

# 洋葱可视化多重标记遗传转化研究

张洪伟, 谭武平, 梁毅

(北京市农林科学院 蔬菜研究中心, 北京 100097)

**摘要:**以“凤凰白皮”洋葱种子为试材, 采用转基因方法, 将载体 pBAC9075 转入愈伤组织, 研究花青素合成转录因子 Bi 和 C1 对转基因植株的影响。结果表明: 经再生培养和草甘膦筛选, 获得 189 棵再生植株, PCR 检测发现 5 棵再生植株表现阳性, 田间草甘膦筛选有 7 棵植株存活, 其中 2 棵植株鳞茎有花青素积累, 试验结果以期花青素作为一种可视化跟踪系统用于洋葱转基因植株早期筛选提供依据。

**关键词:**洋葱; 遗传转化; 花青素

**中图分类号:**S 633.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)24-0099-05

葱属植物的遗传转化研究最早在洋葱上获得成功, 且转化技术也是最成熟的。Eady<sup>[1]</sup>和 Joubert 等<sup>[2]</sup>分别成功将 *GUS* 基因导入洋葱并表达, 摸索适宜条件, 建立了洋葱遗传转化体系。徐启江等<sup>[3]</sup>用洋葱鳞茎盘诱导出愈伤组织作为受体材料, 将外源锌指蛋白基因 *OSI-SAP1* 整合到洋葱基因组, 得到高度耐盐碱性的转基因植株。刘海燕等<sup>[4]</sup>成功将 *MpASR* 导入洋葱表皮细胞, 为洋葱生理功能及抗逆性育种研究提供了基础。

将草甘膦抗性基因转入植物, 可获得草甘膦的抗性植株; 基因工程常利用其优越的特性, 将该抗性基因做为筛选标记, 通过施用草甘膦筛选目标植株, 大大降低了人工成本, 提高了转化效率, 其中常用的 3 种草甘膦筛选标记分别为 *bar*、*bxn* 和 *epsps* 基因。花青素生物合成相关基因包括结构基因和调节基因; 其中调节基因主要通过控制操纵子, 从而影响结构基因的活性。花青素作为一种肉眼可观察到的性状, 为植物的遗传转化研究带来了极大的方便; 花青素合成转录因子基因作为一种可视化的分子标记用于转基因研究, 大大节省了人财物力。

该研究以草甘膦为筛选标记拟将花青素合成转录因子基因(*Bi* 和 *C1*)通过农杆菌转化法导入洋葱, 获得

*Bi* 和 *C1* 基因高效表达的转基因洋葱稳定株系, 以期为其作为报告基因在洋葱遗传转化中的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 以农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室保存的“凤凰白皮”洋葱种子为试验材料。

1.1.2 载体及试剂 含表达质粒载体 pBAC9075(图 1)的大肠杆菌菌株 Top10 和农杆菌菌株 EHA105(含利福平和四环素抗性), 由北京市农林科学院生物研究中心张晓东老师惠赠; pBAC9075 含大肠杆菌及农杆菌筛选标记 *kan<sup>r</sup>*, 草甘膦筛选标记基因 *EPSPS-CP4*, 花青素调节基因 *Bi* 和 *C1* 分别置于 *CaMV 35S* 启动子下。卡那霉素(Kanamycin, Kan)、利福平(Rifampicin, Rif)、四环素(Tetracycline, Tet)、乙酰丁香酮(Acetosyringone, AS)购

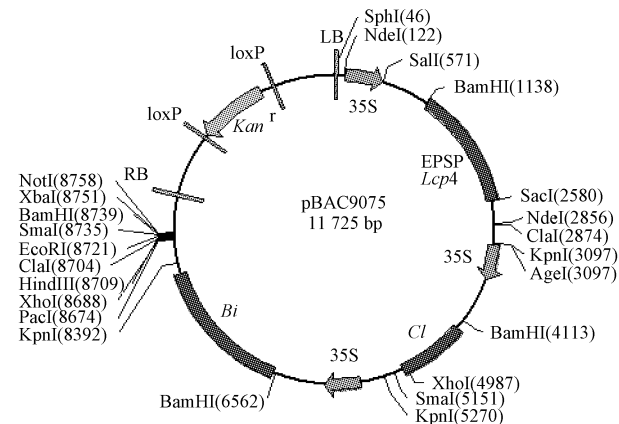


图 1 pBAC9075 表达载体

Fig. 1 Plant expression vector pBAC9075

**第一作者简介:**张洪伟(1986-), 男, 河北井陉人, 研究实习员, 研究方向为洋葱与胡萝卜遗传育种。E-mail:zhwwawzjcx@163.com.

**责任作者:**梁毅(1969-), 男, 河南信阳人, 硕士, 副研究员, 研究方向为洋葱与胡萝卜遗传育种。E-mail:liangyi@nrcv.org.

**基金项目:**国家公益性行业科技资助项目(20093018); 国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2012BAD02B00; 2011BAD35B07); 国家“十二五”蔬菜品种创制的细胞与分子辅助选育系统构建资助项目(2012BAD50G01)。

**收稿日期:**2014-09-22

自美国 Sigma 公司;  $2\times Taq$  PCR Mix 购自 Thermo 公司; 特美汀(Timentin, 有效成分替卡西林钠及克拉维酸钾)及其它常规试剂均为国产。

1.1.3 植物组织培养基配方 诱导培养基: MS+2,4-D (4 mg/L)+6-BA(1 mg/L)+蔗糖(30 g/L)+琼脂(8 g/L); 继代培养基: MS+2,4-D(2 mg/L)+6-BA(2 mg/L)+蔗糖(30 g/L)+琼脂(8 g/L); 共培养基: MS+2,4-D(2 mg/L)+6-BA(2 mg/L)+AS(200  $\mu$ mol/L)+蔗糖(30 g/L)+琼脂(8 g/L); 抑菌培养基: MS+2,4-D(2 mg/L)+6-BA(2 mg/L)+AgNO<sub>3</sub>(5.0 mg/L)+特美汀(200 mg/L)+蔗糖(30 g/L)+琼脂(8 g/L); 分化培养基: MS+TDZ(1 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)+AgNO<sub>3</sub>(7.5 mg/L)+特美汀(200 mg/L)+草甘膦(0.5 mg/L)+蔗糖(30 g/L)+琼脂(8 g/L); 生根培养基: MS+NAA(0.01 mg/L)+特美汀(200 mg/L)+蔗糖(30 g/L)+琼脂(7 g/L)。

## 1.2 试验方法

1.2.1 洋葱胚性愈伤组织获得 选饱满成熟的洋葱种子, 75%酒精消毒 1 min, 0.1%升汞 12 min, 无菌水冲洗干净, 晾干表面水分后接种于诱导培养基, 25℃暗培养至芽长 1 cm, 取顶端 0.1~0.2 cm 继续培养, 产生初级愈伤组织, 将初级愈伤组织于继代培养基中培养得到胚性愈伤组织。

1.2.2 分化培养及草甘膦浓度选择压确定 将“凤凰白皮”洋葱胚性愈伤组织分别转移到含草甘膦浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L 的分化培养基中培养, 每个处理接种 30 个生长旺盛的、具有较强分化能力的胚性愈伤组织, 培养基 15 d 更新 1 次。观察培养 10、20、35、50 d 愈伤组织的生长情况并记录分化的愈伤组织数, 试验重复 3 次。以完全抑制愈伤组织分化能力为标准, 确定草甘膦最终选择压力。

1.2.3 田间草甘膦浓度选择压确定 将“凤凰白皮”洋葱种子播种于育苗穴盘、匀苗, 待幼苗长至 2~3 片叶时, 分别以 50 mL 0.01‰、0.10‰、0.50‰、1.00‰、2.00‰ 的草甘膦溶液喷施洋葱幼苗(植株叶片挂满小水珠), 对照组喷施自来水, 每个处理 1 块穴盘, 10 d 后观察幼苗生长情况。

1.2.4 农杆菌转化及初步筛选 含质粒 pBAC9075 的农杆菌划线、活化并培养至 OD<sub>600</sub>=0.6~0.8, 制成农杆菌侵染液; 将待处理“凤凰白皮”洋葱愈伤组织放入含 200  $\mu$ mol/L AS 的农杆菌侵染液中侵染 10~20 min, 取愈伤组织于无菌滤纸上晾干, 于共培养基 22℃暗培养 3 d。用含特美汀 200 mg/L 的无菌水将共培养愈伤组织(周围可见部分菌落)冲洗干净, 将愈伤组织于无菌滤

纸上晾干, 于抑菌培养基培养 7 d。将经过恢复培养的愈伤组织转接于含 0.5 mg/L 草甘膦的分化培养基中筛选 15 d, 再于含 1 mg/L 草甘膦分化培养基中筛选, 继代培养直至长出再生芽; 将再生芽切下, 转至生根培养基诱导生根。培养条件均为温度 28℃、光照时间 16 h/8h、光照强度 1 800~2 000 lx。当不定根长至 4~8 cm 时, 打开培养瓶驯化练苗 3 d, 洗去根部培养基, 并移栽到营养土中, 移入温室培养。

1.2.5 洋葱 PCR 检测 采用 CTAB 法提取洋葱叶片基因组 DNA, 并以为之模版(非转基因植株叶片 DNA 为阴性对照, 含目的基因的质粒为阳性对照), 根据 EPSPS-CP4 基因、Bi 基因序列设计引物(表 1), 分别对 EPSPS-CP4 基因、Bi 基因进行 PCR 扩增。其中反应体系: DNA 模板 1.0  $\mu$ L,  $2\times Taq$  PCR Mix 12.5  $\mu$ L, 上游引物 1.0  $\mu$ L, 下游引物 1.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 25.0  $\mu$ L。反应程序: 95℃预变性 3 min; 95℃变性 30 s, 59℃退火 30 s, 72℃延伸 40 s, 30 个循环; 72℃延伸 10 min。反应产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 PCR 检测所用的引物

Table 1 Information of the primers used in PCR analysis

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'→3')	片断长度 Fragment length/bp
<i>Epsp-F</i>	AGCTTGACTATGCGATTGCT	921
<i>Epsp-R</i>	CAAGACGTTGAGGATGGTGA	
<i>Bi-F</i>	CTACGTGATCTGCATGACCT	823
<i>Bi-R</i>	CTCTGACATGACGTGGTTCT	

1.2.6 转基因植株田间筛选 将经再生培养初步筛选的再生植株移栽到温室缓苗后, 对洋葱植株的叶面均匀喷施 0.5‰的草甘膦溶液(叶面均挂满小水珠), 观察处理后植株的生长状况及其鳞茎部位与根的颜色变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 草甘膦浓度选择压确定

由图 2 可以看出, 与不加草甘膦的对照相比, 添加

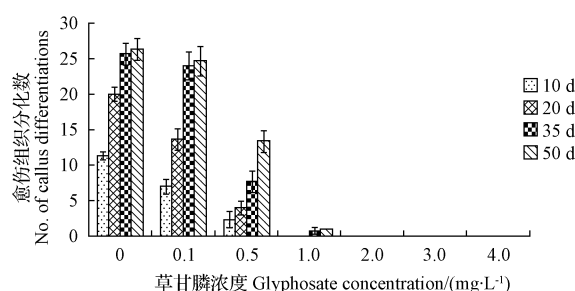


图 2 不同浓度草甘膦处理 10、20、35、50 d 获得分化愈伤组织数

Fig. 2 The number of callus differentiation treated with different concentration of glyphosate for 10, 20, 35 and 50 days

草甘膦的处理组分化的愈伤组织数大为减少,说明草甘膦对洋葱愈伤组织的生长和分化有抑制作用,而且随着草甘膦浓度的增加,抑制效果增强。在低浓度的草甘膦培养基中,愈伤组织分化速度和绿芽长势与对照相比更缓慢,且少数叶片有黄化现象。当草甘膦浓度达到 1 mg/L 时,愈伤基本停止分化,20 d 后愈伤组织开始出现褐化,无法获得再生苗。在超过 1.0 mg/L 草甘膦的培养基中这一现象更为突出。确定草甘膦 0.5 mg/L 为初步筛选浓度,而 1.0 mg/L 为进一步筛选浓度。

## 2.2 田间草甘膦抗性筛选

对洋葱幼苗喷施不同浓度草甘膦溶液,10 d 后观察发现,喷施 0.01‰ 草甘膦溶液和对照组的洋葱幼苗长势正常,0.1‰ 草甘膦溶液处理的洋葱幼苗少数枯萎死亡,

当浓度达到 0.5‰ 时,洋葱幼苗基本死亡(图 3)。因此确定 0.5‰ 的草甘膦溶液为洋葱幼苗的致死浓度。

## 2.3 转基因洋葱再生植株获得

以含质粒 pBAC9075 的农杆菌侵染洋葱胚性愈伤组织,经过共培养、恢复培养及草甘膦梯度筛选后分化出再生芽,经生根培养获得洋葱转化植株。将得到的转化植株练苗并转移到温室营养土中继续培养。共计 826 个转化愈伤组织,经再生培养及初步筛选后获得了 189 棵再生植株。

## 2.4 转化植株的 PCR 检测

由图 4 电泳结果可知,其中 5 个样品目的条带与阳性对照相同,初步判断载体上的目的基因已经整合到洋葱基因组中。

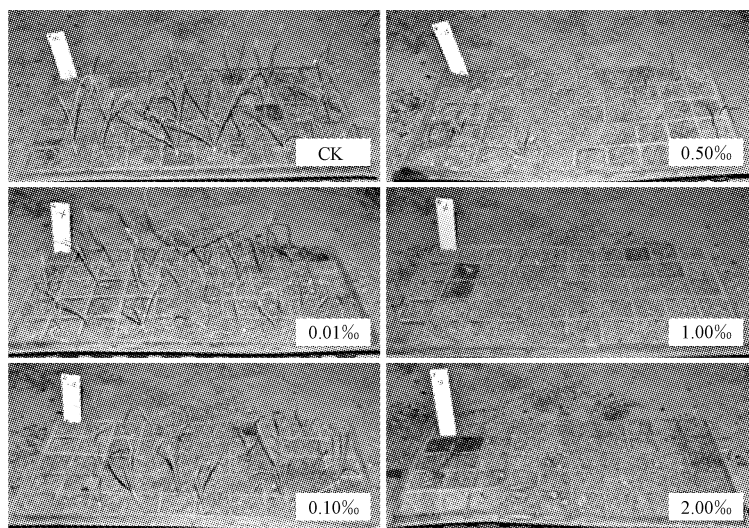
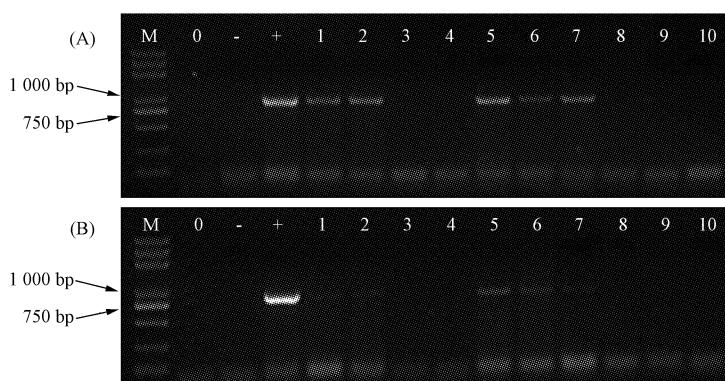


图 3 田间草甘膦抗性筛选

Fig. 3 Field screening of glyphosate resistance



注:M; Trans2K Plus DNA marker,条带从上到下分别为 5 000、3 000、2 000、1 000、750、500、250、100 bp;0:水;-:非转基因植株;+:阳性质粒;1~10:转基因植株。

Note:M; Trans2K Plus DNA marker, the bands from top to bottom are 5 000, 3 000, 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp respectively; 0: water; -: Non transgenic plants; +: The positive plasmid; 1-10: transgenic plants.

图 4  $T_0$  代植株 *EPSPS-CP4* 基因(A)和 *Bi* 基因(B)的 PCR 检测

Fig. 4 PCR testing of *EPSPS-CP4* (A) and *Bi* (B) in  $T_0$  plants

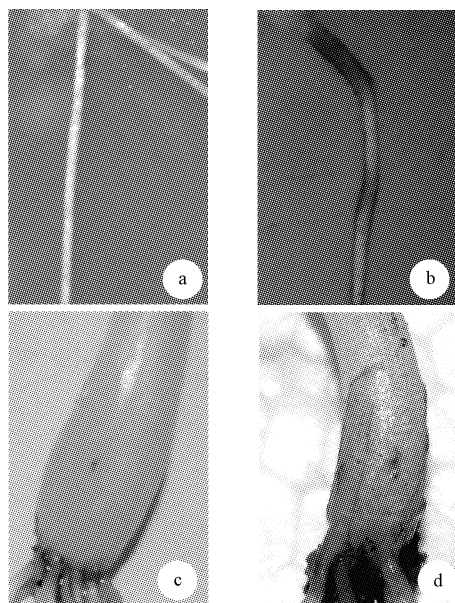


## 2.5 转基因植株田间筛选

经初步筛选的再生植株温室缓苗后,喷施草甘膦溶液,生长 15 d 后大部分再生植株枯萎、死亡,仅有 7 棵植株存活(图 5),其中 2 棵植株根部或鳞茎部位可以观察到明显的紫色,而未转化的对照植株均未出现紫色(图 6),且在鳞茎部位表现出紫色的植株,在苗期便可观



图 5  $T_0$  代植株叶面喷施 0.5% 草甘膦溶液 15 d 后生长情况  
Fig. 5 Growth condition of  $T_0$ -generation plants in 15 days after 0.5% glyphosate treatment



注:a. 非转基因植株根部对照;b. 转基因植株幼苗根部表达花青素;  
c. 非转基因植株鳞茎对照;d. 转基因植株鳞茎部位表达花青素。

Note: a. Control of non-transgenic plant root; b. Transgenic plants root expressing anthocyanin; c. Control of non-transgenic plant bulb; d. Transgenic plants bulb expressing anthocyanin.

图 6 花青素在洋葱组织中表达

Fig. 6 Anthocyanin expression in onion tissue

察到花青素的积累;2 棵紫色表型植株与 PCR 检测结果一致。

## 3 讨论

筛选体系的选择对转基因植株获得有很大影响。非转化细胞在附加筛选剂培养基上不能进行正常的新陈代谢而死亡,转化细胞含抗性基因,对筛选剂有一定承受能力,可以正常生长,从而获得转基因植株。筛选剂使用浓度的确定至关重要,浓度过高会抑制阳性植株的生长,甚至死亡,过低又会导致大量假阳性植株的出现。而在遗传转化过程中,农杆菌侵染对愈伤组织有一定伤害,且非转化细胞的快速死亡积累大量有害物质,会抑制转化细胞,不利于转化细胞的生长<sup>[5]</sup>,因此筛选前有必要经过恢复阶段。该研究采用了 *EPSPS-CP4* 基因作为筛选标记,得到了较为理想的效果;试验过程中首先利用低浓度草甘膦进行初步筛选,使转化细胞彻底复苏,然后再利用高浓度草甘膦筛选,并经 PCR 检测和田间草甘膦筛选而得到目标转基因植株。

在众多的植物遗传转化报告基因中,花青素合成转录因子基因是最方便的一种<sup>[6]</sup>。花青素合成转录因子通过调控花青素的时空表达,使植物组织或器官呈现肉眼可见的颜色,便于早期筛选转化材料,且不需破坏检测材料,避免其它不必要选择标记的存在;这类标记基因在植物遗传转化上的应用,可有效地减少前期筛选的工作量及后期分子检测成本,针对性强,试验结果可信,准确度大为提高。同时在基因功能研究方面,可以根据该基因在植株上的表达效果,直观地反映出基因共抑制、转基因沉默等转基因植株可能出现的重大问题。

## 参考文献

- [1] Eady C C. Towards the transformation of onions (*Allium cepa*) [J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 1995, 23 (3): 239-250.
- [2] Joubert P, Sangwan R S, Aouad M E A, et al. Influence of phenolic compounds on *Agrobacterium vir* gene induction and onion gene transfer [J]. Phytochemistry (Oxford), 1995, 40 (6): 1623-1628.
- [3] 徐启江, 崔成日. 用基因枪法介导 *OSISAP1* 基因遗传转化洋葱 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2007 (3): 188-196.
- [4] 刘海燕, 冯冬茹, 刘兵, 等. 农杆菌介导的 *MpASR* 蛋白在洋葱表皮细胞的定位研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2009 (3): 218-222.
- [5] 李宝健, 曾庆平. 植物生物技术原理与方法 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1990.
- [6] 包满珠. 植物花青素基因的克隆及应用 [J]. 园艺学报, 1997, 24 (3): 279-284.

# 枇杷内生木霉 P3.9 菌株抗菌谱研究

鲁海菊<sup>1</sup>, 张建春<sup>2</sup>, 杞敬香<sup>1</sup>, 徐聪梅<sup>1</sup>, 郑肖兰<sup>3</sup>

(1. 红河学院 生命科学与技术学院, 云南 蒙自 661199; 2. 红河学院 外国语学院, 云南 蒙自 661199;

3. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海南 儋州 571737)

**摘要:**以枇杷内生木霉 P3.9 菌株及枇杷根腐病病菌 *Pestalotiopsis* sp.、康乃馨根腐病菌 *Fusarium* sp.、仙客来根腐病菌 *Fusarium* sp.、万寿菊叶斑病病菌 *Alternaria* sp.、辣椒黑斑病病菌 *Alternaria* sp.、辣椒黄萎病病菌 *Verticillium dahliae* 6 种供试病原真菌为试材, 采用对峙培养法, 将 P3.9 菌株与各病原菌进行对峙培养, 测定其对各病原真菌的抑制作用。结果表明: P3.9 菌株对 6 种供试病原真菌均有不同程度的抑制作用, 抑制率分别为 80.6%、67.6%、73.1%、77.5%、82.0% 和 82.7%, 抑制率均在 60% 以上, 说明 P3.9 菌株抗菌谱广泛, 表现出良好的开发应用前景, 为有效可持续防控上述各病害提供参考依据及生防菌种资源。

**关键词:**枇杷内生木霉; 植物病原真菌; 抑菌活性; 抗菌谱

**中图分类号:**S 667.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)24-0103-05

植物内生真菌(endophytic fungi)是一类在健康植物组织内定殖, 但不引起病害症状的真菌<sup>[1]</sup>。其专一性很强, 可通过人工接种被导入不同的植物并可通过宿主的

种子进行遗传<sup>[2]</sup>。而且, 内生真菌在植物组织内有足够的碳源、氮源, 并且受到植物组织的良好保护, 更易于发挥生防作用<sup>[3]</sup>。木霉(*Trichoderma*)是一种重要的生防因子, 最近研究发现植物体内存在内生木霉真菌, 在可可<sup>[4]</sup>、茶树<sup>[5]</sup>、芦竹<sup>[6]</sup>、南方红豆杉<sup>[7]</sup>等植物中成功分离到内生木霉真菌。其中, 芦竹和南方红豆杉中分离的内生木霉分别对烟草赤星病和水稻纹枯病有很好的防治效果。研究还发现从其它地方分离的木霉菌株能在可可茎上定殖, 与其形成共生关系, 最终成为宿主的内生真菌<sup>[8]</sup>。表明不管是土著的内生木霉还是从外界引入的木霉, 都能与宿主形成共生关系, 最终成为宿主的内生真菌, 对宿主有促生、抗病等作用<sup>[9]</sup>。课题组从枇杷中分离到 1 株枇杷内生木霉真菌 P3.9 菌株, 经显微形态观察, 初步鉴定为深绿木霉(*T. atroviride*), 研究发现

**第一作者简介:**鲁海菊(1978-), 女, 云南大理人, 博士, 副教授, 现主要从事亚热带植物真菌分类和真菌病害等研究工作。E-mail: luhaiju2011@126.com.

**责任作者:**郑肖兰(1976-), 女, 广东清远人, 硕士, 副研究员, 现主要从事亚热带植物真菌病害等研究工作。E-mail: orchidzh@163.com.

**基金项目:**科技部基础工作专项资助项目(2006FY120100); 红河学院博硕资助项目(XJ1B0912); 云南省高校“农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室”建设经费资助项目; “红河学院硕士点植物保护一级学科建设项目”经费资助项目。

**收稿日期:**2014-09-03

## Study on Transformation of Multi-visual Marker Gene in Onion

ZHANG Hong-wei, TAN Wu-ping, LIANG Yi

(Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

**Abstract:** Taking onion seeds as materials, using transgenic method, the vector pBAC9075 was transformed into the callus, and the effects to transgenic plants of anthocyanin synthesis transcription factor Bi and C1 were studied either. The result showed that, 189 regenerated plants were obtained after the regeneration and glyphosate screening. PCR analysis demonstrated that 5 regenerated plants were successfully transformed. Only 7 of the 189 plants were survived after field glyphosate screening and 2 of them showed anthocyanin accumulation. The above results was to provided a basis for the visualization genetic marker anthocyanins on early screening of transgenic plants in onion.

**Keywords:** onion; genetic transformation; anthocyanin