

应用农杆菌介导法进行菊花的遗传转化

龚学臣^{1,2}, 季 静¹, 王 罡¹, 抗艳红², 任永霞²

(1. 天津大学农业与生物工程学院, 天津 300072; 2. 河北北方学院南校区, 张家口 075131)

中图分类号: S682.1 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2005)02-0066-02

菊花(*Dendranthemagrandiflorum*)是菊科菊花属的多年生宿根草本植物,是我国传统名花和世界最主要的观赏花卉之一。我国虽然有菊花品种3 000多个,但缺乏一些名贵品种,不能满足生产和市场的需要。传统的育种方法虽然取得了一些成果,但由于受到物种自身基因的限制(如远缘杂交不杂交亲和性等),不可能引入需要的任何基因。植物基因工程的发展为菊花育种提供了一条新的途径,可以定向地导入目的基因,来改变其花色、花型等性状。

Gutterson等(1994)通过农杆菌介导转化的方法将一个从菊花中分离到的CHS(chalcone synthase)基因,以正义和反义方向分别转入粉花菊花品种'Moneymaker'中,获得了开白色或浅粉色花的植株^[1]。Mitouchkina也获得相似的结果,菊花品种'Parliament'被以反义方向转入源自金鱼草中获得的CHS基因,获得了颜色变浅的转基因系^[2,3]。

本实验以菊花愈伤组织为受体,以类胡萝卜素合成酶基因PSY为目的基因,通过农杆菌介导进行菊花的遗传转化,将PSY基因转入菊花,获得能够改变花色的转化植株,为花卉基因工程研究提供切实可行的试验方法,也为花卉育种提供种质资源。

1 材料与方法

1.1 植物材料、质粒和菌株

菊花品种菊花44、菊花21、菊花20由季静教授提供,利用这些菊花品种的叶片经诱导产生的愈伤组织为遗传转化的外植体。

根癌农杆菌EHA101由季静提供^[4],质粒pEbisPSYHyg上构建有目的基因PSY(八氢番茄红素合成酶基因)和植物抗性筛选标记潮霉素磷酸转移酶基因HPT。

菊花叶片愈伤诱导、分化、生根培养基为MS附加不同浓度的IAA、6-BA和KT。

1.2 工程菌的制备

在超净工作台上,挑取单菌落接种于含筛选抗生素(30 mg/L Km, 100 mg/L(毫克/升) Spec)的液体YEB培养基中,置于摇床上,28℃、160 rpm振荡培养24 h~36 h(小时)。当

OD₆₀₀值约为0.6~0.8时,取活化的菌液于4℃、4 000 rpm离心10 min(分钟),将菌体沉淀物用1/5MS液体培养基重悬,即为工程菌。

1.3 抗性选择标记(Hyg)适宜浓度的确定

以菊花44、菊花20、菊花21三个品种的愈伤组织为外植体,分别接种到潮霉素浓度为0、10、20、25、30、35 mg/L(毫克/升)的愈伤诱导培养基上培养,每一个处理接种愈伤组织30~40块,各处理重复三次,2~3周后记录愈伤组织的褐化情况。

1.4 菊花遗传转化方法及步骤

试验采用农杆菌介导法,以菊花叶片诱导的愈伤组织为受体进行遗传转化。首先,将菊花的愈伤组织块浸入制备好的农杆菌菌液中,浸泡8 min~10 min(分钟)。第二步:用无菌滤纸吸去多余菌液,转入共培养基暗培养3 d(天)。第三步:将共培养后的愈伤组织块经无菌水漂洗后,再接种到脱菌筛选培养基(头孢霉素的浓度为300 mg/L~400 mg/L(毫克/升))上。20 d~30 d(天)后,将其转入分化培养基。第四步:等到分化苗长到2 cm~3 cm(厘米)高时,转入生根培养基。第五步:当根长到2 cm~3 cm(厘米)后,经2 d~3 d(天)的练苗,移栽到花盆中,在培养室或培养箱中生长,直至成活。第六步:检测。

1.5 分子检测

按照王关林的SDS方法提取植物基因组DNA^[5]。

PSY基因的PCR扩增引物I为:5'-GAA TTC ATG TCT ATT TGT ACG CTA TGG GTT GTT-3';引物II为:5'-GC GGC CGC TCA TGT TTG GGG TAT CAT AAA AGA-3'。

PCR反应程序为:94℃预变性2 min(分钟),后94℃变性1 min(分钟),56℃退火1 min(分钟),72℃延伸2 min(分钟)进行30个循环,再72℃延伸10 min(分钟),最后4℃保温。

PCR产物的检测:取5 μl~10 μl PCR扩增产物0.8%琼脂糖凝胶电泳,以λDNA/EcoRI+Hind III双酶切DNA分子为标准分子量,电泳结果在Bio-Rad凝胶成像系统下分析。

2 结果与分析

2.1 不同菊花品种抗性选择标记(Hyg)适宜浓度的确定

以不同菊花品种的愈伤组织为外植体,进行了不同潮霉素浓度的敏感性试验,试验结果见图1。对试验结果进行的方差分析见表。由表可以看出,三个品种对潮霉素的敏感性存在极显著差异。经多重比较可知,菊花20对潮霉素最敏感,菊花21次之,菊花44最弱。

由图1可以看出,三个品种在潮霉素浓度为25 mg/L(毫克/升)时,愈伤组织的褐化率都在95.9%以上,当浓度达到30 mg/L(毫克/升)时,都为100%。因此,确定菊花20的愈



第一作者简介:龚学臣,1963年1月生,作物遗传育种专业(植物基因工程研究方向)硕士,现为河北北方学院农业科学系教师,副教授,系副主任。从1986年参加工作至今,一直从事教学与科学研究工作。十几年来参加了国家“七五”、“八五”重点

攻关研究、自然科学基金等十多项科研项目,其中有9项获奖;参编书4部、副主编1部;在各种刊物上发表研究论文20余篇。

收稿日期:2004-10-08

伤组织潮霉素筛选浓度为 20 mg/L(毫克/升),菊花 21 和菊花 44 的筛选浓度为 25 mg/L(毫克/升)。

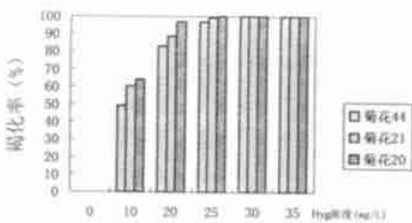


图1 潮霉素对菊花愈伤组织褐化率的影响
菊花愈伤组织褐化率的方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	F _{0.05}	F _{0.01}
重复	11.59	2	5.79	< 1	3.21	5.12
品种	254.20	2	127.10	14.299 **	3.21	5.12
潮霉素	53503.98	5	10700.80	1203.85 **	2.43	3.46
误差	391.11	44	8.89			

注:“ ** ”在 0.01 水平显著

2.2 抗性株的获得及 PCR 和 PCR—Southern 检测

本试验通过芽诱导、生根培养、潮霉素抗性筛选共获得了 20 株抗性再生植株,其中菊花 44 15 株,菊花 21 5 株。

从抗性植株和未转化对照植株叶片提取总 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,未转化植株为阴性对照,质粒含目的基因为阳性对照。电泳结果表明,转基因植株和质粒都在 1.3 kb 附近扩增出特异条带,而阴性对照植株却未扩增出相应的特异条带,由此初步证实,目的基因 PSY 已转入菊花细胞内。

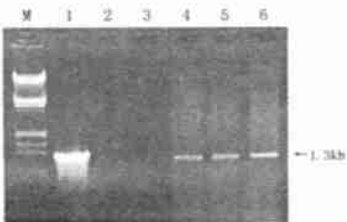


图2 菊花抗性苗的 PCR 检测

1: 阳性质粒 pEbisPSYHyg; 2: 未转化植株; 3: 水; 4~6: 转化植株

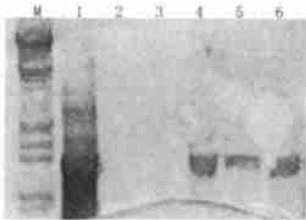


图3 菊花抗性苗的 PCR—Southern 检测

1: 阳性质粒 pEbisPSYHyg; 2: 未转化植株; 3: 水; 4~6: 转化植株

图2是根癌农杆菌介导的菊花遗传转化的 PCR 检测结果电泳图,其中菊花 44 2 株,PCR 阳性率为 13.3%;菊花 21 1 株,PCR 阳性率为 20%。利用 DIG 标记对转化植株进行的 PCR—Southern 杂交结果见图 3。结果表明 PCR 阳性植株

DNA 扩增片段与质粒 DNA 扩增特异片段处于同一位置,而阴性对照植株则没有杂交信号,说明被检测阳性植株扩增出的 PCR 条带确实为特异性的目的条带,证明 PSY 基因确实已整合进菊花抗性再生植株基因组中,但对于外源基因是否表达还需要进一步检测。

3 讨论

3.1 假转化体产生的原因

本研究以菊花愈伤组织为受体,以类胡萝卜素合成酶基因 PSY 为目的基因,通过农杆菌介导进行菊花的遗传转化,经抗性筛选获得了 20 株抗性植株,但 PCR 和 PCR—Southern 的阳性率只有 13.3%~20.0%,这表明在试验中产生了较多的假转化体。这可能是:由于受体细胞暂时表达外源选择性基因而具有了抗性;受体的某些表层细胞稳定表达了外源选择性基因,降低了其周围培养基中的筛选剂浓度,为其它一些非转化细胞提供了一道屏障,逃避了选择压力的影响继续分裂分化;筛选时间太迟或筛选剂浓度偏低,致使未转化细胞分化。

3.2 筛选策略的选择

采取什么样的筛选策略来运用所选定的筛选标记,以准确、有效地区分转化与非转化细胞,且干扰细胞的正常生长与植株再生是转化成功与否的重要环节之一。本研究发现,筛选压力前高后低、或始终按外植体致死压力筛选,外植体表现褐化严重,分化、再生困难,几乎得不到成活的植株;若降低筛选压力,则芽生长快,非转化体增多。在菊花愈伤组织抗性筛选时还发现,抗性芽不但能从绿色的愈伤组织上长出芽,而且会从褐化非常严重,看上去死亡的愈伤组织中长出,而这些芽有可能发育成具有抗性的苗。这可能是由于转化首先是对细胞的转化,而不是组织。表现褐化的愈伤组织,是愈伤组织表层细胞死亡了,而少数抗性细胞仍还活着,只是被大量的褐化细胞包围而难于生长。一旦去掉筛选剂,这些抗性细胞便进行生长发育,进而分化成苗。如何确定一个更合适、有效地筛选策略有待进一步研究。

3.3 转基因菊花的前景

菊花是我国的传统名花,是人们非常喜欢的一种常见花卉。虽然我国已有较多菊花品种,但随着时代的进步,人们生活水平的提高,对观赏植物,尤其是对那些在色、香、味上标新立异的新品种的需求也会越来越多。通过转基因技术来改变花色,实践证明是一种行之有效的育种方法,可以得到特异的花色品种,而且转基因花卉基因工程有强大的发展潜力。

参考文献:

[1] Goutters N C, et al. Modification of flower color in florist's Chrysanthemum: production of a white-flowering variety through molecular genetics. *BIO/Technology*, 1994, 12: 268~271.
[2] Mitouchdina T Y, Tvanova E P, Taran S A, et al. Chalcone Synthase gene from *Antirrhinum majus* in antisense orientation successfully suppressed the petals pigmentation of chrysanthemum. *Acta Hort* 2000, 508: 215~217.
[3] 王春能, 张启翔, 高亦柯. 菊花转基因研究进展[J]. 河南林业科技, 2002, 22(2): 18~20.
[4] 季静, 王罡. 来自龙胆草(*Genitalutea*)的 5 个类胡萝卜素生物合成相关酶基因对类胡萝卜素生物合成量影响的分析[J]. 农业技术生物学报, 2002, 10(3): 62~63.
[5] 王关林, 方宏筠等. 植物基因工程原理与技术[J]. 科学出版社, 2002: 498~500.