

花生幼苗不同切断及其愈伤组织的农杆菌介导转化

梁雪莲¹, 郑奕雄¹, 庄东红², 余德勉¹, 贺焕贞¹

(1. 仲恺农业技术学院, 广州 510225; 2. 汕头大学生命科学院, 广东 515063)

摘要: 试验进行了不同花生外植体(成熟胚的幼叶、胚轴、子叶等)的直接农杆菌转化与花生愈伤组织的农杆菌转化, 比较其感染后的诱芽与上分化生长情况, 并对影响农杆菌介导转化花生的因素进行了探讨。结果表明农杆菌的生长状况、浓度及侵染时间和筛选剂的浓度是影响农杆菌介导花生转化的主要因素; 褐化是影响其转化的关键问题。

关键词: 花生外植体; 农杆菌; 基因转化

中图分类号: S 565.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)04-0197-03

1 材料和方法

1.1 材料

花生型号: 汕油型 S162; 农杆菌种类: GV3850(根癌农杆菌), 内含质粒 PCB302-3, 该质粒 T-DNA 区含有 Nos 启动子控制下的抗虫基因豇豆蛋白酶抑制剂基因(CpTI)和耐除草剂基因(bar)。

1.2 方法

1.2.1 直接转化程序 不同外植体制备—农杆菌培养—农杆菌介导转化外植—诱芽—PPT 筛选—生根

1.2.2 愈伤转化程序 花生愈伤组织诱导—农杆菌培养—农杆菌介导转化愈伤—诱芽—PPT 筛选—生根

1.3 培养基

LB 液体培养基(蛋白胨 10g + 酵母膏 5g + NaCl 10g, pH=7.0); 种子萌发培养基(1/2MS + 1mg/mL 2,4-D); 芽诱导培养基^[1,2](MS + 4mg/mL NAA + 3mg/mL BA + 1mg/mL AgNO₃ + 6mg/mL 谷氨酰胺); 愈伤诱导培养基(MS + 1mg/mL 2,4-D); 杀菌培养基(MS + 4mg/mL NAA + 3mg/mL BA + 1mg/mL AgNO₃ + 6mg/mL 谷氨酰胺 + 500mg/L Cb), Cb 在培养基灭菌后在无菌条件下加入。杀菌筛选培养基(MS + 4mg/mL NAA + 3mg/mL BA + 1mg/mL AgNO₃ + 6mg/mL 谷氨酰胺 + 400mg/L Cb + 100uL/L PPT), Cb 和 PPT 在培养基灭菌后在无菌条件下加入。以上各种培养基均附加蔗糖 3%; 固体培养基附加琼脂 0.7%; 除有特殊要求外, pH 均为 5.8; 常规灭菌; 分装, 每瓶大约盛装 40~50mL 培养基, 封口。

第一作者简介: 梁雪莲(1969-), 女, 博士, 副教授, 从事作物基因转基因研究。

基金项目: 广东省农业厅科技攻关资助项目(粤财农[2005]315 号)。

收稿日期: 2006-12-10

2 结果与分析

2.1 花生外植体的直接农杆菌介导遗传转化

2.1.1 花生萌动种子的预培养 花生种子灭菌在种子萌发培养基中培养 8d 后, 根长 1~1.5cm, 子叶还没有撑破种皮, 根上长出白色须根。培养 10d 后, 20% 的花生子叶已撑破种皮, 部分已经长出叶片、芽(图 1)。



图 1 花生种子萌发 10d 情况

2.1.2 花生不同外植体的感染及接种 将上步培养的花生幼苗剪切分为叶、茎、叶柄、子叶 4 部分, 浸泡于对数生长期的农杆菌液中 5min, 后接种于芽诱导培养基。

2.1.3 转化后的外植体在 MS 诱芽培养基中的诱芽效果比较 4d 后, 不同外植体的诱芽情况: 叶片, 少量愈伤组织, 长有瘤状突起(图 2a), 但没有诱导出芽; 子叶中段, 长出愈伤组织, 长有绿色瘤状突起(图 2b); 只有一片子叶长出芽(图 2c); 茎, 30% 的伤口长出芽(图 2d)。可见茎段、叶柄与子叶的伤口处很少或几乎没有长芽, 而含有腋芽的幼茎截断却长出了很多芽, 并且长势很旺, 2~3d 就长出了新叶子。

2.1.4 抑制农杆菌过渡生长及继代培养 将花生外植体先继代到杀菌培养基, 再继代到杀菌筛选培养基中生长, 期间不同外植体的生长情况如下: 叶片有少量愈伤组织生成, 子叶有两片长出愈伤组织, 有 7~8 个茎段长出愈伤组织, 但部分培养基产生臭味, 与单世华等的结

果相同,褐化现象严重^[3,4],部分有染菌现象,出现乳白色液体(图3)。外植体长势不均匀,子叶外植体有愈伤组织,并有轻微褐化现象(图4)。根与茎的外植体几乎全部褐化,农杆菌过度增长。少量叶片与子叶的外植体还可以进行第三次继代培养(图5)。最后70%的花生幼苗褐化死亡(图6)。没有及早预防褐化是失败的主要原因^[5]。



a 叶片上长有瘤状突起, b 子叶上长有瘤状突起,
c 茎上长芽, d 叶段芽是最好的长芽材料

图2 不同外植体的诱芽效果



图3 第一次继代培养 图4 子叶外植体愈伤组织的褐化现象



图5 第二次继代培养 图6 再生苗褐化死亡

2.2 花生外植体愈伤组织的农杆菌介导遗传转化

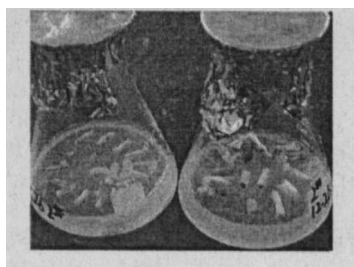


图7 花生外植体愈伤组织的诱导

2.2.1 花生外植体愈伤组织诱导 10瓶芽诱导培养基中的花生外植体在两星期的避光培养期间没发生变化,既没被污染也没有愈伤组织生成(图7)。将它们放到培养室,观察其在光照条件下的诱导情况,15d后这10瓶不同花生外植体都能长出愈伤组织。

2.2.2 花生外植体的愈伤组织的继代培养 第一次继代时根、茎、叶的外植体的愈伤组织长势良好,呈现黄绿色疏松状,有少量愈伤组织为淡黄色,一瓶叶子外植体愈伤组织有分化现象(图8)。第二次继代时由于培养室光照系统坏了,导致愈伤组织褪绿,有少量变成淡黄色(图9)。

2.2.3 农杆菌感染花生愈伤组织 愈伤组织同前面方法经农杆菌感染,再经过杀菌与筛选培养后,出现严重的褐化现象,分析其原因可能是:加了PPT(除草剂)筛选后,杀死无抵抗力的外植体;PPT浓度有可能过高(PPT使用浓度在0.3mg/L以上时,叶片出现不同程度的黄色枯斑,高浓度下会枯萎死亡);激素的浓度过高^[6];农杆菌过量生长最终不能继续分化生长下去(图10)。

3 讨论

3.1 不同抗生素及浓度在花生外植体再生中抑制农杆菌的效应

羧苄青霉素(Cb)和头孢霉素均能抑制根癌农杆菌的生长和繁殖,因此在农杆菌介导的转基因过程中,常采用这两种抗生素来消除转化后过度生殖的农杆菌,但它们对不同植物组织的效应不同。如Holford等(1992)研究发现,Cb的分解产物为生长素及苯乙酸,有类似2,4-D的结构和功能,可刺激愈伤组织的增殖;而Cef对组织具有很强的毒性。因此试验只选用Cb抗生素来抑制根癌农杆菌的生长和繁殖。

3.2 农杆菌浓度与浸泡时间对花生外植体转化的影响

若菌浓度过低,外植体切口边缘只有少量的农杆菌生长,则外植体的转化机率很少,而其过度繁殖,可引起对外植体的毒害。浸泡时间越长,外植体的伤害程度越严重,如浸染15min,仅2~3d就无法控制菌的过度生长,而浸泡5min的有23.3%的材料可分化出绿色愈伤组织突起,并且可控制农杆菌的过度繁殖。试验每100mL培养液中加入160μL对数生长期的农杆菌菌液,浸染5min,发现只有部分子叶伤口处有绿色愈伤组织突起,其它的花生外植体没有绿色愈伤组织突起,而且部分花生外植体褐化严重而死。可知,同一浓度农杆菌对花生不同部位的外植体侵染能力不同,以及农杆菌在不同外植体上的增殖能力也不同,而且花生不同的外植体对农杆菌的侵染时间有不同的要求^[6]。该试验侵染时间为5min只对子叶适宜,而对其它外植体就有不同程度的毒害作用。建议其他外植体的侵染时间低于5min。Lacorte和Mansur等^[7]1993研究表明,农杆菌对花生不同类型外植体侵染性有所不同,他所用的菌株可感染第三期叶片(长度10~13mm,深绿色),而对淡绿色和白色叶片不能感染;就未萌发种子而言,带胚子叶可被感染,去胚子叶则否。综上所述,选择强侵染力的农杆菌菌株处理合适的外植体对于农杆菌介导的遗传转化的成功至关重要。

3.3 共培养时间对农杆菌介导花生外植体转化的影响

外植体在侵染后与农杆菌共培养是整个转化过程中非常重要的环节。Ming Cheng等^[8]1996和Eapend

等^[9]1994年认为共培养2~3d适于农杆菌GV3850介导花生外植体的转化,既可以让农杆菌有足够的时间把T-DNA转移到植物细胞中,又不至于因菌的过度生长而使植物细胞受到毒害死亡。试验共培养了4d,可观察到部分子叶伤口处有绿色瘤状突起,而其它外植体就有褐化现象出现,并且农杆菌有过度增殖的现象出现。可知,试验应该在共培养第2~3d就进行杀菌筛选培养,可抑制农杆菌的过度增殖。

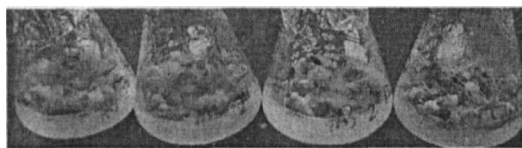


图8 愈伤组织的第一次继代培养

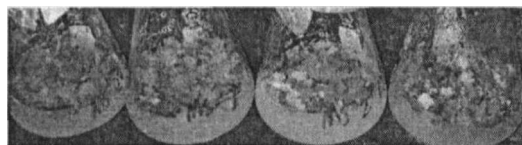


图9 愈伤组织的第二次继代培养

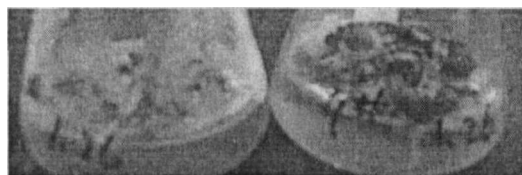


图10 花生外植体发霉长菌

3.4 筛选剂PPT浓度对花生外植体转化的影响

外植体的选择压对转化结果影响极大,过高或过低均不利于抗性材料的生长和分化。该试验所使用的农杆菌GV3850内含质粒pCB302-3,该质粒携带了耐除草剂基因bar,对除草剂PPT有特异抗性,因此该试验筛选剂为PPT,浓度为100uL/L。从最后结果看PPT浓度过高可能是本实验褐化的主要原因^[4],应作低于100uL/L的不同浓度梯度筛选。另外改善培养基成分也是消除褐化的关键^[5]。

参考文献:

- [1] 梁丽琨,林荣双,由翠荣.不同激素对花生离体分化的影响[J].植物研究,2004,24(2):187-191.
- [2] 单世华.农杆菌介导几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因遗传转化花生的研究[D].博士学位论文,2003.
- [3] 苗华荣.基因工程与花生品种改良[J].世界农业,1995,12:25-26.
- [4] 王传堂,李广存,毕玉平.花生遗传工程[J].Peanut Science and Technology,1999,1:1-6.
- [5] 梁丽琨,林荣双,肖显华,等.添加物影响花生外植体再生及基因转化[J].生物技术,2002,12(3):6-8.
- [6] 梁雪蕊,郑奕雄.花生转基因研究进展[J].种子(Seed),2006,25(1):46-50.
- [7] Lacorte C, Mansur E, Timmerman B, et al. Gene transfer into peanut by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Cell Reports, 1991, 10: 354-357.
- [8] Cheng M, Jarret R L, Li Z, Xing A, Demski J W. Production of fertile transgenic peanut plants using *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Cell Reports, 1996, 15: 653-657.
- [9] Eapen S, George L. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer in peanut[J]. Plant cell reports, 1994, 13: 582-586.

Peanut Genetic Transformation by *Agrobacterium Tumefaciens*

LIANG Xue-lian¹, ZHEN Yi-xiong¹, ZHUANG Dong-hong², YU De-mian¹, HE Huan-zhen¹

(1. Life Sciences Department Zhongkai University of Agricultural and Technology, Guangzhou 510225; 2. College of Life Sciences, Shantou University, Guangdong 515063)

Abstract: Studied *Agrobacterium*-mediated transformation on peanut explants. First, we affected different explants with A. T, including leave, stem, cotyledon and axillary bud, which were just cut from healthy seedlings. Second, after induced callus from there different explants, we affected callus with A. T. Finally, we also discussed the factors of this approach. The results showed explants could still produce healthy callus after A. T affection; the main reason caused failure of two kind of transformation is brownlization; Peanut was more easy to brownlize than other cereal, such as maize and wheat; different explants had no difference with the same cb concentration, and the appropriate conditions were as the following: 500mg/L cb, 100uL/L PPT, no more than 5minutes affection with A. T, but different explants had light different responsibilities. In sum, the key points affecting result of peanut *Agrobacterium*-mediated transformation was A. T, affected concentration and PPT selected concentration.

Key words: Peanut; Agrobacterium; Gene transformation