

以潮霉素为筛选标记猕猴桃遗传转化体系的初步建立

陈晓玲¹, 秦华明², 周玲艳¹, 潘少英¹, 罗翠欢¹, 梁红¹

(1. 仲恺农业技术学院 生命科学学院, 广东 广州 510225; 2. 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510264)

摘 要:以带潮霉素筛选标记基因的质粒载体通过农杆菌介导法分别转化猕猴桃的叶片、叶柄和茎段, 并获得转化再生植株。结果表明: 筛选时潮霉素浓度以 2 mg/L 合适; 叶片预培养以光照为适合, 而叶柄和茎段差别不大; 就转化率而言, 茎段明显高于叶柄和叶片; 经 PCR 检测初步证实转化植株为阳性植株。

关键词: 潮霉素; 筛选标记; 猕猴桃; 遗传转化

中图分类号: S 663.403.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2008)01—0189—03

猕猴桃(Actinidia)系猕猴桃科猕猴桃属植物, 其风味独特, 营养丰富, Vc 含量高, 有一定保健功效, 因而倍受关注。我国猕猴桃栽培面积居世界第一位, 产量排第二位。目前, 猕猴桃现有的栽培品种往往存在某些性状缺陷, 如耐贮藏性和抗逆性较差等。遗传转化研究将对猕猴桃品种改良起到积极推动作用, 在改良猕猴桃某些性状选育新品种方面具有广阔的应用前景。它可以有目的、有计划地向猕猴桃引入优良性状而不需要改变它原有的其它特性, 使猕猴桃品种改良具有定向性和预见性。

猕猴桃上常用的选择标记基因是新霉素磷酸转移酶基因(NPTII), 该基因的表达可使转化细胞对含有氨基糖苷键的抗生素如卡那霉素产生抗性, 其作用原理是 NPTII 基因产物通过酶促磷酸化使氨基糖苷类抗生素失活, 从而解除毒性。抗生素卡那霉素的使用浓度一般为 25~50 mg/L。在农杆菌转化禾本科作物中, 潮霉素磷酸转移酶基因(hpt)一直作为有效的标记基因^[1-3], 其表达产物可通过酶促磷酸化作用而使 Hyg 失活, 从而产生抗性。磷酸转移酶基因(HPT)在果树遗传转化中也有使用^[4], 但在猕猴桃中还尚未报道。通过以潮霉素为筛选标记基因的载体转化猕猴桃叶片、茎段和叶柄, 建立了猕猴桃叶片、茎段和叶柄的转化体系, 并为以潮霉素磷酸转移酶基因为筛选标记对猕猴桃进行大规模的筛选打下基础。

1 材料与方法

第一作者简介: 陈晓玲(1972-), 女, 硕士研究生, 助理研究员, 主要参加猕猴桃资源与遗传多样性的研究。
通讯作者: 梁红。E-mail: lhofice@yahoo.com.cn。
基金项目: 广东省科技计划资助项目(2005B60301010); 仲恺农业技术学院校基金(G3051312)。
收稿日期: 2007—09—01

1.1 材料

1.1.1 植物材料 美味猕猴桃和平 1 号无菌苗的叶片、叶柄和茎段。

1.1.2 载体和农杆菌 质粒载体携带潮霉素磷酸转移酶(hpt)基因; 农杆菌菌株为 LBA4404。

1.2 方法

1.2.1 实生苗的获得 将种子洗净后, 用 2.5 mg/L 的赤霉素溶液分别处理 5 h, 将经赤霉素处理过的种子分别用 2% 的次氯酸钠消毒 15 min, 灭菌水冲洗 3~5 次, 然后将种子用镊子分别接种于 MS 基本培养基中进行发芽。待小苗出现 2 片绿色子叶时, 将其转入生根培养基生根培养。

1.2.2 猕猴桃内源耐潮霉素能力试验 为了确定抗性筛选用潮霉素的最高浓度即确定它最大的内源耐潮霉素能力, 将叶片切成大约 0.5 cm×0.5 cm 大小的小方块, 叶柄和茎段切成大约 0.5 cm 长, 接种在含不同浓度的潮霉素培养基上进行测试。潮霉素的浓度梯度首先设置为 10、20、30、40、50 mg/L, 再根据筛选情况设置更细微的浓度梯度。每种筛选剂的各个浓度分别接 5 瓶, 每瓶接入 4 块外植体, 25℃, 光培养, 30 d 后观察愈伤组织诱导和不定芽分化情况。

1.2.3 猕猴桃外植体遗传转化 遗传转化的基本方法和操作过程参考周玲艳等^[4]。浸染用农杆菌菌液 OD₆₀₀ 为 0.4, 浸染用叶片大小为 0.5 cm×0.5 cm 的小方块, 叶柄和茎段大约为 0.5 cm 长, 浸染时间为 10 min。共培养 3 d 后, 将外植体接入不含筛选剂的培养基预培养 6 d, 预培养分光照和黑暗培养, 然后接入筛选培养中, 放入光照 12 h、温度 25℃培养, 1 个月后统计愈伤组织诱导率、不定芽分化率。待转化苗长至 3~5 cm 高时, 将其切下接入生根培养基中进行生根培养。

1.2.4 转化苗 PCR 检测 随机取叶片、茎段和叶片的转化苗叶片半片放入 1.5 mL 灭菌离心管中, 然后以 SDS

法抽提 DNA, 取适量 DNA 进行 *hpt* 基因 PCR 扩增。

2 结果

2.1 猕猴桃外植体筛选浓度的确定

表 1 不同筛选剂浓度对猕猴桃叶片不定芽分化的影响

筛选剂浓度/mg/L	外植体生长状态和不定芽分化
0	66.7%外植体形成愈伤组织和分化不定芽
1.0	11.1%形成愈伤组织, 但无不定芽分化
3.0	全部枯黄
6.0	全部枯黄
9.0	全部枯黄

试验中以叶片为外植体代表, 首先设置了 10、20、30、40、50 mg/L 等 5 个浓度进行初选, 15 d 左右, 5 种筛选浓度的培养基中的外植体均出现褐化, 1 个月后全部死亡。根据初选结果又设置了 1.0、3.0、6.0、9.0 mg/L 等 5 个浓度梯度, 以不加潮霉素的培养基为对照。在不加潮霉素的培养基上, 愈伤组织和不定芽分化率为 66.7%, 当筛选剂浓度为 1.0 mg/L 时, 外植体不定芽分化率降低至 11.1%, 且小植株生长缓慢; 当筛选剂为 3.0 mg/L 时, 不定芽分化率为 0(表 1)。筛选剂使用浓度的要求是, 不仅能有效地抑制非转化细胞生长, 而且不影响转化细胞的正常生长。较低浓度的选择压力导致假阳性率增加, 过高浓度的筛选剂又会对植物造成一定程度的伤害, 因此, 综合考虑不同外植体以及筛选时使用筛选剂对不定芽分化的影响, 故筛选剂潮霉素的使用浓度确定为 2.0 mg/L。

2.2 不同外植体及不同预培养方式对转化效率的影响

表 2 结果表明, 不同外植体对不同的培养条件的反应不同, 对叶片而言, 光照预培养 1 周对其存活严重不利, 光照条件下, 外植体褐化率达 92%, 对茎段而言, 暗培养褐化率比光照培养高, 而对叶柄而言, 暗培养和光照培养的效果相差不大。但叶片和茎段在光照条件下预培养后分化率高于黑暗预培养, 叶柄光照条件下分化率低于黑暗条件。从 3 种外植体总体来看, 光照条件下, 形成的愈伤组织分化率为 37.8%, 略高于黑暗条件下预培养的分化率 31.4%, 但黑暗培养和光照培养对最终转化效率影响不大。

表 2 不同外植体及不同预培养方式对转化效率的影响

培养方式	外植体类型	共培养外植体块数	外植体褐化率/%	接入筛选外植体数	愈伤组织诱导率/%	不定芽分化率/%	转化率/%
光培养	叶	53	92.0	4	100	25.0	1.9
	叶柄	50	24.0	38	100	15.7	12.0
	茎段	30	26.7	22	100	72.7	53.3
暗培养	叶	80	46.3	43	93	14.0	7.5
	叶柄	30	23.3	23	100	30.4	23.3
	茎段	16	37.5	10	100	50.0	31.3

2.3 转化植株的 PCR 检测

转化植株以 SDS 法获取 DNA 用于 PCR 检测, 图 1 结果可以看出, 所检测的叶片转化植株中的 3、4、5 号有 3 个没有扩增出相应的带, 而其他转化植株均扩增出与质粒 DNA 大小一致约为 500 bp 的带。

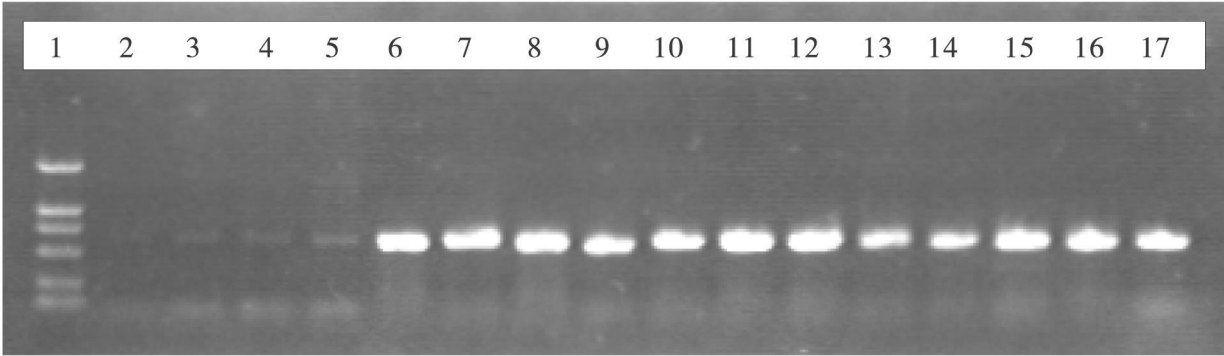


图 1 猕猴桃转化植株 PCR 鉴定

注: 1: DGL2000 2: 空白对照, 3~8: 叶片转化植株, 9~13: 茎段转化植株, 14~16: 叶柄转化植株 17: 阳性对照。

3 讨论

猕猴桃遗传转化已经有很多成功的例子^[5-9], 其标记基因多是 *NPTII*。 *Hpt* 基因是近期植物基因工程中广泛应用和比较受欢迎的选择标记, 相对于其他筛选标记来说, 其适应的植物较广, 对植物的迫害较小。试验以 *hpt* 基因为筛选标记基因, 获得了猕猴桃不同外植体的转化植株。

外植体和农杆菌共培养后, 转化细胞因受到一定程

度的伤害而生长比较弱, 往往需要周围非转化细胞的滋养才能很好的生长, 立即加入高浓度的抗生素容易造成转化细胞的死亡, 影响转化效率, 因此, 初始选择转化体时, 筛选剂的浓度不宜过高, 或者在共培养后延迟 1~2 周加筛选剂, 这时外植体开始愈伤化, 对高浓度筛选剂的耐受力增加。试验在共培养后将外植体预培养 1 个星期才转入筛选培养基, 但预培养的培养条件对转化效果有一定的影响, 主要是培养条件对外植体的器官形成

香花槐花器官的组织培养及植株再生研究

王玲仙¹, 谢吉容², 付 坚¹, 殷富有¹, 黄兴奇¹

(1. 云南省农业科学院 生物技术与种质资源研究所 云南 昆明 650223; 2. 重庆文理学院 生命科学系, 四川 重庆 402168)

摘 要: 采用香花槐的花器官做外植体, 进行组织培养和植株再生系统的研究。结果表明: 2,4-D 对于香花槐愈伤诱导的启动是必需的, 而多种激素配比会使诱导率提高; 选择浓度为 0.3 ~ 0.5 mg/L 的 BA 和浓度为 0.1 mg/L 的 NAA 配合使用, 能使花药愈伤达到较高分化率; 1/2MS+IBA 0.05 mg/L 和 1/2MS+IBA 1.0 mg/L 的诱导组培养生根效果较好。

关键词: 香花槐; 花药培养; 再生植株; 愈伤组织

中图分类号: S 685.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)01-0191-03

香花槐(*Robinia idaho*)又名富贵树, 蝶形花科, 刺槐属的落叶小乔木, 奇数羽状复叶, 小叶互生, 全缘, 每年开花2次, 花为粉红色, 有香味, 较抗寒, 具抗病虫害、抗

污染等优点, 根系发达, 固氮能力强, 能在较贫瘠的土壤上生长, 是目前城市、山区绿化、美化及净化环境和改善生态环境的优良树种。香花槐无种子, 繁殖多用扦插或埋根法, 此法速度慢 效率低。而香花槐的组织培养, 通常采用香花槐茎段、腋芽、幼叶、茎尖等为外植体建立植株再生系统^[1-6]。虽然在毛刺槐花药培养上有初步研究^[7-8], 但关于香花槐用花器官培养方面的研究尚未见报道。此研究用香花槐的花器官作为外植体进行比较探讨了不同激素诱导花器官愈伤组织和再生植株的形

第一作者简介: 王玲仙(1964), 女, 云南昆明人, 助理研究员, 主要从事花卉基因工程研究。E-mail: wanglingxian2001@yahoo.com.
通讯作者: 黄兴奇。E-mail: xingqih@hotmail.com.
基金项目: 云南省农业科技攻关资助项目(2006NG34)。
收稿日期: 2007-08-23

的影响^[7,8], 试验发现不同外植体对培养条件的反应不一致。

参考文献

[1] Hiei Y, Ohta S, Toriyama K, et al. Efficient transformation of rice mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. Plant J, 1994(6): 271-282.
[2] Aldemita R R, Hodges T K. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Japonica and indica rice varieties [J]. Planta, 1996 199: 612-617.
[3] Rashid H, Yoka S, Toriyama K et al. Transgenic plant production mediated by Agrobacterium in indica rice [J]. Plant Cell Rep. 1996, 15: 727-730.
[4] Hidaka T, Omura M, Ugaki M, et al. Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of citrus spp. From suspension cells [J]. Japan J

Breed 1990 40: 199-207.
[5] 郭卫东, 沈向, 李嘉瑞等. 利用 Lfy cDNA 转化猕猴桃的研究 [J]. 园艺学报, 1999, 26(2): 116-117.
[6] 毕静华, 高月, 刘永立等. 阔叶猕猴桃抗生素敏感性及其遗传转化的研究 [J]. 核农学报 2006 20(4): 287-291.
[7] 王进茂, 郑均宝, 高秀丽等. 花烛组织培养的研究 [J]. 河北林果研究, 2000(15): 69-74.
[8] Khalil S M, Cheah K T, Perez E A, et al. Regeneration of banana via secondary somatic embryogenesis [J]. Plant Cell Reports 2002 20(12): 1128-1134.

Study on the Transformation System of *Actinidia* by *hpt* as Selection Gene

CHEN Xiao-ling¹, QIN Huan-ming², ZHOU Ling-yan¹, PAN Shao-ying¹, LUO Cui-huan¹, LIANG Hong¹

(1. Zhongkai University of Agricultural and Technology, Guangdong, Guangzhou 510225, China; 2. College of Science and Technology, Jinan University, Guangdong, Guangzhou 510264, China)

Abstract: The leaf, petiole and stem of *Actinidia* was transformed by *Agrobacterium*-mediated which carry plasmid with *hpt* gene and the transformed plants were obtained. The results showed the optimal selective concentration of Hyg was 2 mg/L; light was suitable for pre-culture of leaf and it was no significant difference for petiole and stem to pre-culture under light and dark; the transformation efficiency of stem was significantly higher than leaf and petiole; most of transformation was proved to be positive by PCR.

Key words: *hpt*; Selection gene; *Actinidia*; Transformation