

真空渗入转化法中农杆菌在植株体内的分布和活力变化

徐恒骞^{1,2,3} 刘 凡^{2*} 王秀峰³ 赵 泓²

(¹山东理工大学生命科学院 淄博 255049)

(²国家蔬菜工程技术研究中心园艺科学与工程学院 北京 100081)

(³山东农业大学园艺科学与工程学院 泰安 271018)

摘 要:以真空渗入处理后的白菜植株为材料,采用组织化学染色法和细菌平板培养的方法,研究了农杆菌在植株体内的分布特点及其活力变化。结果表明:不同器官中农杆菌的分布量不同,以花器官中分布最多,叶中次之,茎中最少;农杆菌存在于细胞间隙中,维管束及其周围分布较集中,在胚珠中大量分布。处理后植株体内,各器官中农杆菌的生活力及其数量都随时间延长而减少,但是花器官中的农杆菌存活量较大,处理 15d 后的花蕾中仍然有一定量(约 10^3 个 CFU/g 组织)具有活力的农杆菌存在。讨论了这些研究结果在揭示真空渗入转化法的转化过程和提高转化频率中的意义。

关键词:白菜 真空渗入转化法 农杆菌 分布 生活力

中图分类号:Q812 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)04-0621-04

真空渗入转化法是原位转化法的一种,它不仅具有不依赖于组织培养系统的优点,而且在拟南芥上的研究结果还表现了对基因型的不敏感性,一些应用其它方法转化率低的生态型,也能够获得较高的转化频率^[1]。关于真空渗入转化技术的研究,在拟南芥上已有不少工作^[2-4],在其它作物中也有零星报道^[5,6],但研究工作基本上是针对农杆菌进入植物体以前的渗入处理条件^[2,3],对农杆菌进入植物体内后的分布及存活情况,国际上尚无报道。本实验室已经成功地建立了稳定的不结球白菜真空渗入转基因体系,但转化频率不高^[6]。为进一步了解真空渗入转化法的影响因素,揭示其转化机理,提高白菜中的转化频率,本实验采用组织化学染色法和细菌平板培养的方法,对真空渗入转化处理后的白菜植株中,农杆菌在各器官中的分布及其活力变化进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料:菜薹(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *utilis* tsen et Lee)是芸薹种白菜亚种中的一个变种,试验采用其地方品种“49 菜心”(种子购自广州市蔬菜研究所)。其特点是生长发育期短,对光照和温度要求不严格,植株个体较小,易于操作。

1.1.2 工程菌:农杆菌为 C58Cl 菌株,具有利福霉素(Rifampicin)和庆大霉素(Gentamycin)抗性;携带 pBBB-intron-gus 质粒,抗卡那霉素,其 T-DNA 中具外源 *bar* 基因(国家蔬菜工程技术研究中心生物技术实验室保存)。

1.1.3 试剂:常规试剂、染色试剂购自北京益利精细化学公司,皆为分析纯;PCR 试剂购自 Promega 公司;引物由赛百盛生物工程有限公司合成。

1.2 真空渗入处理

将花期植株进行处理,真空渗入处理依照 Liu 等^[6]的方法。

1.3 真空渗入处理后植株中农杆菌的分布情况观察

采用石蜡切片结合组织化学染色法^[7],观察农杆菌在植株体内的分布情况。分别取真空处理后植物的花、茎、叶,置于 FAA 中固定,采用苯酚品红和固绿双色对染,染色后植物细胞细胞质呈现浅粉红色,细菌和植物细胞壁呈现绿色^[8]。

1.4 植物组织中农杆菌的培养

真空处理后的植株,分别取茎、叶、花 1g 左右,称重(每棵植株只取一次),无菌水冲洗 5 次后置于研钵中,加入 0.85% 的生理盐水 3mL,研磨,取上清液,再用生理盐水依次进行 10 倍稀释,稀释 7 次后,分别取稀释液进行平板培养。每板涂布 100 μ L,重复 3 次。以生理盐水作为零对照,不经真空处理的植株提取液作为负对照。农杆菌的培养采用土壤杆菌属细菌筛选配方^[8],略作修改。每 1L 培养基中含甘露糖醇 15g,二水硝酸钙 20mg,硝酸钠 5g,磷酸二氢钾 2g,氯化锂 6g,七水硫酸镁 0.2g,溴百里酚蓝 0.1g,琼脂 15g,pH7.2。经常规高压灭菌后,在培养基冷却至 50℃ 左右时,加入 100 μ g/mL 卡那霉素。

灭菌冷却后,培养基成深蓝色。溴百里酚蓝能抑制革兰氏阳性细菌,氯化锂抑制假单孢杆菌属细菌,卡那霉素抑制

基金项目:北京市高技术实验室项目资助(953850100)

* 通讯作者。Tel 86-10-51503016 E-mail liufan@nerv.com

作者简介:徐恒骞(1966-)男,山东省莒南县人,讲师,博士,研究方向是植物基因工程。E-mail xhj310@163.com

收稿日期:2004-12-15,修回日期:2005-02-05

非工程农杆菌。

1.5 培养菌落的鉴定

1.5.1 形态鉴定 :土壤农杆菌属细菌的菌落 ,在该培养基上 ,应表现圆形、突起、发亮 ,最初浅蓝色 ,最后成为深绿色。

1.5.2 抗性鉴定 把从平板上随机挑取的各菌落 ,独立接种到 20mL LB + 100μg/mL Kan + 50μg/mL Rif + 50μg/mL Gent 液体培养基中 ,28℃、200r/min 震荡培养。24 ~ 48h 后 ,如果培养基混浊 ,农杆菌生长良好 ,表明平板上的菌落具有同时抗 3 种抗生素的能力 ,这是转化用工程菌的特性。

1.5.3 分子鉴定 :质粒提取采用碱裂解法 ,PCR 采用常规方法 ,*bar* 基因引物序列如下 : primer1 :5'-AACTCCGTACCG AGCCGCA-3' ;primer2 :5'-ATGCCAGTCCCGTGCTTGA-3'。PCR 反应体系 (25μL) :10 × buffer 2.5μL ,dNTP (10mmol/L) 0.5μL , primer1/2 (50μmol/L) 各 0.5μL ,plasmid DNA 200ng ,*Taq* 酶 1U。反应条件 :94℃ 2min ;94℃ 40s ,52℃ 40s ,72℃ 1min ,30 个循环 ,4℃ 保存。

2 结果和分析

2.1 农杆菌在渗入处理后白菜植株体内的分布特征

在真空渗入法转化过程中 ,农杆菌接触哪些植物组织细胞 ,是揭示转化机理的重要研究内容。本试验利用石蜡切片结合组织化学染色 ,观察了农杆菌在植物体内的分布。试验结果表明 ,进入植株体内的农杆菌不是均匀分布的 ,具有空间差异性。在茎中 ,农杆菌呈现出以维管束为中心的集中分布 ,并沿着形成层向两翼扩展 ;皮层的外面几层细胞间有细菌的分布 ,皮层细胞的内部几层中很少或者没有染色的颗粒状细菌 (图 1-A)。中央髓部组织中则没有染色的颗粒状细菌 (图 1-B)。绿色颗粒状的细菌处于细胞间隙中 (图 1-C)。这些结果表明维管束中的细菌 ,不是通过皮层直接进入的。如果农杆菌直接穿过表皮和皮层细胞进入到维管束中 ,应当观察到由外到内细菌的连续分布。

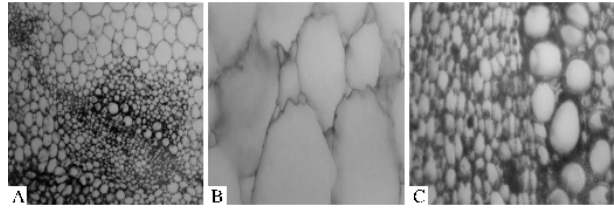


图 1 真空渗入处理后菜薹茎中农杆菌的分布情况

Fig.1 The stained bacteria in the stem of pakchoi after vacuum infiltration

A : Vascular bundle (100 ×) ; B : Pith (400 ×) ; C : Vascular bundle (800 ×) .

叶片中 ,细菌相对均匀地分布在叶肉组织细胞间隙中 (图 2-A) ,中脉中的细菌分布表现与茎中的相似 ,在维管束及其周围有着密集分布 ,皮层的外面几层细胞间也有染色的细菌 ,但是皮层与维管束之间具有明显的空白地带 ,细菌的分布是不连续的 ,这表明中央维管束中的细菌 ,同样不是由体外直接穿过皮层而进入的 (图 2-B)。花器官中的农杆菌 ,在

子房壁的细胞间隙中相对均匀地分布 ,但是在维管束处染色较深 ,数量明显增多 ,在胚珠处农杆菌明显聚集 ,染色也较深 (图 2-C)。

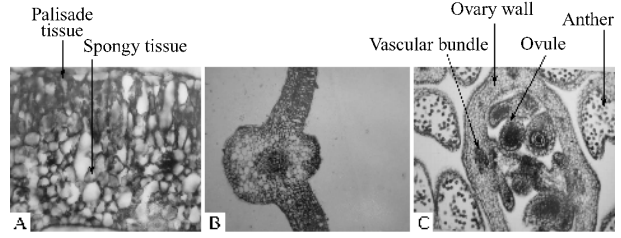


图 2 菜薹叶片和子房中农杆菌的分布

Fig.2 The stained bacteria in the leaf and ovary of infiltrated pakchoi plants

A : Mesophyll tissue (400 ×) ; B : Main vein (100 ×) ; C : Ovary (100 ×) .

以上试验结果表明农杆菌在不同组织和器官中的分布 ,表现出不同的特点 ,但是它们的共同特点是维管束及其周围的存量最多。这个特点表明 ,在真空渗入转化法中 ,虽然农杆菌可以通过植株的表面直接进入植株皮层内 ,但维管束对农杆菌在植物体内的富集和运输中可能起着重要的作用。

2.2 各器官中农杆菌数的定量以及活细菌数量变化的动态分析

上述结果显示真空渗入处理后 ,农杆菌在植株体内各器官中的分布是不均匀的。采用细菌平板培养菌落计数法 ,对花、茎、叶各器官中活的农杆菌数量的相对差异大小 ,农杆菌在体内存活的时间及活力变化情况进行了考察。为了保障结果的可靠性 ,首先需要对采用该方法获得的菌落进行鉴定 ,以保证培养所得菌落是转化用的工程菌。

2.2.1 菌落鉴定 ①菌落的形态鉴定 :从平板中菌落的形态看 ,菌落皆呈现圆形、突起、发亮 ,最后深绿色 ,符合土壤杆菌属细菌的菌落特征。对照则没有培养出菌落。②菌落的抗性鉴定 :能够形成菌落 ,在平板上生长的细菌 ,已经通过了培养基和卡那霉素的初步筛选。由于转化所用的工程菌 ,同时还拥有抗利福霉素和庆大霉素的能力 ,因此可以从平板上挑取菌落 ,进行进一步的抗性鉴定。结果表明 ,被鉴定的每一个菌落 ,都可以很好地在选择培养基中生长 ,这表明都带有相应的抗性基因。③农杆菌的分子鉴定 :采用碱裂解法提取上述培养菌的质粒 DNA ,与转化用质粒 (对照质粒) 相比较 ,电泳结果表明 ,这两种质粒大小完全一样。

由于转化所用的质粒带有外源 *bar* 基因 ,故采用 *bar* 基因的扩增引物 ,对所提的质粒进行 PCR 扩增。电泳结果表明 ,从所有质粒 DNA 中都能扩增出 400bp 的特定的 *bar* 基因片段 (图 3) ,从而证明这些培养出的细菌正是转化所用的工

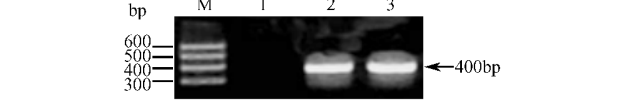


图 3 质粒中 *bar* 基因的 PCR

Fig.3 PCR of the *bar* gene in the plasmid DNA
M. DNA marker ; 1. Blank control ; 2. Plasmid DNA from bacteria in infiltrated plants ; 3. Plasmid DNA from the agrobacteria used
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

程农杆菌。因此,可以认定采用该培养法在平板上形成的菌落,就是渗入植物体内的农杆菌所形成的菌落。

2.2.2 农杆菌在植株体内不同器官间的数量差异:采用平板培养的方法,计数植株体内的农杆菌,能较好地反映出植株体内活的农杆菌数量。结果表明来源于不同器官的单位重量的组织中,可形成菌落单元(Cloning Formation Unit, CFU)数量差异很大。多次试验数据表明,在花中农杆菌含量最高,叶中次之,茎中最少,且经常在 10^6 稀释倍数下无法获得 CFU。表 1 中列出 A、B 两批处理植株的培养结果,处理后的花器官内的农杆菌含量可高达 10^9 数量级,茎中仅有 10^6 数量级,有的甚至还少。

细菌平板培养的结果与组织化学染色观察到的结果相符。花中活的农杆菌较多表明,该真空渗入处理技术体系下,农杆菌更容易进入花器官,或者花器官的环境有利于农杆菌的存活。

表 1 农杆菌处理后 3d 内的培养结果

Table 1 CFUs within 3days from the treated plants

Samples	CFU $\times 10^6$ /g		
	Stem	Leaf	Flower
A1	57.8	137.6	1075.4
A2	0	117.6	830.6
A3	2.9	191	1338.9
B1	16.7	406	1177
B2	28.5	692	1470
B3	14.7	285	777

2.2.3 各器官内农杆菌活力随时间的变化情况:在真空处理的过程中,大量农杆菌进入植株体内,其中只有极少数的农杆菌能够成功地转化植物细胞。为什么数量巨大的农杆菌没有起作用?多次试验发现:①植株中的农杆菌生活力受到抑制,在 48~72h 内不能长成正常大小的菌落,不同器官来源的农杆菌,其菌落直径有显著差异;②不论在花、茎还是叶中,CFU 数量随着植株处理后恢复时间的延长迅速减少,其中,以花器官中农杆菌存量最多,15d 后每克鲜组织中仍有近 10^3 CFU(表 2 列出部分数据)。

表 2 处理后的植株体内农杆菌的时间变化

Table 2 The dynamic distribution of CFU in the treated plants

Sampling time/d	CFU $\times 10^3$ /g		
	Stem	Leaf	Flower
2	150.4	1780	11070
6	20.15	622.1	626.2
9	9.8	2.3	958.2
14	0.18	0	65.4
19	0	0	0.326
CK	0	0	0

3 讨论

原位转化法是在植株活体情况下进行的,农杆菌通过物理方法进入植株体内后,与目标细胞发生作用,进行转化。关于真空渗入处理条件的研究,相关文献有较多报道^[2~4],然而,农杆菌进入植株后的情况,没有报道。本试验表明,真

空渗入处理后,农杆菌直接进入植物体内的直线距离是有限的,在叶片中,农杆菌可能通过气孔或者表面直接进入。在主叶脉的局部(薄壁组织)和茎的髓部没有细菌,可能由于细胞排列紧密,或者真空渗入条件等原因,农杆菌便不能到达。研究表明,在原位转化法中,农杆菌与目的细胞的黏附依然是必需的^[1],这样,农杆菌的分布范围,就限制着转化的范围。

从分布状况看,茎、叶、花中都有大量农杆菌,为农杆菌转化这些组织提供了可能性。拟南芥中的试验表明,农杆菌对不同器官的细胞转化能力并不相同,其中对花器官组织细胞的转化能力更强^[9]。原位转化法是从处理的植株后代中筛选转化株,多数研究表明,农杆菌的原初转化位点是雌配子体^[9,10]。本研究结果表明,植株体内的农杆菌数量分布,花器官中含量较高,且持续时间较长,具活力农杆菌数量大,也就增加了植物适于转化态细胞遇到农杆菌的几率。Ye 等^[9]甚至在收获的种子中,发现仍有农杆菌存活,这为转化事件的发生提供了基础。但不同的研究结果也表明,农杆菌可能不会在拟南芥植株体内进行有力的繁殖,以便获得较长时期的转化能力,处理 12~14d 后的植株,转化率明显下降^[11],这与本试验的结果有相当的可比意义,即转化率降低可能与植株体内农杆菌数量降低相对应,重复处理植株可以提高转化率的事实^[11],也支持这种观点。在 Rakousky 等^[12]的实验中曾提及,农杆菌在拟南芥上能存活很长时间,在处理 3~6d 时,每 1 克组织中仍有 1.2×10^8 个活细菌。虽然文章没有表明测试材料的器官来源,但高出白菜相应时期许多,可能是拟南芥的真空渗入转化频率高于白菜的原因。白菜植株体内的微环境对农杆菌的存活可能是不利的,当然各器官之间也可能存在差别。因此,在较短时间内使植株体内具有足够数量的农杆菌,并且是这些农杆菌充分与植物组织细胞接触,可能是提高转化率的关键。

参 考 文 献

[1] Mysore K S , Kumar C T , Stanton B G . *Arabidopsis* ecotypes and mutants that are recalcitrant to *Agrobacterium* root transformation are susceptible to germ line transformation . *The Plant Journal* , 2000 , **21** (1) : 9 - 16 .

[2] Bechtold N , Ellis J , Pelletier G . In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants . *C R Acad Sci Paris Life Sci* , 1993 , **316** : 1194 - 1199 .

[3] Clough S J , Bent A F . Floral dip : a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* . *The Plant Journal* , 1998 , **16** (6) : 735 - 743 .

[4] 刘 凡 , 王国英 , 曹鸣庆 . 农杆菌介导的植物原位转基因方法研究进展 . 分子植物育种 , 2003 , **1** : 108 - 115 .

[5] Trieu A T , Stephen H B , Kardailsky L V . Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium* . *The Plant Journal* , 2000 , **22** (6) : 531 - 541 .

[6] Liu F , Cao M Q , Yao L . In planta transformation of pakchoi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*) by infiltration of adult plants with *Agrobacterium* . *Acta Hort* . 1998 , **467** : 187 - 192 .

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [7] 黄承芬,杜桂林.生物显微制片技术.北京:北京科学技术出版社,1991:84-100.
- [8] 方中达.植病研究法.第三版.北京:中国农业出版社,1994,107,191.
- [9] Ye G N, Deborah S, Pang S. *Arabidopsis* ovule is the target for *Agrobacterium* in planta vacuum infiltration transformation. *The Plant Journal*, 1999, **19**(3): 249-257.
- [10] Bechtold N, Benedicte J, Sylviet J. The maternal chromosome set is the target of the T-DNA in the in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 2000, **155**: 1875-1887.
- [11] Desfeux C, Clough S J, Bent A F. Female reproductive tissue are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiology*, 2000, **123**: 859-904.
- [12] Rakousky S, Kocabek T, Vincenciova R, et al. Transient β -glucuronidase activity after infiltration of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biologia Plantarum*, 1997/98, **40**(1): 33-41.

The distribution and viability changes of the *Agrobacteria* in the vacuum infiltrated plants of Chinese cabbage

XU Heng-jian^{1 2 3} LIU Fan^{2*} WANG Xiu-feng³ ZHAO Hong²

(¹ College of Life Science, Shandong University of Technology, Zibo 255091, China)

(² National Engineering Research Centre for Vegetables, Beijing 100089, China)

(³ College of Horticulture, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: To understand further the mechanism of agrobacteria transformation by vacuum infiltration, the distribution and viability changes of the agrobacteria in infiltrated Chinese cabbage (*B. rapa* ssp. *chinesis*) plants were investigated by histochemical staining and bacteria plating techniques. Results revealed that there were different quantities of *Agrobacteria* in different organs, among which the most quantity occurred in flowers, especially in ovules. The *Agrobacteria* lied in the space between cells and concentrated in the vascular bundle no matter the type of the organs examined. The CFUs (colony forming unit) of the *Agrobacteria* derived from the flowers were always the most in every experiment. The viabilities of the agrobacteria in the plants declined dramatically along with the elongation of the time after plant infiltration in all organs, but there were still 10^3 CFUs per gram fresh tissue in the flowers after 15 days of infiltration. These results may explain the fact that the ovules were the targets for the *Agrobacteria* mediated vacuum infiltration transformation.

Key words: Chinese cabbage, Vacuum infiltration transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, Distribution properties, Viability