后, 经无菌 MS<sub>3</sub> 液体培养基冲洗, 接种于附加羧苄青霉素 (cb)400μg ml<sup>-1</sup> 和 G418 10μg ml<sup>-1</sup> 的 MS<sub>3</sub> 固体培养基上。4-5 周后, 切取愈伤组织上长出的抗性幼芽, 转入含 cb 200μg ml<sup>-1</sup> 和 G418 10μg ml<sup>-1</sup> 的 MS<sub>4</sub> 培养基上<sup>[5,1]</sup>。待芽长至 3-4cm 高, 转移至附加 cb 200μg ml<sup>-1</sup> MS<sub>5</sub> 培养基上生根<sup>[5,1]</sup>。

**抗性植株 DNA/DNA 斑点杂交** 剪取抗性植株叶片用于 DNA 提取。基因组 DNA 提取参照 Doyle 等<sup>[6]</sup> 并加以简化。约 1-2μg 基因组 DNA 经变性后直接点至硝酸纤维素滤膜上。预杂交、杂交及洗膜方法参照 Sambrook 等<sup>[7]</sup>。杂交探针为 2.9kb 的 CaMV35S-GUS 片段, 采用 Sigma 公司的随机引物试剂盒标记而成。

**转基因植株 GUS 活性的原位组织化学染色** 植株茎段经徒手切成薄片, 立即放入 x-Gluc 溶液<sup>[8]</sup> (5mmol/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5mmol/L K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 100mmol/L H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.06% Triton X-100, 0.3% X-Gluc) 中, 37℃ 染色反应, 于 Olympus BH<sub>2</sub> 型显微镜观察与拍照。

## 2 实验结果

### 2.1 不同预培养时间的外植体对 G418 的敏感性

为了确定最适的 G418 选择浓度, 进行了不同预培养时间的外植体对不同浓度 G418 的敏感性试验。结果表明, 未经预培养的下胚轴对 G418 非常敏感, 接种到抗性梯度培养 (含 G418 5-20μg ml<sup>-1</sup>) 上, 不到 1 周全部外植体白化、死亡。预培养 3d 的外植体接种至筛选培养基 2 周后, 只有 G418 5μg ml<sup>-1</sup> 处理的下胚轴长出少量芽点, 其后也慢慢白化、死亡; 其余浓度下的下胚轴全部死亡。预培养 10d 的外植体, 表面已有芽点分化, 接种至抗性梯度培养基 3 周后, 只有 7.5μg ml<sup>-1</sup> 和 10μg ml<sup>-1</sup> 两种浓度处理的下胚轴, 芽能缓慢生长, 但最终也死亡; 其余浓度下的下胚轴很快死亡。可见, 金鱼草下胚轴不定芽的分化生长对 G418 比较敏感, 不过随着预培养时间的延长, 耐药程度有所提高。通过本实验, 我们确定选用预培养 3d 的外植体为转化受体, G418 选择浓度为 7.5-10μg ml<sup>-1</sup>。

### 2.2 下胚轴的转化和转基因植株再生

预培养 3d 的下胚轴与根癌农杆菌共培养后, 在筛选培养基上光照培养 4-5 周。下胚轴逐渐

分化形成许多抗性幼芽(图版 I:1b)。之后,切下的抗性幼芽转移壮苗培养基(含相应抗生素)上(图版 I:1c)。经生根后,移栽于花盆生长。最后植株开花(图版 I:2)。

### 2.3 乙酰丁香酮(AS)对金鱼草下胚轴转化的影响

经 AS 预处理和未经预处理的根癌农杆菌分别与预培养 3d 的下胚轴共培养, 2d 后转移至 MS<sub>3</sub> 筛选培养基。4 周后观察统计抗性芽出现频率(表 1)。并对抗性芽(5-6cm 高)进行 GUS 组织化学染色, 以确证为转化幼苗。结果表明, 农杆菌经 AS 预处理后, 金鱼草下胚轴转化频率有所提高。

### 2.4 农杆菌和下胚轴相互作用的扫描电镜观察

取与农杆菌共培养 2d 的下胚轴进行扫描电镜观察。结果显示农杆菌在下胚轴表面分布不均匀。大量农杆菌附着于下胚轴切段的伤口处和维管束细胞的周围, 而在下胚轴表皮细胞, 尤其未受伤的表皮细胞附着较少(图版 I:6)。农杆菌之间或紧密联结成簇, 或通过小纤丝相互联系(图版 I:7)。农杆菌与植物细胞之间的联系也和农杆菌间的联系相似, 即紧密附着于下胚轴细胞壁上, 或者形成小纤丝固定于细胞壁上(图版 I:7)。这些小纤丝的形成与农杆菌的转化过程密切相关<sup>[9,10]</sup>。

### 2.5 抗性植株 GUS 基因表达的组织化学分析

取转化和非转化金鱼草再生植株切段, 徒手切片后分别置于 X-Gluc 溶液进行染色反应, 于显微镜观察显色情况。结果显示, GUS 基因在抗性植株中得到表达。不过, GUS 酶活性在茎中的分布不均匀, 在维管束韧皮部部位表达较强(图版 I:3-4)。

### 2.6 抗性植株外源基因的 DNA/DNA 斑点杂交检测

为了证实 GUS 基因片段存在于金鱼草基因组内, 分别从抗性植株和对照植株提取总 DNA, 以 GUS 基因的 DNA 片段为探针进行 DNA/DNA 斑点杂交。结果表明, 质粒和抗性植株均出现阳性杂交信号, 而对照植株为阴性(图 1)。表明抗性植株存在与 GUS 基因同源的 DNA 片段。

## 3 讨论

根癌农杆菌 T-DNA 转移至植物细胞是一个复杂的过程。首先农杆菌细胞附着在宿主植物细胞表面并开始特定结合是实现 T-DNA 转移的初始条件<sup>[9,10]</sup>。随后, 部

表 1 AS 对提高金鱼草下胚轴转化频率的作用

Table 1 Effect of AS on transformation frequency of hypocotyl from *Antirrhinum majus*

农杆菌预处理 Pretreated <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	外植体数 No. of hypocotyl explants	G418 抗性植株数 No. of G418-resistant plants	转化频率 Frequency of transformation
0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AS	90	30	33.3%
30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AS	95	40	42.1%



图 1 转基因植株 DNA/DNA 斑点杂交分析

Fig. 1 DNA/DNA dot hybridization analysis of transgenic plants

探针 Probe: <sup>32</sup>P-GUS gene; P: Plasmid p35SGUSINT;

CK: 非转化植株 Non-transformed plant;

1-4: 转化植株 Transformed plants

分菌体细胞壁溶解,菌体内形成颗粒状内含物<sup>[9]</sup>,这可能是 T-DNA 释放和转移的一种机制。在本实验中,农杆菌间经紧密联结或形成小纤丝相互联系,同时形成小纤丝固定于金鱼草下胚轴细胞表面(图版 I:7),是实现转化下胚轴细胞的第一步。

在农杆菌转化植物细胞过程中,外源基因随着 T-DNA 片段整合进植物基因组中。GUS 基因是近年来植物基因工程中应用最为广泛的报告基因之一。其产物的组织化学染色分析法能直观地反映 GUS 基因在不同组织、不同器官甚至不同细胞中的表达情况。常用的 GUS 基因既可在农杆菌中表达,又可在植物细胞中表达,容易造成组织化学染色假象,因而不能真实地反映转化植株 GUS 基因表达情况。我们选用的载体农杆菌 LBA4404,所含质粒 p35SGUSINT 上的 GUS 基因内带有一段高等植物基因的内含子,不能在农杆菌中正确表达,只有当它进入高等植物细胞后,在真核细胞内的转录、翻译系统下才能正确表达。因此,利用带有内含子的 GUS 报告基因的 Ti 质粒为转化载体,可通过 GUS 化学染色分析,快速而又简便地鉴别转化植株。我们的实验结果表明:GUS 基因在转基因金鱼草中得到表达,并且在茎中,GUS 酶活性分布不均匀,在维管束部位表达较强。DNA/DNA 斑点杂交进一步证实 GUS 基因存在于植物细胞中。

### 参考文献

- 1 Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 1991, 353:31-37
- 2 Sommer H, Bonas U, Saedler H. Transposon-induced alteration in the promoter region affect transcription of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*. *MGG*, 1988, 211:49-55
- 3 Handa T. Genetic transformation of *Antirrhinum majus* L. and inheritance of altered phenotype induced by Ri T-DNA. *Plant Science*, 1992, 81:199-206
- 4 Mugnier J. Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*, 1988, 7:9-12
- 5 余迪求, 邓庆丽, 沈亚楠等. 金鱼草下胚轴组织培养的研究. *园艺学报*, 1996, 23:99-100
- 6 Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1988, 12:13-15
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning, A laboratory manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988
- 8 Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO J*, 1987, 6:3901-3907
- 9 余迪求, 许耀, 李宝健. 根瘤农杆菌转化谷子细胞早期的细胞生物学研究. *中山大学学报(自然科学版)*, 1994, 33:10-17
- 10 欧阳学智, 许耀, 李宝健. 小麦悬浮培养细胞与根瘤农杆菌相互作用的亚显微生物学研究, I 农杆菌附着于小麦细胞的扫描电镜观察. *中山大学学报论丛*, 1992, 8:55-60

### 图版说明

1. 金鱼草转化实验结果; a. 对照; b. G418 抗性小芽; c. G418 抗性小植株;
2. 开花的转基因植株;
- 3-4. 抗性植株 GUS 基因表达组织化学分析;

3. 非转化再生植株茎横切面;
4. 转化的 G418 抗性再生植株茎横切面;
- 5-7. 农杆菌与下胚轴相互作用的扫描电镜观察;
  5. 未与农杆菌共培养的下胚轴;  $\times 1000$
  6. 与农杆菌共培养的下胚轴, 示大量农杆菌附着于下胚轴表面;  $\times 3000$
  7. 图 6 的部分放大;  $\times 6000$

### Explanation of plate

1. Experiment of hypocotyl transformation of *Antirrhinum majus* with *Agrobacterium tumefaciens* (p35SGUSINT);
  - a. CK; b. G418-resistant regenerated buds; c. G418-resistant regenerated plants
2. Transgenic plants with flowers;
- 3-4. Histochemical assay of GUS gene expression in G418-resistant plants;
  3. Transverse stem of transformed regenerated plants;
  4. Transverse stem of non-transformed regenerated plants;
- 5-7. Scanning electron microscopic observation of interaction between *Agrobacterium tumefaciens* (p35SGUSINT) and hypocotyl explants;
  5. Hypocotyl surface of non-cocultivated with *Agrobacterium tumefaciens*;  $\times 1000$
  6. Hypocotyl surface of cocultivated with *Agrobacterium tumefaciens*. Showing attachments of many bacteria to the surface of explants;  $\times 3000$
  7. Magnification of a part of Fig. 6.  $\times 6000$