

文章编号: 1674 - 7054(2016) 04 - 0427 - 08

农杆菌介导的木薯遗传转化体系的优化

廖华兰 黎秀琼 李可 李伯凌 熊茜 苏童 李春霞 陈银华 罗丽娟

(海南大学 农学院/海南省热带生物资源可持续利用重点实验室,海口,570228)

摘要: 以木薯腋芽为外植体,通过添加不同含量的 2,4-D 和 picloram 摸索诱导体细胞胚及 FEC 的最佳激素条件;利用优化的再生体系,以木薯脆性胚性愈伤组织(FEC)为受体,对农杆菌侵染 FEC 的侵染浓度、侵染时间以及侵染后潮霉素抗性筛选浓度进行了研究。结果表明,12 mg · L⁻¹ 的 picloram 能较快诱导出体细胞胚及 FEC;农杆菌菌液浓度 $OD_{600} = 0.4$ 并侵染 30 min 为 FEC 转化效率及植株再生率的最佳条件;共培养后,通过逐渐增加潮霉素筛选浓度(0, 5, 8, 15 mg · L⁻¹) 能更有效地提高植株的再生率。

关键词: 木薯;组织培养;报告基因;遗传转化;分子鉴定

中图分类号: S 533 **文献标志码:** A DOI:10.15886/j.cnki.rds wxb.2016.04.004

木薯(*Manihot esculenta* Crantz) 为大戟科(Euphorbiaceae) 木薯属灌木状多年生植物,是世界三大薯类作物之一^[1],原产于热带美洲,现广泛栽培于热带和部分亚热带地区^[2-3],有地下粮仓、淀粉之王的美誉^[4],但在生产上,病害一直是限制木薯产量提高的制约因素之一^[5]。木薯的世界平均产量为 10 t · hm⁻²,我国约为 15 ~ 30 t · hm⁻²。2008 年广西藤县木薯示范区内,在严格控制病害发生的条件下,平均产量为 46.2 t · hm⁻²^[6],可见病害造成的产量损失超过 1/3。由于木薯遗传背景复杂以及生产和工业上对木薯需求量的增加,因此,建立高效的木薯育种方法来提高木薯的产量很有必要。在现有的报道中,利用非洲木薯 TMS60444 脆性胚性愈伤组织(FEC) 经农杆菌介导遗传转化获得再生植株已经取得成功,但还存在 FEC 悬浮培养系统周期较长,容易发生变异、再生频率低、实验操作复杂等问题^[7],在使用农杆菌侵染共培养后,也因为清洗而破坏 FEC,使其需要较长时间恢复活性^[8],转化后直接采用高浓度抗生素进行抗性筛选容易导致大量外植体褐化死亡而影响转化效率^[9]。笔者采用组织培养的方法^[9-11],通过不同生长素浓度诱导木薯体细胞胚及愈伤组织的产生,利用农杆菌介导的遗传转化法^[12-17]将报告基因 *gus* 转入脆性胚性愈伤组织,选择出共培养后 FEC 不需要经过清洗就能存活且不会滋生农杆菌的最佳菌液浓度及转化时间,并在筛选过程中选择抗生素梯度添加(从低到高再到低),提高了转化 FEC 的再生效率。本研究旨在有效克服当前木薯遗传转化体系中存在的多种细节问题,简化繁琐的实验操作步骤,构建高效稳定的木薯遗传转化体系,为木薯基因工程抗病育种和基因功能鉴定提供实验支持。

1 材料与方 法

1.1 植株材料 实验植物材料为木薯华南 6 号(SC6)、华南 8 号(SC8)、阿根廷 7 号(Arg7)、华南 124 号(SC124) 以及模式品种 TMS60444,农杆菌工程菌(pCambia1301-*gus*)。

1.2 培养基 本实验培养基见表 1,表中培养基均在 115 °C 高温高压灭菌 30 min,冷却后备用。

收稿日期: 2016 - 03 - 16

基金项目: 国家自然科学基金(31260345,31560497);海南省重大科技项目(ZDZX2013023 - 2)

作者简介: 廖华兰(1989 -),女,海南大学农学院 2013 级硕士研究生. E-mail: 545404788@qq.com

通信作者: 李春霞(1980 -),女,副教授. 研究方向: 病原菌致病分子机理. E-mail: chun_xia_li@126.com

表1 木薯各诱导培养基及成分

Tab. 1 Components of the medium

培养时期 cultivate period	培养基名称 medium name	培养基成分 Medium composition
体细胞胚发生	基础培养基(MS ₀)	1 × MS 盐(含维他命) 2 μmol · L ⁻¹ CuSO ₄ 2% 蔗糖 0.8% 琼脂粉 pH5.8
	腋芽膨大培养基(CAM)	1 × MS 盐(含维他命) 2 μmol · L ⁻¹ CuSO ₄ 10 mg · L ⁻¹ 6-BA 2% 蔗糖 0.8% 琼脂粉 pH5.8
	体细胞胚诱导培养基(CIM)	1 × MS 盐(含维他命) 2 μmol · L ⁻¹ CuSO ₄ picloram/2 4-D, 2% 蔗糖 0.8% 琼脂粉 pH5.8
FEC 诱导培养	脆性胚性愈伤培养基(GD)	1 × GD 盐(含维他命) 12 mg · L ⁻¹ 毒莠定 2% 蔗糖 0.3% 琼脂粉 pH5.8
基因转化 及筛选	共培养培养基(SH)	1 × SH 盐, 1 × MS 盐(包含维他命) 12 mg · L ⁻¹ picloram, 6% 蔗糖, pH5.8,
	GD + H + C ₅₀₀	1 × GD 盐(含维他命) 12 mg · L ⁻¹ 毒莠定 2% 蔗糖 潮霉毒素 0.5 8 15 mg · L ⁻¹ 羧辩青霉素 500 mg · L ⁻¹ 0.3% 琼脂粉 pH5.8
植株再生	体细胞胚形成培养基(MSN)	1 × MS 盐(含维他命) 1 mg · L ⁻¹ NAA 2% 蔗糖 0.8% 琼脂粉 pH5.8
	芽器官形成与伸长培养(CEM)	1 × MS 盐(含维他命) 2 μmol · L ⁻¹ Cu SO ₄ 0.4 mg · L ⁻¹ 6-BA 2% 蔗糖 0.8% 琼脂粉 pH5.8

1.3 木薯无菌苗的获得 剪取含 1~2 个腋芽的幼嫩木薯茎段,用自来水冲洗干净,75% 酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗 2 次,3% 的 NaClO 处理 15 min,再用无菌水冲洗 3~4 次,然后用无菌滤纸吸干表面的水分,接种到 MS 固体培养基中。黑暗条件下 28 °C 恒温培养,待叶子长出后,置于光照培养箱内培养 6~8 周。培养条件:光照强度为 2 500 lx,每天光照 16 h,28 °C。

1.4 体细胞胚的诱导及成熟 无菌条件下,取生长健壮、苗龄为 6~8 周的木薯幼苗,去掉叶片和叶柄后,置于无菌的滤纸上,选择腋芽还未分化出叶的茎,用手术刀切成带有 1~2 个腋芽的茎段,用镊子轻轻将茎段平放于 CAM 固体培养基中,28 °C 黑暗培养 2~4 d 后,将腋芽部分切下(已分化成小叶子或将分化成叶子的部分用镊子小心摘除干净),置于不同含量的 2 4-D(1 2 3 4 5 6 mg · L⁻¹) 及 picloram(8, 10, 12, 13 mg · L⁻¹) 的 CIM 固体培养基中,每皿放 12~15 粒腋芽,28 °C 黑暗培养。2 周后统计体细胞胚的出胚率(出胚率 = 诱导出体细胞胚的胚数/接种腋芽数 × 100)。比较各激素浓度的出胚率,选择最适于诱导体细胞成熟的激素浓度进行后续实验。将未成熟的体细胞胚用镊子小心转接到含经筛选后得到的激素浓度最合适的 CIM 固体培养基上,继续诱导成熟体细胞胚,每 2~3 周继代 1 次,共继代 3~4 次。

1.5 不同品种在不同 picloram 的浓度下体细胞胚的诱导 选取生长健康的木薯品种(TMS60444, SC6, SC8, SC124, ARG7),诱导腋芽后将其放置于含 picloram 的浓度分别为 8, 10, 12, 13 mg · L⁻¹ 的 CIM 固体培养基中诱导体细胞胚的产生,14 d 后观察记录胚的诱导情况。

1.6 脆性胚性愈伤组织(FEC)的诱导 将成熟体细胞胚转移到含有 12, 13 mg · L⁻¹ picloram 的 GD 固体培养基中,诱导体细胞胚的脆性胚性愈伤组织(FEC)的产生,首先在 28 °C 黑暗培养 2~3 周,观察记录愈伤组织的生长情况,选择出最合适的 picloram 浓度进行下一步 FEC 的诱导。用镊子小心从非脆性胚性愈伤组织(NFEC)上将脆性胚性愈伤组织(FEC)分离出,弃掉 NFEC,将 FEC 转移到新的含有最合适 picloram 浓度(12 mg · L⁻¹) 的 GD 固体培养基中,28 °C, 16 h 光照培养,每 2~3 周继代 1 次,不断剔除 NFEC,直到不再

有新的 NFEC 产生。当愈伤组织完全纯化后大量快繁,以备后续实验需要。

1.7 植株再生 将 FEC 转到 MSN 固体培养基上,28 ℃,16 h·d 光照。1~2 周后,将 MSN 固体培养基上长出的子叶胚转移到 CEM 固体培养基中诱导根和真叶的生成,并诱导茎的伸长。2~3 周继代 1 次,直至长出真叶。然后将生长良好的小植株用手术刀切下,于 MS 固体培养基中培养,28 ℃,16 h 光照直至生根。

1.8 报告基因 *gus* 的转化 基因的转化采用农杆菌介导的遗传转化方法。在含 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素和 50 mg·L⁻¹ 利福平的 LB 培养基上划线培养具卡那霉素抗性的 pCAMBIA1301-*gus* 质粒的农杆菌,28 ℃ 倒置培养 2 d 后,挑取单克隆于 LB 液体培养基,培养 12 h 后收集菌体,用 SH 液体培养基重悬菌体,设置菌液浓度分别为 $OD_{600} = 0.1, 0.2, 0.4, 0.8$, 每个浓度 3 个重复。将愈伤组织挑取放置于菌液中,28 ℃,100 r·min⁻¹ 分别培养 15, 30, 45 min, 用滤膜滤掉菌液。在 SH 固体培养基上放一层无菌滤纸,将 FEC 平铺于滤纸上,28 ℃,16 h 光照培养 2 d 后直接将滤纸及 FEC 转移至 GD 培养基,培养 2 d 后再转移至含 5 mg·L⁻¹ 潮霉素的 GD 培养基,培养 1 周,之后每隔 1 周依次将其转移至含 8 mg·L⁻¹, 15 mg·L⁻¹ 潮霉素的 GD 培养基中培养。

1.9 转化植株的再生 将经过 15 mg·L⁻¹ 潮霉素筛选的 FEC 用镊子轻轻挑取放置于 MSN 固体培养基上,诱导分化子叶胚,待分化出绿色子叶后将其转移到 CEM 培养基上诱导芽的产生和茎的伸长。待茎长至 3~5 cm 后,将茎切下转移到 CBM 固体培养基中继续生根壮苗。

1.10 转基因植株的鉴定 报告基因 *gus* 染色:将转化筛选培养 20 d 的 FEC、子叶胚以及再生植株的叶片取出,无菌水清洗残留培养基后,浸于 GUS 染色中,37 ℃ 放置过夜。之后去掉染色液,加入 70% 的乙醇 65 ℃ 脱色,直至样品呈无色或白色,在体式显微镜下观察染色情况并拍照。转基因植株的 PCR 检测:采用 CTAB 法提取转化再生植株叶片基因组 DNA,用潮霉素磷酸转移酶基因引物 Htp-F/R(引物序列)进行 PCR 扩增。程序如下:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 循环;72 ℃ 8 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的 2,4-D 对体细胞胚诱导的影响 在含有 1~6 mg·L⁻¹ 2,4-D 的 CIM 培养基中,愈伤组织呈淡黄色,结构较为松散,且水渍化较严重(图 1)。其中 2,4-D 为 2 mg·L⁻¹ CIM 培养基中,出胚率为 70.8%,为该激素出胚率最高的浓度。在含有其他浓度 2,4-D 的 CIM 培养基中,诱导体细胞胚的效率都较低。同时,在实验中还发现 2 mg·L⁻¹ 2,4-D 诱导体细胞胚分化成喇叭胚和子叶胚较其他浓度约快 2 周。

2.2 不同浓度的 picloram 对体细胞胚诱导的影响 在含有不同浓度 picloram (8~13 mg·L⁻¹) 的培养基中,体细胞胚的出胚率随着 picloram 浓度升高而增加。浓度为 12 mg·L⁻¹ 时的出胚率为 83.3%,为该激素对体细胞胚诱导的最大值;其余浓度下诱导出的体细胞胚的出胚率均低于 12 mg·L⁻¹。含有浓度为 13 mg·L⁻¹ picloram 的培养基中体细胞胚的出胚率为 80.3%,与 12 mg·L⁻¹ 的差异不显著。添加这 2 种浓度 picloram 的培养基中获得的愈伤组织结构较致密,适合用于诱导成熟体细胞胚和脆性胚性愈伤(图 2)。因此,后续试验中设置 picloram 浓度 12~13 mg·L⁻¹ 为诱导体细胞胚的较适浓度(表 2)。

2.3 不同基因型对体细胞胚诱导的影响 接种腋芽 2 周后,对 5 个品种的体细胞胚进行计数分析,结果表明:当 picloram 浓度为 12 mg·L⁻¹ 时,5 个木薯品种的体细胞胚的出胚率高于其他浓度的,进一步证实 picloram 12 mg·L⁻¹ 为最适合诱导胚浓度;而对于不同的木薯品种,TMS60444 无论在哪种浓度 picloram 培养基中,产生体细胞胚的比率都最高,尤其在 12 mg·L⁻¹ 时达到 89.2%,其次是 SC8,为 83.3%,其他几个品种都接近 80%(表 3)。因此,本实验选择 TMS60444 为实验材料,建立稳定的转化体系后将继续以 SC8 为实验材料进行转化。

表2 2,4-D和picloram的不同浓度对诱导体细胞胚的影响

Tab. 2 somatic embryogenesis induction in CIM medium under the different concentrations of picloram and 2,4-D

处理号 Treatment number	浓度/(mg·L ⁻¹) concentrations		外植体个数 Number of explants	体细胞胚个数 number of Somatic embryo	愈伤组织数 Number of callus	出胚率/% Embryo rate	出愈率/% callus rate
	2,4-D	picloram					
A	1	-	24	11	20	45.8	83.3
B	2	-	24	17	22	70.8	91.6
D	3	-	24	13	18	54.2	75.0
E	4	-	24	10	22	41.6	91.6
F	5	-	24	13	20	54.1	83.3
G	6	-	24	11	22	50.0	91.6
C8	-	8	24	14	24	58.3	100
C10	-	10	29	18	25	62.1	86.2
C12	-	12	36	30	34	83.3	94.4
C13	-	13	36	29	34	80.5	94.4

表3 不同picloram浓度对不同品种木薯体细胞胚出胚率(%)诱导的影响

Tab. 3 somatic embryo rate(%) in CIM medium supplemented with the different concentrations of picloram

浓度/(mg·L ⁻¹) concentrations	木薯品种 varieties of cassava				
	TMS60444	SC6	SC8	SC124	Arg7
8	71.0	60.3	67.8	59.4	63.1
10	76.3	65.7	73.6	71.9	73.5
12	89.2	79.3	83.3	81.3	80.2
13	84.6	72.1	80.5	78.1	76.5

2.4 不同浓度的picloram对成熟体细胞胚及脆性胚性愈伤FEC诱导的影响 应用12,13 mg·L⁻¹ picloram诱导成熟体细胞胚时发现,成熟体细胞胚的诱导效果较好,均呈指状,淡黄色。但体式显微镜下观察时发现添加picloram 12 mg·L⁻¹的培养基中成熟体细胞胚的数量较picloram 13 mg·L⁻¹多(图3),说明在诱导成熟胚的过程中,12 mg·L⁻¹为picloram最佳浓度。

为了进一步验证在诱导脆性胚性愈伤组织FEC过程中,12 mg·L⁻¹ picloram的诱导效率是否也高于13 mg·L⁻¹ picloram,在含12,13 mg·L⁻¹ picloram的GD培养基中诱导愈伤组织的发生,每2~3周继代1次。培养2~3个月后观察发现:含picloram 13 mg·L⁻¹的GD培养基中诱导产生的脆性胚性愈伤几乎没有明显的小圆颗粒的愈伤组织,且整个愈伤明显水渍化。用镊子去感受愈伤组织的松脆程度时,整个组织松软;而在含有picloram 12 mg·L⁻¹的GD固体培养基中诱导产生的脆性胚性愈伤,体式显微镜下可观察到初生的FEC,继续在GD固体培养基上进行诱导、增殖培养、不断纯化,5~6个月后就会有明显的小圆颗粒状的FEC产生(图4)。因此,12 mg·L⁻¹ picloram是诱导FEC的最佳浓度。

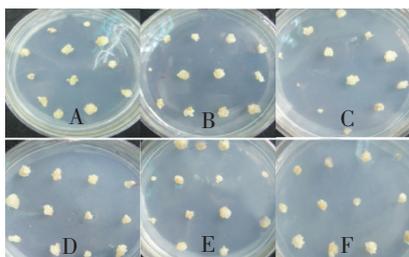


图1 不同浓度2,4-D体细胞胚的诱导情况

Fig.1 somatic embryo growth in CIM medium supplemented with different concentrations of 2,4-D
A. 1 mg·L⁻¹; B. 2 mg·L⁻¹; C. 3 mg·L⁻¹; D. 4 mg·L⁻¹;
E. 5 mg·L⁻¹; F. 6 mg·L⁻¹

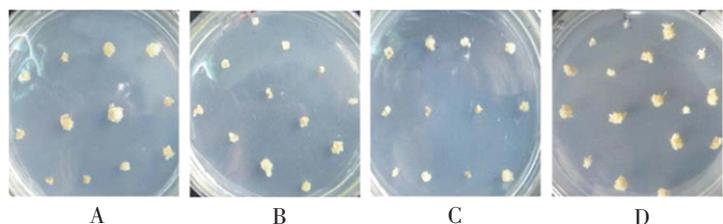


图2 不同浓度picloram对体细胞胚的诱导情况

Fig.2 somatic embryo growth in CIM medium supplemented
With different concentrations of picloram
A. 8 mg·L⁻¹; B. 10 mg·L⁻¹; C. 12 mg·L⁻¹ D. 13 mg·L⁻¹

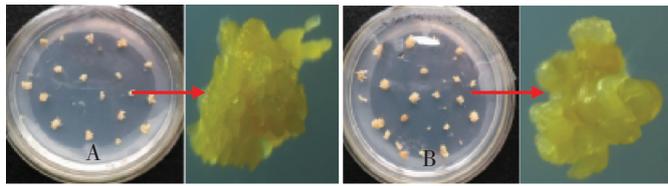


图3 不同浓度的 picloram 对成熟体细胞胚的诱导情况
Fig. 3 mature somatic embryo growth in CIM medium under the different concentrations of picloram
A. $12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; B. $13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

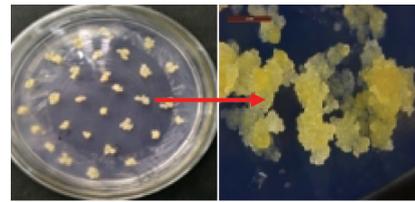


图4 $12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ picloram 诱导成熟 FEC 的生长情况
Fig.4 mature FEC growth under $12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Picloram

2.5 农杆菌菌液浓度和侵染时间对木薯 FEC 存活率的影响 对工程菌 (pCAMBIA1301-gus) 菌株侵染后在 $\text{GD} + \text{H}_{15} + \text{C}_{250}$ 固体培养基上培养 7 d 的 FEC 进行观察, 结果表明: 当菌液浓度 $OD_{600} = 0.1$ 时, 3 个不同的侵染时间段的 FEC 都出现大部分死亡现象, $OD_{600} = 0.1$ 时, FEC 的死亡数比 $OD_{600} = 0.2$ 时多, FEC 表面干净, 没有残留的菌体; 当菌液浓度 $OD_{600} = 0.4$ 时, 3 个时间点的 FEC 生长状况都较其他浓度生长状况好。侵染时间为 30 min 时, FEC 生长最健康, 只有极少数 FEC 表面有残留的菌体, 且较容易处理; 当菌液浓度为 $OD_{600} = 0.8$ 时, 3 个时间点的 FEC 几乎全部死亡, 并且侵染后有较多的残留菌体无法清除, 影响 FEC 的后期生长 (图 5)。因此, 初步确定, 农杆菌侵染木薯 FEC 的最佳侵染条件为: 菌液浓度 $OD_{600} = 0.4$, 侵染时间为 30 min。

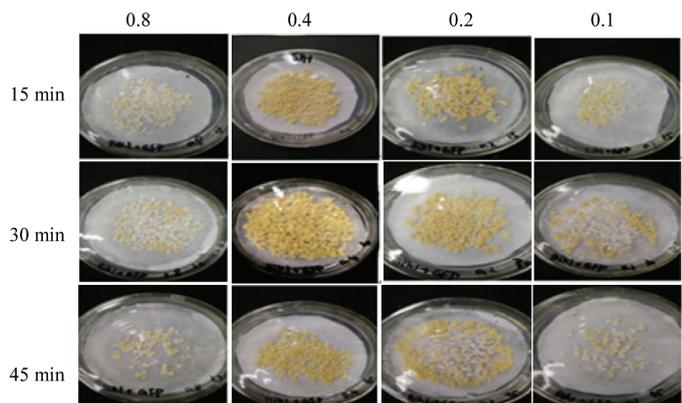


图5 不同浓度菌液和不同侵染时间下的 FEC 生长情况

0.1, 0.2, 0.4, 0.8 为菌液的 OD_{600} 值; 15, 30, 45 min 表示侵染时间

Fig.5 Phenotype of FEC Under the different bacteria liquid concentration and the different infection time
0.1, 0.2, 0.4, 0.8 indicate agrobacterium OD_{600} value; 15, 30, 45 min indicate infection time

2.6 转化植株的再生 将转化培养后的 FEC 转移至 MSN 培养基上 20 d 后可分化出绿色子叶 将绿色子叶胚转移至 CEM 培养基上诱导长大, 仍未分化的 FEC 转移至新的 MSN 培养基上 继续分化。约 30 d 后有大量

子叶长大, 但只有极少数子叶会分化出芽点, 大部分子叶并未有芽点分化出。将带有芽点的子叶转移至 CEM 培养基中, 子叶在 CEM 培养基上 4 周左右开始分化出真叶、不定芽及不定根, 用手术刀将长出的不定芽切下转移至 MS 固体培养基中 6~8 周即可获得 8 cm 高的转基因木薯再生苗 (图 6)。

2.7 转化过程的 GUS 染色检测 将侵染后培养 20 d 的 FEC 以及在 MSN 培养基上诱导长出的子叶和转化再生植株的叶片、茎进行 GUS 染色检测, 未转化的组织作对照。体视显微镜观察拍照发现: 经农杆菌侵染后的 FEC 有少数颗粒被染成了蓝色, 对照组 FEC 并未染成蓝色 (图 7 A); 经过潮霉素筛选培养后长出的子叶胚被 GUS 染液染成蓝色 (图 7B); 再生植株的叶片及茎染色后观察发现, 有 43 株苗的叶片及芽被染成蓝色, 对照未被染色 (图 7 C 和 D)

2.8 转基因植株的 PCR 检测 经转化、潮霉素筛选后获得的 43 棵再生植株提取叶片基因组 DNA 后, 应用潮霉素磷酸转移酶基因引物 Htp-F/R 扩增进行扩增, 未转化植株叶片 DNA 作为阴性对照。结果显示: 经潮霉素抗性筛选后得到的再生苗中只有 7 株扩增出约为 400 bp 大小目的条带, 对照组没有条带, 阳性率为 16.27% (图 8)。结果说明 报告基因已转入木薯基因组中, 且只有通过使用大批量的 FEC 进行转化、多次筛选, 才能获得少量转基因成功的木薯植株。

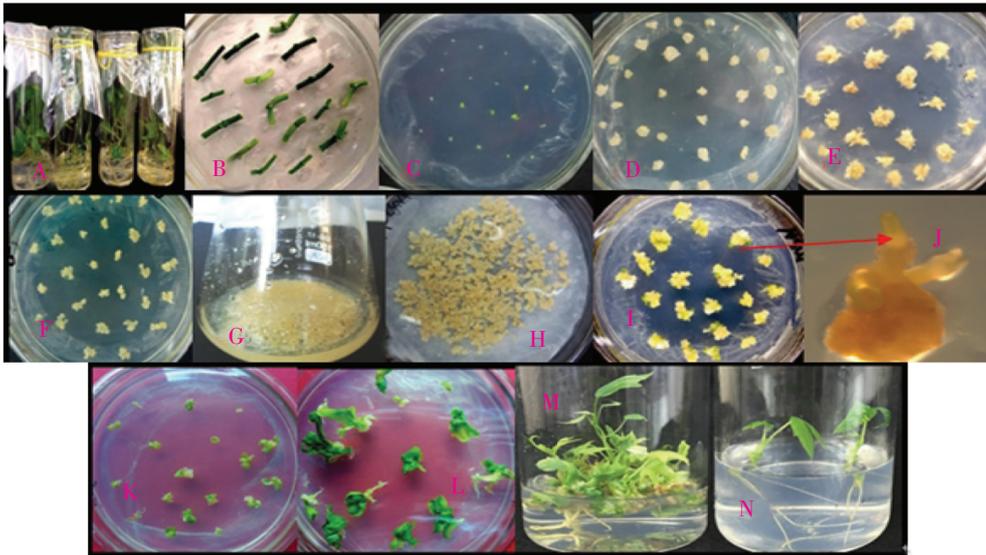


图 6 木薯遗传转化流程图

A:木薯组培苗; B:带腋芽的茎段; C:腋芽在 CIM 培养基上诱导产生体细胞胚; D:腋芽诱导 2 周后产生的体细胞胚; E:成熟胚; F:脆性胚性愈伤组织(FEC); G:菌液侵染 FEC; H:FEC 转换后共培养及筛选培养; I: MSN+ C₂₅₀ + H₁₅ 培养基上诱导子叶胚的产生; J: 显微镜下的子叶胚; K:CEM 培养基上生长的子叶胚; L:分化出顶芽的子叶胚; M:CEM 培养基上诱导真叶及不定根的形成; N:MS 培养基上生长再生苗

Fig.6 The flow chart of cassava genetic transformation

A: cassava plantlet. B: Swollen axillary bud on CAM.; C: axillary bud on CIM D: Immature somatic embryos (indicated by arrows) growing on a bed of NEFC on CIM. E: Mature somatic embryos on CIM. F: Cluster of FEC on GD appropriate for Agrobacterium inoculation. G: FEC for Agrobacterium inoculation. H: FEC following cocultivation spread onto mesh on GD + C₂₅₀ I, J: Developing embryo/cotyledon (indicated by arrow) on MSN + C₂₅₀ + H₁₅ K: Developing embryo/cotyledon transferred to CEM. L, M: Appearance of immature shoots following several weeks on CEM. N: In vitro transgenic cassava plantlet

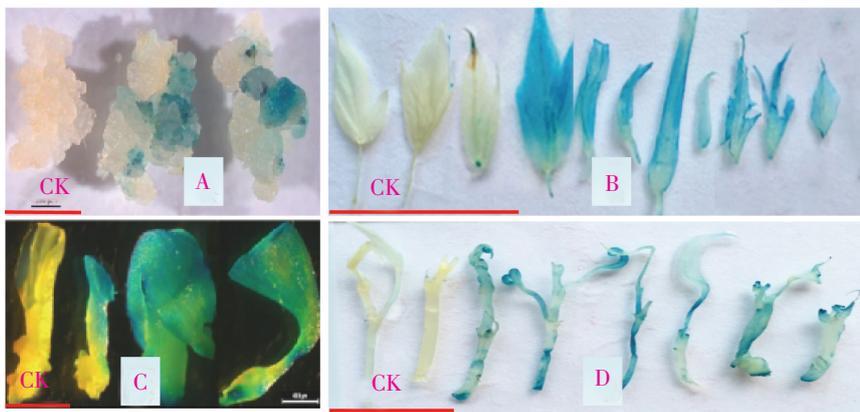


图 7 转基因植株再生过程的 GUS 染色

A: 愈伤组织; B:再生植株叶片; C:子叶胚; D:芽

Fig. 7 GUS staining of FEC and regenerate transplants

A: FEC; B: leaves from Transplants; C: cotyledons; D: bud

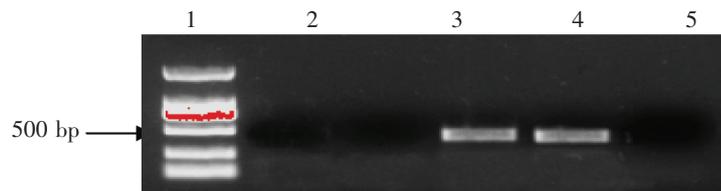


图 8 转基因木薯 PCR 检测

1:2 000maker; 2,3: 未转基因植株; 4,5:转基因植株; 6:H₂O

Fig.8 Detection of transgenic cassava via PCR

1:2 000maker; 2,3: No transgenic plants ; 4,5: transgenic plants; 6:H₂O

3 讨论

由于木薯遗传转化涉及外植体主要为脆性胚性愈伤组织和子叶切块,而两者都需要经过体细胞胚发生形成。生长素是诱导木薯初生和次生体细胞胚发生的唯一因素,目前尚无报道有其他因素可诱导木薯体细胞胚^[7]。因此,选择出诱导木薯体细胞胚发生的最佳激素浓度是建立木薯遗传转化体系的首要步骤。本实验分别采用 2,4-D 和 picloram 2 种激素的不同浓度来诱导木薯体细胞胚的发生,结果表明,一定浓度范围内,随着 Picloram 的浓度升高体细胞胚的发生率不断升高,当其浓度为 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,体细胞胚的产量达到最高,为 83.3%,Picloram 浓度为 $13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时体细胞胚的产量稍有下降,为 80.5%,这与朱文丽等^[8]的研究结果一致。而 2,4-D 6 个浓度中,最高的体细胞胚产量为 70.8%,此时 2,4-D 浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而朱文丽等^[8]认为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最佳浓度,可能需要通过调整培养基中所含激素、蔗糖和琼脂粉的比例来减少水质化现象的产生。通过 2 种激素不同浓度进行对比试验发现,picloram 浓度为 $12 \sim 13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 更适合用于诱导体细胞胚和脆性胚性愈伤。实验进一步运用了 picloram 的 4 个浓度梯度来分别诱导 5 个木薯品种,结果发现 5 个品种木薯体细胞胚的产量都是在 picloram 浓度为 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最高,进一步证实了 picloram $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为诱导体细胞胚的最佳浓度。其中,非洲木薯 TMS60444 体细胞胚的产量最高,出胚率可达到 89.2%,且更容易在较短的时间(3 个月)获得 FEC,而 SC8 需要大约 6 个月的时间才能获得较纯的 FEC,因此,本实验应用 TMS60444 作为实验材料构建木薯遗传转化体系,在以后的研究中可以进一步优化转化条件,将基因转入到木薯主要栽培品种中。

农杆菌介导的木薯遗传转化是菌体和外植体之间相互作用的极其复杂的过程。它涉及到农杆菌附着受体细胞,遗传转化的成功一个方面取决于农杆菌与植物受体相互作用获得转化细胞的数量,另一个方面取决于转化细胞再生能力的高低^[18]。每一步的因子都会影响到最后的转化效率。前人研究发现,处于对数分裂期的菌液才具有最强的活力^[19]。所以,在活化农杆菌时一定要把握好时间,振荡时间要适度,否则会引起其浸染能力的下降,不利于转化^[20]。转化后也尽可能不要用液体去多次清洗 FEC,否则会破坏 FEC 的结构,使其活性降低,影响转化效率及再生率。本研究通过实验发现: $OD_{600} = 0.1 \sim 0.8$ 时,3 个侵染时间的 FEC 都有大量死亡,但 $OD_{600} = 0.1$ 时的 FEC 比较干净,几乎没有残留的菌体,而 $OD_{600} = 0.8$ 的 FEC 有大量菌体残留。这可能是因为 $OD_{600} = 0.1$ 的菌液浓度低,转化率低,未转化成功的 FEC 不能在具潮霉素抗性筛选培养基上生长,而 $OD_{600} = 0.8$ 时菌液浓度过高,残留菌体过多,菌体的生长抑制了 FEC 的生长。在 12 个交叉实验中, $OD_{600} = 0.4$,侵染时间为 30 min 的 FEC 的生长状况最好、活力最强,虽然侵染前期有少量菌体残留,但经过 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 羧苄青霉素多次培养后能得到很好的抑制。因此,本实验初步得出对于木薯品种 TMS60444,在不经清洗 FEC 情况下,菌液浓度 $OD_{600} = 0.4$,侵染时间 30 min 为遗传转化的最佳条件,且经潮霉素浓度梯度筛选能够保证转化成功的概率及植株的再生率。对于其他木薯品种是否也同样适用,还需要进行后续研究。

参考文献:

- [1] 李超萍,时涛,刘先宝,等.国内木薯病害普查及细菌性萎蔫病安全性评估[J].热带作物学报,2011,32(1):116-121.
- [2] 黎贞崇,梁秀明.木薯作为我国燃料乙醇原料的潜力分析[J].酿酒科技,2010,190(4):31-33.
- [3] 李开绵,黄贵修.木薯主要病虫害[M].北京:中国农业科学技术出版社,2008.
- [4] 岑贞陆,黄思良.木薯抗细菌性枯萎病鉴定技术初报[J].作物杂志,2008(6):33-35.
- [5] Lozano J C. Cassava bacterial blight: a manageable disease[J]. Plant Disease, 1986, 70: 1089-1093.
- [6] 岑贞陆,黄思良.木薯抗细菌性枯萎病鉴定技术初报[J].作物杂志,2008(6):33-35.
- [7] 姚庆荣,郭运玲,郭安平.木薯组织培养和遗传转化研究进展[J].南方农业,2008(5):8-11.
- [8] Bull S E, Owiti J A, Niklaus M, et al. Agrobacterium-mediated transformation of friable embryogenic calli and regeneration of transgenic cassava[J]. Nature, 2009, 4(12): 1845-1854.
- [9] 王颖,郭军辉,陈雄庭,等.农杆菌介导木薯遗传转化过程中的几个影响因素[J].中国园艺,2013(10):1-3.

- [10] 马国华, 许秋生, 袁蕴兰, 等. 从木薯嫩叶直接诱导初生体细胞胚胎发生和芽的形成[J]. 植物学报, 1998, 40(6): 503–507.
- [11] 朱文丽, 莫饶, 李开绵, 等. 激素对木薯体细胞胚胎发生与植株再生的影响[J]. 热带作物学报, 2010(4): 621–625.
- [12] Woodward B, Puonti-Kaeräs J. Somatic embryogenesis from floral tissue of cassava (*Mnilot esculenta* Crantz) [J]. Euphytica, 2001, 120: 1–6.
- [13] 农艳丰. 农杆菌介导木薯“新选 048”遗传转化体系的初步建立[D]. 南宁: 广西大学, 2014.
- [14] 尹彩霞, 乔爱民, 张鹏, 等. 木薯组织培养和转基因育种研究进展[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2009(2): 65–71.
- [15] Taylor N J, Edwards M, Kieman R J. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Mnilot esculenta* Crantz) [J]. Nature Biotechnol, 1996, 14(6): 726–730.
- [16] Bother k, Verdier V. Cassava bacterial blight in Africa: the state of knowledge and implication for designing control strategies [J]. African Crop Science Journal, 1994, 40: 505–509.
- [17] Liu J, Zheng Q J, Ma Q X, et al. Cassava genetic transformation and its application in breeding[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2011, 53(7): 552–569.
- [18] 郭运玲, 姚庆荣, 孔华, 等. *AGPase* 基因转化木薯获得转基因植株的研究[J]. 热带作物学报, 2011(12): 2274–2277.
- [19] 王关林, 方宏绮. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 482.
- [20] 余洁. 木薯淀粉分支酶基因克隆及反义表达载体的构建[J]. 热带作物学报, 2008(3): 342–346.
- [21] Liu J, Zgeng Q J, Ma Q X, et al. Cassava Genetic Transformation and its Application in Breeding[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2011, 53(7): 552–569.

The Optimization System for *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of Cassava

LIAO HuaLan, LI XiuQiong, LI Ke, LI BoLing, XIONG XI,
SU Tong, LI ChunXia, CHEN YinHua, LUO LiJun

(The Agricultural College of Hainan University/ Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources,
Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Cassava axillary buds was used as explants by adding different concentrations of 2,4-D and picloram to explore the best hormone condition for inducing somatic embryos and FEC; Using optimized regeneration system, studying the infection concentration, infection time of *Agrobacterium* and the Screening concentration of hygromycin. The results show that: 12 mg · L⁻¹ picloram is the best hormone concentration to induction somatic embryo and FEC; the optimal conditions for the conversion efficiency of FEC and the plant regeneration is $OD_{600} = 0.4$ of *Agrobacterium* and 30min infection time. By increasing the concentration of hygromycin (0, 5, 8, 15 mg · L⁻¹) selection is more advantageous to plant regeneration. The results of the study have optimized the existing cassava genetic transformation system, which provides a platform for cassava genetic engineering breeding.

Keywords: cassava; tissue organ culture; reporter gene; genetic transformation; molecular characterization