

文章编号 :1673 - 7636(2006)06 - 0291 - 06

亚麻单倍体抗逆基因的转化

康庆华^{1,2}, 许修宏¹, 李柱钢³, 徐 涵⁴, 关凤芝², 刘文萍³, 张利国²

(1. 东北农业大学资源与环境学院 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农科院经作所 黑龙江 哈尔滨 150086;
3. 黑龙江省农科院生物中心 黑龙江 哈尔滨 150086; 4. 法国图卢兹综合科学研究所 法国 图卢兹市 31300)

摘 要:为提高亚麻抗逆性,尽快获得转基因纯系亚麻,本研究采用农杆菌介导的转基因技术,将抗盐和低温胁迫基因 *HY15CS* 导入单倍体亚麻,结果获得抗性再生植株24株,从15株生长健壮的再生植株中 PCR 检测到3株阳性植株,阳性率20%。同时进行了不同方法的单倍体检测技术的研究,确定 DAPI 染色可以做为快速鉴定植物体倍性常用方法。

关键词: 亚麻;单倍体; *HY15CS* 转基因; DAPI 染色

中图分类号: S563.2 **文献标志码:** A

1 前言

亚麻是重要的纤维及油料作物,主要分布于欧洲、亚洲、北美洲和北部非洲。我国亚麻种植区域从地理分布上可以划分为八个区:东北平原区、南方冬季亚麻区、黄土高原区、阴山北部高原区、黄河中游区、河西走廊灌区、南疆内陆灌区、北疆内陆灌区、青藏高原区。20世纪90年代以前,我国的亚麻纤维产区主要集中在东北的黑龙江,之后由于传统的东欧亚麻企业的没落、WTO 的加入及我国市场经济的建立、种植业结构的调整,我国亚麻产业得到进一步发展,纤维亚麻产区由黑龙江发展到新疆、内蒙、吉林、辽宁、甘肃、云南、湖南、浙江等省区。2004年我国亚麻种植面积达16万公顷,跃居世界第一。油用亚麻种植区域主要集中在甘肃、内蒙古、宁夏、陕西、河北、新疆、青海等省区,每年播种面积60-70万公顷,居世界第二位^[1]。随着我国亚麻产业的发展壮大,种植面积的向南延伸,亚麻育种工作者面临东北地区干旱、倒伏问题,华北、西北枯萎病严重问题,西南、华南安全越冬、北疆内陆区苗期温度低,大气干旱、青藏高原区气候寒湿霜害严重等问题^[2]。所以目前亚麻科研、生产中急需解决的问题就是尽快育出抗逆品种。

直接采用抗逆基因转化,定向选育亚麻抗逆品种应是解决上述问题的捷径。目前,随着植物基因工程技术的发展,各类基因(抗除草剂、抗虫、抗病、抗逆境、改变品质性状等基因)在不断地被克隆,各类启动子的构建成功,转基因植物的研究和应用也随之迅猛发展。全球转基因作物种植面积1996年为170万公顷,2005年全球转基因作物种植面积已达9000万公顷,是1996年的5.3倍^[3]。随着转基因植物的发展扩大,各种基因遗传转化的方法也应运而生。迄今为止,已经建立了十余种基因转化方法,按转化系统的原理,可以分为三大转化系统类型^[4]:(1)以质粒DNA等为载体的转化系统,如农杆菌法。(2)不用任何载体,通过物理化学方法直接将外源基因导入受体细胞的直接转化系统,如基因枪法、微针注射法。(3)以植物自身的生殖系统种质细胞,如花粉粒或其它细胞等为媒体的转化系统,如花粉管通道法。迄今为止所获得的转基因植物中约80%是利用根癌农杆菌转化而来的。

据大量资料记载,利用植物基因工程技术获得的转基因植株已不计其数,但从转基因植株中选育外源基因纯合的转基因品系往往需要较长的时间和大量的田间工作,因为外源基因不可能同时

收稿日期 2006-10-10

作者简介 康庆华,女(1974-) 助研,从事农业生物技术工作。E-mail kang_qinghua@126.com

通讯作者 许修宏 E-mail howard2857@hotmail.com 注 陈浩,姜卫东,赵东升,黄文功,房宇妍等同志参加了部份工作。

插入或整合到二倍体植株的等位基因同一位点上,因此转基因后代发生性状分离。一般来讲,导入双倍体的外源基因纯合需要4年以上,再加上至少2-3年的大田试验,到获得生产上能应用的品系至少需要6-7年以上的时间,显然转基因作物的应用受到了限制。为此,我们采用农杆菌介导的转基因技术将抗盐和低温胁迫基因HY15导入亚麻单倍体的研究,旨在建立一种使外源基因快速纯合的育种程序,以使育种进程缩短3-4年,在最短时间内选育出生产上急需的抗逆转基因品系。

2 试验材料及方法

2.1 试验材料

植物材料:1、D95029-8-3,2、D95029-8-1,3、D95029-10-3,4、D95029-18-3,5、D95029-18-7,1-6Ha(获得的加倍材料)

基因:抗盐和低温胁迫基因(HY15)于2004年在上海交大从大白菜(*Brassica napus*)中克隆获得,由黑龙江省农科院李柱钢博士馈赠。基因载体EHA105菌株pB121质粒。

2.2 试验方法

2.2.1 单倍体受体制备

将供试材料的种子各50粒浸泡于75%酒精5min,无菌水冲洗2次;再用1%的NaClO饱和溶液浸20min,无菌水冲洗3-4次,播种于含固体MS培养基试管中,每管2-3粒。于23-24℃暗培养2-3天,种子开始萌发,将长出的双胚苗或多胚苗标记序号,移到组培室(25℃,12h光照)培养,待用。

2.2.2 受体倍性检测

醋酸洋红染色与DAPI荧光染色共同确定单倍体。

1)醋酸洋红染色 预处理:当种子露白时将其放在0-8℃下培养48h,再放回23℃条件下处理7.5-8小时,将多胚苗作标记,根尖剪下1cm,立即放入冰水中,冷处理20-24小时。固定:取出根尖,滤纸吸干,在卡诺固定液低温固定16小时后放于75%的酒精中保存。染色:取出根尖,滤纸上吸干,放入预先配制好1%醋酸洋红(进口)溶液中染色3天。观察:挑出已染好的根尖,切去根冠,切取极少量的分生组织于载玻片上,加1滴45%的醋酸,盖上盖玻片,用橡皮头轻敲,使染色体散开,于LEIKA4000显微镜100×下观察。

2)DAPI(4'-6-Diamidino-2-phenylindole)荧光染色 只检测倍性:用70%的酒精固定根尖,然后用0.01%DAPI的70%酒精溶液染色1分钟或更长时间(最好黑暗条件下染),压片然后观察,用荧光显微镜在400nm观察(100×,本试验所用显微镜LEIKA4000)。

2.2.3 转化

1)预培养:以筛选到的亚麻单倍体苗的叶片为外植体,置愈伤培养基(MS+2mg/LBA+1mg/NAA)预培养3天。2)菌液制备:a.挑取农杆菌EHA105菌落,转接于10ml含Rif(利福平)40mg/l,Str(链霉素)25mg/l,Kna(卡那霉素)50mg/l的改良的YEP液体培养基中,28℃,200rpm振荡培养过夜;b.以2%的接种量转接于含相同抗生素的YEP液体培养基中,28℃,200rpm振荡培养至OD600为0.5~0.6;c.取一定体积(12.5ml)菌液,4℃,5000rpm离心5-10min,弃上清,以等体积无菌MS液离心去上相,以洗脱抗生素,再加3-4倍体积的加有50mg/lAS(乙酰丁香酮)的MS液,混匀备用。3)浸染:将已预培养3天的外植体侵入菌液中,10rpm振荡浸染1h。对照受体采用无菌水或MgSO₄浸泡。4)共培养:将上述浸染后的受体(包括对照)接到附加50mg/lAS的MS分化培养基(pH6.0以下)上,19-20℃下,每天14-16小时的光照培养4-5天,光照强度为2000Lux。5)脱菌、分化选择培养:选择上述处理生长健康的受体,接到加有抗菌素100mg/l头孢噻污钠(国产)+400mg/lTEMETIN(进口)+50mg/lKna的分化培养基上,在接种前先用1000mg/l头孢噻污钠浸洗10分钟,后再用MgSO₄或无菌水冲洗2-3次。设0对照(对照受体接种在不加抗生素的分化培养上)。6)生根培养:将获得的再生植株接种于MS+400mg/lTEMETIN(进口)+100mg/lCORFLAND和附加0.005mg/lNAA进行生根。整个转化过程对糖的浓度适当调节。7)炼苗移栽:在移栽前打开盖子,自

然炼苗4-6天;从培养基内将有根苗取出,用清水将根上的培养基冲洗干净栽入营养土中,营养土和盛土容器要灭菌。

2.2.4 抗性植株的PCR检测

1)质粒DNA的提取采用碱裂解法,参照王关林的试验方法进行^[5]。

2)再生植株(模板)DNA提取采用CTAB法,参照Stewart的试验方法进行^[6]。

3)PCR(聚合酶链式反应)检测:以HY15CS(含nos终止子,长度450bp)的两个引物(Primer1和Primer2)检测转化后获得的抗性植株。在冰上建立PCR反应体系(20 μ l):

dd H ₂ O	12.6 μ l
10 \times Buffer	2 μ l
dNTP(2mM) 萤自缚	0.4 μ l
Primer 1(10 μ M)	1 μ l
Primer 2(5 μ M)	2 μ l
Taq(5 M/ μ l)	1 μ l
TEMP	1 μ l

PCR程序:95 $^{\circ}$ C预变性3min,94 $^{\circ}$ C变性30s,61 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸60s,35个循环;72 $^{\circ}$ C再延伸10min,4 $^{\circ}$ C贮存。取1-5 μ l反应产物进行1%琼脂糖凝胶电泳检测,筛选鉴定阳性植株。该试验所用的两个引物Primer1和Primer2可扩增出HY15CS基因的序列片段,扩增片段的大小为450bp,通过PCR扩增为阳性的可确定为转基因植株。

Primer 1 3' - CAA TCC TTC TTC CGC CTC TT - 5'

Primer 2 5' - CAA GAC CGG CAA CAG GATTC - 3'

3 结果与分析

3.1 醋酸洋红染色与DAPI荧光染色染色体鉴定筛选单倍体

依2.2.1方法,我们以多胚种子D95029-8-3的1、3、21号种子(1-1)(1-3)(1-21);D95029-8-1的21号种子(2-21);D95029-18-3的12号种子(4-12);1-6Ha的11、21、23号种子(1-6Ha-11)(1-6Ha-21)(1-6Ha-23)的16株(每粒种子有大、小苗各1株)多胚苗的根尖为检测部位,采用醋酸洋红进行染色。3天后,倍性鉴定结果是:4-12的小苗、1-6Ha-23的小苗为单倍体(16条左右);2-21的小苗鉴定为二倍体;其余苗没有查到能鉴定出倍性的分裂相。采用DAPI染色,对4-12的小苗、1-6Ha-23的小苗、1-1的大苗茎部或根部表皮细胞检测,倍性鉴定

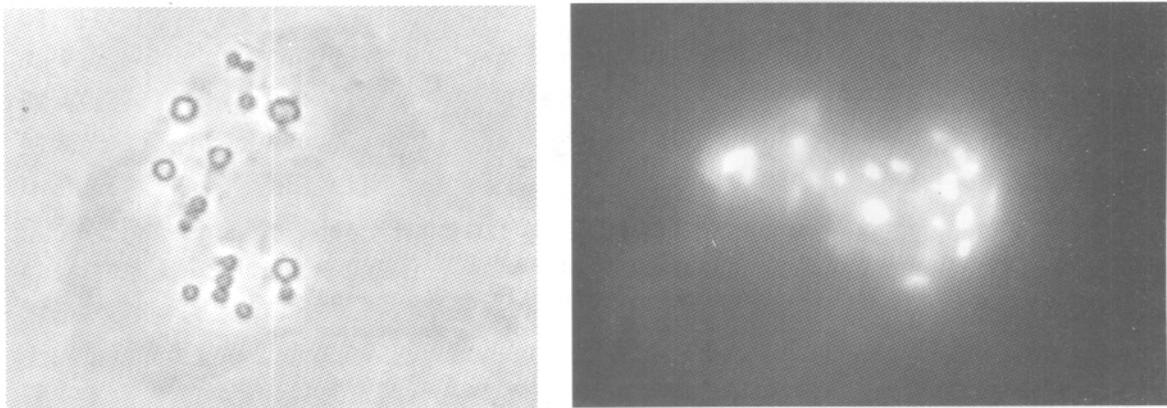


图1 供试材料的染色体数目

左: 4-12小苗的染色体(醋酸洋红染色);右: 1-6Ha-23小苗的染色体(DAPI染色)

Fig. 1 Numbers of chromosome of haploid

Left: The chromosome of small plant of 4-12

Right: The chromosome of small plant of 1-6Ha-23

结果 4-12的小苗、1-6Ha-23的小苗为单倍体,1-1的大苗可能为二倍体。通过染色体检测确定出两份单倍体材料:4-12的小苗(见图1左)、1-6Ha-23的小苗(见图1右)用于转化试验。从试验方法看 DAPI 荧光染色方法鉴定单倍体方便简洁快速,可省去采用其他常规染色技术前对植物材料的预处理,及染色时间的要求,是快速鉴定、检测单倍体材料较适宜的方法。本试验只做了倍性鉴定,具体染色体个数及核形分析还有待进一步研究。

3.2 单倍体转化再生植株的获得

按2.2.3方法所述,以上述检测到的单倍体材料4-12和1-6ha-23小苗(无菌苗)的幼嫩叶片为外植体,置于9%含糖量的固体培养基(MS+6-BA2mg/l+NAA1mg/l)预培养3天,使柔嫩叶片硬化,采用预先制备的农杆菌菌液(OD=0.5542,MS液稀释3倍)摇晃浸染1h,浸染前对硬化的叶片做划伤处理,对照受体采用无菌水处理,将浸染后的叶片置于共培养培养基(MS+6-BA2mg/l+NAA1mg/l+50mg/lAS)中5天,选择上述处理生长健康的受体(53片),用1000mg/l头孢噻污钠浸洗5分钟,后再用无菌水冲洗2-3次,接到加有抗菌素100mg/l头孢噻污钠(国产)+400mg/l TEMETIN(进口)+50mg/lKna的分化培养基(MS+6-BA1mg/l+NAA0.05mg/l)上。设0对照,即受体接在不加抗生素的分化培养基上以跟踪检测分化系统。培养条件为25℃,12h光照,两周换一次分化培养基,30天左右以4-12为受体的叶片愈伤块有的开始分化出抗性芽(见图2),最后统计共有8块愈伤能分化出芽,愈伤分化率为15%,其余叶片愈伤渐渐变白、变黄,含卡那培养基内对照受体分化明显受到抑制,50天左右全部黄化死掉,而以1-6Ha-23为受体的叶片愈伤一直未分化,其0对照也未分化,可能此分化培养基不适于该基因型。待已分化出的芽长至1cm左右时,将其切下转至生根培养基中(MS固体培养基+0.005mg/lNAA+Kna50mg/l+100mg/l头孢噻污钠+400mg/l TEMETIN)。最后通过卡那霉素抗性筛选共获得了24株转化再生植株。由于卡那霉素的选择作用,仍有部分植株白化。

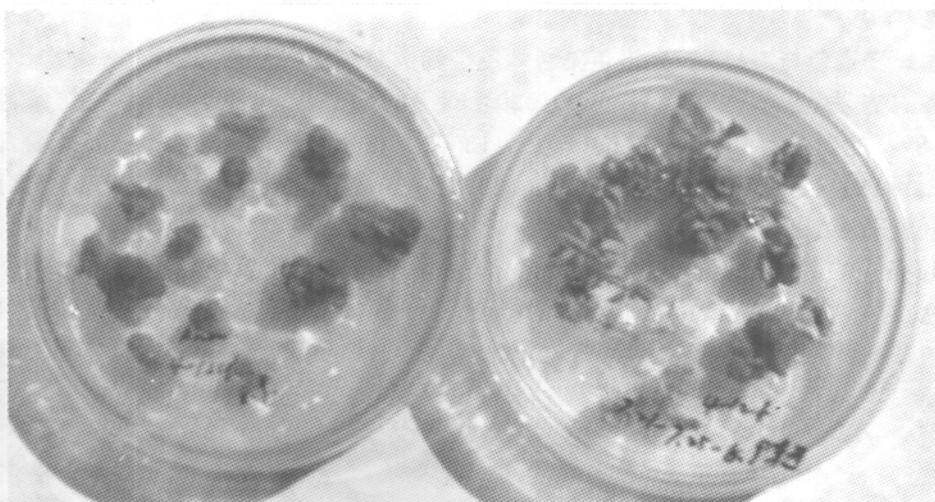


图2 植株再生

左:4-12单倍体叶片未经转化 右:4-12单倍体叶片经过转化

Fig. 2 Plant regeneration

Left: The leaves of haploid of 4-12 not treated by *Agrobacterium tumefaciens*

Right: The leaves of haploid of 4-12 treated by *Agrobacterium tumefaciens*

3.3 PCR 检测结果

根据2.2.4的方法,微量粗提亚麻再生植株幼嫩叶片的总DNA,以碱裂解法提取载有HY15CS基因的pB121质粒DNA。以转HY15CS基因的抗性亚麻植株的总DNA为模板,以载有HY15CS基因的质粒DNA为阳性对照,以未转基因4-12小苗(对照受体)的再生植株的总DNA为阴性对照,同时设不加模板的PCR反应体系为空白对照,以HY15CS的两个特异引物(Primer1和Primer2)进

行PCR,阳性对照和部分转基因植株应扩出450bp,阴性对照及空白对照无扩增条带。通过对15株健壮抗性植株进行了PCR,经1%琼脂糖凝胶电泳与标准分子量DL15000比较,其中共3株呈阳性(见图3),阳性率20%。证实HY15CS基因已经转入受体亚麻单倍体中,即获得了转HY15CS的阳性亚麻植株。

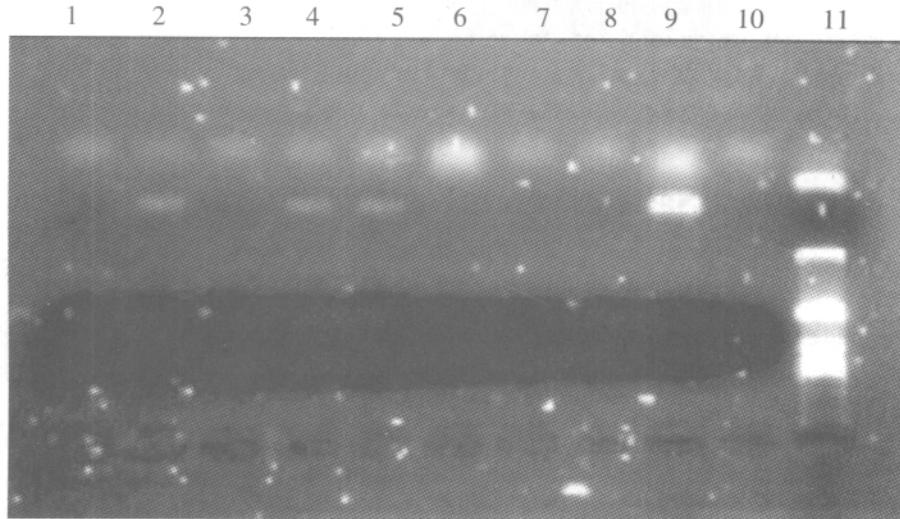


图3 亚麻单倍体转化植株的PCR检测

1-7 植株;8 阴性对照植株;9 阳性对照(质粒DNA);

10 体系的空白对照;11 Marker(DL15000)

Fig. 3 PCR analysis of transfered plants of flax haploid

1-7: Regeneration plants; 8: Negative CK; 9: Positive CK(plasmid);

10: CK; 11: Marker(DL15000)

4 结论与讨论

4.1 通过HY15基因转化亚麻单倍体试验,我们获得卡那霉素抗性再生植株24株,从其健康的15株中PCR检测出3株阳性植株,证明已有基因插入到单倍体亚麻基因组中,标志着利用抗逆基因转化亚麻单倍体的转基因技术获得成功。这为我们得到纯系抗逆亚麻新品系,使多胚亚麻利用奠定了坚实的基础。

4.2 通过单倍体鉴定试验,确定DAPI荧光染色可以用来检测植物体倍性,而且简单、快速而准确,可以省略其他染色方法的前处理、固定、长时间染色等程序。我们所用的DAPI的中文名称是4,6-联脒-2-苯基吡啶,是一种常用的荧光染料,其作用机理与溴化乙锭(EB)等染色剂的机理类似:它们与DNA双螺旋的凹槽部分可以发生相互作用,从而与DNA的双链紧密结合。结合后产生的荧光基团的吸收峰是358nm,而散射峰是461nm,正好UV(紫外光)的激发波长是356nm,使得DAPI成为了一种常用的荧光检测信号。采用该染色法来识别单倍体以至在将来检测转化再生植株倍性的变化是极为实用的。

4.3 在基因转化的过程中仍然存在基因转化率低的问题;另外,利用农杆菌介导法进行转化,虽然对于双子叶植物亚麻来讲是转化率最高的一种方法,但其试验周期较长,脱菌困难,任何一个环节上的错误或误差都会导致全程的失败。受体基因型的选择问题相当关键,不同的基因型,其愈伤分化率不同,对抗生素及抗菌素的敏感程度也存在较大的差异。尤其是在利用单倍体转化的过程中,上述问题表现得更明显,所以亚麻基因转化体系尚需进一步完善。

参考文献:

- [1] 王玉富. 我国亚麻生物技术的发展[J]. 中国麻业, 27(2): 60 - 65.
- [2] 路颖. 我国亚麻种质资源的研究与评价利用[J]. 中国麻业, 2004, 26(5): 212 - 216.
- [3] 雷秉乾, 王仁祥. 转基因植物的研究与开发利用[J]. 作物研究, 2006, 19 - 12.
- [4] 植物基因转化系统分类[EB/OL]. 2002 - 10 - 22. <http://www.biocentury.com.cn/jcyjzhyjd1.htm>.
- [5] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998, 598 - 599.
- [6] Stewart, Jr C N. Soybean DNA isolation procedure using fresh tissue [J]. Soybean Genet. Newsl, 1994, 21: 243 - 244.

Study on Cold and Salt Resistance Gene Transformation of Flax Haploid

KANG Qing - hua^{1,2}, XU Xiu - hong¹, LI Zhu - gang³, XU Han⁴,

GUAN Feng - zhi¹, LIU Wen - ping³, ZHANG Li - guo²

- (1. Resources and environmental sciences college, Northeast agriculture university Harbin 150030, China ;
 2. Institute of industrial crops, Heilongjiang academy of agricultural sciences, Harbin 150086, China ;
 3. Biotechnology center of heilongjiang academy of agricultural sciences, Harbin 150086, China ;
 4. Institute de la recherche interdisciplinaire de toulouse, Toulouse 31300, France)

Abstract : In order to improve resistance of cold and salt of flax, and select pure transgenic flax, cold and salt resistant gene *HY15* was introduced into haploid flax by *Agrobacterium tumefaciens*, and 24 regeneration plants were obtained. The PCR analyses revealed that there were 3 transformed plants whose genomes were integrated with foreign gene *HY15* sequence in 15 strong regenerated plants, and the frequency on *HY15* gene integrated into flax haploid regenerated plant was 20%. DAPI stain was selected from others as a fast method to judge the chromosome ploidy.

Key words flax ; haploid ; *HY15* gene ; Transformation ; DAPI stain

《机剥苕麻》地方标准通过专家评审

2006年11月28日,由湖南省农业厅主持,组织有关麻纺、科研、农业和检验检测专家对中国农科院麻类研究所起草的《机剥苕麻》地方标准进行了评审。专家组经过认真评审,一致认为:

- 1、《机剥苕麻》起草单位提供的资料齐全,符合评审要求。
- 2、该标准是在广泛收集国家标准、总结现有科技成果和先进经验的基础上,对机剥苕麻的定义、技术要求、检验、包装、标志、运输和贮存等进行了规范,标准编写规范,符合 GB/T1.1 的编写要求。技术先进,可操作性强,填补了我国机剥苕麻标准的空白,达到了国内同类标准的先进水平。
- 3、《机剥苕麻》标准对促进苕麻剥麻机的推广应用,提高机剥苕麻质量,促进苕麻产业的发展具有重要的作用。

(中国农业科学院麻类研究所 龙超海供稿)