

根癌农杆菌介导马齿苋愈伤组织遗传转化研究

王红艳¹, 王鸿磊¹, 黄群策²

(1. 中国农业大学 烟台研究院, 山东 烟台 264670; 2. 郑州大学 离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450052)

摘 要: 利用马齿苋的叶片诱导出愈伤组织, 再以愈伤组织为受体建立了根癌农杆菌介导的遗传转化体系。结果表明: 利用该转化体系得到抗性愈伤组织后, 对其进行 GUS 组织化学染色和 PCR 扩增鉴定, 证实为转化子, 表明根癌农杆菌介导外源基因转化马齿苋的愈伤组织是完全可行的, 为今后通过基因工程手段进行马齿苋的改良奠定了基础。

关键词: 马齿苋; 愈伤组织; 根癌农杆菌; 遗传转化

中图分类号: Q 949.745.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)01-0124-03

马齿苋(*Portulaca oleracea* L.), 为马齿苋科(*Portulacaceae*) 马齿苋属(*Portulaca*) 1 a 生肉质草本植物, 别名马齿菜、瓜子菜、马蛇子菜、五行草和长寿草等, 遍布全国各地, 是古往今来最常见的中草药和野生蔬菜^[1]。近年来, 马齿苋以其丰富的营养、独特的药理作用和菜药兼用的特性而备受消费者的欢迎和研究学者的关注^[2-8], 被国家卫生部认定为药食同源的保健功能食品之一, 具有广阔的开发前景。目前, 国内外有关马齿苋的研究主要集中在栽培技术、化学成分、临床应用、保健食品的加工和组织培养等方面, 但在遗传育种方面近乎空白。因此, 探寻高效快速的育种途径以培育出高产优质的品种, 已成为势在必行的工作。该研究在前期对马齿苋组织培养研究的基础上^[9], 以愈伤组织为受体, 采用根癌农杆菌介导法研究了该植物的遗传转化条件, 为其遗传育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料: 中国农业大学烟台研究院温室种植的马齿苋。

菌株和质粒: 根癌农杆菌为 *LBA4404*, 该菌株含有质粒 *pBI 121*, 该载体携带 GUS 基因和 *npt-II* 基因。质粒 *pBI 121* 的物理图谱如图 1 所示。

1.2 试验方法

1.2.1 马齿苋愈伤组织的诱导及预处理 剪取马齿苋

植株顶端的幼叶, 先用 75% 酒精消毒 1 min, 用无菌水冲洗 1 次, 再用 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min, 用无菌水冲洗 5~6 次, 最后用无菌滤纸吸干水分并在无菌培养皿上将叶片切成 0.5 cm² 左右的方块, 接种到愈伤组织诱导培养基(MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L, 以下同)上, 于 26℃ 条件下光照培养 14 h/d, 光照强度为 2 000~3 000 lx。待长出愈伤组织后, 再将其切下并转移到愈伤组织诱导培养基上继代培养, 2 周继代 1 次。当继代 3~4 次后, 挑选颜色鲜艳、生长旺盛的颗粒状愈伤组织切成小块并在无菌培养皿上适当干燥后即可用于农杆菌浸染。

1.2.2 农杆菌 *LBA4404* (*pBI 121*) 浸染液的制备^[10]

农杆菌 *LBA4404* (*pBI 121*) 在含有 50 mg/L 卡那霉素(Km) 和 100 mg/L 链霉素(Str) 的 YEB 选择培养基上划线于 28℃ 条件下暗培养。长出菌落后挑取单菌落接种于含有 50 mg/L Km 和 100 mg/L Str 的 50 mL YEB 液体培养基中, 于 28℃ 条件下 180 r/min 过夜培养。菌液经 25℃ 条件下 5 000 r/min 离心 10 min 后重悬于 MS 液体培养基中, 调其 OD₆₀₀ 值为 0.5~0.6, 并加入 600 μmol/L 的乙酰丁酮(AS) 即可用于浸染。

1.2.3 农杆菌 *LBA4404* (*pBI 121*) 浸染及共培养^[10]

将准备好的愈伤组织小块浸入农杆菌 *LBA4404* (*pBI 121*) 浸染液中 20 min, 用无菌滤纸吸干多余的液体, 接种到附加 600 μmol/L 的乙酰丁酮(AS) 的愈伤组织诱导培养基上, 于 28℃ 条件下暗培养 3 d。

1.2.4 抗性愈伤组织的获得 将共培养后的愈伤组织用无菌水冲洗多次并吸干水分, 转接到附加 80 mg/L 卡那霉素(Km) 和 300 mg/L 羧苄青霉素(Carb) 的愈伤组织诱导培养基上进行选择培养。培养温度为 26℃, 光照时间为 14 h/d, 光照强度为 2 000~3 000 lx。每 2 周换 1 次新鲜培养基, 共筛选 3 次。

1.2.5 抗性愈伤组织的检测 GUS 活性检测: 从获得

第一作者简介: 王红艳(1980-), 女, 河南安阳人, 硕士, 讲师, 现从事植物生物技术方向的教学科研工作。E-mail: why1980221@163.com。

基金项目: 农业部公益性行业科研专项资金资助项目(200803034); 河南省科技前沿基础研究资助项目(82300433202)。

收稿日期: 2010-10-14

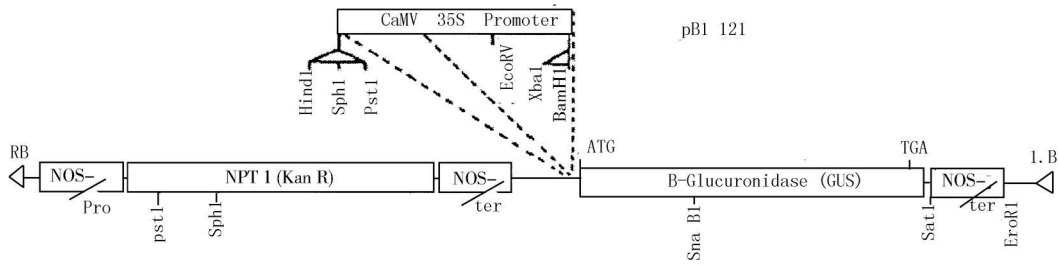


图 1 质粒 *pBI 121* 的物理图谱

的抗性愈伤组织中随机抽取一部分进行 GUS 活性检测^[1]。将抗性愈伤组织小块放入盛有 GUS 染色液的离心管中,打开管盖在真空干燥箱中抽真空 5 min(抽去组织中的气泡),缓慢充气后,取出离心管,封闭管口,37℃保温 12 h,观察蓝色反应。PCR 检测:从获得的抗性愈伤组织中随机抽取一部分提取植物总 DNA 进行 PCR 鉴定。总 DNA 提取用植物基因组提取试剂盒(购自上海生物工程公司)。以抗性愈伤组织 DNA 为模板,质粒 *pBI 121* 为阳性对照,未转化愈伤组织 DNA 为阴性对照,用 *gus* 基因引物(引物 1: 5'-GGGA TCCA TCGC AGCG TAAT G-3' 和引物 2: 5'-GCCG ACAG CAGC AGTT TCAT C-3', 由上海生物工程公司合成)进行 PCR 扩增,扩增条件为:94℃预变性 2 min,然后 94℃、45 s,60℃、45 s,72℃、1 min,33 个循环,最后 72℃延伸 10 min。预期扩增片段大小为 563 bp。

2 结果与分析

2.1 马齿苋愈伤组织的诱导

马齿苋叶片接种后 4 d 无明显变化,第 7 天叶片开始卷曲,切口边缘处出现少量愈伤组织,第 14 天叶片极度卷曲和膨大,并出现较多愈伤组织,到第 21 天,愈伤组织快速生长,几乎蔓延了整个叶片。叶片诱导的愈伤呈淡绿色,质地比较致密,生长良好(图 2)。为了获得更多的愈伤组织,可将上述愈伤组织切成小块后再用相同的培养基进行继代增殖培养。继代培养第 1 周,愈伤组织生长较缓慢;第 2 周,愈伤组织生长迅速,颜色鲜绿,质地致密;到第 3 周,则生长减慢并开始褐化。因此,选用继代 1~2 周的愈伤组织作为转化受体比较好。

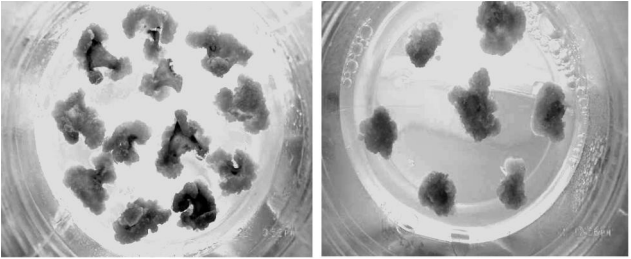


图 2 愈伤组织的诱导和继代培养

2.2 抗性愈伤组织的筛选与获得

将经过共培养的 350 块愈伤组织先用无菌水冲洗

多次以除去表面的农杆菌,然后接种到附加 80 mg/L Km 和 300 mg/L Carb 愈伤组织诱导培养基上进行筛选培养。结果如图 3 所示,未经转化的愈伤组织几乎不能在筛选培养基上生长,在第 1 次筛选后几乎全部褐化死亡;经过转化的愈伤组织在第 1 次筛选后大部分褐化死亡;将第 1 次筛选中存活的愈伤组织切割下来并接种到新鲜的筛选培养基上进行第 2 次筛选,存活的愈伤组织大大增加;将第 2 次筛选中存活的愈伤组织切割下来并接种到新鲜的筛选培养基上进行第 3 次筛选,抗性愈伤组织长势良好,但与正常愈伤组织相比,则生长缓慢、质地坚硬、颜色发白。经过 3 次连续筛选培养后,共获得 102 块抗性愈伤组织。

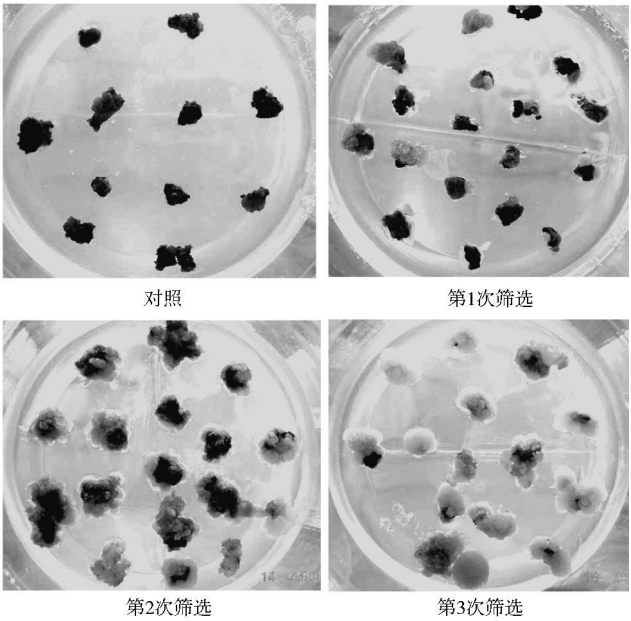


图 3 抗性愈伤组织的筛选

2.3 抗性愈伤组织的检测

2.3.1 GUS 活性检测 从获得的 102 块抗性愈伤组织中随机抽取 10 块进行 GUS 组织化学染色,结果如图 3 所示,所测抗性愈伤组织均有不同深浅和不同大小的蓝色斑点,表明经过 3 次筛选所获得抗性愈伤组织为嵌合体。

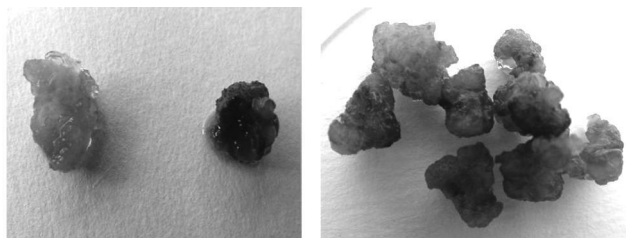


图4 抗性愈伤组织的GUS组织化学染色

2.3.2 PCR检测 从获得的102块抗性愈伤组织中再随机抽取12块进行GUS基因的PCR检测,结果如图4所示,所测抗性愈伤组织中均扩增出目标条带(563 bp的GUS基因),而未转化愈伤组织没有扩增出目标条带,表明GUS基因在部分细胞中已被整合和表达。

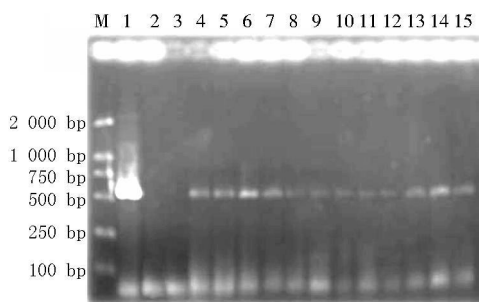


图5 抗性愈伤组织的PCR检测

注 M: Marker DL2000; 1: 阳性对照(质粒 *pBI 121*); 2: 阴性对照(未转化愈伤组织); 3: 空白对照(用 dH_2O 代替模板DNA); 4~15: 随机抽取的12个样品。

3 结论与讨论

该研究以马齿苋愈伤组织为受体进行了根癌农杆菌介导的遗传转化研究。试验结果表明,利用 OD_{600} 值为0.5~0.6的根癌农杆菌 *LBA4404*(*pBI 121*)菌液浸染愈伤组织小块20 min后,于暗处共培养3 d即可实现

GUS基因的有效转化。将经过与农杆菌共培养的愈伤组织在筛选培养基上连续进行3次筛选后即可得到抗性愈伤组织,对所得到的抗性愈伤组织随机抽取进行GUS组织化学染色和PCR检测,证实均为转化子,成功实现了马齿苋愈伤组织的遗传转化。试验尝试将部分抗性愈伤组织转接到分化培养基($MS+6BA\ 34.0\ mg/L+NAA\ 0.2\ mg/L$)上进行分化培养,但最终没有实现不定芽的分化。原因可能是受到农杆菌的浸染、筛选剂、抗生素等多方面的影响,其再生条件与原来不同。因此,下一步要进行抗性愈伤组织的再生条件研究。尽管未能获得转基因植株,但该试验证明利用农杆菌介导外源基因转化马齿苋是完全可行的,这为今后通过基因工程手段进行马齿苋的改良奠定了基础。

参考文献

- [1] 王红艳,王松丽. 野生蔬菜马齿苋的研究进展[J]. 中国农学通报, 2004, 20(2): 31-36.
- [2] 李利峰. 马齿苋—野生蔬菜中的保健珍品[J]. 辽宁农业科学, 1997, (4): 56.
- [3] 王书荣.“菜中之鱼—马齿苋”[J]. 中国蔬菜, 1998(1): 51-52.
- [4] 杨春玲,孙克威,王永华等. 马齿苋营养价值及其设施栽培技术[J]. 辽宁农业职业技术学院学报, 2007(1): 21-22.
- [5] 闰明,乔秀红. 马齿苋的经济价值及开发利用[J]. 农牧产品开发, 2000(5): 25-27.
- [6] 翟玮玮,顾立众. 马齿苋功能因子及保健食品的开发[J]. 食品科技, 2003(2): 20-24.
- [7] 谭丽霞,周求良. 马齿苋的营养成分分析及其开发利用[J]. 中国野生植物资源, 2008(2): 49-50.
- [8] 丁怀伟,姚佳琪,宋少江. 马齿苋的化学成分和药理活性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2008(10): 831-837.
- [9] 王红艳,黄群策,秦广雍等. 马齿苋的组织培养和植株再生[J]. 河南农业科学, 2006(5): 84-87.
- [10] Wang G L, Fang H J. Principles and techniques of plant genetic engineering[M]. Beijing: Science Publishing House, 2002.
- [11] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W, et al. Gus fusion; β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plant[J]. EMBO J, 1987(6): 3901-3907.

Genetic Transformation of *Portulaca oleracea* L. Callus Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

WANG Hong-yan¹, WANG Hong-lei¹, HUANG Qun-ce²

(1. Yantai Academic of China Agricultural University, Yantai Shandong 264670; 2. Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering of Zhengzhou University, Zhengzhou Henan 450052)

Abstract: The callus was induced from the leaves of *Portulaca oleracea* L., then the callus was used for the receptor of genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The results showed that the resistant calli was screened and confirmed to be transformants by GUS histochemical assays and PCR assays. It showed that genetic transformation of *Portulaca oleracea* L. callus mediated by *Agrobacterium tumefaciens* was entirely feasible.

Key words: *Portulaca oleracea* L.; callus; *agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation