

应用农杆菌介导法的多年生黑麦草遗传转化研究^{*}

刘 萍¹, 张振霞¹, 苏 乔², 袁剑刚¹, 席嘉宾¹, 辛国荣¹, 杨中艺¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 大连理工大学, 辽宁 大连 116024)

摘 要: 以草坪型多年生黑麦草 *Lolium perenne* L. 成熟种子为外植体, 经过愈伤组织诱导和植株再生研究, 建立了该草种的遗传转化体系, 并成功地应用农杆菌介导法将克隆自辽宁碱蓬的甜菜碱醛脱氢酶基因 (*BADH*) 转移进多年生黑麦草, 获得的转基因株系 Gsc-LP5 通过 PCR 检测证明了目的基因的存在, 通过叶片离体检测法证明了作为检测基因随同质粒一同转入的抗潮霉素基因的 表达, 通过盆栽耐盐试验证明了转基因植株具有较强的耐盐能力。

关键词: 多年生黑麦草 *Lolium perenne* L.; 愈伤组织诱导; 植株再生; 遗传转化; 农杆菌介导法

中图分类号: Q344⁺. 13 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 03-0126-03

多年生黑麦草 *Lolium perenne* L. 是一种应用广泛的重要草坪草, 为了改良多年生黑麦草的抗逆性, 国外有关多年生黑麦草的转基因技术研究进展很快, 利用分生组织和颖果作为外植体均获得了再生植株, 建立了多年生黑麦草细胞悬浮系和原生质体培养体系^[1-3]。对遗传转化方法的研究也正在深入, 已经通过基因枪法和碳化硅纤维介导法获得了转基因植株^[4-7], 但尚未见转基因新品种的出现, 也未见利用农杆菌介导法成功进行遗传转化的研究报道。在国内则未见有关多年生黑麦草遗传转化的研究报道。本研究主要探讨了利用农杆菌介导法将具有耐盐性的甜菜碱醛脱氢酶基因转入多年生黑麦草的方法, 试图获得具有一定耐盐能力的多年生黑麦草转基因植株。

1 材料和方法

1.1 植物材料和质粒 供试植物材料为多年生黑麦草品种为旋风 *Priouette* 和百尼牡 *Barlennium*。实验所用根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株为 LBA4404, 含有整合了甜菜碱醛脱氢酶基因 (*BADH*) 和抗潮霉素基因 (*hpt*) 的质粒 *pCAMBIA1301*。所用 *BADH* 克隆自辽宁碱蓬 *Suaeda liaotungensis*, 由大连理工大学安利佳教授惠赠。

1.2 多年生黑麦草愈伤组织诱导和分化培养基 经过研究获得了一系列用于多年生黑麦草组织培养的优化培养基, 包括愈伤组织诱导培养基: MS 培养基附加 5 mg/L 2, 4-D、0.05 mg/L 6-BA、1 mg/L

ABA 和 1 g/L CH; 分化培养基: MS 培养基附加 3 mg/L 6-BA、1 mg/L NAA 以及 1 mg/L KT; 生根培养基: 1/2MS 培养基附加 0.5 mg/L NAA 和 3 g/L Phytagal。

1.3 多年生黑麦草遗传转化 多年生黑麦草愈伤组织预培养 10 d 后放入经活化培养的农杆菌培养物中, 慢速 (120 r/min) 振荡培养 20 min, 再静置 10 min。将经感染处理的愈伤组织吹干 2~3 h 后放在共培养基上培养 2 d, 然后用 0.1 mol/L 甘露醇无菌液振荡清洗, 再用 300 mg/L 头孢霉素液 120 r/min 振荡洗涤 3 次。干燥处理 2 d 后置于含 300 mg/L 头孢霉素和 50 mg/L 潮霉素的第一次筛选培养基上培养, 挑选表现出潮霉素抗性的愈伤组织置于含 70 mg/L 潮霉素的第二次筛选培养基培养; 将生长旺盛的抗性愈伤组织转移到分化培养基进行植株再生培养, 然后将分化产生的幼苗转移至生根培养基上生根培养, 当幼苗长至 8~10 cm 高时移植到土壤中。

1.4 遗传转化检测方法 选取转化后再生的潮霉素抗性植株及未转化植株进行 PCR 检测。利用叶片离体检测法检测了已转入 *BADH* 基因的再生植株的潮霉素抗性^[8]。对经上述两种方法检测均证实为阳性的 1 个株系进行了盆栽耐盐性检测。方法是: 将该株系、另一非抗性再生植株以及通过种子发芽获得的实生苗同时移植到 35 cm×25 cm×15 cm 的塑料方盆中进行土培, 60 d 后用 $w=0.5\%$ 的 NaCl

^{*} 收稿日期: 2005-04-20

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项基金资助项目 (J2002-B-006)

作者简介: 刘萍 (1976 年生), 女, 博士生; 通讯联系人: 杨中艺; E-mail: adszyz@zsu.edu.cn

溶液进行处理，浇水量为 200 mL/d，连续浇灌 5 d。75 d 后观察其受盐害的情况。

2 结果与讨论

2.1 愈伤组织诱导和植株再生效率 经优化的愈伤组织诱导和分化培养基获得了最高 16.3% 的愈伤组织诱导率和 38.8% 的植株再生率（图 1：1—6），其中植株再生率的品种间差异极大，这与以往的研究结果相似^[9]。在愈伤组织诱导中，如果培养基中 2, 4-D 含量过高，容易产生蓬松、无胚性的愈伤组织（图 1：7）。在植株再生过程中则发现为数不少的白化苗（图 1：8），其原因尚不清楚。

2.2 农杆菌介导的 *BADH* 基因遗传转化 共使用了 1 928 个愈伤组织进行农杆菌介导的 *BADH* 基因遗传转化，经过 2 次潮霉素筛选（图 2），共获得 267 个抗性愈伤组织，经过分化培养，共获得 109 株具有潮霉素抗性的再生植株，因此，本研究所采用的转化系统的抗性植株率为 5.65%，显示了农杆菌介导的多年生黑麦草遗传转化的效率确实是比较低的，但也并非不可用的。

2.3 抗性植株的遗传转化检测 从上述 109 个植株中随机选取 5 个植株进行 *BADH* 基因的 PCR 检测，其中株系 Gsc-IP5（来自品种旋风）证实为阳性株（图 3），对此株系进行的叶片离体检测的结果也显示了潮霉素抗性阳性（图 4）。在此基础上通过盆栽试验对 Gsc-IP5 株系进行了耐盐性检测，结果显示该株系比来自相同品种的非遗传转化再生植株以及实生苗有更强的耐盐能力，且株型变得更加矮小致密（图 5）。

参考文献：

[1] DALTON S J. Plant regeneration from cell suspension

protoplasts of *Festuca arundinacea* Schreb. (tall fescue) and *Lolium perenne* L. (perennial ryegrass)[J] . Journal of Plant Physiology, 1988, 132: 170—175.

[2] TORELLO W A, Symington A G. Regeneration of perennial ryegrass callus tissue[J] . Horticulture Science, 1994, 19: 56—57.

[3] WANG Z Y, NAGEL J, POTRYKUS I, et al. Plant from suspension cell—derived protoplasts in *Lolium* species[J] . Plant Science, 1993, 94: 179—193.

[4] SPANGENBERG G, WANG Z Y, WU X L. Transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells[J] . Plant Science, 1995, 108: 209—217.

[5] DALTON S J, BETTANY A J E, TIMMS E, et al. Co-transformed diploid *Lolium perenne* (perennial ryegrass), *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) and *Lolium temulentum* (darnel) plant produced by microprojectile bombardment[J] . Plant Cell Reports, 1999, 18: 721—726.

[6] HENSGENS L A, de BAKKER E P, van Os-RUYGROK E R, et al. Transient and stable expression of gusA fusions with rice genes in rice, barley and perennial ryegrass[J] . Plant Molecule Biology, 1993, 23(4): 643—669.

[7] DALTON S J, BETTANY A J E, TIMMS E, et al. Transgenic plants of *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* and *Agrostis stolonifera* by silicon carbide fibre-mediated transformation of cell suspension cultures [J] . Plant science, 1998, 132: 31—43.

[8] 刘巧泉, 陈秀花, 王兴稳, 等. 一种快速检测转基因水稻中潮霉素抗性的简易方法[J] . 农业生物技术学报, 2001, 9(3): 264—268.

[9] BRADLYE D E, BRUNEAU A H, QU R D. Effects of cultivar, explant treatment, and medium supplements on callus induction and plantlet regeneration in perennial ryegrass[J] . International Turfgrass Society Research Journal, 2001, 9: 152—156.

Transgenic *Lolium perenne* L. Applying *Agrobacterium* mediated Gene Transfer

LIU Ping¹, ZHANG Zhen xia¹, SU Qiao², YUAN Jian gang¹, XI Jia bin¹, XIN Guo rong¹, YANG Zhong yi¹

(1.School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;
2.Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: *BADH* gene cloned from *Suaeda liaotungensis*, a salt tolerant plant, was transferred into *Lolium perenne* L. by *Agrobacterium* mediated gene transfer method. The transgenic plants were examined by PCR detection, hygromycin resistance assay and salt tolerance test. As the result, strain Gsc-IP5 among the regenerated plants from hygromycin resistant calli was found to respond positively to the examinations, and therefore was considered to be a successful transgenic plant. Further studies are carrying out for the other regenerated plants.

Key words: *Lolium perenne* L.; callus induction; plant regeneration; gene transfer; *Agrobacterium* mediated



图 1 愈伤组织诱导和植株再生

Fig 1 Callus induction and plant regeneration

1: 愈伤组织培养; 2: 致密的胚性愈伤组织; 3: 开始分化的绿芽丛; 4: 植株再生
5: 生根培养; 6: 再生植物盆栽 7: 蓬松白色的无胚性愈伤组织; 8: 白化苗

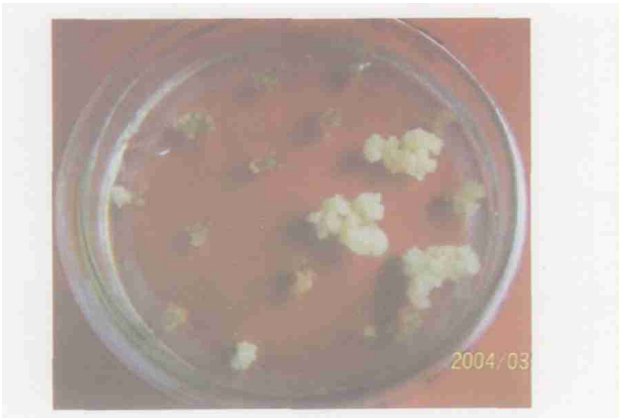


图 2 抗性愈伤组织筛选

Fig 2 Selection of hygromycin resistant callus

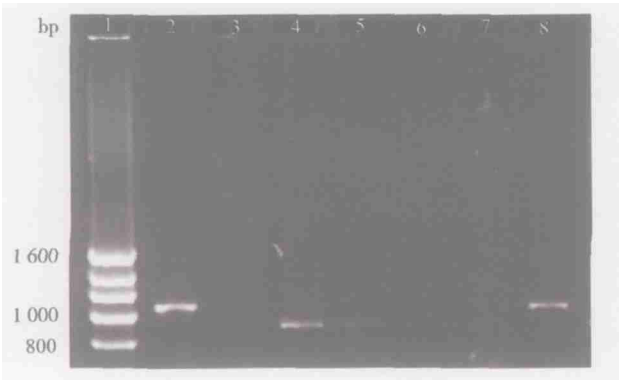


图 3 Gsc-IP5 株系抗潮霉素离体检测结果

Fig 3 Hygromycin resistance assay of regenerated strain Gsc-IP5

1: Mark; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照; 4: Gsc-IP1;
5: Gsc-IP2; 6: Gsc-IP3; 7: Gsc-IP4; 8: Gsc-IP5



图 4 PCR 检测结果 PCR detection, 显示 Gsc-IP5 植株为 *BADH* 遗传转化阳性株系

Fig 4 *BADH* was found to be transferred into the strain Gsc-IP5



图 5 Gsc-IP5 株系耐盐性盆栽试验 (处理后 75 d)

Fig 5 Salt tolerance test in pot for the strain Gsc-IP5 (the 75th day after salt treatment)