

· 园艺 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20250038



主持人: 朱国鹏

Open Access



发根农杆菌介导的水角遗传转化体系的建立

周荟森^{1#}, 谭德冠^{1,2,3*}, 王英¹, 付莉莉², 于颖², 孙雪飘², 张家明^{2*}

(1. 海南大学热带农林学院, 海南海口 571737 中国; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/中国热带农业科学院海南热带农业资源研究院/农业农村部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室/海南省热带微生物资源重点实验室, 海南海口 571101 中国; 3. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572025 中国)

摘要: 水角(*Hydrocera triflora*)是重要的濒危水生植物, 耐旱性差是导致其濒危的重要因素。本研究拟建立水角遗传转化体系, 并对其进行遗传改良, 以期减轻其濒危程度。首次建立并优化了发根农杆菌介导的水角遗传转化体系。在优化该转化体系研究中, 发现水培扦插转化法较优, 菌株 K599 转化率最高, 带顶芽插穗作侵染外植体转化效果较优。优化的转化体系转化率达 63.3%。构建了过表达海藻糖合成酶 *MeTPS6* 基因的载体并获得其转基因植株。3%(m/m) polyethylene glycol-6000(PEG-6000)溶液处理 3 d, 发现转基因植株生长正常, 而对照叶片出现萎蔫。经检测转基因植株毛状根的海藻糖含量显著高于对照。这些结果表明过表达 *MeTPS6* 转基因水角的耐旱能力得到显著改善。本研究结果为水角的性状改良和基因功能验证提供基础, 也为其他水生植物高效转化体系的建立提供技术借鉴。

关键词: 水角; 发根农杆菌; 遗传转化; 转基因复合植株; 耐旱

中图分类号: Q948.8

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2025)05-0755-10

周荟森, 谭德冠, 王英, 等. 发根农杆菌介导的水角遗传转化体系的建立 [J]. 热带生物学报, 2025, 16(5): 755-764. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20250038

水角(*Hydrocera triflora*(L.) Wight & Arn)属于凤仙花科水角属, 是该属单种的多年生水生草本植物^[1]。水角主要生长在沼泽地、湖边、水稻田中, 在印度、斯里兰卡、泰国、中国等国家分布。水角的花左右对称, 呈粉红色, 花期长达 9 个月, 具有较高的观赏价值。在中国, 水角主要分布在海南省海口市的羊山湿地^[2]。根据植物智的网站(<http://www.iplant.cn>)和《中国生物多样性红色名录—高等植物卷》公布的信息, 水角已处于地区绝灭状态(regional extinction, RE)。水角耐旱性差是导致其濒危的重要因素, 在水位降低、泥土含水量减少的情况下, 其极易失水枯萎死亡^[2]。

遗传转化技术是植物遗传改良的有效手段,

是解决农业生产中存在问题有效的技术方法。基于植物组织培养的根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的遗传转化方法被广泛应用, 并在玉米(*Zea mays*)^[3]、水稻(*Oryza sativa*)^[4]、高粱(*Sorghum bicolor*)^[5]等植物中取得良好的效果。但该方法依赖于植物的高效、成熟的再生体系, 同时存在转化率低、耗时长、实验成本高等缺点, 严重制约了一些植物的性状改良及重要基因功能的研究进展。近年来, 发根农杆菌介导转化产生的转基因毛状根与野生型地上部组成的转基因复合植物的技术得到了发展。该技术不依赖植物组织培养, 具有操作简单、非基因型依赖、转化率高、耗时短和成本低等优势, 逐渐被广泛应用于植物

收稿日期: 2025-02-26

修回日期: 2025-03-20

基金项目: 海南省自然科学基金项目(322RC761); 中国热带农业科学院基本科研业务费创新团队项目(1630052020020, 1630052020022)

*第一作者: 周荟森(1998—), 男, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。E-mail: 1959195422@qq.com

*通信作者: 谭德冠(1974—), 男, 研究员, 硕士生导师。研究方向: 净水植物种质资源收集及应用。

E-mail: tandeguan@itbb.org.cn;

张家明(1966—), 男, 研究员, 博士生导师。研究方向: 净水植物种质资源收集及应用。

E-mail: zhangjiaming@itbb.org.cn

性状改良和基因功能研究。Aggarwal 等^[6]建立了鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)基因型依赖程度低的发根农杆菌介导的转化体系,发现在过表达 *AtTT2* 基因的转基因鹰嘴豆复合植株的毛状根中,原花青素水平得到显著提高。Chen 等^[7]用发根农杆菌侵染大豆(*Glycine max*)种子下胚轴,获得转基因大豆复合植株,在该转基因复合植株的毛状根中验证了 Pi 转运蛋白基因 *GmPT7* 的功能。Fan 等^[8]建立了大豆一步发根农杆菌介导转化方法,通过 CRISPR/Cas9 基因编辑系统在转基因的毛状根中验证了 *Rfg1* 基因功能,同时还在转基因的毛状根中验证了 YAO 启动子的功能。Wang 等^[9]建立了柱花草发根农杆菌介导转化技术,在转基因柱花草复合植株的毛状根中证实了 *SgEXPB1* 基因在磷缺乏的条件下能促进根的生长。

海藻糖是由 2 个葡萄糖分子通过 1,1-糖苷键而成的非还原性双糖^[10],并广泛存在于植物、动物、真菌、细菌及藻类当中^[11]。海藻糖对提高植物耐旱性、耐寒性等非生物胁迫起到重要作用^[12-13]。在海藻糖生物合成过程中,海藻糖-6-磷酸合成酶(trehalose-6-phosphate synthase, TPS)是一个调控其生物合成的关键酶^[12-13]。绝大部分植物的海藻糖含量极低,但可通过调控 *TPS* 基因的表达从而达到提高其海藻糖含量的目的。过表达拟南芥 *AtTPS* 基因的转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)其海藻糖含量得到显著提高,具有较强的耐受盐胁迫能力^[14]。过表达水稻 *OsTPS1* 的转基因水稻的海藻糖含量显著高于野生型,其耐寒、耐盐、耐干旱的能力也得到改善^[15]。过表达木薯 *MeTPS1* 的转基因烟草积累了更高水平的海藻糖,其耐旱能力也得到明显提高^[16]。由此可知,提高植物 *TPS* 基因表达水平可以增强其耐旱、耐寒等非生物的胁迫的能力。

目前尚未有水角的遗传转化研究报道。本研究拟应用发根农杆菌介导法转化水角,建立水角转基因技术体系,同时构建过表达 *MeTPS6* 基因的载体转化水角,以期获得耐旱能力强的转基因水角新种质。本研究的实施为水角的性状改良和基因功能验证提供基础,也为其他水生植物高效转化体系的建立提供技术借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料 于 2023 年 4 月份在海南省海口市羊山地区采集生长健康且健壮的水角的幼嫩枝条。

1.2 方法

1.2.1 枝条处理 将幼嫩的枝条剪成长约 7 cm 的插穗,顶端切口平切或保留顶芽,下端切成 45° 斜口;保留插穗上部叶片 2 ~ 4 片。每片叶子剪去 1/2 ~ 2/3。

1.2.2 发根农杆菌菌株的制备 二元表达载体 pCambia1301 由中国热带农业科学院热带生物技术研究所言普博士提供。pCambia1301 含有由 CaMV35S 启动子驱动 β -葡萄糖苷酸酶(*GUS*)基因。参考已报道的热击法^[17]将 pCambia1301 分别转入 MSU440、C58C1 和 K599 等 3 种发根农杆菌菌株,具体的操作方法如下:1) 取 1 μ g pCambia1301 于 100 μ L 发根农杆菌感受态细胞中,轻轻混匀;2) 菌液置于冰上先预处理 5 min,再置于液氮处理 5 min,37 $^{\circ}$ C 水浴处理 5 min,冰上静置 5 min,加入 700 μ L TY 液体培养基 28 $^{\circ}$ C 200 r $\cdot$ min⁻¹ 振荡培养 2 h;3) 将菌液涂布于含 50 mg $\cdot$ L⁻¹ 卡那霉素(Kana)和 50 mg $\cdot$ L⁻¹ 链霉素(Strep)的 TY 固体培养基上,28 $^{\circ}$ C 培养 2 d;4) 将单克隆菌落接种于含有相应抗生素的 TY 液体培养基中,28 $^{\circ}$ C 200 r $\cdot$ min⁻¹ 振荡培养过夜,PCR 检测阳性克隆,获得含 *GUS* 基因的发根农杆菌菌株,用于下面的水角遗传转化实验。

1.2.3 转化方法 采用土培扦插转化法和水培扦插转化法 2 种转化方式对水角插穗进行转化处理。土培扦插转化法的操作步骤如下:1) 在水角插穗下端斜面处涂布上含有 *GUS* 目的基因的 K599 菌体,移植于湿润的无菌土壤基质:*m*(蛭石):*m*(泥炭土):*m*(椰糠)=1:1:1,再向移植好的插穗浇灌 1 mL 相应的发根农杆菌发酵液;2) 保持环境相对湿度 90%,控制温度 28 $^{\circ}$ C,遮光度 70%,培养 15 d 后,观察转化效果。水培扦插转化法的操作步骤:1) 对水角插穗下端斜面处蘸上含有 *GUS* 目的基因的 K599 菌体;2) 在含有 50 mg $\cdot$ L⁻¹ Kana、50 mg $\cdot$ L⁻¹ Strep TY 液体培养基中加入 1%(v/v)的活化的带有 *GUS* 基因载体的 K599 菌株,28 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.8,4000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 5 min,收集菌体;3) 将菌体稀释于清水中,直至 OD₆₀₀ 为 0.1;4) 将插穗置于含有菌体稀释液的水培育苗箱中,确保约 1/3 插穗的下部浸于溶液中,培养温度为 28 $^{\circ}$ C,培养 15 d 后,观察转化效果。

为了比较这2种转化方法的效果,对获得的水角植株的毛状根进行GUS组织化学染色,来确定阳性的转基因水角复合植株,并统计转化率。为了数据的准确性,统一用带顶芽的水角插穗作为转化材料。每个处理侵染10个插穗,每个处理重复3次。根据GUS检测结果来统计转化率:

$$\text{转化率}(\%) = (\text{阳性转基因植株数量} / \text{检测的植株总数}) \times 100. \quad (1)$$

比较这2种转化方法的转化效果。作Student *t*-test 检验, $P < 0.05$ 为显著差异。

1.2.4 不同发根农杆菌的转化效果 用上面制备好的带GUS目的基因载体的MSU440、C58C1和K599等3种发根农杆菌菌液,采用水培扦插转化法分别转化带顶芽的水角插穗。每个处理侵染10个插穗,每个处理重复3次。根据GUS检测结果来统计各处理转化率,比较各菌株的转化效果。作ANOVA方差分析, $P < 0.05$ 为显著差异。

1.2.5 不同水角插穗类型的转化效率的测定与比较 用前面制备好的带GUS目的基因载体的K599菌液,采用水培扦插转化法分别处理带顶芽的和没顶芽的水角插穗。每个处理侵染10个插穗,每个处理重复3次。根据GUS检测结果来统计2种类型插穗的转化率,比较它们的转化效果。作Student *t*-test 检验, $P < 0.05$ 为显著差异。

1.2.6 GUS组织化学染色 GUS组织化学染色应用商业化的GUS试剂盒(北京,中科瑞泰),实验操作按试剂盒说明书进行。剪取水角复合植株的毛状根,用dH₂O清洗干净,滤纸吸干根上的水珠后置于含GUS染色液的离心管中,离心管用锡箔纸包扎好后于50 r·min⁻¹ 振荡培养30 min,将材料转至无水乙醇中脱色,体视显微镜下观察染色情况。

1.2.7 DNA提取及PCR检测 采用高效植物基因组DNA提取试剂盒(北京,天根)提取样品DNA。剪取100 mg复合植株的根部,用清水清洗3遍,无菌滤纸吸干水珠后置于研钵中,加入液氮进行研磨,再根据试剂盒说明书进行DNA提取。设计GUS基因引物, *GUS-F*: 5'-CTGGGTGGACGATATCACCG-3', *GUS-R*: 5'-GCGAAATATTCCCGTGCACC-3'。1%(m/v)凝胶电泳检测PCR扩增产物。

1.2.8 构建海藻糖-6-磷酸合成酶 *MeTPS6* 过表达载体 步骤1)海藻糖-6-磷酸合成酶基因 *MeTPS6* 的克隆。取盆栽2个月的木薯品种Ku50

的根部,采用RNAprep Pure植物总RNA提取试剂盒(北京,天根)提取木薯根的总RNA,再用TransScript一步法gDNA去除及cDNA合成试剂盒(北京,全式金)反转录合成一链cDNA。从GenBank中查找到木薯的海藻糖-6-磷酸合成酶基因 *MeTPS6* 序列(登录号:MF684374.1),设计 *MeTPS6* 引物 (*MeTPS6-1-F*: 5'-ATGGTGTCAAGGTCATACTC-3', *MeTPS6-1-R*: 5'-CACTGCAACGTGTTTGTCTG-3'),以木薯根cDNA为模板DNA扩增 *MeTPS6*。采用pMD19-T载体(北京,宝生物)对PCR扩增产物进行T载体克隆,将克隆好的T载体送至华大基因测序,确保 *MeTPS6* 序列正确。

步骤2)构建海藻糖-6-磷酸合成酶 *MeTPS6* 基因过表达载体。参考所报道的Nimble Cloning(NC分子克隆)技术^[18]构建海藻糖-6-磷酸合成酶基因 *MeTPS6* 过表达载体。以上面构建好的含有 *MeTPS6* 基因的T载体质粒为模板,对 *MeTPS6* 基因进行扩增,所用的引物为: *MeTPS6-2-F*: 5'-agtgtctctgtccagtcctATGGTGTCAAGGTCATACTC-3', *MeTPS6-2-R*: 5'-gggtctcagcagaccacaagtCACTGCAACTGTTTGTCTG-3'(小写字母为NC框接头序列)。对PCR扩增产物进行1%(m/v)凝胶电泳,用凝胶回收试剂盒(南京,诺唯赞)纯化回收目的条带。采用NC克隆试剂盒(海南,壹田)将纯化回收后的PCR产物与带有NC克隆框的载体pNC-Green-SubC(由中国热带农业科学院热带生物技术研究所言普博士馈赠)进行NC克隆反应。将反应产物通过热击法导入感受态大肠杆菌 *E.coli* TOP10 菌株中,菌液涂布在含有50 mg·L⁻¹ Kana的LB固体培养基上,转化平板于37℃过夜培养后,挑选阳性克隆于含50 mg·L⁻¹ Kana的液体LB培养上37℃振荡培养16 h,用菌液作模板扩增 *MeTPS6* 基因,PCR扩增产物送至华大基因测序,确定序列正确的阳性克隆为构建成功的新载体,命名为pGreen-35s:*MeTPS6-EGFP*。

1.2.9 *MeTPS6* 基因过表达载体转化水角 参照前面所建立的优化的转基因水角复合植株技术体系进行 *MeTPS6* 基因过表达载体转化水角研究,具体操作如下:1)采用热击法将载体pGreen-35s:*MeTPS6-EGFP* 导入感受态发根农杆菌K599中。2)对带有顶芽的水角插穗下端斜面处涂上携带pGreen-35s:*MeTPS6-EGFP* 的发根农杆菌K599菌

株。3) 在含有 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kana、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Strep TY 液体培养基中加入 1%(v/v) 的活化的携带目的基因的 K599 的菌液, 28°C 振荡培养至 OD_{600} 值为 0.8, 离心收集菌体。4) 用清水稀释菌体至 OD_{600} 值为 0.1, 将下端斜面处已涂抹发根农杆菌的插穗置于含有菌体稀释液的水培育苗箱中, 28°C 培养 40 d。

1.2.10 带 *EGFP* 标记基因的转基因水角复合植株检测 将手持荧光手电筒(LUYOR-3415RG, 美国)的发射光波调至绿色荧光波长 500 nm, 在黑暗条件下照射 pGreen-35s:*MeTPS6-EGFP* 转化的水角植株, 检测阳性转基因植株。用高效植物基因组 DNA 提取试剂盒分别提取阳性转基因植株的根部基因组 DNA, 设计 *EGFP* 基因引物(*EGFP-F*:5'-AGGACGACGGCAACTACAAG-3', *EGFP-R*:5'-TCTCGTTGGGGTCTTTGCTC-3'), 以根部基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 1%(m/v)凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.11 过表达 *MeTPS6* 基因的转基因植株耐旱性检测 配制好 3%(m/v)的 polyethylene glycol-6000(PEG-6000)水溶液, 将过表达 *MeTPS6* 基因的转基因和非转基因水角植株的根部浸泡于装有 3%(m/v)PEG-6000 的水溶液玻璃瓶中, 28°C 自然光照条件培养, 观察它们的耐旱性。

1.2.12 转基因水角复合植株海藻糖含量的测定 参考 Han 等^[16]报道的方法测定转基因水角复合植株海藻糖含量。剪取转基因植株的根 1 g, 用液氮研磨至粉末, 加入 15 mL 80%(v/v)乙醇, 在 80°C 水浴中处理 30 min, $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清。再向沉淀物中加入 15 mL 80%(v/v)乙醇, 重复抽提 2 次。将重复抽提的上清与前面的上清合并, 80°C 烘干乙醇, 加无离子水定容至 5 mL, 用 0.22 μm 滤膜过滤滤液。准备好 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的海藻糖标准液。将样品进样至高效液相色谱仪(Waters e2695)中, 每次进样 10 μL , 采用的流动相为乙腈:水(含 0.1%(m/v)的 NH_4OH)(70:30), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温为 25°C , xbridge- NH_2 为色谱柱。检测器的条件是氮气流速 $2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 漂移管温度 85°C 。

2 结果与分析

2.1 发根农杆菌介导的水角遗传转化体系的建立 采用土培扦插转化法和水培扦插转化法对水角插

穗进行转化处理, 结果发现这 2 种方法均能获得具有毛状根的植株(图 1)。在土培扦插转化法中, 在插穗斜面处涂布 K599 菌体, 将插穗移植于湿润的含蛭石、泥炭土、椰糠的基质中, 再浇上 K599 菌液, 培养 15 d 后插穗基部长出毛状根(图 1-A)。在水培扦插转化法中, 插穗斜面处预先蘸上 K599 菌体, 再插入 K599 菌液稀释液, 培养插 15 d 后, 插穗基部也长出毛状根(图 1-B)。

GUS 组织化学染色结果显示, 阳性转基因植株的毛状根显示蓝色(图 2-A), 而阴性非转基因植株的毛状根颜色没有任何变化(图 2-B)。对这 2 种转化方法的转化率进行分析, 结果显示土培扦插转化法的转化率为 43.3%, 而水培扦插转化法的转化率为 63.3%, 后者显著高于前者(图 2-C)。随机选取 GUS 检测阳性的植株 10 株, 提取其根部基因组 DNA, PCR 检测, 结果发现均能扩增出 *GUS* 基因片段的条带, 目的条带大小为 732 bp(图 2-D), 因此再一步证实 GUS 检测阳性植株为转基因水角复合植株。上述结果表明水培扦插转化法优于土培扦插转化法。

2.2 不同发根农杆菌菌株对水角转化效率的影响

为了进一步优化发根农杆菌介导的水角转基因技术体系, 采用水培扦插转化法实验 MSU440、C58C1、K599 等 3 种发根农杆菌对带顶芽的水角插穗的转化效果。这 3 种菌株均携带载体 pCambia1301。对各处理植株的毛状根进行 GUS 组织染色检测, 根据检测结果统计转化率。结果表明, 菌株 MSU440 和 C58C1 转化率最低, 分别为 36.7% 和 33.3%; 菌株 K599 的转化率显著高于另两个菌株, 达到 63.3%(图 3)。因此, 在发根农杆菌介导的水角转基因技术体系中选用菌株 K599 转化效果最佳。

2.3 不同水角插穗类型对水角转化率的影响 水角的插穗存在 2 种类型, 一种是带顶芽的, 另一种是没顶芽的。为了验证这 2 种类型的插穗是否对水角转化率存在影响, 从而更进一步优化发根农杆菌介导的水角转基因技术体系, 采用水培扦插转化法, 并选用携带了表达载体 pCambia1301 的发根农杆菌 K599 菌株来进行该研究。结果表明, 没顶芽的插穗转化率为 40.0%; 而带顶芽的插穗转化率高达 63.3%, 显著高于没顶芽的插穗(图 4)。这些结果表明, 带顶芽的插穗的转化率优于没顶芽的插穗。

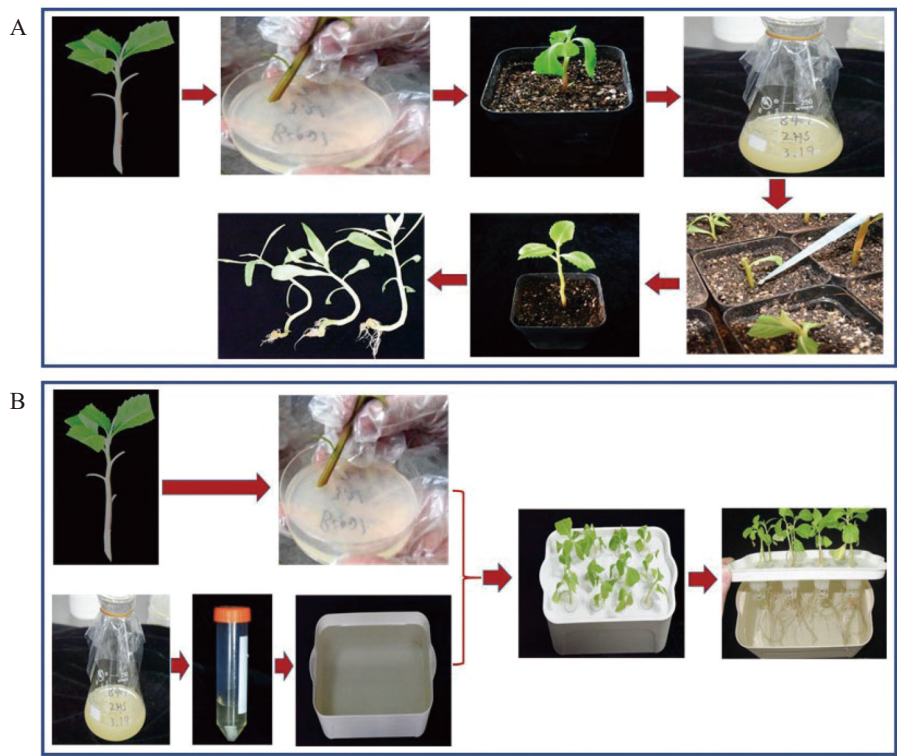


图 1 发根农杆菌介导的水角转基因体系的建立

Fig. 1 Establishment of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation system for *Hydrocera triflora*

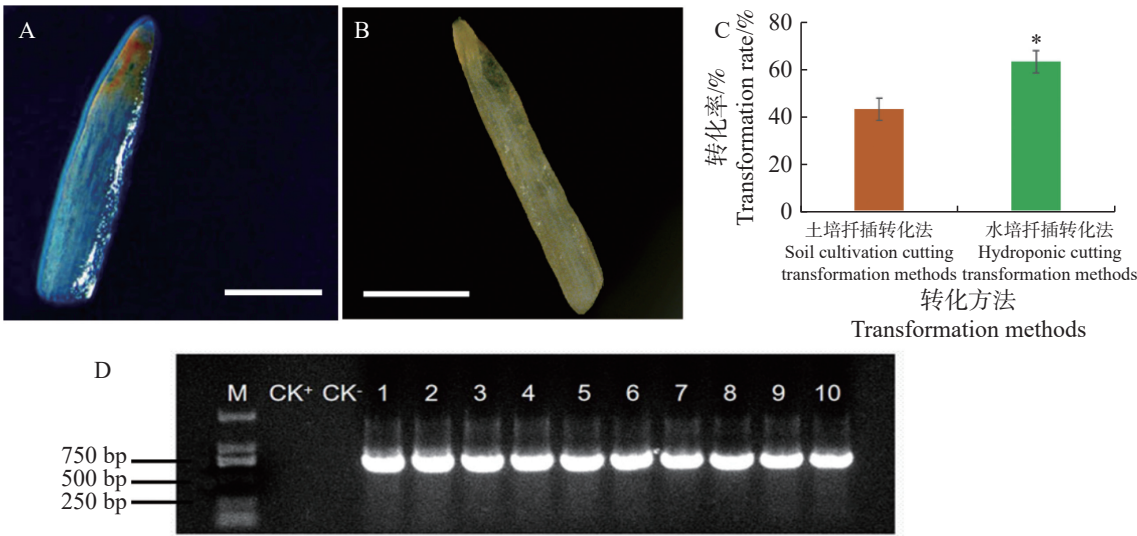
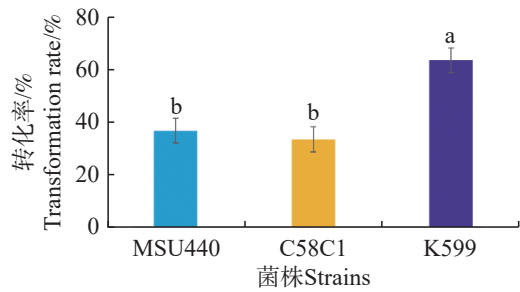


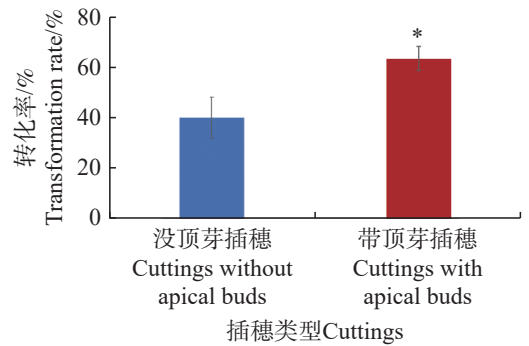
图 2 土培扦插转化法与水培扦插转化法的转化率比较

Fig. 2 Comparison of transformation rates between soil cultivation and hydroponic cutting transformation methods



不同字母表示显著差异($P < 0.05$)。
Different letters indicate significant differences($P < 0.05$).

图 3 不同发根农杆菌菌株对水角转化效率的影响
Fig. 3 The effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on *Hydrocera triflora* transformation efficiency



“*”表示显著差异($P < 0.05$)。
“*” indicates a significant difference($P < 0.05$).

图 4 不同插穗类型对水角转化效率的影响
Fig. 4 The effect of different types of cuttings on *Hydrocera triflora* transformation efficiency

2.4 表达载体 pGreen-35s:*MeTPS6*-EGFP 的构建
NC 克隆技术是一种简单高效的分子克隆技术^[18]。基于该技术逐渐被广泛应用,NC 克隆技术的开发者随后开发一套基于 Nimble Cloning 的植物表达载体,其中包括 pNC-Green-SubC^[19]。植物表达载体 pNC-Green-SubC 中的 CaMV 35s 启动子连接 NC 克隆框和标记基因 *EGFP*。从木薯根部扩增到不带终止密码子的 *MeTPS6* 基因序列,长度共

计 2562 bp, T 载体克隆该基因序列,以此 T 载体质粒为模板,用带 NC 克隆框接头的引物 *MeTPS6*-2 扩增 *MeTPS6* 基因序列,获得两端带 NC 克隆框接头的 *MeTPS6* 基因序列。将 *MeTPS6* 基因序列与 pNC-Green-SubC 载体进行 NC 克隆反应,获得新的载体 pGreen-35s:*MeTPS6*-EGFP(图 5)。在新载体中,CaMV 35s 启动子驱动 *MeTPS6* 和 *EGFP* 进行融合表达。

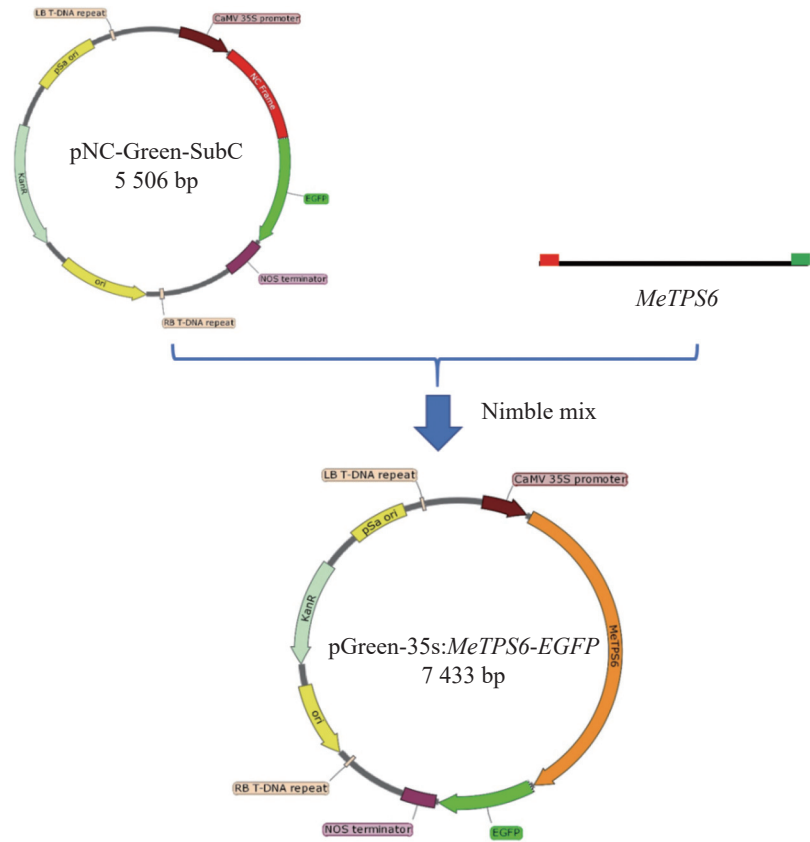
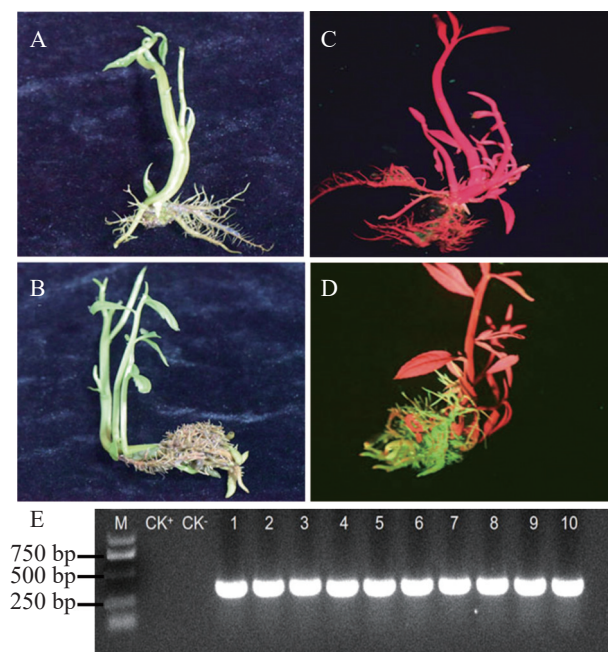


图 5 表达载体 pGreen-35s:*MeTPS6*-EGFP 的构建
Fig. 5 Construction of pGreen-35s:*MeTPS6*-EGFP

2.5 表达载体 pGreen-35s:MeTPS6-EGFP 的转化及转基因复合植株的耐旱效果 本研究构建了 MeTPS6 基因过表达载体 pGreen-35s:MeTPS6-EGFP, 应用所建立的发根农杆菌介导的转基因水角复合植株技术体系转化至水角植株中, 获得了转基因水角复合植株。非转基因与转基因的水角植株在形态上没有表现差异(图 6-A、B)。对转基因植株进行绿色荧光检测, 结果发现在发射光波长 500 nm 照射下, 非转基因植株的根、茎、叶均显示红色(图 6-C); 阳性转基因复合植株的毛状根显示绿色, 而其茎和叶均显示红色(图 6-D)。随机选取 10 株经荧光检测为阳性转基因的复合植株, 分别提取它们的毛状根 DNA, 经 PCR 检测, 它们均能扩增出 EGFP 基因片段(图 6-E), 进一步证实



A. 可见光照下非转基因水角植株; B. 可见光照下转基因水角复合植株; C. 荧光光照下非转基因水角植株; D. 荧光光照下转基因水角复合植株; E. 转基因植株毛状根 PCR 检测。CK⁺. 阳性对照, 以空载体的 K599 为模板的 PCR 扩增产物; CK⁻. 阴性对照, 以非转基因水角植株根部 DNA 为模板的 PCR 扩增产物。

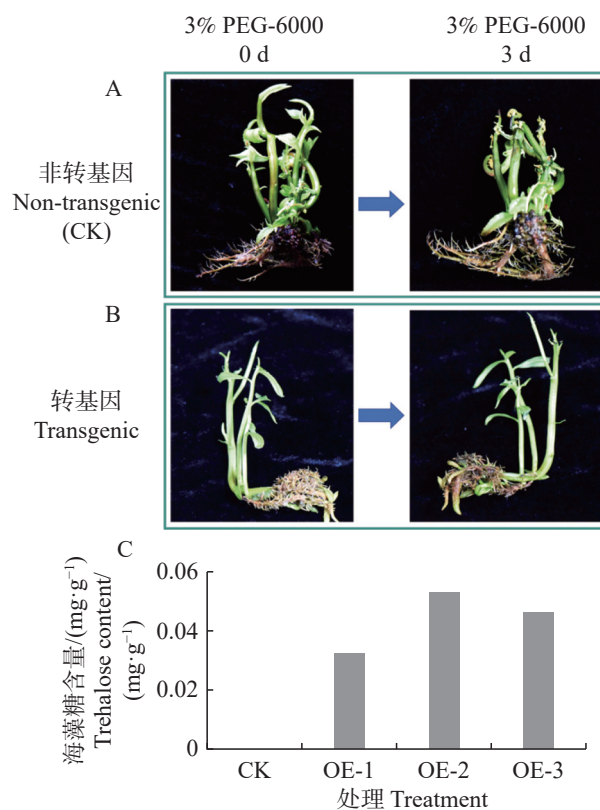
A. Non-transgenic *H. triflora* under visible light; B. Transgenic *H. triflora* under visible light; C. Non-transgenic *H. triflora* under fluorescent light; D. Transgenic *H. triflora* under fluorescent light; E. PCR detection of hairy roots in transgenic plants. CK⁺. Positive control, PCR amplification using empty vector K599 as template; CK⁻. Negative control, PCR amplification using non-transgenic plant root DNA as template.

图 6 发根农杆菌介导表达载体 pGreen-35s:MeTPS6-EGFP 转化水角

Fig. 6 pGreen-35s:MeTPS6-EGFP transformed *Hydrocera triflora* using *Agrobacterium rhizogenes* mediated method

它们是转基因复合植株。

将转基因水角复合植株和非转基因水角植株的根部浸泡于 3%(m/v)PEG-6000 溶液中, 培养 3 d 后, 非转基因水角植株叶片出现萎蔫(图 7-A), 转基因水角复合植株生长正常(图 7-B)。选取 3 株转基因植株检测其毛状根的海藻糖含量, 发现它们的海藻糖含量在 0.032 ~ 0.053 mg·g⁻¹ (图 7-C); 而对照的根部由于海藻糖含量太低, 超出仪器检测的灵敏度范围, 因此没有检测到海藻糖含量。这些结果表明转基因水角复合植株的耐旱能力得到显著改善。



A. 非转基因水角植株在 3% PEG-6000 溶液处理 3 d 后叶片出现萎蔫; B. 转基因水角复合植株在 3% PEG-6000 溶液处理 3 d 后生长正常; C. 转基因水角复合植株毛状根海藻糖的检测。

A. Non-transgenic *H. triflora* showed wilting of leaves after treated with 3% PEG-6000 solution for 3 days; B. Transgenic *H. triflora* composite plants grew normally after treated with 3% PEG-6000 solution for 3 days; C. Detection of trehalose in hairy roots of transgenic *H. triflora* composite plants.

图 7 转基因水角复合植株耐旱性检测

Fig. 7 Drought tolerance testing of transgenic *Hydrocera triflora*

3 讨论

有关水角组织培养的报道极少。王景飞等^[20]

以水角的种子和茎段为外植体,通过优化培养基组分来诱导这些外植体上的芽点形成不定芽和丛生芽,获得水角再生植株。这种不经过愈伤组织获得再生植株的组织培养方法不能应用于根瘤农杆菌介导的遗传转化技术上。目前发展出不依赖组织培养的发根农杆菌介导的遗传转化方法,这些研究均是通过携带目的基因的发根农杆菌感染种子下胚轴,获得由转基因毛状根和野生型茎叶组成的转基因复合植株,这些转基因复合植株可用来改良性状和研究相关基因的功能^[6-9]。这种遗传转化方法具有操作简单、转化率高、不依赖组织培养和基因型等优势。为此本研究借鉴该技术来尝试建立水角的高效、便捷、不依赖组织培养的转基因技术体系。由于水角种子萌发率极低,本研究选用水角插穗来代替种子幼苗作为农杆菌感染外植体,并成功建立了基于发根农杆菌介导的水角转基因技术体系。本研究的结果为其他水生植物以及极难获得种子或种子萌发率低的植物的性状改良和基因功能验证提供了技术参考。

不同的发根农杆菌菌株对植物转化率存在一定的影响。在柱花草遗传转化研究中,菌株 K599 和 Arqual 的转化率达 95%,均显著高于 MSU440 菌株,而 ArA4 和 Ar1193 菌株不能诱导产生转基因毛状根^[9]。本研究也得到相似的结果,即菌株 K599 的转化率达到 63.3%,显著高于菌株 SU440 和 C58C1。在鹰嘴豆^[6]、大豆^[21]等植物的发根农杆菌介导转化研究中,菌株 K599 被证明是最合适的转化菌株。因此菌株 K599 可能适合多种植物的转化。

发根农杆菌能够在无激素促进、无抗性筛选的条件下诱导植物被侵染部位产生毛状根^[22],因此被广泛应用于基因功能验证、次生代谢产物等方面的研究^[6,9,23]。发根农杆菌诱导被侵染部位产生的毛状根其阳性率在不同的物种中存在差异。Wang 等^[9]发现柱花草阳性复合转基因植株的毛状根阳性率达到 100%。而 Fan 等^[8]发现大豆阳性复合转基因植株的毛状根阳性率与转化方法相关,其中二步转化法最高,为 53.85%。在本研究中,水角阳性复合转基因植株的毛状根阳性率达到 100%,与柱花草的相似。

海藻糖-6-磷酸合成酶是海藻糖生物合成代谢的关键酶,在植物干旱等非生物胁迫中起到重要

作用^[11,24]。*MeTPS6* 基因主要在木薯的根中表达,且参与了木薯的抗旱等胁迫响应^[25]。本研究构建了 *MeTPS6* 基因过表达载体,并转化至水角的毛状根中,获得转基因复合植株。目前所报道的植物耐旱实验基本上采用 PEG-6000 溶液处理来作为模拟干旱胁迫处理^[16,26-27]。本研究也采用 PEG-6000 溶液处理过表达 *MeTPS6* 基因的转基因复合植株,培养 3 d 后发现转基因复合植株生长正常,而对照出现萎蔫,说明转基因复合植株的耐干旱胁迫能力得到明显提升。

本研究采用 NC 分子克隆^[18] 这一新的克隆技术来构建植物表达载体,与当前广泛应用的 Gibson assembly^[28] 和 Gateway cloning^[29] 分子克隆技术相比,具有如下优势:1) Gibson assembly 需要将目标载体质粒酶解线性化后,目的基因才能克隆至目标载体上,而 NC 不需要将目标载体质粒酶解线性化,目的基因片段可直接克隆至环状的质粒上;2) Gibson assembly 的插入片段限制于 PCR 产物,Gateway cloning 需要入门克隆,而 NC 比较灵活,可以直接使用 PCR 产物或者入门克隆;3) Gateway cloning 在重组位点上会留下一个 25 bp 的缝,而 NC 能进行完全无缝克隆;4) 多片段组装时,Gateway cloning 的克隆效果极差,而 NC 的克隆效果不受影响。此外,研究者还开发出一套基于 Nimble Cloning 的植物表达载体^[19],可用于基因异位表达、基因沉默、亚细胞定位、蛋白互作、启动子活、CRISPR/Cas9 基因编辑等研究。

4 结 论

首次建立了高效、不依赖组织培养的水角遗传转化体系。对该转化体系进行优化研究,以水角插穗为发根农杆菌感染外植体,发现水培扦插转化法的转化率显著高于土培扦插转化法;发根农杆菌菌株 K599 转化率最高;选用带顶芽插穗作为感染外植体,其转化效果优于无顶芽插穗。经优化的水角转化体系其转化率达 63.3%。此外,构建了过表达海藻糖-6-磷酸合成酶 *MeTPS6* 基因的载体 pGreen-35s:*MeTPS6*-EGFP,通过转化获得了过表达 *MeTPS6* 转基因水角复合植株。3%(m/v) PEG-6000 溶液处理 3d 后,发现转基因植株生长正常,而对照出现萎蔫现象;转基因植株毛状根的海藻糖含量为 0.032 ~ 0.053 mg·g⁻¹,显著高于对照,

表明过表达 *MeTPS6* 转基因水角复合植株的耐旱能力得到显著改善。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志-第一卷-总论[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 219.
- [2] 王景飞, 吕德任, 黄赛, 等. 海南省濒危水生植物水角的资源现状及调查分析[J]. *中国园艺文摘*, 2017, 33(12): 67 – 69.
- [3] FRAME B R, SHOU H X, CHIKWAMBA R K, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(1): 13 – 22.
- [4] NISHIMURA A, AICHI I, MATSUOKA M. A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation in rice[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(6): 2796 – 2802.
- [5] GUREL S, GUREL E, MILLER T I, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Sorghum bicolor* using immature embryos[M]//DUNWELL J M, WETTEN A C. Transgenic plants: methods and protocols. 2nd ed. New York: Humana Press, 2012: 109-122.
- [6] AGGARWAL P R, NAG P, CHOUDHARY P, et al. Genotype-independent *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation of chickpea: a rapid and efficient method for reverse genetics studies[J]. *Plant Methods*, 2018, 14(1): 55.
- [7] CHEN L Y, QIN L, ZHOU L L, et al. A nodule-localized phosphate transporter GmPT7 plays an important role in enhancing symbiotic N₂ fixation and yield in soybean[J]. *New Phytologist*, 2019, 221(4): 2013 – 2025.
- [8] FAN Y L, ZHANG X H, ZHONG L J, et al. One-step generation of composite soybean plants with transgenic roots by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 208.
- [9] WANG L J, WANG W Q, MIAO Y, et al. Development of transgenic composite *Stylosanthes* plants to study root growth regulated by a β -expansin gene, *SgEXPB1*, under phosphorus deficiency[J]. *Plant Cell Reports*, 2023, 42(3): 575 – 585.
- [10] 张雯, 王宇斐, 郭延平. 高等植物 6-磷酸海藻糖信号调控研究进展[J]. *植物生理学报*, 2016, 52(4): 394 – 400.
- [11] 丁泽红, 付莉莉, 吴春来, 等. 木薯 *MeTPSI* 基因克隆、表达及生物信息学分析[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(9): 28 – 33.
- [12] GARG A K, KIM J K, OWENS T G, et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(25): 15898 – 15903.
- [13] 巩涛, 刘德海, 王继雯, 等. 海藻糖合成途径及分子生物学研究进展[J]. *中国农学通报*, 2016, 32(14): 62 – 67.
- [14] 郭蓓, 胡磊, 何欣, 等. 海藻糖-6-磷酸合成酶转基因烟草提高耐盐性的研究[J]. *植物学通报*, 2008, 25(1): 41 – 49.
- [15] LI H W, ZANG B S, DENG X W, et al. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPSI* enhances abiotic stress tolerance in rice[J]. *Planta*, 2011, 234(5): 1007 – 1018.
- [16] HAN B Y, FU L L, ZHANG D, et al. Interspecies and intraspecies analysis of trehalose contents and the biosynthesis pathway gene family reveals crucial roles of trehalose in osmotic-stress tolerance in cassava[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7): 1077.
- [17] LI X X, ZHENG J K, YANG Y Q, et al. *INCREASING NODULE SIZE1* expression is required for normal rhizobial symbiosis and nodule development[J]. *Plant Physiology*, 2018, 178(3): 1233 – 1248.
- [18] YAN P, ZENG Y J, SHEN W T, et al. Nimble cloning: a simple, versatile, and efficient system for standardized molecular cloning[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 7: 460.
- [19] YAN P, TUO D, SHEN W T, et al. A Nimble Cloning-compatible vector system for high-throughput gene functional analysis in plants[J]. *Plant Communications*, 2023, 4(2): 100471.
- [20] 王景飞, 符瑞侃, 任军方, 等. 濒危水生植物水角的离体培养技术[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(3): 110 – 113.
- [21] GUO Z L, CAO H R, ZHAO J, et al. A natural uORF variant confers phosphorus acquisition diversity in soybean[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 3796.
- [22] 梅错, 刘志鹏. 发根农杆菌介导的箭筈豌豆毛状根遗传转化体系的建立[J]. *中国草地学报*, 2020, 42(5): 1 – 7.
- [23] FATHI R, MOHEBODINI M, CHAMANI E. High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Cichorium intybus* L. via removing macronutrients[J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 128: 572 – 580.
- [24] 李莉, 黄群策, 秦广雍. 海藻糖在提高植物抗逆性方面的研究进展[J]. *生物学通报*, 2003, 38(6): 6 – 7.
- [25] 丁泽红, 铁韦韦, 付莉莉, 等. 木薯海藻糖合成酶基因 *MeTPS6* 克隆及其在非生物胁迫下的表达分析[J]. *南方农业学报*, 2017, 48(11): 1923 – 1929.
- [26] 罗颖洁, 武建新, 文昭竹, 等. 白三叶萌发期耐旱性评价中 PEG6000 适宜浓度筛选[J]. *湖南生态科学学报*, 2018, 5(4): 6 – 11.
- [27] 李静静, 任永哲, 白露, 等. PEG-6000 模拟干旱胁迫下不同基因型小麦品种萌发期抗旱性的综合鉴定[J]. *河南农业大学学报*, 2020, 54(3): 368 – 377.
- [28] GIBSON D G, YOUNG L, CHUANG R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 343 – 345.

- [29] HARTLEY J L, TEMPLE G F, BRASCH M A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination[J]. *Genome Research*, 2000, 10(11): 1788 – 1795.

Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation system for *Hydrocera triflora

ZHOU Huisen^{1#}, TAN Deguan^{1,2,3*}, WANG Ying¹, FU Lili², YU Ying²,
SUN Xuepiao², ZHANG Jiaming^{2*}

(1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (CATAS) / Hainan Academy of Tropical Agricultural Resources, CATAS / Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Tropical Crop Biology and Genetic Resources/Hainan Key laboratory of Tropical Microbe Resources, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Sanya Research Institute, CATAS, Sanya, Hainan 572025, China)

Abstract: *Hydrocera triflora* is an important aquatic plant that is in an endangered state. Its poor drought resistance is the main factor leading to its endangerment. An attempt was made to build a genetic transformation system for and to improve its traits via this transformation system. *H. triflora* *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation system was successfully established and optimized for the first time. The results show that the transformation rate of hydroponic cutting transformation method was significantly higher than that of soil cultivation cutting transformation method. *Agrobacterium rhizogenes* K599 strain had the highest transformation rate. The cuttings with apical buds as infection explants had a higher transformation rate than those without apical buds. The transformation rate of the optimized *H. triflora* transformation system reached 63.3%. Meanwhile, pGreen-35s:MeTPS6-EGFP that overexpresses trehalose-6-phosphate synthase *MeTPS6* was constructed by Nimble Cloning technology. The transgenic composite *H. triflora* were obtained. After 3 days of treatment with 3% PEG-6000 solution, it was found that the transgenic plants grew normally, while the control leaves showed wilting. The trehalose content in the hairy roots of transgenic plants was significantly higher than that of the control. These results indicate that overexpressing *MeTPS6* in transgenic composite *H. triflora* significantly improves their drought stress tolerance.

Keywords: *Hydrocera triflora*; *Agrobacterium rhizogenes*; genetic transformation; transgenic composite plants; drought tolerance

(责任编辑: 邹游兴)