

液体培养在枇杷花药胚状体遗传转化中的应用研究

秦红玫^{1,2}, 王永清¹, 辜润智¹

(1. 四川农业大学 林学院园艺学院 四川 雅安 625014; 2. 西华师范大学 生命科学学院 四川 南充 637002)

摘要: 分别采用固体培养基和液体培养基对经过携带目的基因的农杆菌转化的枇杷花药胚状体进行培养。结果表明: 液体培养在转速为 100 rpm 时胚状体的生长和增殖最佳; 选择培养采用的抗菌素以安必西林 1 000 mg/L+卡那霉素 100 mg/L 为宜; 液体培养基上产生次生胚的百分率和平均产生的次生胚数都高于固体培养基。液体培养获得的增殖胚发育的时期一致性较高, 生活力旺盛; 固体培养获得的增殖胚状体多数成簇状分布, 容易提早萌发。

关键词: 枇杷; 花药胚状体; 液体培养; 遗传转化

中图分类号: S 667.303.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)07-0104-03

枇杷(*Eriobotrya japonica* Lindl.) 为蔷薇科(Rosaceae) 枇杷属植物, 是我国亚热带地区的珍稀特产水果, 我国是世界上枇杷主要产地, 为世界上最大的生产国^[1]。由于枇杷童期长, 运用常规育种耗时久, 效果差。随着转基因技术在其它果树上的成功, 尝试用新方法来自短枇杷的育种时间, 加快育种效率, 已成为枇杷育种研究的方向之一。

1 材料与方法

1.1 植物材料

所用植物材料为实验室制备的“大五星”枇杷花药胚状体, 该胚状体材料的获得在世界上尚属首次^[2]。

1.2 质粒与菌株

农杆菌采用 EHA52 菌株, 外源质粒是 PBI121, 携带有 GUS 报告基因, *NPTII* 基因和 *CycD2* 质粒(拟南芥基因组中发现, 对调节细胞周期具有重要作用的调控因子)。

1.3 培养基

共培养采用的培养基为 MS 基本培养基, 附加蔗糖 3%, Gelrite 2.5 g。选择培养基为 MS+ZT 0.05 mg/L+NAA 0.02 mg/L+IBA 0.02 mg/L, 附加蔗糖 3% 的液体培养基和另外附加 Gelrite 2.5 g/L 的固体培养基。在以上 2 种选择培养基中分别添加过滤灭菌的安必西林(Amp)和噻孢霉素(Cef)。浓度为: ①Amp 500 mg/L; ②Amp 750 mg/L; ③Amp 1 000 mg/L; ④Cef 500 mg/L; ⑤Cef 750 mg/L; ⑥Cef 1 000 mg/L。2 周后转入含相同抗菌素并加入培养和卡那霉素(Kan)100 mg/L 的新鲜培

养基上继续培养。

1.4 细菌的活化

农杆菌活化采用 LB 细菌培养基, 附加卡拉霉素 50 mg/L。低温保存的农杆菌先在 LB 固体培养基上平板培养 2 d(28℃, 暗培养)后转移到 LB 液体细菌培养基上(28℃, 100 rpm)过夜培养, 离心收集菌团后稀释细菌, 调整细菌浓度在 OD₆₀₀=0.5 左右。

1.5 农杆菌介导的遗传转化

选取培养瓶内生长良好的无菌枇杷花药胚状体同稀释好的农杆菌菌液接触 30 min, 然后用无菌滤纸吸干多余的菌液, 接种到共培养基上暗培养 2 d, 然后转移到选择培养基上培养。选择培养分别采用液体、固体培养 2 种方式。液体培养采用振荡培养, 分别设置转速为 60、80、100、120 rpm。转入选择培养基后在前 1 个月内每周进行 1 次装瓶, 培养温度(25±1)℃, 光照 16 h/d, 光照强度 2 000 lx。

2 结果与分析

2.1 转速对液体培养的影响

在不同的转速下, 花药胚状体的增殖情况不一致, 主要体现在增殖数量和增殖的胚状体的生长状况和所处的时期。在含有安必西林 1 000 mg/L 和卡那霉素 100 mg/L 的选择培养基上的培养结果显示, 在不同转速的培养基中胚状体的增殖以及增殖胚状体的大小以及颜色、生活力等存在差异。直径 1~3 mm 的浅黄色和白色的胚状体生活力最强。不同转速下的胚状体增殖情况见表 1。转速在 60、120 rpm 时的增殖较差, 部分增殖的新胚为褐色, 生活力差, 总的增殖率也较低。转速为 100 rpm 时的增殖效果最好, 其次为 80 rpm。在 100 rpm 时增殖出的直径在 1~3 mm 之间胚状体个体数最多, 在增殖出的新胚中所占比率也最大, 呈浅黄色至白色, 个体饱满, 生活力旺盛, 而其它直径大小的胚也

第一作者简介: 秦红玫(1978-), 女, 四川南充人, 在读博士, 现主要从事果树生物技术及育种研究工作。E-mail: hmlb406@163.com。
通讯作者: 王永清(1957-), 男, 四川眉山人, 博士, 教授, 现从事植物生物技术方向研究工作。E-mail: yqw14@sicau.edu.cn。
收稿日期: 2009-02-10

为浅黄色到白色, 生活力强。因此液体培养时选择转速为 100 rpm 为宜。

表 1 不同转速对液体培养的影响

转速 /r · min ⁻¹	接种数 / 个	产生的新 胚状体数	新胚状体不同直径范围的比率/%				新的胚状 体颜色
			直径< 1 mm	直径 1~ 2 mm	直径 2~ 3 mm	直径> 3 mm	
60	16	49	30. 61	46. 94	16. 33	6. 12	浅黄色、褐色
80	16	216	43. 06	40. 74	12. 04	4. 17	白色、浅黄色
100	16	288	36. 46	54. 17	5. 56	3. 82	白色、浅黄色
120	16	87	67. 82	16. 09	4. 59	0	浅黄色、褐色

2.2 抗菌素对农杆菌的控制效果及对胚状体生长影响

在共培养 2 d 后均出现少量的细菌, 表明农杆菌的存在。共培养 2 d 后的胚状体转入含卡那霉素的选择培养基上。在含卡那霉素的选择培养基上胚状体的生长不如未加卡那霉素的选择培养基, 说明卡那霉素对胚状体的生长有一定的抑制作用, 这也利于选择出含有目的基因的胚状体。培养 4 周后所有的选择培养基上都未再出现农杆菌, 说明所采用的不同浓度和种类的抗菌素都能有效地抑制农杆菌的生长。但是在含有不同抗菌素的选择培养基上胚状体的存活能力不一致。在含有安必西林的选择培养基上的胚状体存活数高于含有噻孢霉素的选择培养基。而在含有安必西林的选择培养基中又以浓度为 1 000 mg/L 的培养基上胚状体的存活率最高, 达到 50% 以上。因此在选择培养中以 Amp 1 000 mg/L+Kan 100 mg/L 对感染农杆菌后的枇杷花药胚状体进行选择培养为最佳。

2.3 液体培养与固体培养对选择培养的影响

未经过农杆菌介导转化的胚状体在液体培养中的增殖率明显高于在固体培养基上。在添加抗菌素的选择培养基上也得到了一致的结果(表 2)。液体培养基上产生次生胚的百分率和平均产生的次生胚数都高于固体培养基, 特别是平均产生的次生胚数远高于固体培养基。液体培养上增殖出的新胚状体绝大多数是分散分布, 发育时期相对一致, 适合于进一步的萌发成苗。而固体培养上增殖出的新的胚状体多簇状分布, 不容易分开, 增殖出的新胚状体发育时期差异较大, 容易提早畸形萌发, 对进一步的萌发成苗不利。

表 2 培养基对胚状体增殖的影响

抗菌素	液体培养		固体培养	
	产生次生 胚的百分率/%	平均产生 的次生胚数	产生次生 胚的百分率/%	平均产生 的次生胚数
对照 CK	96	23. 32	86	5. 02
Amp 500 mg/L	46	9. 75	30	3. 80
Amp 750 mg/L	52	13. 86	24	4. 08
Amp 1 000 mg/L	59	18. 82	42	4. 26
Cef 500 mg/L	23	6. 22	28	3. 29
Cef 750 mg/L	28	8. 20	26	3. 46
Cef 1 000 mg/L	12	8. 33	8	3. 50

3 讨论

核桃是果树中第一个成功地导入外源基因并使其表达的树种, 以胚状体为外植体, 通过与农杆菌共培养获得了转基因植株^[3]。很多果树以胚状体为受体, 以农杆菌介导方法进行了深入研究, 如核桃^[4]、桃^[5]、李^[6]、葡萄^[7]、番木瓜^[8]等。在枇杷上的遗传转化上李名扬等^[9]用野生型根癌农杆菌感染枇杷子叶外植体, 获得了 50%~95% 的枇杷转化瘤组织, 农杆菌 Ti 质粒的 T-DNA 转移并整合进了枇杷细胞核中, 且得到表达。该试验中采用的液体培养对于转化后的材料的培养是很有利的。分析其可能原因, 一方面是培养材料与培养基的充分接触, 另一方面可能是液体培养中胚状体的增殖主要起源于胚状体表面的单细胞, 而且液体培养可能在一定程度上抑制了胚状体的提早萌发, 从而能保持稳定高效地增殖。

参考文献

[1] 陈杰忠. 果树栽培学各论[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 185-186.
[2] Li J Q, Wang Y Q, Lin L H, et al. Embryogenesis and plant regeneration from anther culture in loquat (*Eriobotrya japonica* L.)[J]. Scientia Horticulturae, 2008, 115: 329-336.
[3] McGranahan G H, C A Leslie S Unatsu. A. grobacterium-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plant[J]. Bio/ Tecnology, 1988, 6: 800-804.
[4] 汤浩茹, Wallbraun M, 任正隆, 等. 通过农杆菌介导法将哈兹木霉几丁质酶 ThEn-42 基因导入核桃[J]. 园艺学报, 2001, 28: 12-18.
[5] Smigocki A C, Hammerschlag F A. Regeneration of plants from peach embryo cells infected with a shooty mutant strain of *A. grobacterium*[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1991, 116: 1092-1097.
[6] Soerza R, Cordts J M, Mante S, et al. Agrobacterium-mediated transformation of plum with the papaya ringspot virus coat protein gene[J]. Hort-science, 1991, 26(6): 786.
[7] Mullins M A, Tans F. Agrobacterium-mediated transformation of grapevines transgenic plants of *Vitis rupestris* Schelle and shoots of *Vitis vinifera* L[J]. Bio/ Technol, 1990, 18: 1041-1045.
[8] Tulecke W, McGranahan G H, Leslie C A. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of Walnut, *Juglans regia* L[J]. Plant Sci, 1985, 40(1): 57-63.
[9] 李名扬, 蒋建国, 罗静. 根癌农杆菌 T-DNA 在枇杷子叶外植体中的转移与表达[J]. 西南农业大学学报, 1991(4): 442-444.

花粉直感对南果梨的影响

王家珍, 李俊才, 刘 成, 蔡忠民, 沙守峰

(辽宁省果树科学研究所 辽宁 熊岳 115009)

摘 要: 用黄冠、鸭梨、雪花3 品种对南果梨的中心花、边花进行人工授粉试验。结果表明: 雪花梨对南果梨有明显的花粉直感。

关键词: 南果梨; 花粉直感; 品质

中图分类号: S 661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)07-0106-02

南果梨属于秋子梨系统, 该品种以其果实色泽鲜艳、果肉细腻, 爽口多汁, 风味香浓而著称, 是辽宁省鞍山地区梨树的主栽品种, 大部分地区是通过人工解决授粉问题。近几年, 发现不同的花序、同一个花序上的果实萼片状态表现不一样, 并且果实在可溶性固形物、糖、酸等含量上也有些不同。为此, 于2008年进行了用不同品种人工授粉, 同时进行同一品种对不同的花朵(中心花、边花)人工授粉试验, 以期了解花粉直感在南果梨上的表现。

1 材料与方法

试验设在辽宁省鞍山海城市八里镇东山道村梨园, 该园为向北的山坡地, 粘壤土, 有良好的排灌条件, 管理水平较高。供试品种为秋子梨系统的南果梨, 树龄12 a, 株行距为4 m×5 m, 树势中等。授粉品种花粉采自石家庄果树研究所梨树试验园, 有黄冠梨、鸭梨、雪花梨3个

品种, 待母树开花量达到30%左右时, 选择晴天无风的上午10时用橡皮头进行人工点授。在每株南果梨树上选150个花序, 每个花序上选3个大蕾期的边花(4月18日)。用3个授粉品种的花粉各授50个花序, 摘除中心花, 然后套袋, 重复10次。坐果(授粉10 d左右)后摘袋, 每序只留2个果。用同一方法间隔2 d左右(4月20日)授中心花。

采收时每株树每个处理随机采集10个果实, 测定单果重、纵横径(计算果形指数)、可溶性固形物(用手持测糖仪)、总糖(斐林试剂法)、总酸含量(用氢氧化钠滴定法)。

2 结果与分析

2.1 对南果梨品种坐果率的影响

由表1可以看出, 各处理对南果梨的坐果率均有影响, 其中雪花梨授粉的中心花坐果率最高, 其次是鸭梨授粉的边花, 黄冠授粉的中心花坐果率较低, 其余居中, 经过邓肯氏多重比较测验差异显著。说明雪花梨与南果梨的亲性和性更好。建议生产上用雪花梨作南果梨的授粉品种。

第一作者简介: 王家珍(1964), 女, 本科, 研究员, 现从事梨树育种及栽培工作。E-mail: wangjz2@163.com。
收稿日期: 2009-02-10

Studies on Loquat Anther-derived Embryo's Transformation in Liquid Culture

QIN Hong-mei^{1,2}, WANG Yong-qin¹, GU Run-zhi¹

(1. College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China; 2. College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637002, China)

Abstract: Liquid medium and solid medium were applied to culture loquat anther-derived embryos transformed mediated with *Agrobacterium tumefaciens*. Results showed: when the Shaker worked with 100 rpm, the embryos grew best; in selection medium 1 000 mg/L ampicillin and 100 mg/L Kanamycin was the optimal antibiotic concentration to select the loquat anther-derived embryos after transformation; the percentage of embryos producing new embryos and No. of newly formed embryos per embryo producing new embryos in liquid medium both higher than that of solid medium. In liquid medium most of the newly formed embryos developed at the same stage and grew ed well.

Key words: Loquat; Anther-derived embryo; Liquid culture; Transformation