

文章编号: 1007-4627(2008)04-0414-05

X射线辐照对发根农杆菌介导芸芥遗传转化的影响*

武振华¹, 张红^{1, #}, 牛炳韬², 李莎³, 王根轩², 孙鹏⁴, 刘斌¹, 李宁¹

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃兰州 730000;

2 兰州大学生命科学学院, 甘肃兰州 730000;

3 兰州军区陆军总医院, 甘肃兰州 730000;

4 甘肃省建筑工程总公司第一中学, 甘肃兰州 730000)

摘要: 探讨了X射线辐照对芸芥发状根诱导的影响, 为研究辐射对转基因技术的协同作用提供一定的实验依据。以芸芥无菌苗的子叶为材料, 通过5—20 Gy的X射线辐照和不等浸染时间的联合处理, 研究苗龄、预培养时间、辐照剂量及其浸染时间等因素对芸芥发状根诱导的影响作用, 并通过聚合链酶式反应(PCR)对所得发状根进行了分子水平的鉴定。15 Gy X射线辐照能提高芸芥发状根的诱导频率, 且有量效关系, 其中先浸染后辐照比先辐照后浸染效果更显著; PCR结果也表明, 发根农杆菌R1000的 *rolB*基因已成功地被转入并整合到该发状根的基因组中。X射线辐照对芸芥发状根的诱导具有一定的促进作用, 且最佳推荐诱导剂量为15 Gy或稍多。

关键词: X射线; 辐照; 芸芥; 发状根

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

1 引言

随着基因分离、克隆、重组及转基因技术的日趋成熟, 遗传转化已发展成为植物基因表达调控和物种改良的有效研究手段。其中农杆菌介导法由于具有转移DNA片段大、成本低、再生植株育性稳定、无须原生质体培养和外源基因拷贝数低等优点而日渐成为植物遗传转化最重要的方法之一^[1]。然而, 转化频率低和重复性差仍然是一个比较棘手的问题。因此, 如何建立适宜不同物种的有效转化体系, 提高转化频率值得探讨。现已证明乙酰丁香酮AS、农杆菌菌液的浓度和共培养时间等条件的优化都会对转化频率产生一定的影响^[2, 3]。但有关辐照处理对发状根诱导频率的影响尚未见报道。

芸芥(*Eruca Sativa* Mill)是十字花科芝麻菜属植物, 油料、蔬菜兼用, 以其优异的抗旱、耐瘠、抗病性而著称, 是芸薹属乃至整个十字花科植物育种的重要资源^[4], 目前对芸芥的研究仅局限于栽培及

遗传多样性等方面, 而有关其遗传转化的研究还未见报道。为了探讨辐射对植物遗传转化频率的影响, 本研究通过X射线和发根农杆菌的联合介导, 建立了芸芥发状根培养的高频转化体系, 为转基因技术的深化提供了一定的实验依据。

2 材料与方法

2.1 植物材料及菌株

选饱满的青城芸芥种子, 用70%的乙醇消毒30 s, 0.1%的HgCl₂浸泡8 min, 无菌水冲洗干净, 无菌滤纸吸干, 接种于MS固体培养基, (20±1) °C, 12 h/d, 1000 LX的光照条件下培养。

发根农杆菌选用R1000菌株, 挑取单菌落接种于含50 mg/l Kana的YEB液体培养基(pH 5.4)^[5], 恒温振荡培养(28 °C, 180 r/min)至菌液在600 nm波长处的吸光值(OD₆₀₀)为0.6—0.8。再取100—200 μl该菌液与10 ml新鲜的YEB培养液混合, 在

* 收稿日期: 2008-02-04; 修改日期: 2008-04-03

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(1075151); 甘肃省重大科技专项项目(O702NKDA045); 兰州市科技攻关项目(07-2-07); 中国科学院西部之光人才培养计划项目(O760160XB0); 甘肃省自然科学基金资助项目(O803RJZA074)

作者简介: 武振华(1974—), 男(汉族), 甘肃通渭人, 硕士研究生, 从事辐射生物学效应研究; E-mail: wuzhh@impcas.ac.cn

通讯联系人: 张红, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

相同条件培养到(OD_{600}) 约为0.2—0.5 时进行转化。

2.2 转化

取3—6 d苗龄的无菌苗子叶和下胚轴, 在MS培养基上预培养1—4 d后, 先用活化的R1000菌液分别浸染5, 10, 15, 20, 25, 30, 35和40 min, 再用5, 10, 15和20 Gy的X射线分别辐照处理, 或先分别用5, 10, 15和20 Gy的X射线辐照处理, 再分别用活化的R1000菌液浸染5, 10, 15, 20, 25, 30, 35和40 min, 无菌滤纸吸干, 置于无激素的MS固体培养基, 25 °C, 黑暗环境下共培养2 d。同时设不辐照只浸染组和不辐照不浸染组作为对照。继代培养14—21 d后, 切下外植体上长出的发状根, 转移至含头孢噻肟钠(cef) 500 mg/L^[6]的MS选择培养基, 每7 d转一次, 并逐渐降低cef浓度, 6—7代后, 转入不含cef的1/2 MS培养基, 建立离体扩繁体系。

该实验的每个处理至少重复3次, 每瓶至少接种10块外植体。21 d后统计转化率和出根密度:

转化率(%) = (产生发根的外植体数/外植体总数) × 100%;

出根密度 = 所有外植体产生的发根总数/出根外植体总数。

2.3 发状根的PCR检测

按钟军等^[7]改进的SDS法, 提取芸芥发状根基因组DNA, 并以芸芥无菌苗基因组DNA为阴性对照, 提取的DNA溶解于TE, 4 °C保存备用。

使用Zdravkovic korac等^[8]依据Slightom等^[9]公布的*rolB*基因序列设计的引物进行聚合链酶式反应(PCR)扩增, 其中PCR扩增引物为: 5'-ATG GAT CCC AAA TTG CTA TTC CTT CCA CGA-3'(上游); 5'-TTA GGC TTC TTT CTT CAG GTT TAC TGC AGC-3'(下游), 由上海生物工程技术服务有限公司合成。扩增条件为: 95 °C预变性5 min, 94 °C变性1 min, 61 °C退火1 min, 72 °C延伸1 min, 共36个循环; 72 °C继续延伸10 min。扩增产物在1%的琼脂糖凝胶上分离, 紫外检测仪中观察并拍照。

3 结果与分析

3.1 发状根的形态发生

芸芥的两种不同外植体分别被R1000菌株感

染10 d后, 均能陆续长出幼根。这些幼根具有发状根的典型特征, 单生、双生或丛生, 白色根毛, 细而柔软, 质脆, 易断裂, 贴壁向上或沿培养基表面生长, 无向地性。脱除菌后, 在无激素的1/2 MS培养基上迅速生长并产生许多分枝(图1); 而未经农杆菌浸染的子叶和下胚轴, 偶有几个小根长出, 且向下长入培养基, 在无激素的1/2 MS培养基上逐渐褐化并最终死亡。由图2和表1可以看出, 子叶的转化率要高于下胚轴, 但不同处理的同种外植体诱导率差异不显著($a P > 0.05$, $b P > 0.05$), 且苗龄、预培养时间及浸染时间对转化率有一定的影响, 其中最佳的苗龄、预培养时间和浸染时间分别为4 d, 2 d和15 min, 所以后面的实验都是以4 d苗龄的子叶作为外植体, 预培养2 d后, 以R1000菌株作为供体菌浸染15 min进行转化的。

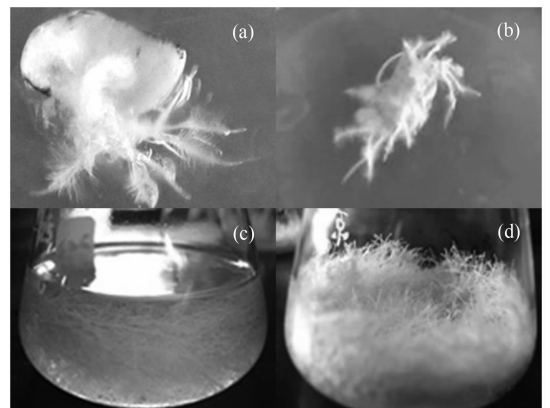


图1 不同情况下的芸芥发状根

(a) 只浸染不辐照, (b) 浸染加辐照, (c) 液体培养的发状根, (d) 固体培养的发状根。

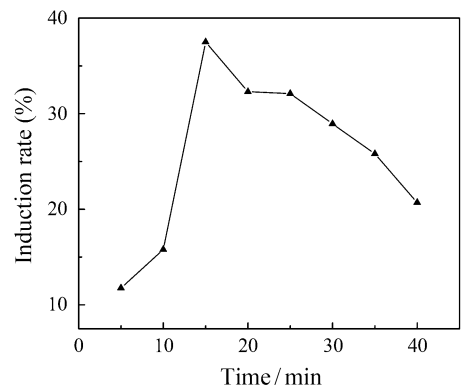


图2 浸染时间对发状根诱导率的影响

表1 外植体种类、苗龄及预培养时间对发状根诱导的影响*

苗龄/d	预培养时间/d	接种外植体数/block		发状根诱导率(%)	
		子叶	下胚轴	子叶	下胚轴
3	1	24	27	16.7 ^a	11.1 ^b
4	2	31	29	22.6 ^a	17.2 ^b
5	3	25	27	20.0 ^a	18.5 ^b
6	4	25	22	16.0 ^a	13.6 ^b

* 子叶诱导率相互间无显著性差异 a $P > 0.05$; 下胚轴诱导率相互间无显著性差异 b $P > 0.05$ 。

3.2 X射线辐照对芸芥发状根诱导的影响

芸芥无菌苗的子叶不用发根农杆菌浸染也不辐照时,没有发状根产生,但经过发根农杆菌浸染以后,无论辐照与否,都会诱导产生一定数量的发状根。由表2可以看出,与只浸染不辐照的对照组相比,经X射线辐照后,芸芥发状根的诱导率显著增加(a $P < 0.01$, b $P < 0.05$),且对辐射剂量具有一定的依赖性。发状根密度也有所增加,开始出根的时间也有所提前,且当辐射剂量超过15 Gy后,诱导率和发状根密度似乎降低,但差异都不显著,无统计学意义;相同的辐照剂量,先浸染后辐照的发状根诱导率比先辐照后浸染的要高(c $P < 0.05$)。

3.3 发状根中rolB基因的PCR扩增结果分析

rolB 是发根农杆菌 Ri 质粒 TL-DNA 上与发状根形成密切相关的基因^[10],如图3所示。利用

rolB基因序列设计的引物,能从芸芥发状根的总DNA中扩增到期望的约450 bp的特异性 DNA 片段,而阴性对照的基因组DNA 中则扩增不到此片段。这说明发根农杆菌的Ri质粒TL-DNA上的rolB基因已经转入并整合到了芸芥的发状根基因组中。

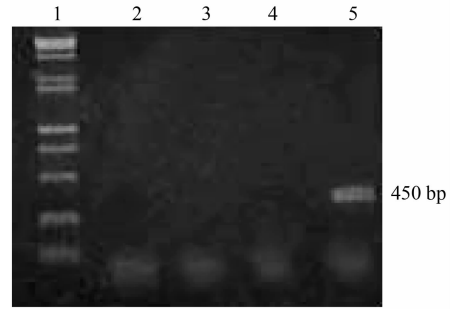


图3 芸芥发状根中rol B基因的PCR检测

1为Marker; 2, 3和4为阴性对照(正常根)的扩增条带; 5为阳性克隆(发状根)的扩增条带。

表2 X射线辐照对芸芥发状根诱导的影响*

处理方式	辐射剂量 /Gy	出根时间 /d	外植体数 /block	发状根诱导率 (%)	发状根诱导密度
不浸染不辐照	0	0	27	0	0
只浸染不辐照	0	14	38	21.1	1.5
先浸染后辐照	5	10	18	44.4 ^{ac}	1.75
	10	11	22	45.5 ^{ac}	2.2
	15	10	28	50.0 ^{ac}	2.0
	20	11	36	50.0 ^{ac}	1.7
	先辐照后浸染	5	10	48	33.3 ^b
	10	10	38	36.32 ^b	2.8
	15	11	32	43.8 ^a	2.57
	20	11	28	42.9 ^a	2.33

* 与只浸染不辐照组相比: a $P < 0.01$, b $P < 0.05$; 与先辐照后浸染组相比c $P < 0.05$ 。

4 讨论

辐照能引起生物体的损伤甚至变异,但也有文献报道,较低剂量的辐照可以打破种子的休眠、增强机体抗性、提高作物产量、促进基因转移和细胞加工,对生物体具有一定的积极意义^[11-17]。

本研究发现,不同剂量的X射线辐照,能够使芸芥发状根的出根时间提前,诱导率和出根密度有所增加。然而,当辐射剂量超过15 Gy时,诱导率和出根密度似乎有所降低。这可能是由于生物组织具有疏松而不均匀的结构,射线的辐照会使外植体的损伤伤口形成较深的直通孔道,也就是说,射线辐照促使了外植体伤口处生物沟道的连通,形成了外源大分子导入的通道,为介导外源基因的转入提供了更多的机会,从而表现为转化频率的提高。但辐照剂量过高,DNA链尤其是染色体被过度损伤,使其损伤难以修复甚至导致细胞死亡,组织存活率降低,从而使转化率也下降。结果提示,X射线辐照的辅助处理方法对发根农杆菌介导芸芥的遗传转化具有一定的促进作用,这为利用农杆菌介导法进行其他植物的遗传转化提供了一定的实验依据。

本研究还发现,先浸染后辐照的发状根诱导率比先辐照后浸染的要高。这可能是由于辐照条件使外植体伤口处发根农杆菌Ti质粒的T-DNA区段被诱导并激活,从而促进T-DNA区段的剪切,提高T-DNA区段整合进植物基因组的几率而提高了转化频率。对先浸染后辐照的处理而言,射线既促使外植体形成了较多的转基因通道,又使发根农杆菌Ti质粒的T-DNA片段被诱导并激活,而先辐照后浸染的处理相当于射线只对外植体形成了较多的转基因通道,所以,前者转化频率较后者要高。

参考文献(References):

- [1] Wang Guanlin, Fang Hongjun. *Plant Gene-engineering*. Beijing: Technology Press, 2002, 499(in Chinese).
(王关林,方宏筠.植物基因工程.北京:科技出版社,2002,499.)
- [2] Fu Chunxiang, Jin Zhiping, Yang Rui, *et al.* *Acta Bioengin*, 2004, **20**(3): 366(in Chinese).
(付春祥,金治平,杨睿等.生物工程学报,2004, **20**(3): 366.)
- [3] Xu Hongwei, Zhou Xiaofu. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2003, **11**(3): 45(in Chinese).
(徐洪伟,周晓馥.中国生态农业学报,2003, **11**(3): 45.)
- [4] Hou Kuanzhao, Wu Delin, Gao Yunzhang, *et al.* *Chinese Dictionary of Seed Plants Family*. Beijing: Science Press, 1984, 184(in Chinese).
(侯宽昭,吴德邻,高蕴璋等.中国种子植物科属词典.北京:科学出版社,1984,184.)
- [5] Yu Shuhong, Li Ling, Liu Chuanfei, *et al.* *High Technology Letter*, 2002, **3**: 34(in Chinese).
(于树宏,李玲,刘传飞等.高技术通讯,2002, **3**: 34.)
- [6] Wang Li, Yu Rongmin, Zhang Hui, *et al.* *Acta Bioengin*, 2002, **18**(1): 69(in Chinese).
(王莉,于荣敏,张辉等.生物工程学报,2002, **18**(1): 69.)
- [7] Zhong Jun, Li Muxun, *Biotechnology*, 2002, **12**(5): 18(in Chinese).
(钟军,李木旬.生物技术,2002, **12**(5): 18.)
- [8] Zdravkovic-Korac S, Muhovski Y, Druart P, *et al.* *Plant Cell Rep*, 2004, **22**: 698.
- [9] Slightom J, Durand-Tardif M, Jouanin L, *et al.* *J Biol Chem*, 1986, **261**: 108.
- [10] Di-Cola A, Costantino P, Spanò L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1996, **46**: 203.
- [11] Wen Xianfang. *China Nuclear Agriculture Sciences*. Zhengzhou: Henan Technology and Science Press, 1999, 116(in Chinese).
(温贤芳.中国核农学.郑州:河南科学技术出版社,1999, 116.)
- [12] Yu Zengliang. *Introduction to Ion Beam Biotechnology*. Anhui: Anhui Sci Tech Press, 1998, 177—180(in Chinese).
(余增亮.离子束生物技术引论.安徽:安徽科学技术出版社,1998, 177—180.)
- [13] Han Jianwei, Yu Zengliang. *Acta Biophys Sin*, 1998, **14**(4): 757(in Chinese).
(韩建伟,余增亮.生物物理学报,1998, **14**(4): 757.)
- [14] Yu Zengliang, Yang Jianbo, Wu Yuejin, *et al.* *Nucl Instr and Meth*, 1993, **B80/81**: 1 328.
- [15] Yang Jianbo, Wu Lijun, Wu Jiadao, *et al.* *Sci Bull*, 1994, **39**(16): 1 530(in Chinese).
(杨剑波,吴李君,吴家道等.科学通报,1994, **39**(16): 1 530.)
- [16] Xiao Guoqing, Song Mingtao, Li Wenjian, *et al.* *Nuclear Physics Review*, 2008, **25**(2): 161(in Chinese).
(肖国青,宋明涛,李文建等.原子核物理评论,2008, **25**(2): 161.)
- [17] Zhou Libin, Li Wenjian, Qu Ying, *et al.* *Nuclear Physics Review*, 2008, **25**(2): 165(in Chinese).
(周利斌,李文建,曲颖等.原子核物理评论,2008, **25**(2): 165.)

Effects of X-ray Irradiation to Genetic Transformation of *Eruca sativa* Mill Mediated by *Agrobacterium rhizogenes**

WU Zhen-hua¹, ZHANG Hong^{1, #}, NIU Bing-tao², LI Sha³, WANG Gen-xuan²,
SUN Peng⁴, LIU Bin¹, LI Ning¹

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

2 *School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;*

3 *General Hospital of Lanzhou Military Area, Lanzhou 730050, China;*

4 *First Middle School, Gansu Construction Engineering Corporation, Lanzhou 730000, China)*

Abstract: To investigate the effects of X-ray irradiation to the hairy root induction of *Eruca sativa* Mill, and to provide basic experimental data for concerted reaction of irradiation to the Genetic transformation technology. The aseptic cotyledons of *Eruca sativa* Mill were jointly treated with the X-ray at dose of 5, 10, 15, 20 Gy respectively and the different infected time, then the influence of explant age, pre-culturing time, dose of X-ray and infected time were studied. Furthermore, the hairy roots were testified in molecular level by the polymerase chain reaction(PCR). The irradiation of X-ray at dose of 15 Gy can improve the frequency of *Eruca sativa* Mill hairy root induction in a dose-dependent manner. Moreover, the transformation frequency in pre-infection plus irradiation group is higher than that in pre-irradiation plus infection group at the same irradiation dose. In addition, the PCR analysis also demonstrated that *rolB* gene of T-DNA from Ri plasmid had been integrated into the genome of the transformed roots. The irradiation of X-ray has some positive effects on the hairy root induction of *Eruca sativa* Mill, and the optimal revulsive dose is 15 Gy or a little bit more.

Key words: X-ray; radiation; *Eruca sativa* Mill; hairy root

* **Received date:** 28 Feb. 2008; **Revised date:** 3 Apr. 2008

* **Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (10675151); Scientific Technology Research Project of Gansu Province (O702NKDA045); Lanzhou Program for Science and Technology Development (07-2-07); Western Light Talents Training Program of Chinese Academy of Sciences (O760160XB0); Natural Science Foundation of Gansu Province of China(O803RJZA074)

Corresponding author: Zhang Hong, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn