

油葵基因转化体系的建立

黄俊轩, 李建科, 李双跃, 刘艳军, 杨静慧

(天津农学院 园艺系, 天津 300384)

摘要: 为了建立油葵基因转化体系, 以 *pCB302* 为载体, 进行了 *C58C1* 农杆菌介导的遗传转化。结果表明: 3 mg/L 的除草剂浓度为最适宜的选择压; 叶片、叶柄和茎段 3 种外植体中, 茎段的基因转化率最高; 7、14、28 d 的继代培养时间中, 7 d 的继代培养基因转化率最高。

关键词: 油葵; 基因转化; 选择压; 外植体

中图分类号: S 565.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)13-0176-03

生物技术是 21 世纪科技史上令人瞩目的重点领域, 也是 21 世纪国家经济发展新的增长点。组织培养是转基因技术不可或缺的组成部分, 已经在植物改良中发挥了重要的作用^[1]。2001 年, 我国已批准环境释放的转基因植物 58 项, 已批准商品化生产的有 26 项。不论是国外还是我国, 转基因植物研究工作都在蓬勃发展^[2]。2000 年 7 月 11 日, 巴西、中国、印度、墨西哥、英国、美国等全球七大科学院在华盛顿联合发表白皮书, 支持转基因技术研究, 这是全球权威科研机构首次对备受争议的转基因技术做出的公开表述^[3]。这份白皮书详细阐明了生物技术在消除第三世界国家饥饿和贫穷方面有不可替代的作用, 呼吁各国政府重新考虑制定生物技术政策, 鼓励发达国家对转基因技术的研究, 并与发展中国家分享它们的成果^[4]。21 世纪是生物技术蓬勃发展的年代, 转基因植物以及转基因食品的兴起是生物技术革命的必然, 它将给人类带来巨大的社会财富、利益和美好前景。

油用向日葵是近 30 年来总产量增长最快的世界三大油料作物之一, 年增长率 7.1%。世界上油葵的主产国是阿根廷、法国, 其次是中国。我国的油葵主要集中在东北三省、内蒙古、新疆和正在迅速发展的陕西、山西和河北等省(自治区)。油葵的籽实含油率一般在 46% 左右, 高的可达 50% 以上, 出油率在 42% 以上。油葵油

属于半干油, 不易干燥, 在工业、制造业等相关产业用途广泛。由于油葵具有广泛的生态适应性, 抗旱、抗涝、耐盐碱, 适于沿海滩涂地区种植, 油葵作为生物能源代替柴油, 已受到世人关注^[5]。油葵作为重要的油料植物, 近些年在我国已大面积应用。有关的育种研究也有报道, 但关于利用基因工程技术进行育种的研究少有报道^[6]。由于油葵多为野生, 种质资源不丰富, 品种性状单一, 所以利用常规育种技术很难得到理想的育种目标, 如采用基因技术手段进行辅助育种, 将会收到特殊的效果。该研究就是利用农杆菌介导技术进行油葵的基因转化研究, 目的是找到油葵转化的最佳方法, 为今后利用转基因技术育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

油葵试管苗及转化所用 *pCB302* 质粒和农杆菌 *C58C1* 均由天津农学院园艺系园林植物实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 除草剂浓度的筛选 取生长健壮的油葵试管苗, 以其茎段为外植体, 放在含有 0、1、3、5、10 mg/L 除草剂的分化培养基上 (MS+KT 0.25 mg/L+IAA 0.5 mg/L) 进行再生芽的诱导。茎段长度为 2~3 cm, 接种 100 块, 培养条件为 28℃, 24 h 光照, 光强 2 000 lx。从接种后每 7 d 观察 1 次, 主要观察外植体及其伤口部位颜色变化和愈伤、再生芽的生长情况。经 28 d 培养后, 对每种处理的再生率进行统计。

1.2.2 不同外植体的转化 取带有 *pCB302* 质粒的农杆菌 *C58C1* 工程菌 1 个单菌落, 接种到 LB 液体培养基中过夜振荡培养, 待其 OD 值为 0.4 时, 取出, 浸染油葵叶片、叶柄、茎段 10 min, 取出, 用无菌的滤纸吸干多余的菌液, 然后放在带有滤纸的 MS 固体培养基上, 在 28℃ 黑暗条件下共培养 24 h, 共培养后移到含有除草剂

第一作者简介: 黄俊轩(1973), 男, 广东河源人, 本科, 副教授, 现主要从事园林植物教学与研究工作。E-mail: huangjunxuan@sina.com.

通讯作者: 杨静慧(1961-), 女, 甘肃兰州人, 博士, 教授, 现主要从事园艺和生物技术方面的教学与研究工作。E-mail: jinghuiyang2@yahoo.com.cn.

基金项目: 天津市科委科技支撑资助项目(08ZCKFNC01200), (07ZCKFNC01100); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目。

收稿日期: 2010-03-31

(3 mg/L)、羧苄青霉素(500 mg/L)的分化培养基上,诱导转化芽。培养条件为 28℃,24 h 光照,光强 2 000 lx。接种后每 7 d 观察 1 次。28 d 后,对每种处理的再生率进行统计。

1.2.3 不同继代时间的处理 取生长健壮的油葵试管苗,以其茎段为外植体。取带有 *pCB302* 质粒的农杆菌 C58C1 的 1 个单菌落,接种到 LB 液体培养基中过夜振荡培养。待其 OD 值为 0.4 时,取出,浸染油葵茎段 10 min。取出后用无菌滤纸吸取多余菌液,将农杆菌处理好的油葵外植体放 28℃黑暗条件下进行共培养。共培养后移到含有除草剂(3 mg/L)、羧苄青霉素(500 mg/L)的分化培养基上,诱导转化芽。培养条件为 28℃,24 h 光照,光强 2 000 lx。从接种后分成 3 组,分别在培养 7、14、28 d 继代 1 次,主要观察外植体及其伤口部位颜色变化和愈伤、再生芽的生长情况。经 56 d 培养后,对每种处理的再生率进行统计。

2 结果与分析

2.1 除草剂选择压的确定

将非转化的油葵外植体放在不同浓度的除草剂选择压力下培养,以筛选出用于基因遗传转化的最适选择压(除草剂浓度)是转基因筛选的关键。油葵外植体放入含有不同浓度除草剂的分化培养基下培养 28 d 后的结果见表 1。从表 1 可以看出,在无除草剂时,外植体生长健壮,芽的再生率达 100%;除草剂浓度为 1 mg/L 时,外植体生长健壮,芽再生率下降到 68%;当除草剂浓度为 3 mg/L 时,外植体生长停滞,但颜色正常绿色,再生率为 0;当除草剂浓度为 5~10 mg/L 时,外植体颜色变黄,并随着除草剂浓度的增大,变黄并枯死。所以,油葵外植体在除草剂浓度为 3 mg/L 时,组织颜色正常,芽不能再生,再生率为 0,确定为油葵基因转化试验的筛选压力。

表 1 不同浓度除草剂对油葵外植体芽再生的影响

不同除草剂浓度 /mg·L ⁻¹	接种数量	芽再生块数	生长情况
0	100	100	生长健壮
1	100	68	生长健壮
3	100	0	生长停滞
5	100	0	生长停止 颜色变黄
10	100	0	逐渐变黄并枯死

2.2 不同外植体的基因转化率

从表 2 可以看出,在芽分化培养基上和 3 mg/L 除草剂选择压下,不同油葵外植体的芽再生率有较大的差异。以叶片、叶柄为外植体获得的芽再生率均为 0,而茎段的转化率达到 16.3%,因此茎段是比较理想的转化外植体。

表 2 不同外植体的基因转化率

不同外植体	接种外植体数/个	再生芽数	芽再生率/%
叶片	110	0	0
叶柄	87	0	0
茎段	98	16	16.3

2.3 不同继代时间对油葵基因转化率的影响

从表 3 可以看出,不同继代时间对油葵基因转化率的影响较大,当继代时间为 7 d 时,接种外植体的芽再生数量最多,转化率最高,基因转化率达 18%;当继代时间为 14 d 时,基因转化率仅为 1%,当继代时间为 28 d 时,转化率为 0。因此,在油葵基因转化时,继代时间为 7 d 最好。

表 3 不同继代时间对油葵基因转化率的影响

不同继代时间/d	接种外植体数	再生芽数	转化率/%
7	100	18	18
14	100	1	1
28	100	0	0

3 讨论

在基因转化试验中,选用外植体的不同也会影响转化效果。在该试验中只有采用茎段为外植体时,才能获得较高的转化率。一般认为只有较高的再生率的外植体在转化试验中才能有较高的转化率,然而在实际转化试验中往往会出现不一致的现象,如在该试验中油葵的叶柄在离体再生培养中获得的再生率高于油葵茎段,但在转化试验中采用茎段获得的转化率却明显高于叶柄。分析原因主要由于油葵茎段外植体的生长势明显高于叶柄,在转化试验中,由于油葵的叶柄生长势较弱,在共培养阶段就有大部分的外植体由于农杆菌的生长迅速而死亡,因此在筛选培养中也有些不适应抗生素等培养条件而死亡,从而造成其转化率出现明显下降。相反,虽然油葵茎段的再生率不高,但由于其生长势较强,在共培养及筛选培养阶段几乎没有出现大量死亡的现象,因此会得到满意的转化效果。通过以上分析,在基因转化研究中选择外植体的类型是很关键的,不能只凭其再生率的高低而决定,一定要在试验中进行比较。

参考文献

[1] 王群.粮食安全的耕地保障分析[J].地域研究与开发,2001,20(4):68-71.
[2] 蒋灿.转基因食品安全研究[J].科技进步与对策,2002(1):38-39.
[3] 聂凌鸣,宁正祥.转基因食品争论与风险性探讨[J].武汉工业学院学报,2002(2):11-15.
[4] 苏贤坤,张晓海,汪自强,等.转基因作物与我国农业可持续发展[J].农业现代化研究,2004(1):77-80.
[5] 陆胜龙.沿海滩涂盐碱地杂交油葵夏播高产栽培技术[J].农业科技通讯,2007(1):29.
[6] 胡文冉,黄乐平,孟庆玉,等.天麻抗真菌蛋白 GAFP 基因转化油葵的研究[J].新疆农业科学,2007,44(3):67-70.

金线莲组织培养新体系建立及优化

黄 勇

(文山学院 科研处, 云南 文山 663000)

摘 要:以滇越金线莲和花叶开唇兰 2 个金线莲品种为材料进行组织培养,旨在完善金线莲组织培养体系。结果表明:2 种金线莲在 MS(不加大量元素)+花宝 3 g/L+椰子汁 10% 的培养基中种子无菌萌发情况良好;在 MS(不加大量元素)+花宝 3 g/L+蛋白胨 2 g/L+香蕉汁 100 g/L+活性炭 5 g/L 的固体培养基和液体培养基中交替进行继代培养生长速度快、增殖系数高;练苗移栽后存活率高、生长情况良好。由此建立并优化了金线莲组织培养体系。

关键词:金线莲;组织培养;离体快繁

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2010)13-0178-02

金线莲为兰科(Orchidaceae)开唇兰属(金线莲属)(*Anoectochilus* Blume)多年生草本植物。该属植物有 40 多种,分布于亚洲热带地区至大洋洲,我国 20 种,2 个变种^[1]。金线莲为名贵中草药,享有“药王”等美誉。但其种子在自然条件下萌发率极低,加上长期采挖,种质资源稀缺,已濒临灭绝。为此,已有研究利用组织培养这一生物技术手段对其种质资源进行抢救性地保存^[2-4]。但研究多以茎段为材料,且技术还不甚完善。该研究以滇越金线莲和花叶开唇兰 2 个金线莲品种^[5]果实为外植体进行组织培养,以期建立完善的金线莲组织培养体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

作者简介:黄勇(1981-),男,硕士,研究方向为生物资源研究与开发。

基金项目:文山学院科研基金资助项目(2003201)。

收稿日期:2010-03-31

文山野生滇越金线莲和花叶开唇兰 2 个金线莲品种。

1.2 试验方法

1.2.1 种子无菌萌发 将成熟而未开裂的金线莲果实用 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min, 无菌水中洗 5~6 次。果实破开后将种子均匀地抖落在 1/2MS、1/2MS+10% CM(椰子汁)、VW、VW+10% CM、MS(不加大量元素)+Hypoxyl(花宝)、MS(不加大量元素)+Hypoxyl+10% CM、KC、KC+10% CM 8 种培养基中进行种子无菌萌发试验,观察其萌发情况。视果实大小每个果实可接种 3~6 瓶。培养基 pH 5.6~5.8 以琼脂 7 g/L 固化,培养条件为温度(25±2)℃,光照强度 1 000 lx,光周期 12 h/d(下同)。

1.2.2 继代培养 将种子萌发后的幼苗接种到附加不同浓度激素(6-BA、NAA)和添加物(Hypoxyl、蛋白胨、香蕉汁(BJ)、活性炭(AC))的培养基上进行继代培养,观察其生长情况。

1.2.3 练苗移栽 继代培养多次后,将培养瓶移到室外打开瓶盖练苗 3~5 d,然后洗去小苗基部的残留培养基

The Transformation System of Oil Sunflower(*Helianthus annuus* L.)

HUANG Jun-xuan, LI Jian-ke, LI Shuang-yue, LIU Yan-jun, YANG Jing-hui
(Horticultural Department of Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384)

Abstract: In order to establish the system of genetic transformation on oil soybean by *Agrobacterium* medium transformation of *Agrobacterium tumefaciens* strains C58C1 with pCB302 vector, the concentration of herbicide, the selection of explants and pre-culture were researched. The results showed that more suitable concentration of herbicide was 3 mg/L, the more desirable explants were stems, the more desirable time of pre-culture was 7 days with highest transformation ratio.

Key words: oil soybean; genetic transformation; explants; selection pressure