

盆栽非洲菊基因枪介导法转化体系的建立

毛碧增* 单兰兰 范巍巍 赵丽涵 李德葆

(浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029)

摘要 以非洲菊盆栽品种为材料, 研究了BA和NAA不同浓度组合对不定芽诱导增殖的影响; 基因枪介导法转化的不同轰击距离对转化率影响。结果表明: 1.5 mg/L BA的培养基上增殖倍数最高, 高达8.96倍; 9 cm的目标轰击距离转化效率最高, 达到10.9%。建立了非洲菊盆栽品种的再生和转基因体系, 为非洲菊基因工程育种打下基础。

关键词 盆栽非洲菊; 再生体系; 基因枪介导转化; 转基因体系; 转基因植株

非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus)是菊科大丁草属, 多年生宿根草本花卉, 又名扶郎花、大丁草。自19世纪80年代非洲菊在南非洲被发现后, 英国和法国园艺学家们相继选育了一批切花非洲菊品种, 直到20世纪80年代欧洲育成了非洲菊盆栽品种。

20世纪80年代我国才开始引入非洲菊切花品种, 近几年才从荷兰、丹麦引入盆栽非洲菊品种, 盆栽非洲菊已成为盆栽花卉的新型材料。目前国内外对盆栽非洲菊的育种及产业化生产等方面刚起步, 盆栽非洲菊基因工程育种等有关研究未见报道。本研究通过建立盆栽非洲菊快速繁殖及基因枪介导的转基因体系, 为利用生物技术进行盆栽非洲菊基因工程育种提供技术平台。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为雨燕系列的试管苗, 其商品名及花色为: 雨燕霜状橙红色。转化质粒为pCAMBIA2200(图1)。

1.2 不同培养基对非洲菊增殖的影响

取2~3 cm高的小苗接种到以MS为基本培养基的不同激素组合的16种增殖培养基中, 每种培养基5个处理, 每个处理约3~5株苗, 比较不定芽诱导增殖能力。各组分培养基均加入30 g/L食用糖, 8.0 g/L琼脂, pH 5.8, (25 ± 1.0) °C光照培养, 光照强度为60 μmol/(m²·s), 16 h/天。



图1 转基因载体pCAMBIA2200

1.3 基因枪介导的非洲菊的遗传转化

1.3.1 非洲菊小苗对Kan的敏感性 取2~3 cm高的小苗分别接种到含不同浓度(0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/L)卡那霉素(Kan)的增殖培养基(MS+0.5 mg/L BA)上, 每个浓度重复6次, 每瓶接种5株苗。

1.3.2 受体的准备 切取0.1~0.2 cm大小的茎尖组织接种于高渗培养基中(MS+ 1.5 mg/L BA +47 g/L甘露醇+47 g/L山梨醇), 每皿80个茎尖, 培养4~6 h, 待轰击。

1.3.3 DNA金粉子弹的制作 DNA金粉子弹的制作及转化参考Chen等^[1]的方法, 部分步骤进行了改良, 步骤如下: 称取直径1.0 μm金粉6 mg, 加1 ml无水乙醇, 震荡1~2次, 10 000 r/min离心10 s, 弃上清液, 加1 ml的双蒸水, 震荡1~2次, 10 000 r/min离心10 s, 弃上清液, 双蒸水重复洗涤一次后, 用100 μl双蒸水悬浮金粉。取50 μl金粉悬浮液, 加5 μg pCAMBIA2200 DNA, 低速震荡, 加20 μl新鲜的0.1 mol/L亚精胺, 一滴一滴加入50 μl 2.5 mol/L的CaCl₂, 室温下放置10 min, 10 000 r/min离心10 min, 弃上清液, 加入60 μl的无水乙醇, 低速震荡悬浮, 10 μl金粉-DNA悬浮液涂布大载膜, 至干燥待用。

1.3.4 基因枪轰击茎尖组织 PDS-1000/He(Bio-Rad)基因枪对茎尖进行轰击转化, 轰击参数为可裂膜压力为1100 psi, 轰击距离分别为6 cm和9 cm,

收稿日期: 2004-03-08 接受日期: 2004-09-06

*通讯作者。Tel: 0571-86971678, E-mail: maobz@zju.edu.cn

每个处理重复4次。

1.3.5 转化子的筛选 经轰击的茎尖组织接种到增殖培养基恢复培养一周, 再接种于含 Kan 的筛选培养基筛选抗性转化子。

1.4 转基因植株的 PCR 检测

1.4.1 转基因植株的 DNA 提取 转基因非洲菊植株 DNA 的提取方法参照文献[2], 有些步骤进行了改良, 步骤如下: 称取 1 g 非洲菊叶片, 用液氮研磨至粉状。加入 8 ml 经预热的提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 2% CTAB)预热 1 h, 每隔 10 min 摇一次, 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)混匀, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液加入 1/10 体积的 CTAB/NaCl (10% CTAB, 0.7 mol/L)混匀, 再加等体积的氯仿/异戊醇(24:1)混匀, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液加入 2/3 体积的异丙醇, 轻轻混匀。室温放置, 钩出 DNA 絮状沉淀, 吸干, 溶于 TE, 经 RNA 酶消化后, 再经乙醇沉淀纯化。制备的 DNA 样品用于 PCR 分析。

1.4.2 转基因植株的 PCR 扩增 以扩增 NPT II 基因片段为转基因阳性鉴定。NPT II 基因的引物为 P1: 5'-GCTCGACGTTGTCACCTGAAG-3'; P2: 5'-TCGTCCAGATCATCCTGATC-3', 对转基因植株进行 PCR 扩增(94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 20 s), 35 个循环, 72 °C 10 min 延伸。反应产物于 0.8% 琼脂糖电泳检查。

2 结果

2.1 不同激素组合培养基对非洲菊不定芽增殖的影响

为了建立盆栽非洲菊高效的增殖体系, 设计了以不定芽方式快速增殖的实验。取 2~3 cm 长的小苗接种于 16 种不同激素组合的增殖培养基中, 一个月后, 统计不同组合培养基不定芽增殖能力, 见表 1。

由表 1 可见, BA 浓度为 0 mg/L, NAA 浓度为 0.1~0.3 mg/L 时, 这些处理对不定芽的增殖能力与处理 1 不存在显著差异; 在 BA 浓度为 0.5~1.5 mg/L, NAA 浓度为 0.1~0.3 mg/L 时, 各处理对不定芽的增殖诱导能力与处理 1 存在显著差异, 而各处理间只有 BA 浓度为 1.5 mg/L 时, 对不定芽的诱导增殖存在显著差异。这些结果表明 NAA 对本材料不定芽的诱导增殖无明显影响, 而细胞分裂素在此起主导作用, 这与关于春石斛不定芽诱导的研究报道一

表 1 不同激素组合的培养基对非洲菊不定芽增殖的影响

处理	激素(mg/L)		接种量	增殖芽数	增殖倍数
	BA	NAA			
1	0	0	25	27	1.08 ^a
2	0	0.1	25	28	1.12 ^a
3	0	0.2	26	29	1.12 ^a
4	0	0.3	20	22	1.10 ^a
5	0.5	0	25	136	5.40 ^b
6	0.5	0.1	25	109	4.36 ^b
7	0.5	0.2	25	100	4.00 ^b
8	0.5	0.3	24	94	3.92 ^b
9	1.0	0	23	116	5.04 ^b
10	1.0	0.1	25	91	3.64 ^b
11	1.0	0.2	15	43	2.87 ^b
12	1.0	0.3	25	99	3.96 ^b
13	1.5	0	24	215	8.96 ^c
14	1.5	0.1	25	101	4.04 ^b
15	1.5	0.2	25	100	4.00 ^b
16	1.5	0.3	25	87	3.48 ^b

同列中不同小写字母表示差异达显著水平($P < 0.05$)。

致^[3]。在实验中, 还发现长期采用 1.5 mg/L BA 的增殖培养基, 继代 5 次后, 植株容易导致玻璃化, 这表明非洲菊长期生长在高浓度细胞分裂素状态下, 高频率的诱导增殖, 可能影响了内源激素及有机物等营养物质的积累。在产业化生产中, 在要追求高的繁殖系数同时, 应该结合试管苗的健壮程度, 因为试管苗的健壮程度与移栽成活率呈正相关。为此, 对于非洲菊的增殖培养基应该选用: 1.5 mg/L BA 的增殖培养基与增殖频率相对低但试管苗健壮的 0.5 mg/L BA 的增殖培养基交替使用, 可以得到较好效果。

2.2 非洲菊小苗对 Kan 的敏感性

小苗在不同浓度 Kan 选择压力下培养 1 个月后的生长统计状况见表 2。

由表 2 可见, 当 Kan 的浓度达到 25 mg/L 时, 非洲菊小苗培养 1 个月全部死亡, 因此本实验采用 25 mg/L Kan 选择转基因植株, 与 Elomaa 等^[4]报道的一致。在本实验中, 也发现当 Kan 浓度达到 15 mg/L 时, 植株新叶呈黄白色, 增殖能力降低。

表 2 非洲菊小苗对 Kan 的敏感性

Kan (mg/L)	接种量	增殖苗数	增殖倍数	成活率(%)
0	30	245	8.16	100
5	30	102	3.40	100
10	30	73	2.43	100
15	30	55	1.83	100
20	30	33	1.10	100
25	30	0	0	0
30	30	0	0	0

2.3 轰击距离对转化频率的影响

经不同距离轰击的茎尖，在无抗生素的增殖培养基上恢复1周后，转入筛选培养基(含有25 mg/L Kan的增殖培养基)中进行筛选。1个月后，统计各处理的抗性植株见表3，抗性植株进行PCR检测，45个转化子可以扩增出240 bp的NPT II的目的片段，与用pCAMBIA2200质粒设立的阳性对照一样，见图2。抗性转基因茎尖和转基因非洲菊试管苗见图3。

由表3可知，共转化了644个茎尖组织，获得Kan抗性茎尖组织106个，得到PCR阳性独立转化子45个，其中轰击距离为6 cm的转化频率只有3.72%，

表3 轰击距离对转化频率的影响

轰击距离(cm)	轰击茎尖数	抗性植株数	PCR 阳性植株数	转化率 %
6	80	11	3	3.72 ^a
	81	14	4	
	80	9	2	
	82	10	3	
9	79	15	8	10.90 ^b
	80	18	8	
	80	13	10	
	82	16	7	

同列中不同小写字母表示差异达极显著水平($P < 0.01$)。

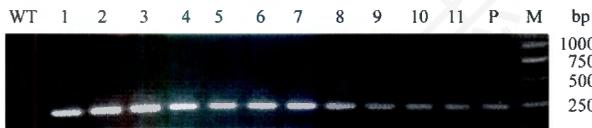


图2 转基因非洲菊植株 DNA 的 PCR 结果

P: pCAMBIA2200 阳性质粒; WT:野生型; 1~11: 转基因植株; M: 1 kb DNA ladder.

而轰击距离为9 cm的转化频率达到10.9%，不同轰击距离的转化频率存在极显著差异。

3 讨论

花卉的产业化生产中，植物组织培养是一项被国内外广泛应用的生物技术^[5]，应该综合考虑实验各流程的技术参数，在期望得到高频率的诱导增殖系数同时，要结合试管苗的质量，因为试管苗的质量关联着继代能力和试管苗的移栽成活率，最终影响着生产成本。只有合理的应用生物技术对植物进行快速繁殖，才能把实验成果应用到实际的产业化生产上。因此，在非洲菊快速繁殖技术上，应该适当的将高激素增殖培养基和低激素增殖培养基交替使用，同时综合考虑种苗增殖量和质量。

利用基因工程技术培育一些传统育种方法无法培育的性状改良的新奇品种是花卉业发展的必然趋势。已对非洲菊^[4]、菊花^[6]、康乃馨^[7]、玫瑰^[8]、兰花^[9]、唐菖蒲^[10]等主要花卉进行转基因研究，在双子叶花卉的转基因中利用农杆菌介导法转化占主导地位^[5]。由于基因枪介导法存在多拷贝插入，后代的性状遗传不稳定等现象在创立种质资源等时不太应用，但基因枪介导法转化频率高，而且实验周期短，对于可以应用组织培养技术进行大规模繁殖的物种来说，应用基因枪转化法是一种在短时间内得到新品种的有效转化方法。对于非洲菊的转化研究，Elomaa等^[4]报道了以农杆菌介导法，将查耳酮基因的cDNA反义转化了非洲菊叶柄，得到了转基因非洲菊小苗，转化频率为0.1%~2%，而本实验

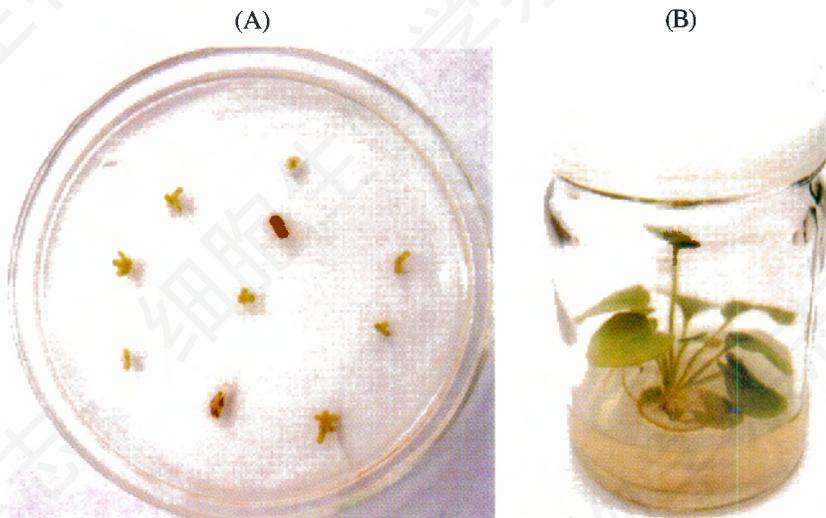


图3 抗性茎尖组织及转基因植株

A: 抗 Kan 的抗性茎尖组织; B: 转基因非洲菊植株。

利用基因枪法转化非洲菊茎尖, 得到转基因植株的转化频率达 10.9%, 可以应用基因枪法介导外源基因转化。基因枪转化的参数我们正进行进一步优化, 如设计了不同轰击压力、轰击距离以及轰击次数等, 以期提高转化频率。

参考文献 (References)

- [1] Chen L *et al.* *Nat Biotechnol*, 1998, **16**: 1060
- [2] 陈亮等。《茶叶科学》, 2002, **22**: 19
- [3] 毛碧增等。《浙江大学学报(理学版)》, 2003, **30**: 580
- [4] Elomaa P *et al.* *Biotechnol*, 1993, **11**: 508
- [5] Zuker A *et al.* *Biotechnol Adv*, 1998, **16**: 33
- [6] Seiichi F *et al.* *Breeding Sci*, 1995, **45**: 179
- [7] van Altvorst AC *et al.* *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 1996, **169**: 169
- [8] van der Salm TPM *et al.* *Mol Breeding*, 1997, **3**: 39
- [9] Kuehnle AR *et al.* *Plant Cell Rep*, 1992, **11**: 484
- [10] Kamo K *et al.* *Plant Sci*, 1995, **110**: 105

Transformation of Potted *Gerbera jamesonii* Bolus Using Particle Bombardment

Bi-Zeng Mao*, Lan-Lan Shan, Wei-Wei Fan, Li-Han Zhao, De-Bao Li

(*Biotechnology Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

Abstract The *in vitro* regeneration and transformation of potted *Gerbera jamesonii* Bolus were investigated. The effects of hormone and hormone combination on the adventitious buds proliferation and target distance on the transformation frequency were studied. The results indicated that 1.5 mg/L BA significantly increased adventitious buds proliferation to 8.96-fold than that of hormone free treatment. 9 cm target distance significantly improved the transformation frequency, which was up to 10.9%.

Key words potted *Gerbera jamesonii* Bolus; regeneration system; particle bombardment; transformation system; transgenic plants

Received: March 8, 2004 Accepted: September 6, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-571-86971678, E-mail: maobz@zju.edu.cn