

文章编号: 1003-8701(2006)05-0045-03

Bar 基因转化豆科牧草百脉根的研究

刘艳芝, 邢少辰, 王玉民, 王中伟, 谭化, 董英山*

(吉林省农业科学院生物技术研究中心, 吉林 公主岭 136100)

摘要: 以豆科植物百脉根子叶为转化受体, 通过根癌农杆菌介导方法将外源目的基因 *Bar* 基因和 *Gus* 基因导入, 经筛选分化、再生, 得到具有 Basta 抗性的转基因植株。在 Basta 浓度的选择中, 2 mg/L 是百脉根较为适宜的筛选浓度。试管苗叶片筛选剔除假转体和嵌合体植株, 转基因植物移栽大田后生长良好。PCR 检测证明外源目的基因已整合到百脉根基因组中。

关键词: 百脉根; 根癌农杆菌; 基因转化; *Bar* 基因; 植株再生

中图分类号: Q78

文献标识码: A

百脉根(*Lotus cirniculatus*)是优良的多年生豆科牧草之一, 其营养丰富, 耐寒、耐涝、耐贫瘠、耐践踏、耐牧, 耐旱能力仅次于紫花苜蓿, 加之适口性好, 茎、叶中皂素含量低, 使反刍家畜不易得膨胀病, 因此它不仅可作为放牧牧草, 也可作为青饲料或青刈饲料^[1]。

草丁膦是德国 Hoechst 公司开发的有机磷类广谱、高效除草剂, 其杀草机理为抑制植物氨基酸生物合成酶 - 谷氨酰胺合成酶(GS)的合成, 使细胞体内氨的含量迅速积累, 叶绿体结构解体, 光合作用受阻, 植物死亡^[2]。从潮湿链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)中分离了抗草丁膦的 *bar* 基因, *bar* 基因编码乙酰转移酶 PAT, 使乙酰辅酶 A 与草丁膦游离氨基结合, 形成 AC-PAT 复合物, 从而使草丁膦失去活性^[3]。D. Halluin 于 1990 年将 *Bar* 基因导入苜蓿, 田间试验检测证实转基因植株具有对除草剂 Basta (主要成分是草丁膦)的抗性^[4]。国内对百脉根的遗传转化研究也有一些报道^[5-7], 但都是以验证基因的表达为主要目的。

百脉根出苗时生长缓慢, 容易受杂草侵害, 除草时只能用消灭禾本科杂草的除草剂喷杀, 而双子叶杂草只能人工除草, 费用非常高, 本项研究将 *Bar* 基因转入百脉根, 其最终目标是培育出抗除草剂的百脉根新品种, 这对牧草生产具有实际意义。

1 材料和方法

1.1 植物材料

百脉根种子由吉林省农业科学院草地所提供。将种子用 75%乙醇浸泡 2 min, 0.1%升汞溶液灭菌 20 min, 无菌水冲洗 4 次, 浸泡 24 h 后置于放有湿润滤纸的培养皿中, 光照培养 2 d 后, 将发芽种子接种于 MS₀(MS 基本培养基, 不加激素、3%蔗糖、0.8%琼脂、pH 值 6.0)培养基中。7 d 左右取无菌苗子叶, 顶端切去 1/3, 全部埋入 L₂(MS + 6BA 0.1 mg / L + 3%蔗糖 + 0.8%琼脂, pH 值 6.0)培养基里预处理若干天。

1.2 质粒和菌株

质粒: pCAMBIA3301 由中科院上海植生所卫志明先生惠赠。含有 35 S 启动子调控的 *Bar* 基因和 *Gus* 基因(图 1)。质粒在大肠杆菌中保存。

收稿日期: 2006-06-05

作者简介: 刘艳芝(1964-), 女, 吉林省公主岭市人, 副研究员, 主要从事牧草及草坪草转基因研究。

通讯作者: 董英山

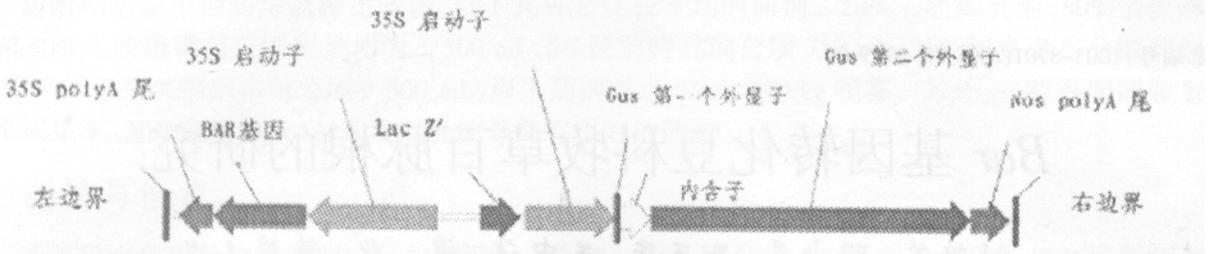


图 1 转化用目的基因示意

菌株:根癌农杆菌菌株 LBA4404(郭三堆先生提供)带有链霉素和利福平抗性标记。用碱裂解法从大肠杆菌提取质粒 pCAMBIA3301,用液氮处理的冻融直接转移法将 pCAMBIA3301 转入 LBA4404,微量提取质粒进行酶切分析,以确定目的基因是否转入农杆菌质粒中。菌株在附加卡那霉素 50 mg/L 的 YEB 培养基上培养,在 26~28 °C 下振荡过夜培养至细菌生长对数期,再用 MS₀(pH 值 5.6)液体培养基重新悬浮即可用于转化实验。

1.3 转化及培养方法

经预培养的子叶浸入 MS₀(pH 值 5.6)液体培养基悬浮的农杆菌菌液中,期间摇动几次。30 min 后将感染的子叶置于无菌滤纸上,吸干子叶表面水分,接入共培养培养基(MS+0.1 mg/LBAP+ 3% 蔗糖 + 0.6%琼脂, pH 值 5.6),暗培养 1 d 后转入含 Basta 2 mg/L 及 cef500 mg/L 的筛选培养基上,进行转化体的筛选培养。每 2 周换 1 次新鲜培养基,继代 4 次以上。培养条件为 25~26 °C,每日光照 12 h,光强 2 000 lx。将再生苗转入无激素的 1/2 MS 培养基以诱导生根。数周后将植株移栽至温室中。

1.4 试管苗叶片筛选

将再生小植株的叶片接种到 MS₀+3 mg/L 除草剂(Basta)培养基和 MS₀+5 mg/L 除草剂(Basta)培养基上。以组织培养获得的再生植株叶片作抗性筛选对照。

1.5 转化体的分子检测 PCR 检测

抗性植株的 PCR 分析。取抗性植株幼嫩叶片 0.2~1 g,按 CTAB 法提取基因组 DNA,根据 Bar 基因序列设计了特异扩增引物,上游引物 B₁ 为 5'-GCAGGAACCGCAGGAGTGG,下游引物 B₂ 为 5'-ATCTCGGTGACGGGCAGGAC。在每一 25 μl PCR 反应体系中含 50 ng 基因组 DNA,10 mmol/L Tris-HCl pH 9.0,50 mmol/L KCl,1.8 mmol/L MgCl₂,0.1% Triton X-100,200 mol dNTPs,每一引物 50 ng,1 U Taq DNA 聚合酶。PCR 反应在 Biometra 热循环仪上按下列程序进行:预变性 94 °C 4 min;然后 94 °C 45 sec,55 °C 45 sec,72 °C 1 min,35 个循环;最后 72 °C 10 min。PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 转化体的再生培养

预培养 2 d 的百脉根无菌苗子叶经农杆菌感染 30 min,共培养 1 d 后转至附加 2 mg/L Basta 的筛选培养基上。此时外植体已膨大,特别是伤口处明显膨大。3 周后外植体大部分变成黑褐色、焦糊状;少部分为黄褐色、透明状;一部分为深绿色、边缘有突起,此种类型的外植体约占总外植体数的 10%。6 周左右呈深绿色的外植体逐渐出现深绿色致密状愈伤组织。经过 4 次继代后,去掉 Basta 筛选,愈伤组织 1 周内即分化出大量的不定芽。分化的簇生再生芽在重新转入附加 2 mg/L Basta 的筛选培养基上,大量的非转化芽死亡,将健壮的抗性再生芽切下转至无激素的 1/2MS 培养基中,10 d 左右 95% 的再生苗能正常生根。4~6 周之后移栽至花盆。检测再生苗无农杆菌污染后,4 周后移至大田。

2.2 Basta 对百脉根筛选浓度的选择

为了对百脉根选择合适的 Basta 筛选浓度,特别设计了 5 个梯度浓度,分别为 0、1、2、3 和 5 mg/L,将百脉根无菌苗子叶接入相应的分化培养基。经 2 个月筛选,结果显示 2 mg/L 的 Basta 对百脉根的筛选较为适宜。当 Basta 浓度为 1 mg/L 时,分化率仅为 30%。5 mg/L Basta 筛选条件下,分化率为 0,在 20 多天内子叶外植体不断褐化、坏死。而其他浓度条件下,一部分外植体不断出现绿色愈

伤组织和不定芽,这是因为这些外植体的内部没有立即受到除草剂的损伤,从而开始分化;另一部分外植体则逐渐褐化,可能是这些外植体最初的生理状态就比较弱。无论是哪一种情况,这些培养物都逐渐受到 Basta 的损伤,在 2 个月时全部死亡(表 1)。

2.3 试管苗叶片筛选结果

将再生苗的幼嫩叶片取下来,接种到附加 3 mg/L($MS_0 + B_1$)培养基中进一步筛选。结果获得的 96 株再生植株叶片,经 2 个月筛选后有 18 株的叶片依然能够存活,而对照叶片均于 1 周后死亡。还发现:即使是同一植株的叶片筛选时,也出现有的叶片死亡,有的叶片存活,有的叶片半存活,我们分析这可能是嵌合体的表现形式,是由于放松筛选所导致的;另外还出现同样是存活的叶片,叶色深浅有很大的差别,可能是由于转入的基因在植株中的表达量不同,这有待于进一步分析。

2.4 PCR 扩增检测

表 1 百脉根无菌苗子叶对不同浓度的 Basta 抗性结果

Basta 浓度(mg/L)	接种数	死亡数	死亡率(%)
0	60	0	0
1	60	18	30
2	60	60	100
3	60	60	100
5	60	60	100

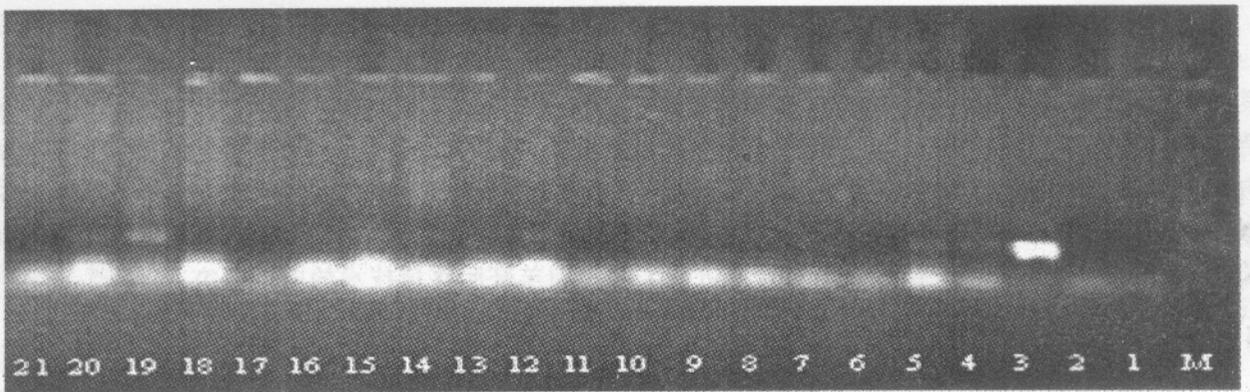


图 2 转化植株 PCR 检测结果

M 为 Marker; 1-2 为阴性对照; 3 为阳性对照; 4~21 为转化植株

转化处理的百脉根再生植株提取其总 DNA, 作为 PCR 扩增 *Bar* 基因的模板。经 PCR 扩增后, 琼脂糖电泳检测 PCR 扩增产物, 转化体显示出约 552 bp 大小的特征带, 而对照组则无此带(图 2)。结果表明, 外源 *Bar* 基因已整合在百脉根总基因组中。

2.5 再生植株的移栽

百脉根再生植株适宜在春秋季节移栽, 室温约 20℃。将转化植株连同培养瓶在温室放置 1 周左右, 打开盖后再锻炼 1 周, 洗净植株根部琼脂, 移到装有营养土的花盆中, 1 个月后再移栽至大田。

3 讨 论

农杆菌介导转化百脉根的过程中, 放松筛选是很关键的一个步骤。一般来说, 转基因的整个过程都需要筛选压力的存在, 这样才会减少非转化体的出现, 避免增加后来检测的工作量。但是, 在本项实验中, 如果培养基中一直加 Basta 筛选外植体, 结果仅能得到抗性愈伤组织, 却得不到抗性芽。我们在实验中随机选出一部分农杆菌侵染后的外植体一直做筛选处理, 继代 8 次时仍然没能得到抗性芽。因此我们在实验中选用继代筛选 4 次, 然后做 1 次放松筛选, 得到不定芽后再重新筛选, 结果得到抗性植株, 同时也去除掉大量的非转化体。

叶片筛选结合 PCR 技术对于检测 *Bar* 基因在植物中的表达是一个快捷、准确的方法。转基因植物分子检测的第一步是对获得的抗性植株 DNA 进行 PCR 扩增, 通常抗性植株的数量都很多, 因此 PCR 扩增的工作量就很大, 费用也非常高, 并且 PCR 扩增十分灵敏, 经常会出现假阳性扩增, 影响检测的准确性, 会给转基因后代选择带来麻烦。利用叶片筛选方法, 可根据叶片在含除草剂培养基上的筛选情况进一步确定转基因植株, 这一步又可以筛选掉一定数量的非转化体和嵌合体(下转第 55 页)

