

生长点滴滴法在筛选鉴定转基因植株中的应用*

金万梅, 巩振辉, 吕元红

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 对转化体(种子或幼苗)筛选的培养基筛选法和生长点滴滴筛选法进行了比较分析。结果表明, 在4 d 苗龄的转化芥菜幼苗生长点滴滴 800 mg/L 的潮霉素, 获得了转基因植株, PCR 检测结果表明, 两种筛选方法的筛选结果一致。生长点滴滴法的优点是, 转基因幼苗不易污染, 且成活率高。

[关键词] 芥菜; 转基因植株; 筛选方法; 生长点滴滴法

[中图分类号] S637.203.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2002)05-0023-04

自1984年报道获得第一例完整转基因植株以来, 转基因研究进展很快。植物转基因作为现代育种的重要手段, 可在短时间内实现品种改良, 缩短育种周期, 提高育种效率, 并可以打破物种界限, 为培育新品种服务。目前, 已有近200种植物转基因成功, 并且有许多商品化品种大面积推广, 这些品种具有抗虫、抗病、抗除草剂、抗逆及品质改良等优点^[1~4]。植物转基因日益显示出巨大潜力, 采用多种遗传转化方法可将外源目的基因导入植物染色体组中, 获得转基因植株, 但大部分受体是未转化的^[4, 5]。筛选转化体时, 一般采用在培养基中添加一定质量浓度的抗生素, 转化体可在此种培养基中正常生长, 而非转化体则黄化死亡。如果培养基筛选污染严重, 转化体在移栽过程中就难以成活, 大大影响转化效果^[6, 7]。为此, 本研究试图通过对培养基筛选法和生长点滴滴筛选法的比较, 建立较为完善的生长点滴滴筛选法, 为解决常规培养基筛选转化体时污染率高、转化体移栽成活率差的问题提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 携带潮霉素磷酸转移酶基因和CaMV Cabb B-J1基因VI的农杆菌菌株GV3101(本实验室保存), 用植株原位真空渗入遗传转化技术, 转化雪里蕻和圆叶芥, 获得T₁代种子。对照为未经任何处理的雪里蕻和圆叶芥种子。

1.1.2 药品与试剂 潮霉素为Sigma公司产品;

引物、dNTP、Taq 酶、10×缓冲液、Mg²⁺均为Sangon产品; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 培养基筛选 筛选培养基1/2MS, 经1 mol/L NaOH 或1 mol/L HCl调pH至7.0, 高压灭菌后, 冷却至55℃加入不同质量浓度的潮霉素。试验设6个处理, 潮霉素质量浓度分别为0, 15, 20, 25, 30, 35 μg/mL。将非转化种子用体积分数70%的酒精消毒30 s, 体积分数2%的次氯酸钠浸泡25 min, 无菌水冲洗3次, 每次5 min, 接种在培养基中, 观察记录子叶和根的生长发育状况, 确定芥菜种子筛选的最佳质量浓度和筛选时期。在此基础上, 以获得的最佳筛选质量浓度和筛选时期对雪里蕻和圆叶芥T₁种子各2000粒进行筛选。

1.2.2 生长点滴滴筛选法 将对照种子用体积分数70%的酒精消毒30 s, 体积分数2%的次氯酸钠处理25 min, 播种在湿透的海绵上, 23℃催芽12 h, 置于23℃光照充足的条件下生长, 每天给海绵中加适量的水, 待第4天子叶完全展平, 取4 μL 质量浓度分别为0, 600, 800, 1000, 1200 μg/mL 的潮霉素^[8], 轻轻地滴在生长点上, 观察记录子叶和根的生长发育状况, 确定最佳质量筛选浓度和筛选时期。在此基础上, 以获得的最佳筛选质量浓度和筛选时期对雪里蕻和圆叶芥T₁种子各2000粒进行筛选。

1.2.3 芥菜转基因植株的分子检测 (1) 芥菜转基因植株的微量DNA提取。随机各取1株抗性苗, 取

* [收稿日期] 2002-09-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39770522); 陕西省自然科学基金项目(2001SM11); 科技部杨凌生物育种中心基金项目(99-18)

[作者简介] 金万梅(1971-), 女, 甘肃靖远人, 硕士, 主要从事植物遗传转化研究, 现就职于北京市农林科学院林业果树研究所草莓基因组组(北京香山瑞王坟甲12号, 100093)。

幼嫩叶片0.05 g,方法参照文献[9, 10]。(2)PCR 检测^[2, 11]。用CaMV Cabb B-J I 基因Ⅵ的3和5端作引物进行PCR扩增。引物1:CTTCTTTATCTAGAGGAAGGGT;引物2:ACATCTCTGGTACCTGAGAAAA TCA GACCTC。在冰上建立反应体系,反应液总体积为20 μL。模板(200 ng)1 μL; dNTP(各1.25 mmol/L)5 μL; 10×缓冲液2 μL; 引物(20 pmol) I 2.06 μL,引物(20 pmol) II 2.86 μL; Tag酶(2 μmol/min)0.4 μL; 去离子水补足20 μL,加矿物油20 μL。扩增程序:94℃4 min, 30个循环(94℃30 s, 50℃1.5 min, 72℃1.5 min), 72℃7 min。

2 结果与分析

2.1 培养基筛选

试验结果(表1)表明,不同质量浓度潮霉素对雪里蕻和圆叶芥的萌发影响不显著,发芽率均高达

97%以上,但对其生长发育具有明显的抑制作用。随着质量浓度的增加,其抑制作用加强。潮霉素质量浓度为15和20 mg/L时,雪里蕻和圆叶芥均有侧根和真叶长出,与对照相比,出现的时间晚3~9 d,黄化率分别为15%, 12%及48%, 53%。潮霉素质量浓度为25, 30和35 mg/L时,幼苗均没有侧根和真叶长出,黄化率均达100%,但潮霉素质量浓度为25 mg/L时,雪里蕻和圆叶芥的生长势与20 mg/L的相比差异不显著,质量浓度为30和35 mg/L时幼苗生长主要在8日龄之前,以后生长几乎停滞。

以上分析表明,25 mg/L 潮霉素为雪里蕻和圆叶芥筛选的最佳质量浓度,筛选时期为16日龄幼苗。鉴别转化体的标准为:在潮霉素质量浓度为25 mg/L的筛选培养基上,16日龄的雪里蕻和圆叶芥植株生长正常,叶片现绿,有侧根发出或真叶长出,或既有侧根又有真叶出现。

表1 潮霉素对雪里蕻和圆叶芥种子萌发及其生长发育的影响

Table 1 Effects of Hygromycin on the gem ination and growth of *Cv* Xuelihong and Yuan yejie

生态型 Ecotype	潮霉素 质量浓度/ (μg · mL ⁻¹) Concen- tration of Hyg	接种数 No. of seeds inoculation	发芽率/% Gem in a- tion per centage	8 d 根长/cm Root length 8 d	8 d 下胚 轴长/cm Hypocotyl length 8 d	16 d 根长/ cm Root length 16 d	16 d 下胚 轴长/cm Hypocotyl length 16 d	生侧根 时间/d Appearing lateral root time	生真叶 时间/d Appearing leaf bud time	黄化率/% Etiolation percentage
雪里蕻 Xue lihong	0(CK)	100	98	1.5	3.2	3.6	5.3	8	10	0
	15	100	98	1.3	2.7	2.1	3.8	11	12	15
	20	100	97	1.1	1.9	1.6	2.6	17	15	48
	25	100	98	1.0	1.3	1.4	2.0	-	-	100
	30	100	97	0.8	1.0	0.9	1.2	-	-	100
圆叶芥 Yuan yejie	35	100	98	0.6	1.0	0.7	1.1	-	-	100
	0(CK)	100	98	1.6	3.1	3.8	5.6	9	12	0
	15	100	97	1.4	2.8	2.2	3.7	14	14	12
	20	100	98	1.3	2.0	1.7	2.7	17	15	53
	25	100	98	1.1	1.3	1.4	2.0	-	-	100
	30	100	97	0.7	0.9	0.8	1.0	-	-	100
	35	100	98	0.7	0.8	0.8	0.9	-	-	100

2.2 生长点点滴筛选

试验结果(表2)表明,经不同质量浓度潮霉素处理,8日龄雪里蕻和圆叶芥的根生长差异不显著,而16日龄的根长均显著低于对照,萌发侧根数均为2条左右,下胚轴生长显著低于对照,且随着潮霉素质量浓度的增加下胚轴生长趋于停滞。潮霉素质量浓度为600 mg/L时,真叶出现的时间推迟,一些植株始终不产生真叶,雪里蕻和圆叶芥黄化率分别为55%和58%;800和1200 mg/L时,各处理不产生

真叶,且黄化率达100%。从生长状况看,随着潮霉素质量浓度的增加,其抑制作用明显增强,其中潮霉素质量浓度为800 mg/L时,雪里蕻和圆叶芥的生长势接近于600 mg/L的处理。

综上分析,生长点点滴筛选法筛选雪里蕻和圆叶芥的最佳潮霉素质量浓度为800 mg/L,筛选时期为接种潮霉素后10 d。筛选转化体的标准为真叶长出,叶色显绿,生长正常。

表 2 潮霉素对雪里蕨和圆叶芥生长发育的影响

Table 2 Effects of Hygromycin on the growth of Cv. Xuelihong and Cv. Yuanyejie

生态型 Ecotype	潮霉素 质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Concen- tration of Hyg	接种数 No. of seeds inoculation	4 d 根长/cm Root length 4 d	4 d 下胚 轴长/cm Hypocotyl length 4 d	8 d 根长/ cm Root length 8 d	8 d 下胚 轴长/cm Hypocotyl length 8 d	16 d 根长/ cm Root length 16 d	16 d 下胚 轴长/cm Hypocotyl length 16 d	生真叶 时间/d Appearing leaf bud time	黄化率/% Etiolation percentage
雪里蕨 Xue lihong	0(CK)	100	1.1	1.7	2.1	3.3	4.0	4.9	10	0
	600	100	1.1	1.7	2.1	2.0	3.4	2.2	14	55
	800	100	1.1	1.7	2.0	1.8	3.2	2.0	-	100
	1 000	100	1.1	1.7	1.9	1.8	2.8	1.9	-	100
	1 200	100	1.1	1.7	1.9	1.7	2.8	1.7	-	100
圆叶芥 Yuan yejie	0(CK)	100	1.2	1.7	2.3	3.1	4.3	4.5	12	0
	600	100	1.2	1.7	2.1	2.2	3.2	4.7	16	8
	800	100	1.2	1.7	2.1	2.0	3.0	2.5	-	100
	1 000	100	1.2	1.7	2.1	1.9	2.8	2.0	-	100
	1 200	100	1.2	1.7	2.0	1.7	2.7	1.7	-	100

2.3 两种筛选结果的比较及筛选程序的优化

从表 3 可以看出, 两种鉴定方法的转化率接近, 但生长点点滴筛选移栽成活率大大高于培养基筛选

法。各处理随机取抗性苗 1 株, 经 PCR 检测, 均有条带扩出。由此可见, 生长点点滴筛选法是可靠的。

表 3 培养基筛选和生长点筛选鉴定比较

Table 3 Comparison between medium with Hygromycin screening and growing point screening

生态型 Ecotype	筛选方法 Method	接种数 No. of seeds inoculation	转化体数 No. of transfor- mants	转化率/% Transfor- mation frequency	移栽 成活数 No. of survivals	移栽 成活率/% Survival percentage	PCR 检测 株数 No. of PCR analysis	阳性株数 No. of positive plants
雪里蕨 Xue lihong	培养基筛选 Medium screening	2 000	11	0.55	4	0.36	1	1
	生长点点滴筛选 Growing point screening	2 000	12	0.60	10	0.83	1	1
圆叶芥 Yuan yejie	培养基筛选 Medium screening	2 000	10	0.50	4	0.40	1	1
	生长点点滴筛选 Growing point screening	2 000	8	0.40	7	0.87	1	1

生长点点滴筛选法的程序是, 待测种子经表面消毒处理, 播种在湿透的海绵上, 待子叶展平, 取 4 μL 质量浓度为 800 mg/L 的潮霉素滴在生长点上, 播种后 10 d, 以真叶长出、叶色显绿、生长正常的植株作为转化体, 而失绿黄化的为非转化体。

3 讨 论

芥菜真空渗入遗传转化 T_1 代种子筛选是芥菜遗传转化至为关键的一步。筛选转化体时, 一般采用

在培养基中加入一定质量浓度的抗生素, 转化体可在此种培养基中正常生长。根是植物从外界获得物质的主要器官, 同时气孔、皮孔也可吸收部分外界物质。试验结果表明, 采用生长点点滴筛选, 其结果与培养基筛选一致, PCR 检测, 也得到相同结论。

生长点点滴筛选不需要培养基, 节省药品, 无污染, 操作容易, 筛选出的转化体移栽成活率高, 具有一定的应用前景。

[参考文献]

[1] 张宝红, 丰小嵘. 转基因抗虫棉现状、问题和对策[J]. 作物学报, 1998, 24(2): 248- 256

[2] Cecchine E, Gong Z H, Geri C, et al. Transgenic Arabidopsis lines expressing gene V I from cauliflower mosaic virus variants exhibit a range of symptom-like phenotype and accumulate inclusion bodies[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1997, 10(9): 1094- 1101.

[3] 金万梅, 巩振辉, 李桂荣, 等. 植物遗传转化方法和转基因植株的鉴定[J]. 陕西农业科学, 2000, (1): 24- 29

[4] 胡张华, 黄锐之, 刘智宏, 等. 利用花粉管导入法获得转反义 PEP 基因大豆植株[J]. 浙江农业学报, 1999, 11(2): 99- 100

- [5] 董云洲, 段胜军, 赵连元, 等. 用基因枪转化花粉获得转基因谷子和玉米[J]. 中国农业科学, 1999, 32(2): 9- 13
- [6] Nam J, Mysore K S, Zheng C, et al. Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium* [J]. MolGen Genet, 1999, 261: 429- 438
- [7] Li wenbin, Zarka K, Douches D, et al. Coexpression of potato PVY coat protein and cry V-Bt genes in potato [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1999, 124(3): 218- 223
- [8] 荆家海. 植物生理学[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1994. 167- 179
- [9] 巩振辉, Cecchini E, Millner J J. 以 PCR 鉴定转基因植株的微量DNA 提取方法[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(1): 45- 48
- [10] Clark M S. 植物分子生物学实验手册[M]. 顾红雅, 瞿礼嘉译. 北京: 高等教育出版社出版, 1998. 3- 11
- [11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 著. 分子克隆实验指南(第2版) [M]. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1998. 672- 688

Dripping antibiotic solution on growing point as a novel approach to screening transgenic plants

JIN Wan-mei, GONG Zhen-hui, LU Yuan-hong

(College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The two methods of screening transgenic plants, including transgenic seeds sowed in the medium with hygromycin (TSSM) and dripped hygromycin solution on the growing point of transgenic seedling (DSGPTS), were compared and analysed. The results indicated that the transgenic plants were obtained with the method of DSGPTS, when 800 mg/L of hygromycin was dripped on the growing point of transgenic seedling at its age of 4 days. PCR analysis showed that the results of both TSSM method and DSGPTS method were showing no difference. The advantage of DSGPTS method is that the transgenic seedling is safe from pollution and the percentage of survival for the transgenic seedling is high.

Key words: *Brassica juncea*; transgenic plants; screening method; method of dripping antibiotic solution on growing point

欢迎订阅 2003 年《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会主办的学术刊物, 刊载有关果树、蔬菜、观赏植物和西瓜、甜瓜等方面未曾发表的学术论文、研究报告、研究简讯及经过省(直辖市)级审定或鉴定的新品种、学术活动报告及广告等。读者对象主要是园艺科研人员、大专院校师生及专业技术人员。

2003 年本刊由 97 页增加至 128 页, 双月 25 日出版, 大 16 开本。每期定价 10.00 元, 全年 60.00 元。国内外公开发行, 全国各地邮局均可订阅, 漏订者可直接寄款至本编辑部订购。国内邮发代号 82- 471, 国外发行由中国国际图书贸易总公司承办, 代号 BM 448。

欢迎订阅 2000 年增刊和 2001 年增刊, 每册定价 10 元, 免收邮费, 欲购者请与编辑部联系。

编辑部地址: 北京市中关村南大街 12 号中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部

邮政编码: 100081 电话: (010) 68919523