

胡萝卜筛选标记选择及遗传转化

周玲艳¹, 秦华明²

(1. 仲恺农业技术学院生命科学学院, 广州 510225; 2. 暨南大学理工学院, 广州 510632)

摘要:以常用的筛选剂潮霉素(Hyg)、除草剂Basta和卡那霉素(Kan)对胡萝卜愈伤组织进行敏感性试验,结果表明:胡萝卜愈伤组织对潮霉素和除草剂Basta非常敏感,筛选浓度分别以8mg/L和2mg/L较为合适;卡那霉素合适的筛选浓度应为150mg/L。以带bar基因的质粒载体对胡萝卜愈伤组织进行遗传转化,获得抗性愈伤组织和再生植株。

关键词:愈伤组织; 筛选标记; 潮霉素; Basta; 卡那霉素

中图分类号:S631.2 **文献标识码:**B **文章编号:**1001—0009(2006)04—0024—03

利用植物来生产疫苗、抗体和药物蛋白已成为转基因植物研究热点,该转基因植物又被称为“分子药田”、“分子农业”(molecular farming)^[1]。利用植物作为蛋白质生产系统非常经济:植物可以大规模种植,而且产物便于贮运;植物具有完整的真核细胞表达系统;表达产物无毒性和副作用,安全可靠等^[2]。植物生物反应器还具有生产简单、成本较低、使用方便等优点^[3]。

胡萝卜营养丰富,富含维生素A,可以生吃,在世界范围内广泛栽培,因此是一种理想的植物生物反应器。胡萝卜的组织培养较早,培养体系较为成熟,但目前以胡萝卜作为受体材料进行遗传转化的研究报道较少,而胡萝卜作为生物反应器必将受到研究者的重视。在遗传转化中通常使用筛选标记基因来区别转化体和非转化体,GM旨在对不同筛选剂对胡萝卜愈伤组织筛选效果和筛选浓度进行相关研究,为胡萝卜愈伤组织遗传转化系统的成功建立铺垫基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

胡萝卜直根系诱导的愈伤组织。

1.2 载体和农杆菌

质粒载体携带bar基因;农杆菌菌株为LBA4404。

1.3 培养基

愈伤组织诱导和继代培养基: B5基本培养基+蔗糖3g/L+2,4-D 0.1mg/L+琼脂粉7g/L; 共培养培养基: B5基本培养基+蔗糖3g/L+葡萄糖3g/L+2,4-D 0.1mg/L+As100uM+琼脂粉7g/L; B5基本培养基+蔗糖3g/L+2,4-D 0.1mg/L+As100uM+琼脂粉7g/L; 筛选培养基: B5基本培养基+蔗糖3g/L+2,4-D 0.1mg/L+cefo250mg/L+carb250mg/L+Basta+琼脂粉7g/L; 分化培养基: MS基本培养基+蔗糖3g/L+琼脂粉7g/L。

1.4 方法

1.4.1 筛选剂对胡萝卜愈伤组织筛选浓度的确定 选取生长一致的愈伤组织接入加有一定浓度筛选剂的继代培养基中,3种筛选剂据其他植物品种的筛选浓度设几个浓度梯度, Basta 的浓度分别为0.0.5.1.0.2.0.5.0.10.20.30,

40mg/L; Hyg 的浓度分别为0.1.2.5.8.10.20.50.100mg/L; Kan 的浓度分别为0.20.50.100.150.200.500mg/L。每种筛选剂的各个浓度分别接3皿,每皿接入10块愈伤组织,25℃,暗培养,1周后连续观察愈伤组织的生长、褐化死亡情况。

1.4.2 胡萝卜愈伤组织的遗传转化 遗传转化的基本方法和操作过程参考周玲艳等^[4]。每个处理分别挑取100块愈伤组织用于浸染和共培养。

2 结果与分析

2.1 胡萝卜愈伤组织对除草剂 Basta 的敏感性情况

试验中,首先设置了10.20.30.40mg/L等4个浓度进行初选,10d左右,4种筛选浓度的培养基中的愈伤组织均出现褐化,且生长完全受到抑制,2周后全部褐化死亡。根据初选结果又设置了0.5.1.0.2.0.5.0.10mg/L等5个浓度梯度,在Basta浓度为0.5mg/L的培养基上,愈伤组织正常分裂生长,且愈伤组织颜色鲜艳,跟正常继代的愈伤组织没有太大区别;在Basta浓度为1.0mg/L的培养基上,有6块愈伤组织在2周后观察有新的愈伤组织长出,但3周后愈伤组织生长受到一定的抑制,其他的愈伤组织均出现褐化;在Basta浓度为2.0mg/L的培养基上,2周后观察,94%的愈伤组织出现严重褐化,有2块愈伤组织轻度褐化,但生长受到完全抑制。在Basta浓度为5.0mg/L和10mg/L的培养基上,2周后愈伤组织均出现褐化,因此,胡萝卜愈伤组织进行遗传转化时,Basta的筛选浓度以2mg/L较为合适。

表1 不同 Basta 浓度梯度对胡萝卜愈伤组织生长的影响

Basta 浓度	愈伤组织生长抑制或褐化率	愈伤组织生长状态
0	0	愈伤组织颜色鲜艳,浅黄色,正常生长增殖
0.5	0	愈伤组织颜色鲜艳,浅黄色,正常生长增殖
1.0	80%	愈伤组织颜色暗黄,生长受到一定的抑制
2.0	100%	愈伤组织褐化,生长完全抑制
5.0	100%	愈伤组织褐化,生长完全抑制
10	100%	愈伤组织褐化死亡,生长完全抑制
20	100%	愈伤组织褐化死亡,生长完全抑制
30	100%	愈伤组织褐化死亡,生长完全抑制
40	100%	愈伤组织褐化死亡,生长完全抑制

2.2 胡萝卜愈伤组织对潮霉素的敏感性情况

试验中,首先设置了10.20.50.100mg/L等4个浓度进

行初选,跟 Basta 筛选剂的情况一样,10d 左右,4 种筛选浓度的培养基中的愈伤组织均出现褐化,且生长完全受到抑制,2 周后愈伤组织全部褐化死亡。根据初选结果又设置了 1.0、2.0、5.0、8.0、10mg/L 等 5 个浓度梯度。在 Hyg 浓度为 1.0mg/L 的培养基上,90% 的愈伤组织正常生长增殖,但愈伤组织颜色暗淡,1 个月后生长停止,最后褐化死亡;在 Hyg 浓度为 2.0mg/L 和 5.0mg/L 的培养基上,愈伤组织分别只有 23% 和 53% 的愈伤组织的生长受到抑制,其他愈伤组织或多或少有一定的增殖,但 1 个月后,所有愈伤组织褐化死亡;而在 Hyg 浓度为 8.0mg/L 和 10.0mg/L 的培养基上,愈伤组织生长完全受到抑制或褐化死亡。因此,就胡萝卜愈伤组织的遗传转化而言,潮霉素的筛选浓度以 8mg/L 较为合适。

表 2 不同 Hyg 浓度梯度对胡萝卜愈伤组织生长的影响

Hyg 浓度	愈伤组织生长抑制或褐化率	愈伤组织生长状态
0	0	愈伤组织颜色鲜艳,浅黄色,正常生长增殖
1.0	10%	愈伤组织颜色稍暗,大多数愈伤正常增殖
2.0	23%	愈伤组织颜色稍暗,大多数愈伤正常增殖
5.0	53%	愈伤组织颜色稍暗,部分愈伤正常增殖
8.0	100%	愈伤组织褐化,生长受到抑制
10	100%	愈伤组织褐化死亡,生长完全抑制
20	100%	愈伤组织褐化死亡,生长完全抑制
50	100%	愈伤组织褐化死亡,生长完全抑制
100	100%	愈伤组织褐化死亡,生长完全抑制

2.3 胡萝卜愈伤组织对卡那霉素的敏感性情况

在胡萝卜愈伤组织对卡那霉素的敏感性试验中,分别设了 20、50、100、150、200、500mg/L 共 6 个浓度梯度。在 Kan 浓度为 20mg/L 的培养基上,愈伤组织颜色鲜艳,90% 的愈伤组织正常生长增殖,跟正常继代的愈伤组织区别不明显;在 Kan 浓度为 50mg/L 的培养基上,愈伤组织颜色跟继代的愈伤组织差不多,且大部分愈伤组织有一定的增殖;在 Kan 浓度为 100mg/L 的培养基上,愈伤组织颜色稍暗淡,愈伤组织的生长受到一定的抑制,有少部分愈伤组织在早期有一定的增殖;在 Kan 浓度为 150mg/L 和 200mg/L 的培养基上,愈伤组织颜色暗淡,愈伤组织的生长受到抑制;在 Kan 浓度为 500mg/L 的培养基上,愈伤组织颜色暗淡,生长完全受到抑制,最后褐化死亡。因此,卡那霉素的筛选浓度以 150mg/L 较为合适。

表 3 不同 Kan 浓度梯度对胡萝卜愈伤组织生长的影响

Kan 浓度	愈伤组织生长抑制或褐化率	愈伤组织生长状态
0	0	愈伤组织颜色鲜艳,浅黄色,正常生长增殖
20	10%	愈伤组织颜色鲜艳,大部分愈伤组织正常生长
50	30%	愈伤组织颜色较为鲜艳,大部分愈伤有增殖
100	80%	愈伤组织颜色略暗淡,愈伤生长受到一定抑制
150	100%	愈伤组织颜色暗淡,愈伤生长受到抑制
200	100%	愈伤组织颜色暗淡,愈伤生长受到抑制
500	100%	愈伤组织褐化,愈伤生长完全抑制

2.4 胡萝卜 Basta 抗性愈伤组织的获得

以携带 bar 基因的质粒借助农杆菌对胡萝卜直根系形成层来源的愈伤组织进行转化。试验中,采用了固体培养基和液体培养基两种不同继代方式的愈伤组织进行农杆菌浸染,而且在共感染和共培养时采用了高糖液和普通糖浓度两

种培养基。固体培养基上继代的愈伤组织使用普通糖浓度培养基未获得抗性愈伤组织,而使用高糖液培养基获得 2 块抗性愈伤组织;悬浮继代培养的愈伤组织使用普通糖浓度培养基同样未获得抗性愈伤组织,而使用高糖液培养基获得 12 块抗性愈伤组织。由此可见,高糖浓度的培养基可大大提高遗传转化频率;而液体悬浮培养有利于愈伤组织状态的改善,且多为几个或十几个细胞组成的小细胞团,有利于遗传转化。农杆菌的浸染对胡萝卜造成较大的伤害,在转入筛选培养基后 10d 左右一直没有增殖,但抗性愈伤组织不褐化,呈乳白色,在转入新鲜的筛选培养基继代培养后,一部分抗性愈伤组织褐化死亡,说明这一部分愈伤组织可能是暂时逃避的非抗性愈伤组织,还有一部分抗性愈伤组织长出颗粒性的新鲜愈伤组织。将新增殖的抗性愈伤组织转入分化培养基进行光照培养获得再生植株。

3 小结与讨论

在遗传转化的质粒载体中往往插入了标记基因,使转化体与非转化体容易区分开来,即在选择培养基中加入某种选择性试剂,产生一种选择性压力,致使非转化细胞不能生长,而转化细胞具有选择性标记基因,能表达其产物而对选择性试剂产生抗性,从而不受选择压力的影响而正常生长。

转化体的筛选是植物遗传转化的一个重要环节,成功的筛选主要取决于 3 个方面:适当的选择性标记基因和选择性试剂;适当的选择性试剂浓度;适当的选择时间^[5]。不同植物物种、品种及外植体类型,其适宜的选择性试剂种类和浓度不尽相同。合适的筛选压既可有效地抑制和杀死非转化细胞,而又不影响转化细胞的正常生长,通常在转化前做一些预试验,以初步确定选择性试剂的浓度。新霉素磷酸转移酶基因(Npt-Ⅱ)、潮霉素磷酸转移酶基因(hpt 基因)和除草剂抗性基因(bar 基因)是植物遗传转化中常用的几个筛选标记基因。

新霉素磷酸转移酶基因(Npt-Ⅱ)是植物遗传转化中最早、且最为广泛使用的选择性标记基因,该基因产物对氨基糖苷类抗生素卡那霉素和 G418 等具有抗性,使其磷酸化而失活。卡那霉素在不同植物中的筛选效果和筛选浓度有很大变化,很多草本植物和禾谷类植物培养细胞对卡那霉素具有天然的抗性。潮霉素磷酸转移酶(hpt)是另一种广泛使用的选择性标记,其表达产物通过酶促磷酸化作用而使潮霉素失活,从而产生抗性。该基因对一些草本植物的筛选也非常有效。bar 基因编码 PPT 乙酰转移酶(PAT),PAT 催化乙酰辅酶 A 的乙酰基转移到 PPT 的氨基上,形成乙酰 PPT 而使 PPT 失活,对广谱除草剂 Basta 的活性组分 PPT 及除草剂 Herbiace 的活性组分 biolaphos 均有抗性。bar 基因在遗传转化中被认为可能是最有前途的选择性标记基因。它的使用具有一定的优越性,可以产生具有农业用途的转基因植物,同时避免了任何不必要的选择标记基因的存在。本研究使用潮霉素、Basta 和卡那霉素对胡萝卜愈伤组织进行敏感性试验,发现胡萝卜愈伤组织对潮霉素和 Basta 非常敏感,筛选使用的相对浓度较低,而对卡那霉素的敏感性稍差,筛选浓度较高。

植物遗传转化的影响因素很多,包括植物种类、品种,受体的生理状态,培养基的基本成分,农杆菌菌液的浓度、浸染

的时间和共培养的时间等等,本试验中对胡萝卜愈伤组织遗传转化影响因素进行了初步的研究。胡萝卜愈伤组织对农杆菌的浸染非常敏感,浸染时间和共培养时间过长对愈伤组织的状态影响非常大,容易使愈伤组织褐化死亡。愈伤组织的继代方式对转化成功也有影响,在固体培养基上生长的愈伤组织或大块、或松散,愈伤组织状态不佳,不利于遗传转化,而液体悬浮培养多代的愈伤组织生长状态一致,大多由几个或十几个细胞组成的小细胞团,浅黄色,细胞分裂旺盛,以其作为遗传转化受体易取得较好的效果。梁雪莲等^[9]认为高糖溶液能提高农杆菌的转化效率,本试验采用共感染和共培养时采用高糖溶液同样取得了较好的结果。植物遗传转化的影响因素非常复杂,本人正在从多方面探索影响胡萝卜愈伤组织转化的因素,以期建立一个高效、稳定的胡萝卜遗传转化体系。

参考文献:

- [1] Fischer R, Emans N. Molecular farming of pharmaceutical proteins[J]. Transgenic Research, 2000, 9: 279-299.
- [2] 井鑫, 张兴国. 植物生物反应器研究进展[J]. 西南农业大学学报(社会科学版), 2004, 2(4): 109-112.
- [3] Streatfield SJ, Jilka JM, Hood EE, et al. Plant based vaccine: unique advantage[J]. Vaccine, 2001, 19(17-19): 2742-2748.
- [4] 周玲艳, 姜大刚, 吴豪, 等. 基于 TAC 载体的水稻遗传转化系统的建立[J]. 遗传学报, 2005, 32(5): 514-518.
- [5] 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.
- [6] 梁雪莲, 孙毅, 郭平毅, 等. 农杆菌介导转化小麦幼胚获得抗除草剂再生植株[J]. 植物生理与分子生物学报, 2003, 29(6): 501-506.

1 优良品种的选择

极早熟杂交一代新品种雪娃、抗重茬龙甜四号、耐贮藏运香玉。

2 栽培技术

选茬:以玉米、麦、糜茬为好,其次是豆茬,最后是菜茬。随着玉米、黄豆播前除草剂的大面积使用,除草剂对后茬作物的危害越来越大,在选茬时要给予高度重视。

2.1 覆膜移栽技术

种子消毒:用 50℃~55℃的温水浸种,开始浸种时注意搅拌,防止种子烫伤。或用 70%的甲基托布津 800 倍液浸种,在用药剂浸种 0.5h 后,要将种子洗净,再继续浸种催芽,浸种的时间 6~7h,催芽的温度 28℃~30℃。营养土的配置比例:大田土:腐熟的猪厩肥:腐熟马粪=7:2:1,配置 1M3 营养土加硫酸钾型三元复合肥 2.5kg,混合均匀,并用苗菌敌拌土,每小袋(5g)拌土 30kg,能有效防治苗期猝倒病的发生。培育壮苗:播种至出苗,适当高温 28~30℃,促进快速出苗;出苗至第一片真叶出现,适当降温 23~25℃,防止幼苗徒长,出现“高脚苗”。第一片真叶至四片真叶出现,适当升温 25~28℃,促进幼苗快速生长;定植前 7~10d 要逐渐降温“炼苗”,以适应大地的环境。在育苗时注意培根填土,促根保墒。定植时间:以当地晚霜已过为宜。黑龙江省覆膜移栽在 5 月 20 日左右。施肥:基肥每

667m² 施硫酸钾型三元复合肥(氮、磷、钾各 15%)25kg,腐熟鸡粪 3 000kg 沟施。生长过程中,叶面喷施 2~3 次 0.2%~0.3%的磷酸二氢钾,促进果实糖份的充分积累。整枝:4 叶定心,三蔓整枝,如营养过于旺盛,要在晴天“拦头”,调整营养生长和生殖生长的平衡,有促进结瓜和提高早熟性的作用。

2.2 小拱棚栽培技术

与覆膜移栽基本相同,只是定植时间比露地覆膜移栽一般早 10~15d。同时注意人工授粉。

2.3 大棚栽培技术

品种的选择原则:质优、抗病、不易脱柄(如采用吊蔓栽培)。吊蔓栽培:不仅能充分利用空间,改变叶片受光条件,还可提高种植密度,增加产量。定植时间:黑龙江省 4 月 15~20 日,株行距 45~50×75cm。施肥:基肥每 667m² 施硫酸钾型三元复合肥(氮、磷、钾各 15%)25kg,腐熟鸡粪 3 000

kg 施。生长过程中,追肥一次,每 667m² 追施硫酸钾 8~10kg,叶面喷施 2~3 次 0.2%~0.3%的磷酸二氢钾。合理整枝:4 叶定心,3 蔓整枝,子蔓、孙蔓均可结瓜,孙蔓结瓜后留 2 叶摘心。温度管理:午前增温,促进光合作用;午后放风降温,抑制养分消耗;上半夜增温,促进光和产物的输送,下半夜降夜温,减少养分的消耗。花期管理:揭膜引虫传粉;养蜂传粉;人工授粉,最佳时间早 8:00~10:00。控水管理:定植→缓苗前,控水,促进缓苗;果实膨大后→采收前,控水,增加果实的甜度,保持果实固有的风味。灌水管理:在子蔓伸长期,灌一次大水,促进子蔓快速生长。在果实有乒乓球大小时灌一次大水,促进果实快速膨大。CO₂ 气肥:施肥时间:上午 8:00~10:00,时间不可过长,否则会造成植株早衰。温度小于 13℃不得使用 CO₂ 气肥。采收:注意护秧,用剪刀剪果柄。打老叶:选晴天逐渐去掉老叶,增加光照和通风,利于后茬瓜的生长。

3 病虫害的防治

3.1 病害

猝倒病:瓜幼苗距地面 1cm 左右的地方变色、腐烂或干缩,子叶尚未萎蔫就全株倒伏。管理时增温、降温,延长光照时间。药剂防治:育苗时,用苗菌敌拌土,每 1 小袋(5g)拌土 30kg,发病后,可将苗菌敌粉末撒在发病植株周围。

枯萎病:叶从基部逐步发黄萎蔫,茎基部纵列,病茎纵切面上维管束变褐,根变褐腐烂。选用抗病品种;合理轮作;增施磷钾肥;药剂防治:枯萎灵 600~800 倍液或用 40% 瓜枯宁 600 倍液灌根或科生霉素 200~400 倍液灌根。

病毒病:叶片出现花叶、蕨叶或皱缩,节间缩短,坐瓜困难。防治:及早防治蚜虫,控制病毒病的发生。发病初期用 20% 病毒 A 800 倍液防治;发病较重用病毒威 800~1000 倍液或 2% 病可克 800~1000 倍叶面喷施。

白粉病:主要特征是叶片有一层白色粉状物。防治:用 15% 的粉锈宁 1500 倍液叶面喷施。

霜霉病:叶片沿叶脉有多角形病斑,湿度大时,叶背有黑色的霉状物。防治:发病初期用 75% 百菌清 600 倍液或用 77% 多宁可湿性粉剂 500 倍叶面喷施。

炭疽病:叶片、茎、果实有圆形凹陷褐色病斑,湿度大时,病斑上产生粉红色粘状物。防治:发病初期用 70% 代森锰锌可湿性粉剂 500 倍液或安美托 600 倍叶面喷施。

疫病:叶部发病初期有暗绿色水浸状圆形斑,湿度大时,成软腐状,干燥时病斑变褐,易破裂。防治:40% 乙磷铝 300~500 倍液(无公害药剂);40% 杀毒矾 600~800 倍液喷施。

3.2 虫害

金龟子:用敌百虫拌油茶面做毒饵,根据虫害的危害程度,每隔一定距离撒一小堆,防治效果很好。蚜虫:用菜虫立灭 1 000 倍液或 10% 的氯氰菊酯乳油 1 500 倍液喷洒。潜叶蝇:用苏阿维 1 000 倍液叶面喷施。

(黑龙江省克东县农业技术推广中心, 161800)

薄皮甜瓜优质高效栽培技术

朱继强