

应用农杆菌介导的生长点转化方法 建立甜瓜遗传转化技术

郝金凤,荆培培,张 丽,哈斯阿古拉

(内蒙古大学 生命科学学院,内蒙古自治区牧草与特色作物生物技术重点实验室,内蒙古 呼和浩特 010021)

摘要:为探讨甜瓜的遗传转化技术,以甜瓜品种河套蜜瓜腋芽生长点做外植体,利用庆大霉素基因作为筛选基因,对影响农杆菌转化的菌液浓度、转化时间、共培养时间进行了正交试验。通过优化转化条件,建立了农杆菌介导的甜瓜腋芽生长点遗传转化体系。结果表明,采用培养20 d的无菌苗,以腋芽作为外植体,预培养1 d;用 $OD_{600}=0.7$ 的菌液转化10 min后,黑暗中共培养2 d,然后用40 mg/L庆大霉素进行筛选;移栽后在叶片上喷洒20 mg/L庆大霉素筛选转基因植株,效果最好。通过对庆大霉素抗性苗进行PCR检测,初步验证外源基因已经整合进甜瓜基因组,转化率达到76%,幼苗移栽成活率为76.3%。

关键词:甜瓜;植物生长点;遗传转化;农杆菌

中图分类号:S652 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)02-0116-05

Establishment of Transformation Method for Melon Using *Agrobacterium*-mediated Plant Genetic Transformation Via Plant Apical Meristem

HAO Jin-feng, JING Pei-pei, ZHANG Li, HASI Agula

(1. College of Life Sciences of Inner Mongolia University,

Inner Mongolia Key Laboratory Herbage and Endemic Crop Biotechnology, Huhhot 010021, China)

Abstract: A high-frequency transformation system has been established by *Agrobacterium tumefaciens* transformation technology and using meristems of axillary buds as transformation receptor. External factors that affect the efficiency of genetic transformation on the base of gentamicin were studied and optimized, such as the bacterial concentration and the times of transformation and co-cultivation. The major results were as follows: seedling was grown for 20 days, then axillary buds excised and stabbed were infected with *Agrobacterium tumefaciens* which OD_{600} was 0.7 for 10 min. Then after co-cultivation for 2 days, transformed plants were selected by 20 mg/L and 40 mg/L gentamicin on the leaves and rooting respectively. It was originally proved by the PCR that expression cassettes had been transferred into the genome. The positive transformation rate was 76% by the analysis of PCR. And the living rate of the transplanted transgenic plants was 76.3%.

Key words: Melon; Plant apical meristem; Genetic transformation; *Agrobacterium tumefaciens*

20世纪90年代初,转基因技术逐步应用于甜瓜。1990年,Fang等^[1]利用根癌农杆菌侵染甜瓜子叶,成功地将NPTⅡ基因转入了甜瓜(*Cucumis melo* L.)。随后利用农杆菌介导法转化甜瓜的研究越来越多^[2-5],内蒙古自治区牧草与特色作物生物技术重点实验室分别用农杆菌介导法^[6-7]和花粉管通道法^[8]

转化了甜瓜品种河套蜜瓜。但这些甜瓜的转化方法都有其不足之处,花粉管通道法受时间和环境条件的限制,农杆菌介导法转化甜瓜子叶外植体获得的转基因植株移栽成活率低,而且组培过程中需要脱分化和再分化的繁琐步骤。1988年,McCab等^[9]用基因枪法首次转化大豆茎尖分生组织获得了成功,这为利用

收稿日期:2013-10-11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31101559;31360486);教育部“春晖计划”科研合作项目(Z2005-2-01003)

作者简介:郝金凤(1977-),女,内蒙古呼和浩特人,博士,主要从事植物分子生物学及基因工程研究。

通讯作者:哈斯阿古拉(1961-),男,内蒙古通辽科左后旗人,教授,博士,主要从事植物分子生物学及基因工程研究。

新的外植体进行甜瓜的遗传转化指引了方向。

本研究以甜瓜腋芽生长点作为外植体,优化了农杆菌转化甜瓜生长点的体系,经抗生素筛选和分子检测获得了阳性植株。

1 材料和方法

1.1 植物材料

植物材料为甜瓜品种河套蜜瓜原种,由本实验室保存。

1.2 菌种和试剂

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) AGL1 菌株、植物双元表达载体 pPZP221 (35S-GUS-nos) 由本实验室保存。Taq DNA 聚合酶、dNTP、10 \times PCR Buffer、RNaseA、提取质粒试剂盒均购自大连宝生物工程公司。

1.3 甜瓜生长点的农杆菌转化

1.3.1 培养基及培养条件 农杆菌的培养采用 YEB 培养基,pH 值 7.4。固体培养时加 15 g/L 的琼脂粉。培养条件为 28 $^{\circ}\text{C}$ 。甜瓜转化培养基见表 1。

表 1 植物培养基
Tab.1 Plant medium

| 培养基类型 Type of medium | 培养基成分 Component of medium |
|-------------------------|--|
| 共培养培养基(G) | MS + IAA 0.1 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L + 蔗糖 3% + 琼脂 0.5% |
| 诱导培养基(YY) | MS + IAA 0.1 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L + 蔗糖 3% + 琼脂 0.5% + Gen 40 mg/L + Cef 200 mg/L |
| 生根培养基(R) | MS + NAA 0.1 mg/L + 蔗糖 1.5% + 琼脂 0.5% + Gen 40 mg/L |

1.3.2 无菌苗培养及外植体的制备:取饱满甜瓜种子,去壳,用 0.1% 氯化汞消毒 10 min,无菌水冲洗 3 次,然后接种于 1/2 MS 固体培养基。24 ~ 26 $^{\circ}\text{C}$ 、光照强度 2 500 lx 和 16 h/d 光照条件下培养成苗。切除培养 20 d 的无菌苗叶片,将茎剪成带叶柄和一个腋芽的茎段,然后接种于 MS 培养基,预培养 1 d。每组试验 50 个外植体。

1.3.3 转化方法 农杆菌菌液的制备:将含有表达载体 pPZP221 (35S-GUS-nos) 的农杆菌接种于含有 100 mg/L Rif,100 mg/L Spe 5 mL 液体 YEB 培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$,170 r/min 振荡培养 36 ~ 48 h,至对数生长期时于 50 mL YEB 液体选择培养基中进行扩大培养,28 $^{\circ}\text{C}$,160 r/min 培养约 48 h。于 4 $^{\circ}\text{C}$,5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,然后加入 25 mL 10 mmol/L 的 MgSO_4 ,悬浮菌体,4 $^{\circ}\text{C}$,5 000 r/min 离心收集菌体,最后用 MS 液体培养基悬浮菌体,测其 OD₆₀₀ 值备用。

转化过程:用灭菌细针刺伤预培养 1 d 的外植体腋芽萌发处,伤口处滴加 10 μL 农杆菌转化菌液,让其充分接触,然后处理掉多余菌液,在共培养培养基(G)上于 24 ~ 26 $^{\circ}\text{C}$ 进行暗培养。共培养结束后,外植体用 MS 液体培养基 + Cef (200 mg/L) 浸泡 10 min,脱菌 3 次,然后用 MS 液体培养基冲洗 3 次。用无菌滤纸吸干外植体表面的液体,转入到诱导培养基(YY)上,24 ~ 26 $^{\circ}\text{C}$ 、光照强度 1 000 ~ 2 000 lx 和 16 h/d 光照条件下进行茎的诱导。待嫩茎长到 4 ~ 5 cm 高时,在生根培养基(R)上诱导生根。将长出多条健壮根的小植株在室内炼苗 2 ~ 3 d,然后移至混有营养土和蛭石(1:1)的花盆中。

1.3.4 甜瓜生长点基因转化影响因子的优化 菌液

浓度(OD₆₀₀ 值为 0.2,0.4,0.5,0.7)、转化时间(5,8,10,15 min)共培养时间(1,2,3,4 d)。每个处理分别侵染外植体 50 个,3 次重复。利用 SPSS 软件分析统计再生抗性植株数据,确定最佳的转化条件。1.3.5 转化植株的 PCR 检测 采用 SDS 法^[10] 提取再生植株的基因组 DNA。利用引物设计软件 PrimerPremier 5.0,以载体上的 35S 启动子和 nos 终止子序列设计转基因植株的检测引物,分别为 35SP1、35SP2 和 nosP1、nosP2,目的片段大小分别为 437,212 bp。为了排除转基因植株检测中出现假阳性的可能,根据农杆菌 AGL1 中的 Ti 质粒的 *VirA* 基因序列设计引物 *VirAP1*、*VirAP2*,用于残留农杆菌的检测,目的片段大小为 346 bp。以未转化的甜瓜叶片基因组为阴性对照。引物序列分别为:35SP1:5'-AGGGTCTTGCGAAGGATAG-3',35SP2:5'-GGCGAACAGTTCATACAGAG-3';nosP1:5'-GCCATAATTTATCCTAGT-3',nosP2:5'-TTTGGCAATAAAGTTTCT-3';*VirAP1*:5'-TTTCTTGGGTCCGCTTCAGTG-3',*VirAP2*:5'-ATACCGTCGCCCGTTTCGTT-3'。

以上述提取的 300 ng 总 DNA 为模板,分别用 35SP1、35SP2 和 nosP1、nosP2 这 2 对引物进行检测。为了排除叶片上残留的农杆菌造成的假阳性,再用 *VirAP1* 和 *VirAP2* 引物进行检测。PCR 反应体系为 25 μL ,含 10 \times PCR Buffer 2.5 μL ,5 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 2.5 μL ,2.5 mmol/L 的 dNTP 各 1 μL ,5 U/ μL 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μL 。反应条件分别为:35SP1 P2,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s,53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,30 个循环;nos P1 P2,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,43 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,30 个循环;*VirAP1* P2,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,57 $^{\circ}\text{C}$

退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,30 个循环。

计算转化率,转化率(%) = PCR 检测的阳性再生植株数/处理的外植体总数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 农杆菌介导的甜瓜生长点转化体系的优化

表 2 农杆菌菌液浓度对甜瓜生长点转化的影响

Tab.2 Effect of different concentration values on induction of multiple shoot in melon

| 菌液浓度/OD ₆₀₀ Bacterial concentration | 平均值/% Mean | 标准差 Std. error | 95% 置信区间 95% Confidence interval | |
|---|---------------|-------------------|-------------------------------------|--------------------|
| | | | 下边界 Lower bound | 上边界 Upper bound |
| | | | | |
| 0.2 | 44.925 | 3.138 | 37.246 | 52.604 |
| 0.4 | 57.500 | 3.138 | 50.671 | 66.029 |
| 0.5 | 45.000 | 3.138 | 37.321 | 52.679 |
| 0.7 | 60.850 | 3.138 | 53.171 | 68.529 |

2.1.2 侵染时间对甜瓜生长点转化的影响 侵染时间短使附着在外植体受伤细胞处的农杆菌少,转化频率会降低;侵染时间过长会导致外植体褐死,丧失再生能力。本研究共设计 4 个转化时间:5,8,10,15 min,用 SPSS 软件分析转化时间对甜瓜生长点转化的影响。结果显示,转化 10 min 后转化效率较高(表 3)。

表 3 侵染时间对甜瓜生长点转化的影响

Tab.3 Effect of infection time on induction of multiple shoot in melon

| 侵染时间/min Infection time | 平均值/% Mean | 标准差 Std. error | 95% 置信区间 95% Confidence interval | |
|----------------------------|---------------|-------------------|-------------------------------------|--------------------|
| | | | 下边界 Lower bound | 上边界 Upper bound |
| | | | | |
| 5 | 47.525 | 3.138 | 39.846 | 55.204 |
| 8 | 45.850 | 3.138 | 38.096 | 53.454 |
| 10 | 65.000 | 3.138 | 58.171 | 73.529 |
| 15 | 49.975 | 3.138 | 42.296 | 57.654 |

2.1.3 共培养时间对甜瓜生长点转化的影响 共培养过程中根癌农杆菌的增殖和生长状态与其侵染能力相关,直接影响转化的效率。本研究共设计 4 个共培养时间:1,2,3,4 d,用 SPSS 软件分析共培养时间对甜瓜生长点转化的影响。结果显示黑暗中共培养 2 d 转化效率较高(表 4)。

表 4 共培养时间对甜瓜生长点转化的影响

Tab.4 Effect of co-culture time on induction of multiple shoot in melon

| 共培养时间/d Co-culture time | 平均值/% Mean | 标准差 Std. error | 95% 置信区间 95% Confidence interval | |
|----------------------------|---------------|-------------------|-------------------------------------|--------------------|
| | | | 下边界 Lower bound | 上边界 Upper bound |
| | | | | |
| 1 | 35.000 | 3.138 | 27.321 | 42.679 |
| 2 | 63.350 | 3.138 | 55.671 | 71.029 |
| 3 | 56.675 | 3.138 | 49.771 | 65.129 |
| 4 | 53.325 | 3.138 | 45.646 | 61.004 |

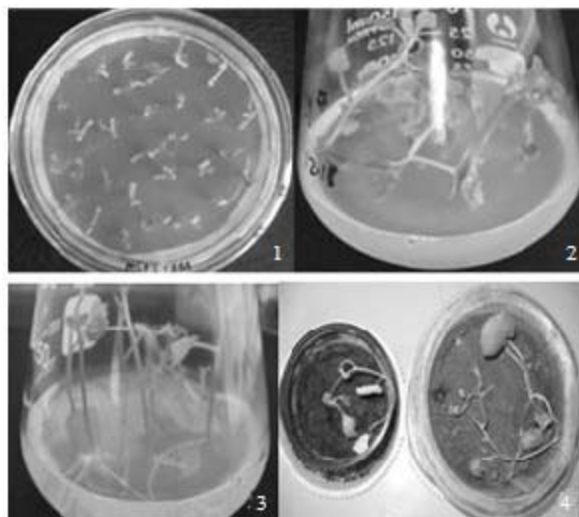
通过对以上结果的分析,得到了农杆菌转化甜瓜生长点的最优体系:菌液浓度为 OD₆₀₀ = 0.7,转化时间为 10 min,黑暗条件下中共培养 2 d。诱导培养基和生根培养基中分别含有 40 mg/L 庆大霉素,当转基因植株移至花盆时,在叶片上喷洒 20 mg/L 庆大霉素进行筛选。

对转化的影响因素统计结果进行了方差分析,结果显示,农杆菌菌液浓度、转化时间和共培养时间这 3 个因素对试验结果的影响非常显著 ($P < 0.05$),各因素的主次顺序为共培养时间 > 转化时间 > 农杆菌菌液浓度。这一结果表明,在农杆菌 AGL1 转化甜瓜腋芽生长点的转化体系中,共培养

时间的长短对转化效率影响最大,其次是转化时间的长短,再其次是农杆菌菌液浓度。

2.2 甜瓜抗性再生植株的获得

将长至4~5 cm高的嫩茎在生根培养基R上诱导20 d后,95%以上的嫩茎长出较健壮的根,40 d后根系较发达,形成发育完整的抗性再生植株(图1)。移栽入花盆后60%以上成活。



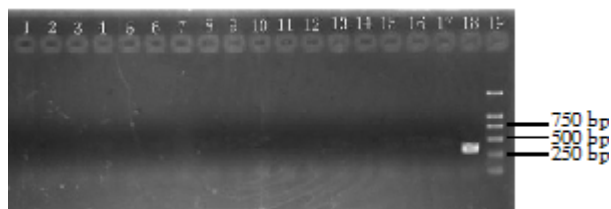
1. 腋芽萌发;2. 4~5 cm的腋芽茎段;
3. 再生茎段生根;4. 移栽到花盆中成活的再生植株。
1. The germination of axillary buds;2. The stems of 4~5 cm;
3. Rooting of regenerated stems;4. Regenerated plants in pots.

图1 抗性再生植株

Fig.1 Resistant regenerated plants

2.3 转化植株叶片上残留农杆菌 AGL1 的检测

为了验证转化植株中的外源基因来自于宿主基因组DNA,而非转化菌 AGL1 菌体的残留,本研究对转化植株进行了农杆菌 *VirA* 基因的PCR检测。结果没有得到扩增条带,证明转化植株中没有根癌农杆菌的污染,因此,在转化植株中检测外源基因时排除了假阳性的可能(图2)。



1~16. 待检测样品;17. 阴性对照;
18. 阳性对照;19. DL2000 分子量标记。
1~16. DNA samples of regenerated plants;
17. Negative control;18. Positive control;19. DL2000 DNA Marker.

图2 *VirA* 引物对再生植株的PCR检测

Fig.2 PCR analysis of regenerated plants with *VirA* primers

2.4 转化植株的PCR检测

以转基因甜瓜总DNA为模板,分别用35SP1P2和nos P1P2为引物进行PCR检测,得到了与阳性对照相一致的特异性扩增条带(图3,4),而阴性对照

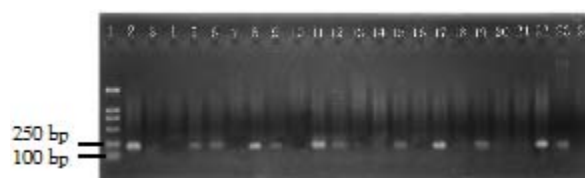
没有。说明外源基因已插入到转基因甜瓜基因组中。正交试验的阳性率最高可以达到73.3%。利用优化体系转化腋芽生长点的阳性率达76%。



1. DL2000 分子量标记;2. 阳性对照;
3. 阴性对照;4~24. 待检测样品。
1. DL2000 DNA Marker;2. Plasmid pPZP221 (35S-GUS-nos) as positive control;3. Non-transgenic plant as negative control;
4~24. DNA samples of resistant regenerated plants.

图3 35S引物对抗性植株的PCR检测

Fig.3 PCR analysis of resistant regenerated plants with 35S primers



1. DL2000 分子量标记;2. 阳性对照;
3. 阴性对照;4~24. 待检测样品。
1. DL2000 DNA Marker;2. Plasmid pPZP221 (35S-GUS-nos) as positive control;
3. Non-transgenic regenerated plant as negative control;
4~24. DNA samples of resistant regenerated plants.

图4 nos引物对抗性植株的PCR检测

Fig.4 PCR analysis of resistant regenerated plants with nos primers

利用优化的甜瓜腋芽生长点转化体系转化的50个腋芽外植体中,经PCR检测获得了38株阳性再生植株,转化率为76%。移栽成活的再生植株有29株,成活率为76.3%。

3 讨论

本研究中选择了甜瓜腋芽茎段做外植体。由于扦插使甜瓜茎段与母体发生分离,从而引起其内部激素的重新分配或重新合成,激活了处于休眠状态的腋芽分生组织,最终启动腋芽的生长进而发育成主干。

植物茎尖是细胞分裂的旺盛部位,也是农杆菌的敏感部位,因此,选择茎尖分生组织作为外植体进行遗传转化很容易获得转基因植株。1988年,McCab等^[9]用基因枪法首次转化大豆茎尖分生组织,获得了再生植株,并在转基因植株中检测到了外源基因的存在。自此以植物生长点作为遗传转化受体的研究逐渐增多,并取得了重要进展。随后王宏芝等^[11]比较了基因枪法与农杆菌介导法转化小麦不同时期的生长点,结果发现,农杆菌与小麦生长点共

培养的转化效率较高,而且植物生长点的发育状态良好。

本研究利用甜瓜腋芽生长点作为外植体,用灭菌针刺伤生长点萌发处创造伤口,进行了农杆菌转化体系的优化。经过抗生素筛选和分子检测证实其具有较高的转化率,缩短了甜瓜的再生周期,提高了幼苗移栽的成活率,为甜瓜的遗传转化提供了一条可行的途径。

参考文献:

- [1] Fang G W, Grumet R. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants[J]. Plant Cell Rep, 1990 (9): 160 – 164.
- [2] Yoshioka K, Hanada K, Nakazaki Y, *et al.* Successful transfer of the cucumber mosaic virus coat protein gene to *Cucumis melon* L. [J]. Japanese Journal of Breeding, 1992, 42(2): 277 – 285.
- [3] Ayub R, Guis M, Ben Amor M, *et al.* Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits[J]. Nat Biotech, 1996, 14: 862 – 866.
- [4] Bordas M, Montesinos C, Dabauza M, *et al.* Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL1 to *Cucumis melo* L. cultivars and in vitro evaluation of salt tolerance[J]. Transgenic Res, 1997, 6(1): 41 – 51.
- [5] 樊继德, 孔庆国, 张 梅, 等. 子房注射法获得转基因甜瓜植株[J]. 园艺学进展, 2006 (7): 510 – 513.
- [6] 哈斯阿古拉, 方天棋, 张竞秋, 等. 用反义 Acc 合成酶基因转化河套蜜瓜的研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 1999, 21(增刊): 200 – 201.
- [7] 郝金凤, 财音青格乐, 方天棋, 等. 农杆菌介导的 ACC 氧化酶反义基因转化甜瓜品种河套蜜瓜的研究[J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 2006, 37(1): 54 – 57.
- [8] 哈斯阿古拉, 牛一丁, 张 丽, 等. 花粉管通道法转基因技术在甜瓜品种河套蜜瓜上的应用[J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 2007, 35(4): 419 – 423.
- [9] McCab D E, Swain W, Martinell B J. Stable transformation of soybean by particle acceleration [J]. Bio Technol, 1988, 6: 923 – 926.
- [10] 周翼明, 卫志明, 许智宏, 等. 根瘤农杆菌介导转化葛菜获得转基因植株[J]. 植物生理学报, 1997, 23(1): 21 – 28.
- [11] 王宏芝, 魏建华, 李瑞芬, 等. 农杆菌介导的小麦生殖器官的整体转化[J]. 中国农业科技导报, 2004, 6(3): 22 – 26.