

提高草木犀遗传转化植株再生率技术的研究

刘玉冬, 刘艳军, 杨静慧 (天津农学院园艺系, 天津300384)

摘要 [目的] 确定草木犀遗传转化植株的适宜的除草剂选择压力。[方法] 分别以草木犀试管苗的子叶、下胚轴和破坏生长点的茎尖为外植体, 在含有0、1、3、5、10 ng/L 除草剂草丁膦的分化培养基 MS+BA3 ng/L +IAA 0.2 ng/L 中对其进行分化培养, 筛选适宜的除草剂选择压力, 在此选择压力下, 对外植体进行遗传转化, 并对转化芽进行分子水平检测。[结果] 当除草剂浓度为3 ng/L 时, 所有外植体均无再生芽; 转化培养后, 子叶、下胚轴和破坏生长点的茎尖的再生率分别为0.48%、4.29%和10.8%; 分子水平检测结果显示, 外源基因已成功转入草木犀转化芽中。[结论] 除草剂对草木犀外植体的适宜选择压力为3 ng/L, 破坏生长点的草木犀茎尖对外源基因的转化效率较高。

关键词 草木犀; 除草剂; 再生率

中图分类号 S603.1+6 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)15-06873-03

Study on Technology of Increasing Regeneration Rate of Genetic Transformation Plant of *Melilotus suaveclens* Ledeb.

LIU Yu-dong et al (Department of Horticulture, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384)

Abstract [Objective] The aim was to determine the optimal selection pressure of herbicide for genetic transformation plant of *Melilotus suaveclens* Ledeb. [Method] With the cotyledon, hypocotyl and stemtip with broken growing point of *M. suaveclens* plantlet as the explants, they were inoculated into the differentiation mediums of MS+BA3 ng/L +IAA 0.2 ng/L that contained 0, 1, 3, 5, 10 ng/L herbicide basta for differentiation culture, and then the optimal selection pressure of herbicide was screened out. Under the optimal herbicide selection pressure, the genetic transformation of explants was conducted and the transformation buds were detected on molecular level. [Result] When the herbicide concn. was 3 ng/L, all explants had no regeneration buds. After transformation cultivation, the regeneration rates of cotyledon, hypocotyl and stemtip with broken growing point were 0.48%, 4.29% and 10.8% resp. The result of molecular detection showed that exogenous gene had been transplanted into the transformation buds of *M. suaveclens*. [Conclusion] The optimal selection pressure of herbicide on explants of *M. suaveclens* was 3 ng/L and the exogenous gene transformation rate of stemtips with broken growing point was higher.

Key words *Melilotus suaveclens* Ledeb.; Herbicide; Regeneration rate

草木犀 (*Melilotus suaveclens* Ledeb.) 属豆科草木犀属1年或2年生草本植物, 常被用做改良盐碱地的生物脱盐器, 草木犀不仅可以有效吸收土壤中的盐碱, 还可增加土壤有机质含量^[1-4]。笔者通过试验建立了草木犀离体再生技术, 以期为提高草木犀改良盐碱地的能力及其利用价值提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料 草木犀 (*Melilotus suaveclens* Ledeb.) 试管苗, 含抗缺铁黄化FRQ2基因的农杆菌C58C1均由天津农学院园艺系园林植物实验室提供; PCR引物由上海生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 除草剂浓度的筛选。取长出子叶且生长健壮的草木犀试管苗, 分别以子叶、下胚轴、破坏生长点的茎尖为外植体, 用含有0、1、3、5、10 ng/L 除草剂的分化培养基 (MS+6-BA 4 ng/L+NAA 0.2 ng/L) 诱导再生芽。其中叶片剪掉叶缘及叶柄, 下胚轴保留部分茎段组织, 但不带腋芽, 茎尖长约2~3 mm, 用解剖针破坏其生长点。每种外植体在不同除草剂浓度培养基上均接种200块, 培养条件为温度28℃, 光照24 h, 光强2 000 lx。接种后每7 d观察1次, 主要观察外植体及其伤口部位颜色变化和愈伤、再生芽的生长情况。培养28 d后统计各处理再生芽的诱导率。

1.2.2 不同外植体转化处理。取农杆菌C58C1的1个单菌落, 接种到LB液体培养基中过夜振荡培养, 待其OD值为0.4时取出, 并用其浸染草木犀不同外植体^[5], 处理外植体数分别为叶片205片, 下胚轴256块, 破坏生长点的茎尖74块, 将外植体和C58C1单菌落接种在带有滤纸的MS固体培养基

上, 28℃、黑暗条件下共培养2 d, 2 d后将外植体移至含有除草剂(3 ng/L)、羧苄青霉素(500 ng/L)的分化培养基上, 诱导转化芽。培养条件为温度28℃, 光照24 h, 光强2 000 lx。接种后每7 d观察1次, 主要观察外植体及其伤口部位颜色变化和愈伤、再生芽的生长情况。培养28 d后, 统计各处理外植体的再生芽诱导率。

1.2.3 转化芽的分子水平检测。将转化苗转入生根培养基(1/2MS+IBA 0.5 ng/L)中, 苗高3 cm时随机选取7株, 各取200 ng叶片, 采用柱式DNA提取试剂盒提取转化苗的基因组DNA, 以FRQ2基因的两端保守序列为引物, 进行PCR扩增, 扩增产物用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。同时对其中7株转化苗的基因组DNA进行Southern blot检测, 所用探针为800 bp的35S启动子基因片段, 采用随机引物法32 p dCTP10~20 μG对探针进行放射性标记, 验证除草剂筛选转化植株的可靠性。

2 结果与分析

2.1 不同浓度除草剂对不同外植体的筛选效果 由表1可知, 培养基中无除草剂时, 破坏生长点的茎尖的再生率最高, 子叶的再生率最低。从培养过程来看, 在诱导再生的初期, 不同外植体的伤口部位均可长出愈伤组织, 但叶片愈伤组织多为白色, 而下胚轴、破坏生长点的茎尖的愈伤组织均为绿色, 随培养时间的延长, 愈伤组织上很快长出再生芽。

当培养基中除草剂浓度为1 ng/L时, 对外植体的转化率基本无影响, 而除草剂浓度达到3 ng/L时, 所有外植体均无再生芽产生。诱导再生初期(大约7 d), 当培养基中除草剂浓度为1~5 ng/L时, 所有外植体伤口部位均无变化, 而当除草剂浓度为10 ng/L时, 外植体开始变黄。培养14~21 d后, 3、5 ng/L除草剂处理外植体开始变黄, 伤口部位出现萎缩, 而1 ng/L除草剂处理的外植体一直较绿, 伤口部位有再

基金项目 重盐碱地旱荒地改良植物选育(072CKFNCO100)。

作者简介 刘玉冬(1967-), 男, 天津人, 副教授, 从事园艺方面的教学与科研工作。

收稿日期 2009-02-11

生芽分化,且外植体大小和颜色基本无变化。培养28 d后,3~10 ng/L 除草剂处理的外植体颜色开始由黄变黑,最后枯萎、死亡。

表1 不同浓度除草剂对草木犀不同外植体的筛选效果

Table 1 The screening effects of different explants of *Millettus suaveolens* with different concentration of herbicide

除草剂浓度 Herbicide concentration	再生率 % Regeneration rate		
	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	破坏生长点的茎尖 Semtip with broken growing point
0	11.5	34.1	100.0
1	10.9	28.1	100.0
3	0	0	0
5	0	0	0
10	0	0	0

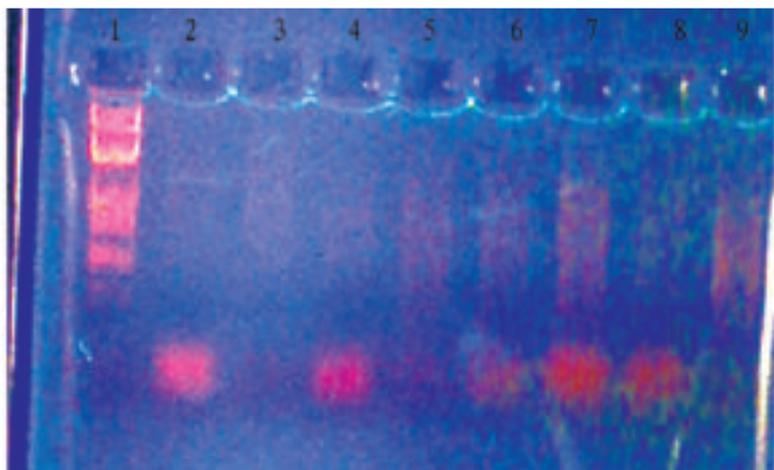
2.2 不同外植体对基因转化率的影响 由表2可知,草木犀试管苗不同部位外植体对FRO2基因的转化效率存在明显差异。其中破坏生长点的茎尖对FRO2基因的转化率最高,而子叶对FRO2基因的转化率最低。

从诱导过程来看,接种初期(7 d),所有外植体均无较大差异。培养14~21 d后,接种的大部分叶片组织开始变黄,少数叶片的伤口处有白色愈伤组织长出;下胚轴变黄数量较叶片略少,愈伤组织多出现在叶柄与茎的连接处,且愈伤多为绿色或淡绿色;破坏生长点的茎尖变黄外植体数最少,愈伤均为绿色,且个别愈伤可长出转化芽。培养28 d后,大部分没有再生芽或愈伤的外植体基本变黄、变黑至死亡。

表2 不同外植体对基因转化率的影响

Table 2 Effects of different explants on the gene transformation rate

不同接种部位 Different inoculation parts	接种外植体数 Number of inoculated explants	再生芽数 Number of regenerated buds	再生率 % Regeneration rate
子叶 Cotyledon	205	1	0.48
下胚轴 Hypocotyl	256	11	4.29
破坏生长点的茎尖 Semtip with broken growing point	74	8	10.80



注:1为分子量Marker;9为对照草木犀DNA;2~8为转化草木犀DNA。

Note:1, Marker;9, Control DNA of *Millettus suaveolens*;2-8, Transformed DNA of *Millettus suaveolens*.

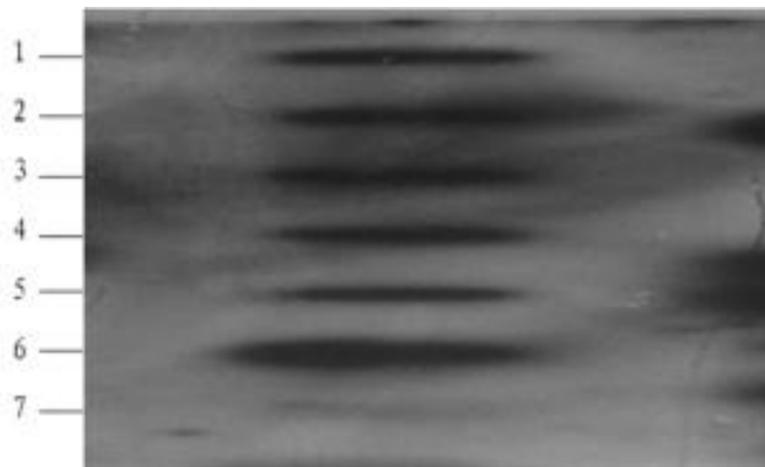
图1 转化草木犀植株PCR扩增0.8%琼脂糖凝胶电泳照片

Fig.1 0.8% agarose gel electrophoresis photograph for PCR amplification of transformed plants of *Millettus suaveolens*

2.3 PCR及Southern Blot对转化苗的检测结果 由图1可

知,未转化植株的DNA无扩增带。5株转化苗在195 bp处有1条特异性条带,说明外源基因已整合到草木犀基因组中。

由图2可知,5株转化草木犀植株的基因组DNA均有很强的杂交信号,而未转化草木犀的基因组DNA无杂交信号,说明外源FRO2基因已整合到草木犀基因组中。



注:1~5为转化草木犀DNA;6为阳性对照(转化质粒DNA);7为未转化草木犀DNA。

Note:1-5, DNA of transformed plants of *Millettus suaveolens*;6, Positive control (transformed plasmid DNA);7, DNA from untransformed *Millettus suaveolens* plants.

图2 转化草木犀植株Southern Blot检测照片

Fig.2 Southern blot detection photograph of transformed plants of *Millettus suaveolens*

3 讨论

3.1 除草剂筛选浓度的确定 含抗缺铁黄化FRO2基因的农杆菌C58C1的转化筛选标记为BAR基因,即除草剂可作为转化芽的筛选标记,而除草剂对不同植物的筛选浓度存在差异^[6]。据报道,筛选标记BAR基因时,不同除草剂对BAR基因的筛选效果不同^[7]。

该试验结果表明,当所用除草剂浓度为1 ng/L时,对外植体再生基本无影响,而除草剂浓度为3 ng/L时,无再生外植体出现,故将3 ng/L作为除草剂的筛选浓度,若除草剂浓度高于合理筛选浓度,则对转化芽的生长具有抑制作用^[8]。

除草剂筛选转化芽时,若筛选时间过短,则筛选效果不能充分表现出来;而筛选时间过长时,外植体再生因缺乏营养受到抑制。该试验确定的除草剂对转化芽的合理筛选时间为28 d。

3.2 不同外植体对基因转化效率的影响 不同外植体对FRO2基因的转化率由大到小依次为子叶、下胚轴、破坏生长点的茎尖。这些外植体中,基因转化率高外植体再生率也较高,说明高再生率是高转化率的前提。

试验结果表明,多数外植体均可产生愈伤,但仅有少数愈伤组织可长出再生芽。且可再生芽的愈伤组织多为绿色。在不同外植体中,分生组织的多少是再生的关键。叶片中分生细胞较少,因此其再生率较低,而茎尖中分生组织最多,再生率也最高^[9]。绿色愈伤组织容易再生,这可能与细胞质浓度有关,细胞质浓度较大时,营养充沛,利于细胞分化生长。

采用分生组织较多的部位(如茎尖)为外植体时,由于原生长点细胞分裂旺盛,筛选压力对其生长的抑制作用较弱,易得到假转化苗(或嵌合体),故该研究对茎尖生长点进行了破坏,同时保持了较高的除草剂筛选压力。PCR及Southern blot检测结果表明,在3 ng/L除草剂筛选压力下,采用破坏

生长点的茎尖为外植体,可使草木犀的基因转化效率得到较大提高。

4 结论

该试验采用草木犀试管苗的子叶、下胚轴、破坏生长点的茎尖为外植体,在含有0、1、3、5、10 mg/L 除草剂草丁膦的



图3 移栽入土的再生转化草木犀

Fig.3 The regenerated and transformed *M. suaveolens* after transplanting

参考文献

- [1] 王清连. 植物组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 186 - 199.
- [2] 四川成都市园林局. 花卉植物组培进展[J]. 2001: 69 - 76.
- [3] JAMES DJ, DANDEKAR A M. Regeneration and transformation of apple [M] // LINSEY K. Plant tissue culture manual: Fundamentals and application. Dordrecht/ Boston: Kluwer Academic Publishers, 1991: 1 - 18.
- [4] 刘庆忠. 提高草木犀转化效率的研究[J]. 果树科学, 2000, 17(3): 159 - 163.
- [5] ROBINSON NJ, PROCTER C M, CONOLLY E L et al. A ferric-chelate reduc-

分化培养基 MS+ BA 3 mg/L+ IAA 0.2 mg/L 上诱导再生芽, 得出3 mg/L 除草剂为适宜的筛选压力。在此筛选压力下, 对不同外植体进行遗传转化, 其中破坏生长点的茎尖再生芽的效率最高, 对其部分再生苗进行PCR 及 Southern blot 杂交检测, 再生苗均为转化苗(图3~4)。



图4 转化的草木犀外植体

Fig.4 The transformed explants of *M. suaveolens*

tase for iron uptake from soils[J]. Nature, 1999, 397: 694 - 697.

- [6] 盖树鹏. 转基因植物的筛选与检测[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2000, 31(1): 95 - 100.
- [7] 段发平. Bar 基因和转 Bar 基因作物的研究进展[J]. 广西植物, 2001, 21(2): 166 - 172.
- [8] 师效欣. 根癌农杆菌介导丑豆胰蛋白酶抑制剂基因转入草木犀主栽品种中[J]. 园艺学报, 2000, 27(4): 282 - 284.
- [9] 孙爱君. 草木犀与八棱海棠的试管苗外植体植株再生[J]. 上海农业学报, 2000, 16(2): 23 - 30.

(上接第6872页)

2.2 琼脂糖电泳分析 不同方法提取DNA的凝胶电泳检测结果见图1。由图1可知, 提取方法、 、 、 、 、 、 、 所提取DNA的电泳带很清晰, 基本无降解拖尾现象, 在加样孔附近滞留的物质很少; 而方法 、 、 电泳带不明显, 可能存在污染物。

2.3 RAPD 检测 基因组DNA是否可用, 可直接用PCR扩增效果验证。在PCR扩增反应中, 对模板DNA的要求以RAPD最低。由图2可知, 运用11种不同方法通过RAPD检测都能扩增出清晰的带型。

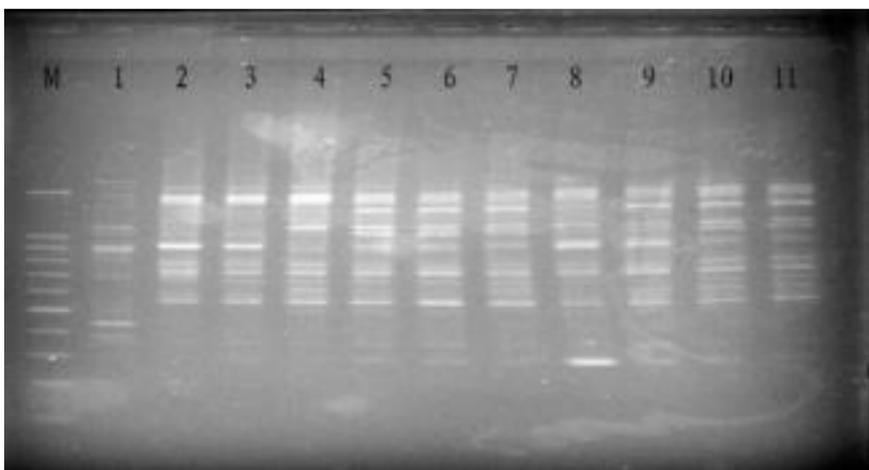


图2 RAPD 扩增电泳图谱

Fig.2 RAPD amplification electrophotogram

3 讨论

(1) 对于方法 , 利用提高CTAB浓度的办法提取DNA, 未能获得满意效果。可能是因为CTAB具有一定的黏性, 浓

度过高, 保温时材料与CTAB缓冲液难以充分混匀, 造成材料发泡不均匀, 需延长保温时间, 增加DNA的降解。

(2) 分子生物学研究中, DNA的提取质量是影响试验分析结果的关键因素之一。目前, 植物基因组DNA的提取方法主要有CTAB法、SDS法以及试剂盒提取法等。人们常根据试验目的、要求和植物种类或营养体的不同选用不同的方法, 具体操作也会存在较大差异。该试验中, 由于枸杞叶片组织含有较高的糖和酚类物质, 利用适用于其他植物的提取方法从枸杞叶片中也能得到枸杞基因组DNA, 完全能满足RAPD分析的需要。

参考文献

- [1] 匡可任, 路安民. 中国植物志(茄科)[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 47 - 48.
- [2] 黄震华, 徐菱华. 作物耐盐极限及土壤盐渍化分级标准研究[J]. 宁夏农林科技, 1989(4): 179 - 184.
- [3] 姜静. 分子生物学试验原理与技术[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2003: 18 - 32.
- [4] 詹亚光, 曾凡锁. 富含多糖的白桦成熟叶片DNA的提取方法[J]. 东北林业大学学报, 2005(3): 24 - 27.
- [5] 孙晓东. 枸杞基因组DNA的提取与分析[J]. 陕西中医, 2003, 24(12): 1129 - 1130.
- [6] 严奉坤, 许兴. 枸杞基因组DNA提取及指纹图谱分析[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(1): 46 - 49.
- [7] 顾红雅, 瞿礼嘉. 植物基因与分子操作[M]. 北京: 北京大学出版社, 1995: 21 - 23.
- [8] 腊萍, 罗淑萍, 章建新, 等. 甜菜总DNA不同提取方法的研究[J]. 新疆农业大学学报, 2006(2): 77 - 79.
- [9] 陈路, 赵家荣. 古莲的研究现状及意义(一)[J]. 生物学通报, 1999, 34(11): 1 - 2.