

· 热带作物 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230082



主持人: 徐 冉

基于 Fast-Tracc 方式建立苦瓜高效遗传转化体系的研究

刘之洋¹, 刘 静¹, 宁 宇¹, 戚仁洁², 徐 海¹, 陈龙正¹

(1. 江苏省农业科学院 蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 南京 210014;

2. 江苏海洋大学 药学院, 江苏 连云港, 222005)

摘 要: 为了建立基于 Fast-Tracc 方式的苦瓜再生方法, 以 2 个不同基因型苦瓜 (*Momordica charantia*) 的幼苗为研究对象, 利用含有发育调节因子 DR 的双元载体, 通过农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导对植株进行侵染, 对直接再生的植株, 经荧光观察及 PCR 分子检测确认阳性株。结果表明: 农杆菌浓度对植株直接再生率的影响较大, $OD_{600} = 0.8$ 时再生效率最高, 可达 33.33%。不同基因型之间再生效率有明显的差异, 平均效率分别为 26.67% 和 4.70%。含有 AtGRF5 和 TaGRF4-OsGIF1 的两种载体对苦瓜再生均有效。荧光观察及 PCR 分子检测结果发现, 最高阳性率达到 10.00%。

关键词: Fast-Tracc 方式; 发育调节因子; 苦瓜; 遗传转化

中图分类号: S642.5; Q819 文献标志码: A 文章编号: 1674-7054(2023)06-0622-06

刘之洋, 刘静, 宁宇, 等. 基于 Fast-Tracc 方式建立苦瓜高效遗传转化体系的研究 [J]. 热带生物学报, 2023, 14(6): 622-627. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230082

遗传转化技术在作物性状改良上发挥了重要作用, 改良的优异性状包括产量、品质、生物和非生物胁迫抗性等方面。其中, 基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑技术因具有操作简便、编辑效率高、支持多靶点编辑、编辑形式多样等优势, 成为作物遗传改良的新兴技术, 已在许多作物性状改良上发挥了重要作用^[1-5], 但是该方法严重依赖于作物的再生和转化体系^[6]。对于遗传转化体系较为成熟的作物, 如小麦 (*Triticum aestivum*)^[7]、水稻 (*Oryza sativa*)^[8]、番茄 (*Solanum lycopersicum*)^[9] 等, 基因编辑技术应用相对容易实现。然而, 对于大多数蔬菜作物而言, 遗传转化体系并不成熟, 这也成为限制 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在蔬菜作物上应用的关键瓶颈问题。因此, 建立高效的遗传转化体系是实现蔬菜基因编辑的关键环节, 亟待实现

技术突破。大多数蔬菜作物离体培养时, 从外植体中诱导分化形成再生芽过程非常困难, 受基因型、外植体状态、培养基类型、生长调节剂类型及含量、培养环境等诸多因素影响^[10]。植物分生组织的再生是由几个主要的发育调节因子 (Developmental Regulators, DRs), 如 WUS (WUSCHEL)、STM (SHOOT MERISTEMLESS)、MP (MONOPTEROS) 和 GROWTH-REGULATING FACTORS (GRFs) 决定的, 通过在体细胞中特定表达 DRs 可直接诱导分生组织再生^[11-14]。有研究表明, 利用 *AtGRF5* 可以将西瓜 (*Citrullus lanatus*) 的转化效率提高到 25% 左右, 与传统载体相比效率增加了 40 倍^[15]。除离体培养利用 DR 提高遗传转化效率外, 还可以直接在植株上与含有 DR 的农杆菌进行共培养直接再生, 从而实现遗传转化, 被称为 Fast-

收稿日期: 2023-06-30

修回日期: 2023-09-25

基金项目: 江苏省农业科学院探索性颠覆性创新计划项目 [ZX(21)1205]; 江苏省科技计划专项资金(重点研发计划现代农业)项目 (BE2022339); 江苏省农业科技自主创新资金项目 [CX(21)3027]; 江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室项目 (ZD2022003)

第一作者: 刘之洋 (1984-), 女, 博士, 副研究员. 研究方向: 蔬菜遗传育种和生物技术. E-mail: 20140042@jaas.ac.cn

通信作者: 陈龙正 (1980-), 男, 博士, 研究员. 研究方向: 蔬菜遗传育种和生物技术. E-mail: lzchen@jaas.ac.cn

Tracc(fast-treated agrobacterium coculture)。该方法的优点一方面体现在不用通过优化外源激素配方来诱导再生芽的生成,避免了从愈伤组织经脱分化、再分化形成再生芽的阶段,为解决遗传转化顽拗型蔬菜作物的转基因或者基因编辑技术难题提供了新思路。另一方面,该方法不需要经过组织培养就可获得转基因植株,与组培方法相比,用时可缩短 2~3 个月,大大提高了工作效率。已有研究表明,利用 Fast-Tracc 方法在烟草(*Nicotiana tabacum*)上的转化效率为 6%~10%^[16],金鱼草(*Antirrhinum majus*)上转化效率为 3.8%~8.8%,番茄上转化效率为 3.3%~13.3%^[17]。苦瓜(*Momordica charantia*)属于遗传转化顽拗型蔬菜,遗传转化非常困难,目前还未发现利用 Fast-Tracc 方法的苦瓜遗传转化成功的相关报道。本研究利用含有不同 DR 基因的双元载体,以农杆菌 GV3101 为介导,直接侵染不同基因型苦瓜幼苗下胚轴,诱导切口直接再生成芽,获得转基因阳性植株。本研究结果能为后续利用非组培方式对遗传转化顽拗型蔬菜作物进行基因编辑提供新的解决思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料 供试的苦瓜材料(品种)为‘K12’(白皮,雌性弱,长势强旺,分枝多)和‘K103’(白皮,强雌性,长势弱,分枝少)为本课题组保存的高代自交系。载体 pW502 和 pW503 由北京大学现代农业研究院张华伟研究员惠赠,其中, pW502 含有的 DR 类型为 AtGRF5, pW503 含有的 DR 类型为 TaGRF4-OsGIF1^[15],并含有红色荧光基因(*DsRed*)作为标记基因。GV3101 菌株购自南京诺维赞生

物公司。

1.2 苦瓜苗的准备 将苦瓜种子浸种 8 h 后,置于 28 ℃ 下催芽,选取发芽整齐一致的种子播种于 50 孔穴盘内,放置于温室(昼温 28 ℃/夜温 18 ℃;光周期:光照 16 h/黑暗 8 h)中培养。待幼苗长至两叶一心期,进行实验。每次接种幼苗数为 50 株,重复 3 次。

1.3 农杆菌悬浮液的制备 将含有 pW502 或 pW503 的 GV3101 菌株接入 5 mL LB 液体培养基(含 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Kan, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Rif 抗生素)中振荡培养(28 ℃, 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),过夜培养后按照 1% 的比例转接菌液至 50 mL LB 液体培养基中(含 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Kan, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Rif 抗生素, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮),继续培养使农杆菌浓度达到 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$,室温离心(5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min)收集菌体,用 MS 液体培养基(含 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮),重新悬浮菌体,将农杆菌浓度调至 $OD_{600} = 0.4$ 或 0.8 后,28 ℃ 静置 2 h 后,进行注射。

1.4 侵染体系的建立 在苦瓜幼苗长至两叶一心期时,将幼苗顶端分生组织用新刀片切去,仅留有子叶(图 1),将农杆菌悬浮液用微量注射器注射至幼苗伤口处,注射的量以不溢出幼苗伤口为准;将蘸有悬浮液的脱脂棉球置于伤口处保湿,黑暗条件下 25 ℃ 放置 2 d 后,光周期为 16 h(光照)/8 h(黑暗)条件下培养继续培养,培养时温度为 25 ℃,直至植株再生。当切口处出现再生现象时,用手持式荧光仪观察是否有红色荧光信号,将有荧光信号的植株持续培养至叶片展开,进行分子检测确定阳性植株。

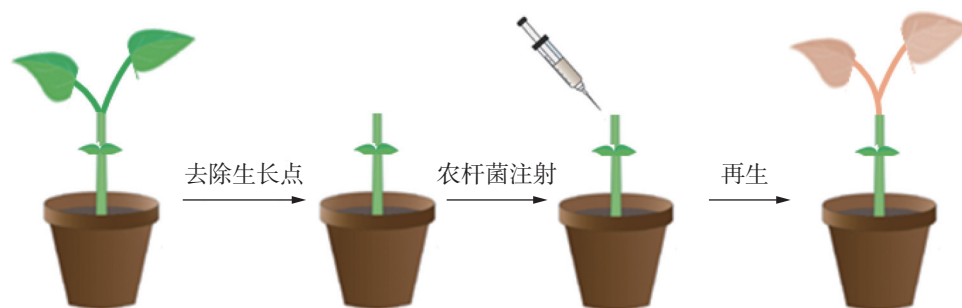


图 1 非组培方式的苦瓜再生方法示意图

1.5 阳性植株的鉴定 对再生的叶片进行取样,利用 CTAB 法提取 DNA,以引物对 *DsRed*-F(5'-GGAGGGCACCGTGAACGGCCACGAG-3')和

DsRed-R(5'-ACCTTGTAGATGAAGCAGCCGTC-CT3'),进行 PCR,程序是:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 复性 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,

34 个循环后, 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。对 PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳验证, 含有目的条带的即为阳性植株。

1.6 统计分析 实验数据采用 Microsoft Excel 进行统计, IBM SPSS Statistics 20 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同接种浓度对植株再生率的影响 为了找到合适的农杆菌接种浓度, 选取 2 个不同的浓度 ($OD_{600} = 0.4$ 或 0.8) 进行接种实验(供试受体为 ‘K122’)。结果显示(表 1), 当利用 $OD_{600} = 0.8$ 的农杆菌接种时, 所含 DR 为 AtGRF5 的载体(pW502)平均再生效率为 26.67%, 含 DR 为 TaGRF4-OsGIF1 的载体(pW503) 平均再生效率为 33.33%, 要明显高于 $OD_{600} = 0.4$ 时菌液接种的效率(8% 和 5.30%)。说明农杆菌接种浓度为 $OD_{600} = 0.8$ 时利于植株再生。

表 2 不同基因型间植株再生效率统计

品种名	接种农杆菌所含质粒	农杆菌浓度(OD_{600})	接种数/株	再生数/株	再生效率/%
‘K122’	pW502	0.8	150	40	26.67±3.71a
‘K103’	pW502	0.8	150	7	4.70±3.71b

2.3 不同 DR 诱导再生的效率差异 为了明确不同 DR 对诱导再生效率的影响, 利用含有 pW502 和 pW503 的农杆菌在 $OD_{600} = 0.8$ 时接种, ‘K122’ 的平均再生效率分别为 26.67% 和 33.33%, 两者差异不明显。而将 2 种农杆菌分别接种 K103, 平均再生效率分别为 4.7% 和 4%, 差异也不明显。结果表明, 含有 2 种质粒的农杆菌分别接种两个不同基因型材料, 再生效率都没有明显差异(表 3)。

2.4 阳性再生植株的验证 为了筛选再生植株中

表 3 不同 DR 诱导植株的再生效率统计

品种名	接种农杆菌所含质粒	农杆菌浓度(OD_{600})	接种数/株	再生数/株	再生效率/%
‘K122’	pW502	0.8	150	40	26.67±3.71a
	pW503	0.8	150	50	33.33±1.76a
‘K103’	pW502	0.8	150	7	4.70±3.71b
	pW503	0.8	150	6	4.00±2.00b

表 1 不同接种浓度下植株再生效率统计

农杆菌浓度(OD_{600})	接种农杆菌所含质粒	接种数/株	再生数/株	再生效率/%
0.4	pW502	150	12	8±2.31b
	pW503	150	8	5.30±1.33b
0.8	pW502	150	40	26.67±3.71a
	pW503	150	50	33.33±1.76a

注: 不同小写字母表示不同处理间差异显著, 相同小写字母表示差异不显著, 下同。

2.2 不同基因型间植株再生的差异 为了明确 Fast-Tracc 方式诱导植株再生是否受基因型的影响, 本实验选取了 ‘K122’ 和 ‘K103’ 2 个苦瓜基因型利用质粒 pW502 进行接种。以 $OD_{600} = 0.8$ 的浓度接种, ‘K122’ 的平均再生效率为 26.67%(质粒 pW502), 而 ‘K103’ 的再生效率为 4.7%(质粒 pW502)。结果显示(表 2), 利用同一种 DR 诱导, 在相同接种浓度下, K122 的再生效率高于 K103, 表明不同基因型间的植株再生具有明显差异。

的阳性植株, 用手持式荧光仪观察切口处再生组织是否有红色荧光信号, 结果显示, 部分再生组织处可以观察到红色荧光信号(图 2)。将再生芽持续培养至叶片展开后进行取样, 提取 DNA 后进行 PCR 检测显示部分再生植株可以扩增出分子量为 312 bp 的目的片段, 即为 *DsRed* 转化成功的阳性植株(图 3)。统计结果显示(表 4), 当 $OD_{600} = 0.8$ 时, 含有 pW502 或者 pW503 农杆菌对 K122 进行侵染, 平均阳性率都达到 10%, 对 ‘K103’ 进行侵染时, 则不能获得阳性植株。

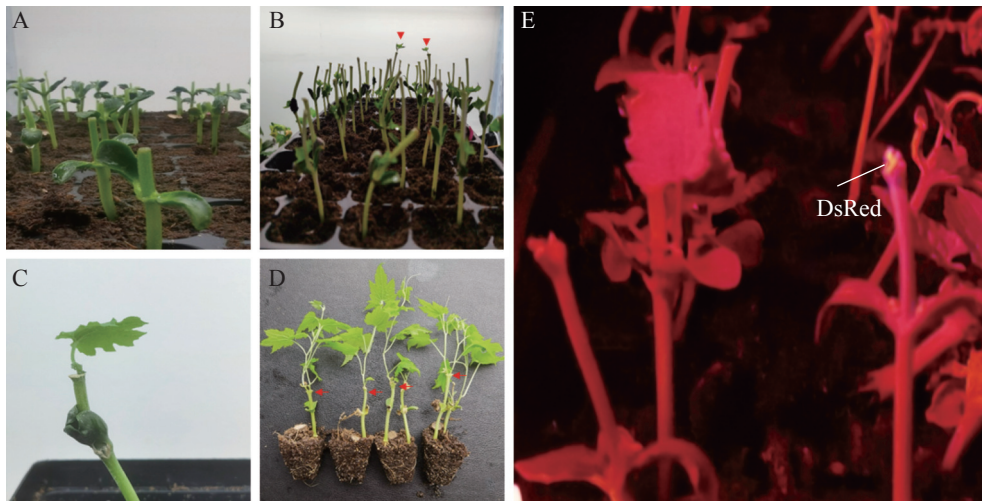


图 2 非组培方式苦瓜再生的表型

A: 去除生长点后植株表型; B ~ C: 切口处再生叶子; D: 再生成苗; E: 切口处再生组织红色荧光信号的表型。

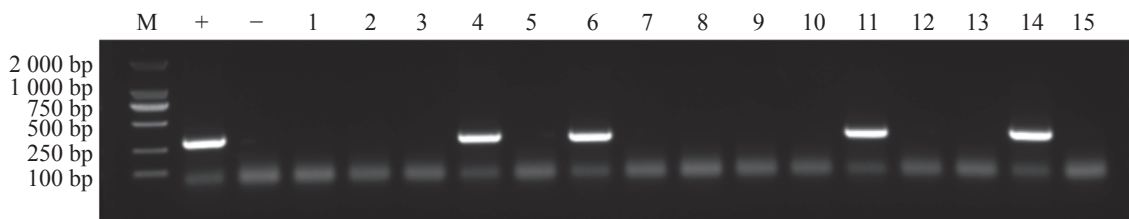


图 3 阳性植株 DNA 分子检测

M: DL2000 marker; +: 含有 pW502 的农杆菌作为阳性对照; -: 未转化的植株作为阴性对照; 1 ~ 15: 不同的再生植株, 其中 4、6 号为转化 pW502 的阳性植株, 11、14 号为转化 pW503 的阳性植株。

表 4 阳性植株转化效率统计

品种名	接种农杆菌所含质粒	农杆菌浓度 (OD_{600})	接种数/株	再生数/株	再生效率/%	阳性植株数/株	阳性转化效率/%
K122	pW502	0.8	150	40	26.67±3.71	4	10.00±1.04a
	pW503	0.8	150	50	33.33±1.76	5	10.00±1.60a
K103	pW502	0.8	150	7	4.70±3.71	0	/
	pW503	0.8	150	6	4.00±2.00	0	/

3 讨论

与植物组培方式的遗传转化相比, Fast-Tracc 方式的直接再生方法步骤相对简单, 避免了传统方法中的从愈伤组织经脱分化、再分化形成再生芽的阶段^[18]; 费时较少, 本研究从播种到植株再生约耗时 50 d, 而传统离体培养则需要 3 个月以上, 这些优点有利于对植物进行功能研究和遗传改良, 尤其是生长期较长的植物(果树等)。

本研究虽然获得了苦瓜转基因阳性株, 但是不能排除其是嵌合体的可能, 与传统的组培方式获得的转基因植株一样, 后续需要对转基因植株后代进行进一步鉴定, 筛选可以稳定遗传的转基

因植株后代。另外, 转基因植株自交后代是否符合 3 : 1 孟德尔遗传规律, 也需要后续进一步调查与分析。

据报道, 当农杆菌接种浓度 $OD_{600} = 0.2 \sim 0.3$ 时诱导再生效率较高^[19], 但是本研究中 $OD_{600} = 0.8$ 有较高的诱导效率, 可能是由于不同转化方法导致的差异, 前者是利用农杆菌侵染外植体进行离体培养, 本研究是将农杆菌接种到切口处进行直接再生, 当 $OD_{600} = 0.8$ 时可以获得较高的诱导效率, 表明该浓度的农杆菌侵染可以使苦瓜成功再生。众所周知, 不同农杆菌接种浓度, 对再生效率影响较大, 并且针对不同作物的最适农杆菌接种浓度也可能存在差异, 因此, 在对不同作物进行

Fast-Tracc 方式的诱导体系的建立时,需要摸索最适接种浓度。在西瓜离体培养的遗传转化体系的建立中, pW502 和 pW503 诱导再生效率均高于 13.00%, 暗示载体中含有的 AtGRF5, TaGRF4-OsGIF1 可能对瓜类作物有诱导再生的作用^[15], 本研究利用这两个载体, 利用 Fast-Tracc 方法实现了苦瓜的直接再生, 进一步证明了 AtGRF5, TaGRF4-OsGIF1 在瓜类作物中的高效诱导再生的作用。

研究表明, 在离体培养中基因型差异是影响遗传转化的重要因素^[20], 本研究发现, K122 的再生效率显著高于 K103, 可能原因是基因型的差异造成的, 表明在 Fast-Tracc 方法进行直接再生中基因型也是影响再生的重要因素之一。本实验中最高再生率为 33.33%, 而阳性转化率最高为 10.00%, 出现了部分假阳性苗, 这可能是缺少抗性筛选所导致的。当然, 此方法还有进一步改进的空间, 例如苗龄, 侵染菌种的选择等。在接下来的研究中可以加入不同苗龄及不同菌种等因素进一步完善此体系, 从而探索出更好的遗传转化体系。

本研究明确了利用含有 GRF5 或 TaGRF4-OsGIF1 的农杆菌 GV3101, 在 $OD_{600} = 0.8$ 时, 对‘K122’的两叶一心期进行接种, 可以不通过离体培养直接再生获得转基因阳性植株。

参考文献:

- [1] MA X, FENG F, ZHANG Y, et al. A novel rice grain size gene OsSNB was identified by genome-wide association study in natural population [J]. *PLoS Genetics*, 2019, 15(5): e1008191.
- [2] HUANG L, LI Q, ZHANG C, et al. Creating novel *Wx* alleles with fine-tuned amylose levels and improved grain quality in rice by promoter editing using CRISPR/Cas9 system [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(11): 2164 – 2166.
- [3] XU Y, LIN Q, LI X, et al. Fine-tuning the amylose content of rice by precise base editing of the *Wx* gene [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(1): 11 – 13.
- [4] ZHANG A N, LIU Y, WANG F M, et al. Enhanced rice salinity tolerance via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the OsRR22 gene [J]. *Molecular Breeding*, 2019, 39: 47 – 57.
- [5] LI C, LI W, ZHOU Z, et al. A new rice breeding method: CRISPR/Cas9 system editing of the *Xa13* promoter to cultivate transgene-free bacterial blight-resistant rice [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(2): 313 – 315.
- [6] WANG S L, KU S S, YE X G, et al. Current status of genetic transformation technology developed in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2015, 14(3): 469 – 482.
- [7] WANG Y P, CHENG X, SHAN Q W, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew [J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32: 947 – 951.
- [8] DONG O X, YU S, JAIN R, et al. Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9 [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1178.
- [9] YUSTE-LISBONA F J, FERNÁNDEZ-LOZANO A, PINEDA B, et al. ENO regulates tomato fruit size through the floral meristem development network [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(14): 8187 – 8195.
- [10] 王文英, 刘喜存, 郭春江, 等. 影响瓜类作物未授粉子房或胚珠离体培养技术的几个因素 [J]. *蔬菜*, 2020(7): 24 – 27.
- [11] BARTON M K. Twenty years on: the inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo [J]. *Developmental Biology*, 2010, 341(1): 95 – 113.
- [12] MENDEZ-HERMANDEZ H A, LEDEZMA-RODRIGUEZ M, AVILEZ-MONTALVO R N, et al. Signaling overview of plant somatic embryogenesis [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 77.
- [13] OMIDBAKHSHFARD M A, PROOST S, FUJIKURA U, MUELLER-ROEBER B. Growth-Regulating Factors (GRFs): A small transcription Factor Family with Important Functions in Plant Biology [J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(7): 998 – 1010.
- [14] ZHANG X Y, XU G C, CHENG C H, et al. Establishment of an Agrobacterium-mediated genetic transformation and CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Hemp (*Cannabis Sativa* L.) [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(10): 1979 – 1987.
- [15] PAN W B, CHENG Z T, HAN Z G, et al. Efficient genetic transformation and CRISPR/Cas9-mediated genome editing of watermelon assisted by genes encoding developmental regulators [J]. *Journal of Zhejiang University-Science B(Biomedicine & Biotechnology)*, 2022, 23(4): 339-344.
- [16] MAHER M F, NASTI R A, VOLLBRECHT M, et al. Plant gene editing through de novo induction of meristems [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(1): 84 – 89.
- [17] LIAN Z, NGUYEN C D, LIU L, et al. Application of developmental regulators to improve *in planta* or *in vitro* transformation in plants [J]. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20(8): 1622 – 1635.
- [18] 李坤坤, 徐昌杰. 蔷薇科果树离体再生与遗传转化研究进展 [J]. *园艺学报*, 2017, 44(9): 1633 – 1644.
- [19] KARMAKAR S, ALI MOLLA K, GAYEN D, et al. Development of a rapid and highly efficient Agrobacterium-mediated transformation system for pigeon pea [*Ca-*

janus cajan (L.) Millsp] [J]. *GM Crops Food*, 2019, 10(2): 115 – 138.

[20] 穆丁郁, 张卫华. 瓜类蔬菜组织培养研究综述[J]. *现代农业科技*, 2020(21): 81 – 84.

Establishment of an efficient genetic transformation system for *Momordica charantia* based on the Fast-TrACC method

LIU Zhiyang¹, LIU Jing¹, NING Yu¹, QI Renjie², XU Hai¹, CHEN Longzheng¹

(1. Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement/Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Jiangsu Ocean University, School of Pharmacy, Lian Yungang, Jiangsu 222005, China)

Abstract: In order to establish a genetic transformation method (fast-treated agrobacterium co-culture (Fast-TrACC), for regeneration of *Momordica charantia*, the seedlings were used to be induced by *Agrobacterium tumefaciens* containing the development regulator DR. The regenerated plants were confirmed by fluorescence observation for target gene *DsRed* and PCR molecular detection, and the positive rate was also calculated. The results showed that the concentration of *A. tumefaciens* plays an important role on the regeneration rate of plants, with the highest regeneration efficiency of 33.33% at $OD_{600} = 0.8$. There were significant differences in regeneration efficiency between the two different genotypes, with an average efficiency being 26.67% and 4.70%, respectively. The two vectors containing *AtGRF5* and *TaGRF4-OsGIF1* were both effective for the regeneration of *M. charantia*, with the highest positive rate of 10.00% confirmed by fluorescence observation and PCR molecular detection. The establishment of this method might provide a new solution for the subsequent gene editing of genetically transformed recalcitrant vegetable crops.

Keywords: Fast-TrACC method; development regulator; *Momordica charantia*; genetic transformation

(责任编辑: 潘学峰)