

硝酸银对桑树遗传转化的作用(简报)

钟名其¹ 楼程富² 谈建中³ 周金妹² 张有做²

(1. 汕头大学理学院生物学系, 广东 汕头 515063; 2. 浙江大学蚕学系, 浙江 杭州 310029;
3. 苏州大学蚕桑学院, 江苏 苏州 215151)

摘要: 调查了硝酸银对农杆菌介导的桑(*Morus alba* L.)品种“新一之瀨”遗传转化的作用。在抗性筛选培养基中添加 2 mg L⁻¹ 硝酸银, 桑叶盘褐化死亡率减少 7.2%, 抗性芽分化率增加 3.9%, 外源基因转化频率增加 9.6%, “假阳性”转化体减少 42.5%。感染农杆菌的桑叶经 MS 培养基培养、农杆菌液体培养和固体培养基上划线培养等实验证实, 硝酸银对工程农杆菌 LBA4404 的生长具有抑制作用, 这可能是提高桑树转化频率的原因之一。

关键词: 桑树; 遗传转化; 根癌农杆菌; 硝酸银

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-3395(2002)01-0074-03

The Effect of Silver Nitrate on Genetic Transformation in White Mulberry (*Morus alba* L.)

ZHONG Ming-qi¹ LOU Cheng-fu² TAN Jian-zhong³ ZHOU Jing-mei² ZHANG You-zuo³

(1. Department of Biology, Science College, Shantou University, Shantou 515063, China; 2. Department of Sericulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 3. School of Sericulture, Suzhou University, Suzhou 215151, China)

Abstract: To determine the effect of silver nitrate on genetic transformation, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated leaves of *Morus alba* cv. Shinichinose were used as explants cultured on kanamycin-resistant screening medium (MS basal medium supplemented with 200–400 mg L⁻¹ carbenicillin and 30–40 mg L⁻¹ kanamycin), to which 2 mg L⁻¹ silver nitrate was added. The results showed that the rate of browning leaf discs infected with *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 decreased by 7.2%, regeneration frequency of kanamycin-resistant buds increased by 3.9%, transformation frequency of Gly gene increased by 9.6%, and the false positive transformants as detected by PCR decreased by 42.5%. The experiments demonstrated that silver nitrate had inhibiting effect on the growth of strain LBA4404, which might increase transformation frequency in white mulberry.

Key words: Mulberry; Genetic transformation; *Agrobacterium tumefaciens*; Silver nitrate

近些年,将硝酸银应用于植物(尤其是芸苔属)遗传转化研究,以提高外源基因的转化效率已有若干报道,但一般都从硝酸银可促进这些植物组织培养不定芽分化来解释^[1-4]。笔者也曾证实,在分化培养基添加 1–2 mg L⁻¹ 硝酸银,对桑树叶片培养不定芽分化具有明显促进作用^[5],但有关硝酸银对农杆菌介导的桑树等多年生木本植物的遗传转化有何影响尚不清楚。本研究在完善桑叶片培养植株再生体系的基础上,探讨了硝酸银对农杆菌介导的桑叶盘遗传转化的影响,并就其机理进行初步分析。

收稿日期: 2001-01-16 接受日期: 2001-05-28
基金项目: 国家自然科学基金项目(39570556)

1 材料和方法

外植体的准备 桑 (*Morus alba* L.) 品种“新一之濂”试管苗由浙江大学蚕学系保存。实验时, 选取试管苗上大小均一的幼嫩叶片, 去除叶柄, 切成 0.5 cm × 1 cm 叶盘作为转化的起始外植体。

工程农杆菌、培养基和试剂 工程农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 的 Ti 质粒含 kan(卡那霉素)抗性筛选标记和外源基因 Gly(大豆球蛋白 A1aB1b 亚基基因)^[6]。桑叶盘转化所用培养基与文献^[7]相同, 其中筛选培养基 MS₃ 配方为: MS + BA 5.0 mg L⁻¹ + NAA 0.2 mg L⁻¹ + Cab (羧苄青霉素) 200–400 mg L⁻¹ + kan 30–40 mg L⁻¹ + AgNO₃ 0–2 mg L⁻¹。AgNO₃, kan 和 Cab 为 Sigma 公司产品, 其余均为国产分析纯试剂。

农杆菌活化和液体培养 从 LB 平板上, 挑 LBA4404 单菌落, 接种于 5 ml LB 液体培养基, 于 28±1℃, 150 r min⁻¹ 黑暗条件下振荡过夜培养, 即为活化菌液。液体培养实验时, 取 3 μl 活化菌液分别接种于含不同浓度 (0–16 mg L⁻¹) 硝酸银的 5 ml LB 液体培养基, 振荡培养, 每隔 2–4 h, 肉眼观察并记录培养基开始出现混浊的时间。

转化、筛选和检测 取活化菌液感染 5 min 的桑叶盘, 用灭菌滤纸吸去叶盘表面多余菌液, 于过渡培养基中共培养 3 d, 再接种到筛选培养基 (含硝酸银 0–2 mg L⁻¹), 每周更换一次, 直至筛选出抗性芽。将抗性芽繁殖和生根培养, 并进行 PCR 检测。

桑叶盘表面农杆菌的生长 将农杆菌感染并吸去多余菌液后的桑叶盘直接接种于添加不同浓度 (0–4 mg L⁻¹) 硝酸银的分化培养基中, 每个浓度接种 3 瓶, 每瓶 8–10 片叶盘, 于 28℃ 光照培养箱中培养, 调查叶盘表面出现微菌落的情况。

2 结果和分析

2.1 硝酸银对农杆菌介导的桑叶盘遗传转化的影响

桑叶盘褐化和抗性芽分化结果如表 1。筛选培养基中添加 2 mg L⁻¹ 硝酸银, 褐化乃至死亡的叶盘比未添加硝酸银减少 7.2%, 抗性芽分化率增加 3.9%。可见, 硝酸银不仅能减轻农杆菌感染和抗性筛选剂 kan 对桑叶盘造成的褐化死亡现象, 而且对抗性芽分化也有一定促进作用。此外调查还发现硝酸银处理的抗性芽分化时间比未添加硝酸银的缩短 5–7 d。

表 1 硝酸银对农杆菌感染后桑叶盘存活和抗性芽分化的影响
Table 1 Effect of AgNO₃ on the survival of white mulberry leaf discs infected with *Agrobacterium* and on kanamycin-resistant bud regeneration

AgNO ₃ (mg L ⁻¹)	接种叶盘数 No. of infected leaf discs	褐化叶盘数* No. of browning leaf discs	有分化芽叶盘数** No. of leaf discs with buds	转化叶盘数*** No. of leaf discs with genetic transformation
0	108	22(20.2±2.1)	17(15.7±1.1)	6(5.6±0.4)
2	92	12(13.0±1.6)	18(19.6±0.8)	14(15.2±0.7)

*, ** 分别培养 7 和 28 d 调查 Determined after 7 and 28 days of culture on MS medium, respectively;

***PCR 检测 Detected by PCR; 括号内的数字为百分率 Figures in parentheses are percentage;

所有数据为两次实验的平均 All data are the mean of two experiments.

对上述转化所获得的抗性芽进行 PCR 检测证实, 添加硝酸银的外源基因转化频率比对照提高 9.6%, 且“阳性”转化体的比例达 77.8% (14/18), 比对照区 35.3% (6/17) 高 42.5%。可见, 添加硝酸银后“假阳性”转化体的比例大大减少。

2.2 硝酸银对桑叶盘表面农杆菌生长的影响

根据叶盘表面出现微菌落的时间调查(表 2),未添加硝酸银区,叶盘培养 3 d 就有微菌落出现,15 d 后,所有叶盘均长出微菌落;当添加 1 mg L^{-1} 硝酸银时,微菌落开始出现的时间略有推迟(4 d),培养 15 d 后,含微菌落叶盘比未添加硝酸银时减少 21.4%;而添加 2 mg L^{-1} 以上硝酸银时,微菌落出现时间推迟了 9–11 d,培养 15 d 后,含微菌落叶盘少于 1/3(28.6%)。可见硝酸银可延缓农杆菌感染后桑叶盘表面微菌落的出现,且浓度大于 2 mg L^{-1} 时,硝酸银对 LBA4404 的生长具有较强抑制作用。

表 2 硝酸银对桑叶盘表面农杆菌生长的影响
Table 2 Effect of AgNO_3 on the growth of *Agrobacterium* on the surface of white mulberry leaf discs

AgNO_3 (mg L^{-1})	叶盘总数 No. of leaf discs	微菌落叶盘数 No. of leaf discs with little-colony	微菌落出现时间(d) Days of appearance of little-colony
0	28	28(100)	3
1	28	22(78.6±2.7)	4
2	28	8(28.6±3.6)	12
4	28	8(28.6±1.4)	14

微菌落叶盘为培养 15 d 调查,括号内的数字为百分率 No. of leaf discs with little-colony were counted after 15 days of culture on differentiation medium. Figures in parentheses are percentage.

2.3 硝酸银对液体培养农杆菌生长的影响

农杆菌液体培养时培养基开始出现混浊的时间,除 1 mg L^{-1} 硝酸银处理的培养基开始混浊的时间与对照相同($8 \pm 2 \text{ h}$)外,其余浓度开始混浊时间都不同程度推迟($8-88 \text{ h}$),且硝酸银浓度越高,开始出现混浊的时间越迟。可见硝酸银对液体培养 LBA4404 的生长具有抑制作用,硝酸银浓度越大,抑制作用越明显。

3 讨论

在筛选培养基中添加 2 mg L^{-1} 硝酸银,不仅可减少桑叶盘褐化死亡,促进抗性芽分化,而且还能提高外源基因转化频率,尤其能减少“假阳性”转化体的比例。此外,抗性芽分化时间也缩短 5–7 d。说明硝酸银对桑树遗传转化确有促进作用,这与油菜^[4]、诸葛菜^[1]、甘蓝^[3]等植物的报道一致。推测硝酸银这一作用在双子叶植物中具有普遍性,但对单子叶植物的效果如何尚需进一步论证。

周冀明等曾发现硝酸银对农杆菌 A208se 生长有抑制作用^[5],本实验也证实它对农杆菌 LBA4404 的生长具有抑制作用。我们推测硝酸银的作用在于抑制了叶盘表面农杆菌细胞的活力,继而减轻了农杆菌大量生长对叶盘过敏性反应造成的褐化死亡现象,使得叶盘生长和分化能力增强,从而提高转化频率。但硝酸银对遗传转化是否有直接影响尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 周冀明,卫志明,许智宏,等.根癌土壤杆菌介导转化诸葛菜子叶获得转基因植株[J].生物工程学报,1996,12(1):34–39.
- [2] 毛慧珠,唐惕,曹湘玲,等.抗虫转基因甘蓝及其后代的研究[J].中国科学(C辑),1996,26(4):339–347.
- [3] Barfield D G, Pua E-C. Gene transfer in plants of *Brassica juncea* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation [J]. Plant Cell Reports, 1991,10:308–314.
- [4] De Block M, De Brouwer D, Tenning P. 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, 1989, 91: 694–701.
- [5] 钟名其,楼程富,谈建中,等. AgNO_3 对桑叶片培养不定芽分化的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(1): 97–100.
- [6] 谈建中,楼程富,平野久,等. 大豆球蛋白基因表达载体的构建及对桑树的遗传转化[J]. 蚕业科学, 1999, 25(1): 5–10.
- [7] 钟名其,楼程富,谈建中,等. 农杆菌介导的桑树遗传转化条件的研究[J]. 蚕桑通报, 1999, 30(4): 16–18.