

黑花生再生体系和遗传转化的初步研究

余云芳^{1,2},姚伟^{1,3*},李红梅¹,段真珍¹,何正权¹,乐超银¹,张昌菊²,梁宏伟¹

(1. 三峡大学生物技术研究中心,湖北宜昌 443002; 2. 三峡大学医学院,湖北宜昌 443002;

3. 福建农林大学,农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室,福建福州 350002)

摘要:以黑花生品种黑霸 920 成熟种胚、幼叶和胚轴为外植体,对黑花生植株再生和遗传转化进行了研究。通过设置一系列不同浓度激素配比的培养基来优化各阶段培养条件,初步建立了高效的黑花生再生体系,即花生种子经 75% 乙醇表面消毒 15 min, MS+6-BA 2.0 mg/L 为最优化的种子萌发培养基, MS+2,4-D 2.0 mg/L 为最佳诱导愈伤培养基,幼叶为最佳诱导愈伤组织的外植体, MS+6-BA 8 mg/L+NAA 0.5 mg/L+AgNO₃ 1 mg/L 为最佳分化培养基, MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L+活性炭 200 mg/L 为最佳生根培养基。同时确定了愈伤组织和幼苗的卡那霉素筛选压分别为 30 mg/L 和 300 mg/L。利用农杆菌介导法将含有 GUS 基因和 NPT II 基因的植物表达载体 pBI121 导入花生组织,在对愈伤组织、幼叶和胚轴的 GUS 表达检测中均有蓝色斑块出现,证明 GUS 基因已成功转入到花生细胞中。

关键词:花生; 组织培养; 农杆菌介导法; GUS 检测

中图分类号: S565.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)03-0038-06

Plant Regeneration and Genetic Transformation in *Arachis hypogaea* L

YU Yun-fang^{1,2}, YAO Wei^{1,3*}, LI Hong-mei¹, DUAN Zhen-zhen¹, HE Zheng-quan¹,

YUE Chao-yin¹, ZHANG Chang-ju², LIANG Hong-wei¹

(1. Biotechnology Research Center of China Three Gorges University, Yichang 443002, China; 2. Medical Science College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China; 3. Key Lab of Eco-physiology & Genetic Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture, P. R. China, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Plant regeneration and transformation from embryo, young leaf, hypocotyl through callus induction were investigated in a case of peanut (*Arachis hypogaea* L) cultivar Heiba920. The optimal media were selected for plant regeneration by supplementing MS medium with different kinds of hormones: MS+6-BA 2.0 mg/L for seed bourgeon; MS supplemented with 2.0 mg/L 2,4-D for producing callus; MS+6-BA 8 mg/L+NAA 0.5mg/L+AgNO₃ 1 mg/L for differentiation; And MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L+ active carbon 200 mg/L for inducing root. The optimal selective agent was 30mg/L of kanamycin for callus and 300mg/L of kanamycin for embryo culture. Plant expression vector pBI121 including GUS gene and NPT II gene was transformed into peanut tissues by *Agrobacterium tumefaciens*. Blue strains in callus, young leaf and hypocotyls transformed showed that GUS gene was integrated into the genome of *Arachis hypogaea* L.

Key words: Peanut; Tissue culture; *Agrobacterium* mediated transformation; GUS test

收稿日期: 2005-11-22

基金项目: 湖北省教育厅青年项目(Q200513002); 国家“863”高新技术计划(2002AA241031)

作者简介: 余云芳(1979-), 女, 湖北宜昌人, 在读硕士研究生, 主要从事植物生物技术研究。

通讯作者: 姚伟(1977-), 男, 湖北宜昌人, 博士, 硕士生导师, 主要从事植物生物技术研究。

花生作为主要的油料和经济作物之一,普遍地受到其生产国家的重视。但由于花生容易受到病、虫、旱害等不利环境的影响,产量不稳定。植物基因工程技术的迅速发展,使人们能够按照意愿定向改良作物种性,克服传统育种方法的不足,为植物育种开辟了一条新途径。同多数豆科作物一样,花生外源基因导入技术难度比较大,遗传转化在花生育种上应用起步较晚。直到1994年,Eapen和George首次报道通过农杆菌转化获得抗卡那霉素和GUS(β -葡糖苷酸酶)活性的转基因花生^[1];1996和1997年CHENG Ming和LI Zhi-jian分别将GUS基因和TSMV-CP基因成功导入花生中^[2,3]。之后,花生的遗传转化研究主要围绕解决花生组培基因型特异性强的问题,提高再生率、转化率与可重复性,避免或减少组培过程中的变异和嵌合体的产生而进行。

黑花生与一般花生相比,它具有高蛋白、高精氨酸、高硒、高钾含量的优良特性,在保健食品及医疗食品等方面具有广阔的开发前景。黑花生还含有黑色素,黑色素是一种抗氧化剂,具有抗氧化、抗衰老作用,并且还具滋阴、养颜、抗癌功能,因而是当今高效农业中最有发展前景的稀有作物^[4,5]。目前,国内外对黑花生的研究还很少,也没有关于黑花生研究方面的论述。我们以黑花生为研究材料,初步建立起一个完整的黑花生组织培养和遗传转化体系,旨在为其他抗虫、抗病基因遗传转化和以其为生物反应器生产药用蛋白奠定技术基础。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

黑花生品种黑霸920,购于山东莱阳广信实业有限公司。

1.2 菌株与质粒

含有NPTII基因和GUS基因的pBI121质粒由农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点实验室提供,农杆菌EHA105菌株由三峡大学生物技术研究中心实验室保存。

1.3 培养基

种子萌发培养基:MS+6-BA 2.0mg/L;愈伤诱导培养基、分化培养基及生根培养基[生根培养基按正交试验设计25种(表1)],均为MS添加相应的不同配比激素;LB培养基和YM培养基配方参照分子克隆实验指南^[6]。

表1 生根培养基正交试验设计

水平	6-BA(mg/L)	NAA(mg/L)	活性碳(mg/L)
1	0	0	0
2	0.1	1.0	200
3	0.2	2.0	400
4	0.3	3.0	600
5	0.4	4.0	800

1.4 外植体的准备

选取颗粒饱满、个头较大、表面无裂痕、外壳颜色较黑的黑花生种子,先用洗涤剂 and 自来水洗净外壳,然后用75%无水乙醇浸泡,再用无菌蒸馏水清洗2~3次,最后用无菌水浸泡种子过夜或不浸泡。去外壳和子叶,取完整幼胚接种到萌发培养基中,光照培养,光照时间为每天16h,光照强度为1500~2000lx,培养室温度为(25±1)℃。种子萌发4~12d后,即可用于制备外植体,方法如下:取幼叶(8~10日龄),剪去周围1圈,若还大的剪成2~3段,大小约为5mm×2mm的方块;将生长2~4d的花生幼胚,切除小叶和胚根,取中间胚轴,纵向划几条伤口,并横向切成1~2段,每段约0.5~0.8cm;直接取未萌发的花生种子的幼胚切成2瓣,分别用解剖刀纵向划几条伤口。

1.5 植株再生

将外植体接种到愈伤诱导培养基中,置暗室培养,培养室温度为(25±1)℃。愈伤组织每隔2周继代一次,3~4次后将长势良好的愈伤组织转移到分化培养基中,每隔20d继代一次,直至分化出植株。然后挑选生长健壮的植株,适当切除茎基部黑色或绿色斑点,接入生根培养基中生根,待根长至5cm高时打开瓶盖炼苗2d,然后将小植株取出,用流水洗净根部附着的培养基,移栽于装有经过高压灭菌的混合土壤(红壤:沙土=3:1)的花盆中培养,有规律的用自来水浇灌植株,维持生长温度为(25±2)℃,相对湿度为80%,1个月左右即可移植到大田中。

1.6 卡那霉素基础抗性试验

1.6.1 愈伤组织筛选压的选择 将愈伤组织接种到含有Km的诱导培养基上,Km浓度分别为0mg/L、10mg/L、20mg/L、30mg/L、50mg/L、80mg/L、100mg/L。10d后观察愈伤组织的生长情况。每隔2周更换一次培养基直到愈伤组织不再生长。

1.6.2 幼苗筛选压的选择 将幼苗接种到含Km的分化培养基上,Km浓度分别为0mg/L、100mg/L、200mg/L、300mg/L、400mg/L、500mg/L。

10 d后观察叶片生长情况,每2周更换一次培养基直到幼苗完全白化枯死。

1.7 农杆菌介导的遗传转化

1.7.1 农杆菌的准备 农杆菌感受态的制备及pBI121质粒的转化方法参照文献[7],涂板后置28℃培养48 h。挑取3个单菌落用PCR进行鉴定,将鉴定为阳性的菌落接种于20 ml YM培养基(含Rif 50 mg/L、Km 20mg/L)中,在28℃条件下,振荡(200 r/min)培养,使菌液的OD₆₀₀达到0.4左右。

1.7.2 绘制农杆菌菌液生长曲线 将农杆菌单菌落于20 ml的YM培养液中培养,从第4小时开始,每2 h测1次OD₆₀₀值,以OD₆₀₀值对时间作图(图1)。

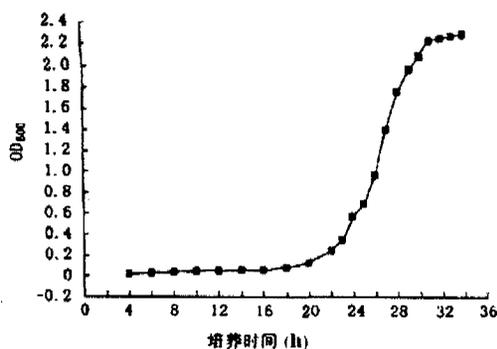


图1 农杆菌菌液生长曲线

1.7.3 转化及抗性幼苗获得 将准备好的愈伤组织块浸于农杆菌菌液中,缓慢振荡10 min,无菌水清洗3~4遍,再置无菌滤纸上晾干,于MS+6-BA 8.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+AgNO₃ 1.0 mg/L培养基MS上暗处共培养5 d,再转入MS+30 mg/L卡那霉素+300 mg/L头孢霉素培养基中培养8~10 d,以抑制农杆菌生长,再转入MS+15 mg/L卡那霉素+300 mg/L头孢霉素培养基中,2~3周后分化出苗,再转入MS+300 mg/L卡那霉素+300 mg/L头孢霉素培养基中,每20 d继代一次,卡那霉素浓度依次降低至200 mg/L和150 mg/L,待苗长到约6 cm高、长势比较好时,再转至生根培养基MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L+活性炭200 mg/L中进行生根培养,最后获得抗性幼苗。

1.8 GUS基因组织化学检测

根长出后7 d,作GUS基因组织化学检测。配置10 ml染色液:X-Gluc 5mg,50mol/LK₃Fe(CN)₆ 20 μl,50 mol/L的K₄Fe(CN)₆ 20μl,0.5 mol/L的Na₂EDTA 2μl,0.1% Triton X-100 100μl,甲醇2ml。将准备好的材料浸泡在染色液中,于25~37℃保温1 h过夜,再转入70%乙醇中脱色2~3

次,至阴性对照材料呈白色,肉眼或显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 种子的表面消毒处理

试验前为了检测种子的发芽率,将种子浸润在自来水中,放在光照培养室里,观察其自然发芽情况。试验证实,种子的发芽率均在100%,说明种子的自然发芽率均属正常。如表2所示,无水乙醇处理时间越长,污染率越低,但种子的萌发和生长也越慢,无水乙醇浸泡的时间超过30 min后,花生种子的生长很慢,甚至停止生长,说明无水乙醇对花生种子有毒害作用。试验表明,采用75%的无水乙醇浸泡15 min,无菌水清洗2~3遍,效果最佳。另外,用无菌水浸泡种子过夜能明显促进种子的生长。无菌水浸泡时间越长,种子生长越快,原因是随着浸泡时间的延长,种子吸收水分增多,体积增大,呼吸也随之加强,从而促进其萌发能力,但如果无菌水浸泡的时间过长,会导致污染率明显升高。

表2 75%无水乙醇浸泡时间对种子萌发的影响

时间 (min)	种子数 (粒)	萌发数 (粒)	萌发率 (%)	污染数 (粒)	污染率 (%)	生长情况
5	40	40	100	8	20	正常
10	55	55	100	4	7.3	正常
15	55	55	100	1	1.8	正常
30	23	20	86.9	0	0	慢,停止
60	35	30	85.7	0	0	停止

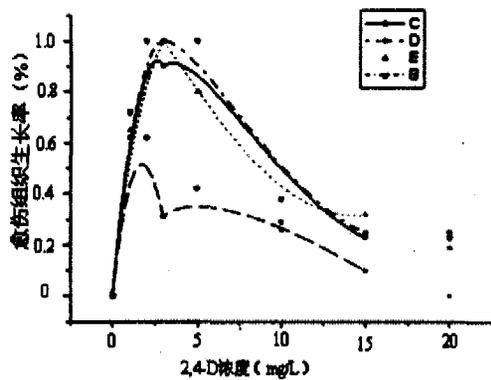
2.2 最佳外植体及最佳培养基的筛选

如图2所示,在3种不同的外植体中,幼叶诱导愈伤组织效果最好,其愈伤组织为黄色、质密、透明、湿润(图3-A),其次是胚轴。试验中还发现低浓度的2,4-D培养时,外植体生根率较高,根均为白色不定根(图3-B),已生根的愈伤组织转移到分化培养基上后会停止生根。同时进行的光培养与暗培养对照试验也表明,暗处培养的愈伤组织比光照下培养的愈伤组织要好。

2,4-D对愈伤的诱导作用是很明显,MS+2,4-D 2.0 mg/L为最佳诱导愈伤培养基。从图2中可以看出其显著的不同,2,4-D的浓度在一定范围内(2~5 mol/L)能促进愈伤生长,完全不加2,4-D时不产生愈伤,2,4-D浓度高时(10~20 mol/L),愈伤的生长也不是很好。

2.3 最佳分化培养基的筛选

愈伤由诱导培养基转移到分化培养基上后,愈伤继续生长且大部分长势很好,约10 d后分化成小植株(图3-C)。其中FH4是最优的激素配方(表3)。



B——以幼叶为外植体的愈伤组织生长率(暗培养); C——以茎为外植体的愈伤组织生长率(暗培养); D——以幼胚为外植体的愈伤组织生长率(暗培养); E——以幼叶为外植体的愈伤组织生长率(光培养)

图2 不同外植体在不同 2,4-D 浓度下的愈伤组织生长率

表3 分化培养基配方及愈伤分化情况

培养基编号	6-BA(A) (mg/L)	NAA(B) (mg/L)	AgNO ₃ (C) (mg/L)	接种愈伤块数	分化个数	分化率 (%)
FH1	2	0	1	50	2	4
FH2	2	0.5	0	40	0	0
FH3	8	0	0	55	30	55
FH4	8	0.5	1	55	50	91
FH5	10	0	0	45	28	62
FH6	10	0.5	1	50	35	70

2.4 最佳生根培养基的筛选

对分化植株在生根培养基上生长 20 d 后,进行统计可知,NAA 对生根的影响最大,培养基中添加 NAA 浓度在 2.0 mg/L 时生根效果较好。在正交试验设计的 25 种培养基中(表 1),以活性炭 200 mg/L+6-BA 0.2 mg/L+NAA 2.0 mg/L+MS 为



A. 叶片愈伤组织; B. 在愈伤培养基上生根的叶片; C. 愈伤组织分化出的植株; D. 分化植株生根培养; E. 开盖炼苗; F. 白化苗与正常植株

图3 黑花生组织培养

最合适的生根培养基,生根率可达 100%,图 3-D 所示的是植株在生根培养基中的生根情况。

2.5 移栽成活情况

将健壮的植株,开盖炼苗(图 3-E)1~3 d 后,移栽到土壤中,注意经常浇水,移栽小苗成活率可达 100%。

2.6 抗生素敏感性试验

愈伤组织诱导试验中,卡那霉素浓度低于 30 mg/L 不能完全抑制未转基因的花生愈伤组织的分化,而当卡那霉素浓度为 50mg/L 及以上时,愈伤组织均不能很好的分化出苗,甚至不分化。考虑到卡那霉素浓度太高会对转基因植株的生长产生不利影

响,故选择临界浓度 30 mg/L 为最佳的愈伤组织筛选压。

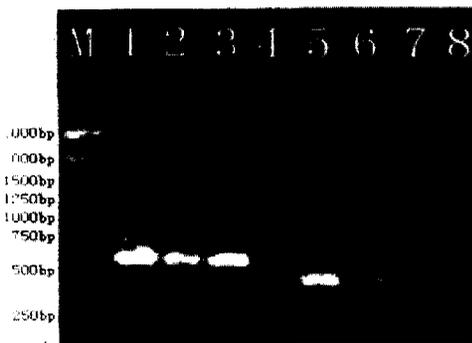
幼苗生长试验中,当卡那霉素浓度小于 300 mg/L 时,植株生长基本正常;当卡那霉素浓度为 300 mg/L 时,出现少数白化苗;而当卡那霉素浓度达到 400 mg/L 时,白化率增加,少数出现褐化最终枯死。当卡那霉素浓度达到 500 mg/L 时,所有植株均褐化最终枯死,所以选择 300mg/L 作为幼苗的卡那霉素筛选压(图 3-F)。

2.7 农杆菌的 PCR 检测

根据 GUS 和 NPTII 基因序列,设计合成 2 对引物,序列如下:

PNPTII(A): 5' - CCTGTCATCTCACCTTGCTCC
-3'
PNPTII(S): 5' - GGCGATACCGTAAAGCACG -3'
PGUS(A): 5' - CCTCGCATTACCCCTTACG -3'
PGUS(S): 5' - GCACACTGATACTCTTCACTCC
-3'

从图4中可以看出 GUS 基因的特异性条带约在 600bp, NPT II 基因的特异性条带在 450bp 左右, 与预期大小(GUS 基因的特异性条带在 602bp、NPT II 基因的特异性条带在 436bp)一致, 阴性对照中没有出现条带, PCR 结果证实了 pBI121 已成功转化到农杆菌中。



M:DNA Marker; 1-3:不同菌液以 PGUS 为引物 PCR 的结果; 5-7:不同菌液以 PNPTII 为引物 PCR 的结果; 4,8:相应的阴性对照(水)

图4 含 pBI121 的农杆菌 PCR 检测结果

2.8 GUS 基因组织化学检测

利用组织化学染色法检测 GUS 基因表达, 结果如图5所示。肉眼及解剖镜下观察到转化



A,B,C:转化的外植体(依次为胚轴、愈伤组织、叶片,箭头所指处为蓝色); C,D,E:未转化的外植体(依次为胚轴、愈伤组织、叶片)

图5 不同外植体 GUS 检测结果

pBI121 的胚轴、愈伤组织和叶片中均出现了蓝色斑块(图5中箭头所指处), 而未转化的外植体没有出现蓝色, 说明含 GUS 基因的 pBI121 载体已经成功转入花生受体细胞中, 并得到瞬时表达。

3 讨论

自从 Abel 培育出第1例转基因植株以来^[8], 转基因生物技术在很多作物的遗传育种上得到广泛的应用。但是在花生上却一直发展比较缓慢, 原因之一就在于花生组织培养的再生体系不够理想, 制约了转基因技术在花生遗传转化上的应用^[9-12]。本试验对具有优良产质性状的黑花生品种黑霸 920 进行研究, 通过一系列的试验研究, 初步建立了高效的黑花生再生体系, MS+6-BA 2.0 mg/L 为最优化的种子萌发培养基; MS+2,4-D 2.0 mg/L 为最佳诱导愈伤培养基; 其中幼叶为最佳诱导愈伤组织的外植体; MS+6-BA 8 mg/L+NAA 0.5 mg/L+AgNO₃ 1 mg/L 为最佳分化培养基; MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L+活性炭 200 mg/L 为最佳生根培养基。同时确定了愈伤组织和幼苗的卡那霉素筛选压分别为 30 mg/L 和 300 mg/L, 可为黑花生的遗传转化工作及黑花生与其近缘野生种间体细胞杂交的应用奠定了基础。本试验利用农杆菌介导法将含有 GUS 基因和 NPT II 基因的植物表达载体 pBI121 导入花生组织, GUS 表达检测外源载体已成功转入到花生细胞中, 初步建立了黑花生的遗传转化体系。利用该遗传转化体系, 我们实验室目前已成功将 C 反应蛋白基因转化到黑花生中, 并进行了 PCR 和 Southern 杂交验证均为阳性(另文发表)。

参考文献:

- [1] Eapen S, George L. Agrobacterium tumefaciens-mediated gene transfer in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1994, 13:582-586.
- [2] Cheng M, Jarrel R L, Li Z, et al. Production of fertile transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants using Agrobacterium tumefaciens [J]. Plant Cell Reports, 1996, 5:653-657.
- [3] Li Z, Jarrel R L, Demskis J W. Engineered resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic peanut expressing the viral nucleocapsid gene [J]. Transgenic Research, 1997, 6:297-305.
- [4] 张瑜芳, 余柏. 黑色花生中的珍品——黑花生 [J]. 山东食品科技, 2003, 3(8):19-22. (下转第 62 页)

的最低可检测值为 8.13 ng;从图 4 中可以看出:Bt 蛋白量降低到 4.06 ng/点时,点样点的斑点较清晰,而 2.03 ng 点样点的斑点较模糊,因此,间接法 Dot-ELISA(HRP-IgG)的最低可检测值为 2.03~4.06 ng;从图 5 中可以看出:Bt 蛋白量降低到 2.03 ng/点时,点样点的斑点仍清晰可见,因此,间接法 Dot-ELISA(AKP-IgG)的最低可检测值为 2.03 ng。

从图中还可以看出直接法和间接法 Dot-ELISA 中,随着 Bt 蛋白量的降低,斑点的颜色逐渐变浅,而夹心法中,随着标准抗原浓度的降低,斑点的颜色变化不明显,因此,直接法和间接法 Dot-ELISA 在进行定性测定的同时,还可以进行半定量测定。3 种 Dot-ELISA 相比,间接法 Dot-ELISA 的效果较好,特别是使用 AKP 系统时,灵敏度更高。

3 讨论

本研究在使用 HRP 系统的 3 种 Dot-ELISA 法中,同浓度下直接法和间接法 Dot-ELISA 的斑点颜色要明显深于夹心法 Dot-ELISA,可能是由于包被 IgG 后,其与 Bt 杀虫蛋白结合,影响了 Bt 杀虫蛋白与酶标抗体的结合的缘故;间接法 Dot-ELISA 中使用了 HRP-IgG 和 AKP-IgG 2 种酶标二抗,

AKP 系统的灵敏度高于 HRP 系统,可能是因为 AKP 系统呈现的紫色比 HRP 系统呈现的灰蓝色要鲜明显眼的缘故。

参考文献:

- [1] 李文敏. 酶联免疫吸附反应的技术进展及应用[J]. 湖北职业技术学院学报,2003,6(4):65-69.
- [2] 沈法富,于元杰,尹承侗,等. 利用 Dot-ELISA 检测 Bt 棉杀虫蛋白的研究[J]. 中国农业科学,1999,32(1):15-19.
- [3] 王保民,何钟佩,赵继勋. 抗虫棉 Bt 杀虫晶体蛋白免疫检测方法的研究[J]. 棉花学报,1998,10(4):220-221.
- [4] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000.
- [5] Hill S A. Methods in plant virology[M]. Oxford:Blackwell Scientific Publication, 1984.
- [6] 金伯泉. 细胞与分子免疫学实验技术[M]. 西安:第四军医大学出版社,2002.
- [7] 郭春祥,郭锡琼. 介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法[J]. 上海免疫学杂志,1983,3(2):97-100.
- [8] Burdon R H, Knippenbery P H. Monoclonal antibody technology[M]. Amsterdam:Elsevier science publication company,1984.

=====

(上接第 42 页)

- [5] 董淑香. 黑粒花生品种介绍[J]. 北京农业,2004,79(7):37-40.
- [6] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南[第 2 版][M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京:科学出版社,1999.
- [7] 崔武,刘炜,吴光耀. 高效、快速地将外源 DNA 导入根瘤农杆菌[J]. 生物工程学报,1995,11(4):350-355.
- [8] Powell-Abel P, Nelson R S, De B, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene[J]. Science,1986,232:738-743.
- [9] Arencibia A D, Carmona E R, Tellez P, et al. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum spp* L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Transgenic Res,1998,7:213-222.
- [10] Miyuki Takaichi, Kenji Oeda. Transgenic carrots with enhanced resistance against two major pathogens, *Erysiphe heraclei* and *Alternaria dauci*[J]. Plant Science,2000,153:135-144.
- [11] P B McGarvey, J Hammond, M M Dienelt. Expression of rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes [J]. Biotechnology,1995,13:1484-1487.