

文章编号: 1001-1498(2003)02-0123-06

提高根癌农杆菌介导的香石竹遗传转化效率的研究

林荣呈¹, 陈龙清¹, 包满珠¹, 孙振元²

(1. 华中农业大学园艺林学学院, 湖北 武汉 430070; 2. 中国林业科学研究院花卉中心, 北京 100091)

摘要: 以无菌苗叶片为外植体,在根癌农杆菌介导下建立并优化了香石竹 5 个品种的遗传转化体系。预培养 2 d 可明显提高转化率;香石竹品种间在转化上存在差异;培养基中添加 20 μmol 的 AgNO_3 抑制不定芽的分化。转化植株在含 25 mg L^{-1} 卡那霉素的生根培养基上培养,生根率为 72.1%,GUS 检测结果 55% 的转化植株呈蓝色,PCR 扩增表明阳性率为 32.2%,Southern 杂交证实外源基因已整合到植物基因组中。

关键词: 香石竹; 根癌农杆菌; 遗传转化; GUS

中图分类号: S722.3 **文献标识码:** A

香石竹 (*Dianthus caryophyllus* L.) 是世界四大切花之一。传统育种方法在香石竹的品种演化中发挥了巨大的作用,但是香石竹品种目前存在的一些问题如抗病、延长瓶插寿命等难以用传统育种方法解决。植物基因工程的应用克服了传统育种方法的不足^[1]。自 1983 年首次获得转基因植株以来,转基因技术已在多种植物上获得了成功^[2]。花卉也已成为遗传转化研究的活跃领域之一,在香石竹上的研究从 1989 年开始报道^[3],此后, Lu 等^[4~6] 都分别将报告基因 GUS、NPT 转入香石竹体内,建立了遗传转化体系。Savin 等^[7] 在延长香石竹花朵瓶插寿命方面取得了重大进展,他们将反义 ACC 氧化酶 (ACO) 基因转入香石竹,结果转基因植株花朵的瓶插寿命比对照延长 8 d。最近,余义勋等^[8] 在抗衰老基因的克隆与载体构建方面做了一些研究,Zuker 等^[9] 还利用基因枪法进行了转化试验。

本研究在前人研究的基础上^[10],在根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn) 介导下优化了以香石竹叶片为外植体的植株再生体系,从而为香石竹的遗传改良、分析外源基因的表达情况,以及外源基因与内源基因的互作等研究打下基础。

1 材料

供试香石竹材料采自上海市华安园艺公司。5 个品种为 Master、Oriana、Laurrella、Sahala 和 Virginie。以无菌苗顶芽以上的 2~3 对叶片作外植体。根癌农杆菌两个菌株为 LBA4404 和 EHA101 采用双元载体系统 pBECKS400.Zsk (由英国 De Montfort 大学提供)。携带质粒 pBECKS.GUSintron^[11]。

收稿日期: 2002-01-10

基金项目: 国家自然科学基金资助(39970532)及国家林业局“948”项目(97-4-06)资助

作者简介: 林荣呈(1970—),男,浙江海宁人,中国科学院北京植物研究所博士研究生。

2 方法

2.1 培养基

植物培养以 MS^[12] 为基本培养基,附加不同浓度的植物激素和抗生素(卡那霉素购自武汉卫检科技服务公司,头孢霉素购自中国科学院遗传研究所,华北制药厂特制)。培养基 D:MS + BA 1.0 mg L⁻¹ + NAA 0.3 mg L⁻¹ + 蔗糖 30 g L⁻¹ + 琼脂 6~8 g L⁻¹;培养基 C:D + 乙酰丁香酮 20 μmol;培养基 S_D:D + 卡那霉素 75 mg L⁻¹ + 头孢霉素 400 mg L⁻¹;培养基 S₀:MS + BA 0.5 mg L⁻¹ + NAA 0.1 mg L⁻¹ + 蔗糖 30 g L⁻¹ + 琼脂 6~8 g L⁻¹ + 卡那霉素 75 mg L⁻¹ + 头孢霉素 200 mg L⁻¹;培养基 S_R:1/2MS + NAA 0.1 mg L⁻¹ + 蔗糖 30 g L⁻¹ + 琼脂 5 g L⁻¹ + 卡那霉素 25 mg L⁻¹,pH 值为 5.6~5.8。

根癌农杆菌培养以 LB 作培养基,pH 值为 7.0,固体培养加琼脂 10 g kg⁻¹。

用高压灭菌锅灭菌(1.1 kg cm⁻²,121 ℃)20 min,抗生素用 0.45 μm 滤膜过滤灭菌。

2.2 转化方法

将无菌苗叶片平放接种于培养基 D 上,置光照培养箱(LRH-250-G,广东省医疗仪器厂生产)中预培养。温度 25 ±1 ℃,光照强度 1 500~2 000 lx,每天光照 14 h。

预培养后的叶片置于过夜振荡培养(28 ℃,150 r·min⁻¹)的根癌农杆菌悬液中浸泡 6~8 min,用无菌滤纸吸去表面多余的菌液,并置于培养基 C 上共培养 2~3 d。随后将叶片转到选择分化培养基 S_D 上进行不定芽的诱导。当芽长出约 1 cm 后,转入增殖培养基 S₀ 上增殖。

设立接种于普通培养基上未经农杆菌侵染的叶片为对照。对预培养时间、不同的香石竹品种,以及不同的根癌农杆菌菌株和质粒对转化的影响进行比较。

2.3 鉴定方法

2.3.1 GUS 组织化学检测 将再生植株在含卡那霉素的生根培养基上生根之后,参照孙敬三等^[13]的方法,将无菌苗叶片切成小块,置于含 X-Glucuronide 的反应缓冲液中 37 ℃ 保温过夜,再用 70%乙醇脱去叶绿素。

2.3.2 PCR 分析 植物总 DNA 的提取参照张俊卫的微量 SDS 提取法^[13]。引物为 *npt* 基因两端的特异序列(由上海生工生物工程有限公司合成)。引物 1:5'-GAGCCTATTCGGC-TATGACT-3';引物 2:5'-AACTCTGIGATGGCAGGTTG-3'。反应体系:1 × 反应缓冲液;1.5 mmol MgCl₂;0.2 mmol dNTPs;0.5 μmol 引物 1,2;1 u Taq 酶;50~100 ng DNA,加水至反应总体积 20 μL,以矿物油覆盖(Taq 酶及 dNTPs 购自武汉生物工程有限公司,矿物油为 Sigma 公司生产)。反应条件:94 ℃ 预变性 3 min,然后 94 ℃ 1 min;57 ℃ 1 min;72 ℃ 2 min,30 个循环,之后在 72 ℃ 延伸 10 min,反应结束后保存于 4 ℃ (PCR 基因扩增仪为 Hema 480,珠海黑马医学仪器有限公司生产)。扩增产物在 14 g kg⁻¹琼脂糖凝胶上电泳,并紫外照相。

2.3.3 Southern 杂交分析 方法参照傅荣昭等^[14]。5~10 μg 植物 DNA 经 *Hind* III 酶切消化,电泳后变性,印迹到尼龙膜上,DNA 固定后与探针(³²P-dCTP 标记的 *npt* 基因和 DNA)杂交,最后放射自显影到 X 光片上。

3 结果

3.1 植株再生及转化体筛选

3.1.1 预培养对香石竹在转化中叶片分化的影响 试验结果表明:不进行预培养,香石竹叶片

的分化率只有 1.0%, 预培养可明显提高农杆菌感染后叶片的分化率, 预培养 1 d, 其分化率为 6.3%, 以预培养 2 d 的效果最好, 其分化出正常芽的频率最高, 达 12.0%, 比不预培养提高了 11 倍, 但随着预培养时间的增加, 其分化频率又下降, 到预培养 3 d 时, 其分化率又降至 7.1%。

3.1.2 不同香石竹品种在转化上的差异 植物不同的品种, 由于基因型不同, 其转化频率亦存在差异。用 LBA4404/pBECKS. GUSintron 对 5 个香石竹品种的转化结果表明: 与对照相比, 经根癌农杆菌感染后, 5 个品种在选择培养基上的不定芽分化时间晚 2~3 d, 外植体膨大, 伸长较慢, 后期外植体逐渐死亡(图版 F1)。分化频率都显著降低, 平均降低 49.8%; 不同品种的分化频率不同, 以 Master、Virginie 品种最高, Oriana、Laurrella 品种次之, 而 Sahala 品种与其它品种差别最大, 其分化频率最低(表 1)。

表 1 不同香石竹品种在转化上的差异

品种	Master	Oriana	Laurrella	Sahala	Virginie	平均
对照分化率/ %	66.2	68.9	65.0	49.0	60.5	61.9
转化分化率/ %	16.1	15.0	13.3	1.7	14.5	12.1
相对分化率/ %	24.3	21.8	20.5	3.5	24.0	/

注: 相对分化率 = $\frac{\text{转化分化率}}{\text{对照分化率}} \times 100\%$

3.1.3 AgNO₃ 对香石竹转化的影响 用 LBA4404/ GUS 对 'Master', 'Laurrella', 'Sahala'

3 个品种的转化培养表明, 未加 AgNO₃ 者 3 个品种的转化率分别为 16.1%、13.3% 和 1.7%, 而加入 AgNO₃ (20 μmol) 者其转化率分别为 8.5%、2.2% 和 0, 其分化率均明显降低, 并且外植体褐化现象严重, 开始褐化的时间也较早, 一周后外植体的受伤部位开始变为土黄色, 并逐渐加深为黄褐色, 其余部位颜色变暗绿, 而对照则为黄绿色, 表明 AgNO₃ (20 μmol) 对香石竹的转化起抑制作用。

3.2 转基因植株的鉴定

3.2.1 生根培养 将继代培养 1 代后的转化苗置于含 25 mg L⁻¹ 卡那霉素的生根培养基上生根, 生根率为 72.1% (图版 I- 2、I- 3)。与对照相比, 出现根的时间晚 3 d 左右, 且生根速度缓慢, 生根量较少。未生根的苗前期茎叶亦能生长, 但后期茎叶逐渐自下而上枯黄。已生根的植株初步表明外源基因得到了转化, 未生根的植株予以淘汰。

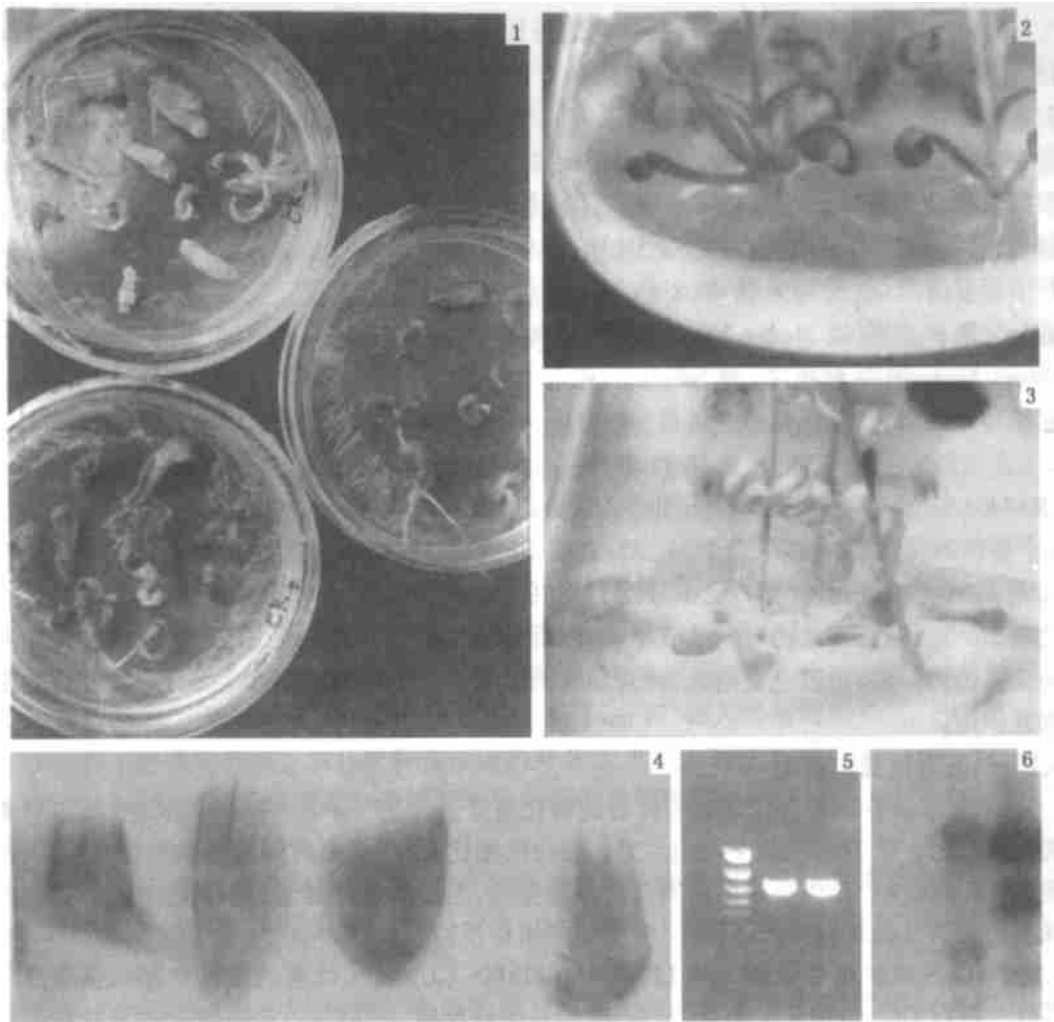
3.2.2 GUS 组织化学分析 从 LBA4404/pBECKS. GUS 转化处理的植株中随机抽取 20 株, 取其叶片进行 GUS 组织化学染色, 结果 11 株呈阳性反应, 占 55%。显微镜检可见叶片的叶脉部位明显呈蓝色, 未转化的对照植株的叶片未见蓝色(图版 I- 4)。

3.2.3 PCR 分析 从生根后的植株中随机选取 28 株, 提取植物总 DNA, 用 *npt* 基因序列两端的特异引物作 PCR 扩增。扩增结果有 9 个样品呈阳性反应, 占 32.2%, 扩增出约 0.7 Kb 的片段, 与质粒 DNA 扩增出的片段大小相同, 表明外源基因已进入植物体内。而空白对照与未转化对照均未扩增出特异片段(图版 I- 5)。

3.2.4 Southern 杂交分析 从 PCR 扩增呈阳性的样品中取样品作 Southern 杂交分析。放射自显影显示有杂交带(图版 I- 6), 证实外源基因已整合到植物基因组中。

4 讨论

关于预培养的效果, 因植物种类而异。一些研究表明预培养可以提高外源基因的瞬间表达和转化率, 如诸葛菜 (*Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz) 预培养 2 d, 转化率提高 50 倍^[15]。但对烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 和苜蓿 (*Medicago falcate* Linn.) 的预培养并未提高转化率。而树番茄 (*Lyphomandra betacea* Sendt.) 预培养后反而降低了转化率^[2]。本试验中以预培养



图版说明

1. 卡那霉素筛选: 左上: 负对照; 左下: 正对照; 右: 在 25 mg L^{-1} 卡那霉素选择压下植株再生状况;
2. 在外加 25 mg L^{-1} 卡那霉素的培养基上生根;
3. 逃脱植株在 25 mg L^{-1} 卡那霉素的培养基上逐渐死亡;
4. GUS 检测: 左边 3 个叶片呈阳性反应, 右边为对照;
5. PCR 检测: 左边泳道为分子量标记, 右边两泳道为阳性反应;
6. Southern 杂交: 左边泳道为分子量标记, 右边泳道为阳性反应。

2 d 的转化率最高, 比对照提高了 11 倍。与国内外已有的报道相比其转化效率也有了明显提高。其原因可能是外植体刚取下后, 伤口抵抗能力较低, 不能立即接受农杆菌的侵染, 而需要有个恢复过程, 但随着预培养时间的增加, 伤口逐渐愈合, 农杆菌难以将外源基因携带到植物细胞内。因此有必要从农杆菌与植物细胞的相互关系上作深入的研究。

AgNO_3 是一种乙烯抑制剂。有证据显示, 它可以促进愈伤组织的器官发生与体细胞胚胎发生, 促进一些再生困难物种不定芽的产生, 增加外植体产生不定芽的数目及提高植株再生频

率。受伤的外植体特别是伤口处易产生较多的乙烯并积累,使培养物的生长分化受到影响。在培养基中加入 AgNO_3 ,可以提高小麦 (*Triticum aestivum* L.)、玉米 (*Zea mays* L.) 及一些芸苔属 (*Brassica*) 植物的茎芽分化频率^[15]。在诸葛菜的试验中,加入 AgNO_3 可大大减轻褐化现象,使分化率提高约 40%,而且 AgNO_3 对根癌农杆菌还有一定的抑制作用。在香石竹上的结果则相反,培养基中加入 20 μmol 的 AgNO_3 ,反而加重了外植体的褐化,使分化频率降低。香石竹是一种乙烯敏感植物,采后的花瓣会产生大量乙烯,但香石竹组培苗产生乙烯情况未见报道。本试验中可能是由于 AgNO_3 使用浓度过高,或者 AgNO_3 对香石竹叶片分化培养起抑制作用从而导致加入 AgNO_3 之后转化率反而降低,这有待于进一步的研究。

研究中发现转化苗经 3~4 次继代培养后,容易出现玻璃化现象,而在相同的培养基上,对照未发生类似情况。这表明玻璃化是由转化引起的,可能是因为用根癌农杆菌感染后,植物细胞和组织的生理机能发生变化所致。目前,有关解决玻璃化问题有较多的研究,提出了一些有效的防止措施^[16]。本研究使用 1/2 MS 培养基继代培养转化苗,很少发生玻璃化现象,又可壮苗。这表明植物激素或培养基盐分含量对玻璃化有一定的影响。此方法可较好地保存转化材料。

参考文献:

- [1] Woodson W R. Biotechnology of floricultural crops[J]. HortScience, 1991, 26(8): 1029~1033
- [2] 王关林,方宏均. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998
- [3] Woodson W R, Golsbrough P B. Genetic transformation of carnation using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. HortScience, 1989, 24(1): 80
- [4] Lu C Y, Nugent G, Wardley-Richardson T, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) [J]. Bio Technology, 1991, 9: 864~868
- [5] Van Altvost A C, Riksen T, K6horst H, et al. Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation[J]. Acta Horticulturae, 1995, 420: 92~94
- [6] Van Altvost A C, K6horst H, Jong J, et al. Transgenic carnation plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of petal explants[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1996, 169: 169~173
- [7] Savin KL, Baudioette S C, Graham M W, et al. Antisense ACC oxidase RNA delays carnation petal senescence[J]. HortScience, 1995, 30(5): 970~972
- [8] 余义勋,张俊卫,孙振元,等. 香石竹 ACC 氧化酶基因的克隆与植物表达载体构建[J]. 林业科学研究, 2002, 15(3): 256~261
- [9] Zuker A, Lchang P F, Ahroni A, et al. Transformation of carnation by microprojectile bombardment [J]. Scientia Horticulturae, 1995, 64: 177~185
- [10] 林荣呈,包满珠. 香石竹的叶片培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(3): 205~206
- [11] McCormac A C, Wu H X, Bao M Z, et al. The use of visual marker genes as cell-specific reporters of *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery to wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Euphytica, 1998, 99: 17~25
- [12] Murashige T, Skoog F. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures [J]. Plant Physiology 1962, 15: 473~497
- [13] 张俊卫,包满珠,陈龙清. 梅、桃、李、杏、樱的 RAPD 分析[J]. 北京林业大学学报, 1998, 20(2): 12~15
- [14] 傅荣昭,孙勇如,贾士荣. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994
- [15] 周冀明,王志明,许智宏,等. 根癌农杆菌介导转化诸葛菜子叶获得转基因植株[J]. 植物生理学报, 1997, 23(1): 21~28
- [16] Amita J, Husain S, Kothari S L. Micropropagation of *Dianthus caryophyllus* L. control of vitrification[J]. J of Plant Biochemistry and Biotechnology, 1997, 6(1): 35~37

Establishment of Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Genetic Transformation System of Carnation(*Dianthus caryophyllus* L.)

LIN Rong-cheng¹, CHEN Long-qing¹, BAO Mar-zhu¹, SUN Zhen-yuan²

(1. College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China;

2. Flower Center, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract : Efficient genetic transformation system of five carnation (*Dianthus caryophyllus*) cultivars has been established and optimized by using leaf explant. The results show that 2-day's pre-culture can increase the transformation frequency obviously. There are differences between carnation cultivars in transformation. 20 μ mol AgNO₃ in selection medium inhibits the adventitious shoot inducing. 72.1% transformed plants rooted on rooting medium containing 25 mg L⁻¹ kanamycin and 55% plants show GUS activity according to histochemical assay. PCR screening indicates that 32.2% of the samples are positive. Southern blot analysis demonstrates that foreign genes are integrated into plant genome.

Key words : *Dianthus caryophyllus*; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation; GUS