

地被菊花 Fall Color 体细胞胚途径再生、遗传转化及转基因植株的抗寒性检测

洪波¹, 仝征¹, 李邱华¹, 马超¹, KASUGA Mie², YAMAGUCHI-SHINOZAKI Kaziko², 高俊平¹

(¹ 中国农业大学观赏园艺与园林系, 北京 100094; ² Biological Resources Division, Japan International Research Center for Agricultural Sciences, 1-1 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki, 305-8686 Japan)

摘要: 【目的】培育耐寒性强的地被菊花 [*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] 新材料。【方法】以 Fall Color 品种的幼嫩叶片为外植体, 探讨胚状体诱导所需的植物生长调节剂浓度和诱导培养时间等条件。【结果】叶片外植体在添加 0.75 mg · L⁻¹ 2, 4-D 的诱导培养基上诱导 15 d, 再进行分生培养, 不仅能够诱导胚性愈伤组织形成, 还能够诱导胚状体发生, 并进一步诱导芽再生, 最终 93% 的供试外植体通过胚状体途径获得芽的再生。通过根癌农杆菌介导法将 35S 启动子驱动逆境诱导转录因子 *DREB1A* 基因导入该品种。转化株在低温下的种子发芽率、扦插苗生长以及植株露地越冬生长状况等方面都明显优于对照。【结论】本研究成功地建立了地被菊花 Fall Color 体细胞胚再生途径, 并成功地获得了具有越冬耐性的地被菊花转化株系。

关键词: 菊花; 地被菊花; 体细胞胚; 遗传转化; *AtDREB1A*; 抗性检测

Regeneration and Transformation Through Somatic Embryogenesis, and Determination of Cold Stress Tolerance in Ground Cover Chrysanthemum cv. Fall Color

HONG Bo¹, TONG Zheng¹, LI Qiu-hua¹, MA Chao¹, KASUGA Mie²,
YAMAGUCHI-SHINOZAKI Kaziko², GAO Jun-ping¹

(¹ Department of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, China Agricultural University, Beijing 100094;
² Biological Resources Division, Japan International Research Center for Agricultural Sciences,
1-1 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki, 305-8686 Japan)

Abstract: 【Objective】This article aims at breeding of new materials with tolerance to cold conditions in ground-cover chrysanthemum [*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura]. 【Method】Young leaf explants of the cultivar, Fall color, were used to determine the optimum conditions of both concentration of plant growth regulator and induction time to establish a high frequency regeneration system through somatic embryogenesis. 【Result】The explants incubated for 15 d on IM containing 0.75 mg · L⁻¹ 2,4-D generated not only embryo callus tissue, but also somatic embryos. The somatic embryos emerged shoot with 93% of shoot regeneration rate after further regeneration culture. *AtDREB1A*, a stress-inducible transcription factor, driven by 35S cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter was transferred into Fall Color through *Agrobacterium*-mediated transformation. Seed germination and seedling growth at low temperature, and plant growth in winter cultivated in open-field were much improved in transgenic plants compared to WT plants. 【Conclusion】These results indicate that the authors have established successfully the embryo-generation system of ground-cover cv. Fall color, and have obtained successfully the transgenic lines with tolerance to open-field conditions in winter.

Key words: *Dendranthema grandiflorum*; Ground cover chrysanthemum; Somatic Embryogenesis; Genetic transformation; *AtDREB1A*; Determination of stress tolerance

收稿日期: 2005-10-21; 接受日期: 2006-04-05

基金项目: 农业部“948”引进项目(2003-Z45)和国家转基因植物研究与产业化开发专项(JY-B-29)

作者简介: 洪波(1965), 女, 黑龙江齐齐哈尔人, 副教授, 博士, 现工作单位为东北林业大学园林学院, 研究方向为植物分子育种及干燥花制作原理与平面压花技术。Tel: 0451-82190122; E-mail: hongbo1203@163.com。通讯作者高俊平(1960-), 男, 山西太原人, 教授、博士, 研究方向为观赏植物采后与逆境生理。Tel: 010-62732787; E-mail: gaojp@cau.edu.cn

0 引言

【本研究的重要意义】地被菊花 [*Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Kitamura] 是菊花中的一个品种群, 其花色丰富, 观赏性好, 覆盖能力强, 是中国北方城区广为应用的重要的园林绿化材料。近年来, 中国城镇化进程不断加速, 城市绿化面积大幅度提高, 对地被菊花的需求也日益加大。但是, 该植物在中国北方应用的一个限制因素是秋冬季露地生长情况下绿期较短, 因此, 开展耐寒性较强的品种培育并加以应用显得尤为重要。【前人研究进展】植物体细胞胚是由具有卵细胞特性的胚性细胞发育而来, 具有很强的接受外源 DNA 的能力, 是理想的基因转化感受态细胞^[1]。有研究表明, 体细胞胚的发生多是单细胞起源, 转化获得的转基因植株嵌合体较少。利用转基因的体细胞胚可以生产人工种子, 有利于转基因植株的生产和推广。尽管有许多尝试, 但在菊花上诱导体细胞胚仍然是较为困难的。仅有的一些报道表明, 菊花可以通过诱导叶片和茎段外植体形成体系胚^[2], 但是品种之间差异较大^[1, 3, 4]。*AtDREB1A* 基因是来源于模式植物拟南芥的逆境诱导转录因子。研究表明, 与抗逆有关的一系列基因启动子区域包含有 ABRE 和 DRE/CRT 元件, 当这些元件与逆境诱导的 DREB 转录因子结合时, 能够启动和调节这些因的表达, 从而提高植物的多重胁迫耐受性^[5]。将该基因同源导入拟南芥, 进行组成型或胁迫诱导型超量表达, 证明转化株同时具有了抗干旱、耐低温以及耐高盐胁迫等的能力^[6]。这一成果, 被认为是 20 世纪 90 年代国际抗旱分子生物学中最重要的研究成果之一。同时, 拟南芥 *AtDREB1A* 基因导入烟草^[7]、水稻^[8]、小麦^[9]、番茄^[10-11]等作物中进行异源表达, 转化株在综合耐性方面得到了证实。【本研究切入点】有关菊花基因工程的研究已有许多报道。如在菊花上成功地转化并得到表达的有选择报告基因、花色调节基因^[12, 13]、花期调节基因^[14]、株型调节基因^[15]、抗病虫基因^[16]、以及抗灰霉病基因^[17]和抗病毒病基因^[18]等。但是, 异源导入观赏植物、特别是菊花方面的研究却鲜见报道。【拟解决的关键问题】本研究以地被菊花为试材, 在通过体细胞胚状体途径建立叶片外植体高频再生体系的基础上, 采用根癌农杆菌介导法将逆境转录因子 *AtDREB1A* 基因转入地被菊花, 并对转基因地被菊花在低温下的繁殖状况及露地越冬时植株的生长状况进行研究。

1 材料与方法

试验于 2001~2005 年在北京中国农业大学科学园进行。

1.1 植物材料与培养基类型

地被菊花 [*Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Kitamura] cv. Fall Color(以下简称 Fall Color), 5~7 叶龄的扦插苗植于直径为 6 cm 的花盆内。培养基质为草炭土与蛭石 1:1, 温室内栽培。无菌系来源于茎尖外植体。培养基种类与添加成分如下:

IM (induction medium), 诱导培养基: MS + 1.5 mg·L⁻¹ IBA + 0.5 mg·L⁻¹ BA + (0.25~2.0 mg·L⁻¹) 2,4-D;

RM (regeneration medium), 分生培养基: MS+1.5 mg·L⁻¹ IBA+0.5 mg·L⁻¹ BA;

DM (development medium), 发育培养基: MS+1.0 mg·L⁻¹ KT+0.1 mg·L⁻¹ NAA+2 mg·L⁻¹ GA₃;

RTM (rooting medium), 生根培养基: 1/2 MS+0.01 mg·L⁻¹ NAA。

1.2 体细胞胚途径植株再生

从 Fall Color 无菌苗中上层幼嫩叶片中取直径为 0.8 cm 叶盘, 接种于含有 0~1.5 mg·L⁻¹ 2,4-D 的 IM 上, 分别诱导 5~25 d, 观察初级胚性愈伤组织的形成。每一处理外植体数为 40。将外植体转移到去除 2,4-D 的 RM 上进行分化培养, 约 8~10 周时在体视显微镜下观察到体细胞胚状体发生后, 转入 DM 上进行胚状体生长培养。当再生芽长至 1.5 cm 时, 转入 RTM 上进行生根培养。MS 培养基含有 3%蔗糖和 0.6%琼脂, pH5.8。培养条件为温度 22~24℃、相对湿度 40%、光强 139 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间 16 h·d⁻¹。

1.3 农杆菌介导的遗传转化

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 C58, 含质粒 pBIG, 携带 CaMV35S 启动子驱动的 *AtDREB1A* 基因, 载体中构建有 NPT II 选择基因, 该质粒由日本农林水产省农林水产业研究中心生物资源系构建。

按照上述胚状体植株再生途径进行了遗传转化。其中, 农杆菌侵染浓度为 OD₆₀₀ = 0.5~0.7 时, 用 1/2 MS 液体培养基稀释 30 倍。外植体预培养 2 d, 侵染时间为 10 min, 共培养 2 d, 诱导和筛选培养基附加有 10 mg·L⁻¹ 卡那霉素 (Km) 和 500 mg·L⁻¹ 头孢霉素 (Cef)。每隔 2 周转接 1 次, 期间观察胚状体和原初芽的形成状况。在原初芽伸长培养中, 附加 25 mg·L⁻¹

Km 和 $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cef。抗性芽生根培养时, 添加 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Km。抗性植株长至 $4\sim 5 \text{ cm}$ 高时, 取少量叶片进行 S_0 代植株在分子检测的基础上, 进行继代繁殖, 用于低温条件下的繁殖试验和冬季露地生长状况分析。

转基因植株各株系 S_1 代和对照植株于 2004 年 6 月 10 日定植于科学园温室。9 月开花前选取一定数量的花蕾按照相同株系异花授粉的方式套袋隔离。待种子充分成熟后, 按照株系分别采收, 在干燥条件下保存 (T_1 代种子)。

1.4 遗传稳定性检测

将转基因植株 T_1 代和对照种子进行流水冲洗 1 h, 75% 乙醇处理 10 min, 然后接种于附加 $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Km 的 $1/2 \text{ MS}$ 培养基上, 3 周后观察种子发芽状况。

1.5 转化株低温下 T_1 代种子发芽和 S_2 代无性繁殖

将转基因植株 2002 株系 T_1 代和对照种子接种于 $1/2 \text{ MS}$ 培养基上, 置于人工气候室内培养, 培养条件如下: 温度 12°C , 湿度 30% , 光照 $186 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 观察种子发芽状况。

取 2002 株系 S_2 代植株与对照在培养箱内进行扦插繁殖, 培养温度: 日温/夜温为 $12/4^\circ\text{C}$, 湿度: 30% , 每天 8 h 光照, 光照 $186 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。观察扦插苗生长状况。

1.6 转化株冬季露地生长状况分析

选取 $5\sim 7$ 叶龄转基因植株 3 个株系与对照植株分别于 2004 年 10 月 2 日和 11 月 15 日定植于校内花卉小区露地, 每株系 $8\sim 12$ 株, 观察自然越冬期间各株系生长状况, 记录植株受冻害或死亡状况。其中植株花蕾萎蔫、叶色灰褐、植株干枯死亡为重度伤害; 花蕾发育不良、叶色变紫、植株尚且存活为中度伤害; 花朵能够开放、叶色黄绿、植株接近正常生长为轻度伤害。

2 结果与分析

2.1 2,4-D 浓度和诱导时间对胚状体诱导的影响

从表 1 看出, 菊花叶片外植体在附加 $0\sim 1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D 的 IM 上诱导 5 d, 转入去除 2,4-D 的 RM 上进行分生培养, 没有产生初级胚性愈伤组织。从外植体诱导时间来看, 诱导 10 d 后转入 RM 上培养 2 周, 普遍变成黄绿色并产生白色不定根, 其中, $0.5\sim 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D 产生膨大、松软的初级胚性愈伤组织, 含有 0.75 和 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D 培养基诱导的外植体胚状体发生率为 53% 和 28% 。外植体诱导 15 d, 转入 RM 上

培养, 普遍形成黄色、膨大松软的初级胚性愈伤组织; 经过进一步培养, 含有 $0.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D 的培养基诱导的外植体达到了 95% 的胚状体发生率。外植体诱导 20 d 或 25 d, 虽然都能不同程度地形成初级胚性愈伤和胚性愈伤组织形成, 但最终很少形成胚状体。

将在 RM 培养基上形成的胚状体 (以球形胚阶段最佳) 剥离接种于 DM 发育培养基上, $2\sim 3$ 周后胚状体萌发产生再生芽, 继续培养 $2\sim 4$ 周, 当再生芽长至 1.5 cm 时转入 RTM 生根培养基。其中附加 $0.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IM 与诱导 15 d 的组合获得 93% 以上的胚状体途径芽再生率 (表 1)。

菊花的再生已有较多的文献报道, 多数是通过直接或间接的器官发生途径, 即外植体通过诱导产生愈伤组织, 愈伤组织增生扩繁, 最终分化出苗, 笔者的前期工作也成功地进行了地被菊花 White Snow 品种器官发生途径的再生^[19]。但是, 这种由脱分化到分化的途径很容易产生变异。菊花胚状体诱导的报道很少, 通过诱导胚状体产生植株, 不仅速度快, 数量多, 结构完整, 无需进行根的诱导, 更重要的是不易产生变异, 能保持母本的优良性状。

2.2 农杆菌介导的遗传转化

笔者在前期通过器官发生途径进行了地被菊花 White Snow 品种 *AtDREBIA* 的遗传转化^[19]的工作基础上, 探索了通过胚状体途径进行 Fall Color 品种的遗传转化。本试验将经农杆菌侵染后的叶盘接种于附加 $0.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D 的 IM 上, 并添加 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Km 和 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cef 进行筛选培养, 11 d 后大部分外植体发黄变软, 只有 $5\%\sim 10\%$ 的外植体边缘增厚隆起; 然后转入添加有 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Km 和 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cef 的 RM 上继续筛选培养 $8\sim 12$ 周, 观察到少量白色抗性愈伤组织分化产生的胚状体, 进而分化出绿色芽点。将此转入附加 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Km 和 $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cef 的 DM 上进行 $4\sim 8$ 周的第二次筛选培养, 期间部分再生芽玻璃化死亡, 少数抗性芽获得伸长生长。抗性植株的根在添加 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Km 的 RTM 上生长正常。这样, 初步筛选出 Km 抗性植株。从 Km 抗性植株 S_0 和 S_1 代植株幼嫩叶片中提取总 DNA 为模板, 进行 PCR 和 PCR-Southern 分析, 得到了预期的 453 bp 大小的片段, 并经 RT-PCR 检测外源基因的表达。为了证实外源基因的遗传稳定性, 进行了无性繁殖后代 S_1 植株的 PCR 扩增; PCR-Southern 杂交进一步获得了该基因遗传的证实^[20]。

接种于 Km 选择培养基上的转基因植株 T_1 代种子

在接种 1 周左右开始陆续发芽, 3 周后大部分种子顺利发芽, 说明具有 *Km* 抗性; 而对照植株种子在接种 2 周后有个别发芽, 3 周时观察到幼苗生长发育迟缓, 多数种子不能发芽, 说明没有 *Km* 抗性。由此推断, *AtDREB1A* 基因通过有性繁殖遗传 (图 2)。

2.3 转化株低温耐性分析

2.3.1 转化株低温下 T_1 代种子发芽和 S_2 代无性繁殖 选取 35S:*DREB1A* 转基因 4 个株系 T_1 代和对照种子, 接种于 1/2 MS 培养基上进行 10~12℃ 的低温发芽比较, 结果见图 3-A。转基因株系培养 14 d 种子开始萌发, 而对照株 20 d 种子开始萌发。28 d 后, 转基因 T_1 代种子萌发率达到 80% 以上, 其中 35S:2002 株系达

到 90%, 而对照种子仅为 26%。

取 35S:2002 株系 S_2 代与对照株在日温/夜温为 12/4℃ 培养箱内进行扦插繁殖, 生长 8 周时植入营养钵, 比较植株的生长状况, 结果见图 3-B。转化株平均株高为 7.6 cm, 平均冠幅为 7.2 cm, 而对照株平均株高仅为 4.2 cm, 平均冠幅为 4.1 cm。

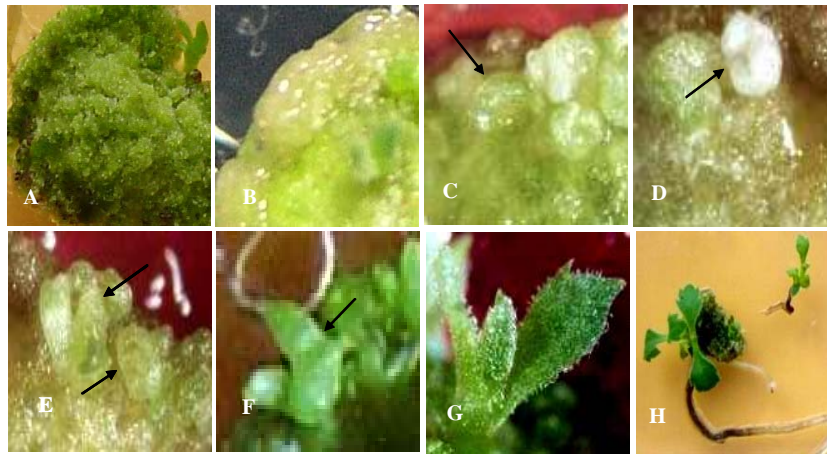
2.3.2 转化株露地越冬生长状况分析 选取转化株 1902、2002 和 2406, 共 3 个株系, 分别于 2004 年 10 月 2 日第一次定植和 2004 年 11 月 15 日第二次定植, 进行露地自然越冬生长和开花状况观察, 结果见表 2 和图 4。

表 1 不同 2,4-D 浓度和诱导时间对植株叶片外植体初级胚性愈伤组织形成、胚状体发生及芽再生的影响

Table 1 Effects of different 2,4-D concentrations and induction times on pre-embryogenic callus, somatic embryogenesis, and shoot regeneration

| 2,4-D 浓度 Concentration(mg·L ⁻¹) | 诱导时间 Induction (d) | 初级胚性愈伤 Pre-embryo- genic callus (%) | 外植体颜色和特征 Explant color and character | 胚性愈伤 Embryogenic callus (%) | 外植体颜色和特征 Explant color and character | 胚状体 Somatic embryo- genesis (%) | 芽再生率 Shoot regen- eration (%) |
|--|-----------------------|---|---|-----------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 0 | 5 | 0 | 黄绿,厚,质脆 O, T, F | 0 | 绿 G | 0 | 0 |
| 0.25 | 5 | 0 | 黄绿,厚,质脆 O, T, F | 0 | 绿 G | 0 | 0 |
| 0.50 | 5 | 0 | 黄绿,厚,质脆 O, T, F | 0 | 绿 G | 0 | 0 |
| 0.75 | 5 | 0 | 黄绿,厚,质脆 O, T, F | 0 | 绿 G | 0 | 0 |
| 1.00 | 5 | 0 | 黄绿,厚,质脆 O, T, F | 0 | 绿 G | 0 | 0 |
| 1.50 | 5 | 0 | 黄绿,厚,质脆 O, T, F | 0 | 绿 G | 0 | 0 |
| 0 | 10 | 0 | 黄,软,不定根 Y, S, adventitious root | 0 | 绿 G | 0 | 0 |
| 0.25 | 10 | 0 | 黄,软,不定根 Y, S, adventitious root | 0 | 黄绿 O | 0 | 0 |
| 0.50 | 10 | 35 | 黄,软,不定根 Y, S, adventitious root | 0 | 黄绿 O | 0 | 0 |
| 0.75 | 10 | 85 | 黄,软,不定根 Y, S, adventitious root | 65 | 黄绿 O | 53 | 53 |
| 1.00 | 10 | 42 | 黄,软,不定根 Y, S, adventitious root | 35 | 黄绿 O | 28 | 12 |
| 1.50 | 10 | 0 | 黄,软,不定根 Y, S, adventitious root | 0 | 黄绿 O | 0 | 0 |
| 0 | 15 | 0 | 黄绿,厚,质脆 O, T, F | 0 | 绿 G | 0 | 0 |
| 0.25 | 15 | 56 | 黄,软 Y, S | 79 | 黄白,松散 LY, IC | 0 | 0 |
| 0.50 | 15 | 100 | 黄,软 Y, S | 85 | 黄白,松散 LY, IC | 82 | 46 |
| 0.75 | 15 | 100 | 黄,软 Y, S | 96 | 黄白,松散 LY, IC | 95 | 93 |
| 1.00 | 15 | 100 | 黄,软 Y, S | 32 | 黄白,松散 LY, IC | 32 | 29 |
| 1.50 | 15 | 83 | 黄,软,不定根 Y, S, adventitious root | 20 | 黄白,松散 LY, IC | 0 | 0 |
| 0 | 20 | 0 | 黄绿,厚,质脆 O, T, F | 0 | 绿 G | 0 | 0 |
| 0.25 | 20 | 42 | 黄,质软 Y, S | 0 | 白色,质硬 W, C | 0 | 0 |
| 0.50 | 20 | 56 | 黄,软,不定根,芽 Y, S, adventitious root and shoot | 35 | 白色,质硬 W, C | 18 | 12 |
| 0.75 | 20 | 85 | 黄,软,不定根,芽 Y, S, adventitious root and shoot | 68 | 黄白,质硬 W, C | 26 | 22 |
| 1.00 | 20 | 85 | 黄,软,不定根,芽 Y, S, adventitious root and shoot | 60 | 黄白,质硬 W, C | 23 | 18 |
| 1.50 | 20 | 34 | 黄,软,不定根,芽 Y, S, adventitious root and shoot | 0 | 黄白,质硬 W, C | 0 | 0 |
| 0 | 25 | 0 | 黄绿,厚,质脆 O, T, F | 0 | 绿 G | 0 | 0 |
| 0.25 | 25 | 12 | 黄,质软 Y, S | 8 | 黄白,质脆 LY, F | 0 | 0 |
| 0.50 | 25 | 56 | 黄,软,不定根 Y, S, adventitious root | 45 | 黄白,质脆 LY, F | 12 | 6 |
| 0.75 | 25 | 56 | 黄,软,不定根 Y, S, adventitious root | 62 | 黄白,质脆 LY, F | 27 | 9 |
| 1.00 | 25 | 45 | 黄,软,不定根 Y, S, adventitious root | 0 | 黄白,质脆 LY, F | 0 | 0 |
| 1.50 | 25 | 36 | 黄,厚,不定根 Y, T, adventitious root | 0 | 黄白,质脆 LY, F | 0 | 0 |

表中每一处理外植体数均为 40 Explant number was 40 each treatment in the table. C. Compact; F. Fragile; G. Green; IC. Incompact; LY. Light yellow; O. Olivine; S. Soft; T. Thick; W. White; Y. Yellow.



A. 初级胚性愈伤组织; B. 胚性愈伤组织; C. 球形期体细胞胚; D. 心形期体细胞胚; E. 子叶期体细胞胚; F. 子叶期体细胞胚的发育; G. 再生芽的分化和生长; H. 体细胞胚途径再生植株的两极性
 A. Yellowish soft callus cultured on induction medium (IM) for 15 d; B. White friable callus with embryogenic structure cultured on regeneration medium (RM) for 6 weeks; C. Lobular-shaped embryo; D. Heart-shaped embryo; E. Cotyledons-shaped embryo; F. Germination stage of cotyledons; G. Regenerated shoots; H. Development of plantlet

图 1 地被菊花 Fall Color 通过胚状体途径的植株再生过程

Fig. 1 Plant regeneration via somatic embryogenesis from ground-cover chrysanthemum 'Fall Color'

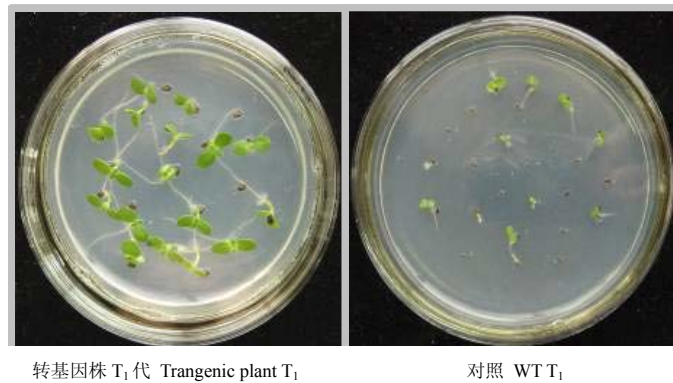


图 2 转基因植株 T₁ 代种子在添加 Kanamycin (Km) 的 1/2 MS 上培养 3 周后的发芽状况

Fig. 2 Germination of T₁ seeds of transgenic plants on 1/2 MS with supplement of Kanamycin (Km) for 3weeks.

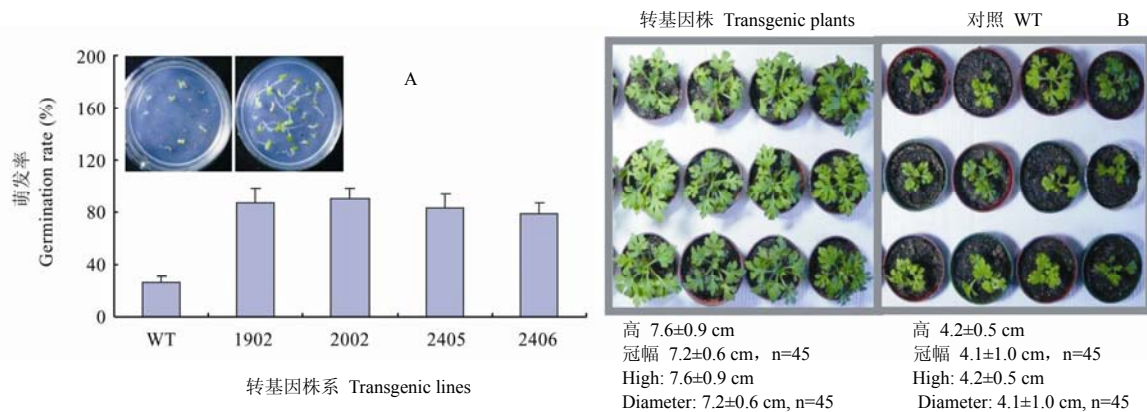


图 3 在低温下转化株 T₁ 代种子发芽率 (A) 和 S₂ 代扦插苗生长 (B) 状况

Fig. 3 Germination rate of T₁ seeds (A) and growth of S₂ cuttings in transgenic plants (B) at low temperature

第一次定植后 70 d, 此期间日平均气温为 10℃, 日极端最低气温为 6℃, 地面日极端最低温为 4℃(资料来自北京市海淀区气象局)。由表 2-A 和图 4-A 看出, 对照植株株高较低, 花蕾僵化, 不能正常开放, 叶片下垂, 叶边缘色紫, 植株受到重度伤害。而 1902、2002 和 2406 各株系花蕾发育正常, 花朵能够正常开放, 叶色没有变化, 植株生长受到影响较小。定植 130 d 后, 在此期间平均气温 2℃, 日极端最低气温-6℃, 地面日极端最低温-9℃(北京市海淀区气象局)。经历 4 个月的自然低温环境, 所有植株地上部分几乎全部干枯死亡, 对照植株无萌芽生长, 而转化株各株系均出现地下茎萌芽(表 2-B 和图 4-B)。

第二次定植 30 d, 在此期间日平均气温 8℃, 日极端最低气温 4℃, 地面日极端最低温 2℃(北京市海淀区气象局)。对照植株下层叶片变紫, 植株几乎没有生长现象, 但是转化株各株系叶色较绿, 平均株高是对照植株的 2 倍以上。定植 90 d, 在此期间日平均气温为 5℃, 日极端最低气温-2℃, 地面日极端最低温-8℃(北京市海淀区气象局)。经过 3 个月自然冬季环境, 对照植株几乎全部死亡, 转化株各株系植株虽然受到严重伤害, 如呈现叶片卷曲、叶色灰暗等症状, 但是植株依然存活(表 2-B 和图 4-B)。

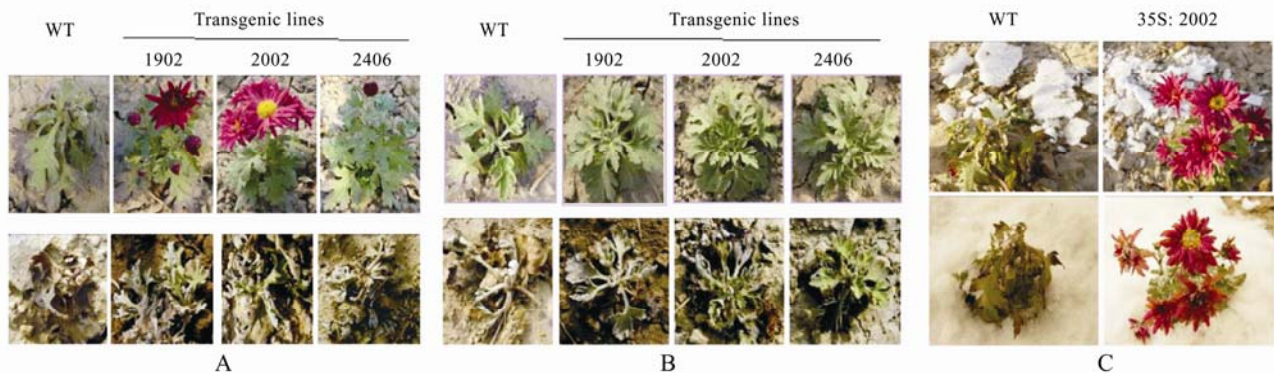
2004 年 12 月 10 日和 12 月 23 日两次降雪植株花

朵开放情况, 见图 4-C。

上述结果表明, 转基因植株在冬季寒冷环境下的成活率、生物量增加、开花情况都比对照植株有明显的改善。本试验没有对 Fall Color 品种进行花芽分化开始时所需要的最适温度进行细致的研究, 低温下能否进行花芽分化、花芽能否正常发育还不能严格判定。因此, 转基因菊花对低温的胁迫耐性只能通过与非转基因对照植株显示出的差异来进行分析。转基因植株露地栽培抗寒性提高的意义在于可以增强北方城市秋冬季节彩化效果。虽然许多地被菊花品种能够在北京地区露地越冬, 但并不见得能够在北方寒冷地区露地越冬。因此, 通过 *AtDREB1A* 基因的导入来提高地被菊花植株露地栽培抗寒性对于在北方寒冷地区推广面积的扩大具有重要的实践意义, 有关推广方面的试验将在今后进行。

3 结论

本研究首先探讨了地被菊花 (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) cv. Fall Color 的幼嫩叶片为外植体诱导胚状体诱导所需的植物生长调节剂浓度和诱导培养时间等条件, 明确了添加 0.75 mg·L⁻¹2,4-D 的 IM 培养基上诱导 15 d, 再进行分生培养的外植体不仅能够诱导初级胚性愈伤组织形成, 还



A. 露地定植时间为 2004 年 10 月 2 日; 拍照时间分别为 2004 年 12 月 15 日, 定植后 70 d (上), 2005 年 2 月 15 日, 定植后 130 d (下); B. 露地定植时间为 2004 年 11 月 15 日, 拍照时间分别为 2004 年 12 月 15 日, 定植后 30 d (上), 2005 年 2 月 15 日, 定植后 90 d (下); C. 露地定植时间为 2004 年 10 月 2 日; 拍照时间为两次降雪, 即 2004 年 12 月 10 日 (上) 和 2004 年 12 月 23 日 (下)。WT. 对照植株; 1902、2002、2406 分别为 35S:*DREB1A* 不同株系。

A. Planting time in open-field, Second, Oct 2004; photographing time, 15, Dec 2004, 70 d after planting (up), and 15, Feb 2005, 130 d (down) after planting; B. Planting time in open-field, 15, Nov 2004; photographing time, 5, Dec 2004, 30 d after planting (up), and 15, Feb 2005, 90 d after planting (down); C. Planting time in open-field, Second, Oct 2004; photographing time, 10, Dec 2004, the first snowing (up), and 23, Dec 2004, the second snowing (down). WT. Wild type. 1902, 2002, 2406: 35S: *DREB1A* transgenic lines

图 4 转化株露地不同定植时期植株生长状况

Fig. 4 Phenotype of transgenic plants with different planting times in open-field

表 2 转化株露地不同定植时期植株生长状况

Table 2 Phenotype of transgenic plants with different planting time grown in open-field

A. 2004 年 10 月 2 日定植 Planting: 2004-10-02

| 株系 Transgenic lines | 株数 Plant No. | 定植前株高 Plant height before planting (cm) | 定植后 After planting | | | | | | | |
|---------------------------|-----------------|--|----------------------------|---|----------------|---|------------------------|---------------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| | | | 70 d (2004-12-15) | | | | 130 d (2005-02-15) | | | |
| | | | 株高 Plant height (cm) | 叶色 Leaf color | 叶数 Leaf No. | 花蕾发育和花朵开放 Bud development and opening | 整株伤害程度 Plant damage | 叶芽色 Leaf and shoot color | 新生芽数 Shoot No. | 植株伤害程度 Plant damage |
| WT | 8 | 2.0 | 15.5 | 绿紫 Green and purple | 12 | 萎焉 Wilted | 重度 Heavy | 叶灰褐 Dust leaves | 0 | 死亡 Dead |
| 1902 | 12 | 2.2 | 22.5 | 绿 Green | 14 | 正常开放 Opened normally | 轻度 Slight | 叶灰褐,芽绿 Dust leaves green shoots | 3 | 地下茎萌芽 Rhizomes sprouted |
| 2002 | 8 | 2.0 | 24.3 | 绿 Green | 15 | 正常开放 Opened normally | 轻度 Slight | 叶灰褐,芽绿 Dust leaves green shoots | 2 | 地下茎萌芽 Rhizomes sprouted |
| 2406 | 12 | 1.9 | 18.0 | 绿紫,下层萎焉 Green and purple, lower leaves wilted | 13 | 部分萎焉 Wilted partly | 中度 Moderate | 叶灰褐 Dust leaves | 1 | 地下茎萌芽 Rhizomes sprouted |

B. 2004 年 11 月 15 日定植 Planting: 2004-11-15

| 株系 Transgenic lines | 株数 Plant No. | 定植前株高 Plant height before planting (cm) | 定植后 After planting | | | | | | |
|---------------------------|-----------------|--|----------------------------|-------------------------|----------------|------------------------|----------------------------|------------------|------------------------|
| | | | 30 d (2004-12-15) | | | | 90 d (2005-02-15) | | |
| | | | 株高 Plant height (cm) | 叶色 Leaf color | 叶数 Leaf No. | 整株伤害程度 Plant damage | 株高 Plant height (cm) | 叶色 Leaf color | 整株伤害程度 Plant damage |
| WT | 8 | 2.0 | 2.5 | 绿+紫 Green and purple | 12 | 重度 Heavy | 5.5 | 灰褐 Dust | 死亡 Dead |
| 1902 | 12 | 2.3 | 6.0 | 绿 Green | 19 | 中度 Moderate | 8.5 | 褐绿 Brownish | 成活 Survived |
| 2002 | 8 | 2.2 | 5.6 | 绿 Green | 21 | 轻度 Slight | 6.3 | 灰绿 Gray green | 死亡 Dead |
| 2406 | 10 | 2.3 | 5.8 | 绿 Green | 22 | 轻度 Slight | 7.5 | 暗绿 Dark green | 成活 Survived |

能够诱导胚性愈伤组织形成并进一步诱导胚状体发生; 通过再生培养可以获得 93% 的芽再生率。通过根癌农杆菌介导法将 35S 启动子驱动的逆境转录因子 *AtDREB1A* 基因导入该品种。转化株在低温下的种子发芽率、扦插苗生长以及植株露地越冬生长状况等方面都明显优于对照。

References

- [1] Pavingerova D, Dostal J, Biscova R, Benetka V. Somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation of chrysanthemum. *Plant Science*, 1994, 97: 95-101.
- [2] Roest S, Bokelman G S. Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ramat in vitro. *Scientia Horticulturae*, 1975, 3: 317-330.
- [3] May R A, Trigiano R N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 1991, 116: 366-371.
- [4] Shinoyama H, Nomura Y, Tuchiya T, Kazuma T. Direct embryoid formation and plant regeneration from leaves of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Japanese Journal of Breeding*, 1997, 46(Suppl): 158.
- [5] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2002, 53: 245-273.
- [6] Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, 1999, 17: 287-291.
- [7] Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. A combination of the *Arabidopsis DREB1A* gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant & Cell Physiology*, 2004, 45: 346-350.
- [8] Dubouzet J G, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet E G, Miura S,

- Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, 2003, 33: 751-763.
- [9] Pellegrineschi A, Reynolds M, Pacheco M, Brito R M, Almeraya R, Yamaguchi-Shinozaki K, Hoisington D. Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana DREB1A* gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. *Genome*, 2004, 47: 493-500.
- [10] Hsieh T H, Lee J T, Chang Y Y, Chan M T. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis CBF1* show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiology*, 2002, 130: 618-626.
- [11] Hsieh T. H, Lee J T, Yang P T, Chiu L H, Chang Y Y, Wang Y C, Chan M.T. Heterologous expression of the *Arabidopsis CBF1* gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiology*, 2002, 129: 1086-1094.
- [12] Mitiouchkina T Y, Dolgov S V, Cadic A. Modification of chrysanthemum plant and flower architecture by *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes* introduction. *Acta Horticulturae*, 2000, 508: 163-169.
- [13] Mitiouchkina T Y, Ivanova E P, Taran S A, Dolgov S V. Chalcone synthase gene from *Antirrhinum majus* in antisense orientation successfully suppressed the petals pigmentation of chrysanthemum. *Acta Horticulturae*, 2000, 508: 215-217.
- [14] 邵寒霜, 李继红, 郑学勤, 陈守才. 拟南芥 *LFY* cDNA 的克隆及转化菊花的研究. *植物学报*, 1999, 41: 268-271.
- Shao H S, Li J H, Zheng X Q, Chen S C. Cloning of the *LFY* cDNA from *Arabidopsis thaliana* and its transformation to *Chrysanthemum morifolium*. *Acta Botanica Sinica*, 1999, 41: 268-271. (in Chinese)
- [15] Petty L M, Harberd N P, Carre I A, Thomas B, Jackson S D. Expression of the *Arabidopsis gai* gene under its own promoter causes a reduction in plant height in chrysanthemum by attenuation of the gibberellin response. *Plant Science*, 2003, 164: 175-182.
- [16] van Wordragen M F. The use of endotoxin genes from *Bacillus thuringiensis* to introduce insect resistance in chrysanthemum callus. In: Jong J D. (ed.) *Integration of in vitro Techniques in Ornamental Plant Breeding*. Wageningen: CPO, 1990: 146-149.
- [17] Takatsu Y, Nishizawa Y, Hibi T, Akutsu K. Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Scientia Horticulturae*, 1999, 82: 113-123.
- [18] Ogawa T, Toguri T, Kudoh H, Okamura M, Momma T, Yoshioka M, Kato K, Hagiwara Y, Sano T. Double-stranded RNA-specific ribonuclease confers tolerance against chrysanthemum stunt viroid and tomato spotted wilt virus in transgenic chrysanthemum plants. *Breeding Science*, 2005, 55: 49-55.
- [19] 洪波, 张常青, 李邱华, 高俊平, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K. 根癌农杆菌介导的转录因子 *DREB1A* 基因在地被菊花中的遗传转化. *农业生物技术学报*, 2005, 13: 304-309.
- Hong B, Zhang CH Q, Li Q H, Gao J P, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K. Agrobacterium-mediated transformation of ground-cover Chrysanthemum(*Dendranthema grandiflorum* cv. White Snow) with transcription factor *DREB1A* gene. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, 13: 304-309. (in Chinese)
- [20] 洪波, 仝征, 马男, 李建科, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K., 高俊平. *AtDREB1A* 基因在菊花中的异源表达提高了植株对干旱和盐渍胁迫的耐性. *中国科学 C 辑*, 2006, 36: 223-231. (中文)
- Hong B, Tong Z, Ma N, Li J K, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Gao J P. Heterologous expression of the *AtDREB1A* gene in chrysanthemum increases drought and salt stress tolerance. *Science in China*, 2006, (in English)