

豇豆子叶节再生体系建立及*Pti4*基因的遗传转化

姜建业^{1a}, 谢永东^{1a}, 王一鸣^{1b}, 赵丽^{1b}, 铁曼曼², 唐懿^{1a*}

(1. 四川农业大学, a. 果蔬研究所; b. 园艺学院, 成都 611130; 2. 达州市农业科学研究所, 四川 达州 635000)

摘要: 为获得豇豆(*Vigna unguiculata*)遗传转化体系,以‘成豇七号’带1片子叶的子叶节作为外植体,对其高效再生体系和农杆菌介导抗病基因*Pti4*的遗传转化进行了研究。结果表明,豇豆无菌苗、不定芽诱导和不定芽伸长培养的最适培养基分别为MSB₅ + 6-BA 3.0 mg L⁻¹、MSB₅ + 6-BA 1.0 mg L⁻¹ + KT 0.06 mg L⁻¹和MSB₅ + 6-BA 0.5 mg L⁻¹ + IBA 0.2 mg L⁻¹。不定芽在MS培养基上能迅速诱导生根,获得完整植株。以豇豆子叶节为受体,通过农杆菌介导成功将*Pti4*整合到‘成豇七号’抗性芽基因组中。因此,豇豆高效再生体系的建立为遗传育种研究奠定了基础。

关键词: 豇豆;子叶节;组织培养;抗病转录因子;*Pti4*;农杆菌介导

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.05.008

Establishment of Regeneration System of Cotyledon Node and Genetic Transformation of *Pti4* Gene to Cowpea

JIANG Jian-ye^{1a}, XIE Yong-dong^{1a}, WANG Yi-ming^{1b}, ZHAO Li^{1b}, TIE Man-man², TANG Yi^{1a*}

(1a. Institute of Pomology & Olericulture; 1b. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2. Institute of Agricultural Science Research of Dazhou, Dazhou 635000, Sichuan, China)

Abstract: In order to obtain genetic transformation system of cowpea (*Vigna unguiculata*), its cotyledon nodes with one cotyledon of ‘Chengjiang 7’ was used as explants, the regeneration system and *Pti4* genetic transformation system by *Agrobacterium*-medium were studied. The results showed that the optimum mediums for aseptic seedling, adventitious bud introduction and adventitious bud elongation were MSB₅ + 6-BA 3.0 mg L⁻¹, MSB₅ + 6-BA 1.0 mg L⁻¹ + KT 0.06 mg L⁻¹ and MSB₅ + 6-BA 0.5 mg L⁻¹ + IBA 0.2 mg L⁻¹, respectively. Adventitious buds could rapidly rooting on MS medium to obtain full plantlets. The cotyledon node was used as receptor, the *pit4* gene mediated by *Agrobacterium* was successfully transformed into the genome of resistant buds of ‘Chengjiang 7’. Therefore, the establishment of high efficient regeneration system for cowpea laid basis for studying on genetic transformation.

Key words: Cowpea; Cotyledon node; Tissue culture; Disease-resistance transcription factor; *Pti4*; *Agrobacterium*-medium

豇豆(*Vigna unguiculata*)是以嫩荚或干籽粒为食的日常蔬菜,其籽粒富含大量蛋白质、维生素、叶酸等^[1]。虫害及真菌病害是导致豇豆产量严重下降,制约豇豆生产规模的重要因素^[2]。转基因技术是生物定向改良和分子育种的一种快捷方法,其中农杆

菌介导法因其费用低、拷贝数低、转育周期短以及能转化较大片段等独特优点而被广泛应用^[3],但以农杆菌介导法获得转基因材料的前提是要建立一个高效稳定的再生受体系统。

Subramaniam等1968年以豇豆根尖分生组织

收稿日期: 2015-05-18

接受日期: 2015-06-19

基金项目: 教育部博士学科点基金项目(20125103120006);四川省教育厅科研项目重点项目(15ZA0011)资助

作者简介: 姜建业(1990~),男,硕士研究生,研究方向为蔬菜遗传育种与生理生态。E-mail: jiangjianye0001@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: 95459425@qq.com

为外植体,首次建立了豇豆再生体系,但再生率极低,不足10%^[4]。之后,经过不断优化再生体系,再生率可达100%,但豇豆组织的再生能力因基因型不同而存在显著差异^[4-7]。在豇豆无菌苗培养基中添加细胞分裂素,可明显提高植株再生率和不定芽数量^[2,5,8-10]。

Pti4 是从番茄(*Lycopersicon esculentum*)中分离出的1个抗病转录因子基因,转录因子 *Pti4* 能够激活植物自身 *PR* 基因的表达,获得系统性抗病机制,提高植物的综合抗病能力。

本文以豇豆‘成豇七号’为材料,以子叶节为外植体,探讨适合不同基因型的豇豆高效再生体系,获得再生植株。同时探讨农杆菌介导 *Pti4* 基因的遗传转化条件,以期建立高效遗传转化体系,为豇

豆的基因工程育种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

选取豇豆(*Vigna unguiculata*)的5个不同基因型‘成豇七号’、‘挂满架长豆角’、‘急先锋’、‘奇丽’和‘夏美’种子为试验材料。

供试农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 EHA105 具有链霉素抗性(Strr)。表达载体质粒为 pRD400,含启动子 CaMV35S 和抗病转录因子基因 *Pti4*,并与具有卡那霉素(Kan)抗性的 *NPT II* 基因相连(图 1)。

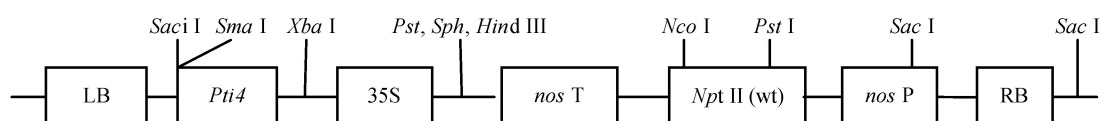


图1 表达载体pRD400-*Pti4*

Fig. 1 Expression vector of pRD400-*Pti4*

1.2 再生体系的建立

以下培养基均以 MSB₅ 为基本培养基,包含 MS 培养基的无机成分和 B₅ 培养基的有机成分。

种子萌发培养基的筛选 选取大小均匀、饱满的‘成豇七号’种子,在超净工作台上用 75% 酒精浸泡 1 min, 0.1% 升汞浸泡 5 min, 无菌水冲洗 4~5 次,接种于种子萌发培养基上。种子萌发培养基添加 6-BA (0、1.0、2.0、3.0、4.0 mg L⁻¹)或 TDZ (0.001、0.005、0.01、0.05、0.1 mg L⁻¹)。每瓶接种 10 粒种子,每处理 5 瓶 3 次重复。在 (25±2) °C, 光照强度 54 μmol m⁻² s⁻¹,光照 16 h d⁻¹ 下培养。5 d 后切取带 1 片子叶的子叶节,接种于不定芽诱导培养基上培养 7 d 后,继代培养 7 d 后观察统计不定芽的生长情况,筛选出最佳的种子萌发培养基。

不定芽诱导培养基筛选 从苗龄 5 d 的无菌苗上切取带 1 片子叶的子叶节(节点距上胚轴约 1 mm,距下胚轴约 5 mm),接种于不定芽诱导培养基上。不定芽诱导培养基为 MSB₅ 基本培养基添加 6-BA 1.0 mg L⁻¹ 和 IBA (0、0.1、0.2、0.3、0.4 mg L⁻¹)或 KT (0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg L⁻¹)、或者添加 IBA 2.0 mg L⁻¹ 和 KT (0.05、0.1、0.5、1、2 mg L⁻¹)。每瓶接种 4~6 个子叶节,每处理 5 瓶 3 次重复。培

养 7 d 后去除初生腋芽和子叶,接种于继代培养基,7 d 后观察统计组培苗的生长情况,筛选出最佳的不定芽诱导培养基。

伸长培养基筛选 将诱导的不定芽接种于伸长培养基上,不定芽伸长培养基 MSB₅ 基本培养基添加 6-BA 0.5 mg L⁻¹ 和 IBA 0.1 mg L⁻¹ 或 6-BA 0.5 mg L⁻¹、IBA 0.2 mg L⁻¹ 和 GA₃ (0、0.05、0.1、0.2 mg L⁻¹)。每瓶接种 4~6 个不定芽,每处理 5 瓶 3 次重复,培养 14 d 后观察统计组培苗的生长情况,筛选出最佳伸长培养基。

生根、炼苗与移栽 切取伸长培养 14 d 的不定芽,接种于 MS 生根培养基上诱导生根^[11-12]。待不定根发达后,先炼苗 4~5 d,取出植株,移栽到经高压灭菌的基质中,温室培养。

再生体系对不同基因型的影响 将建立的再生体系应用于‘挂满架长豆角’、‘急先锋’、‘奇丽’和‘夏美’其他 4 个不同基因型的豇豆,观察统计组培苗的生长情况。

不定芽对卡那霉素敏感性测试 以‘成豇七号’为材料,选取在最佳不定芽分化培养基上培养 7 d 的不定芽,接种于分别含 80、90、100、110、120、150 mg L⁻¹ 卡那霉素的继代培养基中,测试不

定芽对卡那霉素的敏感性。

以上培养基均添加 30 g L⁻¹的蔗糖、7 g L⁻¹的琼脂, pH 调节至 5.8, 在 121℃ ~125℃下高压蒸汽灭菌 18 min^[13]。

1.3 遗传转化体系的建立

农杆菌介导法 以‘成甕七号’为材料, 从 5 d 苗龄的无菌苗上切取子叶节, 用刀尖在子叶节节点处竖划 4~5 个伤口, 预培养 1 d, 浸没于 OD₆₀₀=0.5~0.6 的农杆菌侵染液中 10、20、30、40 min, 吸干表面菌液, 接种于不定芽诱导培养基上, 于 28℃黑暗共培养 15 d, 观察不定芽诱导情况, 筛选最适的侵染时间。将在最适侵染时间下诱导的不定芽分别于共培养 0、1、2、3、4、5 d 后转移到脱菌及筛选培养基中进行抗性筛选和诱导分化。脱菌及筛选培养基为最佳不定芽分化培养基添加适量的卡那霉素以及头孢霉素。每 14 d 继代 1 次, 28 d 后观察统计组培苗的生长情况。

1.4 抗性植株分子检测

采用 SDS 法^[14]提取抗性植株的基因组总 DNA。以抗性苗和未转化组培苗的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 质粒 pRD400 为阳性对照。上游引物为 5'-TCGGCTATGACTGGGCACA-3'; 下游引物为 5'-GATACCGTAAAGCACGAGGAAG-3'。PCR 扩增程序为 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 58℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 40 个循环; 72℃延伸 10 min; 4℃保存。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 数据统计和分析

所有试验均设 3 次重复, 每个培养阶段后统计数据取其平均值, 其中的不定芽数量、长度、主芽数量、主芽长度、丛芽数量、丛芽长度、冠幅、不定芽鲜重、不定芽干重符合泊松分布, 在方差分析前进行平方根转换 $\sqrt{\frac{1}{2} + x_{ij}}$; 不定芽的诱导率和玻璃化率符合二项分布, 方差分析前进行角度反正弦变换 $\arcsin \sqrt{x_{ij}}$ ^[15]。不定芽诱导率(%) = 诱导出芽的外植体数/外植体总数×100%; 不定芽冠幅 = 不定芽宽(cm)×不定芽长(cm); 不定芽鲜重(mg) = 不定芽总鲜重/不定芽总数; 不定芽干重(mg) = 不定芽总干重/不定芽总数; 不定芽玻璃化率(%) = 玻璃化的不定芽

数/不定芽总数×100%。采用 Microsoft Excel 2007 进行数据统计和图表制作, 采用 Spss 20.0 软件进行方差分析, 用 Duncan 新复极差法检验差异显著性, 以 P<0.05 为差异显著。

2 结果和分析

2.1 种子萌发培养基对不定芽诱导的影响

将灭菌后的甕豆种子接种于种子萌发培养基上 5 d, 可见高浓度 6-BA、TDZ 使无菌苗的上胚轴、下胚轴和根茎短而粗壮, 没有侧根生成(图 2: A)。从无菌苗上切取带 1 个子叶的子叶节接种于不定芽诱导培养基(图 2: B)进行不定芽诱导, 7 d 后去除初生腋芽进行继代培养(图 2: C, D), 结果表明, 种子萌发培养时 6-BA、TDZ 浓度越高, 下胚轴愈伤组织越大。

由表 1 可知, 种子萌发培养的不定芽诱导率均达 100%。6-BA 为 1.0~3.0 mg L⁻¹时, 不定芽主芽数随 6-BA 浓度的升高而增加, 3.0 mg L⁻¹ 6-BA 诱导的不定芽主芽最多, 达 4.53 个, 丛芽数最少, 仅 2.87 个; 6-BA 达 4.0 mg L⁻¹时, 诱导的不定芽出现畸形、叶脉扭曲现象。TDZ 为 0.1 mg L⁻¹时, 诱导的主芽最少, 仅 2.54 个, 但丛芽达 4.77 个。当 TDZ 低于 0.1 mg L⁻¹处理间的主芽数和丛芽数无显著差异, 但 TDZ 超过 0.01 mg L⁻¹诱导的不定芽发育畸形, 叶脉扭曲, 叶片深绿。后期试验表明, 主芽较易形成再生植株, 而丛芽则很难。因此, ‘成甕七号’种子萌发的最适培养基为 MSB₅ + 6-BA 3.0 mg L⁻¹。

2.2 不定芽的诱导

不定芽诱导培养 2~3 d 子叶节下胚轴明显伸长, 愈伤组织形成; 培养 5~7 d 子叶节的初生腋芽生长明显。子叶节在含 IBA 和 KT 的培养基中培养 6~7 d 的子叶呈浅绿色, 且 IBA 为 0.2 mg L⁻¹时有不定根生成, 但不定根数随 KT 浓度的升高而逐渐减少, 不定根长度也逐渐变短。而子叶节含 6-BA 的培养基中出现子叶明显萎焉、部分脱落现象。

由表 2 可知, 子叶节在 MSB₅ + 6-BA 1.0 mg L⁻¹ + KT 0.06 mg L⁻¹和 MSB₅ + 6-BA 1.0 mg L⁻¹ + KT 0.08 mg L⁻¹上诱导的不定芽主芽数显著高于其他处理, 以前者最大(4.56 个), 且丛芽数最少(2.87 个)。因此, ‘成甕七号’的不定芽诱导的最佳培养基为 MSB₅ + 6-BA 1.0 mg L⁻¹ + KT 0.06 mg L⁻¹。

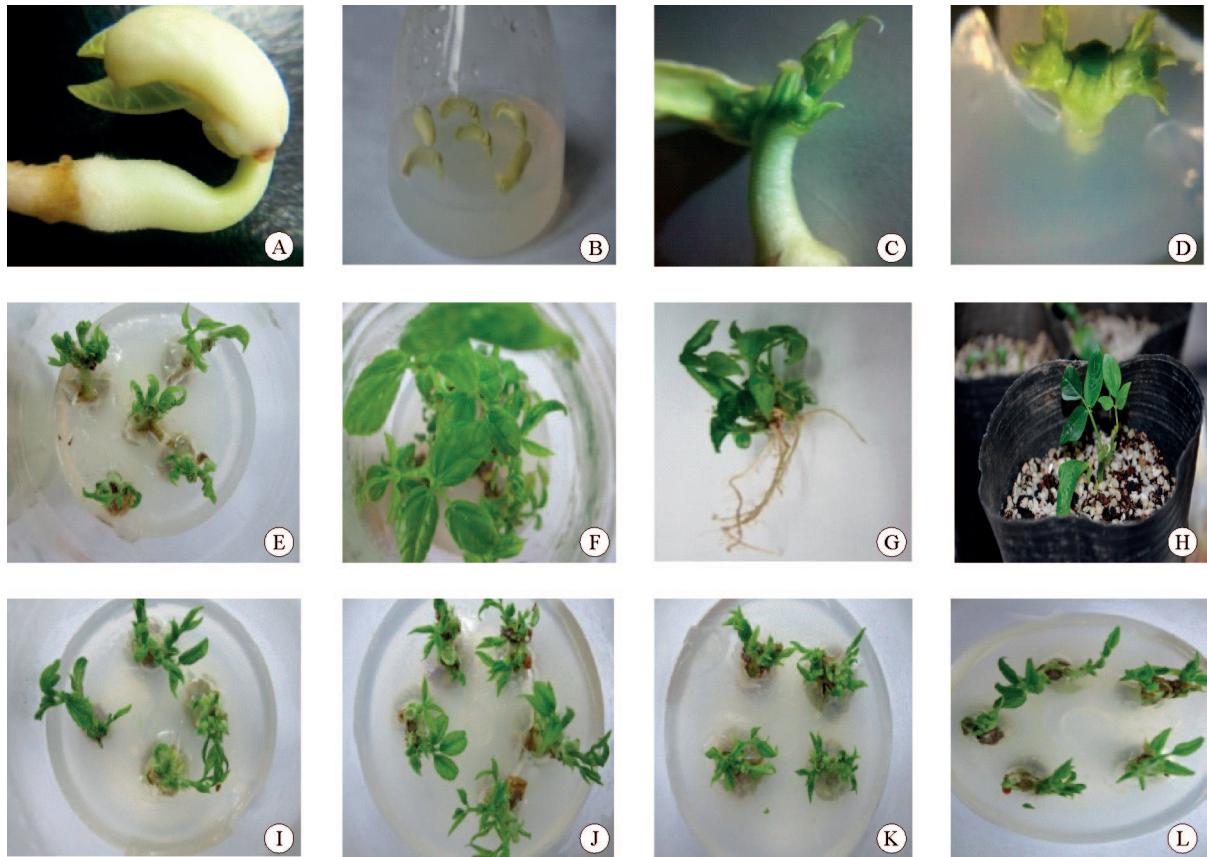


图 2 豇豆的再生体系。A: 无菌苗; B: 子叶节; C: 培养 7 d 后的子叶节; D: 切去初生腋芽的不定芽; E: ‘成豇七号’的再生不定芽; F: 不定芽的伸长培养; G: 再生植株; H: 移栽后的再生植株; I~L: 分别为‘挂满架长豆角’、‘急先锋’、‘奇丽’、‘夏美’的再生不定芽。

Fig. 2 Regeneration system of *Vigna unguiculata*. A: Aseptic seedling; B: Cotyledon node; C: Cotyledon node induced culture for 7 d; D: Adventitious buds without primary axillary bud; E: Adventitious buds of ‘Chengjiang 7’; F: Elongation culture of adventitious buds; G: Regeneration plantlet; H: Transplanting of regeneration plantlet; I~L: Adventitious buds of ‘Guamanjia changjiangdou’, ‘Jixianfeng’, ‘Qili’ and ‘Xiamei’, respectively.

表 1 种子萌发培养基中 6-BA、TDZ 对豇豆不定芽的影响

Table 1 Effects of 6-BA and TDZ in seed germination medium on induction of adventitious buds of cowpea

6-BA (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)	主芽数 Number of main buds	主芽长 Length of main bud (cm)	丛芽数 Number of clustered buds	丛芽长 Length of clustered bud (cm)	诱导率 Induction rate (%)
0	0	1.96±0.10abc	1.18±0.02d	2.17±0.09a	0.88±0.01e	90a
1.0	0	2.07±0.05ab	1.21±0.02cd	2.18±0.10a	0.92±0.01cde	90a
2.0	0	2.07±0.10ab	1.29±0.02ab	2.14±0.14ab	0.92±0.01cd	90a
3.0	0	2.22±0.08a	1.21±0.01cd	1.81±0.08b	0.94±0.01bcd	90a
4.0	0	1.94±0.12b	1.24±0.02bcd	1.91±0.12ab	0.98±0.01a	90a
0	0.001	2.06±0.08ab	1.21±0.03cd	2.06±0.12ab	0.91±0.02de	90a
0	0.005	2.02±0.08ab	1.20±0.03d	1.91±0.09ab	0.93±0.01bcd	90a
0	0.01	1.72±0.08c	1.32±0.03a	2.26±0.12a	0.95±0.01abc	90a
0	0.05	2.04±0.08ab	1.24±0.02bcd	2.08±0.06ab	0.98±0.01a	90a
0	0.1	1.93±0.08bc	1.27±0.02abc	2.11±0.09ab	0.96±0.01ab	90a

同列数据后不同字母表示经 Duncan 新复极差法检验差异显著(P<0.05)。下表同。

Data followed different letters within column indicate significant difference at 5% level by Duncan’s multiple range test. The same is following Tables.

表2 不定芽诱导培养基中 6-BA、IBA、KT 对豇豆不定芽的影响

Table 2 Effect of 6-BA, IBA and KT on adventitious bud of cowpea

6-BA (mg L ⁻¹)	IBA (mg L ⁻¹)	KT (mg L ⁻¹)	主芽数 Number of main buds	主芽长 Length of main bud (cm)	丛芽数 Number of clustered buds	丛芽长 Length of clustered bud (cm)
1.0	0	0	2.07±0.08abc	1.08±0.01f	3.36±0.10bc	0.88±0.01d
1.0	0.1	0	1.55±0.07fg	1.28±0.02cd	2.21±0.09bcd	0.95±0.01ab
1.0	0.2	0	1.45±0.07g	1.44±0.02a	2.38±0.08bc	0.96±0.01a
1.0	0.3	0	1.61±0.08efg	1.38±0.03abc	2.09±0.11cde	0.94±0.01abc
1.0	0.4	0	1.66±0.11efg	1.29±0.03bcd	2.12±0.10cde	0.91±0.01bcd
1.0	0.5	0	1.65±0.04efg	1.39±0.03abc	2.01±0.10cd	0.91±0.01bcd
1.0	0	0.02	2.02±0.05abc	1.14±0.01ef	2.51±0.09ab	0.91±0.01bcd
1.0	0	0.04	1.94±0.04bcd	1.21±0.02de	2.49±0.10ab	0.90±0.01cd
1.0	0	0.06	2.25±0.03a	1.21±0.01de	1.83±0.08e	0.96±0.02a
1.0	0	0.08	2.15±0.07ab	1.18±0.01def	2.78±0.07a	0.91±0.01bcd
1.0	0	0.1	1.70±0.06defg	1.20±0.02de	2.51±0.07ab	0.91±0.01bcd
0	0.2	0.05	1.74±0.06def	1.20±0.03de	2.35±0.08bc	0.90±0.01cd
0	0.2	0.1	1.62±0.08efg	1.21±0.04de	2.43±0.11bc	0.91±0.01bcd
0	0.2	0.5	1.87±0.09cde	1.21±0.04de	2.54±0.10ab	0.89±0.01d
0	0.2	1.0	1.60±0.08efg	1.37±0.06abc	2.49±0.09ab	0.92±0.01bcd
0	0.2	2.0	1.48±0.09fg	1.41±0.07ab	2.49±0.12ab	0.92±0.01bcd

2.3 不定芽的伸长培养

从表3可知,不同培养基对不定芽伸长生长的影响不同。不定芽在MSB₅+6-BA 0.5 mg L⁻¹+IBA 0.2 mg L⁻¹上培养的主芽长、丛芽长、冠幅均高于其

它处理,虽芽鲜重和芽干重不是最大值,但与最大值无显著差异。因此,不定芽伸长培养的最适培养基为MSB₅+6-BA 0.5 mg L⁻¹+IBA 0.2 mg L⁻¹。

表3 6-BA、IBA、GA₃ 对不定芽伸长生长的影响Table 3 Effects of 6-BA, IBA and GA₃ on elongation growth of adventitious buds

6-BA (mg L ⁻¹)	IBA (mg L ⁻¹)	GA ₃ (mg L ⁻¹)	主芽长 Length of main bud (cm)	丛芽长 Length of clustered bud (cm)	冠幅 Canopy (cm ²)	芽鲜重 Fresh weight of bud (mg)	芽干重 Dry weight of bud (mg)
0.5	0.1	0	1.32±0.03ab	0.95±0.01a	2.84±0.13a	30.9±1.0a	2.65±0.26a
0.5	0.2	0	1.41±0.03a	0.95±0.01a	2.87±0.13a	28.8±1.5ab	2.63±0.21a
0.5	0.2	0.05	1.35±0.03ab	0.95±0.01a	2.67±0.11ab	29.0±1.2a	2.58±0.15a
0.5	0.2	0.1	1.38±0.02a	0.95±0.01a	2.62±0.10ab	20.9±1.2c	1.94±0.17b
0.5	0.2	0.2	1.28±0.02b	0.93±0.01a	2.43±0.08b	25.3±0.78b	2.22±0.12b

2.4 再生苗移栽

不定芽伸长培养3周后,不定芽长约3 cm,接种到生根培养基(图2: G)。当诱导的不定根长至4 cm时进行炼苗,7 d后移栽(图2: H),成活率约为80%。绝大部分丛芽在炼苗时死亡,而根系发达的主芽能成长为再生植株。

2.5 基因型对不定芽诱导的影响

5个不同基因型的豇豆种子在最适种子萌发培养基上的萌发率均达90%以上。从表4可知,在最适不定芽诱导培养基上,不同基因型豇豆子叶节均能诱导不定芽,且诱导率均大于92.9%;但诱导的主芽数存在差异,以‘急先锋’诱导的主芽数最

表4 不同基因型的不定芽诱导率

Table 4 induction rate of adventitious bud from different genotypes

6-BA (mg L ⁻¹)	主芽数 Number of main buds	主芽长 Length of main bud (cm)	丛芽数 Number of clustered buds	丛芽长 Length of clustered bud (cm)	诱导率 Induction rate (%)
‘挂满架长豆角’ ‘Guamanjia changdoujiao’	1.97±0.05ab	1.26±0.02a	2.74±0.09a	0.89±0.01b	90.0±0.00a
‘急先锋’ ‘Jixianfeng’	2.11±0.06ab	1.26±0.01a	3.00±0.12a	0.89±0.00b	90.0±0.00a
‘奇丽’ ‘Qi li’	1.81±0.08b	1.20±0.02a	2.64±0.08a	0.91±0.01b	82.5±6.51a
‘夏美’ ‘Xiamei’	1.30±0.15c	1.22±0.03a	2.19±0.12b	0.90±0.01b	90.0±0.00a

多,达4.05个,‘夏美’的最少(1.46个)。不同基因型豇豆诱导的主芽长无显著差异。

2.6 卡那霉素对不定芽诱导的影响

将‘成豇七号’子叶节接种到含不同浓度卡那

霉素(Kan)的分化培养基中(表5),结果表明,当Kan高于110 mg L⁻¹时,绝大部分不定芽为绿色透明或叶片发黄脱落,为非抗性芽(图3: A, B);少量能正常生长的不定芽为抗性芽(图3: C),因此110 mg L⁻¹ Kan 可作为转化植株的筛选浓度。



图3 卡那霉素筛选。A,B: 非抗性芽; C: 抗性芽。

Fig. 3 Screen of kanamycin. A,B: Non-resistant buds; C: Resistant buds.

表5 Kan 对不定芽分化的影响

Table 5 Effect of Kan on differentiation of adventitious buds

Kan (mg L ⁻¹)	出芽数 Number of buds	玻璃化率 Vitrification rate (%)
80	6.93±0.08a	1.90±1.56c
90	6.86±0.08a	5.66±1.27c
100	6.69±0.07a	17.18±3.98b
110	5.93±0.05b	88.89±5.84a
120	5.42±0.05b	88.90±6.12a
150	5.21±0.06b	97.97±1.41a

同列数据后不同字母表示经多重比较 SNK 检验差异显著($P<0.05$)。Data followed different letters within column indicate significant differences at 0.05 level by SNK test.

2.7 农杆菌侵染时间和共培养时间对不定芽诱导的影响

从图5可见,农杆菌侵染10、20、30 min的不定芽诱导率差异不显著,但均显著高于侵染40 min的不定芽诱导率。侵染时间为20 min的抗性芽诱导率却显著高于其他处理的。

农杆菌与不定芽的共培养时间是影响转化效率的重要因素之一。农杆菌侵染20 min,不定芽诱导率随共培养时间的延长呈现先上升后下降的趋势,以共培养2 d的抗性芽诱导率最高,显著高于其他处理,为20.11%。未经共培养的抗性芽诱导率为0;共培养5 d时,农杆菌菌落生长明显,不定芽受害严重,易褐化,不定芽诱导率显著低于其他处理,抗性芽诱导率也较低。因此,2 d是最佳的共培养时间。

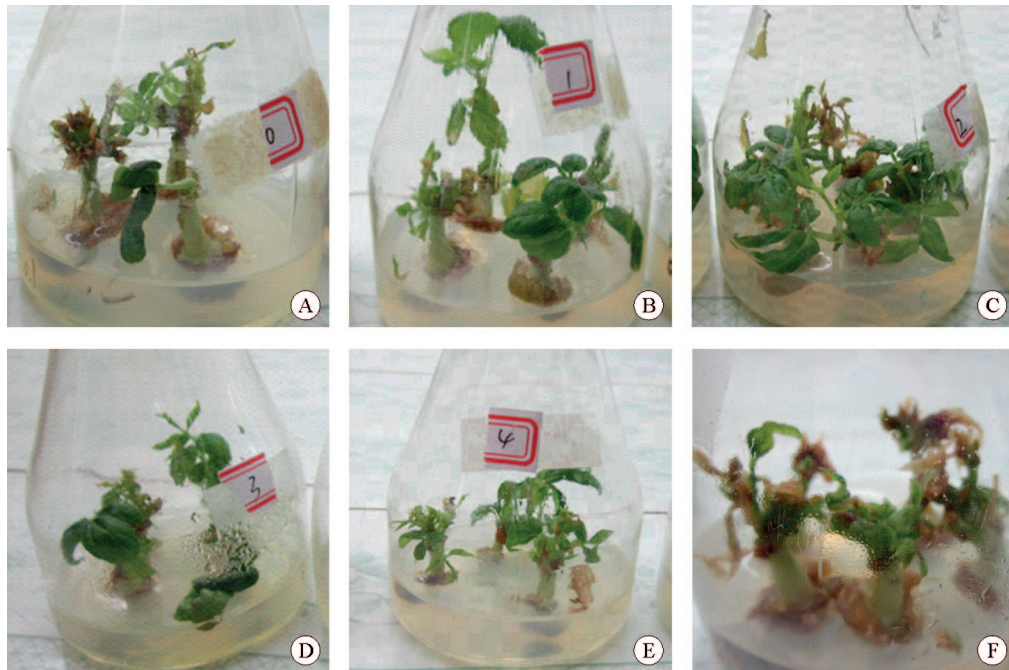


图4 共培养时间的影响。A: 0 d; B: 1 d; C: 2 d; D: 3 d; E: 4 d; F: 5 d。

Fig. 4 Effect of co-cultured time. A: 0 d; B: 1 d; C: 2 d; D: 3 d; E: 4 d; F: 5 d.

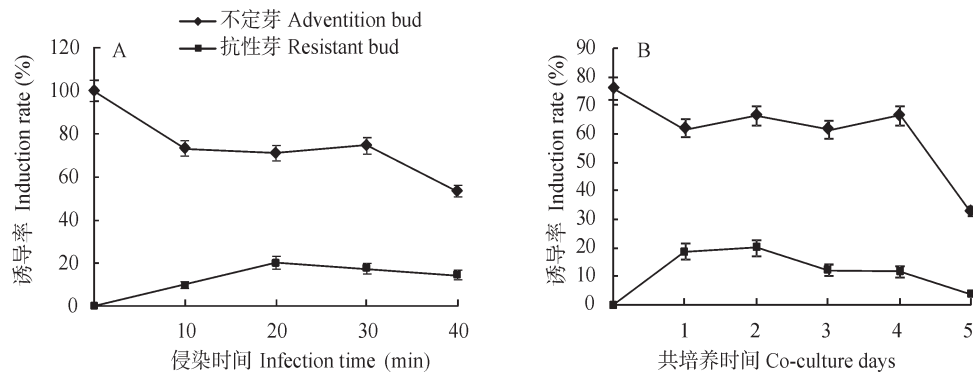


图5 侵染时间(A)和共培养时间(B)对抗性芽诱导的影响

Fig. 5 Effects of infection time (A) and co-culture time (B) on induction of resistant buds

2.8 基因转化及抗性植株分子检测

在建立豇豆子叶节再生体系和优化农杆菌侵染试验的基础上,对100个子叶节进行了侵染转化,共获得54个抗性芽。对抗性芽进行PCR检测(图6),结果有31个扩增出预期基因片段,大小为680 bp,阳性率为57.41%,其余23个呈假阳性。

3 讨论

3.1 豇豆子叶节再生体系

豇豆子叶节自身的分生组织使得其比较容易

诱导不定芽,具有较高的再生率^[16]。近年来利用子叶节通过器官发生途径建立豇豆再生体系成为最常用的一种方法,其不定芽诱导率较高且不定芽诱导数量较多^[17-20]。本研究结果表明,种子萌发培养基中添加6-BA或TDZ对子叶节再生能力并没有明显的改变,不定芽诱导率均达到100%,这与Chaudhury等^[20]的研究结果相似。本研究还观察到,丛芽在伸长生长后期以及诱导生根期间大量枯萎死亡,且炼苗期间仍有大部分死亡,而主芽生长旺盛,长势较好。因此,能诱导较多不定芽主芽才是获得更多再生苗的保障。不定芽诱导培养基中添

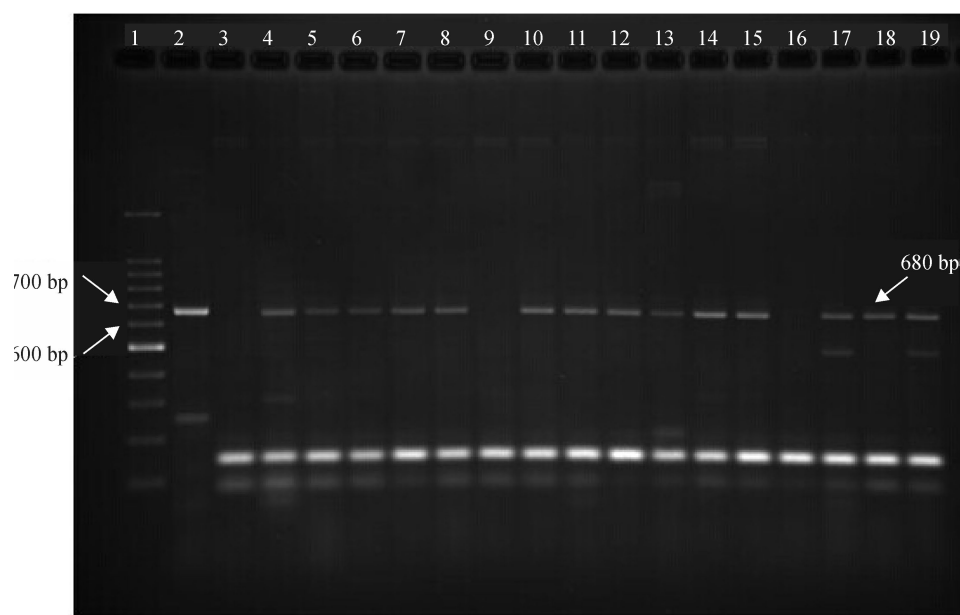


图 6 Kan 抗性芽的 PCR 检测。1: DL1500 Marker; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照; 4~19: Kan 抗性芽。

Fig. 6 PCR detection of Kan resistant buds. 1: DL1500 marker; 2: Positive control; 3: Negative control; 4~19: Kan resistant buds.

加 6-BA 1.0 mg L^{-1} 和 KT 0.06 mg L^{-1} 能极大地提高不定芽主芽的诱导率, 降低丛芽的诱导率。

基因型是影响不定芽诱导率和数量的内在因素。有研究表明豇豆不同基因型的不定芽诱导率差异显著, 最高的达 100%, 最低的仅为 66%^[7]。而本研究以子叶节建立的再生体系有效地减少了基因型对不定芽诱导率的影响, 5 个基因型的豇豆不定芽诱导率均在 92.9% 以上, 且无显著差异。

3.2 农杆菌介导*Pti4*基因的遗传转化

Chaudhury 等^[20]研究表明, 带有子叶的子叶节比不带子叶的子叶节能诱导更多、更长的不定芽, 但带有子叶的子叶节并不适合根癌农杆菌介导的遗传转化, 带有子叶的子叶节体积较大, 与农杆菌共培养后残留的菌液很难清洗完全, 外植体易感染, 不易转化成活。本研究将带有 1 片子叶的子叶节与农杆菌共培养后, 用无菌水冲洗 4~5 次, 极少发生感染, 表明带 1 片子叶的子叶节可通过根癌农杆菌介导进行遗传转化。

豇豆子叶节处的腋芽分生组织细胞具有再生为完整植株和整合 T-DNA 的能力, 多种豆科植物的子叶节和农杆菌共培养后, 都能够再生出有效转化的不定芽^[21]。有研究表明选择压太高, 对转化芽最初的生长会有毒害作用, 导致遗传转化率降低^[17,20,22]。本研究结果也表明, Kan 为 110 mg L^{-1} 时,

豇豆子叶节和农杆菌共培养 2 d, 抗性芽诱导率最高, 而 Kan 高于或低于 110 mg L^{-1} 时, 抗性芽的诱导率则会显著下降。另外大部分再生芽在 Kan 筛选培养基上生长缓慢, 遗传转化率较低, 这可能是 Kan、农杆菌、头孢霉素等对再生芽的生长发育有影响^[19,23]。

侵染时间或共培养时间过短, 农杆菌不能有效地吸附在愈伤组织上, T-DNA 不能有效地转移到植物细胞内; 而侵染时间或共培养时间过长, 又会造成农杆菌伤害愈伤组织, 因此, 侵染时间和共培养时间都会影响转化率。本研究结果表明, 侵染 20 min 共培养 2 d 的转化率较高, 可达 20.11%, 而其他处理的转化率均下降。

参考文献

- [1] Han S Y, Hou N X, Zhang Z J. High yield culture techniques of cowpea in the North [J]. *N Hort*, 2014(3): 201–202.
韩淑艳, 侯霓霞, 张智杰. 北方豇豆高产栽培技术 [J]. *北方园艺*, 2014(3): 201–202.
- [2] Raji A A J, Oriero E, Odeseye B, et al. Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of African cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] genotypes using embryonic axis explants [J]. *J Food Agric Environ*, 2008, 6(3/4): 350–356.
- [3] Zhang B, Zhao M, Gao Z Q, et al. Optimizing transformation systems of spring wheat mediated via *agrobacterium tumefaciens* [J]. *Acta Agri Nuel Sin*, 2007, 21(2): 124–127. doi: 10.3969/

- j.issn.1000-8551.2007.02.005.
张彬, 赵明, 高志强, 等. 农杆菌介导春小麦遗传转化体系的优化研究 [J]. 核农学报, 2007, 21(2): 124-127. doi: 10.3969/j.issn.1000-8551.2007.02.005.
- [4] Subramaniam M K, Royan-Subramaniam S, Gopinath P M, et al. Histogenesis, organogenesis and morphogenesis in callus cultures of *Trigonella foenumgraecum* L. and *Vigna unguiculata* L. [J]. Curr Sci, 1968, 37(14): 398-399.
- [5] Aasim M, Khawar KM, Özcan S. *In vitro* micropropagation from plumular apices of Turkish cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cultivar Akkiz [J]. Sci Hort, 2009, 122(3): 468-471; doi:10.1016/j.scienta.2009.05.023.
- [6] Li X M. Establishment of *in vitro* high efficient regeneration system of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) and screening test for its resistance to kanamycin [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2011: 1-27.
李晓梅. 豇豆高效离体再生体系及其卡那霉素筛选体系的建立 [D]. 成都: 四川农业大学, 2011: 1-27.
- [7] Luo Q. Establish and optimize regeneration system of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cotyledonary nodes and immature embryos [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2013: 24-28.
罗倩. 豇豆子叶节与幼胚再生体系建立与优化 [D]. 成都: 四川农业大学, 2013: 24-28.
- [8] Brar M S, Al-Khayri J M, Morelock T E, et al. Genotypic response of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) to *in vitro* regeneration from cotyledon explants [J]. *In vitro* Cell Dev Biol, 1999, 35(1): 8-12. doi: 10.1007/s11627-999-0002-4.
- [9] Van Le B, de Carvalho M H C, Zuily-Fodil Y, et al. Direct whole plant regeneration of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] from cotyledonary node thin cell layer explants [J]. J Plant Physiol, 2002, 159(11): 1255-1258. doi:10.1078/0176-1617-00789.
- [10] Raveendar S, Premkumar A, Sasikumar S, et al. Development of a rapid, highly efficient system of organogenesis in cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. [J]. S Afr J Bot, 2009, 75(1): 17-21. doi: 10.1016/j.sajb.2008.05.009.
- [11] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures [J]. Physiol Plant, 1962, 15(3): 473-479. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- [12] Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells [J]. Exp Cell Res, 1968, 50(1): 151-158. doi: 10.1016/0014-4827(68)90403-5.
- [13] Gong Z H. Biotechnology of Horticultural Plant [M]. Beijing: Science Press, 2008: 24-25.
巩振辉. 园艺植物生物技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2008: 24-25.
- [14] Wang G L, Fang H Y. Plant Gene Engineering [M]. Beijing: Science Press, 2009: 435-438.
王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 435-438.
- [15] Liu C Q, Yin W L, Xia X L. Somatic Embryogenesis and Histo-cytology of *Hippophae rhamnoides* L. and *Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl. [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2009: 11-36.
刘翠琼, 尹伟伦, 夏新莉. 中国沙棘和北美红杉体细胞胚胎诱导及其组织细胞学的研究 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2009: 11-36.
- [16] Hinchee M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer [J]. Nat Biotechnol, 1988, 6(8): 915-922. doi: 10.1038/nbt0888-915.
- [17] Popelka J C, Gollasch S, Moore A, et al. Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny [J]. Plant Cell Rep, 2006, 25(4): 304-312. doi: 10.1007/s00299-005-0053-x.
- [18] Solleti S K, Bakshi S, Sahoo L. Additional virulence genes in conjunction with efficient selection scheme and compatible culture regime enhance recovery of stable transgenic plants in cowpea via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation [J]. J Biotechnol, 2008, 135(1): 97-104. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.02.008.
- [19] Diallo M S, Ndiaye A, Sagna M, et al. Plants regeneration from African cowpea variety (*Vigna unguiculata* L. Walp.) [J]. Afr J Biotechnol, 2008, 7(16): 2828-2833. doi: 10.5897/AJB07.619.
- [20] Chaudhury D, Madanpotra S, Jaiwal R, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated high frequency genetic transformation of an Indian cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cultivar and transmission of transgenes into progeny [J]. Plant Sci, 2007, 172(4): 692-700. doi: 10.1016/j.plantsci.2006.11.009.
- [21] Chandra A, Pental D. Regeneration and genetic transformation of grain legumes: An overview [J]. Curr Sci, 2003, 84(3): 381-387.
- [22] Sharma K K, Anjaiah V V. An efficient method for the production of transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation [J]. Plant Sci, 2000, 159(1): 7-19. doi: 10.1016/S0168-9452(00)00294-6.
- [23] Zheng Y X, Huang B C, Ji J, et al. Establishment of *Agrobacterium* mediated transformation system of *Eustoma grandiflorum* [J]. Acta Agric Nuel Sin, 2009, 23(4): 597-601.
郑阳霞, 黄彬城, 季静, 等. 农杆菌介导的洋桔梗遗传转化体系的建立 [J]. 核农学报, 2009, 23(4): 597-601.