

根癌农杆菌法转化康乃馨的条件探索

丁小维, 刘开辉, 邓百万, 陈文强, 刘飞虎*

(1. 陕西理工学院, 陕西省资源生物重点实验室, 陕西汉中 723001; 2. 云南大学生命科学学院, 云南昆明 650091)

摘要 [目的] 为构建高效的康乃馨遗传转化体系奠定基础。[方法] 以康乃馨叶片为受体材料, 通过抗 G418 筛选, 探讨预培养时间、根癌农杆菌菌液浓度、共培养时间等因素对根癌农杆菌介导康乃馨遗传转化的影响。[结果] 20 ng/ml G418 是康乃馨叶片转化的适宜浓度。随着预培养时间的增加, 康乃馨叶片的存活率降低, 预培养 2~3 d 时抗性芽分化率较高。当根癌农杆菌 OD₆₀₀ 为 0.5~0.8 时, 抗性芽分化率较高, 适合康乃馨转化。共培养 2~3 d 时, 康乃馨叶片生长状态好, 抗性芽分化率最高。[结论] 预培养、共培养各 2~3 d, 菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0.5~0.8 是根癌农杆菌介导康乃馨遗传转化的适宜条件。

关键词 康乃馨; 根癌农杆菌; 遗传转化

中图分类号 S682.1+62 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)13-05329-02

Exploration on the Genetic Transformation Conditions of *Dianthus caryophyllus* L. Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*
DING Xiao-wei et al (Shaanxi Key Laboratory of Bio-resources, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001)

Abstract [Objective] The research aimed to lay the foundation for constructing the highly efficient genetic transformation system of *Dianthus caryophyllus* L. [Method] With the leaves of *D. caryophyllus* as receptor materials, the effects of such factors as preculture time, the concn. of *Agrobacterium tumefaciens* and coculture time on the genetic transformation of *D. caryophyllus* mediated by *A. tumefaciens* were studied through G418 screening. [Result] 20 ng/ml G418 was the suitable concn. for the transformation of *D. caryophyllus* leaves. With the increasing of preculture time, the survival rate of *D. caryophyllus* leaves were reduced. When preculture time was 2~3 d, the differentiation rate of resistant buds were higher. When OD₆₀₀ of *A. tumefaciens* was 0.5~0.8, the differentiation rate of resistant buds were higher and favorable for the transformation of *D. caryophyllus*. When coculture time was 2~3 d, the growth state of *D. caryophyllus* leaves were good and the differentiation rate of resistant buds were highest. [Conclusion] Both preculture and coculture for 2~3 d and the bacterial liquid concn. OD₆₀₀ of 0.5~0.8 were the suitable conditions for the genetic transformation of *D. caryophyllus* mediated by *A. tumefaciens*.

Key words *Dianthus caryophyllus* L.; *Agrobacterium tumefaciens*; Genetic transformation

康乃馨(*Dianthus caryophyllus* L.)为石竹科石竹属多年宿根性草本植物,是世界著名的四大切花之一。是典型的呼吸跃变型花卉,花期短。通过植物基因工程的方法可以控制其乙烯生物合成,以达到延长花期的目的。以根癌农杆菌介导转入康乃馨花瓣、叶片在国内外虽已有报道^[1-3],但转化难度高、频率低,很难得到正常生长的转基因植株,因此至今未形成一个有效的康乃馨遗传转化体系。笔者研究影响康乃馨转化的一些主要因素,为构建一个高效的康乃馨遗传转化体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料。康乃馨材料由云南省农业科学院花卉研究所提供,品种为俏新娘。康乃馨的顶芽用75%酒精消毒30 s,无菌水冲洗5~6次后,用0.1%升汞溶液消毒6 min,无菌水冲洗5~6次后,接种到附加BA 0.3 ng/L和NAA 0.1 ng/L的MS培养基中,于22℃、光照12 h条件下培养,待无菌苗长到10 cm左右,取其顶端叶片作为转化材料。

1.1.2 菌株及质粒。根癌农杆菌菌株为EHA105,所含质粒上构建有目的基因康乃馨反义ACC氧化酶基因和植物抗性筛选标记NPT⁺基因。

1.2 方法

1.2.1 根癌农杆菌的培养与保存。根癌农杆菌培养在含有25 ng/L Rf(利福平),25 ng/L Str(硫酸链霉素),50 ng/L Kan(卡拉霉素)的YEP培养基,置-70℃冰箱中冷冻、保藏。

1.2.2 康乃馨 G418 敏感性测试。取康乃馨无菌苗顶端第

2~4片叶接种于MS附加一定浓度G418的固体培养基上,G418浓度分别为0、10、20、40、60、80 ng/ml,每处理接种10瓶,每瓶3片叶。于22℃、光照12 h条件下培养,5 d观察1次叶片生长状况。

1.2.3 康乃馨叶片在转化前的预处理。取无菌苗顶端第2~4片叶接种于MS附加1.0 ng/L BA及0.3 ng/L NAA的固体培养基上分别进行预培养1、2、3、4 d,于22℃暗培养。

1.2.4 根癌农杆菌菌液的制备。从YEP平板上挑取单菌落接种于液体YEP培养基上(Rf 25 ng/L, Str 25 ng/L, Kan 50 ng/L),于28℃、200 r/min振荡培养过夜,扩大培养至对数生长期,离心搜集菌体,用MS液体培养基分别稀释制备成OD₆₀₀为0.5、0.8、1.0的根癌农杆菌菌液。

1.2.5 转化与筛选。将预培养过的外植体在根癌农杆菌菌液中浸泡10 min,然后转入共培养基中,共培养时间分别为1、2、3、4、5 d。共培养一定时间后转移到筛选培养基中,筛选培养基中逐渐加大G418浓度。待分化出的苗长至2~3 cm时,从基部切下转入生根培养基培养并移栽。

2 结果与分析

2.1 康乃馨 G418 敏感性鉴定 G418浓度为0、10、20、40、60、80 ng/ml时,叶片白化率分别为0、10%、50%、76%、85%、98%。由此可见,康乃馨叶片对G418很敏感。在未加G418选择压的培养基上,叶片白化率为0。当G418为20 ng/ml时,50%康乃馨的叶片经过20 d的培养慢慢变白。当G418为60 ng/ml时,经过20 d的培养85%的康乃馨叶片都变白死亡。因此确定20 ng/ml G418为转化叶片适宜选择浓度。

2.2 植物材料的选择和预培养同一品种,康乃馨材料来源不同,其对根癌农杆菌感染的耐受力及G418的选择压不同。若以田间叶片为外植体时,G418的浓度较高,对根癌农杆菌的耐受力较强;而以组培苗叶片为外植体时,G418浓度

基金项目 陕西省教育厅重点科研项目(03JK027)。

作者简介 丁小维(1979-),女,陕西咸阳人,硕士,讲师,从事生物资源的保护、开发与利用方面的研究。* 通讯作者。

收稿日期 2008-02-29

较低,对根癌农杆菌的耐受力较弱,可能是组培苗叶片较为幼嫩。但它们的分化再生能力和生长状态无显著差异。

预培养可以促进细胞分裂,分裂状态的细胞更易整合外源基因,因而可以提高转化效率。不预培养或预培养时间过短,外源基因不容易整合进植物细胞,用根癌农杆菌感染后,转化效率低,容易出现嵌合体。预培养时间过长,外植体伤口处膨大疏松,且伤口逐渐愈合,难以浸染,康乃馨材料容易玻璃化。从表1看出,随着预培养时间增加,叶片存活率降低,预培养2~3 d可以得到较高的抗性芽诱导率。因此,预培养2~3 d较为适宜。

表1 预培养时间对叶片的影响

Table 1 Effects of preculture time on leaves

时间 Time d	外植体数 Explant number 片	存活率 Survival rate %	芽分化率 Differentiation rate of resistant buds %
1	85	90.1	1.2
2	85	85.3	2.6
3	65	84.4	2.8
4	64	67.4	0.8

2.3 根癌农杆菌的培养和稀释 根癌农杆菌浓度高,选择培养时,潜伏的根癌农杆菌容易过度生长,会对叶片造成污染,导致叶片死亡;浓度太低,转化效率降低。表2表明,当根癌农杆菌 OD₆₀₀ 为0.5~0.8时,抗性芽分化率均较高,适宜于康乃馨转化。

表2 农杆菌菌液浓度对叶片的影响

Table 2 Effects of *A. tumefaciens* concentrations on leaves

浓度 OD ₆₀₀ Concentration	外植体数 Explant number 片	芽分化率 Differentiation rate of resistant buds %
0.5	120	2.1
0.8	60	2.6
1.0	64	1.6

2.4 植物材料与农杆菌的共培养 康乃馨叶片对根癌农杆菌的耐受力较差,感染时间一般为8~10 min,其后于19~22℃共培养。康乃馨对温度的要求较严格,若温度超过22℃时,其再生芽玻璃化率明显增加,若温度低于19℃,其生长缓慢。

外植体与根癌农杆菌的共培养是T-DNA转移到植物细胞的过程,共培养时间的长短影响到T-DNA片段能否成功转入植物细胞^[4]。由表3看出,相同G418选择压,共培养时间不同,叶片存活率和抗性芽分化率不同。共培养2~3 d时,叶片生长状态好,其抗性芽分化率最高。随着共培养时间增加,叶片生长状态较差、存活率降低,其抗性芽分化率降低。说明共培养时间越长,叶片受到伤害越大,而这种伤害主要来自根癌农杆菌的过度生长。所以2~3 d为康乃馨叶片适宜的共培养时间。

共培养后,根癌农杆菌的过度生长是一个主要问题。为

了解决这个问题,共培养采用了2种试验方案。一是MS固体培养基进行共培养;二是将MS液体培养基滴入双层滤纸上进行共培养。试验发现,2种方案各有优缺点。第1种方案简单,污染可能性低,但芽分化率低,根癌农杆菌很容易过度生长。第2种方案较烦琐,操作过程中容易造成污染,操作中若滴入液体太多,玻璃化严重,芽分化率降低,但芽分化能力较强,根癌农杆菌生长容易控制住。

表3 共培养时间对康乃馨转化的影响

Table 3 Effects of coculture time on transformation of *D. caryophyllus*

时间 Time d	外植体数 Explant number 片	存活率 Survival rate %	芽分化率 Differentiation rate of resistant buds %
1	60	100.0	0
2	55	86.5	5.2
3	60	85.7	6.7
4	55	80.2	2.3
5	31	61.3	1.4

3 讨论

(1) 以康乃馨叶片为受体材料,通过抗G418筛选,探讨叶片预培养、根癌农杆菌浸染、共培养时间等因素对根癌农杆菌介导康乃馨遗传转化的影响。许多试验研究结果表明^[4-5],菌液浓度和浸染时间、预培养时间、共培养时间对转化都有一定的影响,尽管所试材料和菌株不同,但获得的一般结果是:预培养2~3 d,共培养3~4 d,菌液浓度 OD₆₀₀ 0.5~1.0,浸染时间15~20 min。而试验结果与此有所不同,共培养时间2~3 d,菌液浓度 OD₆₀₀ 0.5~0.8,浸染时间8~10 min,这可能是由于不同的受体材料对菌液耐受力不同。

(2) 选择适宜的能抑制根癌农杆菌生长的抗生素是保证转化成功的一个前提。不同植物所用抑菌抗生素种类和浓度不同。Car和Cef是常用的抑菌抗生素。试验使用400 μg/ml Cef,与转化枳壳^[6]所用抑菌抗生素种类一致,但浓度不同。

(3) 康乃馨叶片容易玻璃化,叶失绿、变厚,呈半透明状态。根癌农杆菌感染的叶片较对照玻璃化严重,这表明根癌农杆菌也会引起叶片玻璃化,可能是感染过程中,植物细胞和组织的生理机能受到损伤所致。试验使用透气膜、适当降低培养温度、改变共培养方法等措施,明显减少了玻璃化现象。

参考文献

- [1] VAN ALVOST A C, KOHORST H, JONG J, et al. Transgenic carnation plants obtained by Agrobacterium mediated transformation of petal explants [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1996, 169: 169-173.
- [2] VAN ALVOST A C, RIJSEN T, KOHORST H, et al. Shoot regeneration and Agrobacterium mediated transformation of carnation [J]. *Acta Horticulture*, 1995, 420: 92-94.
- [3] 张树珍, 汤火龙, 杨本鹏, 等. 康乃馨 ACC 氧化酶反义基因遗传转化康乃馨的研究 [J]. *园艺学报*, 2003, 30(6): 699-702.
- [4] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 M. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002: 393.
- [5] 周春丽, 郭卫东, 路梅, 等. 农杆菌介导佛手遗传转化主要影响因素的研究 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2006, 14(5): 374-381.
- [6] 贺红, 潘瑞焱, 韩美丽, 等. 根癌农杆菌介导的枳壳遗传转化的研究 [J]. *云南植物研究*, 1998, 20(4): 1-4.