

灯盏花遗传转化中组织培养受体系统的研究

邱璐^{1,2}, 瞿礼嘉¹, 罗春梅³, 韩翠丽¹, 曹光宇¹ (1. 北京大学生命科学院蛋白质工程及基因工程国家重点实验室, 北京 100871; 2. 云南省楚雄师范学院, 云南楚雄 675000; 3. 云南省楚雄农业学校, 云南楚雄 675000)

摘要 对灯盏花遗传转化中组织培养受体系统进行了研究, 结果表明: 使用 MS + BA 0.2 (mg/L, 单位下同) + NAA 2.0 的培养基, 播种 10 d 的幼苗, 0.5 cm × 1.5 cm 大小的真叶作为外植体, 能在 2 周内形成愈伤组织; 使用 MS + BA 0.5 + NAA 0.5 培养基, 附加 30 g/L 蔗糖, 以真叶为外植体, 能在 2 周内诱导不定芽形成; 使用 75 μg/ml 的氯霉素 (Chl.) 作为土壤农杆菌转化培养的选择压力, 使用 50 μg/ml 的庆大霉素 (Gent.) 作为转基因植株的选择压力, 使用 300 μg/ml 的头孢霉素 (Cef.) 作为土壤农杆菌转基因的抑菌抗生素, 对灯盏花遗传转化效果最佳。

关键词 灯盏花; 遗传转化; 组织培养; 愈伤组织; 不定芽; 抗生素

中图分类号 Q949.783.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)01-0019-03

Study on Tissue Culture System of *Erigeron Breviscapus* (Vant) Hand-Mazz. for Genetic Transformation

QIU Lu et al (National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetics Engineering of Life Science College, Peking University, Beijing 100871)

Abstract The callus can form in two weeks quickly on the MS as basic medium, BA 0.2 mg/L + NAA 2.0 mg/L as hormone and the young sprout sowing for 10 days, and true leaf of size in 0.5 cm × 1.5 cm. The adventitious bud from the true leaf can quickly form on MS + BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L as medium, adding 30 g/L cane sugars. 75 μg/ml Chl. was used as the choice pressure of *Agrobacterium tumefaciens*, 50 μg/ml Gent. was used as the choice pressure of transgene plant, 300 μg/ml Cef. was used as antibiotic of repressing germ and the result of genetic transformation on *Erigeron Breviscapus* (Vant) Hand-Mazz. was the best.

Key words *Erigeron Breviscapus* (Vant) Hand-Mazz.; Genetic transformation; Tissue culture; Callus; Adventitious bud; Antibiotic

灯盏花 [*Erigeron Breviscapus* (Vant) Hand-Mazz.] 又名短葶飞蓬、灯盏细辛, 属菊科飞蓬属, 是一种重要的药用植物, 对心、脑血管疾病具有特殊疗效。目前, 灯盏花药材供不应求, 但野生数量有限, 单株灯盏乙素含量较低, 植株抗性差, 人工栽培驯化难度大, 因此通过转基因技术对灯盏花进行有效的遗传转化, 提高单株有效成分含量, 增强植株抗性显得尤为重要。笔者对灯盏花遗传转化中组织培养受体系统进行了研究, 旨在为灯盏花的遗传转化奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 灯盏花取自云南省楚雄州星升药业有限公司, 种子发芽率为 48.14%。土壤农杆菌及相关转化载体来自北京大学生命科学院蛋白质工程及基因工程国家重点实验室。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的建立。 将灯盏花种子用浓度 75% 酒精溶液消毒 10 s, 再用 0.2% HgCl₂ 溶液消毒 8 min, 无菌水冲洗 10 次后, 接种于附加 10.0 g/L 琼脂、30 g/L 蔗糖, pH 值为 5.8 的 MS 无激素培养基上。接种前, 先将种子在无菌水中浸泡 1 h, 让种子吸足水分, 并用无菌水淋湿培养基表面; 接种后置 25 °C, 暗培养 3 d, 再置于 4 000 lx、16 h/d 的光照条件下培养。3 d 后种子萌发形成无菌苗, 取其真叶、子叶、茎、根等诱导愈伤组织及不定芽。将无根丛生苗移入 MS 或 1/2 MS 无激素的培养基中, 生根形成完整植株。

1.2.2 愈伤组织的诱导。 用 BA 0.2 (mg/L, 单位下同) + NAA 2.0 的激素配比对 MS、B₅、N₆ 培养基诱导愈伤组织形成进行比较; 设计 15 种不同配比及浓度的激素处理诱导愈伤组织形成进行比较; 用 MS + 2, 4-D 1.5 + NAA 1.5 培养基对播种后 6、10、15、20 d 的真叶诱导愈伤组织形成进行比较; 用 MS + BA

0.2 + NAA 2.0 培养基对灯盏花的根、茎、子叶、真叶、种子诱导愈伤组织形成进行对比; 将灯盏花组培苗的真叶剪成 0.5 cm × 1.5 cm、0.1 cm × 0.2 cm、1.0 cm × 4.0 cm 大小诱导愈伤组织形成进行比较^[1]。

以上试验均在接种后 30 d, 统计愈伤诱导率, 愈伤出现时间, 观察并记录愈伤的长势。

1.2.3 不定芽的诱导。 设计 9 组不同激素配比及浓度处理诱导不定芽进行对比; 用 MS + BA 2.0 + NAA 0.5 培养基诱导根、茎、真叶、子叶形成不定芽进行对比; 以 MS + BA 0.5 + NAA 0.5 为基本培养基, 用 10、30、60 g/L 的蔗糖浓度进行对比^[2]。

以上试验均于接种后 30 d, 统计不定芽诱导率、不定芽出现时间, 观察并记录不定芽的长势。

1.2.4 抗生素敏感性测定。 在培养基中分别加入浓度 0、25、50、75、100 μg/ml 氯霉素 (Chl.) 进行土壤农杆菌敏感性测定对照; 在培养基中分别加入 0、25、50、75 μg/ml 庆大霉素 (Gent.) 进行灯盏花敏感性测定对照; 在培养基中分别加入 0、100、200、300、400 μg/ml 头孢霉素 (Cef.) 进行抑制土壤农杆菌生长对照。

1.2.5 转基因方法。 采用基因枪轰击法和土壤农杆菌介导法。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导结果

2.1.1 不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响。 由表 1 可知, MS 诱导灯盏花形成愈伤组织的效果明显优于 B₅、N₆。

表 1 不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响

基本培养基	接种数	形成愈伤数	愈伤诱导率/%	出现愈伤时间/d	愈伤长势
MS	20	19	94	8	++++
B ₅	20	10	50	20	++
N ₆	20	3	15	22	++

注: “++++”表示生长速度最快, “+++”表示生长速度较快, “++”表示生长速度快, “+”表示生长速度慢。下表同。

基金项目 北京大学蛋白质工程及基因工程重点实验室资助。
作者简介 邱璐(1965-), 女, 重庆人, 副教授, 从事植物组织培养及转基因研究。
鸣谢 该项研究得到陈美华教授、秦根基博士、范战民博士、毛仁基博士等的帮助。
收稿日期 2005-10-08

2.1.2 不同的激素配比及浓度对愈伤组织诱导的影响。由表 2 可知,BA 与 NAA 配伍的诱导效果明显优于 2,4-D 与 NAA 配伍、2,4-D 与 BA 配伍、2,4-D 与 KT 配伍及 2,4-D 单独使用。2,4-D 在诱导很多植物形成愈伤组织中起着重要的、不可替代的作用,但 2,4-D 对胎儿发育不利,对动物和人的神经中枢有严重损伤作用;其次它还阻碍植物次生代谢产物形成,影响愈伤组织分化成苗^[3]。而该试验结果说明,NAA 诱导灯盏花形成愈伤组织的效果优于 2,4-D,这有利于减少 2,4-D 的使用及对灯盏花次生代谢产物形成的影响,有利于愈伤组织进一步分化成苗。BA 0.2 + NAA 2.0 诱导的愈伤组织为无色,生长速度最快,长势最好。细胞分裂素/生长素的比值高低,被认为是控制芽、根、愈伤组织分化的关键,比值高有利于芽的形成,比值低有利于根的形成,比值适中有利于愈伤组织的形成^[4]。但该实验结果与此有一定差异,培养基 MS + BA 0.2 + NAA 2.0 似乎应该形成根,但结果形成了大量愈伤组织,无根形成;培养基 MS + BA 0.5 + NAA 0.5 似乎应该形成大量愈伤组织,但结果直接形成大量不定芽,这可能与激素的种类、相对比值及植物个体差异有关。用根、茎、真叶代替种子的对照实验结果相同。培养基 MS + 2,4-D 1.5 + NAA 1.5、MS + 2,4-D 1.5 + BA 1.5、MS + 2,4-D 1.5 + BA 3.0 也能较好地诱导愈伤组织形成,愈伤组织为黄绿色,但长势不如 MS + BA 0.2 + NAA 2.0。

表 2 不同的激素配比及浓度对愈伤组织诱导的影响

激素配比及浓度	愈伤诱导数	愈伤诱导率/%	愈伤出现时间//d	愈伤长势	颜色
MS + 2,4-D 1.0	15	75	20	++	黄色
MS + 2,4-D 2.0	14	70	20	++	黄色
MS + 2,4-D 3.0	13	65	20	+	黄色
MS + 2,4-D 1.5 + NAA 0.5	10	50	20	++	黄色
MS + 2,4-D 1.5 + NAA 1.5	20	100	15	+++	黄色
MS + 2,4-D 1.5 + NAA 3.0	12	60	17	++	黄色
MS + 2,4-D 1.5 + BA 0.5	7	35	17	+	黄绿色
MS + 2,4-D 1.5 + BA 1.5	20	100	17	+++	黄绿色
MS + 2,4-D 1.5 + BA 3.0	19	95	15	+++	黄绿色
MS + 2,4-D 1.5 + KT 0.5	7	35	20	+	黄色
MS + 2,4-D 1.5 + KT 1.5	13	65	21	++	黄色
MS + 2,4-D 1.5 + KT 3.0	8	40	18	+	黄色
MS + BA 0.2 + NAA 2.0	20	100	13	+++	灰白色
MS + BA 0.5 + NAA 0.5	10	50	17	+	黄绿色
MS + BA 2.0 + NAA 0.2	10	50	18	+	黄绿色

注:每种培养基种子接种数均为 20。

2.1.3 接种材料的生理状态对愈伤组织诱导的影响。由表 3 可知,接种 5~20 d 的材料,均能形成愈伤组织,且接种材料越幼嫩,越易脱分化形成愈伤组织^[4],但材料太嫩太小,愈伤组织易褐化死亡。实验发现,以接种 10 d 的灯盏花材料

作外植体,诱导愈伤组织效果最好,使用多次继代的组培苗真叶也能迅速形成愈伤组织。

表 3 子叶的生理状态对愈伤组织诱导的影响

子叶的生理状态	接种数	形成愈伤数	愈伤诱导率/%	出现愈伤时间//d	愈伤长势
接种 5 d	20	18	90	5	++
接种 10 d	10	19	95	6	++++
接种 15 d	20	19	95	8	+++
接种 20 d	20	18	90	10	++

2.1.4 不同接种部位对愈伤组织诱导的影响。由表 4 可知,茎形成愈伤组织的速度优于真叶,真叶也能较快形成愈伤,且愈伤长势较好。由于灯盏花的茎极短,体积、数量有限,故用真叶诱导愈伤组织效果较好。根虽然能较早形成愈伤组织,但愈伤长势不如真叶和茎;种子形成愈伤需要时间最长。

表 4 不同接种部位对愈伤组织诱导的影响

接种部位	接种数	产生愈伤块数	愈伤诱导率/%	出现愈伤时间//d	愈伤长势
根	20	18	90	4~5	++
茎	20	20	100	6	++++
真叶	20	18	90	7	+++
子叶	20	16	80	9	++
种子	20	19	95	12	+++

2.1.5 接种材料大小对愈伤组织诱导的影响。由表 5 可知,0.5 cm × (1.0~1.5) cm 大小的真叶诱导愈伤组织效果较好,材料太大或太小都不利于愈伤组织的形成。材料太小,愈伤组织出现时间早,但褐化死亡严重;材料太大,生长中心在叶的体积增大上,叶的体积迅速增大,但愈伤组织形成速度慢,愈伤诱导率低。

表 5 接种材料大小对愈伤组织诱导的影响

材料处理	大小 cm × cm	形成愈伤组织数	愈伤诱导率/%	愈伤出现时间/d	褐化死亡率/%
真叶去边	0.5 × (1.0~1.5)	17	85	8~10	3
真叶剪成细条	0.1 × 0.2	7	35	5	15
真叶去边	1.0 × 4.0	20	20	18	0

注:每种材料的接种数均为 20。

2.2 不定芽诱导结果

2.2.1 不同的激素配比及浓度对不定芽诱导的影响。由表 6 可知,用 MS + BA 0.5 + NAA 0.5 诱导不定芽时间最短,不定芽长势最好,诱导率最高。MS + BA 2.0 + NAA 0.5 诱导不定芽数虽最多,但不定芽玻璃化现象严重,苗弱,长势不如 MS

表 6 不同的激素配比及浓度对不定芽诱导的影响

激素配比及浓度	接种数	形成不定芽	不定芽诱导率/%	不定芽出现时间//d	单株形成不定芽数	不定芽长势
① MS + BA 1.0 + NAA 0.1	20	18	90	15	11	++
② MS + KT 1.0 + NAA 0.1	20	3	15	20	8~10	+
③ MS + ZET 1.0 + NAA 0.1	20	16	80	14	3~5	+
④ MS + BA 1.0 + IAA 0.1	20	16	80	12	8~20	++
⑤ MS + KT 1.0 + IAA 0.1	20	8	40	18	3~5	+
⑥ MS + ZET 1.0 + IAA 0.1	20	11	55	13	5~8	++
⑦ MS + ZET 5.0	20	3	15	20	3~4	+
⑧ MS + BA 2.0 + NAA 0.5	20	20	100	10	15~20	+++
⑨ MS + BA 0.5 + NAA 0.5	20	20	100	8	10~15	++++

+ BA 0.5 + NAA 0.5; BA 与 NAA 配伍诱导不定芽的效果优于 KT 与 NAA 配伍, KT 与 NAA 配伍优于 ZET 与 IAA 配伍。KT 与 NAA 配伍诱导不定芽效果虽不如 BA 与 NAA 配伍, 但芽长势好, 苗旺, 无玻璃化现象。从①、④、⑧、⑨组实验来看, BA 对灯盏花不定芽的诱导效果较好, 且随 BA 浓度的增加, 诱导出的不定芽数增加。

2.2.2 不同接种部位对不定芽诱导的影响(表 7)。用灯盏花的茎诱导不定芽效果最好, 但灯盏花的茎极短, 体积数量有限; 用真叶诱导不定芽也有较好效果, 且优于根和子叶。

表 7 不同接种部位对不定芽诱导的影响

接种部位	接种数	形成不定芽数	不定芽诱导率//%	不定芽形成时间//d	不定芽长势
根	20	12	60	15	++
茎	20	20	100	7	++++
真叶	20	20	100	9	+++
子叶	20	18	90	13	+

2.2.3 不同糖浓度对不定芽诱导的影响。由表 8 可知, 浓度 30 g/L 蔗糖诱导不定芽的效果明显优于 10、60 g/L, 加 60 g/L 蔗糖的组培苗出现畸形, 褐化死亡严重。

表 8 不同糖浓度对不定芽诱导的影响

糖浓度/g/L	接种数	形成不定芽数	不定芽诱导率//%	出现不定芽时间//d	不定芽长势	单株材料上形成的不定芽数
10	20	4	20	16	++	4
30	20	19	95	8	++++	15
60	20	1	5	30	+	1~2

以上实验说明, 灯盏花能有效形成不定芽, 且效果较好。一般通过不定芽发生途径再生植株, 遗传稳定性优于通过愈伤组织途径再生植株, 转基因效果也更好^[5]。

2.3 抗生素敏感性测定

2.3.1 土壤农杆菌对 Chl. 敏感性测定的结果。植物转基因过程中, 常在目的基因上携带抗生素抗性基因, 作为转基因识别标志。因此常在培养基中加入抗生素作为转基因抗性细菌或植物的选择压力^[6]。由表 9 可知, 使用浓度 75 $\mu\text{g/ml}$ 的 Chl. (氯霉素) 作为选择压力筛选 Chl. 标记的土壤农杆菌阳性克隆单菌落效果较好, 菌落数量少, 遗传转化阳性率高。

表 9 土壤农杆菌 Chl. 敏感性测定

浓度// $\mu\text{g/ml}$	土壤农杆菌长势	遗传转化阳性率//%
0	菌落极密集	0
25	菌落密集	10
50	菌落多	40
75	菌落稀疏	85
100	24 h 内无菌落出现	0

2.3.2 灯盏花对 Gent. 敏感性测定的结果。由表 10 可知, 使用浓度 50 $\mu\text{g/ml}$ 的 Gent. (庆大霉素) 作选择压力筛选 Gent. 标记的阳性灯盏花转基因植株效果最好。75 及 100 $\mu\text{g/ml}$ 浓度过高, 对细胞造成严重伤害, 转基因植物细胞不能正常生长。

2.3.3 土壤农杆菌对 Cef. 敏感性测定的结果。在植物转基因过程中, 用携带目的基因的土壤农杆菌侵染植物时, 一方面土壤农杆菌要有一定的浓度, 要能确保有效地进入植物细胞, 另一方面土壤农杆菌在细胞中大量生长繁殖, 会导致植物细胞死亡。为防止土壤农杆菌大量繁殖对植物细胞造成破坏, 需在培养基中加入一定浓度的 Cef. (头孢霉素) 抑制土壤农杆菌^[7]。Cef. 具有广谱抗性, 能有效抑制土壤农杆菌的生长, 同时对灯盏花的细胞无毒害作用^[8]。由表 11 可知, 使用 200 $\mu\text{g/ml}$ Cef. 浓度太低, 不能有效抑制土壤农杆菌的生长, 影响不定芽诱导; 400 $\mu\text{g/ml}$ Cef. 浓度太高, 能有效抑制土壤农杆菌的生长, 但不定芽形成较快, 影响转基因的效果; 300 $\mu\text{g/ml}$ Cef. 能有效抑制土壤农杆菌的生长, 能稳定地进行转基因, 同时对灯盏花细胞无毒害作用, 转基因的灯盏花细胞能较快形成不定芽。

表 10 转基因植物对 Gent. 敏感性测定

浓度// $\mu\text{g/ml}$	非转基因植株	转基因植株
0	植株绿色, 长势较好	植株绿色, 长势较好
25	大多白化, 20% 出现非白化	出现非白化苗
50	所有苗均出现白化	出现非白化苗
75	所有苗均出现白化	无非白化苗出现
100	所有苗均出现白化	无非白化苗出现

表 11 土壤农杆菌对 Cef. 敏感性测定

浓度// $\mu\text{g/ml}$	土壤农杆菌	灯盏花
0	菌落最多, 生长最旺盛	生长良好, 不定芽形成较慢
100	菌落较多, 生长旺盛	生长良好, 不定芽形成较慢
200	菌落多, 生长一般	生长良好, 不定芽形成慢
300	菌落少, 生长慢	生长良好, 不定芽形成快
400	菌落极少, 生长极慢	生长良好, 不定芽形成较快

3 小结

该试验结果表明: 使用 MS + BA 0.2 (mg/L, 单位下同) + NAA 2.0 的培养基, 播种 10 d 的幼苗, 0.5 cm $\times$ 1.5 cm 大小的真叶作为外植体, 能在 2 周内形成愈伤组织; 使用 MS + BA 0.5 + NAA 0.5 培养基, 附加 30 g/L 蔗糖, 以真叶为外植体, 能在 2 周内诱导不定芽形成; 使用 75 $\mu\text{g/ml}$ 的氯霉素 (Chl.) 作为土壤农杆菌转化培养的选择压力, 使用 50 $\mu\text{g/ml}$ 的庆大霉素 (Gent.) 作为转基因植株的选择压力, 使用 300 $\mu\text{g/ml}$ 的头孢霉素 (Cef.) 作为土壤农杆菌转基因的抑菌抗生素, 对灯盏花遗传转化效果最佳。

参考文献

- Na Jie, Fang Hongjin, Wang Guanlin. Establishment of receptor system of gene transformation of lettuce [J]. *Journal of Liaoning Normal University*, 1995, 18(3): 228 - 231.
- 韩美丽, 陆荣生, 朱积余, 等. 影响农杆菌介导的柑桔基因转化因素研究 [J]. *云南植物研究*, 1999, 21(4): 35 - 41.
- 谢启昆. 药用植物组织培养 [M]. 上海: 上海科学出版社, 1986. 10 - 11.
- 曹宗翼, 吴湘钰. 植物生理学 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1980. 168.
- 宁经元, 张荫麟, 任春玲. 农杆菌介导的药用植物的转化 [J]. *中国中药杂志*, 2000, 25(2): 73 - 76.
- 龔礼嘉, 顾红雅, 胡平, 等. 现代生物技术导论 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002. 243 - 249.
- 顾红雅, 龔礼嘉, 陈章良, 等. 植物基因与分子操作 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1995. 237.
- Wu Jianguo, Chen Shuangyan, Shi Chunhai, et al. Study on culture system in gene transformation of indica rice [J]. *Chinese Agriculture Science Bulletin*, 2002, 18(1): 36 - 40.