

# 激素对油菜子叶再生及转基因瞬间表达的影响<sup>①</sup>

谢伶俐<sup>1,2</sup>, 殷家明<sup>1</sup>, 李加纳<sup>1</sup>,  
柴友荣<sup>1</sup>, 许本波<sup>1,2</sup>, 林 呐<sup>1</sup>

1. 重庆市油菜工程技术研究中心, 西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400716;

2. 长江大学 生命科学学院, 湖北 荆州 434000

**摘要:** 以甘蓝型油菜“湘油 15”子叶为外植体, 以 MS 为基本培养基, 采用正交试验设计, 研究了预培养基 2,4-D 和 6-BA 浓度、分化/共培养基 NAA 和 6-BA 浓度对子叶芽再生频率和转 GUS 基因瞬间表达率的影响. 结果表明, 激素对芽再生频率和转基因瞬间表达率都有重要影响, 但激素对芽再生和转基因瞬间表达的影响效应具有不一致性. 激素对芽分化的影响程度从大到小依次为再生培养基 NAA、预培养基 6-BA、预培养基 2,4-D、再生培养基 6-BA, 推导的对于芽再生的最佳激素组合方案为预培养基 2,4-D 1.0 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L、再生分化培养基 NAA 0.2 mg/L 和 6-BA 3.0 mg/L; 激素对 GUS 基因瞬间表达的影响程度从大到小依次为共培养基 NAA、共培养基 6-BA、预培养基 6-BA、预培养基 2,4-D, 推导的对于瞬间表达的最佳激素组合方案为预培养基 2,4-D 0 mg/L 和 6-BA 0.2 mg/L, 共培养基 NAA 0.05 mg/L 和 6-BA 3.0 mg/L. 推导的对于芽再生频率×GUS 基因瞬间表达率的最佳激素组合方案为预培养基 2,4-D 1.0 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L, 共/分化培养基 NAA 0.05 mg/L 和 6-BA 3.0 mg/L.

**关键词:** 甘蓝型油菜; 子叶; 激素; 再生; 瞬间表达

**中图分类号:** S634.3

**文献标识码:** A

油菜是重要的油料作物, 人们越来越重视通过基因工程技术改良油菜品种. 目前油菜基因转化的方法以农杆菌介导法为主, 农杆菌介导法与其他方法如电激法、基因枪法、显微注射法、激光微束穿刺法等相比具有独特的优势, 它能使目标基因稳定地整合到受体基因组中, 并以孟德尔遗传方式传给下一代<sup>[1,2]</sup>. 在油菜中应用根癌农杆菌导入外源基因已有一些报道, 但转化效率受品种基因型限制大, 而且转化频率普遍偏低, 极大地阻碍了该技术的应用<sup>[3-6]</sup>. 外源基因的转化效率受 T-DNA 转移到植物细胞、T-DNA 整合到植物染色体以及转化细胞再生植株等关键环节影响. 高效的受体再生体系和 T-DNA 高效转移到植物细胞是遗传转化成功的重要前提<sup>[3,4]</sup>. 在油菜中, 关于激素对外植体再生的作用已有很多报道<sup>[4,6-9]</sup>, 而关于激素对转基因瞬间表达的影响及其对再生和转基因瞬间表达影响之间关系的报道很少.

## 1 试验材料和方法

### 1.1 试验材料

供试材料为甘蓝型油菜“湘油 15”. 根癌农杆菌菌株为 LBA4404. Ti 质粒 pF3HA 带有 CaM 35S 启动

① 收稿日期: 2006-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30330400).

作者简介: 谢伶俐(1981-), 女, 湖北随州人, 硕士研究生, 主要从事植物基因克隆和遗传转化研究.

通讯作者: 殷家明

子驱动的和油菜黄籽性状形成有关的黄烷酮 3-羟化酶基因(F3H)反义片断和 GUS 报告基因。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 外植体的获得

种子用 75%乙醇消毒 1 min 后用无菌水冲洗,然后用 5%次氯酸钠浸泡 20 min,无菌水冲洗干净后接种于 MS 培养基上,25 ℃暗培养 2 d 后移到光下,16 h/d 光周期培养。切取苗龄 5 d 左右无菌苗的带柄子叶进行试验。

### 1.2.2 工程菌液的制备

菌种在加有 50.0 mg/L 卡拉霉素、50.0 mg/L 链霉素和 25.0 mg/L 利福平的 LB 固体培养基上划线培养。挑取单菌落接种于加有上述抗生素的 LB 液体培养基中,28 ℃下 200 r/min 振荡培养。农杆菌生长至对数期后,4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 MS 液体培养基悬浮农杆菌至 OD<sub>600</sub>为 0.3 左右,28 ℃下 200 r/min 振荡培养 6 h 供浸染用。

### 1.2.3 激素对再生和瞬间表达的影响

带柄子叶在预培养基上培养 2 d 后,一部分转接于再生分化培养基上,培养 20 d 后统计芽再生频率;另一部分用制备好的工程菌液浸染 10 min,取出吸干多余菌液,于共培养基上共培养 3 d,切取子叶柄伤口处的愈伤组织薄片,参照 Jefferson<sup>[10]</sup>的方法进行 GUS 瞬间表达组织化学染色检测。

以 MS 为基本培养基,预培养基添加一定量的 2,4-D(0、0.3、1.0 mg/L)和 6-BA(0.2、1.0、4.5 mg/L);共/再生分化培养基添加一定量的 NAA(0.05、0.2、0.5 mg/L)和 6-BA(2.0、3.0、4.5 mg/L)。固体培养基均附加 30 g/L 蔗糖,7 g/L 琼脂,pH 5.8。预培养和再生分化培养温度(25±2) ℃,光照时间 16 h/d,光照强度约 2 500 lx;共培养温度(25±2) ℃,暗培养。

试验采用 4 因素 3 水平正交试验设计,共 9 种处理,每处理设 3 次重复,每重复约 30 个带柄子叶。试验数据用 DPS 3.01 专业版进行统计分析。再生出芽频率及 GUS 瞬间表达频率计算公式分别为:再生出芽频率(%)=出芽外植体数/接种外植体数×100%;瞬间表达率(%)=GUS 阳性外植体数/接种外植体数×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 激素对子叶再生出芽率的影响

子叶经预培养 2 d 后,没有加 2,4-D 的培养基中子叶片明显增大、增厚且颜色变得深绿;子叶柄伸长,切口处略有膨大,颜色较绿。加有 2,4-D 的培养基中的子叶片大部分卷曲;子叶柄膨大,变得短而粗,切口处出现明显的愈伤组织,颜色略为发白。分化培养一周左右,外植体切口处出现致密的愈伤组织,部分外植体长出白色根毛状物,并在 10 d 左右长出白色不定根,然后愈伤组织逐渐转绿并产生大量绿色芽眼。

子叶分化培养 20 d 后统计芽的再生频率,其再生频率变化在 30%~80%之间,9 种激素组合处理下的平均芽再生频率(表 1)。从表 1 可以看出,各处理间的芽分化频率差异较大。对各处理的芽再生频率按照 4 因素 3 水平正交试验设计进行方差分析,方差分析结果表明(表 2),除再生分化培养基中不同的 6-BA 浓度下芽再生频率的差异接近显著水平外,预培养基中不同的 2,4-D 浓度、预培养基中不同的 6-BA 浓度以及再生培养基中不同的 NAA 浓度之间芽再生频率的差异都达到了极显著水平。这说明预培养基中的 2,4-D 和 6-BA 浓度、再生分化培养基中的 NAA 和 6-BA 浓度对芽的再生有重要影响。根据方差分析 F 值可知,四者对芽分化的影响程度从大到小依次为:再生培养基 NAA、预培养基 6-BA、预培养基 2,4-D、再生培养基 6-BA。根据极差分析和多重比较结果,推导出对于芽再生的最佳激素组合方案为:预培养基 2,4-D 1.0 mg/L 和预培养基 6-BA 1.0 mg/L,再生分化培养基 NAA 0.2 mg/L 和再生分化培养基 6-BA 3.0 mg/L。

### 2.2 激素对 GUS 基因瞬间表达率的影响

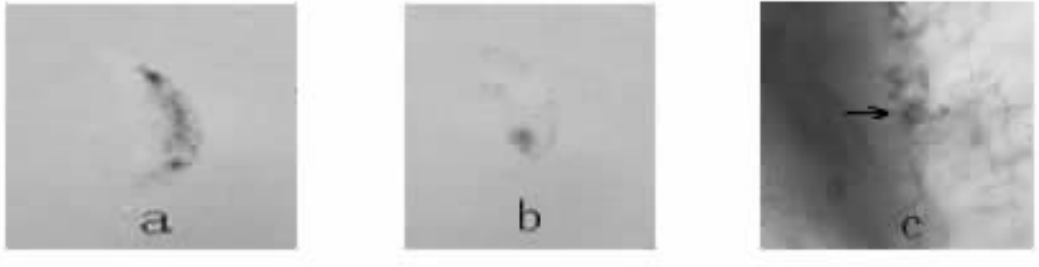
GUS 基因瞬间表达组织化学染色的形态表现,有肉眼可见(图 1a, b)和显微镜下可见(图 1c)染成蓝色斑点两种情况。肉眼可见染成蓝色时又可分为片状蓝斑和点状蓝斑。

表 1 9 种激素组合处理下的芽再生频率

激素组合编号	预培养基激素 /mg·L <sup>-1</sup>	分化培养基激素 /mg·L <sup>-1</sup>	芽再生频率/%	差异显著性	
				5%	1%
X-2	2, 4-D 0+6-BA 1.0	NAA 0.20+6-BA 3.0	78.7	a	A
X-9	2, 4-D 1.0+6-BA 4.5	NAA 0.20+6-BA 2.0	70.7	ab	AB
X-8	2, 4-D 1.0+6-BA 1.0	NAA 0.05+6-BA 4.5	67.9	ab	ABC
X-7	2, 4-D 1.0+6-BA 0.2	NAA 0.50+6-BA 3.0	62.2	bc	ABC
X-4	2, 4-D 0.3+6-BA 0.2	NAA 0.20+6-BA 4.5	58.9	bc	ABC
X-5	2, 4-D 0.3+6-BA 1.0	NAA 0.50+6-BA 2.0	56.7	bc	BC
X-6	2, 4-D 0.3+6-BA 4.5	NAA 0.05+6-BA 3.0	51.8	c	BCD
X-1	2, 4-D 0+6-BA 0.2	NAA 0.05+6-BA 2.0	48.5	cd	CD
X-3	2, 4-D 0+6-BA 4.5	NAA 0.50+6-BA 4.5	38.9	d	D

表 2 不同处理再生正交试验方差分析表

变异来源	SS	df	MS	F 值	显著水平
区组间	779.528 9	2	389.764 4		
预培养基中 2, 4-D 浓度	768.935 6	2	384.467 8	6.582 4	0.008 2
预培养基中 6-BA 浓度	977.528 9	2	488.764 4	8.368 0	0.003 3
再生培养基中 NAA 浓度	1390.046 7	2	659.023 3	11.899 3	0.000 7
再生培养基中 6-BA 浓度	388.868 9	2	194.434 4	3.328 9	0.061 8
误差	934.537 8	16	58.404 6		
总和	5 239.446 7				



a. 肉眼可见的片状蓝斑; b. 肉眼可见的点状蓝斑; c. 显微镜下可见的蓝斑

图 1 GUS 基因瞬间表达组织化学染色的形态表现

将带柄子叶预培养 2 d 后共培养 3 d, 切取愈伤组织薄片进行 GUS 组织化学染色, 肉眼或显微镜下观察 GUS 基因的瞬间表达情况, 统计各个处理 GUS 基因的瞬间表达频率. 9 种激素组合处理下 GUS 基因的平均瞬间表达频率见表 3.

对各个处理的 GUS 基因瞬间表达率进行方差分析表明(表 4), 预培养基中不同的 2, 4-D 浓度、共培养基中不同的 NAA 浓度和共培养基中不同的 6-BA 浓度之间 GUS 基因瞬间表达率的差异均达到了极显著水平; 预培养基中不同的 6-BA 浓度间 GUS 基因瞬间表达率的差异达到了显著水平. 可见, 预培养基和共培养基中的激素水平对转基因进入受体细胞有重要影响. 由方差分析 F 值可知, 对 GUS 基因瞬间表达的影响程度从大到小依次为: 共培养基中 NAA 浓度、共培养基中 6-BA 浓度、预培养基中的 6-BA 浓度、预培养基中的 2, 4-D 浓度. 根据极差分析和多重比较结果, 推导出对于瞬间表达的最佳激素组合方案为: 预培养基 2, 4-D 0 mg/L 和预培养基 6-BA 0.2 mg/L, 共培养基 NAA 0.05 mg/L 和共培养基 6-BA 3.0 mg/L.

### 2.3 激素对芽再生频率×GUS 基因瞬间表达率的影响

从上述可以看出, 激素对于子叶的再生出芽率和 GUS 基因瞬间表达率的效应之间具有不一致性. 对各激素组合处理下子叶的芽再生频率与 GUS 基因瞬间表达率的乘积进行了分析, 以期推导出既有利于再生又有利于瞬间表达的最佳激素组合方案.

表3 9种激素组合处理下GUS基因的瞬时表达率

激素组合编号	预培养基激素	共培养基激素	GUS瞬间 表达频率/%	差异显著性	
	/mg·L <sup>-1</sup>	/mg·L <sup>-1</sup>		5%	1%
X-1	2, 4-D 0+6-BA 0.2	NAA 0.05+6-BA 2.0	17.9	a	A
X-7	2, 4-D 1.0+6-BA 0.2	NAA 0.50+6-BA 3.0	17.3	a	A
X-6	2, 4-D 0.3+6-BA 4.5	NAA 0.05+6-BA 3.0	17.0	a	AB
X-2	2, 4-D 0+6-BA 1.0	NAA 0.20+6-BA 3.0	16.2	a	AB
X-8	2, 4-D 1.0+6-BA 1.0	NAA 0.05+6-BA 4.5	16.1	a	AB
X-5	2, 4-D 0.3+6-BA 1.0	NAA 0.50+6-BA 2.0	15.5	ab	AB
X-3	2, 4-D 0+6-BA 4.5	NAA 0.50+6-BA 4.5	15.1	ab	AB
X-4	2, 4-D 0.3+6-BA 0.2	NAA 0.20+6-BA 4.5	13.4	b	B
X-9	2, 4-D 1.0+6-BA 4.5	NAA 0.20+6-BA 2.0	10.4	c	C

表4 不同处理瞬间表达正交试验方差分析表

变异来源	SS	df	MS	F值	显著水平
区组间	0.542 0	2	0.271 0		
预培养基中 2, 4-D 浓度	14.660 6	2	11.148 2	8.501 3	0.003 1
预培养基中 6-BA 浓度	22.372 4	2	7.787 0	5.938 2	0.011 8
共培养基中 NAA 浓度	63.764 5	2	28.787 0	21.952 3	0.000 1
共培养基中 6-BA 浓度	26.769 4	2	14.925 9	11.382 2	0.000 8
误差	32.505 0	16	1.311 3		
总 和	160.613 9				

各激素组合处理下芽再生频率×GUS基因瞬间表达率值变化在4.7%~14.2%之间,9种激素组合处理下芽再生频率×GUS基因瞬间表达率的平均值变化在5.8%~12.7%之间,最低的是处理X-3,最高的是处理X-2.方差分析结果,预培养基中不同的2,4-D浓度、共/分化培养基中不同的NAA浓度间芽再生频率×GUS基因瞬间表达率的差异都未达到显著水平,而预培养基中不同的6-BA浓度之间以及共/分化培养基中不同的6-BA浓度之间芽再生频率×GUS基因瞬间表达率的差异达到了极显著水平.这说明在试验的激素及其浓度范围内,预培养基和共/分化培养基中的细胞分裂素即6-BA对芽再生频率×GUS基因瞬间表达率的影响较大,预培养基和共/分化培养基中的生长素即2,4-D和NAA对芽再生频率×GUS基因瞬间表达率的影响较小.根据极差分析和多重比较结果,推导出对于芽再生频率×GUS基因瞬间表达率的最佳激素组合方案为:预培养基2,4-D 1.0 mg/L和预培养基6-BA 1.0 mg/L,共/分化培养基NAA 0.05 mg/L和共培养基6-BA 3.0 mg/L.

### 3 结论与讨论

前人的研究表明,油菜的子叶、下胚轴等外植体在含有2,4-D的培养基上进行短时间的预培养后再分化培养,可明显提高外植体的再生频率<sup>[4,7,8,12]</sup>.在油菜的遗传转化中,外植体在农杆菌浸染前经过一定时间的预培养,细胞由于预培养时激素的作用,各种代谢活动旺盛,可以促进细胞分裂,且有利于抵抗农杆菌浸染所带来的毒害作用,并有效地减少褐化的发生和降低褐化的程度,从而有效地提高外植体抗性芽的分化率,致使转化频率升高<sup>[4,7-9,11-13]</sup>.共培养是农杆菌介导转化过程中的一个重要步骤,农杆菌附着、T-DNA转移及整合均在这一时期完成,因此优化共培养的条件非常重要.Manur等<sup>[14]</sup>和Han等<sup>[15]</sup>的研究表明,在共培养基中添加一定的激素有利于提高转化效率.

本试验以甘蓝型油菜“湘油15”子叶为外植体,以MS为基本培养基,采用正交试验设计,研究了预培养基2,4-D和6-BA浓度、分化/共培养基NAA和6-BA浓度对子叶芽再生频率和转GUS基因瞬间表达率的影响.试验结果表明,预培养基和分化/共培养基中的激素水平对油菜子叶的芽再生频率和转基因的瞬间表达频率都有重要影响,但激素水平对芽再生频率和转基因瞬间表达率的影响效应具有不一致性,再生频率高的激素组配其转基因瞬间表达率并不一定高,转基因瞬间表达率高的激素组配其再生频率并不一

定高。如试验中激素组合 X-9 的再生频率较高,在 9 种处理中位居第 2,然而在相同激素组合下其转基因瞬间表达率在 9 种处理中却是最低的;激素组合 X-1 的瞬间表达率在 9 种处理中位居第 1,而相同激素组合下的芽再生频率却较低,在 9 种处理中位居第 8。试验推导的对于芽再生的最佳激素组合方案为预培养基 2, 4-D 1.0 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L、再生分化培养基 NAA 0.2 mg/L 和 6-BA 3.0 mg/L;而推导的对于瞬间表达的最佳激素组合方案为预培养基 2, 4-D 0 mg/L 和 6-BA 0.2 mg/L,共培养基 NAA 0.05 mg/L 和 6-BA 3.0 mg/L。因此,在遗传转化培养基激素组合选择时仅追求高转基因瞬间表达率或高再生频率不一定利于提高转化效率。

瞬间表达是外源基因进入受体细胞内处于未整合状态下短时间的表达,常被用于优化转化条件。外植体再生则是分化细胞脱分化后再分化。转基因在受体细胞的瞬间表达和受体细胞再生是两个不同的生理过程,它们对于细胞生理状态的要求有所不同,这是导致转基因瞬间表达和芽再生对培养基激素要求不一致的原因之一。另外,由于农杆菌一般只能作用于外植体的表面浅层细胞,而再生芽的细胞可能位于外植体的深层,这种瞬间表达细胞部位和芽再生部位的不一致也可导致转基因瞬间表达和芽再生对培养基激素的要求不相同。根癌农杆菌介导的遗传转化涉及外源基因进入受体细胞、外源基因整合进植物基因组以及转化细胞再生植株等复杂生理过程以及工程菌浸染、共培养、抑菌筛选分化培养等多个操作步骤。试验根据各处理的芽再生频率和 GUS 瞬间表达率的乘积推导出最佳预培养基和共/分化培养基激素组合,其有效性尚在进一步试验。

#### 参考文献:

- [1] Horsch R B, Fraley R T, Rogers S G, et al. Inheritance of functional foreign genes on plants [J]. *Science*, 1984, 223: 496 - 498.
- [2] De Block M, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, et al. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny [J]. *EMBO J*. 1984, 3: 1681 - 1689.
- [3] 赵云,王海燕. 基因型对油菜子叶外植体再生植株的影响 [J]. *中国油料*, 1997, 19(4): 1 - 4.
- [4] 石淑稳,周永明,孙学成,等. 甘蓝型油菜遗传转化体系的研究 [J]. *华中农业大学学报*, 1998, 17(3): 205 - 210.
- [5] 王景雪,孙毅,崔贵梅,等. 在油菜组织培养中激素及基因型对下胚轴分化的影响 [J]. *中国油料作物学报*, 2000, 22(1): 11 - 18.
- [6] 李会珍,张志军,周伟军. 基因型和 AgNO<sub>3</sub> 对甘蓝型油菜子叶外植体植株再生的影响 [J]. *中国油料作物学报*, 2003, 25(4): 20 - 22.
- [7] Radke S E, Turner J C, Danidel F. Transformation and regeneration of *Brassica napus* using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell Report*, 1992, 11: 499 - 505.
- [8] 王艳,贺宾,曾幼玲,等. 甘蓝型油菜带柄子叶高频再生植株的研究 [J]. *中国油料作物学报*, 2004, 26(4): 86 - 90.
- [9] 韩德俊,袁本威,胡甘,等. 农杆菌介导的油菜遗传转化研究进展 [J]. *西北农林科技大学学报*, 2005, 11: 18 - 22.
- [10] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene Fusion system [J]. *Plant Mol Biol Repr*, 1987, 5: 387 - 405.
- [11] Moloney M M, Walker J M, Sharma K K. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors [J]. *Plant Cell Reports*, 1989, 8(4): 238 - 242.
- [12] 石淑稳,王新发. 影响油菜子叶外植体不定芽高频再生的因素 [J]. *西北植物学报*, 1998, 18(4): 477 - 482.
- [13] 何业华,雄兴华,官春云,等. 根癌农杆菌介导 TA29-Barnase 基因转化甘蓝型油菜的研究 [J]. *作物学报*, 2003, 29(4): 615 - 620.
- [14] Mansur, E A, Lacorte C, Freitas G, et al. Regulation of transformation efficiency of peanut (*Arachis hypogaea* L.) ex-plants by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Science*, 1993, 89: 93 - 99.
- [15] Han K H, Keathley D E, Davis J M, et al. Regeneration of a transgenic woody legume (*Robinia pseudoacacia* L., blank locust) and morphological alterations induced by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation [J]. *Plant Science*, 1993, 88(2): 149 - 157.

## Effects of Phytohormones on Shoot Regeneration and Transient Expression of Transgene in Cotyledon of Rapeseed (*Brassica napus* L.)

XIE Ling-li<sup>1,2</sup>, YIN Jia-ming<sup>1</sup>, LI Jia-na<sup>1</sup>,  
CHAI You-rong<sup>1</sup>, XU Ben-bo<sup>1,2</sup>, LIN Na<sup>1</sup>

1. Chongqing Rapeseed Engineering Research Center, School of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou Hubei 434000, China

**Abstract:** The cotyledons of a *Brassica napus* variety “Xiangyou 15” were used as the explants and MS was used as the basic medium in the experiment. The effects of the concentration of 2,4-D, 6-BA in the pre-culture medium and that of NAA, 6-BA in the differentiation medium and/or co-culture medium on the shoot regeneration frequency and the transient expression frequency of transformed GUS gene were investigated by using the orthogonal design. The results showed that the concentration of the phytohormones influenced the shoot regeneration frequency and the transient expression frequency of transgene greatly, but the effects on the shoot regeneration frequency and the transient expression frequency of transgene had non-consistency. As for shoot regeneration frequency, the putative optimum phytohormone combination was 1.0 mg/L of 2,4-D, 1.0 mg/L of 6-BA in the pre-culture medium and 0.2 mg/L of NAA, 3.0 mg/L of 6-BA in the differentiation medium. As for transient expression frequency of transgene, the putative optimum phytohormone combination was 0mg/L of 2,4-D, 0.2 mg/L of 6-BA in the pre-culture medium and 0.05 mg/L of NAA, 3.0 mg/L of 6-BA in the co-culture medium. As for the shoot regeneration frequency × transient expression frequency of transgene, the putative optimum phytohormone combination was 1.0 mg/L of 2,4-D, 1.0 mg/L of 6-BA in the pre-culture medium and 0.05 mg/L of NAA, 3.0 mg/L of 6-BA in the co-culture and/or differentiation medium.

**Key words:** rapeseed (*Brassica napus* L.); cotyledon; phytohormone; regeneration; transient expression

责任编辑 夏娟