

农杆菌介导的薰衣草愈伤组织遗传转化

程娜^{1,2}, 姚大年^{1*}, 张文明¹, 王晓军², 赵民安²

(1. 安徽农业大学农学院, 安徽合肥 230036; 2. 中国科学院新疆理化技术研究所, 新疆乌鲁木齐 830011)

摘要 选用带有天山雪莲冷诱导蛋白基因的载体 pCAMBIA1304, 通过根癌农杆菌 EHA105 介导, 将其转到薰衣草愈伤组织中, 经潮霉素筛选, 获得抗性愈伤组织, 抗性愈伤率为 35.3%。经 GFP 瞬时检测和 PCR 检测, 表明外源基因已经整合到薰衣草基因组中, 从而有可能提高薰衣草的抗寒性。

关键词 薰衣草; 愈伤组织; 冷诱导蛋白; 转化

中图分类号 Q813.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)11-03181-02

Agrobacterium-mediated Transformation of *Lavandula angustifolia*

CHENG Na et al (School of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract A transformation system for *Lavandula angustifolia* was developed using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene delivery system. Leaf induced callus was used as explants. The binary vector pCAMBIA1304 which contained GFP and cold-inducible protein gene was introduced into the *Agrobacterium* strain EHA105 and then transformed into callus. Resistant callus was selected by hygromycin. The resistant percentage of callus was 35.3%. GFP gene expression and PCR analysis result confirmed that the cold-inducible protein gene was integrated successfully into *Lavandula angustifolia* genome, which might improve the cold resistance of *Lavandula angustifolia*.

Key words *Lavandula angustifolia*; Callus; Cold-inducible protein gene; Transformation

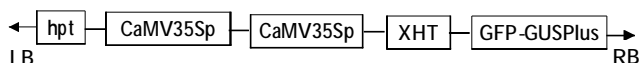
薰衣草 (*Lavandula*) 是唇形花科薰衣草属多年生半阴性亚灌木植物。原产于地中海地区, 我国的河南、陕西、新疆均有分布。薰衣草精油具有安宁镇静、清热解毒、散淤消肿、祛风发汗之效, 广泛应用于医药、食品、烟草、牙膏、化妆品、洗涤剂、消毒剂等工业领域^[1], 具有十分重要的经济价值。

目前关于薰衣草遗传转化的研究报道较少。Sandrine Dronne 等首次报道了用 5 种不同根癌农杆菌转化大薰衣草叶片。结果显示, EHA105 菌株转化获得的植株转化率最高^[2]。Sergio G Nebauer 等用含 npt II 和 gusA 基因的农杆菌菌株 EHA105 对苗龄 35~40 d 的宽叶薰衣草子叶盘和下胚轴进行转化, 获得了抗性植株^[3]。但这些转化研究仅限于报告基因。笔者研究了由根癌农杆菌介导转化孟士德薰衣草 (*Lavandula angustifolia*, cv. Munstead) 愈伤组织的方法, 试图建立稳定的薰衣草遗传转化体系, 并利用该体系将天山雪莲的冷诱导蛋白基因转入到薰衣草中。

1 材料与方法

1.1 植物材料及胚性愈伤组织的诱导 孟士德薰衣草为法国引进品种。叶片经固体培养基 A1、A2 (表 1) 诱导产生愈伤组织。选取继代若干周后生长旺盛、疏松易碎的愈伤组织为农杆菌介导遗传转化的受体材料。

1.2 菌株和质粒 根癌农杆菌菌株 EHA105, 携带质粒 pCAMBIA1304, T-DNA 区含有整合了的潮霉素抗性基因 hpt、雪莲冷诱导蛋白基因 XHT 和 GFP-GUSPlus。hpt 和 GFP-GUSPlus 均位于 CaMV35S 启动子下 (图 1)。



注: LB 和 RB 分别为左边界和右边界; hpt 为潮霉素抗性基因; CaMV35S 为 35S 启动子; XHT 为天山雪莲冷诱导蛋白基因; GFP-GUSPlus 为绿色荧光蛋白和 β -葡萄糖苷酸酶的融合体。

图 1 质粒 pCAMBIA1304 的 T-DNA 区

1.3 农杆菌的培养 挑取农杆菌单菌落, 接种到含 50 mg/L

的卡那霉素的液体 LB 培养基 (表 1) 中, 在摇床上于 150 r/min、27 °C 条件下振荡培养 20~23 h, 至 OD₆₀₀ 为 0.5~0.8。以上菌液 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 收集菌体, 重悬于 MS 培养基中, 至 OD₆₀₀ 为 0.5 左右。

表 1 农杆菌介导薰衣草转化过程中使用的培养基及其成分

培养基	成分
愈伤组织诱导培养基	A1: MS+2, 4-D 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L A2: MS+ NAA 0.2 mg/L+6-BA 2.0 mg/L
共培养基	B1: MS+2, 4-D 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L B2: MS+ NAA 0.2 mg/L+6-BA 2.0 mg/L
延迟筛选培养基	C1: MS+2, 4-D 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L + 头孢霉素 200 mg/L C2: MS+ NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L + 头孢霉素 200 mg/L
筛选再生培养基	D: MS+ NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L + 头孢霉素 200 mg/L + 卡那霉素 100 mg/L
筛选分化培养基	E: MS+ NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+头孢霉素 200 mg/L + 卡那霉素 10 mg/L
筛选生根培养基	F: 1/2MS+IAA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 蔗糖 15 g/L + 头孢霉素 200 mg/L + 卡那霉素 5 mg/L
LB 培养基	G: 胰蛋白胨 10 g/L+酵母提取物 5 g/L+NaCl 10 g/L, pH 值 7.2

1.4 薰衣草愈伤组织的转化 分别挑取继代 2、3、4 周, 生长速度较快、松散易碎、颜色较鲜艳, 表面呈颗粒状突起的愈伤组织, 切碎成 2~3、4~5 mm 大小, 于菌液中浸泡 5、10、15、20 min, 不停摇晃, 取出愈伤组织置于无菌滤纸上吸去附着的菌液, 以未转化的愈伤组织作对照, 计算愈伤组织的存活率。将愈伤组织接种至共培养基的培养基中, 于 22 °C 黑暗中共培养 2~3 d。将共培养后的愈伤组织在无菌水中轻轻漂洗 3~4 次, 直至洗液变清为止。将外植体置于无菌滤纸上吸干, 转入延迟筛选培养基中。27 °C 光照条件下培养 7、10 d。

将延迟筛选培养基中的材料转入 10 mg/L 潮霉素的筛选分化培养基中, 27 °C 光照培养。2 周更换 1 次新鲜的筛选分化培养基。4 周后仍有抗性愈伤组织, 则转入 30 mg/L 潮霉素的筛选分化培养基上。分别以不加潮霉素、未转化的愈伤组织作为对照。

1.5 GFP 瞬时检测 愈伤组织与农杆菌共培养 3 d 后, 立即检测 GFP 基因的瞬时表达, 并计算瞬时表达率。

1.6 转化薰衣草材料的 PCR 鉴定 质粒 DNA 的小量制

作者简介 程娜 (1980-), 女, 安徽合肥人, 硕士研究生, 研究方向: 种子科学与技术。* 通讯作者。

收稿日期 2007-02-13

备采用碱裂解法。用 SDS 法提取薰衣草愈伤基因组 DNA。以天山雪莲冷诱导蛋白为扩增对象。上游引物:5'-TTAACCATGGGAGCAGTGC GGCTCGCAGGGC-3'; 下游引物:5'-GGTTACTAGTTGCGAACGGCCTCTGG TATGTA-3'。PCR 反应条件为:96℃ 预变性 6 min, 循环反应为 94℃ 40 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min 30 s, 循环 40 次, 最后 72℃ 8 min。

2 结果与分析

2.1 影响根癌农杆菌转化薰衣草的因素

2.1.1 侵染时间。研究表明,侵染 5、10、15、20 min,愈伤组织的瞬时表达率逐渐升高。感染 10 min 的 GFP 瞬时表达率可达 90.6%,而感染 5 min 时仅为 38.2%。尽管感染 15 min 瞬时表达率达 95.2%,20 min 甚至高达 97.1%,但在随后的选择培养时却发现很难抑制严重的农杆菌污染(图 2)。

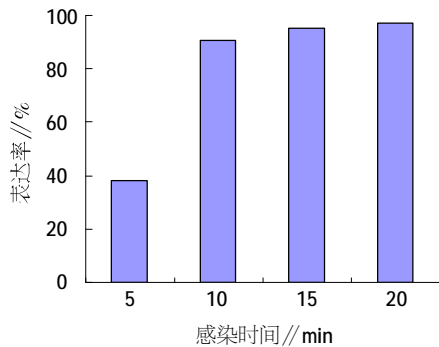


图 2 侵染时间对 GFP 瞬时表达率的影响

2.1.2 继代时间。GFP 瞬时表达研究表明,愈伤组织的生理状态直接影响瞬间转化频率。由图 3 可见,经 1 周继代培养的愈伤组织质量差,GFP 瞬时表达率很低,只有 40.2%;继代培养 2 周后,愈伤组织的质地明显好转且色泽佳,表面呈颗粒状突起且多为体细胞胚胎,此时的愈伤组织转化率最高,GFP 瞬时表达率达 85.2%;继代培养超过 3 周后,瞬时表达率明显下降,4 周仅为 32.6%,同时因愈伤组织老化程度的提高而影响幼苗分化。

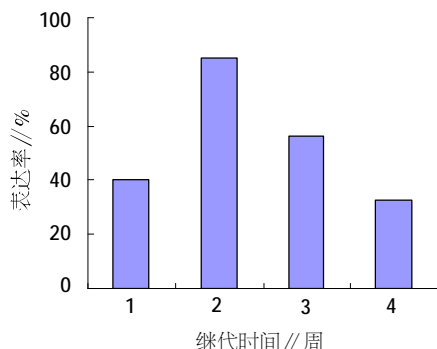


图 3 继代时间对 GFP 瞬时表达率的影响

2.1.3 培养基。取在不同培养基上继代 2 周,大小为 2~3 mm 的愈伤组织,经农杆菌侵染 10 min,共培养 2 d,延迟筛选 10 d,筛选培养 3 周后统计抗性愈伤率。由表 2 可见,在 A2 号培养基上的愈伤组织瞬时转化率(75%)较 A1 高(56%)。而在随后的选择培养过程中愈伤组织大量褐化,得到的抗性愈伤组织较 A1 低得多。因此,A1 培养基最终的抗性愈伤率较高,为 35.3%。愈伤组织褐化的主要原因是由于 6-BA 浓度过高,导致薰衣草愈伤组织产生酚类化合物。另外,愈伤块大小对转化率也有一定的影响,不同大小的愈伤组织

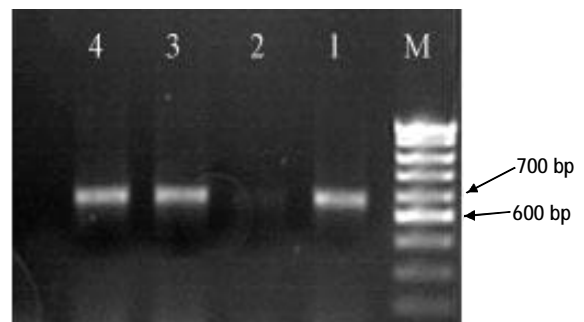
在 GFP 瞬时转化率上基本相同,但 4 mm 以上的愈伤组织在随后的选择培养中很难抑制严重的农杆菌污染。

表 2 培养基对愈伤组织转化率的影响

培养基	愈伤组织数 / 块	GFP 瞬时表达率 / %	抗性愈伤数 / 块	抗性愈伤率 / %
A1	102	56	36	35.3
A2	90	75	12	13.3

2.2 延迟筛选时间对抗性愈伤率的影响 延迟筛选 7 d,获得的抗性愈伤率几乎为 0,而延迟筛选 10 d,抗性愈伤率在 13.3% 以上。原因可能为共培养之后,过早的筛选培养会造成已经转化的外植体细胞因对抗生素的抗性变弱而死亡^[4]。该试验中,薰衣草愈伤组织较其他植物所需的恢复培养时间要长,这可能是由于潮霉素对薰衣草愈伤组织的毒性较强所致。

2.3 转化材料的 PCR 检测 取通过转化获得的不同抗性愈伤组织各约 0.1 g,分别提取总 DNA,并进行 PCR 扩增。在 2 种获得的抗性愈伤组织的扩增结果中,得到了预期分子量的条带,与质粒 DNA 扩增出的条带完全相同,而未转化的薰衣草愈伤组织的 DNA 中未扩增出相应的条带(图 4)。



注:1.质粒 DNA;2.非转基因对照;3,4.转基因阳性愈伤。

图 4 转化薰衣草的 PCR 检测

3 讨论

植物转化受体所处的生理和生长状态是影响转化效率的重要因素之一。具备强分裂能力的感受态细胞是获得高转化率的重要条件。因此,在农杆菌介导的遗传转化中,要把握受体材料的形态特征和生理特性,选择较适宜的感受态细胞以提高转化效率^[5]。该试验结果表明,薰衣草不同继代时间的愈伤组织 GFP 瞬时表达率有明显差异,以继代培养 2 周的愈伤组织进行转化为宜。以往愈伤组织大小的讨论在试验中很少涉及,余云舟等发现,1~2 mm 较 3~4 mm 获得的玉米 GUS 瞬时表达率高^[6]。

该试验结果表明,通过农杆菌介导法,天山雪莲冷诱导蛋白基因已被转移并整合到薰衣草的基因组中,从而有可能提高薰衣草的抗寒性。试验中,通过比较侵染时间、愈伤组织生长状态及不同培养基对转化率的影响,探索适合薰衣草愈伤组织的转化条件。结果显示,在 MS+2,4-D 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 培养基上继代 2 周,大小为 2~3 mm 的愈伤组织,经农杆菌侵染 10 min,共培养 2 d,延迟筛选 10 d,可以获得较高的转化率,而且以后的洗菌及抑菌试验较易成功。这与余云舟等研究结果^[6]一致。目前,薰衣草愈伤组织的根癌农杆菌转化体系尚不完善,还有很多技术指标需进一步优化。

(下转第 3226 页)

(上接第 3182 页)

参考文献

- [1] 《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社. 1979: 248-250.
- [2] SANDRINE DRONNE, SANDRINE M, FRANCOISE BERGER, et al. Agrobacterium-mediated transformation of Lavandula (Lavandula x intermedia Emeric ex Loiseleur)[J]. Transgenic Research, 1999, 8: 335-347.
- [3] SERGIO G NEBAUER, ISABEL A, JUAN S, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the aromatic shrub Lavandula latifolia[J]. Molecular Breeding, 2000, 6:539-552.
- [4] 刘海坤, 卫志明. 大豆遗传转化研究进展[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(2): 126-134.
- [5] 刘颖慧, 于静娟, 赵倩, 等. 根癌农杆菌介导谷子的遗传转化[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(1): 32-37.
- [6] 余云舟, 王罡, 金宁一, 等. 农杆菌介导优良玉米自交系 II 型胚性愈伤组织遗传转化体系的建立[J]. 玉米科学, 2003, 11(3): 28-30, 33.