

The Transgenic Plants of Peanut Were Obtained by Puncture and Emery Grit Assisted Agrobacterium Mediated Transformation

Xiaoxiong Nie, Guili Han, Kun Chu, Bin Peng, Weicheng Huang, Yuxian Bai, Xuelian Liang

College of Life Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou Guangdong
Email: liangxuelian2005@sina.com

Received: Dec. 6th, 2019; accepted: Dec. 19th, 2019; published: Dec. 26th, 2019

Abstract

The paper relates to an ultrasonic assisted Agrobacterium mediated gene transformation method for germination seed, which aims to directly take the germination seed as the Agrobacterium infection receptor without the need for tissue culture and plant regeneration process. In this experiment, the seeds soaked in water for 12 hours, then the embryos were punctured and ultrasonic treated with emery grit, and the treated seeds were cultured with Agrobacterium liquid (containing AS) for 24 hours, finally were sowed. In the process of seedling, glyphosate was sprayed for several times. Some plants has good resistant in field screening. The resistant plant seeds (T1) were cultured. But PCR gel electrophoresis strips of transformed plants were not very clear, proved weakly positive. Finally, a genetic transformation system suitable for peanut with emery grit was established, and the effect of puncturing and sonication in peanut was studied. And some plants with field resistance to glyphosate were obtained.

Keywords

Peanut, Puncturing Embryo, Emery Grit, Ultrasonic, Agrobacterium, EPSPS

穿刺胚加金刚砂超声波辅助农杆菌转化花生

聂小熊, 韩桂丽, 储坤, 彭彬, 黄伟城, 拜玉贤, 梁雪莲

仲恺农业工程学院生命科学院, 广东 广州
Email: liangxuelian2005@sina.com

收稿日期: 2019年12月6日; 录用日期: 2019年12月19日; 发布日期: 2019年12月26日

摘要

论文尝试了一种穿刺胚加金刚砂超声波辅助农杆菌进行植物萌发种子基因转化的方法,其目的是直接以植物萌发种子作为农杆菌侵染受体,无需进行组织培养和植株再生过程。本实验,首先用清水浸泡花生种子12小时后,采用穿刺胚方法加金刚砂超声波处理萌动的种子,再将处理种子与农杆菌菌液(含AS)共培养24小时,然后播种。经过几周的喷洒草甘膦除草剂药液,田间筛选出具有良好抗性的植株,收获具有抗性植株的种子(T1代)。T1代继续培养,幼苗叶片提取DNA,进行PCR分子检测,通过PCR检测电泳图中条带证明获得了弱阳性转化植株。本论文最后建立了适合于花生的遗传转化系统,探讨了穿刺和超声波在花生转基因中的影响。

关键词

花生, 穿刺胚, 金刚砂, 超声波, 农杆菌, EPSPS

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

全球转基因作物种植面积迅猛增长,2017年突破1.898亿 hm^2 ,连续21年增长。目前大多数植物的转基因方法主要是经典的农杆菌和基因枪法[1]。两者均使用愈伤组织为受体,需要经过繁琐冗长的组培过程,有可能会产生体细胞变异,并且具有基因型依赖性[2]。基因枪转化尽管不受寄主限制但容易造成伤害和引发突变,农杆菌则具有天然转化机理,形成单拷贝转化体[3][4]。为了获得高的转化率,研究者不断尝试对不同的组织和器官进行转化,如使用茎尖、顶端分生组织和种子[5][6]。目前,在玉米、水稻[7]、小麦[8]等重要禾谷类作物上多种农杆菌转化方法已经建立起来。另外,农杆菌转化愈伤组织的时候,各种物理的辅助措施(如离心、真空抽滤、超声和热击等处理[9])被认为可以增加农杆菌的侵染以提高转化率,有研究对于成熟组织的花粉和萌动种子这类受体,也采用了这些辅助方法[10][11][12][13]。本研究采用金刚砂辅助农杆菌进行萌动种子胚处理方法,将EPSPS基因[14]导入花生仲恺花01和12号,以期获得转基因抗草甘膦花生。因为花生种子的种皮比较坚硬不易被基因枪穿入,而且基因枪的射入方向单一直接,转化效果不佳。如果我们在穿刺种皮的基础上,用金刚砂代替基因枪的子弹用超声的方法处理种子,金刚砂就会随超声波以自由散射的方式射入花生种子胚,以便农杆菌随之进入胚内进行基因转化。本实验在方法上进行了创新。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

2.1.1. 种子

仲恺花01号和仲恺花12号花生种子(由仲恺农业工程学院农学院提供)。仲恺花01号和12号均为珍珠豆型花生品种,丰产性好,含油率较高;中抗青枯病,田间表现高抗锈病、中抗叶斑病;耐旱性、抗倒性和耐涝性均较强,适宜广东省各地水旱轮作田春、秋季种植。

2.1.2. 根瘤农杆菌

CP4 菌株: 如图 1, 带有 Ti 重组质粒的 LBA4404 农杆菌, Ti 重组质粒中有 EPSPS 基因(标记基因为利福平抗性基因和卡那霉素抗性基因)。

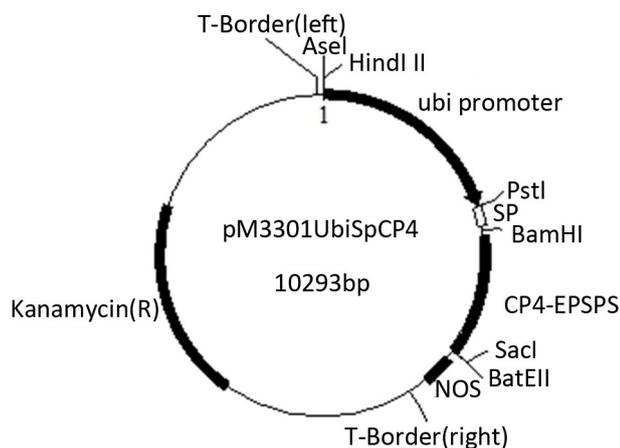


Figure 1. Gene expression vector
图 1. EPSPS 基因质粒图

2.1.3. 除草剂

除草剂为草甘膦(glyphosate)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 准备花生种子

取仲恺花 01 号和 12 号, 剥壳后每瓶约 60 颗, 分装在广口瓶中, 27℃恒温浸泡 4 小时。

2.2.2. 穿刺处理萌动种胚

采用 0.25 mm 长针灸针, 将 5 根捆成一束, 在花生的根部下端 1.5 mm, 用短针斜角 45 度插入 2 mm, 最多刺 2 次, 在进行操作的过程中需要注意深度, 以防损伤过度导致花生胚死亡(如图 2)。



Figure 2. Puncture of germinating seeds
图 2. 穿刺萌动种胚

2.2.3. 金刚砂和超声波处理穿刺的萌动种胚

将针刺处理过的花生种子放入烧杯，加入少量金刚砂，加水没过，置于超声波仪进行超声波处理(如图3，工作效率 800 W，工作 10 s，休息 3 s，循环 3 次)。



Figure 3. Treatment of germinating seeds by emery and ultrasonic wave

图 3. 金刚砂和超声波处理萌动种胚

2.2.4. 农杆菌共培养

将烧杯中的水倒掉，洗净沾在花生上的金刚砂，转入广口瓶，加入已培养好的菌液，液面稍微高于花生(菌液取已完成活化的 CP4 菌株加入新的 LB 培养基中，每 100 ML 瓶加入菌液 200 ul，置于摇床中摇动培养，温度为 28℃，转速为 130 rpm，将菌液培养至分光光度值 $OD_{260} = 0.6$ 后，放置于 4℃ 冰箱保存)。用移液枪加入相应 AS (终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$)，用保鲜膜封住瓶口，然后在膜上插几个小洞，方便透气，放置于摇床共培养，转速 175 rpm，28℃ 侵染 12 h。设置对照与处理(如图 4)，对照种子浸泡后未进行任何处理，摇床培养用水培。



Figure 4. Culture of agrobacterium

图 4. 农杆菌共培养

2.2.5. 清洗

清水冲洗处理过的花生种子。

2.2.6. 播种

播种花生畦宽 20 cm, 行距 27 cm, 每穴 3~4 粒, 尽量保证土地平整。最后小心为花生萌发种子盖土, 避免损伤种胚, 盖土厚度为 2~3 cm。

2.2.7. 田间筛选

播种后, 每周观察一次花生的生长状况, 在幼苗长到 3~5 叶期时, 开始进行除草剂抗性田间筛选, 共喷洒四次, 各次间隔 3 周。第一次, 1:1000 浓度的草甘膦溶液, 分别对仲恺花 01 和 12 号对照组和实验组进行均匀喷雾, 挂好标签。第二次浓度 1.5:1000, 第三次浓度 4:1000, 第四次浓度 7:1000。

2.2.8. 收获 T1 代并进行分子检测

收获抗草甘膦的花生 T1 种子, 并继续播种, 提取幼苗叶片 DNA 进行 PCR 分子检测。DNA 提取采取 SDS 法, PCR 扩增体系为 25 ul, 扩增引物序列为, 上游引物: 5'-ACCATCGTCAACCACTACAT-3', 下游引物: 5'-AGTCCAGCTGCCAGAAACCC-3', 扩增产物片段大小为 438 bp, 引物由上海生物工程股份有限公司合成。

3. 结果与分析

3.1. T0 代转化及大田筛选情况

从 2018 年 4 月 28 日第一次观察花生播种及喷药后生长情况到 2018 年 7 月 28 日收获花生, 期间共 4 次喷药, 5 次对花生进行观察。由于第一、第二次花生喷药的浓度比较低, 花生整体变化不大, 生长旺盛, 处理组和对照组的花生变化不明显, 第三、第四次加大浓度后, 对照喷药的植株叶子发黄, 长势受抑制, 甚至枯萎死亡(图 5 右边植株), 处理组的花生植株也大部分叶子发黄, 枯萎, 抗性好的植株长势良好(图 5 左边植株)。最后收获花生(图 6)。

实验通过穿刺法辅助转化萌发种子仲恺花生 01 号 900 粒, 仲恺花生 12 号 600 粒。不做任何处理空白对照仲恺花生 01 号 100 粒, 空白对照仲恺花生 12 号 70 粒。将转化处理种子和空白对照种子直接播种于实验田中, 播种后仲恺花生 01 号处理组出苗 550 株, 出苗率为 61.1%(表 1), 对照组出苗 75 株, 出苗率 75%; 仲恺花生 12 号处理组出苗率 380 株, 出苗率 63.3%, 对照组出苗 50 株, 出苗率 83.3%。生长



Figure 5. Field screening
图 5. 大田筛选情况



Figure 6. Harvesting peanut
图 6. 收取花生

期间,从第一次到第五次共 3 个月时间进行草甘膦除草剂喷洒筛选,经过喷洒处理的对照组花生植株全部枯萎死亡,实验组仲恺花生 01 号植株存活苗为 5 株,其中 3 株表现为低抗,2 株表现为中抗;实验组仲恺花生 12 号植株存活苗 6 株,其中 4 株表现为抵抗,2 株表现为中抗(表 1)。

大田花生转化植株除草剂抗性筛选划分标准:

高抗(H):整个植株叶片均为正常绿色,叶片挺拔。叶面上没有或仅有个别黄色斑块(相当于 Mannerlof 等的 8~10 级),植物生长发育未受到影响。

中抗(M):植株上绝大多数叶片为正常绿色,但是叶片出现轻微下披,生长速度减慢,少数叶片出现黄色斑块(相当于 Mannerlof 等的 6~8 级)。

低抗(L):植株上部分叶片发黄,萎蔫,出现明显的受害症状。生长发育受到影响,但经过一段时间后植株仍能够恢复生长(相当于 Mannerlof 等 3~5 级),植株表现出明显的耐性。

Table 1. Result of EPSPS gene transformation and screening of T0

表 1. T0 代转化处理情况

品种	处理方法	萌动种子处理数	T0 出苗数(出苗率)	抗性苗(抗性率)	中抗	低抗
仲恺花 01 号	穿刺胚	900	550 (61.1%)	5 (0.9%)	2	3
仲恺花 12 号	穿刺胚	600	380 (63.3%)	6 (1.5%)	2	4

3.2. T1 代种子出苗及生长情况

如图 7 所示,将 T1 代种子室内播种,20 天后幼苗叶片供 DNA 提取。

3.3. 提取 T1 代花生叶 DNA 及分子检测

图 8 为 T1 代种子幼苗进行 DNA 提取的电泳图。如图可以看出 DNA 条带有降解,不清晰。主要原因是花生材料含有酚类和糖类物质比较多, DNA 较难提取,电泳时干扰多。



Figure 7. Budding and growth of T1 generation (A: 2 d, B: 7 d, C: 20 d)
图 7. T1 代播种后种子的出芽与生长情况(A: 2 天, B: 7 天, C: 20 天)

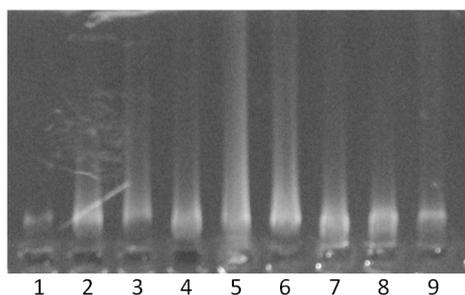


Figure 8. DNA of T1
图 8. DNA 电泳图

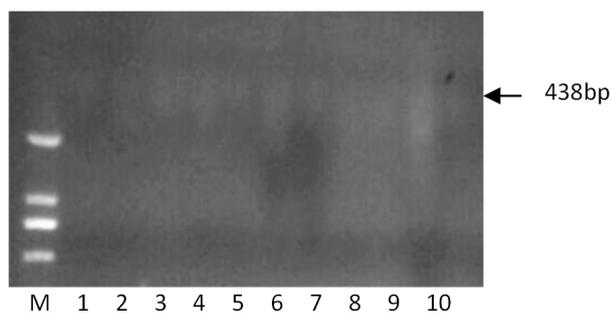


Figure 9. PCR of T1
图 9. PCR 电泳图

图 9 为 T1 代 DNA 进行目的基因扩增的结果。如图所示，从扩增出的 PCR 的电泳图中看不到很明显的目的条带，但模模糊糊又似乎有，扩增效果差。应该进一步优化 DNA 提取和 PCR 扩增程序。可能的原因：1) 模板中含有杂质，DNA 提取的质量差。2) 在提取制备模板时丢失过多，模板降解严重，导致模板量太少。

4. 讨论

4.1. 穿刺法处理萌动种子的影响

穿刺处理过的种子和没有处理的种子相比，穿刺过的种子存活率较低(表 1)，植株长势较差。说明穿刺对花生胚造成较大伤害，不利于出芽。但造成伤害对农杆菌侵染及基因转化又是有利条件，所以本方法对穿刺的深度和面积等参数有严格的要求。

4.2. 除草剂的浓度对花生的影响

本实验第一次按 1:1000 的比例喷洒除草剂,由同一人以匀速喷洒除草剂,花生叶片出现枯黄、损伤,其他部位没有受到影响。第二次按 1.5:1000 的比例喷洒除草剂,花生植株子叶与第一次相比叶子发黄,少部分枯萎,生长状况差;少数植株生长旺盛,对草甘膦除草剂具有不同程度的抗性。由于前两次喷洒除草剂后还没有出现死亡植株,所以第三次加大浓度,按 4:1000 的比例喷洒除草剂,与前两次相比大部分植株叶子枯黄,枯萎,生长状况差,少数植株生长旺盛,但是还是没有死亡植株,所以进行第四次喷药,加大药量,按 7:1000 的比例喷洒除草剂,25 天后观察,空白对照中喷洒除草剂后的植株全部死亡,处理中除少数可能转入转基因 ESPSP 的植株生长势良好(图 5 右),大部分花生植株不具抗性,经过喷洒除草剂,叶片基本枯萎,最后死亡。

4.3. 大田抗性与分子检测结果

本实验经过大田四次筛选,结果很明显看出确实有些苗具有大田除草剂抗性(如图 5),生长状况比对照具有明显优势,但 PCR 分子检测却很不明显。对于这种现象,可能本实验对花生 DNA 提取和 PCR 检测方法不当;另外也可能是在本实验所用花生品种中本身具有此种抗性,经过筛选把它进一步富集加强且区分出来,而不是转基因的结果。需要进一步验证这两种可能性。

5. 结论

本实验尝试了利用金刚砂辅助超声波用农杆菌转化花生萌动种子,尽管最后分子检测的 PCR 结果不明显,但还是获得具有明显大田抗性的植株,不失为一种可行的传统抗性育种筛选方法;另外,从转基因方面讲,毕竟是第一次尝试,从设计步骤和大田筛选结果看整个操作处理程序是可行的,也得到了大田抗性明显的植株。但是程序中的各级参数例如针刺的位置和深度、萌动时间、金刚砂的浓度和超声波强度等均需更细致的实验加以优化,尤其对 DNA 和 PCR 检测方法的优化。

通过本实验,摸索出利用金刚砂辅助超声波进行农杆菌转化花生萌动种子程序如下:1)花生剥壳和恒温水 28℃浸泡 12 小时;2)穿刺处理萌动种子胚;3)金刚砂和超声波处理穿刺的萌动种胚;4)农杆菌共培养;5)花生播种、田间管理与抗性筛选;6)T1 代转化种子室内播种;7)提取 T1 代花生叶 DNA 及分子检测。

基金项目

广东省大创基金,穿刺胚和金刚砂超声波辅助农杆菌转化法进行花生转基因(201711347062)。

参考文献

- [1] Malik, C.P. and Sanadhya, D. (2018) Genetic Engineering and GM Crops. *Plant Science Research*, **34**, 251-258. <https://doi.org/10.32381/JPSR.2018.34.02.14>
- [2] Kauscha, A.P., Nelson, K., Hagua, J., et al. (2019) Edit at Will: Genotype Independent Plant Transformation in the Era of Advanced Genomics and Genome Editing. *Plant Science*, **281**, 186-205. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.01.006>
- [3] 柴志坚, 张芳, 黄园园, 等. 根瘤农杆菌基因工程[J]. 分子植物育种, 2016, 14(1): 92-97.
- [4] 董喜才, 杜建中, 王安乐, 等. 乙酰丁香酮在植物转基因研究中的作用[J]. 中国农学通报, 2011, 27(5): 292-299.
- [5] Yang, J.B., Xu, Z.H., Wei, Z.M., et al. (1993) Factors of *Agrobacterium tumefaciens* Attach to Cultured Cell of Cereals. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*, **26**, 1-6. (In Chinese)
- [6] Xu, Y., Wang, T. and Li, B.J. (1991) A Study of Gene Transformation of Plant Germinating Seed Embryo Induced by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*, **24**, 109-119. (In Chinese)

-
- [7] Wu, C.Y. and Sui, Y. (2019) Efficient and Fast Production of Transgenic Rice Plants by Agrobacterium-Mediated Transformation. *Methods in Molecular Biology*, **1864**, 95-103. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8778-8_7
- [8] Rakesh, K., Harohalli, M.M., Amandeep, K., *et al.* (2019) Optimization of Agrobacterium-Mediated Transformation in Spring Bread Wheat Using Mature and Immature Embryos. *Molecular Biology Reports*, **46**, 1845-1853.
- [9] Maria, J.V.D.V., Marchlo, A.F., Edilson, P., *et al.* (2008) Sonicated Assisted Agrobacterium-Mediated Transformation of Tropical Maize Embryos. *Brazilian Journal der Millet and Sorghum*, **7**, 105-112.
- [10] Sun, Y., Wang, J.X., Liu, S.X., *et al.* (2001) Gene Transformation Methods of Agrobacterium Mediated Plant Germinatingseed. Chinese Patent No. ZL01104185.4.
- [11] 梁雪莲, 郭平毅, 孙毅, 等. 玉米 3 种非组培转基因方法转化外源 Bar 基因研究[J]. 作物学报, 2005, 31(12): 1648-1653.
- [12] 刘新星, 罗俊杰, 陈玉梁, 等. 农杆菌介导棉花和玉米非组培转化方法探索[J]. 甘肃农业科技, 2014(11): 11-14.
- [13] Zhao, X., Meng, Z.G., Wang, Y., *et al.* (2017) Pollen Magnetofection for Genetic Modification with Magnetic Nanoparticles as Gene Carriers. *Nature Plants*, **3**, 956-964. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0063-z>
- [14] 宋敏, 刘丽军, 苏颖异, 等. 抗草甘膦 ESPSP 基因的专利保护分析[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(2): 147-152.