

根癌农杆菌介导的矮牵牛遗传转化体系研究

孙艳香, 李美茹, 张晓月

(廊坊师范学院生物系 河北 廊坊 065000)

摘要: 研究建立了根癌农杆菌介导的矮牵牛遗传转化体系。结果表明最佳的不定芽诱导分化和继代培养基为: MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L; 选择培养基中 30 mg/L 卡那霉素和 300 mg/L 的头孢霉素是适宜的抗生素使用浓度; 侵染过程中 0.05 MPa 负压处理 5 min 和共培养过程中添加 20 mg/L 的乙酰 苯酮均可提高转化效率。卡那霉素抗性植株经 2 次选择继代培养后 PCR 检测全部为阳性。对部分 PCR 阳性植株进行 PCR-Southern 杂交, 证实外源基因已整合进入矮牵牛基因组中。

关键词: 矮牵牛; 遗传转化; 再生体系

中图分类号: S 682 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001 - 0009(2007)08 - 0177 - 03

矮牵牛(*Petunia hybrida* Vilm), 又名灵芝牡丹、碧冬茄等, 原产美洲, 属茄科矮牵牛属多年生草本植物。其花大且色彩丰富艳丽, 为装饰花坛、街道的理想花卉, 广泛应用于城市和园林绿化。利用遗传工程进行矮牵牛育种的主要育种方向是花色育种、抗逆育种和抗病育种^[1]。近年来, 对矮牵牛进行的遗传转化研究出现另一热点, 即利用矮牵牛进行遗传学和基因功能组学研究等^[2]。有关矮牵牛遗传转化研究已有报道^[3]。但由于再生和遗传转化效率的基因型依赖性强, 故不同作者得出的结论不尽相同^[3-5]。因此, 对某一特定品种仍有必要在前人的基础上对各实验环节进行优化。“交响曲”系列是我国近几年较为广泛栽培的大花矮牵牛。有关该系列的遗传转化研究尚未见报道。现以该系列中的红花品种为材料, 旨在探索一套适宜的遗传转化体系, 为利用遗传工程手段进行矮牵牛的遗传改良和功能基因研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料、质粒和菌株

植物材料交响曲系列红色大花品种由廊坊市绿化工程公司提供。取健康盆栽植株的幼嫩叶片用按常规

方法进行表面消毒后, 切成 0.5 cm² 大小的小块儿, 植入不定芽诱导分化培养基中, 于 23 ~ 25 °C、每天光照 16 h、光强 30 μmol · m⁻² · s⁻¹ 条件下培养建立无性克隆系。

农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株为 EHA105, 内含有卸甲 pTiBo542 和 pGNG 质粒, 由本研究室保存^[6]。pGNG 上含有 CaMV 35S 启动子调控下的卡那霉素 (npt II) 和大豆液泡膜 Na⁺/H⁺ 反向转运蛋白基因 (GmNHX1), 终止子均为 CaMV 35S 终止子。

1.2 农杆菌介导的遗传转化体系的建立

1.2.1 激素配比试验 培养基中激素浓度对愈伤组织诱导和不定芽的分化至关重要。为了有效促进愈伤组织的诱导与不定芽的分化, 以 MS 为基本培养基, 在不定芽诱导分化培养基中添加不同浓度的 6-BA 和 NAA, 培养 40 d 后比较不定芽增殖系数 (即每个外植体上分化形成不定芽的数目) 以及生长状态。

1.2.2 抗生素敏感性试验 在最佳的不定芽诱导分化培养基中添加不同浓度的卡那霉素 (Kan) (0、10、20、30、40、50 mg/L), 或不同浓度的头孢霉素 (Cef) (0、100、200、300、400、500 mg/L), 接种外植体, 观察在培养过程中愈伤组织出现的时间、出愈率 (%) (100 × 产生愈伤组织的外植体/接种外植体数), 40 d 后观察不定芽分化生长情况, 确定合适的抗生素使用浓度。

1.2.3 矮牵牛叶盘法的遗传转化 按常规方法^[7] 制备侵染用农杆菌菌液, 菌液的 OD₆₀₀ 为 0.5。侵染用外植体为矮牵牛试管苗叶盘。预培养培养基: MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+3%蔗糖+0.8%琼脂, pH5.8; 预培养时间为 2 d。侵染方法: 将经预培养的外植体放入上述菌液中轻摇 30 min, 或 0.05 MPa 负压处理不同时间后轻摇 30 min。共培养: 共培养培养基为添加或不添加乙酰丁香酮 (AS) 的 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+3%蔗糖+0.8%琼脂 pH5.8 共培养时间 3 d。



第一作者简介: 孙艳香 (1970-), 女, 博士, 副教授, 毕业于南开大学, 现任教于廊坊师范学院生物系, 从事遗传学和分子生物学教学及科研工作, 先后参加河北省“九五”重大科技攻关、天津市自然科学基金等省级项目 4 项, 发表 SCI 收录论文 1 篇, 核心期刊论文 10 余篇, 目前主持厅局级项目 1 项, 廊坊师范学院博士专项基金 1 项, 参加天津市科技攻关项目 1 项。E-mail: yx_sun70@yahoo.com.cn。

基金项目: 廊坊师范学院博士专项基金资助项目 (LSZR200603)。

收稿日期: 2007 - 03 - 23

选择培养基: MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+3%蔗糖+0.8%琼脂+Kan 30 mg/L+Cef 300 mg/L。
选择方法: 为了彻底消除假阳性转化子, 当初次在选择培养基中产生的不定芽高度大于 2 cm 时, 按每一不定芽为一个株系进行编号, 然后再次取叶盘进行选择继代培养。当再次在选择培养基中进行培养时, 部分株系则不再分化不定芽, 为假阳性 Kan 抗性株系; 其余株系则再次分化出不定芽。统计 2 次选择培养时分化出不定芽的株系数, 计算转化率。转化率(%)=100×(2 次选择培养时分化出不定芽的株系数/侵染的外植体数)。当 2 次选择培养过程中长出的具 Kan 抗性的不定芽长至 3 cm 时, 切下转入无激素 MS 培养基中诱导生根。20 d 后, 将根长超过 5 cm 的植株依常规方法进行练苗和移栽。

1.2.4 Kan 抗性植株的分子检测 抗性植株选择继代 2 次后, 取其部分叶片转接入无任何抗生素的 MS 分化培养基中以确定植株中是否仍带有农杆菌。对于已确定的无菌抗性植株按照王关林的 SDS 方法^[7] 提取植物基因组 DNA。GmNHX1 基因的 PCR 反应程序为: 94℃预变性 4 min, 94℃变性 30 s, 62℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 30 个循环; 72℃延伸 10 min。由大肠杆菌 DH5α 中提取 pGNG 质粒, PCR 扩增 GmNHX1, 纯化扩增产物, 以此纯化产物为模板, ³²P 随机引物标记法制备杂交探针, 对部分 PCR 阳性植株的扩增产物进行 PCR-Southern 杂交鉴定。

2 结果与分析

2.1 不同激素比对不定芽诱导和分化的影响

表 1 不同激素比对不定芽诱导和分化的影响

序号	激素配比/mg·L ⁻¹		外植体数	不定芽增殖系数	不定芽生长状态
	6-BA	NAA			
1	1.5	0.1	48	6	淡绿色, 生长较慢 苗纤弱
2	1.5	0.2	52	12	绿色, 生长较快 苗壮
3	1.5	0.5	45	16	绿色, 生长快, 畸形苗较多
4	3.0	0.1	43	12	玻璃化苗和畸形苗多, 纤弱 生长快
5	3.0	0.2	52	15	玻璃化苗和畸形苗多, 纤弱 生长快
6	3.0	0.5	55	20	玻璃化苗和畸形苗多, 纤弱 生长快

将外植体接种于不定芽诱导与分化培养基中, 5 d 左右开始膨大、弓起或卷起, 10 d 左右在切口处形成愈伤组织, 随培养时间的延长, 愈伤组织逐渐增多直至整个外植体完全失去接种时的状态。16 d 左右时愈伤组织或外植体表面开始有绿色芽点发生, 并开始出现丛生芽的分化。40 d 时观察, 在添加不同激素的培养基中, 丛生芽中不定芽增殖系数及生长状态差异较大。如表 1 所示, 6-BA 1.5 mg/L、NAA 0.2 mg/L 的激素配比诱导不定芽的增殖系数较高, 且不定芽的生长质量好。可见 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的培养基成分是矮牵牛不定芽诱导和分化的最适培养基。取不定芽的叶片为外植体在成分相同的新鲜培养基中可进行不定芽的继代培养。

2.2 Kan 和 Cef 对不定芽诱导和分化的影响

Kan 为双子叶植物遗传转化时常用的选择标记用抗生素, 其对植株再生有很大的抑制作用^[7], 因此, 使用浓度过高会降低正常的转化效率; 而过小则会产生大量的假转化植株, 所以确立适宜的使用浓度是遗传转化体系建立过程中的重要步骤。试验结果(表略)证明, 矮牵牛对 Kan 的敏感性较强。当 Kan 浓度为 10 mg/L 时虽有愈伤组织的形成和不定芽的分化, 但不定芽的增殖系数下降, 颜色变淡为黄绿色; 当 Kan 浓度为 20 mg/L 时, 外植体至培养 22 d 才开始出现愈伤组织的形成, 未出现不定芽的分化; 当 Kan 浓度为 30 mg/L 时已完全抑制了愈伤组织的形成和不定芽的分化, 外植体逐渐白化死亡。因此, 选择 Kan 浓度为 30 mg/L 作为不定芽诱导与分化的致死质量浓度。

Cef 是植物遗传转化中常用的一种抑菌剂, 其使用浓度以完全抑制农杆菌的生长而不影响外植体的分化为宜^[7]。已有的研究^[8]表明当培养基中 Cef 浓度为 300 mg/L 时即可完全抑制农杆菌菌株 EHA 105 的生长。从试验结果分析(表略), 当培养基中 Cef 浓度大于 300 mg/L 时, 对矮牵牛不定芽的分化具有抑制作用; 而浓度为 300 mg/L 时则与对照无明显差异, 不影响其分化, 因此, 确定 Cef 300 mg/L 为抑菌剂适宜的使用浓度。

2.3 负压处理对矮牵牛转化率的影响

已有研究^[7,8]表明, 适当的负压处理可提高植物的转化率。试验观察侵染过程中 -0.05 MPa 压力下分别处理 0、5、10、15 min 条件下的转化率, 结果(图 1)表明 5 min 负压处理矮牵牛的转化率最高, 为 3.3%(300 个侵染外植体, 得到 10 株 Kan 抗性植株; 即 10/300); 10 min 处理次之为 1.8%(6/340); 对照为 1.7%(7/420); 15 min 处理最少为 1.0%(3/310)。5 min 负压处理的转化率比对照提高了 94%。

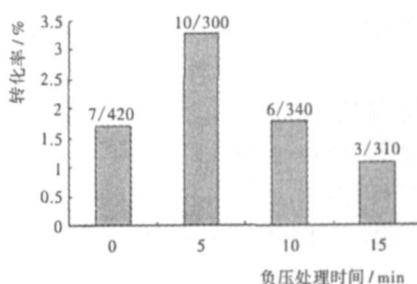


图 1 负压处理对矮牵牛转化率的影响

2.4 AS 对矮牵牛遗传转化率的影响

大量试验显示, 在转化过程中添加乙酰丁香酮(AS)等酚类物质可显著提高植物的遗传转化效率^[7,8]。在共培养培养基中添加不同浓度的 AS 发现, 添加低浓度的 AS 可提高矮牵牛的转化率, 其中 20 mg/L 的 AS 对遗传转化率的提高效果最显著(图 2), 当 AS 浓度超过 40 mg/L 时转化率下降。因此, 在共培养阶段添加 20 mg/L 的 AS 即可。

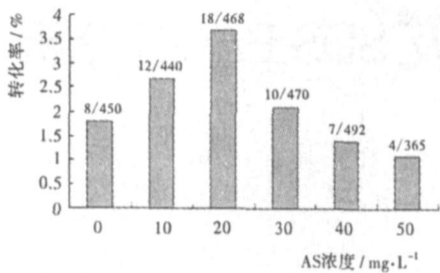


图2 AS 处理对矮牵牛花的影响

2.5 Kan 抗性植株的 PCR 和 PCR-Southern 检测

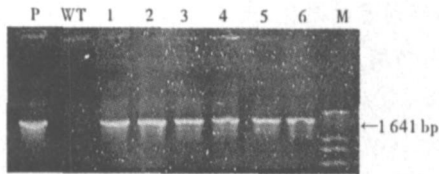


图3 卡那霉素抗性植株的 PCR 检测

注: 1~6: 卡那霉素抗性植株; P: 以 pGNG 质粒为模板的正对照; WT: 未转化植株; M: DL 2000 marker.

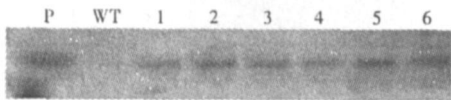


图4 卡那霉素抗性植株的 PCR-Southern 检测

注: 1~6: 卡那霉素抗性植株; P: 以 pGNG 质粒为模板的正对照; WT: 未转化植株; M: DL 2000 marker.

经 2 次选择再生培养获得的抗性株系在无激素 MS 培养基中均可长出健壮根系。确定这些株系不再带有农杆菌后, 取其部分叶片进行 PCR 检测, 结果显示在所有抗性株系中都能检测到 GmNHX1 目的片段(图 3), 表明所有的 Kan 抗性株系都为转基因株系, 将部分转化植株的 GmNHX1 基因扩增产物稀释 1 000 倍后进行 PCR-Southern 杂交以确定扩增产物的真实性, 结果(图 4)显示所有转基因株系均出现了与正对照相同的杂交信号, 而未转基因的野生型对照未出现杂交信号, 说明 PCR 产物真实可靠, GmNHX1 基因确已整合进入这些转基因植株的基因组中。

综上所述, 在比较不同激素组合对矮牵牛不定芽增殖系数影响的基础上建立了大花矮牵牛交响曲系列红色品种的再生体系。体系中以 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基成分作为不定芽诱导分化和继代培养基。与其它文献^[3-5] 报道的培养基相比, 在此培养基中可同时完成愈伤组织的诱导和不定芽的分化, 大大简化了试验过程, 缩短了矮牵牛再生的周期, 有助于加快外源基因的遗传转化。

此外还研究了矮牵牛遗传转化中常用的 2 种抗生素对其愈伤组织诱导和不定芽分化的影响, 以及负压处理和 AS 对遗传转化效率的影响。结果表明选择培养基中添加 30 mg/L Kan 和 300 mg/L Cef 为适宜的抗生素使用浓度; 浸染过程中 0.05MPa 负压处理 5 min 及在共培养过程中添加 20 mg/L 的乙酰丁香酮均有助于转化率的提高。得到的卡那霉素抗性植株经分子生物学检测全部带有外源 GmNHX1 基因, 表明 GmNHX1 基因已整合进矮牵牛基因组 DNA 中, 获得了转 GmNHX1 的矮牵牛植株。矮牵牛遗传转化体系的建立和大量转 GmNHX1 基因矮牵牛的获得, 为利用基因工程手段进行矮牵牛抗逆性的改良和 GmNHX1 基因功能的鉴定打下了良好的基础。

参考文献

[1] 代色平, 包满珠. 矮牵牛育种研究进展[J]. 植物学通报, 2004, 21(4): 385-391.
[2] Cnudde F, Heckatale V, de Jong H, et al. Changes in gene expression during male meiosis in *Petunia hybrid* [J]. Chromosome Res, 2006, 14(8): 919-32.
[3] Garabagi F, Strommer J. Green Fluorescent Protein as an All-purpose Reporter in *Petunia* [J]. Plant Mol Biol Rep, 2000, 18: 219-226.
[4] 郭慧杰. 矮牵牛“wafe”的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(5): 473.
[5] 瞿素萍. 矮牵牛的组织培养研究[J]. 西南农业大学学报, 2001, 10(5): 447-448.
[6] 孙艳香, 王丹, 白艳玲, 等. 大豆 GmNHX1 在百脉根中的过表达研究: 体内 Na⁺ 含量的降低是耐盐性提高的基础[J]. 科学通报, 2006, 51(9): 928-936.
[7] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学技术出版社, 2002: 386-389.
[8] 孙艳香, 杨红梅, 耿云红, 等. 根癌农杆菌介导的百脉根遗传转化体系的优化研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2006, 39(2): 51-57.

Studies on *A. tumefaciens*-mediated Transformation Procedure for *Petunia hybrida* Vilm

SUN Yan-xiang, LI Mei-rui, ZHANG Xiao-yue
(Department of Biology, Teachers College of Langfang HeBei 065000, China)

Abstract: An *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system has been developed for *Petunia hybrida* Vilm. The results showed the MS medium with 6-BA 1.5 mg/L and NAA 0.2 mg/L was the most suitable for the shoots in induction and sub-cultivation. The optimum antibiotics concentration in selective medium was 30 mg/L Kan and 300 mg/L Cef. And transformation efficiency was improved either by subjecting explants to -0.05 MPa pressure for 5 min while they were being infected or by adding AS at 20 mg/L into co-culture medium. After a 2-round selection of Kan-resistance, selected Kan-resistant plants were further identified by PCR and PCR based Southern blot analysis. The results demonstrated that all the Kan-resistant plants were transgenic ones and that the exogenous target gene, the GmNHX1 gene, has been integrated into the genomic DNA of all transformants obtained.

Key words: *Petunia hybrida* Vilm; Genetic transformation system; Regeneration system