

一种发根农杆菌介导的花生遗传转化新方法

申红芸, 熊宏春, 郭笑彤, 左元梅*

(中国农业大学资源与环境学院植物营养系, 北京 100193)

摘要:花生是中国重要的油料作物、经济作物和豆科作物。作为世界第一花生生产国和出口国,利用遗传转化方法,加快花生生物性状和遗传育种的研究势在必行。花生根系和根瘤系统的研究对提高花生抗性进而提高花生的产量和品质以及生物固氮能力具有重要的意义。然而,目前花生遗传转化体系还不成熟,给花生研究造成了严重的障碍。本文建立了利用发根农杆菌介导花生下胚轴形成转基因毛根和根瘤的新方法,并分别用 GFP 和 GUS 两种检测方法对该转化体系进行了检测,表明该方法是一个操作简易、高效的遗传转化方法,为利用基因工程技术对花生进行研究和遗传改良提供了一套新方法。

关键词:花生;发根农杆菌;遗传转化

中图分类号: S565.2.01; R943

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X(2012)02-0518-05

A new method of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in peanut plants

SHEN Hong-yun, XIONG Hong-chun, GUO Xiao-tong, ZUO Yuan-mei*

(Department of Plant Nutrition, College of Resource and Environmental Sciences,
China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is an important oil-bearing crops, economic crops and legume crops in China. As the world's first producer and exporter of peanut, it is imperative to accelerate the biological properties and genetic breeding researches in peanut by genetic transformation method. The researches on the root and nodule system of peanut are essential for improving peanut stress-resistance, peanut yield and quality and biological nitrogen fixation capacity. However, nowadays, peanuts genetic transformation system is still not mature, which gives a serious obstacle to the research in peanut. This paper established a transgenic hairy root and nodule system by *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in peanut hypocotyl. And the results of expression profile by the GFP and GUS reporter gene showed that it was an easy and high efficient transgenic system, which provides a new research method and technology system for research and genetic improvement in peanut plants.

Key words: peanut; *Agrobacterium*; genetic transformation

豆科作物花生是我国重要的油料作物和经济作物。作为世界花生市场最大的生产国和出口国^[1],中国花生生物性状和遗传育种的研究工作面临着新的机遇和巨大的挑战。目前,花生的遗传育种研究主要集中在抗病虫害、抗旱、抗热等抗环境胁迫及其相关性状等方面^[2],而花生根系中影响花生抗胁迫能力的关键基因的发掘和功能研究是培育花生抗

性品种的必要前提。在根系研究方面,利用发根农杆菌 Ri 质粒介导,将外源基因整合进植物核基因组,进而引起宿主植物形成转基因毛状根的天然植物遗传转化系统,被广泛应用于植物根系基因表达、功能分析以及次生代谢产物的合成等方面^[3]。该转化体系具有生长迅速、周期短、一条毛状根来源于一个转化细胞、遗传性状稳定等特点,而且将含

收稿日期: 2011-05-20

接受日期: 2011-12-07

基金项目: 国家自然科学基金(31071840); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(2010000811000)资助。

作者简介: 申红芸(1983—),女,山西临汾人,博士研究生,主要从事植物营养生理与分子生物学研究。E-mail: shenhongyun1983@163.com

* 通讯作者 Tel: 010-62733407, E-mail: zuoyun@cau.edu.cn

有目的基因的毛状根转到分化培养基上可以诱导组织器官形成,获得完整的转基因再生植株,也是植物转基因遗传育种的重要手段之一。目前,番茄、大豆、胡萝卜等植物的毛根转化体系已经非常成熟,而花生由于基因组复杂、转化效率低等原因,其毛根转化技术还尚处于摸索阶段,而且,从已有报道的花生毛根研究来看,毛根诱导形成过程都是在无菌条件下进行,给试验操作带来了很高的要求^[4-5]。本文建立了一种不需要无菌环境操作且转化率高的发根农杆菌介导的花生毛根转化系统,为花生遗传转化的研究提供了新的技术手段。

1 材料与方 法

1.1 花生培养

供试花生 (*Arachis hypogaea* L.) 品种为鲁花 14 号,购自中国农业科学院。花生种子首先用 10% 的双氧水表面消毒 20 ~ 30 min,然后,用去离子水冲洗干净,在饱和硫酸钙溶液中浸泡 6 ~ 7 个小时增加种皮的通透性,最后,取出种子,去离子水冲洗干净后,播种到石英砂中避光发苗,26℃ 培养 5 ~ 6 天,获得子叶未张开的花生幼苗作为发根农杆菌侵染的受体。接种农杆菌的花生形成毛根过程中使用发根营养液培养,培养液组成 (mmol/L) 为: CaCl₂ 2000、KH₂PO₄ 1000、Citrate-Fe 20、MgSO₄ · 7H₂O 500、K₂SO₄ 500、MnSO₄ · 4H₂O 2、H₃BO₃ 4、ZnSO₄ · 7H₂O 1、CuSO₄ · 5H₂O 4、CoCl₂ · 6H₂O 0.2、Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.2。花生毛根形成后换在低氮营养液中培养,其营养液组成 (μmol/L) 为: KNO₃ 3200、KH₂PO₄ 1100、MgSO₄ · 7H₂O 600、CaSO₄ · 2H₂O 4300、H₃BO₃ 50、MnSO₄ · 4H₂O 0.8、ZnSO₄ · 7H₂O 0.8、CuSO₄ · 5H₂O 0.3、(NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O 0.02、Fe(III) - EDTA 80。每三天换一次营养液,pH 控制在 5.8 左右。待毛根长出后,开始接种根瘤菌。花生培养在人工气候室中进行,生长条件为光周期 14h/10h (光照/黑暗),对应的温度为 26℃/21℃ (白天/黑夜),室内相对湿度 60%。花生根瘤菌 (*Bradyrhizobium*) 菌株为 CCBAU05272^[6],由中国农业大学生物学院隋新华老师惠赠。

1.2 外源表达载体构建

供试外源表达载体为 pCAMBIA1305.2,该载体中含有烟草花叶病毒 35S 启动子及其下游 GUS 基因以及反向的卡那霉素和潮霉素两个筛选标记基因,如图 1 所示。以 pEZS-NL 表达载体(由中国农业大学李文学老师惠赠)为模板,eGFP-NcoI-F (5'-

TATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT-3') 和 eGFP-BstEII-R (5'-GTCGGTGACCTTACTTGTACAGCTC GTCCA-3') 为引物,PCR 扩增获得 eGFP 基因,然后利用 NcoI 和 BstEII 双酶切位点,用扩增到的 eGFP 基因片段替换 pCAMBIA1305.2 表达载体中的 GUS 基因,构建 35S 启动子接 eGFP 的表达载体 (pCAMBIA1305.2-GFP)。载体构建过程参考常规分子克隆技术^[7]。

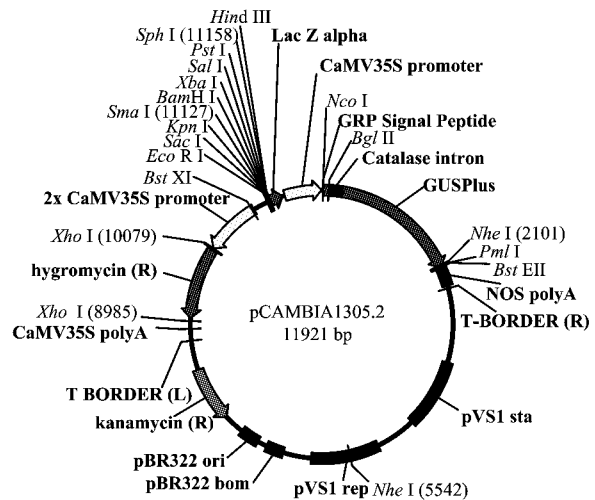


图 1 外源表达载体为 pCAMBIA1305.2 图谱

Fig. 1 Vector map of pCAMBIA1305.2

1.3 发根农杆菌感受态细胞制备与外源表达载体转化

供试发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 菌株为 K599,由华南农业大学资环学院廖红老师惠赠。发根农杆菌感受态的细胞的制备过程:活化发根农杆菌 K599,挑单克隆于 3 mL YEP 培养基中,28℃,220 r/min 振荡培养过夜;取 1.5 mL 菌液接种于 250 mL YEP 培养基中,28℃,220 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.5 左右;将菌液冰浴 30 min,期间不时轻轻摇晃菌液,使菌液温度均一稳定;然后于 4℃,5500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,用 10 mL 预冷的 0.1 mol/L NaCl 溶液重悬细胞;再次 4℃,5500rpm 离心 5 min,弃去上清液,用 1 mL 预冷的 20 mmol/L CaCl₂ 溶液重悬细胞,最后将重悬的菌液分装成每管 50 μL,液氮速冻后储存于 -70℃ 冰箱中备用。外源表达载体转化过程:取 5 μL 载体与 50 μL 农杆菌感受态细胞轻柔混匀后,冰浴 30 min,然后液氮冷冻 1 min,接着 37℃ 融化 5 min,冰浴 2 ~ 3 min,向农杆菌中加入 500 μL YEP 培养基,28℃,220 r/min 振荡培养 2 h,取 200 μL 菌液均匀涂布在含有

卡那霉素(50 mg/L)的 YEP 固体培养基上,28℃ 培养获得成功转化菌株。YEP 培养基组成(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 10, 氯化钠 5, 琼脂粉 12(固体培养基使用), pH 值调至 7.0。

1.4 下胚轴纵切转化法诱导花生转基因毛根形成

在花生发苗的过程中,同时用 YEP 固体培养基活化含有表达载体的农杆菌。接种前,用玻璃刮铲收集菌体,在菌体上加入少量 0.5 mol/L 乙酰丁香酮,轻轻拌匀。当花生形成短而粗的胚轴、子叶尚未胀破种皮露出石英砂表面时(一般播种后 5 d),取出花生幼苗(图 2A),用沾有农杆菌的解剖刀在花生下胚轴垂直切割,环绕下胚轴切割 3~4 处,尽可能的将菌体送入胚轴内(图 2B),然后将接种后的花生种到浇灌发根营养液的石英沙中,培养至花生第一片叶子长出(图 2C),然后用岩棉包裹接种部位,将花生幼苗移植到发根营养液中继续培养,岩棉下部接触营养液,保持接种部位湿润,促进毛根形成(图 2D);待花生接种部位形成愈伤组织或毛根突起时(图 2E),用移液器向接种部位包裹的岩棉上部滴加 50 mg/L 潮霉素约 1 mL,慢慢分布于整个岩棉中,每两天滴加一次,连续处理 3~4 次,用于抑制非转基因毛根的生长,潮霉素处理结束后,用去离子水冲洗岩棉,尽量去除残留的潮霉素,然后在岩棉上

滴加花生根瘤菌液(约 1×10^7 个细胞/mL),少量多次,提高根瘤菌侵染率;待毛根长至 10 cm 左右,去除花生主根及岩棉(图 2F),将带有毛根的花生植株转入含有花生根瘤菌的低氮营养液中继续接种培养 12 h,之后,在低氮营养液中长期培养(图 2G),促进毛根生长同时诱导毛根结瘤(图 2H),每 2 d 更换一次营养液。

1.5 转基因毛根检测

待毛根结瘤后,取转入 pCAMBIA1305.2 质粒花生植株上的毛根根段在 GUS 染液中于 37℃,避光染色过夜,然后依次用 50%、75% 乙醇浸泡 20 min,洗脱残留染色液,最后通过观察 GUS 染色情况,筛选转基因毛根。对转入 pCAMBIA1305.2-GFP 质粒的花生植株,将其毛根及其根瘤徒手切片后,直接用荧光显微镜筛选转基因毛根。GUS 染液组分为:磷酸缓冲液(pH 7.0) 100 mmol/L、曲拉通 X-100 0.5% (v/v)、甲醇 20% (v/v)、X-Gluc 1 mmol/L。

2 结果与分析

2.1 花生毛根的形成

利用下胚轴纵切转化法,分别用含有 pCAMBIA1305.2 或 pCAMBIA1305.2-GFP 质粒的发根农杆菌 K599 侵染花生下胚轴,在农杆菌 Ri 质粒介导

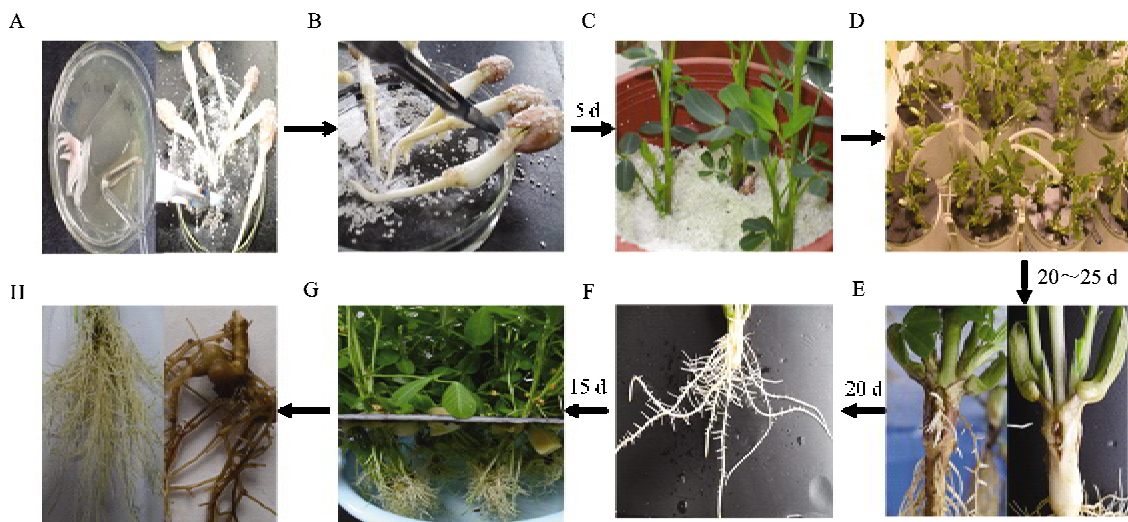


图 2 下胚轴纵切转化法诱导花生转基因毛根及其根瘤的形成过程

Fig. 2 Forming process of transgenic hairy roots and nodules in peanut hypocotyl by straight-cut transformation.

[注(Note): A—收集发根农杆菌(左图) *Agrobacterium rhizogenes* (left), 用于转化的花生幼苗(右图) Young peanut plants for transformation (right); B—用沾有农杆菌的解剖刀在花生下胚轴垂直切割 Cutting the peanut hypocotyl vertically using a scalpel stained with *Agrobacterium*; C—石英沙中培养花生长出第一片叶子 Young peanut plants grow in quartz sand; D—发根营养液中培养花生促进毛根形成 Peanut plants grow in nutrient solution improving formation of hairy roots; E—花生刚形成毛根突起 Hairy roots emerge on the surface of peanut hypocotyl; F—去除主根后的花生毛根 Peanut plants with hairy root only; G—花生毛根大量生长 Peanut plants with a mass of hairy roots; H—毛根(左图), 根瘤(右图) Hairy roots (left), hairy root nodules (right).]

下将外源基因整合进花生的核基因组中。图 2 显示,在培养的 100 株花生中,平均 25 d 后,在花生下胚轴接种部位都有愈伤组织及毛根凸起开始形成,诱导率 100%。在潮霉素的筛选压力下,毛根生长约 20 天,其长度可到达 10 cm 以上,此时去除花生主根,毛根迅速生长,多级侧根大量形成,同时有根瘤形成,说明该方法可以高效地转化发根农杆菌进入并整合到花生的基因组中,进而诱导花生产生大量的毛根,是一个高效的转化方法。

2.2 转基因毛根的检测

利用 GUS 染色方法,分析花生形成的毛根中 pCAMBIA1305.2 质粒成功整合到核基因组中所获得的转基因毛根情况,如图 3A 所示。研究发现,经过潮霉素的初筛,每株花生形成的毛根中,50%~75% 具有 GUS 酶活性,说明该方法体系对于外源基因的转化也是高效的。同时,从图 3B 和图 3D 对毛根的 GUS 活性的分析也可以看出,转入 pCAMBIA1305.2 质粒的毛根,在 35S 启动子的调控下,在根系的每一层细胞中都可以检测到 GUS 酶活性,进一步证明了获得的转基因毛根是阳性的。

同样,对转入 pCAMBIA1305.2-GFP 质粒毛根及其根瘤的分析结果,也可以看出在 35S 启动子的调控下,在根系和根瘤的每一层细胞中都可以检测到荧光,利用该转化体系可以获得阳性的转基因毛根和根瘤(图 4)。

3 讨论与结论

本文建立了利用下胚轴纵切转化发根农杆菌进而介导花生下胚轴形成转基因毛根和根瘤的体系,通过对花生下胚轴毛根形成及外源基因转入情况的分析结果表明,该转化体系不仅可以高效转化发根农杆菌,诱导花生大量形成毛根,而且在介导外源基因的转化方面也表现出转化和整合入花生基因组的高效率,是一个高效的转基因体系。与已有报道的诱导花生形成毛根的体系相比,该转化体系主要有两大特点:第一,姚庆收等人和 Karthikeyan 等人都是利用花生子叶、叶片、茎段等外植体作为发根农杆菌受体,只诱导毛根大量形成,主要用于次生代谢产物的提取和获得^[5,8];而本文建立的体系,不破坏花生地上部,在下胚轴诱导形成转基因毛根系统代替花生根系,获得的是一个组织结构完整的花生植株,该植株一方面可以用于研究外源转入基因在根系的生物学功能以及该基因在过量表达或者沉默等条件下,对花生植株生长状况例如抗胁迫能力的影

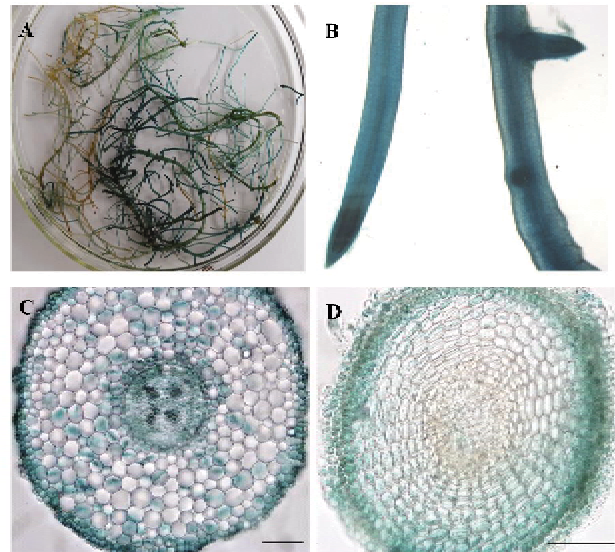


图 3 转入 pCAMBIA1305.2 质粒的毛根检测
Fig. 3 Analysis of the peanut hairy root with pCAMBIA1305.2 plasmid

[注(Note): A—同一株花生中转 GUS 基因毛根筛选 Screening the transgenic hairy roots from all hairy roots of one peanut plant; B—转 GUS 基因毛根的根尖(左图)和侧根(右图) Transgenic hairy root tip (left) and lateral root (right); C—转 GUS 基因毛根横切面 Cross-section of the transgenic hairy roots; D—转 GUS 基因毛根根尖横切面 Cross-section of the transgenic hairy root tips. 图中比例尺代表的是 10 μ m The scale bars are 10 μ m.]

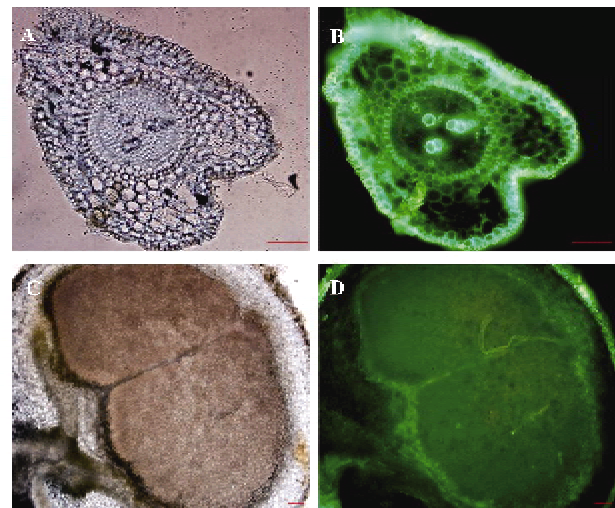


图 4 转入 pCAMBIA1305.2-GFP 质粒的花生毛根检测
Fig. 4 Analysis of the peanut hairy root with pCAMBIA1305.2-GFP plasmid

[注(Note): A 和 B—转 GFP 基因毛根横切面 A and B, Cross-section of the transgenic hairy roots; C 和 D—转 GFP 基因毛根根瘤横切面 C and D, Cross-section of the transgenic hairy root nodules; A 和 C 分别是 C 和 D 在荧光显微镜下对应明场的照片 The left column show a bright-field image corresponding to the right column with GFP fluorescence. 图中比例尺代表的是 10 μ m The scale bars are 10 μ m.]

响;另一方面,该体系获得的完整花生植株可以形成根瘤共生固氮体系,也是研究花生根瘤共生体系中关键基因功能的一个非常好的研究体系。第二,目前,已有报道的关于花生毛根的研究都是在无菌条件下,利用 MS 培养基培养外植体以及形成的毛根,在这个过程中,所有的试验操作必须在超净台中进行^[4-5],对实验条件以及操作人员的技术提出了更高的要求,而该体系中,除了前期农杆菌的培养在无菌条件下进行外,后续的所有试验在普通实验室条件下即可进行,操作简单,是一个易于掌握而且高效的研究体系。

参考文献:

- [1] 刘秀青,刘珉. 中国花生产业国际竞争力实证研究[J]. 河南农业科学, 2008, (11): 42-46.
Liu X Q, Liu M. Experimental study on the international competition power of China's peanut industry[J]. J. Henan Agri Sci., 2008, (11): 42-46.
- [2] 张保亮,张晓玲,杨桥,等. 国际花生育种研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(4): 148-151.
Zhang B L, Zhang X L, Yang Q *et al.* Advances in peanut breeding in foreign countries[J]. Chin. Agric. Sci. Bull., 2005, 21(4): 148-151.
- [3] Hu Z B, Du M. Hairy root and its application in plant genetic engineering[J]. J. Integr. Plant Biol., 2006, 48: 121-127.
- [4] Baker C M, Durham R E, Burns J A *et al.* High frequency somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using mature, dry seed[J]. Plant Cell Rep., 1995, 15: 38-42.
- [5] Karthikeyan A, Palanivel S, Parvathy S *et al.* Hairy root induction from hypocotyl segments of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Afr. J. Biotechnol., 2007, 6 (15): 1817-1820.
- [6] Liu J, Wang L L, Wang E T *et al.* Phylogenetic diversity of rhizobia isolated from the root nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) grown in Hebei[J]. Sci. Agric. Sin., 2006, 39: 344-352.
- [7] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd ed.) [M]. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] 姚庆收,武玉永,王学全. 发根农杆菌介导的花生遗传转化系的建立[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(35): 15367-15368.
Yao Q S, Wu Y Y, Wang X Q. Establishment of peanut genetic transformation system by *Agrobacterium rhizogenes* [J]. J. Anhui Agric. Sci., 2008, 36(35): 15367-15368.