

谢雅晶, 武爱华, 刘贤金. 青杂 5 号甘蓝型油菜的高效再生及农杆菌侵染转化体系的建立[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(12): 17–22.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.005

青杂 5 号甘蓝型油菜的高效再生及农杆菌侵染转化体系的建立

谢雅晶¹, 武爱华^{1,2}, 刘贤金¹

(1. 江苏省食品质量安全重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地/农业部农产品质量安全控制技术与标准重点实验室/江苏省农业科学院食品质量安全与检测研究所, 江苏南京 210014; 2. 南京农业大学植物保护学院, 江苏南京 210095)

摘要:以甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)品种青杂 5 号的子叶、下胚轴外植体为受体,分别对芽分化培养基、芽生长培养基、生根培养基进行激素组合优化研究,建立甘蓝型油菜下胚轴高效再生系统。结果表明,青杂 5 号下胚轴分化率最高为子叶的 3 倍,可达 90% 左右;优化的分化培养基为 MSB + 5 mg/L 噻二唑苯基脲(thidiazuron, TDZ) + 7.5 mg/L AgNO₃ + 0.1 mg/L NAA + 2 mg/L 脯氨酸(proline, L-Pro) + 250 mg/L 酸水解酪蛋白(casein acid hydrolysate, CH) + 3% 蔗糖;生长培养基为 1/2 MSB + 1 mg/L IBA + 2 mg/L L-Pro + 250 mg/L CH + 1.5% 蔗糖;生根培养基为 1/2 MSB + 0.2 mg/L IAA + 1.5% 蔗糖。在此基础上,构建模拟 Bt 的抗虫基因 *Bt2* 的双元表达载体,采用农杆菌介导的方法转化油菜下胚轴,并利用潮霉素及羧苄青霉素对再生植株进行筛选;通过对转基因植株叶片基因组 DNA 的 PCR 检测及叶片 GUS 组织化学染色的分析,发现抗虫基因已整合到油菜植株的细胞核基因组中,并能正常表达;通过小菜蛾接种试验对该抗虫基因进行杀虫效果评价。

关键词:甘蓝型油菜;下胚轴高效再生;农杆菌介导转化;抗虫基因;GUS 染色;转基因植株

中图分类号:S634.304⁺.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)12-0017-05

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)是籽粒产量最高的用油油菜品种,目前我国长江中下游流域大量种植,是我国重要的油料作物。甘蓝型油菜不仅可生产食用油,而且其饼粕富含蛋白质,可作为动物饲料。然而,甘蓝型油菜的生产时常会受到病虫害的威胁,“双低”油菜品种对病虫害极其敏感^[1]。目前缺乏抗虫基因的种质资源,且育出的抗性品种由于致病生理小种的变异和虫类自身适应性的提高易产生抗性衰退的现象。通过遗传转化可将外源抗虫基因导入植物细胞,从而为品种改良提供新的途径。在作物的遗传转化研究中,用外植体通过不定芽途径再生植株的办法有利于保持原有材料和品种优良的农艺性状,再转移进由某一目的基因控制的特定性状,达到品种改良的目的^[2]。因此,建立高效离体组织再生技术是油菜转基因技术成功的前提。经过多年研究,国内外许多机构已经建立了成熟的油菜离体再生体系^[3-6]。然而,研究表明油菜不同基因型、不同外植体之间的最佳离体再生条件存在差异^[7-10],这在一定程度上阻碍了油菜转基因研究的发展。

自从 Ooms 等首次获得转基因甘蓝型油菜植株以来,甘蓝型油菜的遗传转化研究已取得很大进展^[11]。李学宝等通过油菜子叶外植体诱导的愈伤组织,采用农杆菌转化的方式,

将苏云金杆菌杀虫蛋白(Bt)基因导入甘蓝型油菜,获得了抗甜菜夜蛾等幼虫的转基因植株^[12]。王新发等采用农杆菌转化的方式,用油菜小孢子将几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因转化至甘蓝型双低杂交油菜亲本恢复系和保持系中,获得了转基因恢复系和保持系植株,筛选得到高抗菌核病的转基因育种材料^[13]。刘宏波等通过油菜子叶外植体与农杆菌共培养,将蛋白质酶抑制基因和几丁质酶基因导入甘蓝型油菜中^[14]。

本研究用高产、双低、高含油量和抗(耐)菌核病的品种青杂 5 号^[15]的无菌实生苗的下胚轴和带子叶柄的子叶为外植体材料,通过激素等调控条件的优化快速诱导不定芽发生、分化以及生根,从而建立青杂 5 号的高效植株再生体系。并在此基础上,构建模拟 Bt 毒素 Cry1Ab 的抗虫基因 *Bt2* 的双元表达载体,通过农杆菌介导的技术转化抗虫基因 *Bt2*,并通过小菜蛾接种试验对该抗虫基因进行转基因应用潜力评价。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验材料为小菜蛾(*Plutella xylostella*)。

本试验所用菌株、质粒见表 1。农杆菌 EHA105 培养基采用 YEP 培养基;大肠杆菌的培养采用 LB 培养基。试验中所用的限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶购自 NEB 公司;高保真 Fastpfu DNA 聚合酶、大肠杆菌 trans10 感受态细胞、pEASY-Blunt Simple Cloning Vector 购自北京全式金生物技术有限公司;PCR 产物回收试剂盒购自 Promega 公司;质粒小提试剂盒购自 Axygen 公司;组织培养用激素为 Amersco 公司产品;其他生化试剂均为进口或国产生化级或分析纯级试剂。

收稿日期:2015-06-23

基金项目:国家自然科学基金(编号:31301703);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(14)5068]。

作者简介:谢雅晶(1983—),女,江苏南京人,硕士,助理研究员,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail:maria_xie@163.com。

通信作者:刘贤金,博士,研究员,研究方向为农产品质量安全与检测。E-mail:jaasliu@jaas.ac.cn。

表 1 供试菌株与质粒

菌株与质粒	特征	来源
<i>E. coli</i> trans10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>), φ80, <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>ara</i> Δ <i>139</i> , Δ(<i>ara</i> - <i>leu</i> ,)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^r), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	全式金生物技术公司
EHA105	<i>Agrobacterium</i> , Spec ^r , Str ^r	南京农业大学惠赠
pEASY - Blunt Simple Cloning Vector	Amp ^r , Kan ^r , Lac Zα	全式金生物技术公司
pIT2 - B12	pIT2 载体, 含 <i>B12</i> 全长基因序列	笔者所在实验室
pEASY - B12	pEASY - Blunt Simple Cloning 载体, 含 <i>B12</i> 全长基因序列	笔者所在研究室构建
pCambia - 1305.1	双元载体, Hyg ^r , Kan ^r , GUSPlus TM genes	Cambia Labs
p1305 - B12	pCambia - 1305.1 载体, 含 <i>B12</i> 全长基因序列	本研究构建

注:r 上标表示有抗性。

无菌苗体系的建立:供试的甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 为青海地方栽培品种青杂 5 号。分别将其种子经流水冲洗 1~2 h 后,于 70% 乙醇中浸泡 2 min,再用 30% 次氯酸钠溶液消毒 5 min,最后用无菌水漂洗 5~6 次后晾干,播种于不含任何激素的 MS0 固体培养基上。于黑暗、(25±1)℃ 萌发 2 d 后,移至光下,于光照度 25 μmol/(m²·s)、光照时间 12 h/d、培养温度 (25±1)℃ 下培养,取萌发 3~4 d 苗龄的无菌苗下胚轴切段(长 5~7 mm)和带 2~3 mm 长子叶柄的子叶切块作为培养再生植株及遗传转化的起始材料。

1.2 青杂 5 号外植体高效再生系统的建立

取萌发 3~4 d 苗龄的下胚轴切段及子叶切块作为材料,分别置于含有不同激素配比的 MSB 培养基(含 MS 培养基的无机盐^[16]及 B5 培养基的有机成分^[17],激素及蔗糖按一定比例配制,所有培养基均附加 0.65% 琼脂粉)中,于温度 (25±1)℃、光照时间 12 h/d、光照度 25 μmol/(m²·s) 条件下进行培养。培养过程中附加不同浓度的 AgNO₃,对比后得出最佳的培养条件。

1.3 基因的 PCR 扩增、克隆及测序

根据抗虫基因序列分析,在抗虫基因两侧分别设计引物对,为便于遗传操作,在上游引物中引入 *Nco* I 酶切位点,在下游引物中引入 *Bgl* II 酶切位点。上游引物:5'-CATGC-CATGGCCGAGGTGCA-3';下游引物:5'-GGAAGATCTCGT TTGATTTCC-3'。根据设计的引物,以含有抗虫基因的 pIT2-B12 质粒为模板,利用高保真的 DNA 聚合酶 FASTpfu 进行 PCR 扩增。将 PCR 产物回收纯化后与 pEASY-Blunt Simple 载体进行连接,转化大肠杆菌 trans10 感受态细胞,蓝白斑筛选阳性克隆,再进行 PCR 鉴定(通用引物 M13)。测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.4 B12 基因植物双元表达载体的建立

对含抗虫基因的 pEASY-B12 质粒和 pCambia-1305.1 同时用内切酶 *Nco* I 和 *Bgl* II 进行双酶切,回收后连接。连接产物转化大肠杆菌 trans10 感受态细胞,涂布于含有卡那霉素的 LB 平板筛选阳性转化子。从得到的转化子中提取质粒,进行酶切、PCR 检测(1305 正反向引物)以及序列测定(1305 正反向引物)。测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

1305 正向引物(11 828~11 846 bp):5'-ACACGGGG-GACTCTTGACC-3';1305 反向引物(241~258 bp):5'-TC-GAAGACGCCACGGGTC-3'。

1.5 农杆菌培养及感受态制备

挑取农杆菌单菌落接种至 20 mL YEP 液体(Str^r)培养基

中,于 28℃、250 r/min 条件振荡培养至 *D*_{600 nm}=0.5,冰浴 10 min;5 000 r/min 离心 30 s,收集菌体;菌体用 0.5 mol/L NaCl 悬浮,冰浴 20 min;5 000 r/min 离心 30 s,收集菌体;菌体用 20 mmol/L CaCl₂(甘油)悬浮;按 200 μL 分装,-80℃ 保存。

在 200 μL 农杆菌感受态细胞中加入 1 μg p1305-B12 质粒 DNA,冰浴 30 min,放入液氮中 5 min,立即放入 37℃ 水浴锅中,热激 5 min;加入无抗生素的 YEP 液体培养基,28℃ 振荡培养(250 r/min)复苏 3~5 h。取适量菌液于(Hyg^r、Kan^r)抗性 YEP 平板上涂板,28℃ 培养 2 d,挑单菌落,进行 PCR 检测验证(1305 正反向引物)。

1.6 转化方法

将含 p1305-B12 质粒农杆菌单菌落接种至 20 mL YEP 液体(Hyg^r,Kan^r)培养基中培养过夜,离心收集,加含有乙酰丁香酮(AS)200 μmol/L 的 AAM 液体培养基(调节 pH 值至 5.2),调至 *D*_{600 nm}=0.2,菌悬浮液静置 2 h 用于转化。将培养好的油菜下胚轴外植体挑出,放入农杆菌悬浮液侵染 5 min;将下胚轴外植体取出,置于无菌滤纸上沥干,再置于共培养基上,于 28℃ 暗培养 2.5 d。

1.7 抗性植株的再生和移栽

将外植体取出,用无菌水清洗 6 次,其间需要不停地振荡;用含 750 mg/L 羧苄青霉素无菌水浸泡 30 min~1 h,置于无菌滤纸上沥干;转入含 500 mg/L 羧苄青霉素和 25 mg/L 潮霉素分化培养基上,进行 3 轮筛选。得到筛选后的分化苗后,将芽体切下,置于生长培养基中,培养至 3 cm 左右;再放入生根培养基中壮苗生根;根部和茎叶分化完好的苗,炼苗 3~5 d 后,移栽土培。

1.8 转基因植株的 PCR 检测

设计潮霉素抗性基因引物,上游引物(HYG-F):5'-CTTCTCGGGCGATTGT-3';下游引物(HYG-R):5'-CAGCGTCTCCGACCTGAT-3'。PCR 反应条件为:95℃ 变性 5 min,55℃ 退火 2 min,72℃ 延伸 2 min,72℃ 保温 10 min。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.9 转基因植株的 GUS 组织化学染色检测

构建的 p1305-B12 植物表达载体含有报告基因 *GUS-Plus*,利用 X-Gluc 进行 GUS 组织化学染色检测。取 PCR 检测阳性植株叶片,剪成小块,加入染色液{100 mmol/L PBS、pH 值 7.0、10 mmol/L Na₂EDTA、1 mmol/L K₃[Fe(CN)₆]、1 mmol/L K₄[Fe(CN)₆]、0.5% TritonX-100、20% 甲醇}中,37℃ 保温过夜。显色后,用 75% 乙醇脱色。

1.10 转化植株抗虫评价分析

对上述经 PCR 和 GUS 染色检测呈阳性的转化植株 T₂ 代进行小菜蛾离体接种试验。小菜蛾幼虫直接接种到新鲜叶片上,每株接种 20 头 2 龄幼虫。接种 2、4d 后统计小菜蛾平均质量和存活率。

2 结果与分析

2.1 B12 基因植物二元表达载体的构建

植物二元表达载体构建如图 1 所示,抗虫基因 *B12* 片段位于 pIT2 - *B12* 上,在上游引物中引入 *Nco* I 酶切位点,下游引物中引入 *Bgl* II 酶切位点。以含有抗虫基因的质粒 pIT2 - *B12* 质粒为模板,利用高保真的 DNA 聚合酶 FASTpfu 进行 PCR 扩增,与 pEASY - Blunt Simple 载体进行连接,构建 pEASY - *B12*。二元表达载体 pCambia - 1305.1 的 *Nco*I、*Bgl*II 酶切位点分别位于 1、6 bp 位点上,通过双酶切连接 pEASY - *B12* 中的 *B12* 片段,构建 p1305 - *B12* 植物二元表达载体。

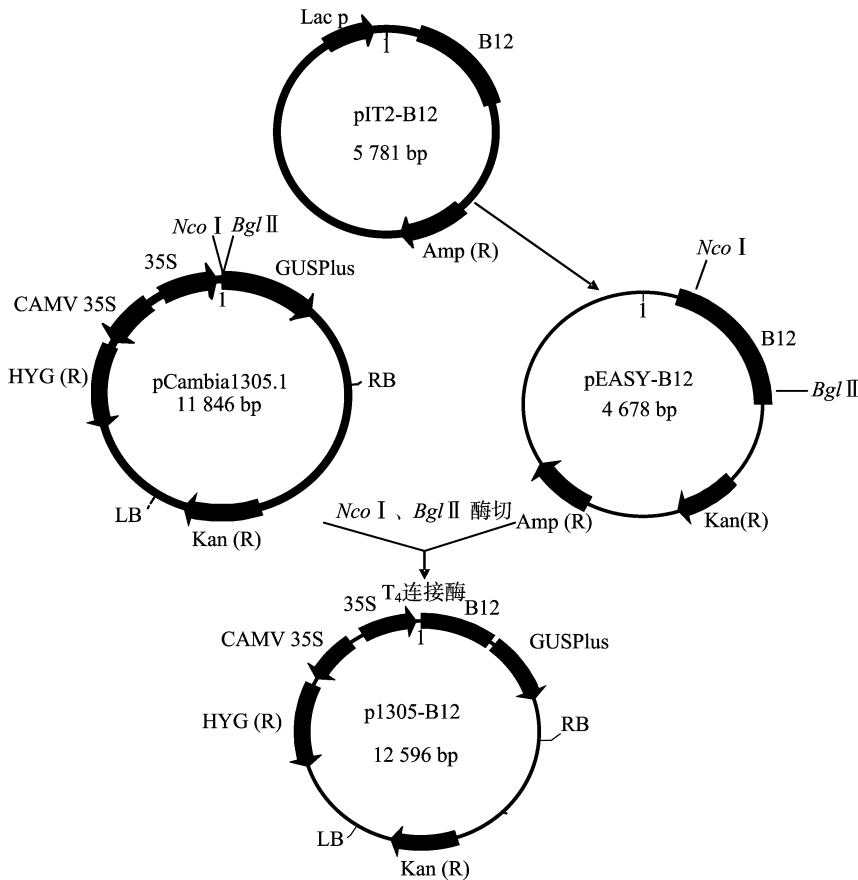
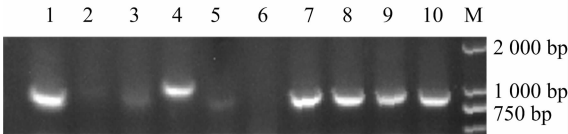


图1 B12 植物二元表达载体的构建

如图 2 所示,所构建的 p1305 - *B12* 植物二元表达载体经 PCR 检测后,阳性克隆的目的条带为 1 000 bp 左右,包含 *B12* 全序列及 p1305 载体片段;经测序比对,确定包含 *B12* 全序列,表明 p1305 - *B12* 植物二元表达载体构建成功。



1~10 为 p1305-B12 质粒的转化子

图2 二元表达载体 p1305-B12 目的基因的 PCR 分析

2.2 不同激素和 AgNO₃ 配比对油菜下胚轴、子叶芽分化频率的影响

在油菜离体下胚轴切段与子叶切段不定芽诱导的试验中,已初步明确 MSB 培养基在附加高浓度 6 - BA、TDZ 时,在下胚轴的上端切口、子叶切口处有不定芽发生;当加入 NAA 浓度超过 0.1 mg/L,达到 1 mg/L 时,诱导产生愈伤组织;当

加入 NAA 浓度为 0.1 mg/L 时,有利于不定芽的诱导;在上述培养基中添加 7.5 mg/L AgNO₃,可提高不定芽的分化效率。由表 2 可见,在本试验条件下,5mg/L TDZ + 0.1 mg/L NAA + 7.5 mg/L AgNO₃ 的配比组合可促进青杂 5 号油菜下胚轴和子叶不定芽的分化,下胚轴(含生长点)的芽分化率最高可达 90.7%,子叶的芽分化率最高可达 31.2%。

表 2 不同激素和 AgNO₃ 配比对油菜下胚轴和子叶芽分化频率的影响

MSB 培养基 (含 2 mg/L L - Pro、250 mg/L CH ₃ 、3% 蔗糖)	培养 30 d 后芽 分化频率(%)	
	下胚轴	子叶
5 mg/L 6 - BA + 0.1 mg/L NAA	34.6	20.7
5 mg/L 6 - BA + 0.1 mg/L NAA + 7.5 mg/L AgNO ₃	46.8	24.5
5 mg/L TDZ + 0.1 mg/L NAA	74.4	24.8
5 mg/L TDZ + 0.1 mg/L NAA + 7.5 mg/L AgNO ₃	90.7	31.2

2.3 不同激素配比对油菜不定芽生长的影响

NAA、IBA 同属生长素类植物生长调节剂,在本试验中添加 0.5 mg/L NAA,却不能促进不定芽的生长,继续促进分化。由表 3、表 4 可见,在使用不定芽生长激素配比(0.2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA)时,青杂 5 号不定芽生长缓慢,培养 30 d 时大多数不定芽仍未长至 3 cm 大小,生长效率仅为 5.6%;提高 IBA 浓度至 1 mg/L,超过半数的不定芽生长至 3 cm 大小,仅需 9~12 d,生长效率为 83.2%;改用 1/2 MSB+1 mg/L IBA 配比时,不定芽生长迅速,超过半数的不定芽可在 5~7 d 内长至 3 cm 大小,生长效率可达到 99.7%。

表 3 不同激素配比对不定芽生长的影响

培养基 [含 2 mg/L 脯氨酸(L-Pro)、 250 mg/L 酸水解酪蛋白(CH)]	超过半数外植体不定芽生长 至 3 cm 大小所需时间(d)
MSB+0.5 mg/L NAA+3% 蔗糖	仅分化不生长
MSB+0.2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA+3% 蔗糖	>30
MSB+1 mg/L IBA+3% 蔗糖	9~12
1/2 MSB+1 mg/L IBA+1.5% 蔗糖	5~7

表 4 不同激素配比下不定芽的生长效率

培养基 (含 2 mg/L L-Pro、250 mg/L CH)	培养 30 d 后生长率 (%)
MSB+0.5 mg/L NAA+3% 蔗糖	0
MSB+0.2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA+3% 蔗糖	5.6
MSB+1 mg/L IBA+3% 蔗糖	83.2
1/2 MSB+1 mg/L IBA+1.5% 蔗糖	99.7

注:生长率=生长至 3 cm 大小的不定芽数/外植体个数×100%。

2.4 不同激素配比对油菜分化芽生根的影响

IBA、IAA 属生长素类植物生长调节剂,在低浓度时能促进不定根的生长。由表 5、表 6 可见,生根培养基为 MSB 培养基时,30 d 后超过半数的接种苗都未长出根,生根率仅为 7.8%;生根培养基为 1/2 MSB 培养基时,超过半数的接种苗在 15~17 d 内形成完整植株,生根效率为 62.3%,根数较少,根系不发达;为缩短生根时间,本试验中添加 0.2 mg/L 低浓度的 IBA 或 IAA,当使用 1/2 MSB 培养基(附加 0.2 mg/L IBA)时,超过半数的接种苗在 7~9 d 即可形成完整植株,生根效率为 98.8%,且根数较多、根系发达;当使用 1/2 MSB 培养基(附加 0.2 mg/L IAA)时,超过半数的接种苗在 3~4 d 即开始生根,在 5~6 d 即可形成完整植株,生根率为 100.0%,

表 5 不同激素配比对不定芽生根的影响

培养基	超过半数接种苗不定芽形成 完整植株所需时间(d)
MSB+3% 蔗糖	>30
1/2 MSB+1.5% 蔗糖	15~17
1/2 MSB+0.2 mg/L IBA+1.5% 蔗糖	7~9
1/2 MSB+0.2 mg/L IAA+1.5% 蔗糖	5~6

注:生根率=生根的苗数/接种苗数×100%。表 6 同。

表 6 不同激素配比下不定芽的生根效率

培养基	培养 30 d 后的生根率(%)
MSB+3% 蔗糖	7.8
1/2 MSB+1.5% 蔗糖	62.3
1/2 MSB+0.2 mg/L IBA+1.5% 蔗糖	98.8
1/2 MSB+0.2 mg/L IAA+1.5% 蔗糖	100.0

根数较多、粗壮,根系发达。

2.5 农杆菌介导的油菜转化和转化植株的获得

将油菜栽培品种青杂 5 号的种子表面灭菌后,分别在 MS0 培养基上萌发成无菌苗。取 3~4 d 龄的无菌苗下胚轴切段在 MSB 芽分化培养基(附加 5 mg/L TDZ、2 mg/L L-Pro、250 mg/L CH、7.5 mg/L AgNO₃、0.1 mg/L NAA,pH 值 5.8)上预培养 48 h 后,将其分别用农杆菌(EHA105/p1305-B12,D_{600 nm}=0.2)感染 5 min,再接种在 MSB 芽分化培养基上与农杆菌共培养 2 d,然后将外植体材料置于附加 500 mg/L 羧苄青霉素的上述 MSB 芽分化培养基上进行抑菌培养和诱导不定芽,2 周后产生幼芽。将分化的不定芽转到 MSB 选择培养基(含 25 mg/L 潮霉素和 500 mg/L 羧苄青霉素的 MSB 芽分化培养基)上进行筛选。10 d 后,大多数分化芽的顶端变为紫色,随后白化枯死,只有少数分化芽正常生长。将能正常生长的分化芽转移到含 500 mg/L 羧苄青霉素的 1/2 MSB 生长培养基(附加 1 mg/L IBA)的上继续选择培养。经多次反复筛选后,待芽苗长至 3~4 cm 高时,从其基部切下,插入含有 25 mg/L 潮霉素、250 mg/L 羧苄青霉素的 1/2 MSB 生根培养基(附加 0.2 mg/L IAA)中诱导生根,获得完整抗性小植株。

2.6 转化植株的 PCR 检测和 GUS 组织化学染色鉴定

构建的 p1305-B12 植物表达载体含有潮霉素抗性基因,根据潮霉素抗性基因序列,设计上下游引物。提取潮霉素抗性植株叶片的基因组 DNA,经 PCR 检测后,成功转入 p1305-B12 的阳性转化植株的目的条带为 400 bp 左右(图 3)。

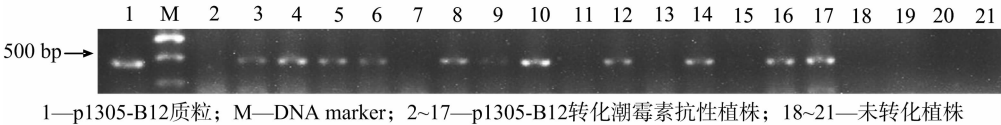
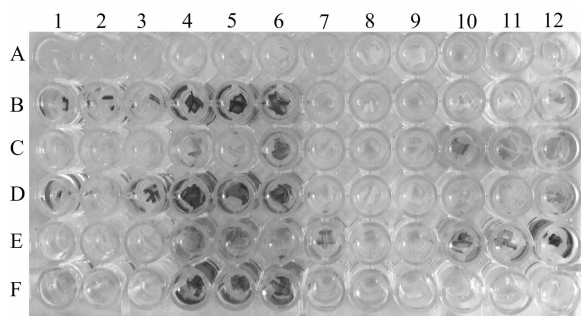


图3 潮霉素抗性植株叶片 PCR 检测电泳结果

构建的 p1305-B12 植物表达载体含有报告基因 *Gus-plus*,利用 X-Gluc 进行 GUS 组织化学染色检测。取转入 p1305-B12,并经 PCR 检测阳性的 T₀、T₁、T₂ 代植株叶片,剪成小块加入染色液中,37℃ 保温过夜。经乙醇脱色后,叶片或叶柄仍显示蓝色的为含有报告基因 *GUSPlus*,即成功转入

p1305-B12,并且所示蓝色的深浅还与报告基因的表达量有关。如图 4 中 D1~D6、E7~E12 所示,上述 T₂ 代植株 *GUS-Plus* 的表达量高,在叶柄、叶片中都有表达;而在 B7~B12、C1~C6、C7~C12、F1~F6 的 T₂ 代植株中,*GUSPlus* 的表达量较低,仅在叶片中表达,在叶柄中不表达;再如 D7~D12、



A1~A12—未转化植株叶片或叶柄(阴性对照); B1~B6—转入 pCambia1305.1 并经 PCR 检测阳性的 T₂ 代植株叶片或叶柄(阳性对照); B7~B12、C1~C6、C7~C12、D1~D6、D7~D12、E1~E6、E7~E12、F1~F6 分别为转入 p1305-B12 并经 PCR 检测阳性的 T₂ 代植株叶片或叶柄。A 行 1~3 列、7~9 列为叶片; A 行其余列为叶柄。B、C、D、E、F 行 1~3 列、7~9 列为叶柄。余列为叶片。F7~F12 为空白, 无叶片/叶柄, 只含有相应缓冲液

图4 PCR 检测阳性的 T₂ 代植株叶片 GUS 组织化学染色结果

E1~E6 所示, 上述 T₂ 代植株不表达 *GUSplus* 基因。

2.7 抗虫基因转基因植株杀虫效果评价

利用农杆菌介导的遗传转化法, 将 *B12* 抗虫基因分别导入油菜青杂 5 号的无菌实生苗 3~4 d 苗龄的下胚轴切段细胞, 分化不定芽, 并经潮霉素多次反复筛选, 共获得转 *B12* 基因植株 22 株。对这些转基因的潮霉素抗性植株进行了 PCR 检测和 GUS 组织化学染色分析, 将结果均呈阳性且 GUS 表达量最高的 2 株转基因 T₀ 代植株移栽入盛有土壤的盆中, 全部存活。将其挂牌标记并套袋自交, 获得了 T₀ 代自交成熟种子。分别在卡那霉素的筛选培养基 MS0 上进行萌发检测试验, 统计遗传分离比, 绝大部分分离比符合孟德尔定律的 3:1。选择能正常生根的 T₁ 代绿苗, 套袋自交, 获得了 T₁ 代自交成熟种子; 再次经卡那霉素萌发试验, PCR 检测和 GUS 组织化学染色验证, 获得 T₂ 代绿苗, 移栽入盛有土壤的盆中, 采取幼叶进行 X-Gluc 组织化学染色后, 选择表达量高的植株叶片进行室内小菜蛾(2 龄幼虫) 的杀虫试验。对照植株为转入 pCambia1305.1 并经卡那霉素萌发试验, PCR 检测和 GUS 组织化学染色验证的 T₂ 代植株。

接种小菜蛾 2、4 d 后, 阳性转化植株叶片喂养的小菜蛾平均质量与对照植株无显著差异, 存活率为 85%, 略低于对照植株(100%)。以上抗虫接种试验结果表明, 阳性转化植株对小菜蛾抗性较低。

3 结论与讨论

本研究以甘蓝型油菜品种青杂 5 号下胚轴外植体为受体, 建立了甘蓝型油菜下胚轴高效再生系统, 优化的分化培养基为 MSB + 5 mg/L TDZ + 7.5 mg/L AgNO₃ + 0.1 mg/L NAA + 2 mg/L L-pro + 250 mg/L CH + 3% 蔗糖; 生长培养基为 1/2 MSB + 1 mg/L IBA + 2 mg/L L-pro + 250 mg/L CH + 1.5% 蔗糖; 生根培养基为 1/2 MSB + 0.2 mg/L IAA + 1.5% 蔗糖。在此基础上, 构建抗虫基因的双元表达载体, 利用农杆菌的介导转化油菜下胚轴, 并利用 25 mg/L 潮霉素、500 mg/L 羧苄青霉素进行筛选。对获得的转基因植株叶片基因组 DNA 的 PCR 检测及 GUS 组织化学染色分析证明, 抗虫基因已整合到青菜植株的细胞核基因组中, 并能正常表达。挑选

表达量高的阳性转基因植株子一代, 通过小菜蛾接种试验对该抗虫基因进行杀虫效果评价。后期准备对抗虫基因进行密码子优化或基因改造, 以提高表达量, 从而提高杀虫效果。

研究表明, 较高的 TDZ 浓度和较低的 NAA 浓度有利于油菜下胚轴切段中芽的诱导和分化, 而前人的研究中使用高浓度的 6-BA^[3]。另外, 诱导培养基中加入 AgNO₃ 是为了促进油菜愈伤组织形成不定芽^[18]。已有研究表明, 促进油菜愈伤组织形成不定芽的适宜 AgNO₃ 浓度为 5 mg/L^[19]。由于品种差异, 本试验的 AgNO₃ 浓度选择为 7.5 mg/L。

本研究建立了甘蓝型油菜青杂 5 号的下胚轴高效再生系统, 青杂 5 号的下胚轴分化率最高为子叶的 3 倍, 可达 90% 左右。使用优化的芽生长培养基, 青杂 5 号油菜的幼芽生长仅需 1~2 周, 形成完整根部仅需 1 周; 而在前人的研究中, 芽生长需要 2~4 周, 形成完整根部需要 2 周^[19]。

筛选获得的高表达量转 *B12* 基因 T₂ 代阳性植株对小菜蛾抗性较低, 这主要与抗虫基因的特异性以及在转基因油菜植株中的表达量有关。抗虫基因 *B12* 的原核表达蛋白需要达到较高的浓度(数据未显示)才能对小菜蛾有较好的致死率, 而在转基因油菜叶片中表达量无法达到很高的浓度, 如外源表达蛋白在叶片可溶性蛋白中含量约为 0.01%^[20], 因此抗虫效果不是很好。这也有可能油菜中密码子的使用偏好性有关, 抗虫基因需要进行密码子优化, 以提高表达量。

参考文献:

- [1] 杜建中, 孙毅, 曹秋芬, 等. 甘蓝型油菜的遗传转化[J]. 生物技术通讯, 2008(5): 772-776.
- [2] 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.
- [3] 王艳, 曾幼玲, 张富春, 等. 新疆甘蓝型油菜下胚轴的组织培养和植株再生研究[J]. 新疆农业科学, 2005, 42(1): 24-28.
- [4] 刘海燕, 隆小华, 刘兆普. 南盐油 1 号油菜的组织培养及植株再生研究[J]. 江苏农业科学, 2010(3): 59-61.
- [5] 裴冬丽. 白菜型油菜高效离体再生体系的建立[J]. 北方园艺, 2011(1): 127-129.
- [6] 夏鸿亮, 汪洪. 沪油 16 号油菜的组织培养和植株再生[J]. 种子, 2011, 30(10): 92-93.
- [7] Pua E C, Mehra - Palta A, Nagy F, et al. Transgenic plants of *Brassica napus* L. [J]. Nature Biotechnology, 1987, 5(8): 815-817.
- [8] Damgaard O, Rasmussen O. Direct regeneration of transformed shoots in *Brassica napus* from hypocotyl infections with *Agrobacterium rhizogenes* [J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17(1): 1-8.
- [9] Ovesná J, Ptáček L, Opatrný Z. Factors influencing the regeneration capacity of oilseed rape and cauliflower in transformation experiments [J]. Biologia Plantarum, 1993, 35(1): 107-112.
- [10] 田志宏, 孟金陵. 甘蓝型油菜原生质体培养及植株再生的研究[J]. 中国油料作物学报, 2002, 24(2): 11-14.
- [11] Ooms G, Bains A, Burrell M, et al. Genetic manipulation in cultivars of oilseed rape (*Brassica napus*) using *Agrobacterium* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1985, 71(2): 325-329.
- [12] 李学宝, 郑世学, 董五辈, 等. 甘蓝型油菜抗虫转基因植株及其抗性分析[J]. 遗传学报, 1999, 26(3): 262-268, 286.
- [13] 王新发, 王汉中, 刘贵华, 等. 导入双价基因的转基因杂交油菜

程 孝,焦翠翠,孙丙耀. 水稻稃片白化突变体 Ds 标记基因的外显子改组分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):22-25.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.006

水稻稃片白化突变体 Ds 标记基因的外显子改组分析

程 孝,焦翠翠,孙丙耀

(苏州大学医学部基础医学与生物科学学院,江苏苏州 215123)

摘要:以含 Ds 元件的水稻稃片白化突变体为材料,采用 TAIL-PCR 技术分离 Ds 侧翼序列,并基于 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)扩增 Ds 标记基因 cDNA 的 3'端序列,分析突变体基因组上 Ds 插入引起的标记基因外显子改组现象。结果显示,水稻稃片白化突变体基因组含 2 个 Ds 拷贝,分别插入于 1 号和 3 号染色体上的类 CBS 结构域蛋白基因和推定的氧化还原酶基因的编码区;cDNA 和基因组 DNA 经比对分析显示,Ds 插入后,2 个基因均导致基因的外显子改组,类 CBS 结构域蛋白基因和推定的氧化还原酶基因分别出现部分内含子序列和 Ds 序列的外显子化现象;Ds 标记基因的编码区虽都出现了截短,但 RACE 扩增证实其在 Ds 插入后仍可表达出成熟的 mRNA,这意味着 Ds 等转座元件介导的外显子改组,可能在基因组进化和蛋白质组多样化中发挥重要作用。

关键词:水稻;稃片;白化突变体;Ac/Ds;外显子改组;3'-RACE

中图分类号:S511.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)12-0022-04

外显子改组被认为是内含子重组产生外显子新组合的自然过程^[1-3],是新基因形成的重要分子机制。近几年研究显示,转座元件在介导外显子改组及产生新基因过程中发挥重要作用^[4-5]。同时,转座元件序列的外显子化也被发现与新基因的产生和种内多样性有关^[6]。目前,有关转座元件外显子化的研究主要集中在灵长类反转录转座元件 Alu^[7],而植物转座元件外显子化的报道相对较少。玉米基因组的 Ac/Ds 转座元件是最早发现的 *hAT* 超家族(*hobo*/Ac/*Tam*³)成员,最近,Huang 等分析转基因烟草中 Ds 元件插入 *EPSPS* 标记基因后的 Ds 外显子化发现,Ds 元件偏爱为外显子化提供剪接供体位点^[8]。本研究旨在以水稻品种 Dongjin Ac/Ds 插入突变库中筛选到 1 株含 Ds 插入的稃片白化突变体材料,在分离 Ds 侧翼序列的基础上,采用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)扩增 Ds 标记基因的 cDNA 序列,通过分析基因转录

水平表达产物,以分析 Ds 插入引起的相关基因外显子改组现象。

1 材料与方法

1.1 材料

稃片白化突变体来源于水稻品种 Dongjin (*Oryza sativa* L. var. *japonica* cv. Dongjin)的 Ac/Ds 插入突变体系,由韩国国立庆尚大学 Han Chang-deok 教授实验室提供,种子播种并栽培于江苏太湖地区农业科学研究所试验田。取田间栽培的野生型与突变体水稻完整植株,带回实验室观察表型,并取其幼嫩的新鲜叶片,提取植物基因组 DNA 用于后续试验研究。稃片白化突变体水稻与野生型水稻在抽穗期时表型及稃片存在明显差异,突变体水稻稃片表现出白化的特征(图 1)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据转座子 Ds 的序列特点,在 Ds 3'末端设计引物 SP1、SP2、SP3,分别与随机简并引物 AD1、AD2、AD3、AD4 搭配,进行温度不对称交错 PCR(TAIL-PCR)的第 1、第 2、第 3 轮扩增;以 TAIL-PCR 扩增获得的侧翼于 Ds 序列的水稻基因组序列设计 3'-RACE 扩增特异引物。除 3'-RACE 的通用引物外,其他引物均采用 Primer Premier 6.0 和 Oligo 7 软件进行设计。引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成,引物序列见表 1。

收稿日期:2015-04-06

基金项目:江苏省苏州市应用基础研究计划-农业部分(编号:SYN201204)。

作者简介:程 孝(1989—),女,安徽人,硕士,主要从事植物结构与发育生物学研究。E-mail:chengxiaol372113@163.com。

通信作者:孙丙耀,副教授,主要从事植物分子遗传学研究。Tel:(0512)65882833;E-mail:sunbingyao@suda.edu.cn。

亲本及其对菌核病抗性的研究[J]. 植物学通报,2005,22(3):292-301.

[14]刘宏波,郭 翔,崔鹏,等. 甘蓝型油菜抗病虫双价基因转化体系的建立[J]. 核农学报,2011,25(1):26-31.

[15]余青兰. 高产双低高含油量甘蓝型春油菜杂交种青杂 5 号(305)的选育[J]. 陕西农业科学,2007(4):56-57.

[16]Murashige T,Folke S. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture[J]. Physiologia Plantarum,1962,15(3):473-497.

[17]Gamborg O L,Miller R A,Ojima K. Nutrient requirements of

suspension cultures of soybean root cells[J]. Experimental Cell Research,1968,50(1):151-158.

[18]杨长友,袁中厚,郑小敏,等. 甘蓝型油菜高效离体再生体系的建立[J]. 生物技术通报,2013(1):111-115.

[19]Bhalla P L,Singh M B. Agrobacterium-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*[J]. Nature Protocols,2008,3(2):181-189.

[20]Mason H S,Lam D K,Arntzen C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plant[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,1992,89(24):11745-11749.