

基于直接递送法建立豌豆遗传转化体系的探究

黄梦茹 张杰*

佛山大学农业与生物工程学院

DOI:10.32629/as.v9i7.4182

[摘要] 为探究不依赖组培的豌豆遗传转化方法,以中豌六号豌豆品种为材料,利用含不同发育调节因子的载体,通过农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)直接注射递送法侵染植株,以PCR检测再生植株确认阳性。结果表明:不同发育调节因子对再生和转化效率影响较大,AtGRF5和ZmWUS+ipt介导的再生效率最高(均>50%),TaGRF4-OsGIF1介导的转化效率最高(29.9%)。农杆菌浓度也影响再生和转化效率,OD600=0.8时两者均明显提升。本研究表明,基于发育调节因子的直接注射递送可有效介导豌豆的再生和转化,可为豌豆功能基因的分子生物学研究提供参考。

[关键词] 豌豆; 直接递送法; 遗传转化; 发育调控因子

中图分类号: S643.3 文献标识码: A

Investigation of a Pea Genetic Transformation System Based on Direct Delivery Method

Mengru Huang Jie Zhang*

Foshan University Agricultural and Biological Engineering

[Abstract] To explore a genetic transformation method for *Pisum sativum* independent of tissue culture, the pea cultivar Zhongwan No. 6 was used as material. Using vectors containing different developmental regulators, plants were infected via direct delivery method by *Agrobacterium tumefaciens*, and PCR was employed to detect and confirm positive transformants among directly regenerated plants. Results showed that different developmental regulators significantly influenced regeneration and transformation efficiency in peas. The highest regeneration efficiency was achieved with AtGRF5 and ZmWUS+ipt, both exceeding 50%. Meanwhile, TaGRF4-OsGIF1 mediated the highest transformation efficiency, reaching up to 29.9%. Additionally, different concentrations of *Agrobacterium* also affected regeneration and transformation efficiency, with OD600 = 0.8 showing significant improvements in both. Therefore, this study demonstrates that direct injection delivery based on developmental regulators can effectively mediate regeneration and transformation in peas, providing valuable support for molecular biological research on functional genes in peas.

[Key words] *Pisum sativum*; Direct delivery method; Genetic transformation; Developmental regulatory factors

1 引言

豌豆(*Pisum sativum* L.)是为豆科(Leguminosae)蝶形花亚科(Fabaceae)豌豆属(*Pisum*)一年生或越年生草本植物。豌豆是世界第二大食用豆类,也是我国重要的食用豆类作物之一,主要作为粮食和蔬菜食用^[1]。豌豆作为豆科植物,能固氮培肥、改善土壤结构,是优良前茬作物,兼具经济与生态价值,对保障国民营养健康和耕地保护意义重大。同时,孟德尔以其为材料发现遗传定律,使其成为遗传学经典模式作物,具有重要理论研究价值^[2]。

随着基因编辑等新兴技术的发展以及豌豆基因组测序的完成,豌豆的基因功能研究及现代分子育种将有望获得极大的发展^[3-6]。稳定高效的遗传转化体系是研究基础。自1990年建立农

杆菌介导体系以来,因依赖组织培养,存在再生效率低、基因型依赖、周期长、转化率低等问题,至今未建立普适稳定体系,严重制约豌豆分子育种研究^[7]。

近年研究表明,体细胞中表达发育调控因子(Developmental Regulators, DRs),如WUS(WUSCHEL)、STM(SHOOT MERISTEMLESS)、MP(MONOPTEROS)和GRFs(GROWTH-REGULATING FACTORS)等,可直接诱导分生组织再生^[8]。例如,玉米Wus2(Wuschel2)和Bbm(Baby Boom)转录因子的递送促进了体细胞胚产生,提高了难转化自交系的转化效率^[9]。Cody等^[10]建立了一种直接递送(Direct Delivery)的植物转化的方法,该方法可以将DRs递送到土壤的植物,促进伤口部位新芽的形成。Lian等^[11]成功利用该方法发现发育调控因子PLT5提高了金鱼草(*Antirrhinum majus*)、甘

蓝(*Brassica rapa*)及甜椒(*Capsicum annuum*)等植物的转化效率。豆科作物(包括豌豆)再生能力较差,该方法在豌豆中是否可行尚不清楚。本研究利用农杆菌直接侵染去除分生组织的豌豆幼苗,探究不同发育调控因子对其再生和转化效率的影响,以期豌豆基因编辑及分子生物学研究提供参考。

2 材料与方法

2.1 实验材料

供试的豌豆材料为中豌6号,采购自中国农业科学研究院。载体pW501-pW506由北京大学现代农业研究院张华伟研究员惠赠,具体质粒信息见表1^[12]。农杆菌GV3101感受态细胞采购自碧云天公司。

表1 pW501-pW506质粒所含有的调控因子^[12]

质粒	调控因子
pW501	
pW502	AtGRF5
pW503	TaGRF4-OsGIF1
pW504	ZmWUS
pW505	ZmWUS+ZmBBM
pW506	ZmWUS+ipt

2.2 豌豆材料的培养

将豌豆种子于室温条件下浸泡12小时后,平铺于塑料托盘上,于25℃黑暗条件下催芽2天,种子发芽后,将发芽一致的幼苗移栽至50孔穴盘中,每孔1株,然后放置于培养室进行培养(昼温25℃/夜温20℃;光周期:光照16 h/黑暗8 h)。待幼苗生长大约10天后进行注射,每次注射约50株,重复2次。

2.3 农杆菌转化及悬浮液的准备

农杆菌转化采用冻融法:500 ng质粒加入50 μL感受态细胞,液氮速冻5 min,37℃水浴5 min,冰浴5 min;加500 μL LB培养基,28℃振荡3 h。取200 μL涂布于含Kan(50 μg·mL⁻¹)和Rif(20 μg·mL⁻¹)的YEP固体培养基,28℃培养2天。菌落PCR鉴定阳性克隆后,挑单菌落于5 mL含相同抗生素的液体YEP中,28℃振荡过夜。按1:100转接至50 mL含Kan、Rif及20 μmol·L⁻¹乙酰丁香酮的液体YEP中,培养至OD₆₀₀=0.4~0.6。离心收集菌体,用注射培养基(10 mM MgCl₂、10 mM MES、200 μM乙酰丁香酮)重悬并调OD₆₀₀至0.2,28℃静置2 h后注射。

2.4 农杆菌注射

使用手术刀片去除豌豆植株的所有顶端和腋端分生组织。用注射器将约1 mL农杆菌悬浮液注入叶腋和伤口处的节点组织,并以蘸菌液的脱脂棉球覆盖伤口保湿。植株暗培养2天后,转入25℃、16 h光照/8 h黑暗的光周期下培养至再生。期间每2-3天用刀片去除所有新生分生组织,但保留最初接种部位的组织。

2.5 鉴定阳性植株

对侵染处新生的幼芽叶片取样,采用CTAB法提取DNA。根据载体中的DsRed基因序列设计引物DsRed-FP(5' GGCTCCAAGGTGT

ACGTGAAG-3')和DsRed-RP(5'-TGATGCTCTCGTTGTGGGAGG-3'),进行PCR。PCR程序为:94℃预变性4 min,94℃变性30 s,55℃复性30 s,72℃延伸30 s,重复34循环,72℃延伸5 min。利用琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行检测,含有目的条带的即为阳性植株。

3 结果与分析

3.1 不同调控因子对豌豆再生效率的影响

为研究不同调控因子对豌豆再生效率的影响,利用转化了含不同调控因子质粒(表1)的农杆菌直接注射豌豆幼苗。结果(表2)显示,OD600=0.2时,含空载体pW501的农杆菌再生效率为38.9%,说明豌豆自身具有较强再生能力。含pW502、pW504或pW506质粒可提高效率,分别达53.2%、44.3%、56.1%,其中pW506(ZmWUS+ipt)最高。而含pW505(ZmWUS+ZmBBM)效率最低(34.4%),低于空载体。表明不同调控因子作用各异,AtGRF5和ZmWUS+ipt影响最大,效率均超50%。

表2 不同调控因子对豌豆再生效率的影响

接种农杆菌所含 质粒	农杆菌浓度 (OD600)	接种数/株	再生数/株	再生效率/%
pW501	0.2	81	31	38.9±10.0
pW502	0.2	79	42	53.2±0.9
pW503	0.2	75	27	37.4±11.1
pW504	0.2	75	30	44.3±21.3
pW505	0.2	80	28	34.4±18.7
pW506	0.2	85	48	56.1±8.6

3.2 转基因阳性植株的鉴定

再生芽出叶后,提取叶片DNA进行PCR检测,部分样品扩增出425bp条带,表明转化成功(图1)。阳性植株统计(表3)显示,含pW503质粒的农杆菌侵染后转化效率最高(29.9%),其他质粒处理组阳性率约为10%。

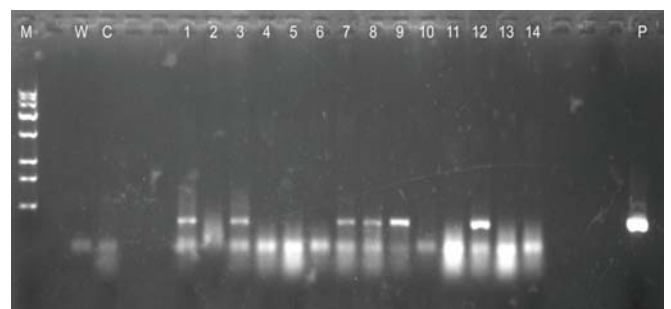


图1 转化阳性植株的PCR检测

M: GeneRuler 1 kb Plus marker; W: 模板为水的对照; C: 模板为未接种农杆菌的豌豆DNA的对照; P: 模板为质粒对照; 1-14: 不同的再生植株。

3.3 不同农杆菌浓度对豌豆再生和转化效率的影响

为探究农杆菌浓度对豌豆再生和转化效率的影响,选用含TaGRF4-OsGIF1的pW503载体,设置OD600=0.2和0.8两个浓度接

种。结果(表4)显示, OD600=0.2时再生效率为31.8%, 阳性转化效率为24.5%; OD600=0.8时分别提升至43.1%和34.9%, 增幅达35%和42%。表明农杆菌浓度为0.8时可有效提升再生和转化效率。

表3 转化阳性植株数统计

接种农杆菌 所含质粒	农杆菌浓 度(OD600)	接种 数/株	再生 数/株	再生效率/%	阳性植株 数/株	阳性转化效率 /%
pW501	0.2	81	31	38.9±10.0	3	10.7±15.1b
pW502	0.2	79	42	53.2±0.9	3	7.2±10.1c
pW503	0.2	75	27	37.4±11.1	8	29.9±12.0a
pW504	0.2	75	30	44.3±21.3	4	12.5±17.7b
pW505	0.2	80	28	34.4±18.7	2	8.8±5.3c
pW506	0.2	85	48	56.1±8.6	3	6.1±1.5c

表4 不同农杆菌浓度对豌豆再生和转化效率的影响

农杆菌浓 度(OD600)	接种农杆菌 所含质粒	接种 数/株	再生 数/株	再生效率/%	阳性植 株数/株	阳性转化效 率/%
0.2	pW503	135	43	31.8±6.1	11	24.5±9.4
0.8	pW503	140	61	43.1±14.3	23	34.9±11.6

4 结语

植物的遗传转化一直是植物基因编辑和作物改良的瓶颈。目前为止, 仅有不到0.1%的植物能够实现稳定的遗传转化^[13]。豌豆转化难度大, 开发高效便捷的转化方法对遗传改良和分子育种意义重大。目前主要依赖组织培养, 存在再生效率低、基因型依赖性强、周期长、转化率低等问题^[7]。本研究探究了一种直接递送法介导的豌豆转化方法, 从播种到植物的再生只需要40~50天, 大幅缩短了转化的时间。

农杆菌介导转化是植物基因功能研究的主流手段, 具有整合稳定、拷贝数少、表达稳定、成本低、安全性高等优点, 但长期依赖组培技术。近年多种非组培活体转化技术发展迅速, 如种子介导法、花器官转化法、直接注射法、切割浸渍出芽法及病毒递送法等, 可实现对不同器官的直接转化^[14]。拟南芥的花序浸染法是目前应用最广泛的非组培依赖的转化方法之一。Cao等^[13]针对具备根出芽潜力的植物开发了一种切割-浸渍-出芽法(CDB)的植物转化方法, 在橡胶草*Taraxacum koksaghyz*、甘薯、黄连木*Pistacia chinensis*、牛蒡*Arctium lappa*、桃*Prunus persica*和蒙古蒲公英*Taraxacum mongolicum*等植物中均得到成功应用。Maher等^[15]报道了一种直接将农杆菌悬液注入植物茎秆、节间、花芽等组织中, 实现了植株的再生和转化, 该技术也在烟草、三七*Panax notoginseng*、百合*Lilium regale*等植物中均得到了成功应用。本研究利用直接递送法也成功实现了豌豆植株的再生和转化, 在没有发育调控因子的作用下, 再生效率为38.9%, 转化效率可以达到10.7%。

直接递送法存在物种局限性, 不同植物再生能力差异显著, 如金鱼草与番茄中注射法再生芽效率偏低。植物细胞的命运可由多种发育调控因子(DRs)决定并调控, 例如WUSCHEL(WUS)、PLETHORAS(PLT)、生长素响应因子(ARF)、生长调节因子(GRF)、叶

状子叶基因(LEC1和LEC2)、BABY-BOOM(BBM)、侧器官边界域(LBDs)、茎尖分生组织缺失因子(STM)以及增强茎尖再生因子(ESR)等^[11]。这些基因的表达与促进愈伤组织形成及植物再生密切相关。研究者利用发育调控基因提升再生能力, 显著提高了阳性芽获得效率。研究表明, PLT5能明显提升金鱼草和番茄的活体转化效率^[11]。刘之洋等研究了Fast-Tracc方式在苦瓜转化中的应用, 结果表明发育调控因子TaGRF4-OsGIF1对苦瓜再生和转化效率具有显著的提升作用^[16]。本研究也发现, TaGRF4-OsGIF1对豌豆的再生和转化效率同样具有显著的提升作用。

本研究利用直接注射递送法, 探究了不同发育调控因子对豌豆再生和转化的影响, 结果表明TaGRF4-OsGIF1可显著提升转化效率。但研究存在不足: 通过注射法获得的阳性植株可能存在嵌合体, 需通过种子收获验证其遗传稳定性。此外, 后续将进一步探究不同豌豆品种对转化效率的影响。

[参考文献]

- [1]仪登霞, 庞永珍.我国豌豆生产和育种的现状与问题[J].中国草地学报, 2022, (44): 104-113.
- [2]Ellis, T.H., Hofer, J.M., Timmerman-Vaughan, G.M., Coyne, C.J., Hellens, R.P. Mendel, 150 Years On[J]. Trends Plant Sci, 2011, 16, 590-6.
- [3]Feng, C., Chen, B., Hofer, J., Shi, Y., Jiang, M., Song, B., Cheng, H., Lu, L., Wang, L., Howard, A., Bendahmane, A., Fouchal, A., Moreau, C., Sawada, C., LeSignor, C., Zhang, C., Vikieli, E., Tsanakas, G., Zhao, H., Cheema, J., Barclay, J.E., Hou, J., Sayers, L., Wingen, L., Vigouroux, M., Vickers, M., Ambrose, M., Dalmais, M., Higuera-Poveda, P., Li, P., Yuan, Q., Spanner, R., Horler, R., Wouters, R., Chundakkad, S., Wu, T., Zhao, X., Li, X., Sun, Y., Huang, Z., Wu, Z., Deng, X.W., Steuernagel, B., Domoney, C., Ellis, N., Chayut, N. Cheng, S. Genomic and Genetic Insights into Mendel's Pea Genes[J]. Nature, 2025, 642, 980-989.
- [4]Kreplak, J., Madoui, M.A., Capal, P., Novak, P., Labadie, K., Aubert, G., Bayer, P.E., Gali, K.K., Syme, R.A., Main, D., Klein, A., Berard, A., Vrbova, I., Fournier, C., d'Agata, L., Belser, C., Berrabah, W., Toege Iova, H., Milec, Z., Vrana, J., Lee, H., Kougbeadjo, A., Terezo, M., Huneau, C., Turo, C.J., Mohellibi, N., Neumann, P., Falque, M., Gallardo, K., McGee, R., Tar'an, B., Bendahmane, A., Aury, J.M., Batley, J., Le Paslier, M.C., Ellis, N., Warkentin, T.D., Coyne, C.J., Salse, J., Edwards, D., Lichtenzweig, J., Macas, J., Dolezel, J., Wincker, P., Burstin, J. A Reference Genome for Pea Provides Insight into Legume Genome Evolution[J]. Nat Genet, 2019, 51, 1411-1422.
- [5]Liu, N., Lyu, X., Zhang, X., Zhang, G., Zhang, Z., Guan, X., Chen, X., Yang, X., Feng, Z., Gao, Q., Shi, W., Deng, Y., Sheng, K., Ou, J., Zhu, Y., Wang, B., Bu, Y., Zhang, M., Zhang, L., Zhao, T., Gong, Y. Reference Genome Sequence and Population Genomic Analysis of Peas Provide Insights into the Genetic Basis of Mendelian and Other Agronomic Traits[J]. Nat Genet, 2024, 56, 1964-1974.

- [6]Yang,T.,Liu,R.,Luo,Y.,Hu,S.,Wang,D.,Wang,C.,Pandey,M.K.,Ge,S.,Xu,Q.,Li,N.,Li,G.,Huang,Y.,Saxena,R.K.,Ji,Y.,Li,M.,Yan,X.,He,Y.,Liu,Y.,Wang,X.,Xiang,C.,Varshney,R.K.,Ding,H.,Gao,S.Zong,X. Improved Pea Reference Genome and Pan-Genome Highlight Genomic Features and Evolutionary Characteristics[J].Nat Genet,2022,54,1553-1563.
- [7]Ludvíková,MichaelaGriga, Miroslav.Pea Transformation: History, Current Status and Challenges[J].Czech Journal of Genetics and Plant Breeding,2022,58,127-161.
- [8]Gordon-Kamm,B.,Sardesai,N.,Arling,M.,Lowe,K.,Hoerster,G.,Betts,S.Jones,A.T.Using Morphogenic Genes to Improve Recovery and Regeneration of Transgenic Plants[J].Plants (Basel),2019,8.
- [9]Lowe,K.,Wu,E.,Wang,N.,Hoerster,G.,Hastings,C.,Cho,M.J.,Scelonge,C.,Lenderts,B.,Chamberlin,M.,Cushatt,J.,Wang,L.,Ryan,L.,Khan,T.,Chow-Yiu,J.,Hua,W.,Yu,M.,Banh,J.,Bao,Z.,Brink,K.,Igo,E.,Rudrappa,B.,Shamseer,P.M.,Bruce,W.,Newman,L.,Shen,B.,Zheng,P.,Bidney,D.,Falco,C.,Register,J.,Zhao,Z.Y.,Xu,D.,Jones,T.Gordon-Kamm,W.Morphogenic Regulators Baby Boom and Wuschel Improve Monocot Transformation[J].Plant Cell, 2016,28,1998-2015.
- [10]Cody,J.P.,Maher,M.F.,Nasti,R.A.,Starker,C.G.,Chamness,J.C.Voytas,D.F.Direct Delivery and Fast-Treated Agrobacterium Co-Culture (Fast-Tracc) Plant Transformation Methods for Nicotiana Benthamiana[J].Nat Protoc,2023,18,81-107.
- [11]Lian,Z.,Nguyen,C.D.,Liu,L.,Wang,G.,Chen,J.,Wang,S.,Yi,G.,Wilson,S.,Ozias-Akins,P.,Gong,H.Huo,H.Applicatio
- n of Developmental Regulators to Improve in Planta or in Vitro Transformation in Plants[J].Plant Biotechnol J,2022, 20,1622-1635.
- [12]Pan,W.,Cheng,Z.,Han,Z.,Yang,H.,Zhang,W.Zhang,H.Efficient Genetic Transformation and Crispr/Cas9-Mediated Genome Editing of Watermelon Assisted by Genes Encoding Developmental Regulators[J].J Zhejiang Univ Sci B,2022,23, 339-344.
- [13]Cao,X.,Xie,H.,Song,M.,Lu,J.,Ma,P.,Huang,B.,Wang,M.,Tian,Y.,Chen,F.,Peng,J.,Lang,Z.,Li,G.Zhu,J.K.Cut-Dip-Budding Delivery System Enables Genetic Modifications in Plants without Tissue Culture[J].Innovation (Camb),2023,4, 100345.
- [14]李娇娇,王晓光,白梦岚,侯小改,等.农杆菌介导的植物非组培遗传转化技术研究进展[J].浙江农林大学学报,2025,(42): 888-897.
- [15]Maher,M.F.,Nasti,R.A.,Vollbrecht,M.,Starker,C.G.,Clarke,M.D.Voytas,D.F.Plant Gene Editing through De Novo Induction of Meristems[J].Nat Biotechnol,2020,38,84-89.
- [16]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,(4):622-627.

作者简介:

黄梦茹(1999--),女,汉族,河南省信阳市人,硕士,佛山大学,主要研究方向:植物逆境生理与分子生物学。

*通讯作者:

张杰(1986--),男,汉族,四川省内江人,博士研究生,佛山大学,主要研究方向:植物营养分子生物学。