

枸杞转基因植株的再生

王慧中* 黄发灿 李安生 邵启全 牛德水

(中国科学院遗传研究所, 北京)

本文报道一个快速简便的枸杞转化再生系统。宁夏枸杞的幼茎外植体, 能被含非致瘤性Ti质粒载体的根癌农杆菌感染。在该载体双向启动子的一端连有一个npt- I基因(新霉素磷酸转移酶 I 基因)以供选择卡那霉素抗性的转化植物细胞。把选择诱导培养基上形成的愈伤组织转到选择分化培养基后能很快分化出芽点, 继而长成完整的小植株。对再生植株的NPT- I酶活性检测及DNA分子杂交表明: 外源基因已整合到枸杞细胞的核基因组上, 并能在植株水平表达出相应的性状。

关键词 转化; 枸杞; 选择培养基; 根癌农杆菌

近年来, 由于植物分子生物学和组织培养技术的发展, 已建立了多种向高等植物导入外源基因的途径, 其中最为常用也是最完善的是以农杆菌的Ti质粒为载体的基因转移技术。就目前所知, 农杆菌几乎能感染所有的双子叶植物, 能被感染的单子叶植物数量也在不断增多。所以Ti质粒有可能成为双子叶植物和某些单子叶植物基因工程的通用载体。该法具有操作简便、转化频率高、能使外源基因较完整地导入受体细胞并整合到其核基因组中等优点。

枸杞是一种名贵中药, 具有坚筋骨, 补肝肾, 滋肾润肺之功效。黑果病是枸杞的主要病害。由于黑果病的危害, 使其品质下降, 危害严重时可以减产50—80%^[1]。运用以上介绍的基因转移技术, 可将有应用价值的外源基因(如抗虫基因、抗病毒基因等)导入枸杞, 从而达到提高品质和增产的目的。本文报道利用根癌农杆菌Ti质粒为载体, 将外源的npt- II基因引入了枸杞细胞, 为枸杞品种的改良打下了基础。

材料和方法

(一) 细菌菌株及其培养

本试验所用的根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)内含非致瘤性Ti质粒pC27。该质粒在其双向启动子的一端连有一个npt- II基因以供选择卡那霉素抗性的转化细胞, 图1为该质粒的图谱。菌株在附加卡那霉素50 μ g/ml的YEB培养基上培养。在26 $^{\circ}$ C下振荡培养过夜, 细菌生长到对数期, 即可用于转化试验。

(二) 植物材料

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L)由牛德水同志提供。该材料采用扦插技术繁殖。待扦插的枸杞茎段产生分枝和绿叶之后, 采取其幼嫩的茎段作为试验材料。

(三) 转化及培养方法

选取宁夏枸杞的幼茎为外植体, 用清水冲洗干净, 再依次用70%酒精浸泡2 min, 0.1%昇汞消毒15 min, 无菌水冲洗5次。把无菌幼茎切成约0.6 cm长的片段, 在用消毒过的液体MS基本培养基稀

本文于1990年10月19日收到。

* 现在地址: 浙江省中药研究所。

释20倍的农杆菌菌液中浸泡10min,然后用消毒滤纸吸干外植体表面水分,接入MS+2,4-D(0.2mg/L)+乙酰丁香酮(40 μ mol)的固体预培养基中培养两天,转入MS(2,4-D 0.2mg/L)+卡那霉素(60 μ g/ml)+头孢霉素(500 μ g/ml)的选择诱导培养基中以进行卡那霉素抗性愈伤组织的筛选。一部分愈伤组织作为继代培养,每两周继代一次;另一部分愈伤组织则转入MS+6-BA(0.2mg/L)+卡那霉素(60 μ g/ml)+头孢霉素(500 μ g/ml)的选择分化培养基上进行卡那霉素抗性绿芽的筛选。当芽长至1.5cm高时转到MS+NAA(0.2mg/L)+卡那霉素(25 μ g/ml)+头孢霉素(150 μ g/ml)的选择培养基中生根。除了卡那霉素和头孢霉素之外,其他培养基成分高压灭菌前一次性加入,琼脂0.7%,pH值5.8,培养温度 $26\pm 2^{\circ}\text{C}$,每天光照14h,光照强度1600lx。

(四) NPT-Ⅱ酶活性测定

采用 Angenon, G. 所用的方法测定^[2]。

(五) 转化组织DNA的提取及分子杂交

采用快速简单的微量制备方法^[3]提取植物DNA。质粒DNA按碱法^[4]分离提纯。探针标记采用缺口平移法^[5]。DNA分子杂交参考文献[5]。探针质粒为pCaMVneo, 内含CaMV35S启动子、npt-Ⅱ结构基因和nos基因3'端构成的标记基因。

结果与讨论

(一) 枸杞幼茎的组织培养

取无菌的幼茎,切成约0.6cm长的片段,接种到MS+2,4-D(0.2mg/L)的培养基上。5天之后便出现肉眼可见的淡绿

色的愈伤组织,愈伤组织诱导率达90%以上。1个月之后愈伤组织覆盖整个瓶子(图版I-1)。这些愈伤组织一方面在相同的培养基上进行继代培养,半个月转接一次;另一方面转到MS+6-BA(0.2mg/L)的分化培养基上,一周之后便可在愈伤组织表面出现许许多多的绿色小芽点。芽点生长很快,10天之后约可长到1.5cm高,此时切下来转到MS+NAA(0.2mg/L)的培养基上生根,很快就长出了根。

(二) 卡那霉素浓度的选择

合适的卡那霉素浓度既能有效地抑制非转化细胞的生长,又不影响转化细胞的正常生长。试验结果见表1、图版I-2和图版I-3。

根据表1的试验结果,我们把该转化试验卡那霉素的浓度选在60 μ g/ml。

(三) 幼茎外植体的转化及卡那霉素抗性植株的再生

取无菌的幼茎,切成约0.5cm长的片段,经农杆菌感染之后,预培养2天,转入选择诱导培养基,一周后产生肉眼可见的淡绿色的愈伤组织,以后愈伤组织增殖很快(图版I-4)。两周后将卡那霉素抗性的愈伤组织转到选择分化培养基,很快愈伤组织表面长出了许多绿色的小芽点。待芽长到1.5cm高时,转到MS+NAA(0.2mg/L)+卡那霉素(25 μ g/ml)+头孢霉素(150 μ g/ml)的选择培养基上,能够很快生根,一个月之后植株高度可达3cm(图版I-5,图版I-6)。

(四) 转化体的鉴定

1. NPT-Ⅱ酶活性测定:取抗卡那霉素60 μ g/ml的绿苗为本实验材料,以非转化的绿芽为对照,定性测定了NPT-Ⅱ酶的活性(图版I-7)。结果表明:枸杞转化体含有迁移率与转化百脉根^[6]相同的NPT-Ⅱ酶带,而非转化的对照没有相应

的酶带。另外从图上还可看出枸杞和百脉根均有干扰蛋白存在。

2. DNA 分子点杂交: 取从卡那霉素抗性的绿苗中提取的DNA为实验材料, 从非转化的绿芽中提取的 DNA 为对照进行 DNA 分子点杂交(图版 I -8)。结果表明: 转化组织DNA中有与 npt- II 同源的基因片段, 而对照 DNA 没有相应的同源片段。

表 1 卡那霉素敏感性试验

Table 1 The experiment of kanamycin-sensitivity

卡那霉素浓度 Conc. of kanamycin ($\mu\text{g/ml}$)	25	50	75	100
枸杞幼茎切段 Young Stem segments of <i>Lycium barbarum</i> L.	+	-	-	-

“+”: 能长愈伤组织, The normal growth of calli

“-”: 不能长愈伤组织, 死亡, No growth of calli & eventual death

以上结果表明: 外源的卡那霉素抗性基因已通过根癌农杆菌介导的基因转移技术导入了枸杞, 并能在植株水平表达出相应的性状——卡那霉素抗性。

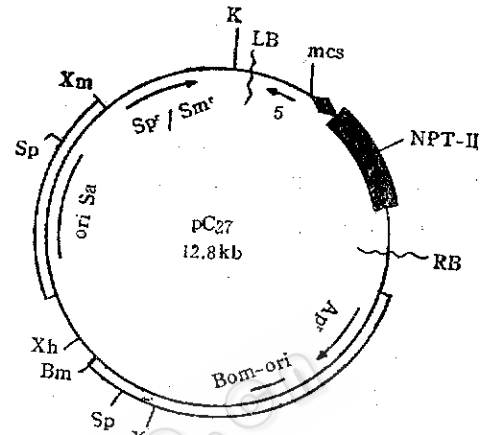


图 1 质粒 pC27 图谱

Fig. 1 Vector map of plasmid pC27.

参 考 文 献

- [1] 牛德水, 邵启全: 遗传, 5(6):24—26, 1983.
- [2] Angenon, G. et al.: EMBO Course on Plant Mol. Bio., August, pp.42—45, 1987.
- [3] Mettler, I.: Plant Mol. Biol. Rep., 5:346—349, 1987.
- [4] Maniatis, T. et al.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [5] 蔡良雍主编: 核酸研究技术(上册), 科学出版社, 1987.
- [6] 虞剑平等: 中国科学, 3:271—274, 1990.

Regeneration of Transgenic *Lycium barbarum* L.

Wang Huizhong Huang Facan Li Ansheng Shao Qiquan Niu Deshui
(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing)

A simple and effective system for transformation and regeneration of *Lycium barbarum* L. has been developed. Young stem segments from *Lycium barbarum* L. could be infected by *Agrobacterium tumefaciens* harboring a non-oncogenic Ti plasmid derived vector which containing a npt- II gene. Calli originated from selective induction medium can differentiate into buds on selective different medium quickly, finally developing into whole plants. NPT- II enzyme activity assay and DNA hybridization indicated that the foreign gene had been integrated into

the genome of *Lycium barbarum* L. and could be expressed in plants.

Key words

Transformation; *Lycium barbarum* L.; selective medium; *Agrobacterium tumefaciens*

图版说明

Explanation of plate I

1. 幼茎切段在2,4-D(0.2 mg/L) 培养基上五周后形成的愈伤组织
Calli induced from young stem segments on 2,4-D(0.2mg/L) medium after 5 weeks culture
2. 幼茎切段在含卡那霉素25 μ g/ml的培养基上四周后形成的愈伤组织
Calli originated from young stems segments on medium containing kanamycin 25 μ g/ml after 4 weeks culture
3. 幼茎切段在含卡那霉素 50 μ g/ml的培养基上四周后仍不能长愈伤组织
No calli induced from young stem segments on medium containing kanamycin 50 μ g/ml after 4 weeks culture
4. 农杆菌转化后的幼茎切段在含卡那霉素60 μ g/ml的培养基上培养三周后形成的愈伤组织
Calli originated from young stem segments infected by *Agrobacterium tumefaciens* on medium containing kanamycin 60 μ g/ml after 3 weeks culture
- 5,6. 转基因的枸杞苗
Transgenic plantlets of *Lycium barbarum* L.
7. NPT-Ⅰ酶活性测定 NPT-Ⅰ assay
a: 非转化百脉根, b: 转化百脉根; c: 非转化枸杞, d: 转化枸杞
a: Untransformed *Lotus corniculatus*; b: Transformed *Lotus corniculatus*; c: Untransformed *Lycium barbarum* L.; d: Transformed *Lycium barbarum* L.
8. DNA分子杂交 DNA hybridization
a: 含npt-Ⅰ基因的pCaMVneo质粒; b: 转化枸杞; c: 非转化枸杞。
a: Plasmid pCaMVneo containing npt-Ⅰ gene; b: Transformed *Lycium barbarum* L.; c: Untransformed *Lycium barbarum* L.

