

果蔗‘拔地拉’植株再生与农杆菌介导的遗传转化研究

李瑞美,何炎森

(福建省农科院甘蔗研究所,福建漳州363005)

摘要:以果蔗(*Saccharum officinarum* L.)‘拔地拉’的幼嫩叶鞘为材料,以MS+2,4-D 2.0 mg L⁻¹为诱导培养基,MS+2,4-D 2.0 mg L⁻¹+6-BA 1.0 mg L⁻¹为分化培养基,MS+IAA 2.0 mg L⁻¹为生根培养基,建立了高效的果蔗再生体系。利用农杆菌介导法将含有 *cryIA* 基因和 *CPTI* 基因的植物表达载体导入果蔗愈伤组织,经潮霉素筛选、PCR 以及 Southern 杂交分析表明,*cryIac* 基因已整合进果蔗基因组中。

关键词:果蔗;农杆菌介导;*cryIac* 基因;遗传转化

中图分类号:Q943.1

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2009)06-0567-04

The Regeneration of Fruits Sugarcane and Transformation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

LI Rui-mei, HE Yan-sen

(Research Institute of Sugarcane, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Zhangzhou 363005, China)

Abstract: Plant regeneration through callus induction were established by using young sheath of fruit sugarcane (*Saccharum officinarum* ‘Badila’), and the transformation of calli mediated by *Agrobacterium tumefaciens* was studied. The optimum media were MS + 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D for calli induction, MS + 2,4-D 2.0 mg L⁻¹ + 6-BA 1 mg L⁻¹ for differentiation; and MS + IAA 2.0 mg L⁻¹ for root induction, respectively. Plant expression vector pMG225, including *cryIA* gene and *CPTI* gene, was transformed into calli of fruit sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens*. It confirmed that *cryIac* gene had been integrated into fruit sugarcane genome by PCR and Southern blot analysis.

Key words: Fruit sugarcane; *Agrobacterium*-mediated; *cryIac* gene; Transgenic plant

果蔗(*Saccharum officinarum* L.)‘拔地拉’(‘Badila’)俗称黑皮果蔗,为禾本科甘蔗属热带种,是果蔗的当家品种。果蔗甘甜多汁,香脆爽甜,营养价值较高,每1 kg 茎肉中含有Ca 80 mg、P 40 mg、Fe 13 mg,含铁量居水果之首,素有“补血果”的美称,每升蔗汁的游离氨基酸达261 mg,此外还含有维生素B₁、B₂、B₆和维生素C等物质,具有多种保健功能,深受人们喜爱。

果蔗螟虫是影响果蔗产量和品质的一个重要因素,农药的过量施用,不仅危害人体健康,还造成水质、土壤污染,天敌减少,病虫抗性增强,生态平衡被破坏等问题。利用转基因技术,把抗虫基因导

入果蔗中,可使果蔗避免螟虫的危害,又可不施(或少施)农药,确保果蔗品质和稳产高产,在生产上有着积极的生态意义和经济意义^[1-2]。本研究利用农杆菌介导遗传转化方法,将抗虫Bt基因*cryIA*导入果蔗,初步建立了果蔗遗传转化体系。

1 材料和方法

1.1 供试材料的培养

选用果蔗‘拔地拉’(*Saccharum officinarum* L. ‘Badila’)为转化受体材料。2007年11月中旬取幼嫩叶鞘为外植体,以洗衣粉刷洗表面污垢,清水冲洗,用干净纱布吸干表面水分,在无菌条件下以

75%乙醇表面喷雾后 1~2 min,剥开表面叶片,再以 75%乙醇表面喷雾,逐层剥离,取心叶切成 2 mm × 3 mm 大小的方块,接入诱导愈伤组织的培养基 M1:MS + 2,4-D 2.0 mg L⁻¹,蔗糖 30 mg L⁻¹,琼脂 10%,pH 5.8。温度 26℃ 左右,暗培养。

分化培养基 M2:MS + 2,4-D 2.0 mg L⁻¹ + 6-BA 1 mg L⁻¹,蔗糖 30 mg L⁻¹,琼脂 10%,pH 5.8;光照培养,光强 18~27 μmol m⁻² s⁻¹。生根培养基 M3:MS + IAA 2.0 mg L⁻¹,蔗糖 15 mg L⁻¹,琼脂 10%,pH 5.8;光照培养,光强 18~27 μmol m⁻² s⁻¹。选择培养基为以上培养基中另加潮霉素 50 mg L⁻¹。

1.2 双元载体和农杆菌菌株

本研究采用的双元载体为 pMG225,含有 CaMV35S 驱动的 *cryIA*, 抗潮霉素(Hygromycin)基因 *hpt* 和 *CPTI* 基因。载体的结构见图 1。

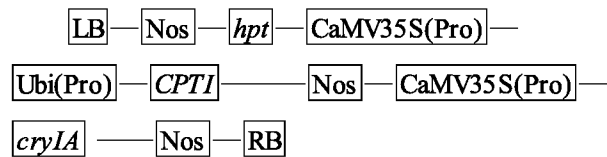


图 1 pMG225 二元载体示意图
Fig. 1 pMG225 binary vector map

采用的根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株为 LBA4404,为本实验室自存;构建质粒 pMG225,用氯化钙法将双元载体 DNA 直接导入农杆菌中^[3]。

1.3 农杆菌介导的转化

挑取农杆菌单菌落,在 YEP 液体培养基(胰化蛋白胨 5 g L⁻¹+酵母浸膏 1 g L⁻¹+牛肉浸膏 5 g L⁻¹ + MgSO₄ 0.493 g L⁻¹, pH 7.0)中,26℃ 于 200 r min⁻¹ 过夜振荡培养至 OD₆₀₀ 达到 0.5~0.6。在 4℃ 24 000 × g 下离心,菌体用 1/2MS 液体培养基清洗 1 次并重悬,稀释到 OD₆₀₀ 为 0.3~0.5 用于转化。超净工作台上取预培养 3 d 的愈伤组织放入有农杆菌液的无菌小培养皿中浸泡 7~10 min,取出,用无菌滤纸吸干表面菌液,于 28℃ 黑暗共培养。

1.4 转化植物的筛选和鉴定

潮霉素浓度确定 果蔗胚性愈伤组织在诱导培养基上培养,取未经转化的胚性愈伤组织切成直径 2 mm 的小块,分别接种于含不同浓度潮霉素的诱导培养基上。潮霉素浓度设有 10 mg L⁻¹、25 mg L⁻¹、50 mg L⁻¹、100 mg L⁻¹ 4 个梯度,不含潮霉素作为对照,共 5 种处理。每种处理接种 50 块

胚性愈伤组织,观测胚性愈伤组织生长、分化、生根的影响。

转化外植体的抗性筛选 吸干农杆菌侵染后的胚性愈伤组织,放入含有 100 μmol/L 乙酰丁香酮的诱导培养基中,28℃ 暗培养 3 d 后用无菌水洗涤 3~4 次,再用 MS 液体培养基洗 1 次,置滤纸上于超净工作台内吹晾至干爽。移至筛选培养基中筛选,经过 2~3 代 50 mg L⁻¹ 潮霉素筛选(每代 14 d),再转入选择分化培养基(即另含 50 mg L⁻¹ 潮霉素,下同)上进行芽诱导选择培养。待长出丛生芽后转入生根培养基上促苗生根。取产生不定根的植株进行分子鉴定。

PCR 分析 随机选取具潮霉素抗性的小苗,采用 CTAB 微量分离 DNA 法^[2] 提取植株总 DNA,进行 PCR 扩增。*cryIA* 基因的特异引物序列为: primer1: 5'-CACAGTTTCTGCTCAGCGAGTT-3'; primer2: 5'-TGAGCAACGATACGTTGTTGTG-3'。扩增产物为 1 931 kb 片段。扩增反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环;最后 72℃ 10 min。扩增产物于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统照相。PCR 反应中以质粒 pMG225 为阳性对照,以未转化植株为阴性对照。

Southern 点杂交分析 随机选取具潮霉素抗性的果蔗小苗,按 CTAB 微量分离 DNA 法提取总 DNA^[3-4]。用核酸蛋白检测仪测定浓度,适当稀释,使不同植株样品 DNA 浓度大致相同。各样品总 DNA 变性后,取 1 μL,点样于尼龙膜上。质粒 pMG225 的 DNA 作为阳性对照,未转化小苗叶片的总 DNA 为阴性对照。用紫外灯照射法固定各点样 DNA 用于 Southern 点杂交。以 *cryIA* 基因的 PCR 特异扩增产物为模板,采用随机引物方法制备地高辛标记探针。经预杂交、杂交和洗膜,用 NBT 和 BCIP 染色液显色。

2 结果和分析

2.1 果蔗的再生体系

果蔗幼嫩叶鞘在诱导培养基上暗培养 20 d 后外植体膨胀数倍,边缘开始出现颗粒状、淡黄色、质地均一的胚性愈伤组织,愈伤组织诱导率达 85%,生长旺盛(图版 I: A);将愈伤组织转至分化培养基上,2 周左右开始分化出芽,分化率为 83%(图版 I: B),且不定芽长势旺盛;将分化的不定芽移至生根培养基中,生根率为 81%(图版 I: C)。基本建立了

高效果蔗植株再生体系,为下一步遗传转化研究奠定了基础。

2.2 潮霉素浓度筛选

从表1可见,潮霉素对果蔗愈伤组织的生长、分化具有明显的抑制作用。对照培养基中的愈伤组织生长正常,并发育成胚性愈伤组织,颜色淡黄。随着潮霉素浓度的增加,愈伤组织的生长受到明显抑制,甚至出现褐化死亡现象。当浓度为 50 mg L^{-1} 时,愈伤组织的成活率仅为6%,呈水渍糊状死亡或棕褐色枯死;分化培养时愈伤组织几乎不发生分化,说明 50 mg L^{-1} 是潮霉素作为果蔗胚性愈伤组织遗传转化筛选的最佳浓度

表1 潮霉素对愈伤组织的影响

Table 1 Effects of Hygromycin on differentiation of callus

潮霉素 Hygromycin (mg L^{-1})	愈伤组织诱导率 Callus induction rate (%)	不定芽 Adventitious buds		生根率 Rooting (%)
		成活率 Survival (%)	分化率 Differentiation rate (%)	
0	100	100	87	100
10	60	43	42	35
25	32	21	11	19
50	6	5	2	1
100	0	0	0	0

2.3 转化和分子检测

吸干农杆菌侵染后的胚性愈伤组织的水分,放入含有 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮的诱导培养基中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暗培养3 d后移至筛选培养基中,经过2~3代 50 mg L^{-1} 潮霉素筛选(每代14 d),大部分胚性愈伤组织出现褐化或水渍糊状(图版 I: D),成活率为8%;存活的愈伤组织被转入选择分化培养基(即另含 50 mg L^{-1} 潮霉素,下同)上进行不定芽诱导选择培养(图版 I: D),分化的部分不定芽出现卷曲,有的出现白化现象;将长势较好的不定芽转入生根培养基上,不定芽生根情况较好,生根率为55%,随后将抗性苗进行分子检测。

PCR 特异扩增反应结果见图2。随机检测的23株再生小植株中有6株扩增出条带,而未经转化的阴性对照无扩增带。

Southern 点杂交分析结果表明,被检测的具潮霉素抗性小苗中有杂交阳性植株(图3),证明 *cryIac* 基因被整合入了果蔗小苗的基因组。

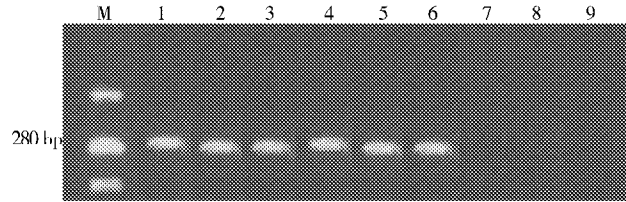


图2 果蔗转化植株的 PCR 结果

Fig. 2 PCR results of transgene plants

M: Marker; 1: 阳性对照 Plasmid pMG225 (positive control); 2~6: 阳性植株 Positive plants; 7~9: 阴性植株 Negative plant.

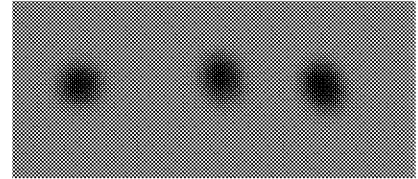


图3 转化植株的 Southern 检测

Fig. 3 Southern blot analysis

1. 阳性对照(质粒 pMG225) Plasmid pMG225 (positive control); 2. 未转化植株 Non-transgenic plant; A、B. 转化植株 Transgenic plants with Hyg^R .

3 讨论

果蔗是高度杂合的无性繁殖作物,其遗传背景十分复杂,染色体数目多($2n=80$),基因组巨大,且果蔗在大多数产区不能开花,亦难以通过常规方法培育新品种,遗传转化方法为果蔗品种改良提供了便捷的手段。同时,果蔗具有良好的再生能力^[5],容易诱导产生胚性愈伤组织,并且可通过胚体出苗,是很好的遗传转化实验材料。本实验用果蔗细嫩叶鞘为外植体,愈伤组织的诱导率最高达到85%,分化率为83%,生根率为81%,基本上建立了高效的果蔗植株再生体系,为通过导入外源目的基因进行果蔗遗传性状的改良奠定了基础。

本实验利用根癌农杆菌介导法进行果蔗遗传转化,对农杆菌的转化条件进行了优化。据研究乙酰丁香酮可以促进农杆菌 *vir* 基因的表达,本研究将侵染后的胚性愈伤组织置于添加 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮的诱导培养基中,藉此提高转化率;抗生素浓度太高会抑制外植体的分化,但过低的浓度无法淘汰假阳性芽,影响选择效率,本研究结果说明 50 mg L^{-1} 潮霉素是果蔗胚性愈伤组织遗传转化筛选的最佳浓度。由于获得的转基因植株数量相对较少,长势柔弱,生长缓慢,本研究只进行了分子生物学鉴定,其大田抗病性鉴定有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Arencibia A D, Carmona E R, Tellez P, et al. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Transgen Res*, 1998, 7: 1-10.
- [2] Enriquez-Obregon G A, Vazquez-Padron R I, Prieto-Samsonov D L, et al. Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum* spp. L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. *Planta*, 1998, 206: 20-27.
- [3] Wang G L(王关林), Fang H J(方宏筠). *Plant Genetic Engineering* [M]. Beijing: Science Press, 1998: 221-227. (in Chinese)
- [4] Zhou S J(周思军), Li X C(李希臣), Liu Z J(刘昭军), et al. Optimization of the *Agrobacterium*-mediated transformation systems of soybean [J]. *J NE Agri Univ(东北农业大学学报)*, 2001, 32(4): 313-319. (in Chinese)
- [5] Gallo-Meagher M, Irvine J E. Effects of tissue type and promoter

strength on transient *GUS* expression in sugarcane following particle bombardment [J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 12(12): 666-670.

图版说明

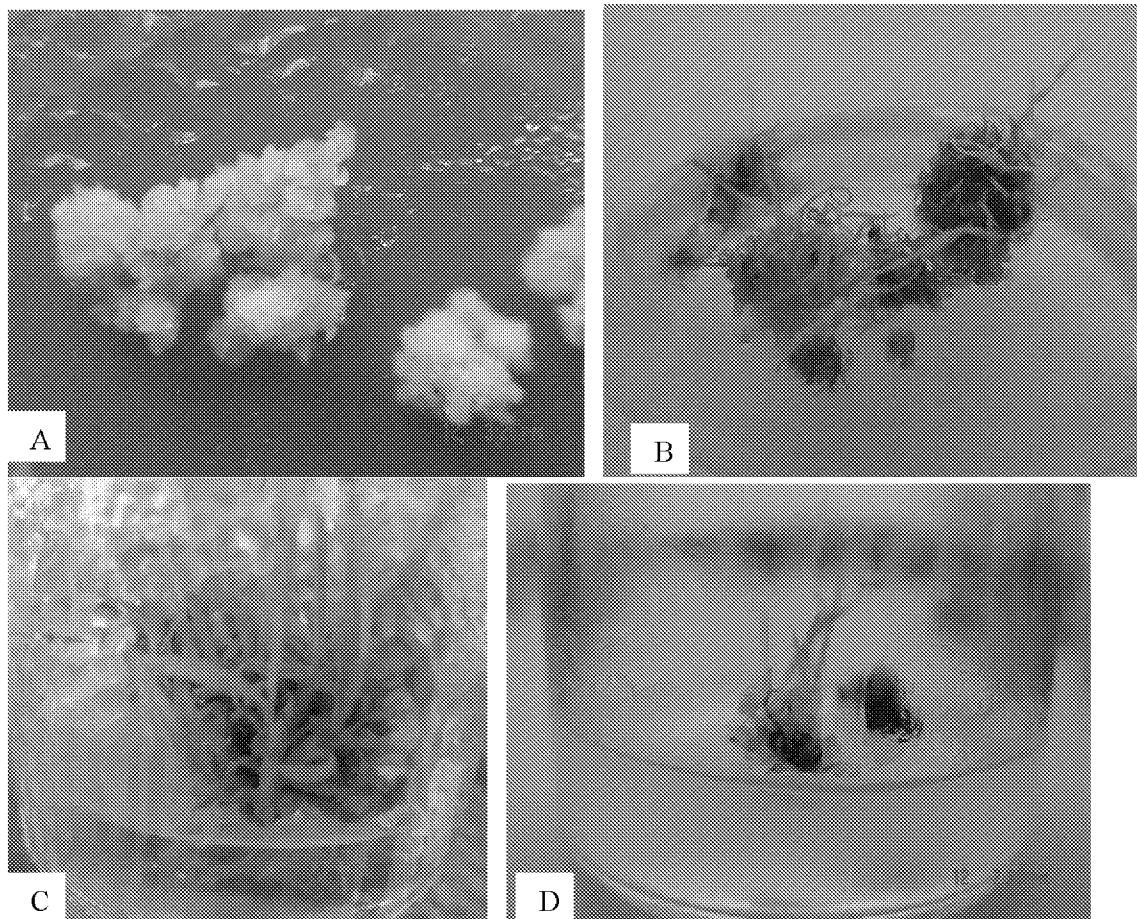
图版 I

A. 愈伤组织; B. 愈伤组织分化出绿色不定芽; C. 不定芽生根; D. 抗性愈伤组织的分化与褐变。

Explanation of plate

Plate I

A. Calli; B. Green adventitious buds differentiated from calli; C. Rooting of adventitious buds; D. Adventitious buds differentiated from Hyg^R calli and browning.



李瑞美等: 图版 I

LI Rui-mei, et al.: Plate I