

花生 *FAD2* 基因 RNAi 载体转化及转基因籽粒脂肪酸分析

黄冰艳,张新友*,苗利娟,严 玫,海 燕,易明林,徐 静,陈占宽
(河南省农作物新品种重点实验室,河南 郑州 450002)

摘要:在构建了以花生 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶(*FAD2*)基因自身启动子驱动、有内含子间隔的该基因编码序列反向重复片段的 RNA 干扰载体的基础上,对上述干扰载体进行了农杆菌介导的花生胚小叶的遗传转化,以期特异调控花生籽粒中油酸、亚油酸含量。在 2 个受体品种中获得 105 株抗性再生植株,用两对引物对其进行了 PCR 扩增,其中 32 株初步证实为转基因植株。采用近红外分析仪对转基因 T_1 籽粒油酸和亚油酸含量的检测结果表明,转基因株系内油酸/亚油酸比值的变异高于对照,多数转基因株系油酸亚油酸比值平均数也显著高于对照。

关键词:花生;*FAD2* 基因;RNA 干扰;遗传转化;油酸;亚油酸

中图分类号:S565.203 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-9084(2008)03-0290-04

RNAi transformation of *Ah FAD2* gene and fatty acid analysis of transgenic seeds

HUANG Bing-yan,ZHANG Xin-you*,MIAO Li-juan,YAN Mei,
HAI Yan,YI Ming-lin,XU Jing,CHEN Zhan-kuan

(Henan Provincial Key Laboratory for Crop Improvement, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: An RNAi vector for peanut *FAD2* gene can be activated by its own promoter and containing its inverted repeat coding sequence fragments spliced by an intron. This gene was transformed into leaflet from germinating peanut seeds by the mediation of *Agrobacterium* in order to manipulate the content of oleic acid and linoleic acid in the seeds specifically. A total of 105 plants tolerant to PPT were regenerated from two recipient cultivars, in which 32 plants were confirmed by PCR to be transgenic plants. Every seed produced by the transgenic plants was tested for its oleic and linoleic content by Infratec 1255 Food&Feed Analyzer. It was shown that the variation of oleic/linoleic ratio (O/L) within transgenic plants were greater than that within the wild type. T-test revealed that the average O/L values of seeds in most transgenic lines were significantly higher than that of the wild type, implying the efficiency of RNAi vector.

Key words: *Arachis hypogaea* L.; *FAD2* gene; RNA interference; Genetic transformation; Oleic acid; Linoleic acid

花生作为重要的油料作物,其籽粒脂肪酸组成对花生的营养品质和贮藏品质均有很大影响。花生油中的脂肪酸主要由油酸、亚油酸和棕榈酸等组成。油酸是一种单不饱和脂肪酸,能降低有害胆固醇(低密度胆固醇,LDL)含量,维持有益胆固醇(高密度胆固醇,HDL)的水平;油酸比亚油酸、亚麻酸等多不饱和脂肪酸的稳定性高,高油酸的食用油更耐贮藏,而且高温烹调不易氧化变质,因此,高油酸花生不仅有益于人们的身体健康,也可有效延长花生产品的保质期和货架期。选育高油酸花生或高油/亚比花生新品种是花生重要育种目标之一,而目前我国大面积推广的花生品种大多油酸含量或油酸与亚油酸比值(简称油/亚比)不高,一般品种在1.0~1.5之间。已知 *FAD2*(Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶)是脂肪酸生物合成途径中催化油酸在第12碳位脱氢形成双键向亚油酸转变的关键酶^[1~3],Stoujesdi 等利用 RNA 干扰技术抑制 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶基因的表达已获得高油酸拟南芥和棉花^[4,5]。本研究的目的就是对已经构建的具有内含子间隔的花生 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶(*FAD2*)基因编码序列反向重复片段的 RNA 干扰载体,实施农杆菌介导的遗传转化,以期特异调控花生籽粒中油酸、亚油酸含量,获得高油酸含量的花生新种质。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 花生品种(*Arachis hypogaea* L.)豫花7号和远杂9102由河南省农业科学院经济作物研究所提供。

1.1.2 质粒和菌株 农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 LBA4404 为本实验室保存。表达载体为本实验室所构建 pCAMBIA3301—Afad12Ri^[6],启动子为花生 *FAD2* 基因自身启动子,含有农杆菌筛选标记基因卡那霉素抗性基因和植物筛选标记 PPT 抗性基因 bar。

1.1.3 酶和试剂 Taq 酶购自大连宝生物工程公司。利福平(Rifampicin)、链霉素、卡那霉素和羧苄青霉素购自上海生物工程公司。组织

培养试剂均为国产分析纯。

1.1.4 PCR 引物 引物序列 BarF: 5' - GTCTGCACCATCGTCAACCACTACATCG - 3', BarR: 5' - TCCAGCTGCCAGAAACCCACGTCAT - 3'; Terminator F: 5' - ATTCAAGTTTGTTAAC - CGTT - 3', Terminator R: 5' - TGTGAGTAGT - TCCCAGATAAG - 3'由大连宝生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 农杆菌侵染 将 -80℃ 保存的 LBA4404 置于含利福平 100 mg/L,链霉素 200 mg/L 和卡那霉素 100 mg/L 的 YEB(酵母提取物 1g/L + 胰蛋白冻 5 g/L + 蔗糖 5 g/L + 硫酸镁 0.98 g/L)液体培养基中,28℃ 振荡培养 2d 至对数生长期($OD_{600} = 0.6$)收集菌体,用 MS₀ 液体培养基洗涤两次,等体积重悬后用于转化。转化外植体为成熟种子萌发 4d 的胚小叶,切取上部 2/3 浸入用 MS₀ 液体培养基稀释的农杆菌菌液中,侵染 5min,取出用无菌滤纸吸去多余菌液,摆放在诱导培养基(添加羧苄青霉素 350mg/L),25℃ 共培养 3d,洗菌后将外植体转至分化培养基。

1.2.2 植株再生及选择 诱导、分化和生根培养基分别为:MS + 6 - BA 0.5mg/L + NAA 0.4mg/L + TDZ 0.3mg/L + AgNO₃ 2mg/L + PPT 0.2~0.5mg/L,MS + 6 - BA 0.4mg/L + NAA 0.1mg/L + AgNO₃ 2mg/L + PPT 0.25mg/L,1/2MS + NAA 0.8mg/L + AgNO₃ 2mg/L + PPT 0.25mg/L。外植体在诱导筛选培养基上生长 4 周左右,将有芽点外植体转至分化筛选培养基,3 周左右继代 1 次;继代 2 次后,将伸长的幼芽转至生根培养基,2 周左右形成不定根;炼苗 1 周后移栽至温室花盆中,1~2 周后移栽至网室田间。

1.2.3 花生基因组 DNA 提取 采用改良 CTAB 法^[7]提取花生植株上未展开幼叶的 DNA。

1.2.4 转基因植株 PCR 检测 PCR 反应体系为 25uL,其中模板 DNA 3uL(0.1~2μg),10

× buffer 2.5 uL, dNTP (各 2.5mmol/L) 2uL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5uL, 引物 (20mmol/L) 各 0.25uL, rTaq (5U/uL) 0.25uL, dH₂O 14.75uL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 2min; 94℃ 变性 30s, 50℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 60s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 转基因植株籽粒脂肪酸成分分析 采用 Infratec1255 型近红外食品/饲料分析仪 (FOSS Tecator 公司) 检测单粒籽仁的油酸、亚油酸相对含量。

2 结果与分析

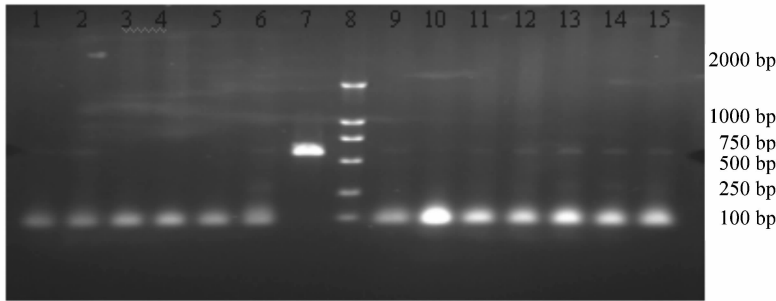
2.1 PPT 筛选浓度

设置了 PPT 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.5mg/L 5 个浓度梯度进行 PPT 筛选浓度选择。结果表明, 花生胚小叶对 PPT 浓度非常敏感,

不同浓度 PPT 培养基上培养 10 d 后, 在 0.2mg/L PPT 的培养基上外植体明显膨大, 保持绿色, 但在 0.3mg/L PPT 的培养基上胚小叶边缘逐渐变黄, 继代后不定芽的分化受到严重抑制。因此采用 0.25mg/L PPT 为基本选择浓度。

2.2 转基因植株 PCR 检测

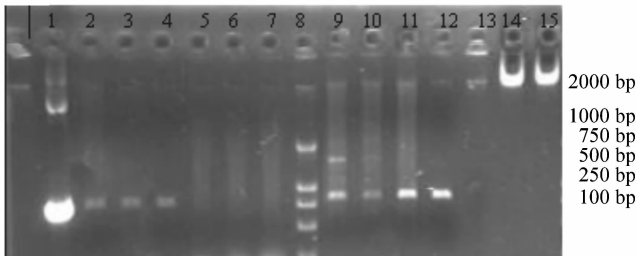
因本研究所构建载体中的 RNA 干扰结构和启动子均来自花生基因组, 不能用目的基因序列和启动子序列作 PCR 检测引物, 所以设计了 Bar 和 Terminator 上各一对引物进行转基因检测, 前者预期扩增片段 550bp, 后者预期扩增片段 780bp (图 1, 图 2)。结果表明, 在获得的 105 株抗性再生植株中, 用两个引物均扩增出预期大小片段的有 32 株, 初步证实为所构建 RNA 干扰结构整合入花生基因组的转基因植株, 比例为 30.5%。



1,3~5, 10, wild type; 7, Plasmid control; 8, DL 2000Marker; 2,6,9,11~15 transgenic plants.

图 1 Bar 引物 PCR 检测转基因植株结果

Fig. 1 PCR result for transgenic plants by primer from Bar sequence



1,12,14,15, Plasmid control; 5,6,7,13, wild type;
8, DL 2000Marker; 2~4,9~11, transgenic plants.

图 2 Terminator 引物 PCR 检测转基因植株结果

Fig. 2 PCR result for transgenic plants by primer from terminator sequence

2.3 转基因植株籽粒的脂肪酸成分分析

对 32 株转基因植株所结种子进行了脂肪酸成分的测定, 部分籽粒油酸和亚油酸比值发

生了变化, 其中 11 个株系的 16 个籽粒油/亚比变化较大。总的变化趋势为籽粒间油亚比变异明显增大 (图 3, 图 4), 峰值和平均值均比对照

株系有所升高。

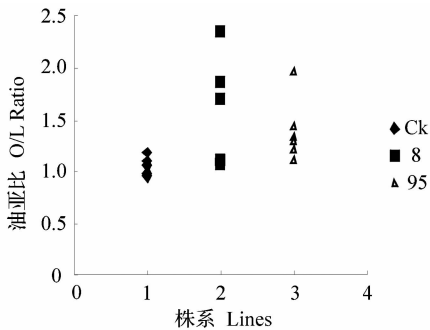


图3 豫花7号转基因株系 T₁ 籽粒 O/L 变化
Fig. 3 O/L variations of transgenic lines derived from Yuhua 7 compared with wild type

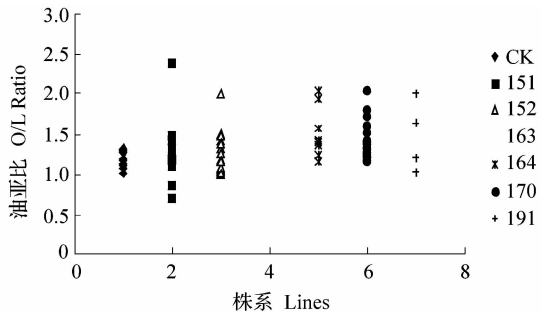


图4 远杂9102转基因株系 T₁ 籽粒 O/L 变化
Fig. 4 O/L variations of transgenic lines derived from Yuanza 9102 compared with wild type

进一步对部分转基因株系与对照油/亚比平均数进行了差异显著性测验(表1),结果显示,不少株系中籽粒油/亚比平均数仍然显著或极显著地高于对照株系,表明其中的部分转基因籽粒油/亚比提高较大或转基因表现显性或部分显性特性,因而对株系平均数产生显著影响。

表1 转基因株系与对照油亚比平均数的差异显著性测验
Table 1 Test of significance on average O/L value between transgenic lines and wild type

中 Varieties	豫花7号 Yuhua7			远杂9102 Yuanza 9102						
株系 lines	ck	8	95	ck	151	152	163	164	170	191
L 平均数 verage O/L	1.05	1.54 *	1.37 **	1.18	1.29	1.26	1.32	1.52 **	1.38 **	1.46 *
/L 变幅 age of O/L	0.97 ~ 1.19	1.07 ~ 2.36	1.12 ~ 1.97	1.01 ~ 1.32	0.71 ~ 2.39	1.01 ~ 2.01	1.00 ~ 2.25	1.16 ~ 2.04	1.15 ~ 2.03	1.02 ~ 1.46

*表示0.05水平差异显著; **表示0.01水平差异显著。* and ** refer to significance at 0.05 and 0.01 level respectively.

3 讨论

3.1 PPT 浓度与转基因检测

不同植物对转基因筛选剂的敏感程度不同,同时,相同筛选剂对不同植物的选择效果差异也很大^[8]。花生遗传转化视外植体的不同,多采用100~200 mg/L的卡那霉素为筛选剂^[9,10],也有采用20~50 mg/L潮霉素作抗性筛选的,以PPT为筛选剂在花生上的应用报道较少。本研究所采用的PPT筛选浓度大大低于油菜(15~20mg/L)等其它作物,与庄东红等^[11]试验结果一致,可能是花生胚小叶外植体对PPT特别敏感,推测与花生小叶蛋白质含量

较高有关,有待进一步验证。但PPT浓度过低,筛选效率也会降低,为严格甄别假阳性植株,本研究采用两对引物进行PCR检测,下一步将进行PCR阳性植株的Southern杂交检测,以进一步确定转基因整合情况及转基因拷贝数。

3.2 转基因后代脂肪酸成分遗传与变异

RNA干扰效果可在子代稳定遗传,拟南芥FAD2基因的hpRNA载体抑制基因表达的效果可稳定遗传5代^[4];另外,RNA干扰可通过杂交传递,Liu Qing等应用RNA干扰基因沉默方法抑制棉花籽粒中 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶基因FAD2-1的表达,使棉籽油中油酸的含量从正

常的 15% 升高到 77% ,用同样的技术抑制 Δ^9 脂肪酸去饱和酶基因 FAD1 的表达,将棉籽中的硬脂酸含量由 2% ~ 3% 提高到 40% ,用高油酸的棉花与高硬脂酸的棉花杂交,可获得两基因同时受到抑制的株系^[5]。本研究检测了 T₁ 籽粒的油酸和亚油酸相对含量,转基因株系的油/亚比与对照株系相比产生了明显的变异,总的变异趋势为籽粒间油/亚比的差异增大,油亚比平均值显著提高,近 20 个籽粒的油亚比大于 2,其后代遗传稳定性及转基因分离规律有待进一步分析,可望培育出能够稳定遗传的高油酸或高 O/L 花生新品种或新种质。

参考文献:

- [1] Lopez Y, Nadaf H L, Smith O D, et al. Isolation and characterization of the delta - 12 fatty acid desaturase in peanut (*Arachis hypogaea* L.) and search for polymorphism for the high oleate trait in spanish market - type lines[J]. Theor Appl Genet, 2000, 101:1 131 - 1 138.
- [2] Jung S, Swift D, Sengoku E, et al. The high oleate trait in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) I. Isolation and characterization of two genes encoding microsomal oleoyl - PC desaturases[J]. Mol Gen Genet, 2000, 263(5):796 - 805.
- [3] Jung S, Powell G, Moore K, et al. The high oleate trait in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) II. Molecular basis and genetics of the trait[J]. Mol Gen Genet. 2000, 263(5):806 - 811.
- [4] Stoujesdijk P A, Singh S P, Liu Q, et al. hpRNA mediated targeting of the Arabidopsis FAD2 gene gives highly efficient and stable silencing[J]. Plant Physiology, 2002, 129:1 723 - 1 731.
- [5] Liu Q, Singh S P, Green A G. High - stearic and high - oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA - Mediated post - transcriptional gene silencing[J]. Plant Physiol, 2002, 129(4):1 732 - 1 743.
- [6] 陈占宽, 张新友, 苗利娟, 等. 花生 Δ^{12} - 脂肪酸去饱和酶基因 RNAi 表达载体的构建[J]. 华北农学报, 2006, 21(4):9 - 12.
- [7] 奥斯伯 F, 金斯顿 R E, 赛德曼 J G, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社, 1998.
- [8] Sharma K K. An effieient method for the production of transgenic plants (*Arachis hypogaea* L.) through *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation[J]. Plnat Science, 2000, 159(1):7 - 19.
- [9] 方小平, 许泽永, 张宗义, 等. 花生小叶外植体植株再生及农杆菌介导的基因遗传转化[J]. 中国油料, 1996, 18(4):52 - 56.
- [10] 单世华, 李春娟, 刘思衡, 等. 以农杆菌为介导花生遗传转化研究[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(1):9 - 12.
- [11] 庄东红, 邹湘辉, 周 敏, 等. 农杆菌介导的花生遗传转化研究[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(4):47 - 50.