红菜薹 *AtARF8* 转基因植株的筛选与鉴定

姚 焱, 刘顺枝, 汪珍春, 王小兰, 黄志伟, 田长恩

(广州大学 生命科学学院, 广东 广州 510006)

摘 要: 超表达拟南芥生长素反应因子 8(*Auxin Response Factor* 8, *AtARF8*)基因能够削弱顶端优势, 增加侧薹数量。因此, 将 *AtARF8* 基因转入红菜薹, 有望成为解决其侧薹数少、产量低的有效途径。该试验利用花蕾浸泡转化法将 *AtARF8* 基因转化红菜薹花序, 获得种子 3 400 粒。将这些种子在卡那霉素抗性培养基上进行初步筛选, 获得了存活植株; 并通过 PCR 分析, 从这些存活植株中鉴定出 3 株转 *AtARF8* 基因的红菜薹植株, 其转化率接近 0.1%。

关键词: 红菜薹; *AtARF8*; 花蕾浸泡转化; 转基因植株

中图分类号: S 634.6; Q 943.2 文献标识码: A 文章编号: 1001—0009(2009)07—0047—03

红菜薹, 又称紫菜薹(*Brassica campestris* L. ssp. Chinessis var. purpurea Tsen et lee), 是中国特有蔬菜。其风味独特, 营养丰富, 颇受消费者的青睐。但现有的适合于华南地区种植的红菜薹品种侧薹数偏少, 产量较低。生产上为促进侧薹萌发, 常采用人工摘除主薹, 导致劳动力成本增加。因此, 目前市场需要培育出侧薹萌发和生长能力强的品种, 在节省成本的同时, 达到稳产和增产的目的。

拟南芥生长素反应因子 8(*Auxin Response Factor* 8, *AtARF8*)基因的功能缺失导致较强的顶端优势和较弱的光反应。超表达 *AtARF8* 基因则可削弱顶端优势, 促进侧枝生长, 增加农作物产量[1]。因此, 将 *AtARF8* 基因转化入红菜薹品种中, 有望提供解决目前红菜薹侧薹数少、产量低的有效途径。

在现有芸薹属植物的转基因方法中, 农杆菌介导法用得最广[2-3]。农杆菌介导的花蕾浸泡(floral-dip)转化法是近年发展起来的一种简便、快速、稳定性高的非组织培养转基因方法[4]。利用该法能直接获得转化种子, 避免了遗传转化和植株再生途径中因体细胞变异和嵌合体形成带来的不利影响。这个方法已在油菜、拟南芥、萝卜、苜蓿等多种植物中成功运用[2]。该试验采用农杆菌介导的花蕾浸泡转化法对红菜薹进行拟南芥 *AtARF8* 基因的转化, 通过抗生素筛选和分子鉴定, 确定转化植株。为利用花蕾浸泡转化法进行红菜薹转基因研究奠定方法学基础, 同时又为培育侧薹数增多、产量增加的红菜薹新品种准备材料。

第一作者简介: 姚焱(1972-), 女, 博士, 副教授, 现从事生物技术研究工作。E-mail: yaoyannn@163.com。

基金项目: 广东省科技计划资助项目(2005B2090101015)。

收稿日期: 2009—02—15

1 材料与方法

1.1 供试材料

红菜薹 9101 和 9017 品系由湖南省蔬菜科学研究所吴朝林高级农艺师提供。

1.2 转化载体

农杆菌 LBA4404 由广州大学基因功能与基因芯片研究中心提供, 超表达载体 pBI101-Hm-35s-ARF8 由 Tian 等(2004)[1] 构建。在该质粒中, *AtARF8* 基因由 CaMV 35S 启动子驱动, 抗卡那霉素基因(*NPT II*)由 NOS3 启动子驱动, 潮霉素抗性基因(*HPT*)由 CaMV 35S 启动子驱动(图 1)。

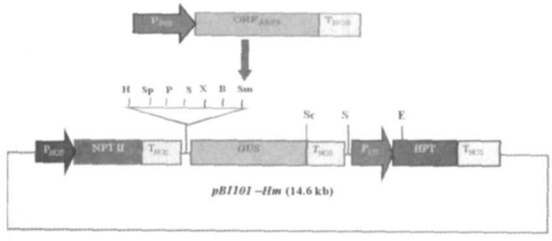

图 1 转化载体构建示意

Fig. 1 Construction of transformation vector

1.3 根癌农杆菌的培养及转化液准备

取 10 mL 已活化农杆菌液, 加入含 50 μg/L Km 的 400 mL 1/4 LB 培养基(1%蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1% NaCl, pH 7.0)中, 28 ℃振荡培养约 3 h, 至 OD_{600}=0.5, 4 ℃下、6 000 rpm 离心 6 min。离心完后用转化液悬浮农杆菌, 转化液悬浮中表面活性剂 silwet-77 的浓度为 0.01%, 蔗糖为 5%。

1.4 花蕾浸泡转化法转化植株

选择初花期的油菜植株, 除去主花序和每个分枝花

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

序的顶端花蕾,将快要开放的花蕾浸入浸染液约 5 s,用纸袋包裹花序保湿,放于暗处 24 h 后,除去纸袋,并置于自然环境中常规管理直至收获种子。

1.5　卡那霉素抗性筛选浓度确定

选取红菜薹未转化处理种子,75%酒精浸泡 30 s,再转至 0.1%升汞溶液中浸泡 10 min,无菌水洗涤 3 次。接种到含有不同卡那霉素抗性筛选浓度 0、100、150、200、250 和 300 mg/L 的 1/2MS 培养基上,每瓶接种 50 粒左右,每个浓度 3 个重复。24℃恒温培养。确定适宜的抗性筛选浓度后,将转化处理的种子接种于此浓度卡那霉素筛选培养基,进行抗性植株筛选。

1.6　样品 DNA 提取

从待检植株上取少量植株幼嫩叶片,液氮处理并研磨成粉末,加入 500 μL DNA 抽提液(0.2M Tris-HCl pH 9.0、0.4M LiCl、25 mM EDTA、1%SDS)和 500 μL 苯酚∶氯仿∶异戊醇(25∶24∶1),漩涡 10 s;12 000 rpm,10 min,上清液中加入 500 μL 异丙醇,混匀,静置10 min;12 000 rpm,10 min 4℃,沉淀真空吸干;沉淀干燥后加入 20 μL 无菌水溶解 DNA。

1.7　转化植株中 *AtARF8* 基因的 PCR 鉴定

以上述 DNA 为模板,用根据 *AtARF8* 基因所设计的引物进行 PCR 鉴定。其中,前向引物为引物 1:5'-AAG CCT ACC ACC ACA ATT GAT ATG-3';反向引物为引物 2:5'-AAA GAC ACT CCA TCC AGT AGT TAG-3'。PCR 反应的总体积为20 μL,其中,模板50 ng,dNTP 0.2 mmol/L,引物浓度0.5 μmol/L。将各组分混合均匀进行进行 PCR 反应:94℃,4 min;94℃,30 s;55℃,30 s;72℃,1 min;循环 35 次;72℃延伸 5 min。反应结束后取产物 5 μL 加入 1 μL 6× loading buffer,在 1.0%的琼脂糖凝胶上电泳检测,用全自动凝胶成像分析系统(Alpha Innotech Multilmage™ Light Cabinet Filter Positions)拍照。

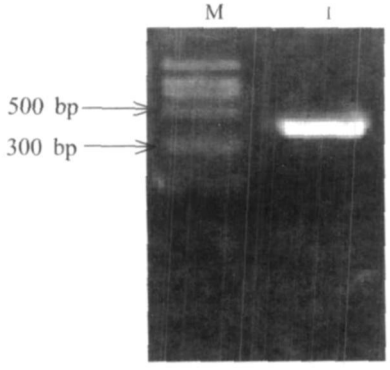

图2　重组农杆菌的 PCR 鉴定

Fig. 2　Identification of transformed Agrobaterium

注:M:DNA Marker;1:携带 AtARF8 农杆菌。

2　结果与分析

2.1　重组农杆菌中 *ARF8* 基因的 PCR 鉴定

随机挑选重组农杆菌单菌落提取质粒,进行 PCR 鉴定(图 2),得到预期的 333 bp 的扩增条带,表明目的基因 *AtARF8* 已成功转入农杆菌 LBA4404。

2.2　花蕾浸泡法获得转化种子

用农杆菌悬浮液直接浸染红菜薹花序。待种子成熟,共获得转化种子 3 400 粒。

2.3　卡那霉素抗性浓度的确定及转化植株的筛选

红菜薹种子在卡那霉素浓度 0~300 mg/L 的筛选培养基上生长,随着卡那霉素浓度的升高,幼苗叶片逐渐失绿,茎部出现紫色,根生长明显抑制(图 3);当卡那霉素为 250 mg/L 及以上浓度时,幼苗完全失绿,不能正常生长。故将 250 mg/L 确定为卡那霉素的抗性筛选浓度。

具有卡那霉素抗性的幼苗能在含卡那霉素的培养基上正常生长发育,而不具有卡那霉素抗性的幼苗,子叶及真叶叶片白化,叶柄变紫变红,最终死亡(图 4)。通过对 3 400 粒转化种子进行卡那霉素抗性初步筛选,共获得卡那霉素阳性幼苗 58 株,但部分在栽培过程中死亡。正常生长植株所结种子,用于进一步的分子鉴定。

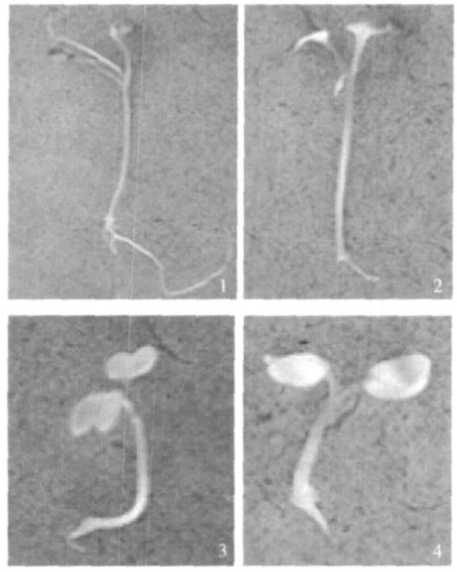

图 3　卡那霉素抗性筛选浓度的确定

Fig. 3　The selection of kanamycin concentrations on Ms medium

注:1:.Kanamycin 0 mg/L;2:Kanamycin 100 mg/L;3:.Kanamycin 200 mg/L;4:Kanamycin 250 mg/L。

2.4　转基因植株的 DNA 分子鉴定

红菜薹叶片 DNA 经 PCR 反应后,电泳检测扩增片段(图 5)。通过 PCR 鉴定,共有 3 株为转基因植株。在所有转化种子中转基因率约为 0.1%。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

图 4 转化种子在含卡那霉素培养基上的生长状况

Fig. 4 Development situation of seeds cultured on Kanamycin-containing medium.

注:1:卡那霉素抗性苗 Kanamycin-resistant seedling;2:无卡那霉素抗性苗 Kanamycin sensitive seedling.

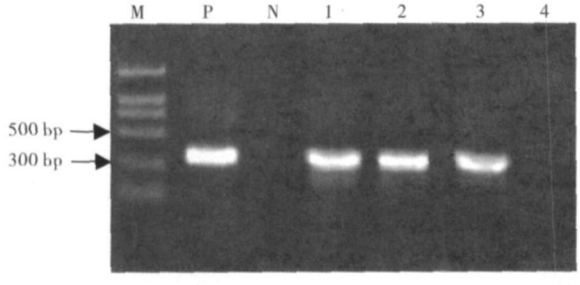

图 5 红菜薹转基因植株的 PCR 检测

Fig. 5 Molecular detection of PCR in transgenic plants

Note: M: Marker; P: Plasmid (positive control); N: Non-transgenic plant (negative control); 1~4: Candidates of transgenic plants.

3 讨论

Clough(1998)用拟南芥作为受体,利用花蕾浸泡转化法转移基因获得成功,并认为表面活性剂 silwet-77 是提高花蕾浸渍转化频率的关键之一,其使用浓度为 0.005%~0.1%。付绍红等(2004)在甘蓝型油菜转化过程中,使用 0.05% silwet-77 获得较高转化率[5]。该试验中 silwet-77 处理浓度为 0.01%,浓度高对该品种红菜薹结实率产生较大抑制作用。这反应出不同植物花序对表面活性剂的耐受性差异。

在菜薹花序经过花蕾浸泡转化法处理后结实过程中,由于红菜薹植株极易受到虫害袭击,影响到植物的正常生长和种子采收,减少了转化种子的采收量。可见,加强植株管理和防虫治虫是保证转基因成效的基础环节;另外,转化种子经过卡那霉素抗性筛选获得的阳性植株,在田间种植过程中也易出现夭折和虫害危害,造成一定比例的筛选植株死亡,明显降低了转基因植株的获得率。因此,在菜薹利用花蕾浸泡转化法进行外源基因转化及筛选时,如何减少损失,将是提高基因转化效率的重要环节。

参考文献

[1] Tian C E. Disruption and overexpression of Auxin Response Factor 8 gene of Arabidopsis affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition[J]. Plant J, 2004, 40: 333-343.

[2] 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[J]. 分子植物育种, 2003, 1(1): 108-116.

[3] 徐光硕,饶勇强,陈雁,等. 用 in planta 方法转化甘蓝型油菜[J]. 作物学报, 2004, 30(1): 1-5.

[4] Desfeux C. Female reproductive tissues are the primary target of Agrobacterium-mediated transformation by the Arabidopsis floral-dip method [J]. Plant Physiol, 2000, 12: 895-904.

[5] 付绍红,牛应泽,杨洪全,等. 表面活性剂 silwet-77 对 floral-dip 转化甘蓝型油菜效果的影响[J]. 分子植物育种, 2004, 5(2): 661-666.

Selection and Identification of Transgenic *Brassica campestris* L. ssp. Chinessis var. purpurea Tsen et lee. Harboring Arabidopsis *ARF*8 Gene

YAO Yan, LIU Shun-zhi, WANG Zhen-chun, WANG Xiao-lan, HUANG Zhi-wei, TIAN Chang-en

(College of Life Science, Guangzhou University, Guangdong, Guangzhou 510006, China)

Abstract: *Arabidopsis Auxin Response Factor* 8 (*AtARF*8) gene could weaken the apical dominance and improve side sprouts growing when it is overexpressed. To increase the quantity of plant side sprouts and improve plant yield, AtARF8 gene was transferred into *Brassica campestris* L. ssp. Chinessis var. purpurea Tsen et lee through the floral-dip method. 3 400 candidate seeds were collected from transformed plants. These seeds were cultured on the kanamycin-containing medium in which antibiotic concentration was determined as 250 mg/L through screening for concentration. Km-resistant plants were selected in the medium. Result of PCR showed that 3 of the kanamycin-resistant plants were transgenetic plants in which *AtAFR*8 gene had been integrated into the plant genome. The ratioper cent of transformation is about 0.1%.

Key words: *Brassica campestris* L. ssp. Chinessis var. purpurea Tsen et lee.; *AtARF*8; Floral-dip transformation; Transgenic plant

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net