

王全智,魏 跃. 农杆菌介导 *FaCBL1* 基因转化红颜草莓的研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(12):39-42.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.12.009

# 农杆菌介导 *FaCBL1* 基因转化红颜草莓的研究

王全智,魏 跃

(江苏农林职业技术学院/江苏现代园艺工程技术中心,江苏镇江 212400)

**摘要:**为了建立草莓品种红颜(*Fragaria × ananassa* Duch. Benihoppe)的高效稳定转基因体系,以草莓红颜组培苗的叶片作为试验材料,对影响基因的因子进行优化,获得稳定高效的转基因体系。结果表明,农杆菌菌液  $D_{600\text{nm}} = 0.4$ 、侵染时间 20 min、培养 3 d 后草莓抗性芽诱导率较高。用 350 mg/L 羧苄青霉素(carbenicillin,简称 Cb)作为抑菌抗生素能够有效抑制农杆菌而不伤害草莓叶片;用 20 mg/L 卡那霉素(kanamycin,简称 Kan)作为筛选抗生素能够尽可能多的去除非抗性芽。荧光定量 PCR 检测结果表明,草莓 *FaCBL1* 基因已经成功转入草莓基因组中。

**关键词:**农杆菌;草莓;*FaCBL1* 基因;转化

**中图分类号:**S668.401 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)12-0039-03

八倍体栽培草莓品种红颜(*Fragaria × ananassa* Duch. Benihoppe)是由日本引入我国栽培的优良品种,该品种果实果形正,鲜食口感好,丰产性好,品质优良,适于设施栽培,目前已经成为我国栽培面积较大的一个品种,尤其是在江、浙地区,栽培面积较大,占草莓总栽培面积的 50% 以上。但是由于该品种耐储性差,货架期短,而且该品种抗病性差,育苗过程极易感染炭疽病,成苗率低,设施栽培过程中容易感染白粉病和灰霉病。因此,亟待对该品种进行改良,而传统的育种方法周期长,见效慢。近年来,由于转基因技术在作物品种改良中的广泛应用,也有多项关于草莓基因改良的报道。因此,用分子育种的方法改良草莓基因在未来草莓产业的发展中是一条必经之路,能够为草莓分子育种开辟一条新途径,对红颜草莓的推广种植和提高红颜草莓生产的经济效益有重要的意义。

钙调磷酸酶 B 类似蛋白(calcieneurin B-like,简称 CBL)是在植物抗逆中起着重要作用的一类基因家族。其中 *CBL1* 基因在抗逆以及果树果实发育、品质形成等方面都有重要的作用<sup>[1]</sup>。而草莓果实的发育是果树学科研究的重要问题之一,研究草莓果实成熟发育对培育草莓优良品种有重要意义,因此,研究草莓 *FaCBL1* 基因在草莓果实发育中的作用及其功能是未来草莓分子生物学研究中的一条重要途径<sup>[2]</sup>。而基因功能的验证有赖于一个高效稳定的遗传转化体系。因此,建立一个高效稳定的 *FaCBL1* 基因遗传转化体系,能够为探讨逆境相关基因在果实发育中的作用奠定一个良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

收稿日期:2016-03-04

基金项目:江苏省农业三新工程(编号: SXGC[2015]312);江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(15)1021]。

作者简介:王全智(1981—),男,安徽亳州人,硕士,农艺师,主要从事蔬菜栽培及分子生理研究。E-mail:1109238212@qq.com。

试验选用草莓品种红颜组培苗,由江苏农林职业技术学院农学院园艺系组织培养实验室保存。组培苗在 MS + 0.5 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA 的培养基上继代培养备用。取草莓叶片剪去叶尖和叶缘,将叶片剪成 3 mm × 3 mm 的叶块备用。

### 1.2 菌株、载体和基因

本试验所用农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)是 GV3101,由江苏现代园艺工程技术中心实验室保存。GV3101 含有植物表达载体 pK7WG2D,该载体上含有的目的基因是 *FaCBL1* 基因,并带有  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因(*GUS*)和卡那霉素(Kan)抗性的新霉素磷酸转移酶基因(*npt II*)。

### 1.3 培养基及培养条件

共培养培养基( $G_1$ ): MS + 4.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IBA;筛选培养基( $G_2$ ): MS + 4.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IBA + 20 mg/L Kan + 350 mg/L Cb;伸长培养基( $G_3$ ): MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 20 mg/L Kan + 350 mg/L Cb;生根培养基( $G_4$ ): MS + 0.1 mg/L IBA + 25 mg/L Kan + 300 mg/L Cb。所有培养基中均附加琼脂 7 g/L、蔗糖 30 g/L。培养条件为光—暗周期 16 h—8 h,光照度 2 000 ~ 3 000 lx,温度 23 ~ 25 ℃。培养 55 d 后统计数据。

### 1.4 转基因方法

1.4.1 农杆菌的培养 将保存的菌转移到附加 100 mg/L 壮观霉素的 LB 固体培养基上,28 ℃ 倒置培养 2 ~ 3 d,长出单菌落后,挑取单菌落放于附加 100 mg/L 壮观霉素的 LB 液体培养基中,28 ℃ 振荡培养至菌液  $D_{600\text{nm}}$  为 0.8 ~ 1.2,室温下 5 000 r/min 离心 10 min,收集菌体并用新鲜的 MS 液体培养基活化菌体。

1.4.2 叶片转化方法 首先将叶片剪到新鲜的 MS 液体中,剪好后放在活化好的液体菌液中侵染,侵染以后的叶片用无菌滤纸吸干表面残留的菌液后接种于  $G_1$  培养基上共培养。共培养结束后,将外植体转入  $G_2$  筛选培养基上进行选择培养和再生,28 d 后更换 1 次新的筛选培养基,待抗性芽长出后,将抗性芽转入  $G_3$  伸长培养基上生长,40 d 后,将抗性芽从茎基部切下,转入  $G_4$  生根培养基上生根,获得完整的抗

性苗。

1.4.3 植物筛选抗生素浓度的确定 将叶片分别接种于含有 Kan 浓度为 10、15、20、25 mg/L 的  $G_1$  培养基上,暗培养 14 d 后转至光下再培养 30 d,统计叶片褐化率、愈伤形成率 and 不定芽再生率,确定最适的 Kan 浓度。

1.4.4 抑制农杆菌抗生素浓度的选择 将共培养后的叶片分别接种于含有 Cb 浓度为 200、350、500 mg/L 的  $G_1$  培养基上,经暗培养 14 d,筛选培养至 40 d 后,观察农杆菌的抑菌程度并确定最适的 Cb 浓度。

1.4.5 菌液浓度、侵染时间、共培养时间的优化选择 培养菌液的  $D_{600\text{ nm}}$  分别设为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6;叶片的浸染时间分别设为 10、15、20、25、30 min;共培养时间分别设为 1、2、3、4、5 d;确定最佳的菌液浓度、侵染时间、共培养时间。

## 1.5 评价指标与数据调查

用 *GUS* 基因的瞬时表达率来选择最佳的菌液浓度、侵染时间、共培养时间。 $GUS$  瞬时表达率 = (显示蓝色的叶片数/所剪的总叶片数)  $\times 100\%$ 。

## 1.6 转 *FaCBL1* 基因草莓植株的检测

### 1.6.1 检测方法

1.6.1.1 *GUS* 染色 转化过程中获得的抗性芽长出叶片后,剪取 3 mm  $\times$  3 mm 的叶块装于含 *GUS* 染色液的离心管中,于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中进行 *GUS* 组织染色,16 ~ 24 h 后取出叶片,用 70% 乙醇脱色,至叶片中的叶绿素完全脱除为止。叶绿素脱除干净后,叶片显示蓝色的为转基因植株,显示白色的为非转基因植株。

1.6.1.2 荧光定量 PCR 检测 提取转基因植株和对照植株总 RNA 进行反转录获得 cDNA,采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR,简称 RT-qPCR) 的方法,检测基因的相对表达量。相关基因和内标 *Actin* 基因 RT-qPCR 扩增的总反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,包括 10  $\mu\text{L}$  SYBR premix Ex *Taq* 混合液,2  $\mu\text{L}$  cDNA,1  $\mu\text{L}$  上游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ),1  $\mu\text{L}$  下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ),6  $\mu\text{L}$  无核酸污染的灭菌水。反应程序:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 20 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,40 个循环,每次循环的第 3 步进行荧光采集。最后从 60  $^{\circ}\text{C}$  升温至 95  $^{\circ}\text{C}$ ,每隔 30 s 上升 0.5  $^{\circ}\text{C}$ ,共 71 个循环。检测其荧光值,绘制熔点曲线。标准品 cDNA 和待测样品均设置 3 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 卡那霉素浓度对草莓转化的影响

转基因植物筛选抗生素的浓度应当是在不伤害植物本身的情况下能够长愈伤,而不能够诱导过多的芽,因此叶片接种于不同浓度 Kan 的培养基中培养 30 d 后,需要统计叶片的黄化率和白化率。随着培养基中 Kan 浓度的增加,外植体失绿、黄化、皱褶、坏死的现象加重,当 Kan 浓度达到 30 mg/L 时,外植体黄化,而且没有再生芽,可见 Kan 对转化外植体再生率有很大影响。由图 1 可知,在 Kan 浓度为 20 mg/L 时,叶片褐化率达到 75%,有一定数量的愈伤组织形成,但是有少量不定芽生成。因此,Kan 浓度达到 20 mg/L 时能够部分抑制草莓不定芽的再生,可作为草莓转基因过程中植物筛选抗生素 Kan 的最佳浓度。

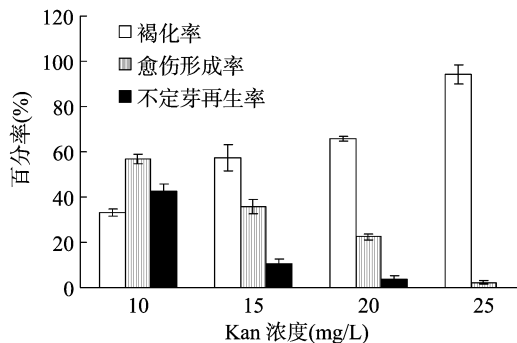


图1 Kan 浓度对红颜草莓叶片不定芽再生的影响

### 2.2 羧苄青霉素浓度对草莓转化的影响

本试验使用转基因中常用的 Cb 抗生素抑制农杆菌,Cb 对草莓的再生会产生一定的影响。低浓度的 Cb 在转基因初期一般都能够抑制大部分农杆菌的生长,但在后期移至光下培养时不能够很好地抑制农杆菌的生长。本试验中,在 Cb 浓度为 350 mg/L 时可以完全抑制农杆菌的生长,而且对草莓外植体的再生率影响不大。因此,可以用选用 Cb 浓度为 350 mg/L 作为抑制培养基中农杆菌生长的最佳浓度。

### 2.3 菌液浓度、侵染时间、共培养时间的选择

由图 2 可知,菌液  $D_{600\text{ nm}}$  在 0.1 ~ 0.4 之间时,随  $D_{600\text{ nm}}$  的增加,*GUS* 瞬时表达率随之上升;在  $D_{600\text{ nm}} = 0.4$  时,*GUS* 瞬时表达率最高。菌液浓度过高会导致叶片切口处褐化,外植体容易死亡;浓度过低农杆菌数目不足,会使转化效率降低。因此, $D_{600\text{ nm}} = 0.4$  时菌液浓度为最佳。

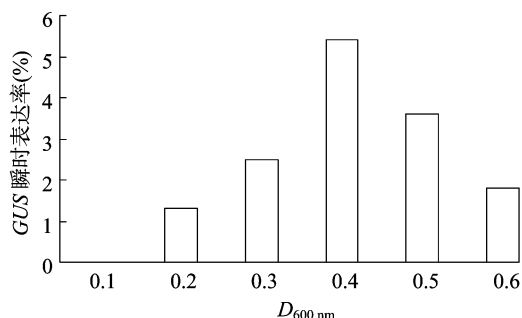


图2 菌液浓度对 *GUS* 瞬时表达率的影响

由图 3 可知,随侵染时间的增加,*GUS* 瞬时表达率随之上升,侵染外植体 20 min 时,*GUS* 瞬时表达率达到最高值。侵染时间过长,外植体容易褐化变烂。因此,最佳侵染时间选为 20 min。

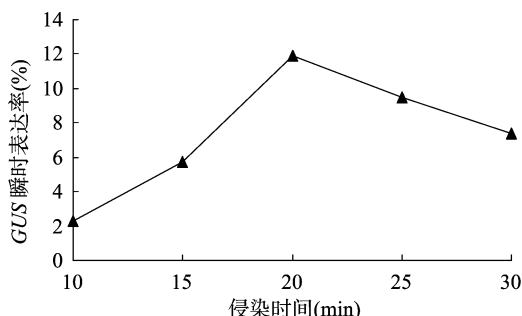


图3 侵染时间对 *GUS* 瞬时表达率的影响

由图 4 可知,外植体在共培养 2 d 时开始有 *GUS* 瞬时表达,随着共培养时间的加长,*GUS* 瞬时表达率逐渐升高,但是在共培养 4 d 时农杆菌的生长已经很难被抑制。因此,以共培养 3 d 为最佳。

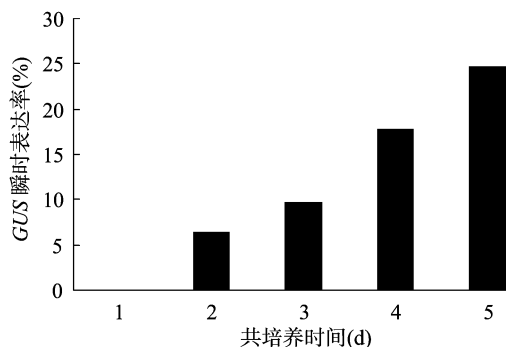


图4 共培养时间对*GUS*瞬时表达率的影响

#### 2.4 抗性芽的伸长、生根

将生长健壮的抗性芽转入伸长培养基中,抗性芽能很好地长大、增殖。将增殖的抗性苗分株,单株放入生根培养基中可以正常生根,生根率达到 90% 以上。

#### 2.5 转基因植株的 *GUS* 组织化学染色检测

通过根瘤农杆菌介导 *FaCBL1* 基因转红颜草莓,共获得 8 株转基因植株,其中 5 株 *GUS* 阳性植株,*GUS* 染色鉴定的部分结果如图 5 所示。



图5 转基因草莓叶片的 *GUS* 染色结果

#### 2.6 转基因草莓植株的荧光定量 PCR 检测

对 *GUS* 染色为阳性的 5 株草莓转基因植株进行荧光定量 PCR 检测。提取 PCR 阳性植株和阴性对照植株的总 RNA,以其为模板进行反转录,再以反转录合成的 cDNA 第 1 链为模板进行荧光定量 PCR 扩增。由图 6 可知,5 个转基因株系的 *FaCBL1* 基因与对照相比都有较高的表达量,且均高于对照,说明基因已经完全转入草莓中。

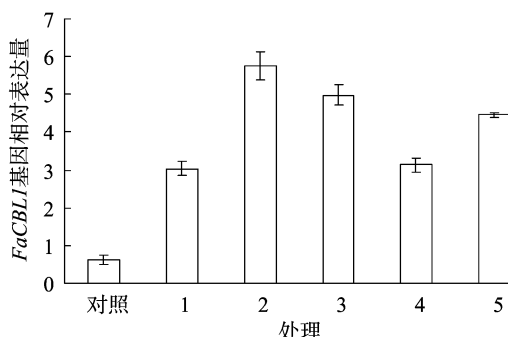


图6 转基因草莓的 *FaCBL1* 基因表达量检测结果

### 3 讨论

草莓作为一种兼具观赏和高营养价值的水果,目前在国内外种植面积日益增加。尤其在我国的,随着观光农业的不断发展,种植草莓将会是我国观光农业发展的一项重要经济收入。目前,我国江、浙、沪地区的城郊已经开始大面积种植草莓,集观光旅游于一体,还能够增加农民的收入。

基因工程的不断发展为草莓育种提供了新的技术手段,可以针对草莓栽培中不能够解决或者难以解决的问题有目的地对草莓进行基因改良,而不改变草莓原有的特性。目前在草莓的转基因中,最常用的方法就是农杆菌转化法,这个方法操作较为简单,但是转化效率低、转化重复性差。本试验通过转化方法的优化,建立了一个高效稳定的基因转化体系,对影响遗传转化的因素进行了优化。

基因转化中要使用选择性抗生素有效地筛选转化成功的细胞。本试验中所用的载体上带有的筛选基因标记是 Kan,关于 Kan 的浓度已经有许多的研究报道<sup>[3-4]</sup>,在草莓的遗传转化中 Kan 的浓度一般在 20 ~ 30 mg/L 之间<sup>[5]</sup>,本试验中选择 Kan 的最佳浓度为 20 mg/L。

农杆菌介导法中为了抑制农杆菌常用 Cb 作为抑菌性抗生素,本试验对 3 种 Cb 浓度作了比较,结果表明,使用 350 mg/L Cb 可以有效抑制农杆菌的生长而对外植体造成的伤害不大。这与其他研究者得出的结论<sup>[6-8]</sup>不同,可能是由于菌株不同或者菌株活性不同,所用抗生素种类以及浓度也有所不同<sup>[9]</sup>所致。

菌液的浓度和侵染时间对遗传转化有很大的影响,菌液浓度过高,对植物材料的毒害较大,容易导致外植体褐化、坏死,而且后期用抑菌抗生素除菌也很困难;菌液浓度过低,农杆菌数目不多,侵染能力较弱,转化效率也就降低,因此要选择适宜的菌液浓度才能有效地提高转化效率。侵染时间过长容易导致外植体中毒死亡,侵染时间太短,农杆菌不能充分被受伤细胞吸收,转化效率较低,因此,掌握好侵染时间有助于提高遗传转化率。本试验结果表明, $D_{600\text{ nm}} = 0.4$  时的菌液浓度侵染外植体 20 min 效果最佳,这与张红梅等的结论<sup>[10-13]</sup>一致。

本试验通过优化一系列的转化条件,建立起一个稳定有效的转基因体系,能够为今后草莓的基因改良提供借鉴。

#### 参考文献:

- [1] 蒋天梅,殷学仁,王 平,等. 乙烯调控非跃变型果实成熟衰老研究进展[J]. 园艺学报,2011,38(2):371-378.
- [2] 张 勇,汤浩茹,罗 娅,等. 草莓 *FaCBF1* 基因的克隆及表达分析[J]. 园艺学报,2014,41(2):240-248.
- [3] 张志宏,吴禄平. 草莓主栽品种 Tudla 遗传转化体系的建立[J]. 农业生物技术学报,1998,6(2):200-204.
- [4] 金万梅,尹淑萍,鲁韧强,等. *GO* 基因对草莓遗传转化及抗病性鉴定[J]. 分子植物育种,2005,3(6):797-800.
- [5] 秦永华,张上隆. 草莓转基因研究进展[J]. 遗传,2007,29(2):150-156.
- [6] Mathews H, Wagoner W, Kellogg J, et al. Genetic transformation of strawberry: stable integration of a gene to control biosynthesis of ethylene[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant,1995,31(1):36-43.

李先良,李居宁,彭春雷. 荆半夏叶柄一步成苗组培快繁体系的优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(12):42-44.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.12.010

# 荆半夏叶柄一步成苗组培快繁体系的优化

李先良<sup>1</sup>, 李居宁<sup>2</sup>, 彭春雷<sup>1</sup>, 赵志常<sup>3</sup>

(1. 荆楚理工学院生物工程学院,湖北荆门 448000; 2. 荆楚理工学院科技处,湖北荆门 448000;

3. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部华南作物基因资源与种质创制重点开发实验室,海南儋州 571737)

**摘要:**以竹叶型荆半夏叶柄为外植体,研究 6-BA、2,4-D 对半夏一步成苗的影响,以及多效唑(PP<sub>333</sub>)、茉莉酸甲酯(MJ)、蔗糖对块茎大小的影响。结果表明,提高 6-BA 浓度有利于叶柄诱导率和平均每个叶柄形成块茎数提高,添加低浓度 2,4-D 有助于提高平均每个叶柄形成块茎数;单因素试验表明,添加多效唑和茉莉酸甲酯、增加蔗糖浓度均能增加块茎直径;正交试验表明,4 个因素对半夏块茎直径的影响顺序为 6-BA 浓度、蔗糖浓度、茉莉酸甲酯浓度、多效唑浓度。综合考虑,荆半夏一步成苗较适宜的培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L PP<sub>333</sub>+2.0 μmol/L MJ+60 g/L 蔗糖。

**关键词:**荆半夏;叶柄;一步成苗;块茎直径;组培快繁;培养基优化

**中图分类号:** S567.23+9.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)12-0042-03

半夏(*Pinellia ternata*)是天南星科半夏属的一种多年生草本植物,也是一种以块茎入药的传统中药材,主要有润燥化痰、降逆、止呕等功效<sup>[1]</sup>。近年来研究发现,半夏还有抗早孕、抗肿瘤、降血脂、护肝等功能<sup>[2]</sup>。据统计,在中药处方中,半夏使用频率居第 22 位<sup>[3]</sup>。半夏需求量大,且野生资源匮乏。种茎是半夏人工栽培的主要成本之一,因此通过高效的方法生产半夏种茎是提高半夏人工栽培效益的有效途径之一。组培快繁作为一种高效繁殖方法,被应用到半夏种茎的繁殖研究中。其中,半夏一步成苗研究较多,通过该方法接种到培养基上的外植体可直接形成完整植株,从而可减少组培快繁中分化成苗的步骤。一步成苗法具有再生周期短、易操作、培养程序简单等优势,展现了大规模工厂化生产潜能<sup>[4]</sup>。另外,一步成苗外植体的来源相对广泛,叶片、珠芽及块茎均可作为外植体<sup>[4-7]</sup>。在一步成苗过程中,不同外植体一般会经历一段愈伤组织阶段,之后愈伤组织分化成苗。分化出的

半夏苗可以移栽,也可将产生的块茎直接作为种茎使用。由于种苗存在运输困难、移栽相对麻烦等问题,因此一步成苗以其产生的块茎为好。有文献报道,外植体可在培养基上形成块茎<sup>[8-9]</sup>,但其增殖率不高<sup>[6]</sup>。另外,作为栽培用的种茎,其直径大小在 1 cm 左右较好<sup>[10]</sup>。因此,种茎大小也是衡量一次成苗法的指标之一。本研究以荆半夏叶柄为外植体,研究不同激素组合、蔗糖浓度对一步成苗法产生块茎数量和大小影响,探索并优化叶柄外植体一步成苗技术体系,旨在为推进半夏种茎组培快繁的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

半夏取自湖北省荆门市京山县永隆镇。叶柄为其中竹叶形半夏叶柄。

### 1.2 方法

1.2.1 6-BA、2,4-D 对半夏一步成苗的影响 叶柄灭菌后,切成 1.5 cm 左右,平躺接入 MS 培养基,培养基分别添加 0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L 6-BA、1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D、1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D、1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D。

1.2.2 多效唑(PP<sub>333</sub>)、茉莉酸甲酯(MJ)、蔗糖对半夏一步成苗的影响 以 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D+

收稿日期:2016-10-07

基金项目:国家自然科学基金(编号:31471850);湖北省荆门市科技局科学基金(编号:110588)。

作者简介:李先良(1976—),男,博士,副教授,研究方向为园艺植物遗传改良和分子生物学。E-mail:libusher@sina.com。

通信作者:赵志常,副研究员,研究方向为热带果树遗传育种与分子生物学。E-mail:zhaozhichang2001@163.com。

[7] Oosumi T, Gruszecki H A, Blischak L A, et al. High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics[J]. *Planta*, 2006, 223(6): 1219.

[8] Barceló M, Elmansouri I, Mercado J A, et al. Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, 54(1): 29-36.

[9] 金建凤, 高强, 陈勇, 等. 转移拟南芥 *CBF1* 基因引起水稻植株脯氨酸含量提高[J]. *细胞生物学杂志*, 2005, 27(1): 73-76.

[10] 张红梅, 王俊丽. “全明星”草莓叶片遗传转化体系的建立[J]. *生物技术*, 2005, 15(3): 68-70.

[11] 王俊丽, 葛会波, 彭士琪, 等. 草莓外源 *LEAS* 基因的导入[J]. *园艺学报*, 2003, 30(3): 322-324.

[12] 张志宏, 吴禄平, 代红艳, 等. 草莓主栽品种再生和转化的研究[J]. *园艺学报*, 2001, 28(3): 189-193.

[13] 那杰, 王关林, 夏然, 等. 草莓 *annfap* 基因反义融合表达载体构建及转基因植株的获得[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(3): 582-586.