

露地菊离体再生体系建立及 *BrDFR* 基因遗传转化

许志茹, 陈智华, 姜艳东, 侯 杰, 佟 玲, 李玉花*

(东北林业大学生命科学学院, 林木遗传育种国家重点实验室, 哈尔滨 150040)

摘 要: 以露地菊 (*Chrysanthemum morifolium*) 品种‘神韵’无菌苗叶片为外植体材料, 研究植物生长调节剂配比对其愈伤组织诱导再生芽的影响, 以建立离体再生体系。研究表明, 露地菊‘神韵’在含 NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基上获得了最高的再生芽分化率。利用已经克隆的‘津田’芜菁 *BrDFR* 基因构建非抗生素筛选的表达载体。以露地菊‘神韵’的无菌苗叶片为受体, 通过农杆菌介导进行 *BrDFR* 基因的遗传转化。以载体的 *PMI* 基因为筛选标记, 通过甘露糖筛选获得了‘神韵’的遗传转化再生植株。经过 PCR 验证和 Southern 杂交检测证实 *BrDFR* 基因已经整合到‘神韵’基因组中。

关键词: 露地菊; 组织培养; 二氢黄酮醇 4-还原酶基因; 遗传转化; 分子检测

中图分类号: S 682.1⁺1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 08-1517-10

Establishment of the Regeneration System and Genetic Transformation of *BrDFR* Gene in Chrysanthemum Cultivar

XU Zhi-ru, CHEN Zhi-hua, JIANG Yan-dong, HOU Jie, TONG Ling, and LI Yu-hua*

(College of Life Sciences, Northeast Forestry University, State Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement, Harbin 150040, China)

Abstract: In our study, with the leaves of the aseptic seedlings of *Chrysanthemum morifolium* ‘Shenyun’, the effect of plant growth regulator combination on regeneration buds induced from callus was analyzed, and the regeneration system of ‘Shenyun’ was established. The study results indicated that the optimum condition for regeneration buds inducing on MS medium is NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for *Chrysanthemum morifolium* ‘Shenyun’. Using the *BrDFR* gene of turnip ‘Tsuda’, the expression vector of non-antibiotic screening was constructed. Leaf explants of the chrysanthemum aseptic seedlings were infected with *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 *pCAMBIA1301* and the *BrDFR* gene of turnip ‘Tsuda’ was introduced into ‘Shenyun’. The selection system was based on the use of *Escherichia coli* phosphomannose isomerase (*PMI*) gene as a selectable marker gene and mannose as a selective nutrient. The explants were selected on medium supplemented with a combination of mannose and sucrose as a carbon source at different concentrations. Among the leaf explants which were infected, there were 7 shoots surviving after selection by the medium containing $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ mannose. PCR analysis and southern

收稿日期: 2013-01-16; 修回日期: 2013-07-02

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (DL10CA03)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xuzhiru2003@126.com, lyhshen@126.com; Tel: 0451-82191783)

blot analysis confirmed that T4 and T7 independent transformed lines were positive for *PMI* and *DFR* genes.

Key words: *Chrysanthemum morifolium*; tissue culture; dihydroflavonol 4-reductase gene; genetic transformation; molecular detection

露地菊 (*Chrysanthemum morifolium*) 多为红色和黄色等深色系, 花多而密, 花期较长, 植株低矮, 容易繁殖, 广泛应用于北方城市秋季绿化 (陈发棣 等, 2005; 丁兵 等, 2007)。目前, 通过转基因技术修饰菊花性状获得菊花新品种的研究已经取得了相关进展 (洪波 等, 2009; da Silva et al., 2013)。

花色素苷属于水溶性类黄酮类色素, 是重要的植物次生代谢产物, 影响花和果实色泽 (Shirley, 1996; Grotewold, 2006; Tanak et al., 2008)。二氢黄酮醇 4-还原酶 (DFR) 是花色素苷合成途径的关键酶, 催化二氢栎皮黄酮、二氢槲皮醇、二氢杨梅黄酮分别生成无色花青素、无色花葵素和无色翠雀素。在此基础上进而形成各种类型的花色素糖苷, 使花和果实呈色 (Shimada et al., 2005; Trabelsi et al., 2011)。目前已经从多种植物中克隆了 *DFR* 基因并研究了其表达特性 (Shih et al., 2008; Tang et al., 2009; Pitakdantham et al., 2011; Li et al., 2012)。*DFR* 基因的遗传转化可以使转基因植株的花色发生相应变化。转中国大白菜 (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) *DFR* 基因的烟草植株花青素含量增加 (Lee et al., 2008)。利用夏堇 (*Torenia* 'Summerwave') 的 *DFR* 基因遗传转化巴西野牡丹 (*Tibouchina semidecandra*) 后转基因植株的花芽颜色变绿 (Yong et al., 2009); 过量表达毛果杨 (*Populus trichocarpa*) *PtrDFR1* 基因的烟草花色变深 (Huang et al., 2012)。

目前, 利用花色素苷生物合成相关催化酶基因遗传转化菊花研究已经取得一定进展 (Courtney-Gutterson et al., 1993, 1994; Mitouchkina et al., 2000; Seo et al., 2007)。蓝眼菊 (*Osteospermum hybrida*) 中飞燕草花色素苷的形成主要源于类黄酮 3',5'羟化酶 (*F3'5'H*) 的作用。蓝眼菊的 *DFR* 不能催化二氢槲皮醇 (Dihydrokaempferol, DHK) 生成无色天竺葵色素, 因此蓝眼菊不能合成花葵素糖苷。利用能够催化 DHK 的非洲菊 (*Gerbera hybrida*) *DFR* 基因遗传转化蓝眼菊, 转基因植株花色素苷成分未发生改变。当通过 RNAi 技术沉默了转非洲菊 *DFR* 基因的蓝眼菊的 *F3'5'H* 基因后, 蓝眼菊花中积累了大量花葵素糖苷 (Seitz et al., 2007)。

本研究中用于遗传转化露地菊的 *BrDFR* 基因克隆于 '津田' 芜菁 (*Brassica rapa* L. subsp. *rapa* 'Tsuda')。'津田' 芜菁块根着色时对光具有敏感性, 照光一侧有花青素糖苷的合成呈现粉红色; 背光一侧不着色。基于此, 从 '津田' 芜菁块根中克隆了花青素合成的关键催化酶基因 *BrDFR*。研究表明, *BrDFR* 基因遗传转化烟草后转基因植株的花色变深 (本课题组的试验数据, 尚未发表)。

本试验中以露地菊 '神韵' 为试材建立了组织培养的离体再生体系。利用 *BrDFR* 基因构建以磷酸甘露糖异构酶 (phosphomannose isomerase, *PMI*) 基因为选择标记基因的植物表达载体 *pCambia1301-PMI-BrDFR*, 遗传转化露地菊 '神韵', 以期培育出花色柔和、色彩丰富且对环境具有安全性的露地菊转基因新品系。

1 材料与方法

1.1 材料及其无菌苗的初代培养和继代培养

供试的露地菊品种为 '神韵' (丁兵 等, 2007), 花朵大, 头状花序顶生, 浅粉色, 抗病性强, 群体效果好。试材 2009 年秋季取自东北林业大学花卉生物工程研究所。试验完成于东北林业大学生

命科学学院。

剪取带芽点的幼嫩茎段为外植体, 流水冲洗 30 min 之后, 用 0.2% 的 Tween20 浸泡 5 min, 流水洗涤 30 min。于超净工作台内用 75% 乙醇将茎段表面杀菌 1 min, 蒸馏水冲洗 3~4 遍, 然后用 1% 的次氯酸钠溶液消毒 10 min, 无菌水冲洗 3 遍, 剪成约 3 cm 的小段接种于 MS 基本培养基中。接种 15 d 后统计: 污染率 (%) = 污染的外植体数/接种的外植体总数 $\times 100$; 死亡率 (%) = 死亡的外植体数/接种的外植体总数 $\times 100$; 成活率 (%) = (1 - 死亡率) $\times 100$ 。

将初代无菌苗的叶片剪掉, 每个植株的茎段剪成 2~3 段, 接种于继代培养基 MS 中, 以扩大无菌苗的数量。

1.2 组培苗不定芽的诱导及生根

将无菌苗的幼嫩叶片切成 1.0 cm \times 1.0 cm 的小块, 选择带有较粗主叶脉的小块正面朝上接种于含不同浓度配比的 NAA 和 6-BA 的 MS 培养基上 (采用双因素随机试验法设计, 共 20 种配比, 如图 1), 每处理 40 个外植体, 接种于 6~7 个培养皿中。重复 3 次。在光照强度为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光周期 16 h $\cdot \text{d}^{-1}$ 、温度 (25 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 的条件下培养。30 d 更换 1 次培养基。

待分化的不定芽长至 1~2 cm 时, 在无菌环境下将其切下接种到 MS 基本培养中进行生根培养。

1.3 表达载体的构建

农杆菌 EHA105、载体 *pCambia1301-PMI*、‘津田’茼蒿 *BrDFR* 基因由东北林业大学生命科学学院发育生物学科实验室保存。Gateway 试剂盒购于 Invitrogen 公司; Blend *Taq*、dNTP 和内切酶购自 TOYOBO 公司; 大肠杆菌感受态细胞 TOP10、质粒提取和凝胶回收试剂盒购自北京天根生化有限公司; Southern 杂交试剂购自罗氏公司和 GE 公司。

按照 Gateway 反应程序, 通过 PCR 扩增在‘津田’茼蒿 *BrDFR* 基因两侧加入接头 attB1 和 attB2。PCR 产物回收纯化后进行 BP 反应和 LR 反应。LR 反应后即可得到 *pCambia1301-PMI-BrDFR* 植物表达载体。LR 反应产物转化大肠杆菌细胞后挑取单菌落扩大培养, 提取质粒。质粒进行 PCR 检测和酶切鉴定以验证表达载体构建的正确性。通过电转法将表达载体转入农杆菌 EHA105 中。

1.4 遗传转化体系的建立及优化

1.4.1 叶片分化对甘露糖敏感性的测试、叶盘法遗传转化及抗性苗筛选

将 20~25 d 苗龄的无菌苗叶片剪成小块, 分别接种于甘露糖浓度 (于立刚 等, 2011) 为 0、5、10、15、20、25 g $\cdot \text{L}^{-1}$ 的分化培养基中进行甘露糖敏感性测试。

利用含有目的基因的农杆菌通过叶盘法进行遗传转化。侵染浓度 OD₆₀₀ 值设置为 0.2、0.3、0.4、0.5 和 0.6, 侵染时间分别设置为 5、10、15 和 20 min。重复 3 次。

将侵染过的叶片接种在 MS 培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下共培养 2 d, 转移到脱菌及筛选培养基中进行抗性筛选 (头孢霉素, cef) 和诱导分化。露地菊的脱菌及筛选培养基为在再生体系筛选的最佳不定芽培养基基础上, 添加最适浓度的甘露糖以及头孢霉素, 即 MS (蔗糖 20 g $\cdot \text{L}^{-1}$ + 甘露糖 10 g $\cdot \text{L}^{-1}$) + NAA 1.0 mg $\cdot \text{L}^{-1}$ + BA 1.0 mg $\cdot \text{L}^{-1}$ + cef 300 mg $\cdot \text{L}^{-1}$ 。待不定芽长到 1 cm 以上时切下转入 MS 培养基并添加最适浓度甘露糖进行生根培养。

1.4.2 转化植株的 PCR 和 Southern 杂交检测

PMI 基因的 PCR 检测同于立刚等 (2011) 的方法。*BrDFR* 基因的 PCR 检测: 引物 primer F 为 5'-TAATGGTAGCTCACAAAGAGAC-3', primer R 为 5'-TGCTTAGAAATTGAACCCGA-3'。PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$

延伸 7 min; 4 ℃ 保存。

CTAB 法提取转基因植株和对照植株总 DNA, 经限制性内切酶 *Hind* III 酶切后琼脂糖凝胶电泳分离; 利用地高辛标记 *PMI* 和 *BrDFR* 基因片段制备探针, *BrDFR* 探针长度为 360 bp, *PMI* 探针长度为 260 bp。参照《现代分子生物学模块实验指南》(李玉花 等, 2007) 中的方法进行 Southern 杂交。

2 结果与分析

2.1 露地菊‘神韵’组培再生体系的建立

‘神韵’茎段外植体培养 15 d 后, 成活率在 77% 以上。经过继代培养后获得了大量的无菌苗。按照双因素随机试验设计, 对露地菊‘神韵’的叶片外植体在 NAA/6-BA 不同浓度配比的 20 种培养基中进行再生试验(图 1), 接种 10 d 后叶片外植体在切口处均长出绿色的愈伤组织, 再经过 14 d 培养后, 有的处理在愈伤组织和叶片的中部或边缘分化出绿色的芽点, 进而诱导分化形成小丛芽; 1 个月后, 小芽长至 1~2 cm。

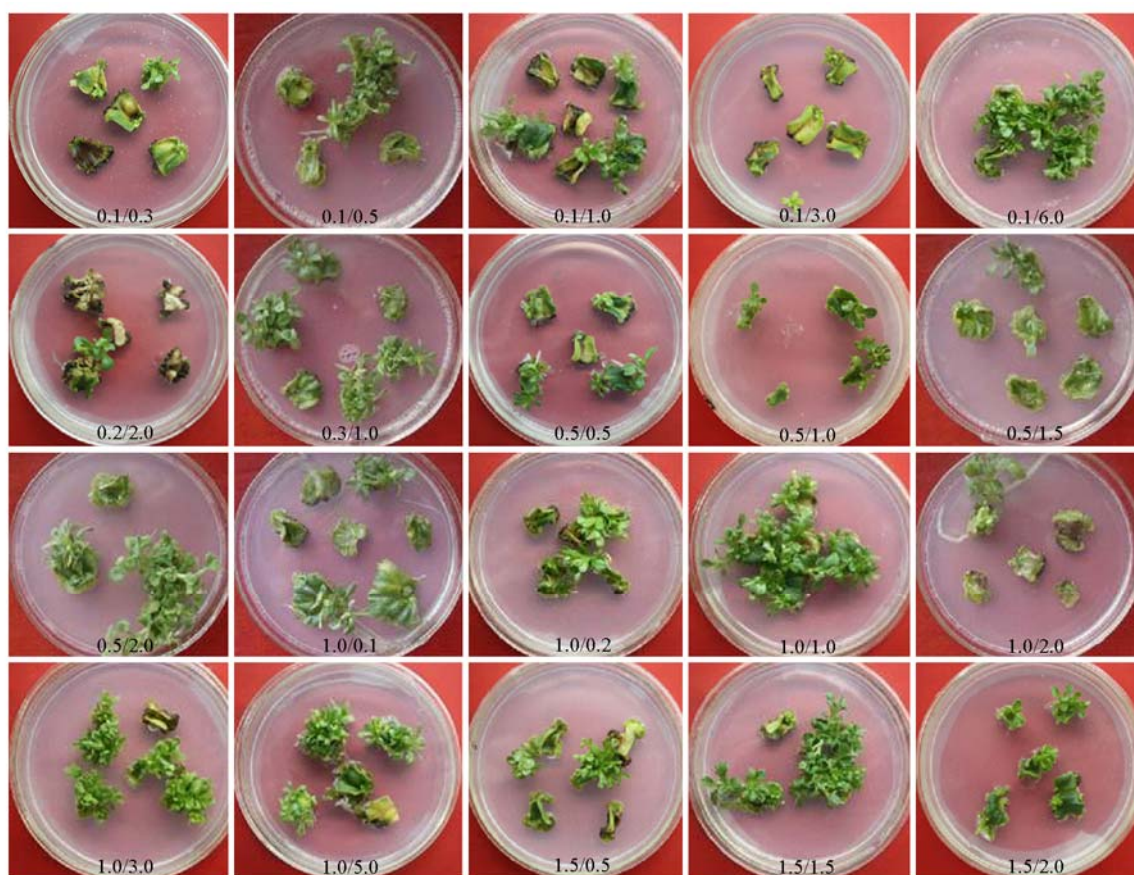


图 1 不同浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 配比 NAA/6-BA 条件下露地菊‘神韵’叶片外植体分化情况

Fig. 1 The regeneration effect of ‘Shenyun’ blades explants on different NAA/6-BA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) combinations

经过一段时间的培养后, 大多数处理均可诱导外植体分化出不定芽, 其中 NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不定芽的再生率最高, 达到 90% 以上, 所以该处理可以作为露地菊 ‘神韵’ 叶片外植体理想的分化体系。将 300 个不定芽接种到 MS 基本培养中 10 d 后开始生根, 1 个月后生根率达 99.3%, 根系发达, 平均每个植株的生根数达到 20 条, 为后续的转基因试验提供了良好试材。

2.2 *pCAMBIA1301-PMI-DFR* 表达载体的构建结果

根据 Gateway 手册, 利用 ‘津田’ 芜菁 *BrDFR* 基因获得 BP 反应产物后进行 LR 反应。LR 反应产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 挑取阳性单克隆扩大培养后提取质粒进行电泳检测 (图 2)。在载体构建过程中, LR 质粒与 BP 质粒均具有卡那霉素抗性。由于 BP 反应载体长度明显小于 LR 反应载体长度, 所以推测泳动速度慢的质粒是 LR 反应的阳性克隆。图 2 中箭头标示的两个质粒泳动速度慢, 初步认为这两个质粒是正确的 LR 质粒, 而其他质粒是 BP 质粒。

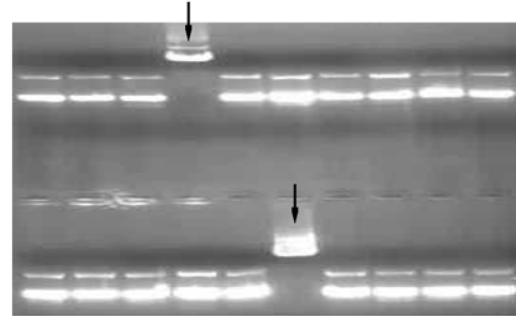


图 2 LR 质粒电泳

Fig. 2 Electrophoretogram of the LR plasmid

对这两个重组质粒进行酶切检测 (图 3)。经过 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切后, 重组的 LR 质粒 *pCAMBIA1301-PMI-BrDFR* 可以得到 2 489 bp 的条带和大于 10 000 bp 的大片段, 对照 *pCAMBIA1301-PMI* 植物表达载体可以得到 3 039 bp 的条带和大于 10 000 bp 的大片段, 酶切试验结果与预期一致。

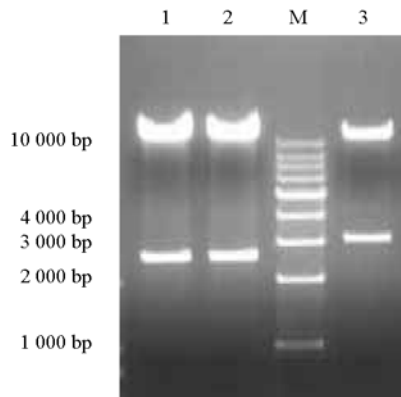


图 3 LR 重组质粒酶切结果

M: Marker; 1, 2: *pCAMBIA1301-PMI-BrDFR* 载体;
3: *pCAMBIA1301-PMI* 对照载体。

Fig. 3 Enzyme digestion identification of the LR recombination plasmid

M: Marker; 1, 2: *pCAMBIA1301-PMI-BrDFR* vector;
3: *pCAMBIA1301-PMI* control vector.

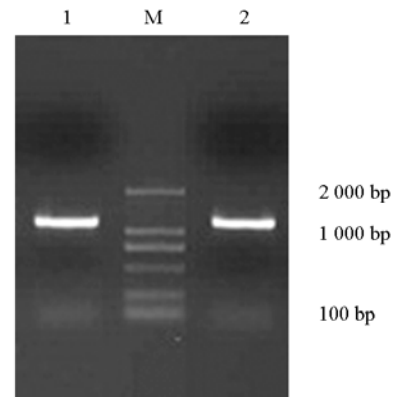


图 4 LR 重组质粒 PCR 结果

M: DL 2000 marker; 1, 2: PCR 产物。

Fig. 4 PCR identification of the LR recombination plasmid

M: DL 2000 marker;
1, 2: PCR production.

以酶切验证正确的质粒为模板, 利用 *BrDFR* 基因特异性引物进行 PCR 检测, 结果如图 4 所示, *pCAMBIA1301-PMI-BrDFR* 表达载体 PCR 扩增条带大小约为 1 100 bp, 与预期结果一致。综合分析酶切检测和 PCR 检测结果, 由此确定 *BrDFR* 基因已经整合到携带 *PMI* 标记基因的表达载体上, 获得了 *pCAMBIA1301-PMI-BrDFR* 表达载体 (图 5)。

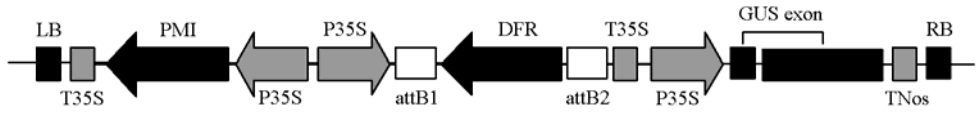


图 5 表达载体 *pCambia1301-PMI-DFR*
Fig. 5 Expression vector structure of *pCambia1301-PMI-DFR*

2.3 甘露糖浓度对露地菊‘神韵’叶片分化的影响

将露地菊‘神韵’无菌苗叶片剪成小块后接种到不同的甘露糖和蔗糖配比浓度的分化培养基中，通过观察不定芽的分化情况确定甘露糖的临界耐受浓度。结果表明，露地菊‘神韵’叶片外植体对甘露糖的临界耐受浓度为 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ （表 1）。 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘露糖浓度既可有效淘汰非转化植株，也可避免甘露糖浓度过大对外植体造成伤害。

表 1 甘露糖浓度对露地菊‘神韵’叶片外植体不定芽分化的影响
Table 1 Mannose concentration on buds differentiation of ‘Shenyun’

甘露糖/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Mannose	接种外植体数 Number of explant	出芽外植体数 Number of buds	总芽数 Total number of all buds	分化率/% Differentiation rate	增殖系数 Proliferation
0	61	56	448	91.8	8.0
5	60	45	234	75.0	5.2
10	60	40	132	66.7	3.3
15	58	0	0	0	0
20	60	0	0	0	0
25	60	0	0	0	0

2.4 农杆菌侵染浓度和侵染时间对露地菊‘神韵’叶片分化的影响

农杆菌的侵染浓度和侵染时间是影响转化效率的重要因素。菌液浓度过高会使叶盘褐化甚至死亡；侵染时间过长，叶片外植体会由于农杆菌毒害而缺氧软腐，失去分化能力。菌液浓度过低，侵染时间过短，则减少了 T-DNA 的整合几率，从而降低转化率。

用不同浓度的农杆菌菌液对叶片外植体进行不同时间的侵染。从表 2 可以看出，侵染露地菊‘神韵’外植体的最适菌液浓度 $\text{OD}_{600} = 0.4$ ，侵染时间为 10 min。

2.5 转化植株的获得及分子检测

露地菊‘神韵’的叶片外植体在含有甘露糖的脱毒筛选培养基上生长 15~30 d 后，叶片边缘出现愈伤组织，进而在叶片四周可以诱导产生不定芽。不定芽生长到一定大小后转至添加了最适浓度甘露糖的 MS 培养基中进行生根培养（图 6）。

表 2 农杆菌侵染浓度和侵染时间对‘神韵’抗性愈伤组织生成的影响

Table 2 Effect of infection concentration and time of *Agrobacterium* on the resistant callus production rate of ‘Shenyun’

侵染浓度/ OD_{600} concentration	侵染时间/ min Infection time	农杆菌污染程度 The contamination degree of <i>Agrobacterium</i>	抗性愈伤组织生成 率/% The production rate of resistant callus
0.2	5	无 None	0
	10	无 None	0.2
	15	低 Low	0.3
	20	高 High	0.2
0.3	5	无 None	0.2
	10	低 Low	0.6
	15	较高 Higher	0.5
	20	高 High	0
0.4	5	无 None	1.0
	10	低 Low	5.0
	15	高 High	0.6
	20	高 High	0
0.5	5	低 Low	2.0
	10	高 High	2.2
	15	高 High	0.2
	20	高 High	0
0.6	5	低 Low	1.2
	10	高 High	0.5
	15	高 High	0
	20	高 High	0

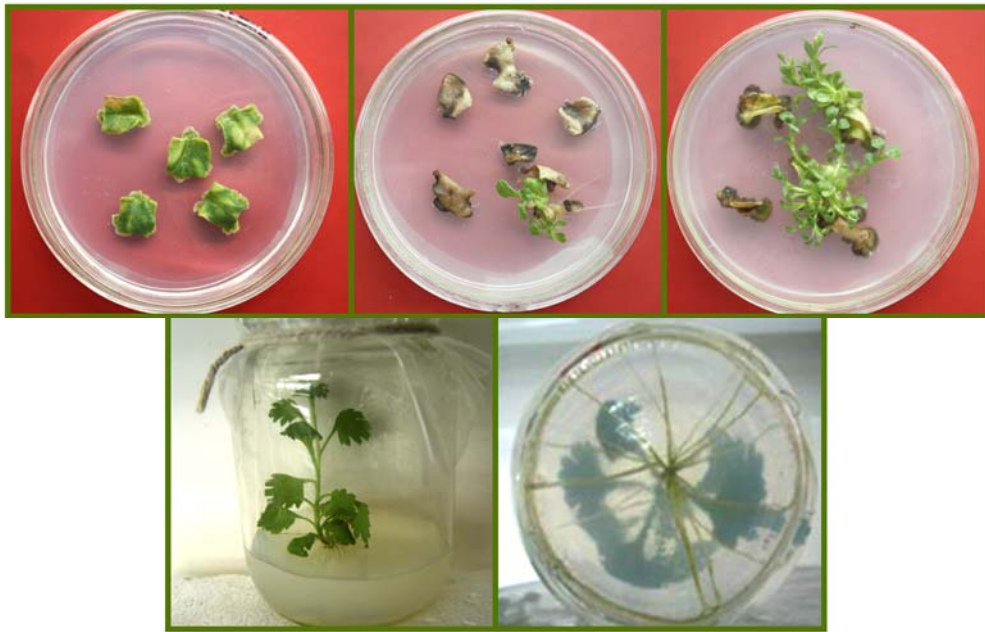
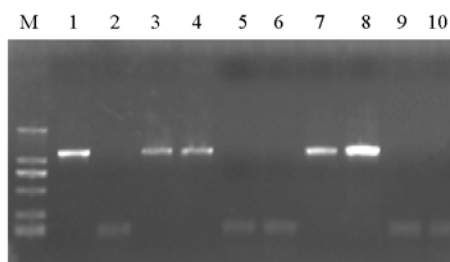


图 6 露地菊‘神韵’转化植株的获得

Fig. 6 The regeneration progress of ‘Shenyun’ transformed plants

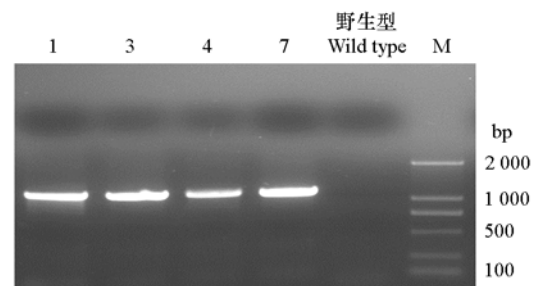
以甘露糖筛选获得的‘神韵’抗性植株和野生型植株 (wild type) 的总 DNA 为模板，去离子水为阴性对照，*pCAMBIA1301-PMI-BrDFR* 质粒为阳性对照，利用 *PMI* 全长基因引物进行 PCR 检测。PCR 结果显示 (图 7)，只有 1、3、4、7 号抗性植株和阳性对照扩增出了约 1 100 bp 的目的条带。选择 *PMI* 基因引物有扩增条带的抗性植株进行 *BrDFR* 基因的 PCR 检测 (图 8)，扩增后 1、3、4、7 号抗性植株均有目的大小的片段产生；野生型‘神韵’植株阴性对照无扩增产物出现。综合分析 *PMI* 和 *BrDFR* 基因的 PCR 检测结果，初步认为 1、3、4、7 号抗性植株的基因组上已经整合了外源 *BrDFR* 基因。

图 7 *PMI* 基因 PCR 检测结果

M: Marker; 1~7: 抗性植株; 8: 阳性对照;
9: 阴性对照; 10: 野生型植株。

Fig. 7 PCR detection of *PMI* gene

M: Marker; 1~7: Resistant plant; 8: Positive control;
9: Negative control; 10: Wild type.

图 8 *DFR* 基因 PCR 检测结果

1、3、4、7: 抗性植株; M: Marker。

Fig. 8 PCR detection of *DFR* gene

1, 3, 4, 7: Resistant plant; M: Marker.

利用 *Hind* III 酶切经过 PCR 验证获得的阳性转化植株的总 DNA，分别用 *PMI* 探针和 *BrDFR* 探针进行 Southern 杂交检测。杂交结果如图 9 和 10 所示，4 号和 7 号转化植株基因组酶切产物可以同

时检测到 *PMI* 基因和 *BrDFR* 基因的杂交信号（图中箭头所示），说明外源 *BrDFR* 基因已经成功整合到露地菊‘神韵’的基因组中，其拷贝数分别为 1。

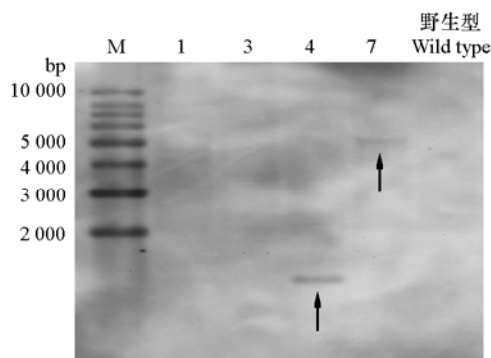


图 9 *PMI* 探针的 Southern 杂交检测结果

M: Marker; 1、3、4、7: 转化植株。

Fig. 9 Southern blot result of *PMI* probe

M: Marker; 1, 3, 4, 7: Transformation plant.

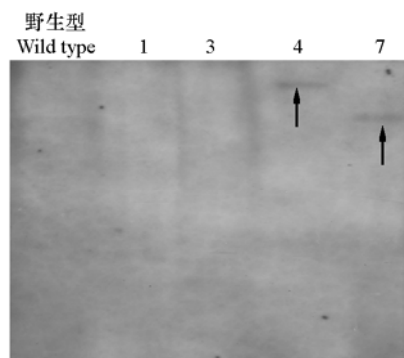


图 10 *DFR* 探针的 Southern 杂交检测结果

1、3、4、7: 转化植株。

Fig. 10 Southern blot result of *DFR* probe

1, 3, 4, 7: Transformation plant.

3 讨论

相关报道表明，*DFR* 基因的异位表达可以改变转基因植株的花色。如豆类模式植物蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 的 *MtDFR1* 基因在烟草中过量表达可导致烟草的花色加深 (Xie et al., 2004)。蓝色花的夏堇栽培品种中内源 *F3'H* 和 *F3'5'H* 基因的敲除可以获得灰粉色花的株系，这种处理降低了花青素和飞燕草色素的含量，同时增加了花葵素含量。这些植株中如果表达玫瑰的 *DFR* 基因，则可以提高花葵素含量，产生深粉色花。利用天竺葵的 *DFR* 代替玫瑰的 *DFR* 基因，也可以使花瓣的粉色加深 (Nakamura et al., 2010)。这些研究结果为利用‘津田’茼蒿 *BrDFR* 基因遗传转化露地菊、丰富露地菊花色的研究奠定了理论基础。

露地菊‘神韵’离体再生体系的建立是进行遗传转化的前提。目前利用农杆菌介导技术向菊花中转入外源基因已经被广泛应用。尽管如此，遗传转化效率仍取决于栽培品种的差异和再生程序的优化 (da Silva et al., 2013)。刘军等 (2004) 指出，菊花遗传转化存在基因型依赖性、转化效率低、再生困难、重复性差和转化细胞不易成苗等问题。因此，不同菊花品种再生和遗传转化体系的建立是实现菊花大规模分子育种亟待解决的首要问题。参考前人的研究数据 (王关林 等, 2004)，本研究中通过不同的激素配比确定了露地菊‘神韵’的最佳离体再生条件。同时进行了甘露糖浓度测试及农杆菌侵染时间等转化条件的优化。在此基础上，利用‘津田’茼蒿 *BrDFR* 基因构建甘露糖筛选的非抗生素型植物表达载体，通过农杆菌介导遗传转化露地菊‘神韵’，期望获得花色更丰富、环境友好型的露地菊新品种。

以往的研究通常利用抗生素和除草剂等抗性基因作为植物遗传转化研究的标记基因，如 *nptII*、*hpt* 和 *Bar* 等。由于携带抗性基因的转基因植物对自然环境存在潜在威胁，因此近年来，有的研究人员在转化时使用标记基因，而在得到阳性转化植株后再通过各种技术手段去除标记基因 (Lutz et al., 2006; Kittiwongwattana et al., 2007)；还有一些研究者则利用双 T-DNA 载体系统有效地培育无选择标记的转基因植物 (辛翠花 等, 2008; 孙磊 等, 2008; Sun et al., 2009)。目前，磷酸甘露糖异构酶基因 (phosphomannose isomerase, *PMI*) 作为有效的正向选择体系的安全标记基因，已经在果树、水稻、棉花及番茄的遗传转化筛选中得到了应用。在甘露糖筛选体系中，转化细胞能够

利用甘露糖作为碳源正常生长和再生, 而未转化细胞则不能利用甘露糖从而抑制正常生长, 以此可以达到筛选阳性转化植株的目的 (Ballester et al., 2008; 王鸿和郝燕, 2011), 同时获得具有环境安全性的新品系。安全标记基因 *PMI* 应用于菊花的遗传转化则刚刚起步。

本试验的研究结果表明, ‘津田’茼蒿 *BrDFR* 基因的非抗生素筛选的表达载体已经构建成功, 遗传转化露地菊 ‘神韵’后经 PCR 和 Southern 杂交验证显示, *BrDFR* 基因已经整合到露地菊 ‘神韵’的基因组中。‘津田’茼蒿 *BrDFR* 基因是否可以改变 ‘神韵’的花色形成还有待进一步的相关试验验证。另外, 露地菊品种 ‘神韵’组织培养体系的建立, 也为通过转基因技术手段改变露地菊花色、培育露地菊新品种奠定了基础。

References

- Ballester A, Cervera M, Pena L. 2008. Evaluation of selection strategies alternative to *nptII* in genetic transformation of citrus. *Plant Cell Rep*, 27 (6): 1005 - 1015.
- Chen Fa-di, Fang Wei-min, Zhao Hong-bo, Guan Zhi-yong, Xu Gao-juan. 2005. New varieties of chrysanthemum-ground cover varieties. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (6): 1167. (in Chinese)
- 陈发棣, 房伟民, 赵宏波, 管志勇, 许高娟. 2005. 菊花新品种——地被菊系列. *园艺学报*, 32 (6): 1167.
- Courtney-Gutterson N, Firoozabady E, Lemieux C, Nicholas J, Morgan A, Robinson K, Otten A, Akerboom M. 1993. Production of genetically engineered color-modified chrysanthemum plants carrying a homologous chalcone synthase gene and their field performance. *Acta Hortic*, 336: 57 - 62.
- Courtney-Gutterson N, Napoli C, Lemieux C, Morgan A, Firoozabady E, Robinson K E. 1994. Modification of flower color in florist's chrysanthemum: Production of a white-flowering variety through molecular genetics. *Biotechnol*, 12 (3): 268 - 271.
- da Silva J A T, Shinoyama H, Aida R, Matsushita Y, Raj S K, Chen F. 2013. Chrysanthemum biotechnology: Quo vadis? *Crit Rev Plant Sci*, 32 (1): 21 - 52.
- Ding Bing, Tong You-li, Li Yu-hua. 2007. New *Chrysanthemum* cultivars ‘Huomeigui’ and ‘Shenyun’. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (3): 803. (in Chinese)
- 丁 兵, 佟友丽, 李玉花. 2007. 地被菊新品种 ‘火玫瑰’ 和 ‘神韵’. *园艺学报*, 34 (3): 803.
- Grotewold E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol*, 57 (1): 761 - 780.
- Hong Bo, Shi Chun-feng, Zhang Xiao-jiao, Gao Jun-ping. 2009. Advances in research of ornamental and agricultural traits in chrysanthemum by gene engineering. *Scientia Agricultura Sinica*, 42 (4): 1348 - 1358. (in Chinese)
- 洪 波, 史春风, 张晓娇, 高俊平. 2009. 菊花观赏性状和农艺性状基因工程改良研究进展. *中国农业科学*, 42 (4): 1348 - 1358.
- Huang Y, Gou J Q, Jia Z C, Yang L, Sun Y M, Xiao X Y, Song F, Luo K M. 2012. Molecular cloning and characterization of two genes encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Populus trichocarpa*. *PLoS One*, 7 (2): e30364.
- Kittiwongwattana C, Lutz K, Clark M, Maliga P. 2007. Plastid marker gene excision by the phiC31 phage site-specific recombinase. *Plant Mol Biol*, 64 (1 - 2): 137 - 143.
- Lee W S, You J A, Chung H, Lee Y H, Baek N I, Yoo J S, Park Y D. 2008. Molecular cloning and biochemical analysis of dihydroflavonol 4-reductase (DFR) from *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* (Chinese cabbage) using a heterologous system. *J Plant Biol*, 51 (11): 42 - 47.
- Li H H, Qiu J, Chen F D, Lv X F, Fu C X, Zhao D X, Hua X J, Zhao Q. 2012. Molecular characterization and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase (DFR) gene in *Saussurea medusa*. *Mol Biol Rep*, 39 (3): 2991 - 2999.
- 李玉花, 刘靖华, 徐启江, 许志茹. 2007. 现代分子生物学模块实验指南. 北京: 高等教育出版社.
- Liu Jun, Zhao Lan-yong, Feng Zhen, Zhang Mei-rong, Wu Yin-feng. 2004. Optimization selection of genetic transformation regeneration system from leaves of *Dendranthema morifolium*. *Chinese Bulletin of Botany*, 21 (5): 556 - 558. (in Chinese)
- 刘 军, 赵兰勇, 丰 震, 张美蓉, 吴银凤. 2004. 菊花叶盘片转基因再生体系的优化选择. *植物学通报*, 21 (5): 556 - 558.
- Lutz K A, Svab Z, Maliga P. 2006. Construction of marker-free transplastomic tobacco using the Cre-loxP site-specific recombination system. *Nat Protoc*, 1 (2): 900 - 910.

- Mitiouchkina T Y, Ivanova E P, Taran S A, Dolgov S V. 2000. Chalcone synthase gene from *Antirrhinum majus* in antisense orientation successfully suppressed the petals pigmentation of chrysanthemum. *Acta Horti*, 508: 215 – 217.
- Nakamura N, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Ishiguro K, Suzuki K, Suzuki H, Okazaki K, Shibata D, Tanaka Y. 2010. Generation of pink flower varieties from blue *Torenia hybrida* by redirecting the flavonoid biosynthetic pathway from delphinidin to pelargonidin. *Plant Biotechnol*, 27 (5): 375 – 383.
- Pitakdantham W, Sutabutra T, Chiemsombat P, Pitaksutheepong C. 2011. Isolation and characterization of dihydroflavonol 4-reductase gene in *Dendrobium* flowers. *J Plant Sci*, 6 (2): 88 – 94.
- Seitz C, Vitten M, Steinbach P, Hartl S, Hirsche J, Rathje W, Treutter D, Forkmann G. 2007. Redirection of anthocyanin synthesis in *Osteospermum hybrida* by a two-enzyme manipulation strategy. *Phytochemistry*, 68 (6): 824 – 833.
- Seo J, Kim S W, Kim J, Cha H W, Liu J R. 2007. Co-expression of flavonoid 3', 5'-hydroxylase and flavonoid 3'-hydroxylase accelerates decolorization in transgenic *Chrysanthemum* petals. *J Plant Biol*, 50 (6): 626 – 631.
- Shih C H, Chu H, Tang L K, Sakamoto W, Maekawa M, Chu I K, Wang M, Lo C. 2008. Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis. *Planta*, 228 (6): 1043 – 1054.
- Shimada N, Sasaki R, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Aoki T, Ayabe S. 2005. A comprehensive analysis of six dihydroflavonol 4-reductases encoded by a gene cluster of the *Lotus japonicus* genome. *J Exp Bot*, 56 (419): 2573 – 2585.
- Shirley B W. 1996. Flavonoid biosynthesis: 'New' functions for an 'old' pathway. *Trends Plant Sci*, 1 (11): 377 – 382.
- Sun L, Zhou L, Lu M, Cai M, Jiang X W, Zhang Q X. 2009. Marker-free transgenic *Chrysanthemum* obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation with twin T-DNA binary vectors. *Plant Mol Biol Rep*, 27: 102 – 108.
- Sun Lei, Zhang Qi-xiang, Zhou Lin, Lu Miao, Cai Ming. 2008. Generating marker-free transgenic *Chrysanthemum* by *Agrobacterium* mediated transformation with twin T-DNA binary vectors. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (5): 727 – 734. (in Chinese)
- 孙磊, 张启翔, 周琳, 陆苗, 蔡明. 2008. 利用双 T-DNA 载体系统获得无选择标记转基因菊花的研究. *园艺学报*, 35 (5): 727 – 734.
- Tanak Y, Sasaki N, Ohmiya A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J*, 54 (4): 733 – 749.
- Tang L K, Chu H, Yip W K, Yeung E C, Lo C. 2009. An anther-specific dihydroflavonol 4-reductase-like gene (*DRL1*) is essential for male fertility in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 181 (3): 576 – 587.
- Trabelsi N, d'Estaintot B L, Sigaud G, Gallois B, Chaudière J. 2011. Kinetic and binding equilibrium studies of dihydroflavonol 4-reductase from *Vitis vinifera* and its unusually strong substrate inhibition. *J Biophys Chem*, 2 (3): 332 – 344.
- Wang Guan-lin, Liu Yan-hong, Guo Shao-hua, Wang Yu, Ji Yan, Fang Hong-jun. 2004. Study on transformation of snowdrop lectin gene to *Chrysanthemum* and aphid resistance of the transgenic plants. *Acta Genetica Sinica*, 31 (2): 1434 – 1438. (in Chinese)
- 王关林, 刘彦泓, 郭绍华, 王宇, 纪彦, 方宏筠. 2004. 雪花莲凝集素基因转化菊花及转基因植株的抗蚜性研究. *遗传学报*, 31 (12): 1434 – 1438.
- Wang Hong, Hao Yan. 2011. Application progress of safe marker gene *pmi* for fruit tree transformation. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (5): 997 – 1002. (in Chinese)
- 王鸿, 郝燕. 2011. 安全标记基因 *pmi* 在果树转基因研究中的应用. *园艺学报*, 38 (5): 997 – 1002.
- Xie D, Jackson L A, Cooper J D, Ferreira D, Paiva N L. 2004. Molecular and biochemical analysis of two cDNA clones encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*, 134 (3): 979 – 994.
- Xin Cui-hua, Liu Qing-chang, Qu Dong-yu, Huang San-wen. 2008. The construction of a binary vector for marker-free transformation in plants. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (5): 701 – 706. (in Chinese)
- 辛翠花, 刘庆昌, 屈冬玉, 黄三文. 2008. 无选择标记的植物表达载体的构建. *园艺学报*, 35 (5): 701 – 706.
- Yong W T L, Abdullah J O, Mahmood M. 2009. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Melastoma malabathricum* and *Tibouchina semidecandra* with sense and antisense dihydroflavonol-4-reductase (*DFR*) genes. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 96 (1): 59 – 67.
- Yu Li-gang, Xie Li-nan, Wang Jiang, Zhang Yang, Li Yu-hua. 2011. Phosphomannose isomerase / mannose selection system to screen *Lc14-3-3* transgenic chrysanthemum plants. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (6): 1139 – 1146. (in Chinese)
- 于利刚, 解莉楠, 王江, 张阳, 李玉花. 2011. 以 *PMI* 为选择标记的露地菊转 *Lc-14-3-3* 基因体系的建立及功能鉴定. *园艺学报*, 38 (6): 1139 – 1146.