

硫辛酸对农杆菌介导的黄瓜子叶节遗传转化的影响

王 烨,顾兴芳,张圣平,苗 晗

(中国农业科学院 蔬菜花卉研究所 北京 100081)

摘要:转化效率低一直是黄瓜转基因的瓶颈。本研究旨在采用硫辛酸(LA)和乙酰丁香酮(AS)辅助进行农杆菌转化,研究硫辛酸作为一种新的转化诱导剂对黄瓜遗传转化的影响。结果表明,在添加浓度相同的情况下,仅在培养基中添加LA的转化效率比较仅在菌液中加入LA有显著提高,而当菌液和培养基中同时加入LA与AS的转化频率最高,即采用100 mg/L LA和50 mg/L AS处理后,黄瓜子叶节Hyg抗性芽的再生频率由28.3%升高到86.7%,Southern Blot验证抗性植株的阳性率为7.5%。因此,在黄瓜遗传转化过程中使用硫辛酸有利于转化细胞的分化,更有助于提高抗性植株的阳性率。

关键词:硫辛酸;根癌农杆菌;遗传转化;黄瓜;子叶节

中图分类号:S642.03 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)增刊-0051-06

Influence of Lipoic Acid on Transformation of Cucumber Cotyledon *in vitro* by *Agrobacterium tumefaciens*

WANG Ye, GU Xing-fang, ZHANG Sheng-ping, MIAO Han

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: It's difficult to increase the transformation efficiency in cucumber. The effect of LA and AS during transformation of cucumber cotyledon node was investigated. The plant regenerated efficiency of cucumber was significantly increased from 28.3% to 86.7%, the transformation efficiency was 7.5% analyzed by Southern-blot when 100 mg/L LA and 50 mg/L AS added in culture media and *Agrobacterium* liquid. Including lipoic acid in culture media during *Agrobacterium* transformation processes of cucumber can improve the transformation method. LA application in transformation has enabled the resolution of problems in cucumber: difficulty in regenerating transformed tissues and shoot escapes that limit the number of transgenic plants.

Key words: Lipoic acid; *Agrobacterium tumefaciens*; Transformation; Cucumber; Cotyledon node.

在植物遗传转化研究中,常通过使用乙酰丁香酮(AS)来辅助农杆菌转化,因为AS是一种酚类物质,可诱导农杆菌内Ti或Ri质粒DNA上的Vir区基因的活化和表达,促进农杆菌T-DNA向宿主细胞核转移,从而提高转化效率^[1-2]。AS尤其对单子叶植物的遗传转化非常必要,而双子叶植物由于在外植体受伤后会自行合成酚类物质,因此不必外加酚类物质就可以使Vir区基因活化,但试验证明加入适量AS依然可以提高转化率^[3-6]。随着对双子叶植物转基因研究的深入和技术的改进,迫切需要开发辅助转化效果更明显、对外植体伤害更小的试剂。以往的研究曾发现抗氧化剂对促进植物外植体分

化、缓解褐化有较好的作用^[7]。近些年硫辛酸(Lipoic acid,下文简称为LA)作为一种超强型抗氧化剂被运用到植物组织培养研究中,并获得了较好的试验效果^[8-10]。而目前LA也被应用到大豆和番茄的遗传转化研究中,结果显示转化效率分别从0.6%和29.8%显著增加到3.7%和87%,并可显著降低大豆和番茄的假阳性率;小麦的转化率从2.8%提高到5.7%;在棉花上,可以使草甘膦抗性芽率由41.4%增长到61.2%^[11]。而在黄瓜的遗传转化中利用AS辅助转化的研究较多,将100 mg/L AS添加到共培养培养基中,再生频率高达83.3%^[12]。

收稿日期:2012-08-22

基金项目:“农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室”资助

作者简介:王 烨(1978-),女,北京人,硕士研究生,助理研究员,主要从事黄瓜遗传育种研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本试验采用的黄瓜品种是新泰密刺,由中国农业科学院蔬菜花卉研究所黄瓜育种课题组提供。根癌农杆菌菌株为 EHA 105,质粒载体为 pCAGC 1341,含有潮霉素抗性基因和抗线虫基因 *MiMPK1*,由中国农业科学院蔬菜花卉研究所植物病理实验室惠赠。

MS 基本培养基(M5519)购自上海 Sigma 生物技术公司,潮霉素(Hyg)、6-BA、NaCl、酵母粉、蛋白胨购自拜尔迪生物技术公司。所配制的 MS 固体(液体)培养基和 LB 固体(液体)培养基高压灭菌后常温保存备用;6-BA、AgNO₃、头孢霉素(Cef)、卡纳霉素(Km)、利福平(Rif)、乙酰丁香酮(AS)均购自拜尔迪生物技术公司,配制为母液后用一次性过滤器(0.22 μm)过滤除菌,-20℃保存备用。

1.2 转化受体和菌液准备

对饱满的黄瓜种子进行预浸泡 2~3 h,待种皮浸透后将其剥除,而后用 75% 酒精进行表面消毒约 30 s,继用 6.5% 的次氯酸钠消毒 15 min,消毒期间需经常摇动。消毒后用无菌去离子水反复冲洗 5 次,最后将种子接种在 MS 培养基上,置于黑暗中培养。种子萌发后转入光下培养,约 4~5 d 后子叶呈合拢且直立状态的时候切取子叶节,并切除 1/2 子叶,仅留 2~3 mm 的下胚轴,将子叶节培养在 MS 添加有 BA 和 AgNO₃ 预培养基上 25℃ 培养 2 d。

挑取含有目的基因载体的农杆菌单菌落,置于 Rif 50 mg/L 和 Kam 50 mg/L 的 LB 培养基中,28℃ 下 280 r/min 振荡过夜培养。当 OD 达到约 0.6 时,10 000 r/min、4℃ 下离心 10 min 收集农杆菌,用等体积 MS 液体培养基重悬。

1.3 遗传转化和再生植株驯化

将预培养 2 d 的子叶节放入农杆菌悬浮液中侵染 10 min 后取出,用无菌滤纸吸干菌液后置于共培养基培养基上 25℃ 暗培养 2 d 后,将子叶节转入 MS + 0.5 mg/L BA + 1 mg/L AgNO₃ + 7 mg/L Hyg + 300 mg/L cef 进行初步筛选。约 2 周选择筛选后,将 Hyg 提高到 15 mg/L 进行为期 1 周的高浓度筛选。最后将保持绿色的再生芽转入生根培养基,1~2 周后可获得黄瓜再生植株。

发育正常的黄瓜再生植株首先进行瓶中驯化,经 3~5 d 可将培养瓶的封口膜逐步去掉,以降低瓶中的湿度。然后将根系间的培养基清洗干净,移植到花盆中时,需要在植株上扣一个玻璃器皿保湿,不

至湿度降低过快。1 周后可移走覆盖器皿,使黄瓜再生植株在温室条件下生长。

1.4 硫辛酸对子叶节转化效率的影响

为了研究硫辛酸在农杆菌侵染过程中对黄瓜子叶节转化效率的影响,设计在预培养培养基、共培养基培养基和侵染菌液中添加 LA 和 AS 的浓度配比如表 1。每个处理 3 次重复,每个重复 20 个子叶节。

表 1 侵染过程中 LA 和 AS 的浓度配比

Tab. 1 Concentration of LA/AS

处理编号 Treatment No.	预/共培养基 Preconditioning/ Cocultivation		侵染菌液 Infect bacteria liquid	
	LA/(mg/L)	AS/(mg/L)	LA/(mg/L)	AS/(mg/L)
1(CK)	0	0	0	0
2	0	100	0	100
3	50	0	0	0
4	100	0	0	0
5	200	0	0	0
6	0	0	50	0
7	0	0	100	0
8	0	0	200	0
9	50	50	50	50
10	100	50	100	50
11	200	50	200	50
12	50	100	50	100
13	100	100	100	100
14	200	100	200	100

1.5 转化植株检测

PCR 检测:以黄瓜转化植株和对照植株的总 DNA 为模板,根据 *MiMPK1* 基因设计 PCR 扩增引物,其上游序列为 5'-TGGAGAAGGTGCTTATGGAATG-3',下游序列为 5'-CATAATTTTCAGGCGCTCGATAC-3',由上海生工公司合成,预扩增片段大小为 525 bp;反应程序为:94℃ 4 min,94℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 2 min,35 次循环;72℃ 10 min。PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。凝胶成像仪观察扩增出的目的条带,并拍照。

Southern Blot 检测:试验步骤按照 Sambrook 等^[13]的方法。用 *EcoR* I 酶切约 20 μg 的黄瓜基因组 DNA,37℃ 温育过夜,在浓度为 1% 的琼脂糖凝胶中进行电泳分离,用 20 × SSC 过夜转膜,于 120℃ 固定 30 min,而后杂交过夜,利用地高辛试剂盒(Roche 公司)标记含目标基因质粒 DNA 的 PCR 产物作探针过夜杂交,再进行洗膜、显色和定影。

1.6 数据调查与统计分析

再生频率(%) = 分化外植体数/接种外植体总数 × 100%

每外植体抗性芽数(个/外植体) = 抗性芽数/

外植体总数

转化效率(%) = PCR 或 Southern blot 阳性植株数/再生植总数 × 100%

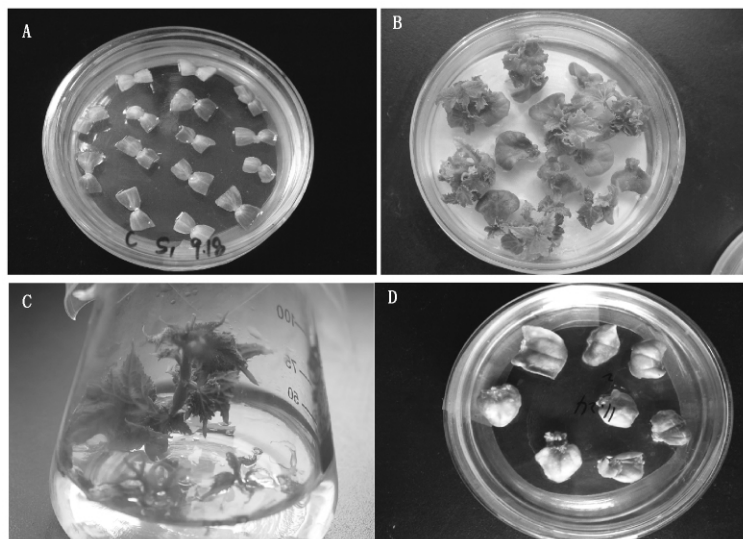
试验数据采用 Duncan 新复级差法进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 黄瓜子叶节抗性芽的再生过程

在见光以前,从幼苗上切取的子叶节的颜色保

持浅绿色,直到转为光下培养才开始变深,且见光后子叶节体积明显增大,叶片增厚。接种约1周后,在切口处开始有微量愈伤组织出现。在10~14 d后,子叶节开始出现新分化出的深绿色芽点。经过2~3周的培养,小芽点进一步发育、变大,这时子叶节外植体为深绿色,切口处的愈伤组织也明显增多变厚。培养3周后可以肉眼观察到分化好的小芽。接种4~5周后再生的小芽伸长生长,未分化出芽点的子叶节外植体开始变黄(图1)。



A. 预培养; B. 选择培养; C. 抗性植株; D. 对照。

A. Pre-culture cultivation; B. Select-culture cultivation; C. Regenerated plants; D. CK.

图1 黄瓜子叶节的遗传转化过程

Fig.1 Cucumber cotyledon nodes regeneration

2.2 不同 LA/AS 处理对黄瓜子叶节再生频率的影响

在培养基和菌液中添加 LA 和 AS 的各处理试验结果见图2。添加浓度相同的情况下,只在培养基中加入 LA 处理的再生频率和抗性芽数均比只在菌液中加入 LA 的各处理高。在菌液中加入 100 mg/L LA 时再生频率为 55.0%,而同浓度的 LA 添加在培养中的处理再生率可提高到 76.7%,达到了极显著的水平,200 mg/L 的 LA 同样可以使再生率得以显著提高。只在培养基中加入 LA 的处理 3~5 中,用 100 mg/L LA 侵染子叶节后获得的 Hyg 抗性芽数和再生频率在 3 个浓度的处理中最高,当采用 50 mg/L 的 LA 时再生频率极显著下降到 50.0%,而当 LA 浓度提高到 200 mg/L 时,抗性芽数和再生频率比 LA 为 50 mg/L 时更低,但未达到显著水平,这种变化趋势同样出现在 LA 只加入菌液的处理 6~8 中。以上分析说明 LA 单独使用时 100 mg/L 是较合适的浓度,且添加到培养基中可更有助于农

杆菌的转化。

所有处理中,以在培养基和菌液中都加入 100 mg/L 的 LA 与 50 mg/L 的 AS 的处理 10 再生频率最高,达到 86.7%,平均每外植体的抗性芽数为 1.12 个,对照只有 0.47 个,极显著高于其他处理。此外,采用 100 mg/L AS 搭配 50,100,200 mg/L LA 的处理 12,13,14 的再生频率比较采用 50 mg/L AS 搭配 50,100,200 mg/L LA 的处理 9,10,11 分别有极显著水平的下降;在培养基和菌液中只使用 100 mg/L AS 的处理 2 的再生频率可达到 70.0%,同样极显著高于 100 mg/L AS 搭配各浓度 LA 的其他处理,也极显著高于 50 mg/L AS 搭配 200 mg/L LA 的处理 11,但与 50 mg/L AS 搭配 50 mg/L LA 的处理 9 之间差异不显著。综上所述,与对照相比单独使用 100 mg/L 的 AS 的再生频率较高,但与 LA 搭配使用的转化效率低于单独使用的效率,需要适当降低 AS 的浓度再搭配 LA 辅助进行农杆菌转化则有助于转化效率的提高。

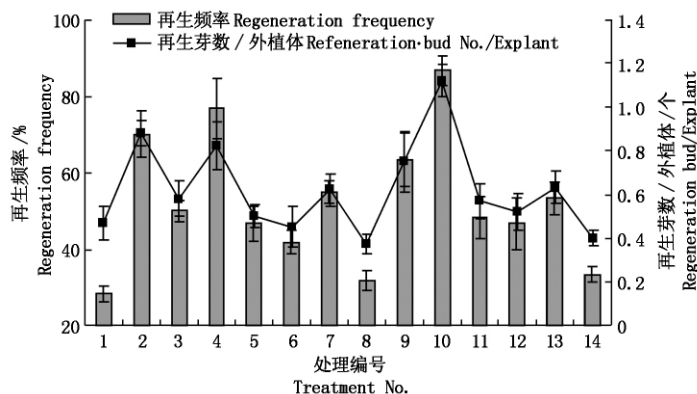
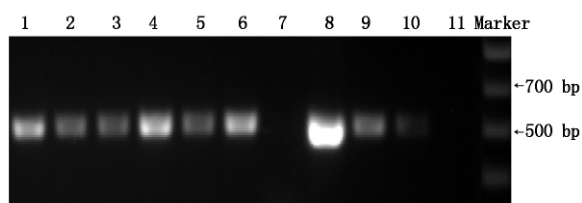


图2 不同 LA/AS 处理对黄瓜子叶节再生频率的影响

Fig.2 Effect of LA/AS on shoot regeneration from cotyledon node of cucumber

2.3 PCR 验证 LA/AS 对黄瓜子叶节转化效率的影响

以黄瓜转化植株的基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增检测,部分抗性植株得到了约 525 bp 的特异性条带(图 3),与阳性对照质粒的扩增结果相同,阴性对照没有特异性扩增条带,具体试验结果见图 4。PCR 检测结果初步表明 *MiMPK1* 基因已经整合到黄瓜基因组中。



1~7. 不同再生子叶节; 8. 质粒; 9,10. 阳性对照; 11. 阴性对照; *MiMPK1* 基因扩增片段长 525 bp。
1~7. Different independently regenerated shoots; 8. Plasmid; 9,10. Positive control plants; 11. Negative control. The amplified DNA fragment of the *MiMPK1* gene is 525 bp.

图3 黄瓜抗性植株的 PCR 检测

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified DNA from leaf tissue of the regenerated shoot

对 Hyg 抗性植株进行 PCR 检测后发现,添加浓度相同的情况下,只在培养基中加入 LA 的处理的转化效率均比只在菌液中加入同浓度 LA 的各处理高。在培养基中加入 100 mg/L LA 的处理 4 与在菌液中加入 100 mg/L LA 的处理 7 相比可显著提高 PCR 阳性率。此外,在培养基中加入 50,100,200 mg/L LA 的 3 个处理之间,只有采用 100 mg/L LA 的转化率显著高于 200 mg/L LA,其他处理间的转化效率差异均不显著。这一情况与只在菌液中添加 LA 的变化趋势相同。

在所有处理中,以培养基和菌液中都添加 50 mg/L AS 和 100 mg/L LA 的处理 10 的转化效率最高,达到 20.9%,与对照相比可以极显著提高转化效率,但与处理 2,4,9 相比差异不显著。采用 50

mg/L AS 搭配 50,100 mg/L LA 的处理 9,10 的转化效率分别比只在培养基中添加 50,100 mg/L LA 的处理 3,4 的转化效率有所提高,但未达显著水平,仅和采用 100 mg/L AS 搭配 50,100 mg/L LA 的处理 12,13 之间存在显著差异,转化效率分别从 12.9% 和 15.8% 提高到 17.8% 和 20.9%。由此可见,在培养基中添加 LA 比添加到菌液中更利于转化效率的提高,LA 浓度采用 100 mg/L 比 50,200 mg/L 能获得更多的 PCR 阳性植株,50 mg/L AS 和 100 mg/L LA 搭配使用可以提高转化效率,但效果不显著(图 4)。

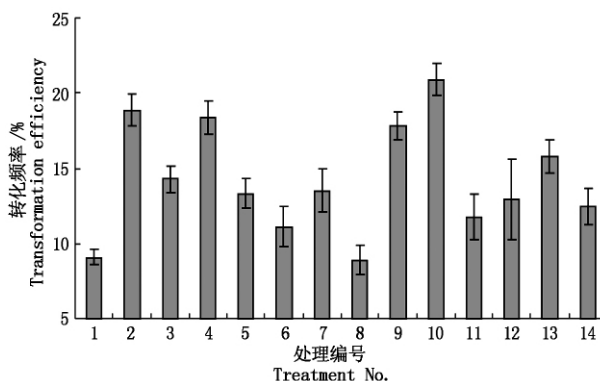
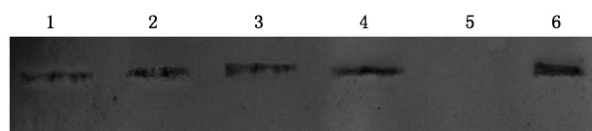


图4 PCR 验证黄瓜子叶节再生植株转化效率

Fig.4 PCR analysis of cucumber regenerated shoot



1~4. 4 株不同的再生子叶节; 5. 阴性对照; 6. 阳性对照。
1~4. Isolated from 4 independent regenerated shoots; 5. Negative control; 6. Positive control.

图5 黄瓜抗性植株的 Southern Blot 检测

Fig.5 Southern-Blot analysis of *MiMPK1* digested DNA isolated from transgenic plants

2.4 Southern-Blot 验证 LA/AS 对黄瓜子叶节转化效率的影响

选取 PCR 阳性的黄瓜转化植株,提取基因组总 DNA,用 Roche 公司的地高辛试剂盒标记探针,进行

Southern Blot 检测,有 25 株出现了杂交信号(图 5)。

通过 Southern-Blot 验证黄瓜子叶节再生植株的阳性率时发现,转化过程中使用 50 mg/L AS 和 100

mg/L LA 后转化频率最高,可以达到 7.5%,其次是 50 mg/L AS 搭配 50 mg/L LA 的转化率为 6.7%,对照的阳性率为 0。

表 2 Southern-Blot 验证黄瓜子叶节再生植株转化频率

Tab. 2 Southern Blot analysis of cucumber regenerated plant

处理编号 Treatment No.	外植体总数/个 Explant No.	再生植株数 Regenerated plants	PCR 阳性植株数 PCR positive plants	阳性植株数 Southern Blot positive plants	转化效率/% Transformation efficiency
1(CK)	60	28	1	0	0
2	60	53	10	3	5.7
3	60	35	5	2	5.7
4	60	49	9	2	4.1
5	60	30	4	1	3.3
6	60	27	3	1	3.7
7	60	37	5	2	5.4
8	60	22	2	1	4.5
9	60	45	8	3	6.7
10	60	67	14	5	7.5
11	60	34	4	1	2.9
12	60	31	4	1	3.2
13	60	38	6	2	5.3
14	60	24	3	1	4.2

3 讨论

植物受到创伤后,组织细胞会释放出创伤信号分子-酚类化合物(如乙酰丁香酮),当农杆菌接受到该信号时,诱导 Ti 质粒上 vir 区基因的表达^[14]。吴迪、周长梅和朱延明^[15]的研究也证明酚类化合物是通过活化启动 vir 区基因的酶类来实现提高转化效率功能的,由于酚类物质可抑制细胞防御机制启动,使浸染变得容易。因此,AS 被广泛应用于目前的植物转基因技术中,但是在黄瓜子叶节转化过程中单独使用 AS 的转化效率并不高。魏爱民等^[16]分别在播种培养基、菌液和共培养基中添加 20 mg/L AS,研究了 AS 对黄瓜愈伤诱导和抗性芽分化的影响,结果表明,播种培养基中加入 AS 对芽诱导的作用较小,在菌液和共培养基中加入乙酰丁香酮,愈伤诱导率均高于 95%,菌液和共培养基中同时使用乙酰丁香酮,抗性芽分化率最高达 11.5%。郑丽娟^[17]用添加 50 $\mu\text{mol/L}$ AS 菌液侵染黄瓜茎节和子叶,再生芽率与对照相比分别提高 4.6% 和 1.6%;在共培养阶段添加 50 $\mu\text{mol/L}$ AS 能够明显促进转化。AS 对提高黄瓜转化效率的作用有限可能是由于双子叶高等植物本身具备合成酚类物质的能力,这些酚类可以起到活化 vir 基因的作用,因而添加外源 AS 的转化效果不显著^[6]。

近些年 LA 作为一种超强型抗氧化剂在生物技

术领域中得到迅速推广,其广泛存在于动、植物体内,它的应用对植物组培和医药技术发展有着重要意义。LA 目前已被应用到大豆和番茄的遗传转化研究中,结果显示转化效率分别从 0.6% 和 29.8% 显著增加到 3.7% 和 87%,并可显著降低大豆和番茄的假阳性率;在棉花上,可以使草甘膦抗性芽率由 41.4% 增长到 61.2%^[11]。但至今没有 LA 在黄瓜遗传转化上应用的报道。通过本试验发现,当 LA 搭配 AS 共同作用于农杆菌转化时,抗性芽率相比对照或者是单独使用 LA、AS 时都有显著提高,且 Southern-blot 检验下的转化效率也有所增长,证明 LA 与 AS 协同作用更有利于黄瓜的遗传转化,其中 LA 可缓解自由基对细胞的伤害、减缓组织的氧化过程,而 AS 促进 Vir 区基因的活化,两者共同作用下使转化率得以提高。

此外,pH 对 Vir 区的活化有着明显的影响,而本试验仅仅针对 LA 和 AS 浓度配比来探讨其对农杆菌介导的黄瓜子叶节的遗传转化的影响,在今后的研究中可以进一步考虑 pH 同 LA、AS 协同作用对黄瓜遗传转化效率的影响。

参考文献:

- [1] 许 耀,贾敬芬,郑国昌. 酚类化合物促进根癌农杆菌对植物离体外植体的高效转化[J]. 科学通报,1988,33(22):1745-1748.
- [2] Godwin I, Todd G, Ford-Lloyd Brian *et al.* The effects of

- Acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species [J]. *Plant Cell reports* ,1991 9(12) : 671 – 675.
- [3] James D ,Uratsu S ,Cheng J *et al.* Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of apple [J]. *Plant Cell Rep* ,1993 ,12: 559 – 563.
- [4] Huang F H ,Li X Y. Effects of concentration of Acetosyringone and *Agrobacterium tumefactions* on *Gus* gene transformation efficiency of *Populus* [J]. *In Vitro* ,1994 ,30: 67.
- [5] 杨秀荣 ,陈永文 ,方 平 ,等. 乙酰丁香酮对根癌农杆菌介导的甘薯遗传转化的影响 [J]. *西南师范大学学报: 自然科学版* ,2002 27(5) : 751 – 754 ,758.
- [6] 陈 峥 ,金 红 ,程 奕 ,等. 提高黄瓜农杆菌遗传转化体系再生效率的研究 [J]. *天津农业科学* ,2001 ,7(4) : 47 – 79.
- [7] Enriquez-Obregon G A ,Vazquez-Padron R I ,Prieto-Samsonov DL ,*et al.* Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds. *Biotechnologia Aplicada* ,1997 ,14: 169 – 174.
- [8] Packer L ,Witt E ,Tritschler H. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant [J]. *Free Rad Biol Med* ,1995 ,19: 227 – 250.
- [9] Packer L ,Tritschler H. Alpha-lipoic acid: The metabolic antioxidant [J]. *Free Radical Biol Med* ,1996 20: 625 – 626.
- [10] Packer L ,Tritschler H. ,Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid [J]. *Free Radical Biol Med* ,1997 22: 359 – 378.
- [11] Yinghui Dan ,Charles L. Armstrong ,Himmy Dong *et al.* Lipoic acid-a unique plant transformation enhancer [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* ,DOI 10. 1007/s11627 – 009 – 9227 – 5.
- [12] 张若纬. 黄瓜离体再生和遗传转化体系的建立 [D]. 北京: 中国农业科学院研究生院 ,2010.
- [13] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual* [M] 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989.
- [14] 郭晓丽. 根癌农杆菌介导植物遗传转化的分子机制 [J]. *衡水学院学报* ,2008 ,10(1) : 52 – 54.
- [15] 吴 迪 ,周长梅 ,朱延明. 酚类物质对葡萄遗传转化效率的影响 [J]. *园艺学报* ,2003 30(1) : 77 – 78.
- [16] 魏爱民 ,张文珠 ,杜胜利 ,等. 影响农杆菌介导的黄瓜抗虫基因遗传转化体系的因素研究 [J]. *天津农业科学* ,12(3) : 1 – 3.
- [17] 郑丽娟. 黄瓜离体培养及根癌农杆菌介导的遗传转化体系的研究 [D]. 扬州: 扬州大学 ,2009.