

研究报告

Research Report

普那菊苣高效再生体系建立和遗传转化研究

宋书锋¹ 曹凤² 杨培志³ 陈明利² 李传山² 郭蔼光^{1,2*}

1 西北农林科技大学生命科学学院, 杨凌, 712100; 2 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌, 712100; 3 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌, 712100

* 通讯作者, guoaiguang@yahoo.com.cn

摘要 普那菊苣为菊科多年生草本植物, 从国外引种后已在我国得到广泛种植。普那菊苣草质柔嫩, 适口性优良, 营养丰富, 牛、羊、猪、鱼、兔极喜食, 是一种非常优良的牧草, 具有广阔的发展前景。本研究通过对不同激素浓度配比实验, 建立普那菊苣的高频再生体系, 结果表明 MS+6-BA 2.0mg/L+IBA 0.1mg/L 培养基可高效诱导愈伤组织和芽的分化, 1/2MS 培养基可快速诱导根的生成, 形成再生植株。通过构建植物表达载体 pBI121-GFP, 利用农杆菌介导转化普那菊苣以探寻高效的普那菊苣转化体系, 结果显示以农杆菌 LBA4404 为介导菌株、以叶片为转化受体、3d 预培养时间和 3d 共培养时间以及 350mg/L 羧苄青霉素和 40mg/L 卡那霉素筛选浓度转化效果较好, 为利用普那菊苣生产动物口服型疫苗建立了初步的技术基础。

关键词 普那菊苣(*Cichorium Intybus* L.), 组织培养, 根癌农杆菌

High Efficient System Establishment on Plant Regeneration and Study on Genetics Transformation in Puna Chicory (*Cichorium Intybus* L.)

Song Shufeng¹ Cao Feng² Yang Peizhi³ Chen Mingli² Li Chuanshan² Guo Aiguang^{1,2*}

1 College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, 712100; 2 Shaanxi Key Laboratory of Agriculture Molecular Biology, Yangling, 712100; 3 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, 712100;

* Corresponding author, guoaiguang@yahoo.com.cn

Abstract Puna Chicory (*Cichorium Intybus* L.), a perennial herbaceous plant of Compositae family, is widely planted at our country after introduction. Puna Chicory is tender and dainty. It is rich of nourishment. Cattles, sheep, pigs, fish and rabbits prefer it. Puna Chicory is a kind of pasture that has a promotional value. This research discussed how to establish high-efficient regeneration system of Puna Chicory by the different phytohormone combination experiment. The result showed that the medium of MS+6-BA 2.0mg/L+IBA 0.1mg/L could efficiently induce the differentiation of callus and bud of leaf, the medium of 1/2MS induced the regeneration of roots quickly, and the regenerated plant formed. Vector pBI121-GFP was constructed and transformed to Puna Chicory by *Agrobacterium tumefaciens*. The regenerated resistant plants could be obtained by pre-culturing for 3d, co-culturing with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 for 3d, then transferring to the callus inducement media containing 350mg/L Carb and 40 mg/L Kan for 20d. This system is the elementary technology for production of mammal edible vaccine.

Keywords Puna Chicory, Tissue culture, *Agrobacterium tumefaciens*

自 1983 年获得转基因植物以来, 人们已经利用植物反应器生产出了糖类、蛋白质和脂类(杨蓉和朱陆元, 2002)。近年来在疫苗方面, 最激动人心的研究工作是利用植物生物反应器生产口服型疫苗(汪仁莉

和吕玉玲, 2002)。Wigdorovitz 等(1999)用转基因苜蓿表达了 FMDV 结构蛋白 vp1, 用此转基因苜蓿的新鲜叶片喂饲小鼠, 小鼠体内产生了特异性抗体。Gomez 等(2000)则利用马铃薯表达了来自猪传染性

肠胃炎冠状病毒(TGEV)的糖蛋白 S (Spike)的 N 端结构域 (N-gS), N-gS 包含该蛋白质主要的抗原性位点,直接饲喂小鼠,它们也产生了抗糖蛋白 S 的特异抗体。利用植物生物反应器生产动物口服型疫苗受到越来越多的关注。

普那菊苣(*Cichorium Intybus* L.)属菊科多年生宿根草本植物,莲座叶丛生型,原产于欧洲。普那菊苣草质柔嫩,适口性优良,营养丰富,牛、羊、猪、鱼、兔极喜食,国外广泛用于饲料、制糖等原料。普那菊苣适应性广,根系发达,产草量高,营养丰富,含粗蛋白质 16.44%~27.35%,饲用价值高,是一种很有推广价值的牧草。80 年代末,我国科技工作者从国外引种成功,并且在贵州、四川、河北和山西等地广泛推广种植。目前国内外普那菊苣相关研究多集中在高产栽培技术方面(程林梅和曹秋芬, 2004),而有关普那菊苣组织培养和基因转化方面的研究报道较少。

本实验的目的是构建一个高效的普那菊苣再生体系和转化体系,为利用普那菊苣生产动物口服型疫苗建立初步的技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

基本培养基为 MS 培养基, pH5.8。愈伤组织和芽诱导筛选培养基:MS+3%蔗糖+0.6%琼脂,附加不同的激素(表 1)。根诱导筛选培养基:MS+2%蔗糖+0.6%琼脂,附加不同的激素(表 2)。材料培养在 25℃~28℃条件下,光照强度为 1 300~1 500Lux,光照时间为每天 10h。DH5 α 、农杆菌 LBA4404 (Rif⁺)、农杆菌 EHA105 (Rif⁺)、质粒 pBI121 (Kan⁺)由本实验室保存。pUC18 (Amp⁺),带有绿色荧光蛋白基因(*gfp*)由植保学院杨栋同学惠赠。各种限制性内切酶由宝生

表 1 愈伤组织和芽诱导培养基

Table 1 The medium for callus induction and bud induction

培养基编号	培养基成分
No. of medium	Component of medium
A1	MS+6-BA 2.0mg/L+IBA 0.1mg/L
A2	MS+6-BA 2.0mg/L+IBA 0.5mg/L
A3	MS+6-BA 3.0mg/L+IBA 0.1mg/L
A4	MS+6-BA 3.0mg/L+IBA 0.5mg/L
A5	MS+6-BA 2.0mg/L+NAA 0.1mg/L
A6	MS+6-BA 2.0mg/L+NAA 0.5mg/L
A7	MS+6-BA 3.0mg/L+NAA 0.1mg/L
A8	MS+6-BA 3.0mg/L+NAA 0.5mg/L

表 2 根诱导培养基

Table 2 The medium for root induction

培养基编号	培养基成分
No. of medium	Component of medium
B1	1/2MS
B2	MSO
B3	1/2MS+Charcoal 0.5g/L
B4	MSO+Charcoal 0.5g/L
B5	1/2MS+6-BA 0.1mg/L+IBA 1.0 mg/L
B6	1/2MS+6-BA 0.1mg/L+IBA 2.0 mg/L
B7	1/2MS+6-BA 0.2mg/L+NAA 1.0 mg/L
B8	1/2MS+6-BA 0.2mg/L+NAA 2.0 mg/L

物公司提供, T4 DNA 连接酶、氨苄青霉素、卡那霉素和羧苄霉素为进口试剂。组培所用试剂和其它试剂均为国产分析纯。

1.2 引物设计及 PCR 扩增程序

根据已经测序的绿色荧光蛋白基因序列为依据设计引物: Sense: 5'-GAGTTGTCCCAATTCTTGT-GAAT-3', Anti-sense: 5'-GGTAATGGTTGTCTGGT-AAAAGG-3'。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 2min, 然后 94℃ 30s, 54℃ 30s, 72℃ 1min, 40 个循环; 最后 72℃ 10min, 4℃ 保存至电泳。

1.3 愈伤组织诱导和芽分化

将取自大田的叶片用 0.1% 的升汞处理 7~8min, 无菌水冲洗 5 次, 然后切成 0.5cm×0.5cm 的小块, 接种于愈伤组织诱导培养基上, 10d 后, 转移到芽诱导培养基上进行丛生芽的诱导。

1.4 根的诱导和植株再生

芽长 2~3cm 时, 从其基部切下, 插入到生根培养基中, 进行根的诱导, 形成再生植株。

1.5 成苗的移栽

再生苗长到一定高度, 去掉三角瓶的封口膜, 在培养室进行一周时间的炼苗, 一周后, 苗移栽到花盆中, 按常规盆栽实验管理。

1.6 载体构建

1.6.1 植物表达载体 pBI121-GFP

将连接有绿色荧光蛋白基因 (*gfp*) 的克隆载体 pUC18, 用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切, 回收绿色荧光蛋白基因片段, 二元植物表达载体 pBI121 也通过 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切回收大片段, 二者回收产物

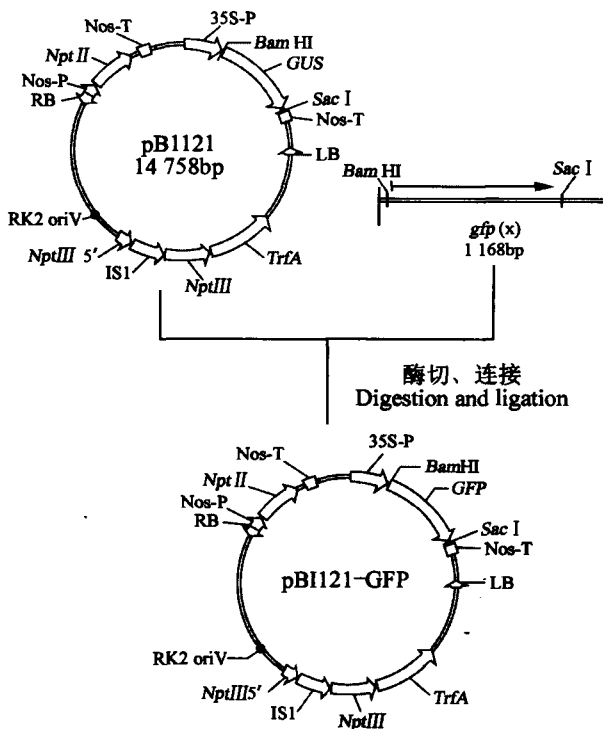


图1 载体 pBI121-GFP 构建

Figure 1 Construction of the vector pBI121-GFP

进行连接构建植物表达载体 pBI121-GFP (图 1)。

1.6.2 质粒的提取、酶切和目的片段的回收、连接

质粒提取方法参照 U-gene 公司质粒提取试剂盒说明书, 目的片段回收方法参照天为时代公司琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书。

1.6.3 大肠杆菌的转化

TSS 转化方法(萨姆布鲁克和拉塞尔, 2002)。挑单菌落做菌落 PCR 快速检测和提取质粒进行酶切检测阳性克隆。

1.6.4 农杆菌的转化

采用冻融转化方法(王关林和方宏筠, 2002)。取单菌落做菌落 PCR 进行检测。

1.7 转化体系的建立

1.7.1 农杆菌液制备

农杆菌 LBA4404 单菌落在附加 10mg/L 利福平和 50mg/L 卡那霉素的 YEP 液体培养基中 28℃ 振荡培养 48h 后, 4 000r/min 离心 5min 收集菌体, 用 MS 液体培养基重悬, 分别稀释至 OD₆₀₀=0.2、0.4、0.6 待用。

1.7.2 外植体预培养

取切好的叶片或叶柄分别在诱导培养基上预培养 1d、2d、3d、4d、5d。

1.7.3 侵染和共培养

取预培养的外植体浸入农杆菌菌液中 5min, 取出后用无菌纱布或无菌滤纸吸干外植体表面残留的菌液, 然后接种于不加抗生素的愈伤诱导培养基中, 分别黑暗共培养 1d、2d、3d、4d。

1.7.4 转化筛选

把共培养一定时间的愈伤组织转移到含卡那霉素(10mg/L、20mg/L、30mg/L、40mg/L、50mg/L)和羧苄青霉素(200mg/L、250mg/L、300mg/L、350mg/L、400mg/L)的愈伤诱导培养基上培养一周, 然后再经过 2~3 轮卡那霉素的筛选, 将有抗性的愈伤组织转移到分化培养基上进行诱导分化培养, 形成再生植株。

2 结果与分析

2.1 最佳再生培养基的筛选

2.1.1 愈伤组织和芽的分化

叶片接种到愈伤诱导培养基上 3d 后, 叶片四周开始膨胀, 5d 后, 整个小块开始弯曲, 并进一步膨胀变大, 10d 后, 膨大的愈伤组织在相同的培养基上发生丛生芽的分化, 20d 后, 芽生成。在本实验中, A1、A2、A3 和 A4 培养基诱导的出愈率都达到了 100%, 芽的诱导分化效率也明显高于 A5、A6、A7 和 A8 培养基的诱导效果(表 3)。因此, 6-BA+IBA 是普那菊苣理想的愈伤组织诱导和芽分化诱导激素组合, A1 培养基较适合愈伤组织的诱导和丛生芽的生成, 并且在愈伤诱导速度上要快于其它筛选培养基, 单个外植体丛生芽的分化个数也要多于其它筛选培养基。从后续的根的诱导情况来看, A1 培养基诱导的芽的生根状况要优于其它筛选培养基。

2.1.2 根的诱导

在根的诱导过程中, B1 培养基要明显优于其它筛选培养基。有资料报道(刘用生和李友勇, 1994), 活性炭对根的诱导有促进作用: 活性炭加到根诱导培养基中, 可以模拟土壤的黑暗环境, 而且活性炭加入培养基中可以吸附一些有害物质, 如防止酚类物质污染而引起组织褐化死亡。本实验通过对照实验, 发现活性炭对普那菊苣幼根的诱导没有明显的促进作用。

2.2 载体的构建

2.2.1 大肠杆菌菌落 PCR 检测

挑取连接产物转化长出的阳性克隆, 用 *gfp* 特异引物进行 PCR 检测, 出现预期条带(图 2)的菌落挑选

表 3 不同激素浓度对比对愈伤诱导和芽分化的影响

Table 3 Effects of the different phytohormone combination on the inducement of callus and the differentiation of bud

培养基 Medium	接种数 No. of inoculation	愈伤组织数 No. of callus	出愈率(%) Percent of differentiated callus	分化芽数 No. of differentiated bud	再生速度和生长状况 Regeneration velocity and growth
A1	90	90	100	540	++++
A2	90	90	100	445	+++
A3	90	90	100	436	+++
A4	90	90	100	407	++
A5	90	83	92.0	343	++
A6	90	76	84.4	247	+
A7	90	80	88.0	261	+
A8	90	71	78.9	209	+

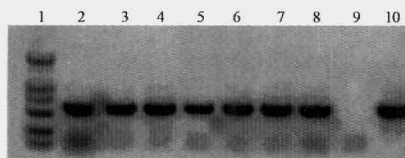


图 2 PCR 检测

注: 1: Marker DL2000; 2~8: 阳性克隆; 9: 阴性对照质粒; 10: 阳性对照 pUC18

Figure 2 PCR analysis

Note: 1: Marker DL2000; 2~8: Positive clones; 9: Negative control (plasmid pBI121); 10: Positive control (plasmid pUC18)

2~3 个菌扩大培养。

2.2.2 酶切检测

提取扩大培养的阳性菌落的质粒用 *Bam*H I 和 *Sac* I 进行双酶切鉴定, 结果都有 826bp 和 12 950bp 目标片段出现(图 3)。

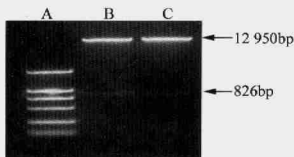


图 3 酶切检测

注: A 为 Marker DL2000; B, C 均为 pBI121-GFP 酶切产物

Figure 3 Restriction enzyme analysis

Note: A: MarkerDL2000; B, C: Digested pBI121-GFP

2.2.3 根癌农杆菌菌落 PCR 检测

挑选阳性克隆进行 PCR 检测结果(图 4)出现预期条带。

2.3 普那菊苣遗传转化体系的建立

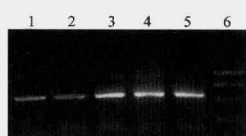


图 4 PCR 检测

注: 1~5 泳道为阳性克隆; 泳道 6 为 Marker

Figure 4 PCR analysis

Note: 1~5: Positive clone; 6: Marker

2.3.1 预培养时间对转化效率的影响

外植体的预培养有利于农杆菌的侵染和基因的转移。预培养一段时间, 可使伤口处的植物细胞处于一种敏感状态, 并且提高侵染后的出愈率和出芽率(图 5)。但是预培养时间过长, 又会造成伤口的愈合化, 不利于农杆菌的侵染。适宜的预培养时间为 3~4d。

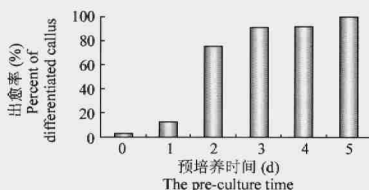


图 5 预培养时间对分化率的影响

Figure 5 Effect of day for pre-culture on the rate of differentiation

2.3.2 农杆菌浓度、侵染时间和共培养时间对转化效率的影响

农杆菌浓度太大, 侵染过程中容易对植物细胞造成伤害, 大量外植体褐化死亡。农杆菌浓度太低没有足够的菌体侵染, 不利于基因的转移, 由图 6 可知。适宜的农杆菌浓度是 $OD_{600}=0.4-0.6$ 。侵染时间控制在

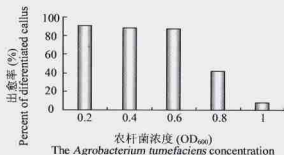


图6 农杆菌浓度对分化的影响

Figure 6 Effect of the *Agrobacterium tumefaciens* concentration on differentiation

5min 左右。外植体与农杆菌的共培养时间太短不利于基因的转化;共培养时间过长,农杆菌过度繁殖造成外植体的褐化死亡。共培养时间一般控制在 3~4d。

2.3.3 抗生素敏感性实验

2.3.3.1 农杆菌对羧苄青霉素的敏感性

外植体与农杆菌共培养后,需要加入适当的抗生素抑制农杆菌的过度生长而引起组织污染、死亡,影响转化效率。常用的抗生素有头孢霉素、羧苄青霉素、氨苄青霉素等。据报道有些抗生素会伤害组织、抑制分化,而羧苄青霉素没有这些副作用(Holford and Newbury, 1992),所以本实验就羧苄青霉素的抑菌效果进行筛选。由图 7 可知,随着羧苄青霉素的浓度增大,脱菌的效果愈加明显,浓度为 350mg/L 时已无农杆菌生长,因此,350mg/L 为适宜的脱菌浓度。

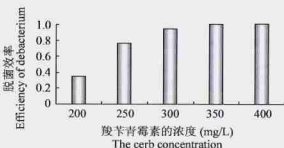


图7 农杆菌对羧苄青霉素的敏感性

Figure 7 The sensitivity of *Agrobacterium tumefaciens* to cerb

2.3.3.2 普那菊苣对卡那霉素浓度的敏感

不同植物乃至同一植物不同基因型对卡那霉素的敏感性不同。卡那霉素浓度太低会造成大量未转化细胞的逃逸,产生大量假阳性苗,太高会抑制转化细胞的分化。本实验研究表明,卡那霉素对普那菊苣的生长有明显的抑制作用。随着培养基中卡那霉素浓度的增加,苗子会发生白化,不能正常生长。由图 8 可知,当卡那浓度为 40mg/L 时,普那菊苣无法

正常生长发生白化,因此,对普那菊苣而言 40mg/L 是较为适宜的筛选浓度。

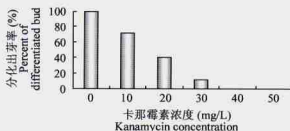


图8 普那菊苣在不同卡那霉素浓度下的分化出芽

Figure 8 Shoot induction rate of Puna Chicory in different Kanamycin concentration

3 讨论

3.1 普那菊苣高频再生体系的建立

植物遗传转化的成功首先依赖于高效的植物再生体系,本试验已初步建立了普那菊苣高频再生体系(图 9),并对遗传转化影响因素进行了研究,为利用植物生物反应器生产动物口服型疫苗建立了良好的技术基础。



图9 普那菊苣组织培养植株再生

注: A: 愈伤组织形成; B: 愈伤组织上形成丛生芽; C: 丛生芽转移到根诱导培养基上; D: 根的诱导形成; E: 再生植株形成; F: 再生苗的移栽

Figure 9 Plant regeneration for tissue culture of Puna Chicory

Note: A: The formation of callus; B: The clustered bud on callus; C: The clustered bud on the inducible culture medium for the root; D: The formation of root; E: The formation of regeneration plant; F: The transplant of the regeneration plant

3.2 转化效率的提高

选择适宜的外植体对转化效率有直接的影响,在实验中,发现农杆菌侵染后叶片的再生状况要好于茎段。侵染共培养期间,大量的茎段会发生褐变而

死亡。在随后的脱菌过程中,茎段彻底脱菌的难度较大,可能是农杆菌进入维管束,对抗生素不是很敏感。如果为了彻底脱菌,加大抗生素的浓度就会对愈伤组织的诱导分化产生不利的影响,在一定程度上抑制芽的分化,并且浓度过大也会造成外植体的死亡。脱菌和阳性筛选可以同时进行,也可以分开进行。同时进行可以减少后期的筛选工作,但是会在一定程度上对有些已经转化但是还没有表达抗生素抗性基因的组织造成伤害;分开进行可以避免这种状况,但同时增加后期的筛选工作量。考虑到相对较低的转化效率,本实验采取脱菌和阳性筛选分开进行。

致谢

本项目由西北农林科技大学博士创新基金资助。

参考文献

- Cheng L.M., and Cao Q.L., 2004, Study on the efficient systems for regeneration and *AFL2* gene transformation of Puna Chicory, *Caodi Xuebao* (*Acta Agrestia Sinica*), 12 (3): 199-203 (程林梅, 曹秋芬, 2004, 菊苣再生体系建立及转 *AFL2* 基因的研究, 草地学报, 12(3): 199-203)
- Gomez N., Wigdorovitz A., and Castanon S., 2000, Oral immunogenicity of the plant derived spike protein from swine-transmissible gastroenteritis coronavirus, *Arch. Virol.*, 145 (8): 1725-1732
- Holford P., and Newbury H.J., 1992, The effect of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Antirrhinum majus*, *Plant Cell Rep.*, 11: 93-96
- Liu Y.S., and Li Y.Y., 1994, The use of active carbon in the plant tissue culture, *Zhiwu Shenglixue Tongxun* (*Plant Physiology Communications*), 30(3): 214-217 (刘用生, 李友勇, 1994, 植物组织培养中活性炭的使用, 植物生理学通讯, 30(3): 214-217)
- Sambrook J., and Russell D.W., eds., Huang P.T., trans., 2002, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Third Edition), Science Press, Beijing, China, pp.87-88 (J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔, 主编, 王培堂, 主译, 2002, 分子克隆实验指南 (第三版), 科学出版社, 中国, 北京, pp.87-88)
- Wang G.L., and Fang H.J., eds., 2002, *Botanical Gene Engineering*, Science Press, Beijing, China, pp.776-777 (王关林, 方宏筠, 主编, 2002, 植物基因工程, 科学出版社, 中国, 北京, pp.776-777)
- Wang R.L., and Lv Y.L., 2002, The research review of bacterin produced by gene modified plant, *Ningxia Nongxueyuan Xuebao* (*Journal of Ningxia Agricultural College*), 23 (4): 63-65 (汪仁莉, 吕玉玲, 2002, 转基因植物疫苗的研究进展, 宁夏农学院学报, 23(4): 63-65)
- Wigdorovitz A., Carrillo C., Dus Santos M.J., Trono K., Peralta A., Gomez M.C., Rios R.D., Franzone P.M., Sadir A.M., Escribano J.M., and Borca M.V., 1999, Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1, *Virology*, 255: 347-353
- Yang R., and Zhu M.Y., 2002, The present research of drug molecular produced by the plant actor, *Xibao Shengwuxue Zazhi* (*Chinese Journal of Cell Biology*), 24(1): 26-29 (杨蓉, 朱睦元, 2002, 植物生物反应器生产药物大分子的研究现状, 细胞生物学杂志, 24(1): 26-29)