

离子注入对百合基因转化受体系统建立的影响

王 丹¹, 李景原^{1,2}

(1. 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453002; 2. 郑州大学离子束生物工程重点实验室, 郑州 450052)

摘 要:以兰州百合为研究对象,通过鳞片离体培养、抗生素筛选以及离子束处理等,建立了稳定高效的基因转化受体系统。结果表明:MS+6-BA 1.0mg/L+NAA 0.5mg/L 是不定芽诱导的适宜培养基,1/2MS+NAA 0.2mg/L+0.1%活性炭是较为适宜的生根壮苗培养基。抗生素敏感性试验表明,卡那霉素和头孢霉素选择压分别以 125mg/L 和 300mg/L 较为适宜。运用能量为 30keV 的低能氮离子束注入百合鳞片,发现 $8 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 的剂量对不定芽的诱导具有明显的刺激和促进作用。

关键词:兰州百合;组织培养;基因转化;离子注入

中图分类号:S 603.6;S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)04-0215-03

兰州百合(*Lilium davidii* var. *unicolor*)属于川百合的变种,又称大王百合、甜百合和平陆百合等,它不仅具有观赏价值,还可药用兼食用,是我国具有悠久栽培历史的优良品种之一。长期以来,百合品质和性状的改良主要依赖传统的遗传育种方法,进展比较缓慢。近年来,分子生物学的迅速发展为百合种质改良提供了全新的方法和途径,具有更加广阔和诱人的前景^[1,2]。目前,百合的转基因研究在世界范围内报道还较为少见,而良好的受体系统又直接决定其转化方法的简易以及转化再生频率的稳定和高效。现就兰州百合鳞片离体培养,生根,试管苗移栽,抗生素筛选以及离子束处理进行了探讨,旨在建立一个稳定高效的兰州百合离体再生体系,为进一步的基因转化提供良好的受体系统。

1 材料与方法

1.1 植物材料及消毒

取兰州百合的鳞片作为外植体,用自来水冲洗干净后在超净台上用 70%酒精浸泡 30s,再用 20%次氯酸钠溶液处理 15min 后用无菌水冲洗 5~6 次,最后用无菌滤纸吸干表面水分。

1.2 培养基与培养条件

所有培养基都选用 MS(Murashige and Shoog, 1962)为基本培养基,附加不同种类和浓度的生长素与细胞分裂素。蔗糖 3%,琼脂 0.7%,pH 值为 5.8,温度 23±1℃,光照时间 12h/d,光照强度 1 200Lx。

1.3 不定芽的诱导及植株再生

将鳞片分上、中、下 3 个部位切成 0.5cm×0.5cm 的

小块,接种在培养基上诱导不定芽,每 3 周继代 1 次,从而研究外植体的不同部位,不同插入方式,以及不同激素组合对不定芽发生频率的影响。不定芽长至 2~4cm 时,将其转入 1/2MS+NAA 0.2mg/L+0.1%活性炭的培养基中生根壮苗,练苗后移栽至基质培育。

1.4 抗生素敏感性试验

根据离体培养结果,用筛选出适宜的不定芽诱导培养基附加不同浓度的抗生素进行敏感性试验。卡那霉素(Kan)设置 0、25、50、75、100、125、150mg/L 7 个浓度,头孢霉素(Cef)设置 0、100、200、300、400、500、600mg/L 7 个浓度,试验过程中定期记录外植体褐变情况。

1.5 氮离子束注入对百合植株再生的影响

用郑州大学离子束生物工程重点实验室的 TITNA 低能离子注入机对兰州百合鳞片进行氮离子束注入,能量为 30keV,剂量设置 $0, 1 \times 10^{14}, 3 \times 10^{14}, 5 \times 10^{14}, 8 \times 10^{14}, 1 \times 10^{15}, 3 \times 10^{15}, 5 \times 10^{15}, 8 \times 10^{15}, 1 \times 10^{16}, 2 \times 10^{16}$ (N^+/cm^2) 11 个水平。将注入过的鳞片消毒后接种于筛选出的培养基上,诱导不定芽的分化,培养条件同上,30d 后统计其分化情况。

2 结果与分析

2.1 兰州百合不定芽的诱导

将鳞片接种于不同激素组合的培养基上诱导不定芽,10d 后鳞片由白色变为黄绿色,约 15d 后鳞片基部略有膨胀,有的在切口处出现少量淡黄绿色的愈伤组织,其后很快分化成小鳞茎状突起,而多数在鳞片腹侧不形成明显的愈伤组织就直接分化出大量的淡黄色小突起,单个的或者是沿切口边缘成排出现,然后进一步分化成不定芽。

由表 1 中可见,10 种培养基对不定芽的诱导作用各不相同,细胞分裂素与生长素配合使用比单独使用 6-BA 诱导效果要好,且生长素以较低浓度为佳。2,4-D 的使用

第一作者简介:王丹(1981-),女,河南师范大学药用植物专业在读硕士,攻读药用植物专业。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470105)。

收稿日期:2006-11-28

会形成少量愈伤组织,不利于不定芽的大量形成,因此在兰州百合基因转化时可用 MS+6-BA1.0+NAA0.5 (mg/L)作为鳞片诱导分化培养基,其分化频率高达 96.7%,且生成的不定芽密而多,叶色青绿,生长旺盛。

表 1 植物激素对鳞茎鳞片不定芽分化的影响

激素组合 (mg/L)	接种 数	分化率 (%)	芽分化情况
BA0.5+NAA0.5	60	90.0	出芽较多,生长健壮
BA1.0+NAA0.5	61	96.7	芽密而多,生长健壮
BA2.0+NAA0.5	55	74.5	芽较少,并有少量颗粒状愈伤
BA1.0	57	52.6	有褐化现象,出芽量少
BA2.0	52	44.2	有明显的褐化现象,芽稀少
BA0.5+2,4-D0.5	60	81.7	出芽较多,但生长不旺,有少量愈伤组织长出
BA0.5+2,4-D1.0	58	75.9	切口处有淡黄色愈伤,内侧同时有根和不定芽长出,芽细弱
BA1.0+2,4-D0.5	53	86.8	出芽较多,生长良好,切口处有少量白色霜状愈伤组织
BA1.0+2,4-D2.0	56	67.9	芽数较少,生长细弱,边缘处有黄色颗粒状愈伤组织

2.2 鳞片不同部位和插入方式对不定芽诱导的影响

鳞片的不同切段对不定芽的诱导有较大影响。从形成不定芽的数量看,均以下段最好,中段次之,上段最差,这与前人的研究结果相一致^[3]。此外,鳞片不同的插入方式诱导效果也不一样,由于芽点萌发部位多集中在鳞片内侧的基部切口处,内侧向上放置产生不定芽数目最多且生长速度较快,竖直插入次之,内侧向下放最差。因此,在兰州百合基因转化时,以鳞片下部切段内侧向上的方式进行培养效果最佳。

2.3 生根与移栽

不定芽转入生根培养基后,15d 后便可生根,且生根率高达 100%。选择长出 5~8 根的健壮幼苗移出光照培养箱,练苗一周后转入灭菌的基质(珍珠岩:蛭石=1:1)中移栽,待恢复长出新叶后移至温室苗圃培育。

2.4 抗生素敏感性试验

卡那霉素(Kan)是一种很强的细胞生长抑制剂,而且价格便宜,被广泛应用于植物转基因研究中。试验中,兰州百合鳞片对卡那霉素的耐受力较强,低浓度时,鳞片的分化几乎不受影响,当浓度增至 125mg/L 时,褐变率达到 93.5%,且只有极少量的鳞片能分化出幼芽,当浓度增至 150mg/L 时,外植体几乎全部褐化萎缩。由于高质量浓度的抗生素能迅速杀死细胞,而死细胞对周围细胞的生长有强烈的抑制作用,不利于转化细胞的生长,因此卡那霉素的筛选浓度以亚致死浓度即 125mg/L 较为适宜。

头孢霉素(Cef)能够抑制细菌的生长,而且是一种对植物细胞无毒害作用或毒性很低的抗生素。试验中,低浓度的头孢霉素几乎不影响百合细胞生长,其选择压在 300~400mg/L 时,即可达到较好的抑菌效果,而当浓度为 500~600mg/L 时,外植体的分化将受到了一定程度的抑制,结合经济方面的考虑,在兰州百合基因转化时,头孢霉素的选择压设为 300mg/L 即可。

2.5 氮离子束对鳞片不定芽诱导的影响

离子束集能量沉积、质量沉积和电荷沉积多种效应于一体,对生物体具有独特的损伤和诱变效应,在作物育种中具有良好的应用前景^[4]。然而,离子束在离体培养过程中对百合外植体的分化和植株再生的影响尚未见报道。该研究用能量为 30keV 的氮离子束对百合鳞片进行注入,然后接种于 MS+6-BA1.0+NAA0.5 (mg/L)培养基上,结果表明,不同的氮离子注入剂量对百合不定芽的分化数目影响很大,总体呈现先上升后下降的趋势(图 1)。当剂量为 $1 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 时,鳞片分化无明显改变,当剂量增至 $8 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 时,鳞片分化不定芽的数目明显增多,是对照的 2 倍左右,且幼苗生长健壮。随着剂量的继续增大,百合鳞片逐渐出现褐化萎蔫现象,且分化出不定芽的数目也迅速减少,用 $2 \times 10^{16} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 的剂量处理时,鳞片受损现象严重,几乎全部死亡(图 2)。由此可见,在百合组培时,先用 $8 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 剂量的离子束处理外植体,有利于刺激和促进不定芽的分化,大幅度提高出芽数目。

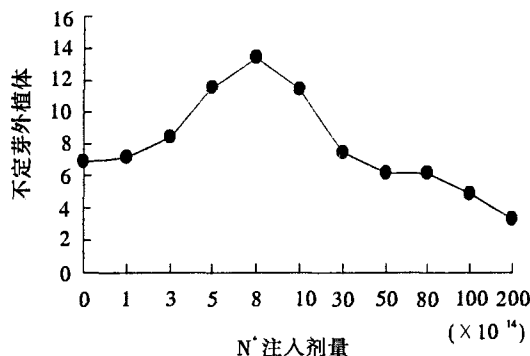


图 1 不同氮离子束剂量对不定芽分化的影响

3 讨论

目前有关百合转基因研究的报道中,多以愈伤组织作为基因转化的受体材料^[5,6],但是通过愈伤组织分化不定芽的方式在遗传稳定性方面存在一些缺陷,容易产生变异。显然,采用鳞片直接分化不定芽的途径要相对优越一些,可以避免愈伤组织阶段细胞突变的发生。试验结果表明,兰州百合以鳞片作为基因转化受体材料,配合适当的培养基和离子束处理,在短时间内即可分化出大量不定芽,且不易污染和褐变,为下一步的基因转化工作可以奠定良好的基础。

培养基中外源激素的种类和对比对百合不定芽的诱导影响较大,细胞分裂素 6-BA 有强烈的诱导出芽作用,当其用量不足时,百合鳞片会因缺乏细胞分裂素而加速衰老,但是当其用量过高时,则会使细胞体积因强烈的分裂活动而急剧缩小,从而抑制外植体的生长和分化。兰州百合在 6-BA 的质量浓度为 1.0 时,诱导出芽效果最好。将生长素 2,4-D 和 NAA 分别与 6-BA 配合使用,结果表明,2,4-D 在诱导的过程中往往伴随着愈伤组织的生成,而 NAA 则更易直接分化不定芽,但二者均

以较低浓度为佳,当浓度高于 1.0mg/L 时会直接分化出

白色的根,且出芽量减少。



1. CK; 2. $8 \times 10^{14} \text{N}^+/\text{cm}^2$; 3. $5 \times 10^{15} \text{N}^+/\text{cm}^2$; 4. $2 \times 10^{16} \text{N}^+/\text{cm}^2$

图2 不同剂量的氮离子束处理结果

在兰州百合的离体培养过程中,鳞片的分化表现出明显的位置效应。以鳞片下部形成小鳞茎的能力最强,中部次之,上部最差。说明与鳞茎盘相连接的基部组织芽分化的能力最强,是最适外植体部位。张正芳等证实:百合鳞片无论什么部位,都能诱导出小鳞茎,只是不同部位长小鳞茎的频率和发生时间有先后之分。杨成德等认为这是由于鳞片不同位置其切块的内源激素存在梯度差异造成的,龙春林等^[3]认为这还与外植体营养状况有关,因为器官原茎的形态发生过程是细胞内旺盛的能量代谢过程,而鳞茎鳞片的厚度也是基部>中部>上部。此外,由于芽点萌发部位多集中在鳞片内侧的基部切口处,鳞片内侧向上放的接种方式更适合不定芽的分化和向上伸长的趋势,与鳞片竖直插入或者内侧向下放的接种方式相比,生成不定芽数目多而且生长速度快。其原因可能是同一鳞片远轴面与近轴面细胞的内源激素水平或者生理生化特性不同,使得鳞片内侧细胞内源细胞分裂素水平高、储藏物质丰富,在同样条件下更易诱导芽的产生。

在百合基因转化过程中,不能连续分割外植体以获得最大增殖系数,因为筛选培养基中的抗生素对有切口的外植体伤害非常大,会使鳞片从伤口处褐化死亡,在筛选时必须保证其完整性,这样就大大限制了获得转基因植株的数量。试验用适当剂量的氮离子束处理外植

体的办法,显著增加了出芽率,弥补了这一不足,尤其在 $8 \times 10^{14} \text{N}^+/\text{cm}^2$ 的剂量下,不定芽的诱导数量是对照的 2 倍以上。刘世强等^[7]用氮离子束处理玉米干种子,对其 M1 代幼胚进行体培养时也发现其愈伤诱导率和再分化率均高于对照。造成这种现象是生理刺激还是遗传变异尚需要做进一步的研究。对于不同的外植体材料,其本身对离子束的敏感和耐受范围各有差异,应根据具体试验选择其合适的离子注入能量和剂量,才能得到较好的诱导效果。

参考文献:

- [1] 周国辉. 转基因植物及其应用[J]. 热带作物学报, 2000, 21(3): 70-76.
- [2] 汪政科, 彭镇华. 观赏植物基因工程研究进展[J]. 林业科学研究, 2000, 13(1): 97-102.
- [3] 龙春林, 程治英, 王俐, 等. 兰州百合器官离体培养外植体位置效应观察[J]. 云南植物研究, 2004, 26(2): 221-225.
- [4] 余增亮. 离子注入生物学研究评述[J]. 安徽农业大学学报, 1994, 21(30): 221-226.
- [5] A. A. Watad, D. J. Yun, Matsumoto, et al. Microprojectile bombardment-mediated transformation of *Lilium longiflorum*[J]. Plant Cell Rep., 1998, 17: 262-267.
- [6] A. Lipsky, A. Cohen, V. Gaba, et al. Transformation of *Lilium longiflorum* Plant for Cucunber Mosaic Virus resistance by particle bombardment[J]. Acta Hort, 2002, 568: 209-214.
- [7] 刘世强, 贾景明, 曹萍, 等. 氮离子束注入对玉米体细胞培养影响的初步研究[J]. 核技术, 1995, 18(7): 410-414.

Effects of ion Beam Implantation on the Establishment of Acceptor system of Gene Transformation of Lily

WANG Dan^{1,2}, LI Jing-yuan¹

(1. College of Life Science of Henan Normal University, Xinxiang 453002; 2. The Provincial Key Lab of Ion Beam Bio-engineering of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

Abstract: The scale leaf of Lily was taken as explant. Though the experiments of the in vitro culture of Lily, the sensibility of adventitious buds to several antibiotic and the treatment of ions implantation, a stable and efficient acceptor system of gene transformation of Lanzhou Lily was established. The results showed that the medium of MS+6-BA 1.0mg/L+NAA 0.5mg/L was optimum for the differentiation and elongation of adventitious buds. The 1/2MS+NAA 0.2mg/L+0.1%C was the suitable medium for adventitious root. The findings of experiments of the sensibility of antibiotic showed that the selection concentration of kannamycin and cefotasimine are 125mg/L and 300mg/L respectively. By the implantation of ^{14}N ion beams with the energy of 30keV, preliminary results showed that the induction of adventitious buds was greatly stimulated at the dosage of 8×10^{14} ions/ cm^2 .

Key words: Lanzhou Lily; Tissue culture; Gene transformation; Ion implantation