

农杆菌介导的百合遗传转化体系的建立

王爱菊¹ 张凤美¹ 鹿金颖¹ 赵祥云² 贾旭¹ 刘敏^{1*}

(¹中国科学院遗传与发育生物学研究所生物技术重点实验室, 中国科学院研究生院, 北京 100101; ²北京农学院园林系, 北京 102206)

摘 要: 通过根癌农杆菌介导的遗传转化方法, 建立了凝望星空百合 (*Lilium* 'Star Gazer') 愈伤组织和西伯利亚百合 (*Lilium* 'Siberia') 叶片的遗传转化体系。试验结果表明: 以愈伤组织和叶片为受体, 均能取得较理想的转化效果; 根癌农杆菌 OD₆₀₀ 介于 0.5 ~ 1.0 时, 能获得较高的转化率; 40 mg · L⁻¹ 的潮霉素对愈伤组织和叶片有很好的筛选效果; 在共培养培养基中, 去除 NH₄NO₃ 对提高百合转化效率有极显著的效果。对转基因百合进行 PCR 检测, 结果表明 *gus* 基因已整合到百合基因组中。

关键词: 百合; 根癌农杆菌; 遗传转化; PCR

中图分类号: S 682.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 03-0664-03

Establishment of Agrobacterium mediated Transformation System of Lily

Wang Aiju¹, Zhang Fengmei¹, Lu Jinying¹, Zhao Xiangyun², Jia Xu¹, and Liu Min^{1*}

(¹Key Laboratory of Plant Biotechnology, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ²Department of Gardens, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China)

Abstract: We established genetic transformation system of lily callus (*Lilium* 'Star Gazer') and leaves (*Lilium* 'Siberia') mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Experimental result indicates that we could get efficient transformation with both callus and leaves as acceptor. We gained high transformation rate when the OD₆₀₀ of *Agrobacterium* was between 0.5 - 1.0. There were better screening to callus and leaves when the concentration of Hygromycin was 40 mg · L⁻¹. Removing NH₄NO₃ from major element could remarkably enhance transformation rate. Results of PCR proved that the *gus* gene had integrated into lily genome.

Key words: *Lilium*; *Agrobacterium tumefaciens*; Genetic transformation; PCR

百合是单子叶多年生宿根花卉, 其花朵硕大, 色彩丰富, 是重要的切花植物。百合的再生能力很强, 再生体系也比较成熟^[1], 但迄今为止国内尚无关于百合的遗传转化体系的报道, 国外研究也较少^[2,3]。我们利用东方百合品种, 对影响东方百合遗传转化的几个因素进行了研究, 建立了较高的农杆菌遗传转化体系, 为东方百合的基因工程育种奠定了基础。

1 目的、材料与方法

试材为东方百合系列品种 '西伯利亚' (Siberia) 和 '凝望星空' (Star Gaze)。所用基本培养基为 MS 培养基。培养基配方如下: C0-1: MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 ~ 0.5 mg · L⁻¹ + 蔗糖 30 g · L⁻¹ + 肌醇 0.1 g · L⁻¹ + 琼脂 5 g · L⁻¹, pH 5.8; C0-2: MS + 6-BA 2.0 mg · L⁻¹ + KT 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + 2, 4-D 0.1 mg · L⁻¹ + 蔗糖 30 g · L⁻¹ + 肌醇 0.1 g · L⁻¹ + 琼脂 5 g · L⁻¹, pH 5.8; C1: MS + NAA 0.2 mg · L⁻¹ + 蔗糖 30 g · L⁻¹ + 肌醇 0.1 g · L⁻¹ + 琼脂 5 g · L⁻¹, pH 5.8; C2: MS + Picram 3 mg · L⁻¹ + 蔗糖 20 g · L⁻¹ + 麦芽糖 10 g · L⁻¹ + 肌醇 0.1 g · L⁻¹ + 琼脂 5 g · L⁻¹, pH 5.8; CL3: MS + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + ZT 0.1 mg · L⁻¹ + NAA 1.0 mg · L⁻¹ + 蔗糖 30 g · L⁻¹ + 肌醇 0.1

收稿日期: 2005 - 06 - 22; 修回日期: 2005 - 08 - 30

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: mliu@genetics.ac.cn)

$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8; C4: C2液体 (大量元素中去除 NH_4NO_3) pH 5.2 ~ 5.4, 使用前加乙酰丁香酮 (As)。

百合球茎表面消毒后, 接种到 C0-2培养基上, 30 d左右得到组培苗, 组培苗继代培养基为 C0-1培养基。将组培苗接种到 C1培养基于黑暗条件下培养得到白化苗和叶片, 之后取白化苗的叶片切成段接种到脱分化培养基 C2培养基上 24 黑暗培养得到愈伤组织。

转化载体: 用农杆菌菌株为 LBA4404, 双元载体 pCAMBIA1301 进行转化, 通过检测报告基因 *gus* 的表达来检测转化效率。载体质粒图谱为:

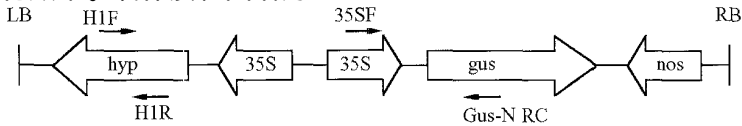


图 1 双元载体 pCAMBIA1301 中的 T-DNA 区域

Fig. 1 T-DNA region of the transformation vector pCAMBIA1301

农杆菌介导的转化: 收集培养好的农杆菌菌体用共培养基 (C4 + As) 重新悬浮至 OD_{600} 0.5 ~ 1.0 左右, 将愈伤组织或叶片置于悬浮液中浸染 30 min, 用灭菌滤纸吸干表面液体, 置共培养基 (C4 + As) 中 24 黑暗培养 3 ~ 4 d。

将转化的愈伤 (或叶片) 取出, 置于筛选培养基中 ($\text{C2} + 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ce} + 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{hyp}$, 叶片用 CL3 代替 C2), 24 暗培养 3 周, 之后再继代筛选 3 周。然后将正常生长的愈伤或叶片 (阳性候选组织) 移入分化培养基 ($\text{C0-2} + 250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ce} + 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{hyp}$) 中生芽, 获得抗性苗。

转化共培养后对转化受体进行 *gus* 染色, 检测转化的瞬时表达率, 可初步判断农杆菌对受体组织的浸染效率。取转基因百合植株叶片进行 *gus* 染色, 检测 *gus* 基因在转基因植株中的表达, 取未转化的同步材料为阴性对照。

用 SDS 法提取转基因百合植株和未转化植株的 DNA。检测 *hyp* 基因的引物序列为 H1F: 5'-GACGGTGTCTGCCATCACAGTTT-3' 和 H1R: 5'-ACTCACC GCGACGTCTGTCAGAA-3'; 检测 *gus* 基因的引物序列为 35SF: 5'-GGGATGACGCACAA TCCCACTATC-3' 和 *gus*-NRC: 5'-ACGCGTGGTTA-CAGTCTTGC-3', 扩增片段范围如图 1 所示。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导和叶片分化

通过球茎在 C0-2培养基上得组培苗, 将其转移到 C1培养基上, 暗培养得白化苗 (同时达到扩繁的目的), 再将白化苗的叶片切成段, 在 C2培养基上诱导得到大量的分化能力强的愈伤组织。

生长素 Picbram (4-氨基-3, 5, 6-三氯吡啶-2-羧酸) 在作物组培方面应用不多^[4], 但在百合愈伤组织诱导中引入 Picbram 对诱导愈伤组织有很好的效果。在诱导培养基中加入 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Picbram, 将 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖改为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 麦芽糖, 可以得到很好的愈伤组织。

百合叶片可以直接分化得苗^[1], 因此可以用叶片作转化受体进行转化。但是不同的百合品种间叶片分化效率差异较大。在 CL3 培养基上, 西伯利亚百合叶片生长势比较强, 分化效率也较高, 故选用西伯利亚百合叶片进行转化。

2.2 潮霉素对百合愈伤组织和叶片的筛选压的确定

试验结果显示, $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素对百合愈伤组织和叶片有很好的筛选效果, $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对百合的幼苗即有很好的筛选效果, 证明潮霉素在百合的遗传转化中是很好的筛选剂。

2.3 NH_4NO_3 对转化效率的影响

在 MS 基本培养基中, 大量元素的 NH_4NO_3 的浓度为 $20.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。农杆菌转化百合愈伤组织和叶片时, 用 MS 基本液体培养基进行共培养, 培养 7 d 只有很少的农杆菌生长, 转化效率为零; 而

在共培养液体培养基的大量元素中去除了 NH_4NO_3 后进行共培养, 培养 3 d 农杆菌即有大量生长, 瞬时转化效率可达 50%。农杆菌的生长和对受体的附着是农杆菌转化的前提, NH_4NO_3 对转化效率的显著的影响可能是因为在百合转化中, 较高的氨离子浓度会显著抑制农杆菌的生长。这与 Hoshi 等的结果^[5]也是一致的。

2.4 受体材料对转化效率的影响

分别以愈伤和叶片为受体材料进行转化, 比较转化效率的差别。结果发现愈伤组织的转化效率高与叶片。叶片的转化效率与百合品种有密切关系, 西伯利亚叶片转化效率较高, 而凝望星空的则很低, 可能与西伯利亚的叶片生长势比较强, 由叶片生成愈伤组织并进一步分化成苗的效率较高有关。

2.5 菌液浓度对转化效率的影响

改变转化时菌液浓度, 测得 OD_{600} 分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2, 转化后对转化受体进行 *gus* 染色, 结果表明: 随着 OD_{600} 的增加, 瞬时表达率呈先升后降的趋势, 当 OD_{600} 为 0.8 时, 叶片和愈伤组织的瞬时表达率最高, 均达到 50%。

2.6 转基因百合 DNA 提取和 PCR 检测

经农杆菌转化筛选后, 抗性愈伤组织或叶片进行分化得到转基因植株。试验中共得到 12 个潮霉素抗性转基因株系, 我们对其中的 5 个株系 (凝望星空 3 个株系, 编号为 T-1 ~ T-3, 西伯利亚两个株系, 编号为 T-4 和 T-5) 做进一步检测。

用 SDS 法提取转基因百合植株的 DNA, 稀释后进行 PCR 反应, 其中对潮霉素基因检测用其特异引物 H1F 和 H1R, 扩增出约 500 bp 的片段, 表明潮霉素基因已整合到转基因百合基因组中; 同时, 我们用 35S 启动子的引物和 *gus* 基因的引物相结合进行扩增, 得到约 900 bp 的片段, 由于 35S 启动子是病毒的启动子, 在植物中没有同源序列, PCR 结果证实 *gus* 基因整合到转基因百合基因组中。

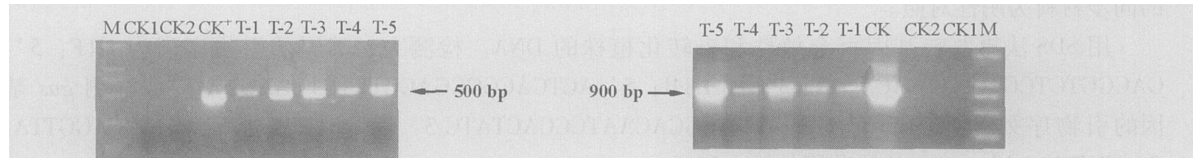


图 2 转基因百合潮霉素基因 (左) 和 *gus* 基因 (右) 的 PCR 检测

M: DL2000; CK1: 水; CK2: 非转基因百合; CK+: 质粒 pCAMB A1301; T-1 ~ T-5: 5 个转基因百合株系。

Fig. 2 PCR of transgenic lily with hygromycin gene (left) and *gus* gene (right)

M. DL2000; CK1. H_2O ; CK2 untransgenic lily; CK+. plasmid pCAMB A1301; T-1 - T-5. five lines of transgenic lily

参考文献:

- 李 艳, 李英慧, 田广澍, 方宏筠, 王关林, 张 新. 百合基因转化受体系统的建立. 沈阳师范学院学报 (自然科学版), 1999, 2: 55 ~ 58
Li Y, Li Y H, Tian G S, Fang H J, Wang G L, Zhang X. Building of acceptor system of gene transfer in lily. Journal of Shenyang Normal University (Natural Sciences), 1999, 2: 55 ~ 58 (in Chinese)
- Simon A, Langeveld M M, Gerrits A, Piet M B. Transformation of lily by *Agrobacterium*. Euphytica, 1995, 85: 97 ~ 100
- Mitsugu H, Hitomi M, Fuminori K. Regeneration of flowering plants from difficile lily protoplasts by means of nurse culture. Planta, 2002, 215: 880 ~ 884
- 林 刚, 何勇刚, 刘 勇, 何光源. 激素对小麦愈伤组织诱导和植株再生的影响. 华中科技大学学报 (自然科学版), 2004, 32 (9): 111 ~ 113
Lin G, He Y G, Liu Y, He G Y. The effects of plant growth regulator and explants on wheat callus induction and regeneration. Journal of Huazhong University of Science and Technology (Natural Sciences Edition), 2004, 32 (9): 111 ~ 113 (in Chinese)
- Hoshi Y, Kondo M, Kobayashi H. Production of transgenic lily plants by *Agrobacterium* mediated transformation. Plant Cell Report, 2004, 22: 359 ~ 364