

根癌农杆菌介导苜蓿体胚转化及转基因植株再生^{*}

黎茵, 黄学林, 肖洁凝, 黄霞, 李筱菊

(中山大学生命科学学院 // 教育部基因工程重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 用含质粒载体 pCambia2301 (带有受 *CaMV35S* 启动子调控的 *GUS* 基因和 *npt II* 基因) 的根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 转化晋南苜蓿 *Medicago sativa* L. cv. Jinnan 的体胚组织, 发现负压处理有利于提高转化频率 (可达 35%), 3 批共 158 个体胚切块的转化实验共获得具有卡那霉素抗性的再生植株 15 株, 经组织化学染色和分子检测, 证实 *GUS* 基因已整合到转化植株基因组中, 在芽、叶片、叶柄和根等组织中均有表达, 并在土壤栽培过程中保持稳定的表达。

关键词: 苜蓿 *Medicago sativa* L.; 转化; 农杆菌; 体胚

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 04-0079-04

苜蓿是一种世界范围内广为种植的重要饲料作物, 在实验室中又是研究植物发育的模式植物。对其进行遗传转化, 不论在理论上还是在应用上均具价值。国外已多次报告外源基因导入苜蓿中, 并且在最近成功地利用转基因苜蓿表达了口蹄疫疫苗基因^[1]。国内仅见吕德扬等将高含硫氨基酸蛋白基因转入紫花苜蓿 5 个品种的报告^[2,3], 转化成功与否与苜蓿基因型有关^[4]。过去取得转化成功的多限于再生能力较强的数个品种, 在栽培品种中取得转化成功并且土壤移栽成活的很少。晋南苜蓿是我国栽培的牧草品种, 该品种尚未有外源基因转化获得转基因植株的报告。我们在建立了晋南苜蓿体胚发生及其调控实验体系^[5-7], 和以苜蓿体胚组织为受体的转化体系^[8]等基础上, 通过转化和筛选得到转基因再生植株, 为苜蓿遗传转化的理论和应用研究提供了有效的方法。

1 材料与方法

1.1 植物材料

晋南苜蓿 *Medicago sativa* L. cv. Jinnan 为多年生品种, 种子由山西省畜牧兽医研究所提供, 种植于本校生命科学学院网室。参照黄学林等^[6,7]的方法诱导苜蓿体胚作为转化受体。

1.2 农杆菌和质粒

农杆菌菌株为 LBA4404, 质粒为 pCambia 2301 (带有以 *CaMV35S* 为启动子的 *GUS* 基因和 *npt II* 基因)。

1.3 转化方法

参照黎茵等^[8]的方法, 在新鲜平板上挑取单菌落接入 5 mL 含 100 mg/L 链霉素和 100 mg/L 卡那霉素的 YEB 液体培养基, 28 °C 振荡培养过夜, 菌液稀释 4 倍后相同条件培养 2~3 h 备用。4 000 r/min 离心 10 min 沉降菌体, 用 SH 液体培养基清洗 2 次并稀释至 A_{600} 值 0.8 左右。苜蓿体胚切成 2~3 mm³ 小块浸入菌液中负压处理, 消毒滤纸吸去多余菌液, 置愈伤组织诱导培养基上共培养, 在光暗周期 16/8 h, 25 °C 下共培养 4 d。

1.4 抗性植株再生

经共培养的体胚组织块置含 500 mg/L 头孢霉素 B5h 固体培养基 (附加 2, 4-D 1 mg/L, KT 0.2 mg/L) 上诱导胚性愈伤组织, 10 d 后将头孢霉素含量降至 250 mg/L, 30 d 更换 1 次培养基, 60 d 后愈伤组织有体胚形成即转入体胚成熟培养基 (SH 基本盐附加 L-Proline 3.45 g/L, (NH₃)₂SO₄ 1.65 g/L), 发育成熟后转入含 125 mg/L 头孢霉素和 50 mg/L 卡那霉素的 1/2SH 固体培养基筛选成苗, 待抗性小苗根系形成, 避开高温干燥天气经炼苗即可移入花盆种植于网室。

1.5 *GUS* 基因组织化学检测

GUS 基因表达的组织化学染色参照 Jefferson^[9]的方法, 待检测组织置 X-Gluc 染液中 37 °C 染色过夜, $\varphi=70\%$ 乙醇脱色。

1.6 转基因植物的分子检测

1.6.1 植物总 DNA 的提取 分别称取 2 g 左右转

* 收稿日期: 2003-09-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39840014)

作者简介: 黎茵 (1969 年生), 女, 博士, 讲师; 通讯联系人: 黄学林; E-mail: ls17@zsu.edu.cn

基因植株和对照植株的叶片于瓷研钵中,液氮充分研磨,CTAB 法提取 DNA,酚-氯仿抽提,乙醇沉淀等步骤按王关林等^[10]的方法进行。

1.6.2 PCR 检测 参照刘巧泉^[11]的方法, *GUS* 基因的特异性扩增引物为:

Primer 1: 5' -GGGATCCATCGCAGCGTAATG-3';
Primer 2: 5' -GCCGACAGCAGCAGTTTCATC-3',
扩增片段为 563 bp。采用上海博彩生物工程有限公司的 Pfu 聚合酶系统,反应体积 20 μ L,模版 DNA 用量为 0.05 μ g。94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 共进行 32 次循环。

琼脂糖凝胶上电泳。DNA 转移到尼龙膜 (positively charged, Roch 公司) 上,分子杂交按常规方法进行,质粒 pCAMBIA2301 经 PCR 扩增片段,电泳后从胶中回收 563 bp 片段作为探针。使用 Roch 公司地高辛 DNA 标记及杂交试剂盒。

2 结果与讨论

2.1 卡那霉素对体胚发生的影响

对体胚组织切块进行卡那霉素敏感性 (筛选质量浓度) 试验,发现在含卡那霉素 10~30 mg/L 的愈伤组织诱导培养基上有愈伤组织形成,但愈伤组织生长缓慢并呈水样化。卡那霉素质量浓度达到 50mg/L 时愈伤组织基本上停止生长,经各浓度卡那霉素处理的愈伤组织均无体胚形成。为保证筛选获得转化体,本实验选择附加卡那霉素 50 mg/L 作为筛选质量浓度。

2.2 头孢霉素对体胚发生的影响

头孢霉素 (Cef) 是根癌农杆菌或发根农杆菌进行植物细胞遗传转化后的常用抑菌抗生素^[12],本实验中头孢霉素的质量浓度必须达到 500 mg/L 时才能完全抑制农杆菌的生长。经试验,体胚组织在含头孢霉素 500 mg/L 的愈伤组织诱导培养基上愈伤组织发生不受影响,而且头孢霉素对愈伤组织的生长略有促进作用,并不影响体胚的发生。因此,转化过程中采用头孢霉素 500 mg/L 抑菌,在体胚发生以后,由于组织中的农杆菌已基本清除,可将头孢霉素质量浓度降至 250 mg/L,成苗时降至 125 mg/L。

2.3 负压处理对转化频率的影响

过去的研究已发现,适当的负压处理可提高根癌农杆菌对外植体的转化频率^[8,13],本实验中体胚组织在菌液中负压处理后共培养 4 d,瞬时表达率在负压处理 10 min (35%) 比处理 5 min (10.8%) 的提高 3 倍以上。根癌农杆菌对植物的侵染过程是受到植物伤口分泌的酚类化合物诱导,菌体先吸附

于组织表面,然后将 Ti 质粒上的 T-DNA 转移并整合进植物基因组中^[14]。本实验体系采用负压处理能造成对外植体一定程度的伤害,引起农杆菌吸附,同时菌液渗入组织内部。但负压处理时间不宜过长,以免对外植体的伤害过大影响生长。

2.4 外源基因的导入及转基因植株再生

体胚组织经负压处理 10 min 后共培养 4 d,将外植体材料置于附加头孢霉素 500 mg/L 的愈伤组织诱导培养基上诱导愈伤,60 d 后转入含头孢霉素 250 mg/L 的体胚成熟培养基中,10~30 d 后有体胚形成 (图 1a),将成熟的体胚转入含头孢霉素 125 mg/L,卡那霉素 50 mg/L 的 1/2SH 培养基萌发,30 d 后即筛选得到抗性小植株 (图 1b),无抗性的体胚停止生长或生长至一定程度后白化枯萎,不能形成根系 (图 1c)。取抗性体胚和抗性小植株组织进行组织化学检测,组织变为蓝色 (图 1d),其中体胚子叶、根尖、成熟叶片和维管组织中的表达由为强烈。对晋南苜蓿体胚组织切块先后进行了 3 批共 158 个外植体的转化实验,最后获得卡那霉素抗性植株 15 株。其中 5 株盆栽移植成功,其余 10 株仍在无菌条件下繁殖。

2.5 抗性植株的 PCR 和 PCR-Southern blot

选取经 LBA 4404/pCAMBIA2301 转化后再生的卡那霉素抗性植株及未经转化的对照植株,随机采叶片提取总 DNA 进行 PCR 检测。结果表明,抗性植株 DNA 可扩增出与质粒扩增得到的 *GUS* 基因 563 bp 片段相应的 DNA 片段。抗性植株 DNA 的 PCR-Southern blot 结果证明 PCR 扩增产物确为 *GUS* 基因片段 (部分结果见图 2)。

2.6 转基因植株 *GUS* 基因表达的稳定性

从经检测已导入 *GUS* 基因的植株上取叶柄为外植体进行体细胞胚的再次诱导,获得同样具有卡那霉素抗性的体胚,将其进行组织化学染色检测,发现体胚组织均不同程度被染成蓝色 (图 1f)。转化植株移入花盆在网室种植 3 个月后,采摘生长旺盛的叶片和叶柄进行组织化学染色检测,仍然可见蓝色表达现象 (图 1g),说明 *GUS* 基因转入晋南苜蓿后能维持持续的表达,证明本实验所建立的转化系统是稳定有效的。

参考文献:

[1] DUS SANTOS M J, WIGDOVOVITZ A, TRONO K, et al. A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants [J]. Vaccine, 2002, 20: 1141-1147.
[2] 吕德扬, 范云六, 余梅敏, 等. 苜蓿高含硫氨基酸蛋白转基因植株再生 [J]. 遗传学报, 2000, 27(4): 331-337.

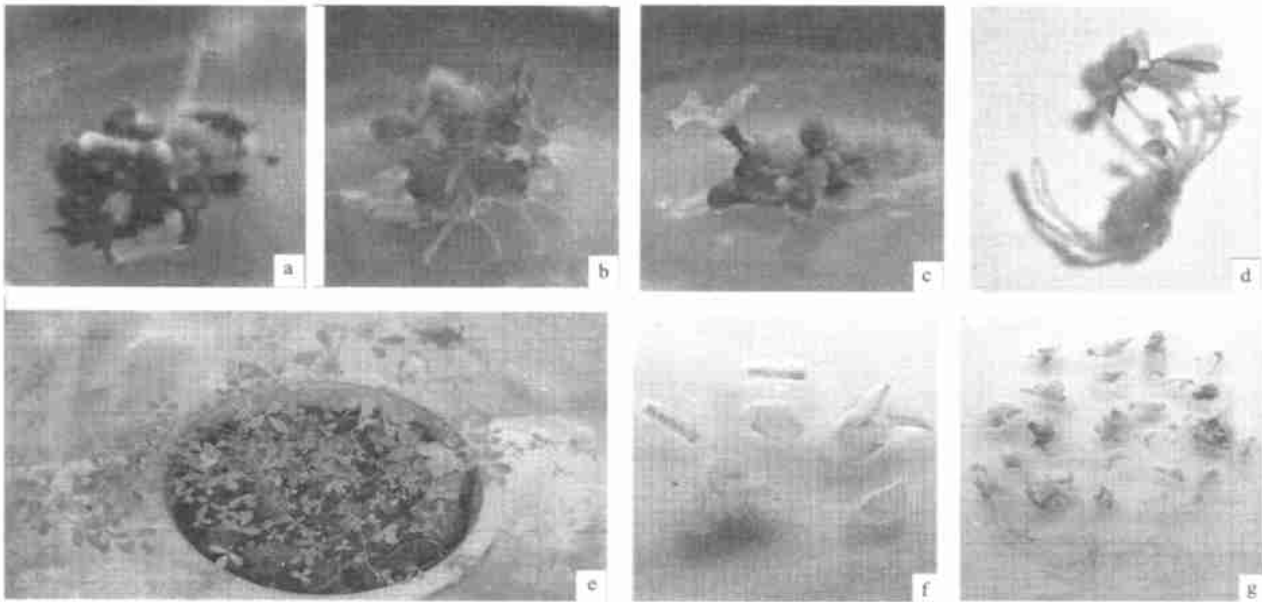


图 1 苜蓿转化体的筛选与 GUS 检测

Fig 2 Selection of alfalfa transformant and detection of GUS expression

a: 转化体胚组织形成的愈伤组织在筛选培养基上形成的体胚; b: 体胚萌发的 Kan 抗性小植株; c: 无卡那霉素抗性的体胚在筛选培养基上白化枯死; d: Kan 抗性小植株经 GUS 染色后呈蓝色; e: 移栽成活的苜蓿转化植株; f: 盆栽 3 个月后转化植株的叶片、叶柄经 GUS 染色后呈蓝色; g: 由转化植株叶柄经 GUS 染色后呈蓝色

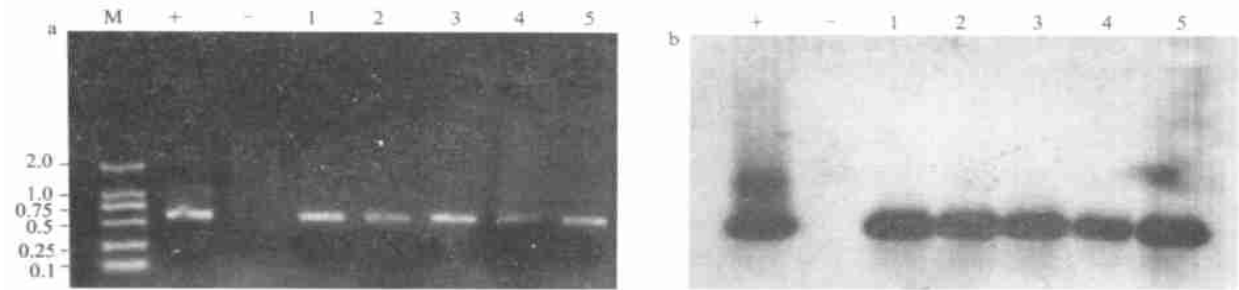


图 2 转基因植株的 PCR 和 PCR-Southern blot 分析

Fig 3 PCR and PCR-Southern blot analysis of transgenic plants

a: 转基因植株的 PCR 分析; b: 转基因植株的 PCR-Southern blot 分析

[3] 吕德扬, 曹学远, 唐顺学, 等. 紫花苜蓿外源基因共转化植株的再生 [J]. 中国科学 (C 辑), 2000, 30 (4): 342—348.

[4] TIAN L, BROWN D C, WEBB J. Transient expression of a reporter gene changes significantly during somatic embryogenesis in alfalfa [J]. Can J Plant Sci, 2000, 80: 765—771.

[5] 黄学林, 李筱菊, 傅家瑞, 等. Thidiazuron 对苜蓿愈伤组织的乙烯生成及其体细胞胚胎发生的影响 [J]. 植物生理学报, 1994, 20: 367—372.

[6] 黄学林, 徐九龙, 高东微, 等. The effect of MGBG on growth of the callus tissue, induction of somatic embryogenesis of alfalfa and their ethylene biosynthesis [J]. 植物学报, 1998, 40 (7): 635—641.

[7] 黄学林, 李筱菊, 黎茵, 等. The effect of AOA on ethylene and polyamine metabolism during early phases of somatic embryogenesis in *Medicago sativa* L. [J]. Physiol Plant, 2001, 113: 424—429.

[8] 黎茵, 黄霞, 黄学林. 根癌农杆菌介导的苜蓿体胚转化 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29 (2): 109—113.

[9] JEFFERSON R A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1987, 5 (4): 387—405.

[10] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.

[11] 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 等. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立 [J]. 植物生理学报, 1998, 24 (3): 259—271.

[12] 徐淑平, 卫志明, 黄健秋. 青菜的高效再生和农杆菌介导 *B. t.* 及 *CpTI* 基因的转化 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28 (4): 253—260.

[13] 黄霞, 黄学林, 李哲, 等. 影响根癌农杆菌介导的香蕉基因转化早期的主要因素 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2002, 41 (5): 68—72.

(下转第 85 页)

- 其对昆虫的生物活性[J]. 应用生态学报, 2003, 14 (1): 93—96.
- [7] 崔德君, 赵善欢, 刘树青. 万寿菊初提物对小菜蛾产卵忌避作用的研究[J]. 农药, 2000, 37(6): 31—35.
- [8] 黄彰欣. 植物化学保护实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1993: 36—37.
- [9] 张兴, 赵善欢. 楝科植物对几种害虫的拒食和忌避作用[J]. 华南农业大学学报, 1983, 4(3): 1—7.
- [10] 廖春燕, 赵善欢. 川楝素对粘虫幼虫拒食作用研究[J]. 华南农业大学学报, 1986, 7(1): 1—5.
- [11] 张业光, 徐汉虹, 黄继光, 等. 非洲山毛豆对几种鳞翅目害虫的拒食作用[J]. 华南农业大学学报, 2000, 21(4): 26—29.

Preliminary Studies on the Bioactivity of Crude Extract from *Mikania micrantha* on Insect and Plant Pathogen

FENG Hui ling¹, YANG Chang ju², ZHANG Xing³, YE Wan hui¹

(1. South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China;

3. Northwest Science & Technology University of Agriculture & Forestry, 712100, China)

Abstract: Preliminary studies on the bioactivity of crude extracts from *Mikania micrantha* H. B. K. on larva of *Pieris rapae* & *Plutella xylostella* were conducted. The results showed that the inhibitory and antifeedant activity of crude extract from *M. micrantha* against larvae of *Pieris rapae* and *Plutella xylostella* are remarkably effective. The toxicity of 500 mg °L⁻¹ ethanol extract against 1~2 instar larva of *Pieris rapae* were 80%, LC₅₀=293.4 mg °L⁻¹, while to 2~3 instar larva of *Plutella xylostella* were over 70%, LC₅₀=343.5 mg °L⁻¹. The toxicity of ethanol extracts to these two kinds of larva are better than that of acetone extract. Antifeedant activity of 125 mg °L⁻¹ of ethanol extracts are good to both larva and antifeedant ratio are 97.4% and 70.4% respectively. The antifeedant ratio of acetone extracts are 96.5% and 98.3% respectively. In 0.02 g mL⁻¹ (dry substance of *M. micrantha* / culture medium) concentration, inhibitory effect of carbinol and ethanol extract to *Phytophthora capsici* & *Exserohilum turcicum* are 100%.

Key words: *Mikania micrantha* H. B. K.; crude extract; insect; plant pathogen; bioactivity

(上接第 81 页)

Regeneration of Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.) by *Agrobacterium* -Mediated Transformation

LI Yin, HUANG Xue lin, XIAO Jie ning, HUANG Xia, LI Xiao ju

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Genetic Engineering,

School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.) were used as receptors for transformation of *GUS* gene by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404/pCambia2301. Results indicated that the transient expression rate was increased by negative pressure treatment and obtained a transient expression rate as high as 35%. Via transformation, we obtained 15 kanamycin resistance plants from 158 explants inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*. Histochemical GUS assay, PCR and PCR-Southern blot analysis have confirmed that *GUS* gene was already integrated into the genome of alfalfa. And *GUS* gene expressed steadily in transgenic plants after planted in soil for three months.

Key words: alfalfa (*Medicago sativa* L.); transformation; *Agrobacterium tumefaciens*; somatic embryo