

丽格海棠高效再生体系的建立及对抗生素敏感性研究

徐美隆¹, 张怀渝^{1,2}, 唐宗祥²

(1. 四川农业大学原子能农业应用研究室 雅安 625014; 2. 四川农业大学植物遗传育种省级重点实验室, 雅安 625014)

摘 要:以丽格海棠叶片和叶柄为外植体, 通过离体培养分化成苗以及对卡那霉素和头孢霉素的敏感性实验, 建立了农杆菌介导的稳定、高效的基因转化受体系统。结果表明: 丽格海棠的最适生芽培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L+KT 0.1 mg/L, 不定芽的最适生根培养基为 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+NAA 0.15 mg/L; 75 mg/L 卡那霉素可以完全抑制叶柄的生芽, 100 mg/L 卡那霉素可以完全抑制叶片的生芽, 75 mg/L 卡那霉素完全抑制不定芽的生根, 头孢霉素浓度小于等于 250 mg/L 时对生芽和生根的影响不大。

关键词: 丽格海棠; 农杆菌介导; 卡那霉素; 头孢霉素; 再生体系

中图分类号: S 682.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2007)07—0175—04

丽格海棠(*Rieger Begonia*), 又称玫瑰海棠, 属秋海棠科秋海棠属的多年生草本花卉。因其花色艳丽、花型多样、花朵硕大、花期特长, 尤其是在春节开花, 深受市场的欢迎。但由于容易感病、花型种类少、栽培技术和栽培条件要求较高等因素的制约^[1], 其规模化生产实施的难度较大, 生产成本较高。因此丽格海棠的品种改良具有重要的应用价值。利用遗传转化进行花卉的品种改良是目前花卉品种改良的重要手段之一, 而农杆菌介导法以其转化频率高、转基因拷贝数低、导入片段确定

性强、能够转化大片段 DNA、操作简便、费用低廉等一系列优点^[2-8]而深受研究者的青睐。近年来, 丽格海棠的组织培养研究取得了一些进展^[9-11], 但基于基因转化的丽格海棠高频再生体系的建立却鲜有报道。研究以丽格海棠为试材, 研究了不经愈伤组织诱导, 直接由叶片和叶柄产生不定芽的再生体系, 探讨了组织培养过程中各种激素对比对叶片和叶柄生芽和小苗生根的影响, 以及卡那霉素(Kanamycin; Km)和头孢霉素(Cefotaxime; Cef)对丽格海棠生芽和生根的影响, 建立了丽格海棠的高效再生体系, 为丽格海棠的遗传转化改良奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

丽格海棠, 由成都星瑞园艺公司提供。

第一作者简介: 徐美隆(1979-), 男, 四川大竹人, 在读硕士, 主要从事花卉转基因及诱变育种, E-mail: xml1106007@163.com。

通讯作者: 张怀渝, E-mail: zhyu@sicau.edu.cn。

收稿日期: 2007—03—23

[8] Litvay J D, Johnson M A , Verma D C et al. inst paper chem.[D] . Tech paper 114 Appleton, WI. 1981.

Callus Induction and Culture of *Picea pungens* ‘*Glauca Globosa*’

SUN Jing-shuang¹, YU Hai², JIA Gui-xia¹

(1. Beijing Forestry University 100083; 2. Forestry Experimental Center of North China China Acedmy of Forestry)

Abstract: The results showed that: (1) Dormant buds, conifers and young stems of *Picea abies* ‘*Glauca Globosa*’ had the best effect sterilized by 0.1% mercuric chloride for 10 ~ 15min; (2) Callus from above three explants induced by 1/2LM +2, 4-D(0.5 ~ 3.0mg/L)+ 6-BA(1.0 ~ 2.0mg/L) and dormant buds had the 77.36 percent highest rate induction. (3) Callus induced from dormant buds differentiated little shoots in the medium 1/2LM+NAA(0.5)+6-BA(1.0)+IBA(0.1). Callus from the explants of conifers and stems had some difficulties in multiplietion and died quickly.

Key words: *Picea pungens* ‘*Glauca Globosa*’ ; Callus; Induction; Differentiation

1.2 方法

1.2.1 外植体的处理 外植体采自生长几个月植株上的幼嫩叶片和叶柄。剪取幼嫩叶片及叶柄,用洗衣粉刷洗表面,自来水冲洗数小时,然后于 70%的酒精中浸30 s后,换用 0.1%的升汞消毒 5~6 min,无菌水冲洗 4~5 次,用灭菌滤纸吸干多余的水分,将叶片切割成 1 cm×1 cm左右大小的切块,叶柄切割成 1 cm 左右的切段,分别接入准备好的生芽培养基,使其叶片近轴面接触培养基,叶柄则是水平放入培养基。培养条件为:温度(24±2)℃,光照 14 h/d,光照强度 2 000 Lx 左右。

1.2.2 培养基配方的筛选 将消过毒的叶片和叶柄作为外植体,以 MS 培养基为基本培养基,生芽培养基采用三因素(6-BA,NAA,KT)3 水平激素配比设计(见表 1),每种配比下接种 8 个外植体,其中叶柄重复 3 次,叶片重复 4 次。每三周更换一次培养基,连续培养 40 d,每 7 d 观察一次,统计生芽率、有效芽数,筛选出最适生芽培养基。当芽长成 2 cm 左右时,在无菌条件下分别将其接种到含不同激素浓度配比的生根培养基上(见表 2)。每种培养基上接种 8 个不定芽,重复 4 次,连续培养 40 d,每 7 d 观察一次,统计生根率、平均根数、平均株高,筛选出最适生根培养基。

1.2.3 Km 的敏感性试验 将叶片和叶柄分别接种到含有 0、10、25、50、75、100 mg/L Km 的最适生芽培养基。每种浓度下接种叶片 32 个,叶柄 24 个。选取 2 cm 左右

的健康的不定芽分别接种在含有 0、10、25、50、75、100 mg/L Km 的最适生根培养基上。每种浓度下接种 24 个小苗。按 1.2.2 方法观察和统计数据。

1.2.4 Cef 的敏感性实验 将叶柄和不定芽分别接种到含有 0、100、250、500 mg/L Cef 的最适生芽和生根培养基上,每种浓度下分别接种 32 个叶柄和 24 个不定芽,按 1.2.2 的方法观察和统计数据。

1.2.5 数据分析 采用 DPS 统计分析软件包对观察数据进行多重比较。以统计数据的最大值为选择最佳条件的依据。

生芽率=(已生芽的外植体数/接种的外植体总数)×100%;

生根率=(已生根的不定芽数/不定芽总数)×100%。

2 结果与分析

2.1 丽格海棠生芽培养

将叶片和叶柄接种在含不同激素浓度配比下的生芽培养基中培养 40 d,统计不同处理生芽率和有效芽数,结果(见表 1)显示,叶柄在 20 d 左右开始有芽点出现,而叶片在 27 d 左右才开始出现芽点,随后长出大量不定芽。表 1 显示,各种培养基对叶片和叶柄的生芽率以及产生有效芽数有一定的差异,但均以处理 2 为最大,其生芽率显著高于处理 6、7、8、9,有效芽数也显著多于其他各处理,并且生长势最好。所以,处理 2 是丽格海棠的最适生芽培养基。

2.2 不定芽的生根

表 1 不同激素浓度组合对丽格海棠生芽的影响

处理	BA	NAA	KT	生芽率		平均有效芽数	
	/mg·L ⁻¹	/mg·L ⁻¹	/mg·L ⁻¹	叶柄	叶片/%	叶柄 %	叶片
1	1(0.5)	1(0.06)	1(0.15)	83.33 a	75.00 a	13.05 B	12.58 B
2	1	2(0.05)	2(0.10)	95.83 a	90.63 a	17.87 A	16.66 A
3	1	3(0.04)	3(0.05)	50.00 bc	43.75 b	6.17 E	9.24 C
4	2(0.25)	1	2	87.50 a	78.13 a	12.19 BC	12.12 B
5	2	2	3	79.17 a	81.25 a	10.35 CD	13.44 B
6	2	3	1	70.83 ab	43.75 b	10.18 D	5.80 D
7	3(0)	1	3	40.67 c	31.25 b	5.67 E	4.10 DE
8	3	2	1	0 d	25.00 b	0 F	3.38 E
9	3	3	2	50.00 c	46.88 b	6.08 E	6.20 D

注:同列中大写字母表示在 0.01 水平上显著,小写字母表示在 0.05 水平上显著,下同。

表 2 不同激素浓度组合对丽格海棠生根的影响

处理	基本培养基	IBA	NAA	生根率	平均根数	平均株高
		/mg·L ⁻¹	/mg·L ⁻¹	/40d		/cm
1	1(1/2MS)	1(0.20)	1(0.15)	100.0% a	14.4 A	3.9 a
2	1	2(0.15)	2(0.10)	100.0% a	10.8 CD	3.0 c
3	1	3(0.10)	3(0.05)	100.0% a	9.7 D	3.0 cd
4	2(MS)	1	2	93.8% a	11.7 BC	3.6 ab
5	2	2	3	87.5% ab	11.5 BC	3.3 bc
6	2	3	1	100.0% a	12.2 B	3.7 ab
7	3(2MS)	1	3	53.1% c	4.5 F	2.6 d
8	3	2	1	87.5% ab	11.7 BC	3.0 cd
9	3	3	2	71.9% b	7.1 E	2.1 e

40 d 后生根率、平均根数、平均株高的统计结果表

明(见表 2),随着时间的延长,生根率不断上升,处理 1、2、3、6 培养基上接种的不定芽生根率均为 100%,且与处理 4、5、8 的生根率差异不显著,只显著高于处理 7 和 9,但处理 1 的株高和平均每株的根数均为最大值,且显著高于其他所有处理。比较生根率、平均株高、平均根数 3 个指标,因此,处理 1 应为丽格海棠生根的最适配方。

2.3 卡那霉素对生芽和生根的影响

对接种在含有不同浓度卡那霉素的最适生芽培养基上的叶片和叶柄 40 d 后的生芽率统计,结果表明:叶片和叶柄的生芽都不同程度的受到卡那霉素的影响,而且随卡那霉素浓度的升高,抑制的程度加大(表 3)。当

卡那霉素浓度为 10 mg/ L 时,叶柄生芽被抑制达到显著水平,而能够显著抑制叶片生芽的卡那霉素浓度则为 25 mg/ L。卡那霉素的半抑制剂量,叶柄在 10 ~ 25 mg/ L 之间,而叶片则在 25 ~ 50 mg/ L 之间。叶柄需要 75 mg/ L 达到完全抑制的效果,而叶片的全抑制剂量是 100 mg/ L。

对接种在含有不同浓度卡那霉素的最适生根培养基上的不定芽经过 40 d 培养后的生根率、平均根数和平均株高的统计,结果表明(表 3),卡那霉素对不定芽生根和芽的生长有明显的抑制作用。当最适生根培养基中卡那霉素浓度为 10 mg/ L 时,不定芽生根和根的生长受到显著抑制,且随着卡那霉素浓度的增加,抑制作用增强;当卡那霉素浓度为 50 mg/ L 时,不定芽仍有 60.3% 生根,但平均根数和平均株高已显著下降;当卡那霉素浓度大于 50 mg/ L 时,不定芽生根被完全抑制,不定芽停止生长。当浓度为 100 mg/ L 时,不定芽完全死亡。

表 3 不同浓度 Km 对叶柄、叶片分化及不定芽生根的影响

浓度 /mg · L ⁻¹	生芽的影响		生根的影响		
	叶柄/ %	叶片/ %	生根率/ %	平均根数	平均株高/ cm
0	91.67 a	87.5 a	100.0 a	13.5 a	3.8 A
10	70.83 b	78.1 a	100.0 a	8.25 b	2.8 B
25	41.67 c	54.2 b	100.0 a	5.3 c	2.4 C
50	20.83 d	29.2 c	60.3 b	1.9 d	2.1 D
75	0 e	12.5 cd	0 c	0 c	2.1 D
100	0 e	0 d	0 c	0 c	2.0 D

2.4 头孢霉素对叶柄生芽、不定芽生根的影响

培养 40 d 后统计不同浓度头孢霉素条件下的生芽率、生根率、平均根数和平均株高,结果表明(表 4):头孢霉素对丽格海棠的叶柄生芽和不定芽生根都有不同程度的抑制作用,且随着头孢霉素浓度的增加,生芽和生根的抑制增强。当头孢霉素浓度为 250 mg/ L 时,只对株高表现抑制作用,使平均株高显著降低,而对叶柄生芽、不定芽生根没有多大影响;而当头孢霉素浓度增加到 500 mg/ L 时,叶柄生芽、不定芽生根都受到显著抑制,致使叶柄的生芽率、不定芽的生根率、平均根数分别降到 65.63%、87.5%和 10.67。由此可见,头孢霉素浓度不能大于 500 mg/ L,而浓度小于等于 100 mg/ L 时,对丽格海棠的生芽和生根没有影响,小于等于 250 mg/ L 时,对丽格海棠生芽和生根的影响很小。

表 4 不同浓度 Cef 对叶柄分化以及不定芽生根的影响

浓度 /mg · L ⁻¹	诱导芽的影响		诱导根的影响	
	叶柄生芽率/ %	生根率/ %	平均根数	平均株高/ cm
0	93.75 a	100.0 a	13.75 a	3.94 a
100	90.63 a	100.0 a	13.96 a	3.98 a
250	78.13 ab	100.0 a	12.92 a	3.38 b
500	65.63 b	87.5 a	10.67 b	3.20 b

3 讨论与结论

建立良好的受体再生系统是丽格海棠基因转化的关键技术环节,直接决定了转化的难易,转化再生频率的高低。在目前已建立的以丽格海棠叶片、叶柄、茎段等为外植体的再生体系中,由于品种的不同,其再生能力存在一定的差异^[10-11]。同时,这些再生体系大多是针对丽格海棠植株繁殖的需要而建立的快繁体系,并不是一个的适用于转基因研究高效的再生体系。研究通过对不同培养基以及卡那霉素和头孢霉素选择压的筛选,建立了一个适用于丽格海棠转基因的以叶柄和叶片为外植体的高效再生体系,其最适生芽培养基为 MS+0.5 mg/ L 6-BA+0.05 mg/ L NAA+0.1 mg/ L KT,生芽率可达 95%。不定芽的最适生根培养基为 1/2MS+0.2 mg/ L IBA +0.15 mg/ L NAA,生根率可达 100%,且小苗生长壮实,生长势好。叶柄较叶片的分化率高。利用这个再生体系,进行了初步的基因转化研究,其转基因植株正在鉴定中。

用于筛选转化体的抗生素种类与所用转化质粒中携带的标记基因有关,卡那霉素是植物遗传转化中最常用的选择性抗生素之一,但对多种植物组织有不良影响^[12-13]。研究表明卡那霉素对丽格海棠叶柄和叶片的再生都具有很强的抑制作用,且叶柄较叶片敏感。当 Km=50 mg/ L 时,叶柄的分化被完全抑制,而叶片的分化被完全抑制的剂量则是 Km=75 mg/ L。而且,用农杆菌浸泡丽格海棠的叶片和叶柄,后者较前者更容易脱菌,所以,试验认为以丽格海棠叶柄作为遗传转化的受体优于叶片。

用抗生素作为遗传转化的选择压,浓度的选择是一个及其重要的环节,有人认为应该采用比全抑制剂量更大的浓度对转化植株进行筛选,这样可以有效的避免一些假阳性植株,防止逃逸株的产生^[14];而另一种观点认为,高浓度的抗生素能迅速杀死植物组织细胞,而死细胞对周围细胞的生长有强烈的抑制作用,不利于转化细胞的生长,因此在转化时确定抗生素的浓度应该首先采用全抑制剂量,然后依次降低抗生素的浓度,这样既可以一定程度上的进行选择,对小苗的生长也没有很大的影响^[15-17]。研究的结果与后者的观点一致,前者能很好的防止假阳性的产生,但极大的影响了芽的分化和小苗的生长,并且得到的小苗不容易成活,这样即使得到转化苗,也很难使其成活。后者虽然可能得到一些假阳性苗,但对转化苗的生长影响不大,所得到的转化苗容易成活。即用 Km 作为丽格海棠遗传转化的选择压时,应在生芽培养基中加入 50 mg/ L 的 Km 进行选择,在以后的继代培养基中依次加 25 mg/ L、10 mg/ L 的 Km,并一直维持 10mg/ L 的 Km,以使 Km 维持在较低浓度进行

选择, 既能在一定程度上对转化植株进行选择, 又尽可能少的对转化植株造成伤害。

Cef 是农杆菌介导遗传转化中广泛使用的脱菌剂, 对大多数农杆菌菌株的脱菌效果好, 但对不同的植物以及同种植物的不同组织的影响不同^[18-19]。试验研究结果表明, Cef 对叶柄的生芽和不定苗的生根影响不大, 当 Cef=100 mg/L 时与对照 (Cef=0) 的差异不显著。并且, 我们在用 Cef 对农杆菌 EHA52 菌株进行脱菌的实验中 (数据未列出) 得到 100 mg/L 的 Cef 能完全抑制农杆菌 EHA52 菌株的生长, 因此, 在基于农杆菌介导丽格海棠的遗传转化时, 为了能尽可能的脱菌, 可以用 Cef=250 mg/L 进行脱菌, 以期彻底脱菌, 然后在继代培养中逐渐降低 Cef 的浓度, 直到 100 mg/L, 这样既可以很好的脱菌, 对芽的分化和根的诱导影响也不大。

参考文献

- [1] 王嘉祥. 丽格海棠栽培技术[J]. 特种经济动植物, 2004, 7(9): 31.
- [2] Hamilton C M, Frary A, Lewis C, et al. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 9975-9979.
- [3] Hamilton C M. A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA[J]. Gene, 1997, 200: 107-116.
- [4] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [5] Stoger E, Williams S, Keen D, et al. Molecular characteristics of transgenic wheat and the effect on transgene expression[J]. Transgenic Res, 1998, 7: 463-471.
- [6] Liu Y G, Shirano Y, Fukaki H, et al. Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 6535-6540.

Sci USA, 1999, 96: 6535-6540.

- [7] Yin Z, Wang G L. Evidence of multiple complex patterns of T-DNA integration into the rice genome[J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 461-470.
- [8] Labra M, Savini C, Bracale M, et al. Genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced by infecting calli with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Rep, 2001, 20: 325-330.
- [9] 文锦芬, 邓明华, 施卫省, 等. 丽格海棠离体培养植株再生关键技术的研究[J]. 昆明理工大学学报(理工版), 2006, 31(2): 111-113.
- [10] 韩超, 方正. 外植体和激素对丽格海棠组培不定芽分化的影响[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(3): 38-41.
- [11] 达克东, 张松, 高东升, 等. 丽格海棠叶片培养胚状体发生和植株再生[J]. 园艺学报, 2001, 28(2): 180-181.
- [12] 朱乾浩. 植物转化细胞研究进展[J]. 世界农业, 1996(3): 21-24.
- [13] Shackelford N J, Chlan C A. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Mol Biol Rep, 1996, 4(1): 50-57.
- [14] 张松, 达克东, 曹辰兴, 等. 抗生素对韭菜根尖培养植株再生的影响[J]. 核农学报, 2003, 17(2): 101-104.
- [15] Hnshi Y, Kondo M, Meri S, et al. Production of transgenic Lily plants by *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Plant Cell Rep, 2004, 22(6): 359-364.
- [16] 唐东芹, 钱虹妹, 唐克轩, 等. 根癌农杆菌介导半夏凝集素基因 pBIX-PTA1 对百合的转化[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2004, 22(2): 35-37.
- [17] 傅荣昭, 刘敏, 梁红健, 等. 通过农杆菌介导法获得菊花转基因植株[J]. 植物生理学报, 1998, 24(1): 72-76.
- [18] Msthas R J, Boyol L A. Cefotaxime stimulates callus growth embryogenesis and refeneration in hexaploid bread wheat[J]. Plant sci, 1986, 46: 217-223.
- [19] Okkel F T, Pederson M G. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics[J]. Acta Hort, 1988, 225: 199-207.

Establishment of Highly Efficient Regeneration System of *Rieger Begonia* and Study on the Sensitivity to Antibiotic in Vitro

XU Mei-Long¹, ZHANG Huai-yu^{1, 2}, TANG zong-xiang²

(1. Isotope Research Laboratory, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014; 2. State key Laboratory of Plant Genetic and Breeding, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014)

Abstract: It is important to establish highly efficient regeneration system in the course of genetic transformation. The effects of hormones, Kanamycin and Cefotaxime in different concentration on shooting and rooting in *Rieger Begonia* in vitro were research in this study. The results showed that the optimized medium for shooting is MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L+KT 0.1 mg/L and the optimized medium for rooting is 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+NAA 0.15 mg/L. Kanamycin at 75 mg/L and 100 mg/L in the medium gives effective inhibition to the regeneration of shoots from the leaf and petiole explants. In addition, Kanamycin at 75 mg/L in the medium shows obvious inhibition to the regeneration of roots from the shoots. Cefotaxime at 250 mg/L in the medium hardly shows inhibition to the refeneration of shoots from the petiole and roots from the shoots.

Key words: *Rieger Begonia*; *Agrobacterium*-mediated; Kanamycin; Cefotaxime; Regeneration system