

矮牵牛 *Tidal Wave* 品种遗传转化受体再生体系的建立

武术杰

(长春大学, 长春, 130031)

李邱华

(中国农业大学)

摘要 以矮牵牛 *Tidal Wave* 品种无菌苗叶片为外植体, 在附加不同质量浓度激素的 MS 基本培养基上诱导培养, 通过器官发生途径获得再生植株。在附加 3.0 mg/L BA、0.3 mg/L NAA 的培养基上获得了 90% 以上芽的再生率。再生芽在附加 0.02 mg/L NAA、1.0 mg/L KT、5.0 mg/L GA₃ 的培养基上发育良好。在 3 种选择抗生素的筛选中发现, 叶片对潮霉素和庆大霉素较为敏感, 这 2 种抗生素质量浓度为 5 mg/L 时, 2 周内可将外植体全部杀死; 而卡那霉素质量浓度达到 15 mg/L 时, 芽分化才被完全抑制。因此可确定卡那霉素为理想的选择抗生素, 其选择压质量浓度为 15 mg/L。2 种抑菌抗生素中, 头孢霉素对叶片再生影响较大; 而 250 mg/L 的羧苄青霉素能有效地抑制农杆菌菌株 LBA4404 的生长, 但对矮牵牛叶片的芽分化影响不大, 为适宜的抑菌抗生素。

关键词 矮牵牛; 组织培养; 遗传转化; 再生体系

分类号 S681.6

Establishment of Regeneration System for Genetic Transformation for Common Garden Petunia 'Tidal Wave' / Wu Shujie (Changchun University, Changchun 130031, P. R. China); Li Qihua (China Agricultural University) // Journal of Northeast Forestry University. - 2007, 35 (4). - 14 ~ 15, 27

Regeneration plantlets were obtained from young leaf explants of the petunia 'tidal wave' induced on MS medium supplemented with different concentrations of antibiotics by organogenesis. Results indicated that the regeneration rate of plantlets reached above 90% on MS medium supplemented with 3.0 mg/L BA and 0.3 mg/L NAA. The regeneration shoots were well developed on MS medium supplemented with 0.02 mg/L NAA, 1.0 mg/L KT, and 5.0 mg/L GA₃. Among the three kinds of selective antibiotics, the explants are very sensitive to hygromycin and gentamicin, and they will entirely die in two weeks at a concentration of 5 mg/L. However, the shoot differentiation can be inhibited at a concentration of 15 mg/L for kanamycin. Therefore, the optimal antibiotic is kanamycin with an optimum concentration of 15 mg/L. For the two antimicrobial antibiotics, cephamycin has an obviously effect on leaf regeneration. Carbenicillin with a concentration of 250 mg/L can inhibit the development of the agrobacterium strain LBA4404 and affect bud differentiation slightly. Carbenicillin is considered to be the appropriate antimicrobial antibiotic.

Key words Common garden petunia; Tissue culture; Genetic transformation; Regeneration system

矮牵牛 (*Petunia hybrida* Vilm), 英文名: common garden petunia, 为茄科矮牵牛属多年生草本植物。利用组织培养技术, 对具优良品种特性的矮牵牛单株进行快速无性繁殖, 不仅可以保持其优良性状, 使花色纯化, 还可以进行周年生产。矮牵牛因其组织培养比较容易, 组织与细胞操作技术简单, 生活周期短, 同时又是一种重要的花卉, 且其基因工程技术开展得也比较早, 从而成为转基因的模式植物之一。Horsch 等 1985 年首次获得了矮牵牛的转基因植株, 以矮牵牛为模式植物进行花色研究。最初阶段的研究主要集中在花色素苷代谢途径上, 结果认为在参与花色素代谢的途径中, CHS (查尔酮合成酶) 尤为重要^[1]。Weiss 等研究发现, 在矮牵牛中 GA₃ 的应用并没有阻止花色素苷生物合成基因在花冠发育过程中早期的表达减少^[2]。Weiss 等研究指出, 在调控矮牵牛花发育的过程中, 糖类起着核心作用, 此作用的发挥需要蔗糖和 GA 的共同协作。当存在蔗糖供给时, 矮牵牛花瓣才能有正常的发育和色素形成的分化^[3]。Tsukaya 等指出, 当花冠生长分化时, 如果蔗糖和 GA₃ 共同存在, 它们将伸长和变得色彩多样, 蔗糖也可以直接引导 chs 基因的表达, 同时发现 chs 基因在矮牵牛花中的表达受到胞内蔗糖水平的调控^[4]。安利忻、刘荣维等对矮牵牛的研究时发现, 花的分生组织决定基因 API 的转化^[5]。国凤利和孟繁静的研究发现, 矮牵牛易于进行根瘤农杆菌介导的基因导入, 这为利用转基因的方法研究基因的功能提供了有利的条件^[6]。

本研究以矮牵牛 *Tidal Wave* 品种为材料, 建立了叶片外植体再生和遗传转化受体再生体系, 为进一步利用基因工程

手段改良品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料: 矮牵牛 (*Petunia hybrida* Vilm, *Tidal Wave*)。

培养基: 矮牵牛受体再生体系的建立以 MS 为基础培养基, 附加不同质量浓度的 BA 和 NAA;

MS 培养基含有 3% 蔗糖和 0.6% 琼脂, pH 值为 5.8。

培养条件: 光照强度为 7 1471 x, 光照时间 16 h/d, 温度 22 ~ 24 °C, 湿度 40%。

选择抗生素: 采用不同质量浓度的卡那霉素 (kanamycin, Km)、潮霉素 (hygromycin, Hyg) 和庆大霉素 (gentamicin, G418)。

抑菌抗生素: 采用不同质量浓度头孢霉素 (cephamycin, Cef) 和羧苄青霉素 (carbenicillin, Carb)。

1.2 试验方法

无菌体系的建立: 本试验中采收试验园当年生矮牵牛 *Tidal Wave* 的种子, 用自来水流水冲洗 1 ~ 2 h, 0.1% 氯化汞杀菌 30 min, 75% 乙醇处理 5 min。然后再用无菌水冲洗 3、4 次, 接种在附加 0.2 mg/L BA、0.02 mg/L NAA 的 MS 培养基上, 待种子发芽后, 继代繁殖, 获得无菌系。

矮牵牛再生体系的建立: 无菌条件下, 分别在无菌苗上选取中层健康叶片, 剪成 0.8 cm² 大小, 将其水平向 (近轴面向上) 接种到含有植物生长调节剂 BA 和 NAA 不同质量浓度组合的 MS 培养基上, 诱导愈伤组织及再生芽发生, 选择最适宜分化的培养基。当再生芽长至 1.5 cm 高时, 将其转入不同生根培养基中进行生根培养, 并将经过不同继代次数的再生植株外植体放在附加不同 NAA 质量浓度的 1/2 MS 培养基上进行生根诱导。

矮牵牛受体再生体系的建立: 无菌条件下, 将直径为 0.8 cm 的矮牵牛叶片外植体, 分别接入到含有不同种类、不同质

第一作者简介: 武术杰, 女, 1965 年 11 月生, 长春大学生物科学技术学院, 副教授。

收稿日期: 2006 年 9 月 29 日。

责任编辑: 戴芳天。

量浓度抗生素的最适芽分化的培养基上,其中选择性抗生素选用卡那霉素(Km)、潮霉素(Hyg)和庆大霉素(G418)。抑菌抗生素选用头孢霉素(Cef)和羧苄青霉素(Carb)。根据叶片离体培养再生芽的分化率,筛选出最适合的选择抗生素、抑菌抗生素及其质量浓度。

2 结果与分析

2.1 矮牵牛再生体系的建立

2.1.1 植物生长调节剂质量浓度对矮牵牛离体叶片再生的影响

将矮牵牛‘Tidal Wave’品种的离体叶片接种于含有 BA 和 NAA 不同质量浓度组合的 MS 培养基上,其外植体愈伤诱导率和芽再生率见表 1。

表 1 植物激素(BA、NAA)质量浓度对矮牵牛 Tidal Wave 品种离体叶片愈伤组织及芽诱导的影响

BA 质量浓度/ mg · L ⁻¹	NAA 质量浓度/ mg · L ⁻¹	外植体 总数/个	外植体形成 愈伤数/个	愈伤组织 诱导率%	分化芽 数/个	单个外植体最 多分化芽数/个	芽分化 率%
0.5	0.05	60	2	3.3	0	0	0
1.0	0.10	60	60	100.0	17	8	28
2.0	0.20	60	46	77.0	71	5	68
3.0	0.30	60	56	93.0	54	15	90
0.5	0.10	60	31	51.0	9	3	15
1.0	0.20	60	60	100.0	20	7	33
2.0	0.40	40	40	100.0	16	13	40
3.0	0.60	40	34	85.0	18	6	45
0.5	0.20	40	8	20.0	0	4	0
1.0	0.40	40	23	57.0	12	3	30
2.0	0.80	40	23	57.0	16	4	40
3.0	1.20	40	9	22.0	0	7	0

对于供试品种叶片离体培养诱导的结果为:各激素组合的培养基均能不同程度地诱导出愈伤组织,也都能诱导出不定芽。在 BA 浓度为 1.0 mg/L、NAA 浓度为 0.1 mg/L;BA 浓度为 1.0 mg/L、NAA 浓度为 0.2 mg/L;BA 浓度为 2.0 mg/L、NAA 浓度为 0.4 mg/L 的 3 种组合条件下都获得了 100% 愈伤诱导率。但芽的再生率仅分别为 28.3%、33.3% 和 40.0%。在 BA 质量浓度为 3.0 mg/L、NAA 质量浓度为 0.3 mg/L 时,芽的分化率最高,达到 90%,所以此质量浓度组合为最佳选择。

2.1.2 植物生长调节剂对再生芽发育的影响

植物生长调节剂对再生芽发育的影响见表 2。对继代培养基对外植体再生芽的影响试验结果表明:再生芽在添加 NAA、KT 和 GA₃ 激素组合的发育培养基中进行发育培养,其生长状况显著好于 BA 与 NAA 激素组合,其中 NAA 0.02 mg/L、KT 1.0 mg/L、GA₃ 5.0 mg/L 组合与 NAA 0.03 mg/L、KT 0.5 mg/L、GA₃ 2.5 mg/L 组合的培养基再生芽发育最好。

表 2 继代培养基对再生芽发育的影响

继代培养基生长调节剂质量浓度/mg · L ⁻¹				外植体总 数/个	芽高 度/cm	生长 状况
BA	NAA	KT	GA ₃			
0.1	0.01			40	1.0	+
0.2	0.02			40	1.0	+
0.3	0.03			40	1.5	+
	0.01	2.0	10.0	40	2.0	++
	0.02	1.0	5.0	40	3.0	+++
	0.03	0.5	2.5	40	3.0	+++

注: + 为再生芽发育不良; ++ 为再生芽发育较好; +++ 为再生芽发育良好。

2.2 矮牵牛遗传转化受体再生体系的建立

2.2.1 抗生素质量浓度对矮牵牛离体叶片芽分化的影响

该矮牵牛 Tidal Wave 品种的叶片对卡那霉素(Km)的作用较敏感。在培养基中加入不同质量浓度的卡那霉素进行筛选培养,当质量浓度达到或超过 15 mg/L 时,叶片再生芽的发生便完全受到了抑制;质量浓度为 10 mg/L 时,仅有 42.5% 的叶片再生出芽;而质量浓度为 5 mg/L 时,可有 62.5% 的叶片

再生出芽(见表 3)。因此根据本试验结果,选用 15 mg/L 的卡那霉素作为基因转化的选择压。

表 3 矮牵牛 Tidal Wave 品种遗传转化卡那霉素(Km)选择压的确定

Km 质量浓度/ mg · L ⁻¹	外植体 总数/个	形成愈伤外 植体数/个	愈伤组织 诱导率%	分化芽外植 体数/个	芽分化 率%
0	40	37	93.0	36	90.0
5	40	39	97.5	25	62.5
10	40	27	67.5	17	42.5
15	40	8	20.0	0	0
20	40	0	0	0	0
25	40	0	0	0	0
30	40	0	0	0	0
40	20	0	0	0	0
50	20	0	0	0	0

注:培养基为 MS + 2 mg/LBA + 0.2 mg/LNAA。

该矮牵牛品种潮霉素(Hyg)和庆大霉素(G418)选择压的试验结果见表 4 和表 5。上述 2 种抗生素均对矮牵牛叶片再生具有较强的抑制作用,外植体在接入含有不同质量浓度的 2 种抗生素后,7 d 开始大量褐化,10 d 后陆续死亡,至培养 20 d 时 80% 以上的外植体死亡。试验结果表明供试矮牵牛品种不适合选用潮霉素和庆大霉素作为基因转化的选择抗生素。

表 4 矮牵牛 Tidal Wave 品种潮霉素(Hyg)选择压的确定

Hyg 质量浓度/ mg · L ⁻¹	外植体 总数/个	愈伤组织 诱导率%	芽分化 率%	外植体褐 化率%	外植体死 亡率%
0	40	93	90	0	0
5	40	0	0	85	76
10	40	0	0	87	85
15	40	0	0	90	87
20	40	0	0	100	100

注:培养基为 MS + 2 mg/LBA + 0.2 mg/LNAA。

表 5 矮牵牛 Tidal Wave 品种庆大霉素(G418)选择压的确定

G418 质量浓度/ mg · L ⁻¹	外植体 总数/个	愈伤组织 诱导率%	芽分化 率%	外植体褐 化率%	外植体死 亡率%
0	40	93	90	0	0
5	40	0	0	25.0	7.5
10	40	0	0	40.0	17.5
15	40	0	0	67.5	45.0
20	40	0	0	87.5	50.0
25	40	0	0	100.0	100.0

注:培养基为 MS + 2 mg/LBA + 0.2 mg/LNAA。

2.2.2 抑菌抗生素对矮牵牛离体叶片芽分化的影响

在进行基因转化时,被农杆菌侵染携带目的基因的外植体转入分化培养基时,要在培养基中加入抑菌抗生素来抑制农杆菌的滋生,以保证外植体的正常生长与分化。本试验中,抑菌抗生素对矮牵牛叶片再生的影响见表 6 和表 7。

表 6 头孢霉素对矮牵牛 Tidal Wave 品种离体叶片芽分化的影响

Cef 质量浓度/ mg · L ⁻¹	外植体 总数/个	形成愈伤外 植体数/个	愈伤组织 诱导率%	分化芽外植 体数/个	芽分化 率%
0	40	37	93.0	36	90.0
250	40	26	65.0	9	22.5
500	40	14	35.0	6	15.0
750	40	5	12.5	0	0

表 7 羧苄青霉素对矮牵牛 Tidal Wave 品种离体叶片芽分化的影响

Carb 质量浓度/ mg · L ⁻¹	外植体 总数/个	形成愈伤外 植体数/个	愈伤组织 诱导率%	分化芽外植 体数/个	芽分化 率%
0	40	37	93.0	36	90
250	40	26	65.0	22	55
500	40	25	62.5	12	30
750	40	0	0	0	0

注:培养基为 MS + 2 mg/LBA + 0.2 mg/LNAA。(下转 27 页)

表1 东北地区不同纬度紫椴枝叶解剖数据

北纬	叶上表皮厚度	叶下表皮厚度	栅海比值	表皮厚度(1)	皮层厚度(1)	木质部宽度(1)	韧皮部宽度(1)	导管周长(1)	晚/早比(1)
40°24'37"	19.906	13.997	0.616	14.456	69.889	205.867	200.267	107.239	0.952
42°37'34"	19.844	13.186	0.681	13.122	57.956	200.903	172.756	115.747	0.603
44°21'6"	17.267	13.192	0.538	14.451	64.581	150.922	110.911	89.264	0.548
46°04'53"	16.353	11.722	0.625	14.039	62.850	173.589	148.102	81.289	0.660
48°01'56"	15.353	9.722	0.580	14.754	62.033	160.422	138.911	96.033	0.600
50°02'23"	19.544	13.456	0.523	15.164	61.028	157.422	128.678	104.617	0.547
北纬	表皮厚度(2)	周皮厚度(2)	皮层厚度(2)	木质部宽度(2)	韧皮部宽度(2)	2年生导管周长	2年生晚材/早材比	木射线长	木射线宽
40°24'37"	12.122	47.667	49.533	308.089	183.233	110.014	0.724	34.533	6.981
42°37'34"	11.403	46.944	47.794	337.211	204.778	115.872	0.478	44.303	6.458
44°21'6"	12.172	40.061	51.833	287.711	192.689	117.919	0.427	42.401	6.550
46°04'53"	11.901	41.608	49.702	281.722	180.267	107.481	0.618	39.128	7.181
48°01'56"	11.833	41.705	50.014	273.608	176.403	110.112	0.572	35.739	7.354
50°02'23"	11.739	42.096	50.972	262.371	171.719	112.002	0.520	30.983	7.520

注:表中(1)和(2)分别代表1、2年生的紫椴枝叶。

导管周长与晚材/早材比、木射线长与木射线宽的变化规律相反。

紫椴的各解剖结构既受随纬度呈明显梯度变化的温度、水分等因子的影响,也受群落类型、坡向、坡度、坡位、土壤、生物、人为等各种无明显梯度变化的因素影响。

参考文献

- [1] 徐万林.中国蜜源植物[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1983.
- [2] 穆立嵩,韩志坚.中国保护植物分类与识别[M].哈尔滨:东北林业大学出版社,2004.
- [3] 周以良,董世林,聂绍荃.黑龙江树木志[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1986.
- [4] 刘财富,赵文华.紫椴等种子发芽温度的试验研究[J].辽宁林业科技,1998(4):12-15.

- [5] 张有富,陈文山,刘高义,等.紫椴硬枝扦插技术[J].吉林林业科技,2002,31(2):12-13.
- [6] 张国珍,陈立新,陈祥伟.紫椴人工幼林适生立地条件分析[J].东北林业大学学报,1998,26(3):56-59.
- [7] 吕秋银.紫椴优质用材林经营技术[J].吉林林业科技,2001,30(5):44-46.
- [8] 郭明辉,郭丽.抚育间伐对紫椴木材材质的影响[J].东北林业大学学报,2001,29(5):26-27.
- [9] 孙留彬,张玉兰,孟庆山,等.紫椴优良无性系的早期选择与测定[J].防护林科技,2003(1):18-53.
- [10] 王军邦,王政权,胡秉民,等.不同栽植方式下紫椴幼苗生物量分配及资源利用分析[J].植物生态学报,2002,26(3):677-683.
- [11] 徐程扬.不同光环境下紫椴幼树树冠结构的可塑性响应[J].应用生态学报,2001,12(3):339-343.

(上接15页)

在脱菌培养的培养基中加入250 mg/L和500 mg/L的头孢霉素,试验结果表明,2种质量浓度下的头孢霉素虽然能很好地抑制农杆菌的生长,但对叶片再生的影响较大,叶片再生率仅达到20%左右(见表6)。因此,在进行基因转化时不宜选用头孢霉素作为抑菌剂。从表7中可以看出,在脱菌培养的培养基中加入250 mg/L的羧苄青霉素对叶片再生影响较小,叶片再生率达55%;加入500 mg/L的羧苄青霉素可使叶片再生率达到30%。试验结果表明这2种质量浓度下的羧苄青霉素均能很好地抑制农杆菌的生长。因此在进行基因转化时,选用250 mg/L的羧苄青霉素作为抑菌剂较为合适,且在后续的转接培养中可适当降低羧苄青霉素的使用质量浓度。

3 结论

在MS培养基上附加3.0 mg/LBA、0.3 mg/LNAA,诱导4周左右时,再生芽的分化率最高,达到90%。

通过外植体脱菌抗生素和选择抗生素质量浓度的筛选,建立了适合矮牵牛的根瘤农杆菌介导的遗传转化的受体再生

体系:以15 mg/L Km为叶盘分化的抗性筛选质量浓度,以250 mg/L Carb作为筛选培养时的脱菌抗生素质量浓度。

参考文献

- [1] 邵莉,李毅,杨美珠,等.查尔酮合酶基因对转基因植物花色和育性的影响[J].植物学报,1996,38(7):517-524.
- [2] Weiss D, Van Blokland R, Kooter JM, et al. Gibberellic acid regulates chalcone synthase gene transcription in the corolla of *Petunia hybrida* [J]. *Plant Physiol*, 1992, 98: 191-197.
- [3] Weiss D, Van der Luit A, Knecht E, et al. Identification of endogenous gibberellins in *petunia* flower, induction of anthocyanin biosynthetic gene expression, and the antagonistic effect of abscisic acid [J]. *Plant Physiol*, 1995, 107: 695-702.
- [4] Tsukaya H, Ohshima T, Naito S, et al. Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from *petunia* in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 1991, 97: 1414-1421.
- [5] 安利忻,刘荣维,陈章良,等.花分生组织决定基因AP1转化矮牵牛的研究[J].植物学报,2001,43(1):63-66.
- [6] 国凤利,孟繁静.矮牵牛花器官发育的研究进展[J].植物生理学通讯,1997,33(4):292-296.