

文章编号 :1003-8701(2013)03-0035-04

根癌农杆菌介导花生遗传转化体系的建立

高明¹,谭化¹,王云鹏¹,陈雪艳²,刘艳芝^{1*}

(1. 吉林省农业科学院,长春 130033;2. 吉林省东辽县农业广播电视学校,吉林 东辽 136600)

摘要:通过农杆菌介导法以花生下胚轴为外植体转化花生品种四粒红。经过共培养、抑菌和筛选培养,在含有 0.8 mg/L Basta 的培养基获得 67 株抗性再生植株。经 PCR 检测,获得 5 株阳性植株,bar 试纸条检测至少有 2 株转基因植株为阳性。该体系操作简便、高效,可作为利用基因工程对花生进行研究和遗传改良的一种技术手段。

关键词:花生;农杆菌;遗传转化

中图分类号:S565.2

文献标识码:A

Establishment of Agrobacterium-mediated Transformation System in peanut

GAO Ming¹, TAN Hua¹, WANG Yun-peng¹,
CHEN Xue-yan², LIU Yan-zhi^{1*}

(1. *Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033;*
2. *Agricultural Broadcast and TV School of Dongliao County, Jilin Province, Dongliao 136600, China*)

Abstract: Agrobacterium-mediated transformation was performed in the peanut variety 'Silihong' using hypocotyl as explants. After co-culture, bacteria restraining and selection, sixty-seven resistant regenerated plants were obtained on the medium with 0.8mg/L Basta. Five PCR-positive plants were tested by Quick-Strip Kit and at least two of them showed positive. The results showed that this protocol was an easy and high efficient, and will provide a practical method for the further genetic improvement of peanut.

Keywords: Peanut; Agrobacterium-mediated; Genetic transformation

利用基因工程技术将外源基因导入花生,可以获得相应的目标性状。Eapen 和 George(1994)首次通过农杆菌介导法将外源基因整合到花生基因组中^[1],之后花生的遗传转化技术研究不断有其他的文献报道,主要采用农杆菌介导和基因枪轰击两种途径^[2-6],农杆菌途径是通过根癌农杆菌介导花生胚状体、胚小叶、幼叶、子叶、胚轴、胚根等外植体,通过抗生素或除草剂抗性筛选获得再生植株,相对于基因枪轰击法,该方法具有操作简便,外源基因单拷贝或低拷贝整合,不需要昂贵设

备等优点,因而易于被采用。近 10 年来,农杆菌介导的花生遗传转化虽然已经取得了明显的进展,但是存在再生和转化率低,基因型限制等难题,因此研究建立高效的遗传转化体系仍然十分必要。本研究在已建立的花生体细胞胚发生体系^[7]基础之上,以除草剂抗性的 Bar 基因为目的基因,通过对影响转化效率的一些因素进行对比实验,初步建立起农杆菌介导花生遗传转化体系,为利用基因工程手段获得花生新种质提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

受体材料为四粒红花生。具体方法是去掉成熟荚果的果皮,分别用 75%的酒精和 0.1%HgCl₂溶液处理 1 min 和 10 min,进行表面消毒,之后用

收稿日期:2013-01-27

作者简介:高明(1976-),男,硕士,助理研究员,主要从事科技查新工作。

通讯作者:刘艳芝,女,硕士,副研究员,

E-mail:liuyz_g@yahoo.com.cn

无菌水漂洗 4 次,用无菌水浸泡 6 h 后取出种子,种于 MS₀ 培养基。

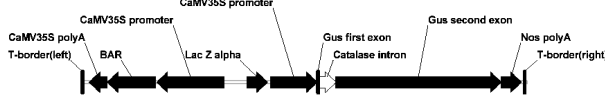


图 1 转化用目的基因示意图

根癌农杆菌菌株 EHA105(含 pKUB 质粒) 由本实验室提供。pCambia3301 由中国科学院上海植物生理研究所卫志明先生惠赠(图 1)。质粒在大肠杆菌中保存。

1.2 菌株培养

农杆菌 EHA105 在 YEP 液体培养基中 28℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.5 ~ 0.7, 4℃, 4 000 rpm 离心收集菌体,再用 MS₀ 培养液洗涤收集菌体,最后将农杆菌悬浮于 MS₀ 培养液中至 OD₆₀₀ 值在 0.5 左右备用。

1.3 侵染

取培养 3d 的花生种子,切掉 2 个子叶,将胚轴纵向切开,再将每段切成 2 mm 大小,浸入制备好的菌液,10 ~ 30 min 后取出外植体,用灭菌滤纸吸干表面菌液,放到共培养基上,在 28℃ 黑暗条件下共培养 1 ~ 3 d。

1.4 转化体的筛选和植株再生

将共培养的外植体转移至附加 0.8 mg/L 除草剂 Basta(主要成分是草丁膦)的诱导培养基上培养 2 周,然后再经过 2 ~ 3 轮筛选(每轮 2 ~ 3 周),当诱导出的体细胞胚可自行脱离下来时,将其转至去掉除草

剂的培养基上,体细胞胚萌发。长出真叶的小苗转至生根培养基上,1 周左右生根,发育成完整植株。

1.5 转基因植株的检测

1.5.1 抗性植株 PCR 分析

采用改良的 CTAB 法,从烟草叶片中提取基因组 DNA,将其稀释至 100 ng/mL 作为模板,以 pCambia3301 为阳性对照,以未转化植株为阴性对照,以 bar 基因的特异性引物进行 PCR 扩增,引物序列分别为:

上游引物 F 5' -GCACCATCGTCAACCAC-TAC-3'

下游引物 R 5' -GAAGTCCAGCTGCCA-GAAAC-3'

PCR 扩增条件为:94℃ 5 min;94℃ 30 s;56℃ 30 s;72℃ 90 s,28 个循环;72℃ 8 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像系统分析。

1.5.2 抗性植株商用试纸条检测分析

试纸条法检测表达蛋白的最低值可达到 0.15%。首先将样品磨碎并加水或提取液提取,溶解获取蛋白。检测时,先将样品垫浸在已提取好的蛋白样品溶液中,样品溶液在毛细吸收作用下由样品垫沿 NC 膜向吸收垫流动。样品溶液中的特定蛋白在流经结合垫时,首先与其中胶体金标记的抗体发生抗原 - 抗体特异性结合,流经检测带时抗原 - 抗体复合物被固定在检测带上的捕获抗体结合,聚集形成肉眼可见的金标条带,显示检测结果为阳性。

1.6 培养基

表 1 花生转 Bar 基因培养基

培养基	成分 (pH5.8)
MS ₀ 培养基	MS + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂
共培养培养基 H1	MS + 2.4-D 40 mg/L + KT 0.5 mg/L + 3% 蔗糖 + 0.5% 琼脂
筛选培养基 H2	MS + 2.4-D 20 mg/L + KT 0.5 mg/L + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂 + Basta 0.8 mg/L + 头孢霉素 500 mg/L
筛选培养基 H3	MS + BA 5 mg/L + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂 + Basta 0.8 mg/L + 头孢霉素 500 mg/L
筛选培养基 H4	MS + BA 2 mg/L + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂 + Basta 0.8 mg/L + 头孢霉素 500 mg/L
筛选培养基 H5	MS + BA 1 mg/L + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂 + Basta 0.8 mg/L + 头孢霉素 500 mg/L
萌发培养基 H6	MS + BA 0.5 mg/L + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂 + 头孢霉素 500 mg/L
伸长培养基 H7	MS + BA 0.1 mg/L + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂 + 头孢霉素 500 mg/L
生根培养基 H8	MS + IBA 0.2 mg/L + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂 + 头孢霉素 500 mg/L

2 结果与分析

2.1 花生试管苗胚轴切段对除草剂 Basta 的敏感性

取 3 d 苗龄的花生胚轴,切成小段接种于附加不同浓度 Basta (0, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L) 的 MS 培养基上,每个培养皿中接种 15 块,每个浓度接种 2 皿共 30 块切段,14 d 统计存活的切段

数量,计算死亡率(表 2),依此确定筛选培养基中

表 2 花生胚轴切段对不同浓度 Basta 的敏感性

Basta(mg/L)	接种切段数	存活切段数	死亡率(%)
0	30	30	0
0.5	30	12	60
0.8	30	4	87
1.0	30	1	97
2.0	30	0	100
3.0	30	0	100

除草剂的适宜浓度。从表 2 可以看出 :Basta 浓度为 1.0 mg/L 时切段死亡率接近 100% , 但因为花生胚轴切段过于幼嫩 , 除草剂对其伤害较大 , 所以实际转化过程中采用的 Basta 浓度为 0.8 mg/L。

2.2 预培养时间对转化率的影响

取 3 d 苗龄的花生胚轴 , 切成小段接种于 H1 培养基上 , 黑暗条件下不同时间(0 , 1 , 2 , 3 d)预培养 , 以 OD₆₀₀ 值为 0.5 的农杆菌侵染 20 min , 转接至共培养基上共培养 3 d 后 , 检测 *gus* 基因瞬时表达频率 , 以确定最佳的预培养时间。结果表明 , 在 0~3 d 内 , 随着预培养时间的增加 *gus* 基因瞬时表达频率也随之升高 , 当预培养时间为 2 d 时 *gus* 基因瞬时表达频率达到最高 , 预培养时间 3 d 时 , *gus* 基因瞬时表达频率反而下降。说明适当的预培养对花生胚轴转化效果的提高是有利的。

2.3 农杆菌侵染时间对转化率的影响

将预培养 2 d 的胚轴切段浸泡于 OD₆₀₀ 值为 0.5 的农杆菌菌液中(10 , 20 , 30 min) , 然后转接到共培养基上进行共培养 , 3 d 后检测 *gus* 基因瞬时表达 , 比较不同侵染时间对转化效率的影响。结果表明 , 侵染 10 min 和 30 min *gus* 基因瞬时表达频率都低于侵染 20 min *gus* 基因瞬时表达频率。在农杆菌介导的遗传转化中 , 适当的农杆菌侵染时间是转化成败的关键问题之一 , 侵染时间过短时 , 由于农杆菌与外植体不能充分结合影响转化效

率 , 但当侵染时间过长 , 过度繁殖的菌体对植物细胞易造成伤害 , 从而引起转化效率下降。因此 , 应选择适宜的侵染时间提高转化率。

2.4 共培养时间对转化率的影响

将预培养 2 d 的胚轴切段浸泡于 OD₆₀₀ 值为 0.5 的农杆菌菌液中 20 min , 转移到共培养基上进行共培养(1,2 , 3 d)后检测 *gus* 基因瞬时表达率。共培养 1 d 和 2 d 胚轴切段的 *gus* 基因瞬时表达频率差别不大 , 但都明显高于共培养 3 d 的 *gus* 基因瞬时表达频率 , 且共培养 3 d 的胚轴切段褐化现象严重 , 这可能说明花生对农杆菌比较敏感。

2.5 根癌农杆菌介导转基因花生的获得与检测

取 150 粒花生种子 , 灭菌后接种于 MS₀ 培养基 , 3 d 后取胚轴切成小段 , 接种于 H1 培养基上预培养 2 d , 在 OD₆₀₀ 值为 0.5 的农杆菌菌液中浸泡 20 min , 转移至共培养基培养基上 2 d , 顺次转移到各阶段培养基上 , 14 d 继代一次 , 最后获得 67 株抗性植株(图 2 , 图 3) , 经 PCR 检测共有 5 株抗性再生植株中检测出与 pCAMBIA3301 中 *Bar* 基因大小相符的电泳条带(图 4) , 进一步使用 *Bar* 试纸条检测 5 株阳性植株明确 2 株为阳性(图 5)。由于 *bar* 试纸条的检测灵敏度为 0.15% , 因此可以确定检出的两株转基因植株中外源基因 *Bar* 的表达量占可溶性总蛋白的 0.15% 以上 , 转化率约为 0.3%。检测结果初步确定 *Bar* 基因已经整合到花

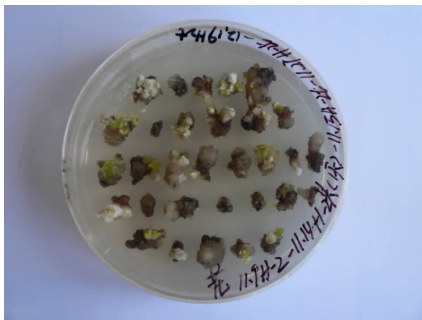


图 2 花生胚轴产生抗性愈伤组织



图 3 花生农杆菌介导转化抗性植株

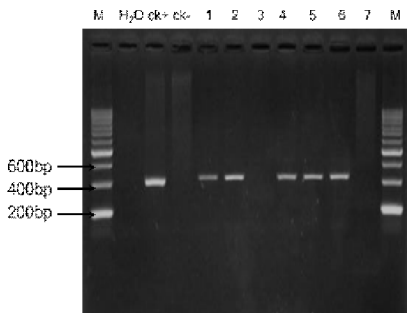


图 4 花生抗性植株 PCR 检测

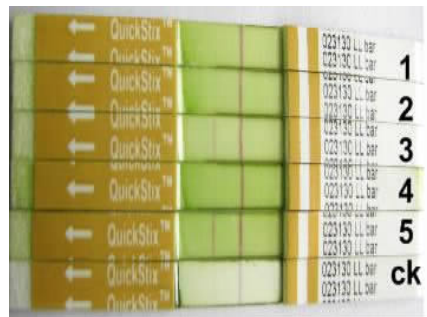


图 5 花生抗性植株试纸条检测

注 :M:200 bpDNA Ladder ;1~7 :抗性植株 ;H₂O :水对照 ;1~5 :转基因植株 ;ck :非转基因阴性对照 ;ck⁺ :质粒阳性对照 ;ck⁻ :非转基因阴性对照 ;ck⁺ :质粒阳性对照

生的基因组中并且得到了表达。

3 讨 论

植物双元表达载体 pCAMBIA 3301 含有 *Bar* 基因,有利于转化过程中对非转化体进行筛选,含有的 *gus* 基因反应产物可被染色,利用这一特点对影响转化效率各个因素进行优化,因此这一载体常常被改造用于多种植物表达载体,所以本研究依此载体建立花生的遗传转化体系具有较大实用性。

草丁膦(glufosinate-ammonium)是以谷氨酰胺合成酶(GS)为靶标酶的有机磷类非传导性灭生除草剂,不但可以灭生除草,也非常适合作为植物转基因研究中的筛选剂。通过导入 *Bar* 基因,植物体内表达出特异的膦丝菌素乙酰转移酶(phosphinothricin acetyltransferase, PAT),以抵抗除草剂的破坏,使转基因植物在喷施了除草剂后仍能继续生长,而非转基因植物因不具有抗性而被灭杀。大豆、玉米、水稻等作物都有利用草丁膦作为筛选剂,获得转基因植株的成功报道^[8-10]。这些报道中,玉米和水稻转化过程中使用 Basta 的浓度在 4~20 mg/L 之间,表现出对草丁膦具有较高的耐受力;大豆转化受体为子叶节,外植体较大,所以也是用了较高浓度的 Basta(3.3 mg/L)。本研究在用胚轴切段做 Basta 敏感性试验时发现,当浓度升高到 1.0 mg/L 时,胚轴切段的死亡率已接近 100%,这一方面说明花生对 Basta 的敏感性很强,另一方面也表明胚轴切段作为转化受体对 Basta 的耐受力较差,所以转化过程中为了避免损失大量的外植体,选用 0.8 mg/L 作为筛选浓度。

花生胚轴切段对农杆菌敏感性也很强,侵染时间长易导致褐化,并且褐化速度很快,共培养 2 d 可使胚轴正常地诱导出胚状体(胚轴切段也有褐化迹象),而共培养 3d 时胚轴切段即褐化发软,无法诱导出愈伤组织,即使得到少量的愈伤组织,状态也不好,较硬,呈结节状,不能正常分化得到再生植株,这可能是导致花生转化难的一个重要原因。更多的影响因素仍在进一步探索中,希望通过优化不同的因素,达到提高花生遗传转化效率的目的。

参考文献:

- [1] EaPenS, Geoge L. Agrobacterium tumefaciens-mediated gene transfer in Peanut (*AraehishyPogaea L.*)[J]. *Plant Cell Reports*, 1994(13): 582-586.
- [2] 瞿 祯. 植物基因工程及其在花生遗传改良上的应用研究近况[J]. *中国油料*, 1994, 16(2): 74-77.
- [3] 王传堂, 李广存, 毕玉平, 等. 花生遗传工程[J]. *花生科技*, 1999(1): 1-5.
- [4] 许泽永. 国外植物基因工程在花生改良上应用研究进展概述[J]. *花生科技*, 1994(2): 1-3.
- [5] 许泽永. 花生基因工程研究进展 [J]. *中国油料作物学报*, 1998, 20(4): 93-98.
- [6] 许泽永. 花生转化和再生研究进展 [J]. *农业生物技术学报*, 2001, 9(2): 107-111.
- [7] 刘艳芝, 韦正乙, 谭 化, 等. 花生体细胞胚发生及植株再生 [J]. *吉林农业科学*, 2008, 33(4): 7-10.
- [8] 李茂福, 李 睿, 傅永福, 等. 农杆菌介导大豆遗传转化的影响因素[J]. *山地农业生物学报*, 2006, 25(4): 283-286.
- [9] 刘小红. *Bar* 基因的转化及抗草丁膦除草剂转基因玉米植株的获得[J]. *沈阳农业大学学报*, 2007, 38(1): 25-29.
- [10] 于恒秀, 赵志鹏, 王 玲, 等. 导入 GNA 和 *Bar* 基因获得抗褐飞虱和抗除草剂的转基因水稻 [J]. *植物保护学报*, 2007, 34(5): 555-556.