

农杆菌子房注射法对金钗石斛的活体转化研究

刘其府^{1,2}, 董 会^{1,3}, 曾宋君¹, 陈之林⁴, 吴坤林¹, 张建霞¹, 段 俊¹

(1 中国科学院 华南植物园, 华南农业植物遗传育种重点实验室, 广东 广州 510650; 2 中国科学院大学, 北京 100049;
3 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642; 4 贵州园艺研究所, 贵州 贵阳 550006)

摘要:对金钗石斛 *Dendrobium nobile* 进行人工自花授粉,在授粉之后 10、20、30、40、45、50 和 60 d 分别将工程化根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (pCambia1301) 直接注射入子房内部. 150 d 后,金钗石斛蒴果成熟,摘取果实,进行种子 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 染色、无菌播种、潮霉素筛选以及 PCR 检测试验. 结果表明:子房注射对果实发育具有较大影响,在授粉后 10~30 d 进行子房注射后,果实脱落;在授粉后 45 d 进行子房注射,成熟果实注射部位的种子 GUS 染色率最高,可达 18%;无菌播种之后,经潮霉素筛选,获得 11 株幼苗,每株植株均表现出 GUS 染色反应;随机挑选 4 株幼苗进行 PCR 检测,发现均能扩增出预期条带,说明外源基因已经整合到植株基因组内. 农杆菌子房注射法在兰科植物转基因的成功应用,可以为兰科植物育种提供一种简单高效的方法.

关键词:金钗石斛; 农杆菌子房注射法; GUS 组织化学染色; 活体转化; PCR 检测
中图分类号:S682 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2013)03-0378-05

In Planta Transformation of Dendrobium nobile by Ovary-Injection of Agrobacterium

LIU Qifu^{1,2}, DONG Hui^{1,3}, ZENG Songjun¹, CHEN Zhilin⁴, WU Kunlin¹, ZHANG Jianxia¹, DUAN Jun¹

(1 Key Laboratory of South China Agricultural Plant Genetics and Breeding, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;
2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
3 College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
4 Horticultural Research Institute of Guizhou Province, Guiyang 550006, China)

Abstract: *Dendrobium nobile* was transformed by ovary-injection of *Agrobacterium*. After artificial pollination in 10, 20, 30, 40, 45, 50 and 60 d, EHA105 (pCambia1301) harboring both β -glucuronidase gene (*GUS*) and *hpt* was injected into the ovary. The seeds of split fruit of *D. nobile* were cultured on the N16 culture medium by aseptic processing and detected by GUS expression. Forty-five days after cultured, the protocorms were diverted to N16 medium with hygromycin to gain hygromycin-resistance protocorms, then four randomly selected hygromycin-resistance protocorms were detected by PCR analysis. The study showed that ovary-injection of agrobacterium had harmful effects on the fruit development and seed formation. Ovary-injection of agrobacterium after artificial pollination 45 d had the highest efficiency, 18% seeds from the injected position showing GUS expression. Eleven hygromycin-resistant plants were gained in this study, and four randomly selected hygromycin-resistant plants were detected by PCR analysis and all of them were positive. The results showed that ovary-injection of agrobacterium transformation had advantages in genetic transformation of orchids.

Key words: *Dendrobium nobile*; ovary-injection of *Agrobacterium*; GUS assay; *in planta* transformation; detection of polymerase chainreaction

金钗石斛 *Dendrobium nobile* 为兰科 Orchidaceae 石斛属植物,分布于我国和东南亚等地,其花色艳丽,花姿优美,清香优雅,是著名的观赏花卉^[1]. 以其为直接亲本在英国皇家园艺学会登录的杂交种有 109 个^[2]. 同时,金钗石斛又是珍贵药用植物,其化学成分有生物碱、酚类和多糖等,具有抗肿瘤、抗衰老、增强机体免疫力、抗白内障和抗菌等作用^[3].

农杆菌介导转化方法目前已经广泛应用在双子叶植物和水稻、小麦、玉米等一些单子叶植物上^[4-5], 这些转化大多建立在成功的转化体系上. 但兰科植物和其他的单子叶植物一样,受伤后不能产生酚类物质而不易感染农杆菌^[4],同时,大部分兰科植物离体诱导愈伤组织有一定难度,难以建立有效的转化体系,限制了农杆菌介导转化方法在兰科植物上的广泛应用. 花粉管通道法已成功用于玉米、小麦、甜瓜、棉花和黄瓜等农作物的转基因育种工作^[6-8]. 将此方法应用到兰科植物目前还鲜见报道,主要原因可能是兰科植物从授粉到受精一般需要数十天的时间,质粒通过花粉管通道从柱头至子房时间太长,易降解. 本研究采用工程化农杆菌直接注射金钗石斛子房,对其进行遗传转化,结合了花粉管通道法操作简单和农杆菌转化过程机理明确的优点,既不依赖于建立有效的遗传转化体系,同时又利用了农杆菌对植物侵染的高效性优势,不失为兰科植物转基因育种的有效方法.

1 材料与方法

1.1 材料

根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, 含有携带 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 基因 (*GUS*) 和潮霉素抗性基因 (*hpt*) 的质粒 pCAMBIA1301.

金钗石斛种植于中国科学院华南植物园温室大棚.

1.2 菌液的准备

挑选农杆菌菌株 EHA105 (pCAMBIA1301) 单菌落于含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸链霉素的 YM 液体培养基中, 28°C 条件下, $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养至 $D_{600 \text{ nm}}$ 达到 $0.4 \sim 0.6$, 取 1.5 mL 菌液 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心, 去上清液, 然后用 10 mL AAM + $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS 活化培养基悬浮, $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 1 h 后可应用于子房注射^[10].

1.3 子房注射方法

在温室中对金钗石斛进行人工自花授粉, 分别在授粉后的 10、20、30、40、45、50 和 60 d 进行子房注射, 每次注射 25 mL 菌液, 每个处理 5 次重复, 菌液现配现用. 注射时, 选择发育较好的子房, 利用微量注射器在垂直于子房长度的方向将活化的农杆菌溶液注射子房内部. 注射后对金钗石斛蒴果挂牌, 待授粉后 150 d 摘取果实并进行无菌播种. 设人工自花授粉后未注射菌液的 5 个果实为对照.

1.4 种子 GUS 组织化学检测 and 无菌播种

由于 pCAMBIA1301 中含有 *GUS* 基因, 采用 GUS 组织化学检测, 方法参照文献[9], 操作时, 采集授粉 150 d 的成熟金钗石斛果实, 先用体积分数为 75% 的乙醇擦洗果荚, 然后放入质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的升汞中浸泡消毒, 10 min 后取出果荚, 用无菌水冲洗 3 次, 再用消毒后的手术刀将果荚剖开, 取出注射部分的种子, 一部分浸入适量的 GUS 染液, 37°C 暗处保温 6 h 后进行乙醇脱色, 观察并拍照^[9], 另一部分用于无菌播种. 播种时, 先将种子放入灭菌的三角瓶内, 加质量浓度为 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的次氯酸钠浸泡 20 min, 用无菌水冲洗 3 次, 过滤后将种子播于本实验室发明的 N16 花宝培养基 (花宝 1 号 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蛋白胨 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 活性炭 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + B_5 培养基的维生素 + 萘乙酸 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 椰子汁 $50 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$)^[12], 放于温度 28°C , 光照强度 $1600 \sim 2000 \text{ lx}$ 的培养室进行培养, 每天光照 16 h. 每个果实播 3 瓶. 每瓶约 300 粒种子.

1.5 原球茎的抗性筛选

将种子萌发 45 d 后形成的原球茎转接至含潮霉素 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的选择培养基上培养, 15 d 后将存活的原球茎转接至潮霉素质量浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上继续培养, 15 d 后再将存活的原球茎转接至潮霉素质量浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上培养, 再过 15 d 将存活的原球茎转至无潮霉素的 N16 培养基上培养^[10].

1.6 幼苗 GUS 组织化学染色

对获得的 11 株抗性植株进行 GUS 染色, 方法同种子 GUS 组织化学检测.

1.7 抗性植株的 PCR 检测

采用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法分别提取抗性株和对照植株基因组 DNA, 以 pCAMBIA1301 质粒为阳性对照, 对照植株为阴性对照^[10]. 根据 *hpt*

基因设计引物: HPT-L, 5'-GATGTTGGCGACCTCG-TATT-3'; HPT-R, 5'-GTGCTTGACATTGGGGAGTT-3'^[10]. 20 μL 体系: 10 × PCR Buffer 2 μL; dNTPs 0.2 mmol · L⁻¹; 引物浓度 0.5 μmol · L⁻¹; Taq 酶 0.2 μL; 模板 150 ng; 加水至 20 μL. 反应条件: 94 ℃ 预变性 2 min; 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 2 min, 32 个循环; 72 ℃ 10 min, 4 ℃ 保存. 产物经 8 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测, 于 UVP 凝胶成像系统观察并拍照.

2 结果与分析

2.1 子房注射转化情况

本试验共注射金钗石斛子房 35 个, 得到成熟果荚 10 个. 授粉后 10、20 和 30 d 进行注射的果实均败育, 未得到成熟果实. 授粉后 40、45、50 和 60 d 获得的果实数分别为 2、2、3 和 3 个.

2.2 种子 GUS 组织化学染色

对种子 GUS 染色检测发现, 40、45、50 和 60 d 处理的果实注射部位的种子均有种子染上蓝色, 而以 45 d 处理的果实注射部位种子染色率最高, 可达 18% (表 1, 图 1c、1d), 而 40、50 和 60 d 处理的种子染色率相对较低.

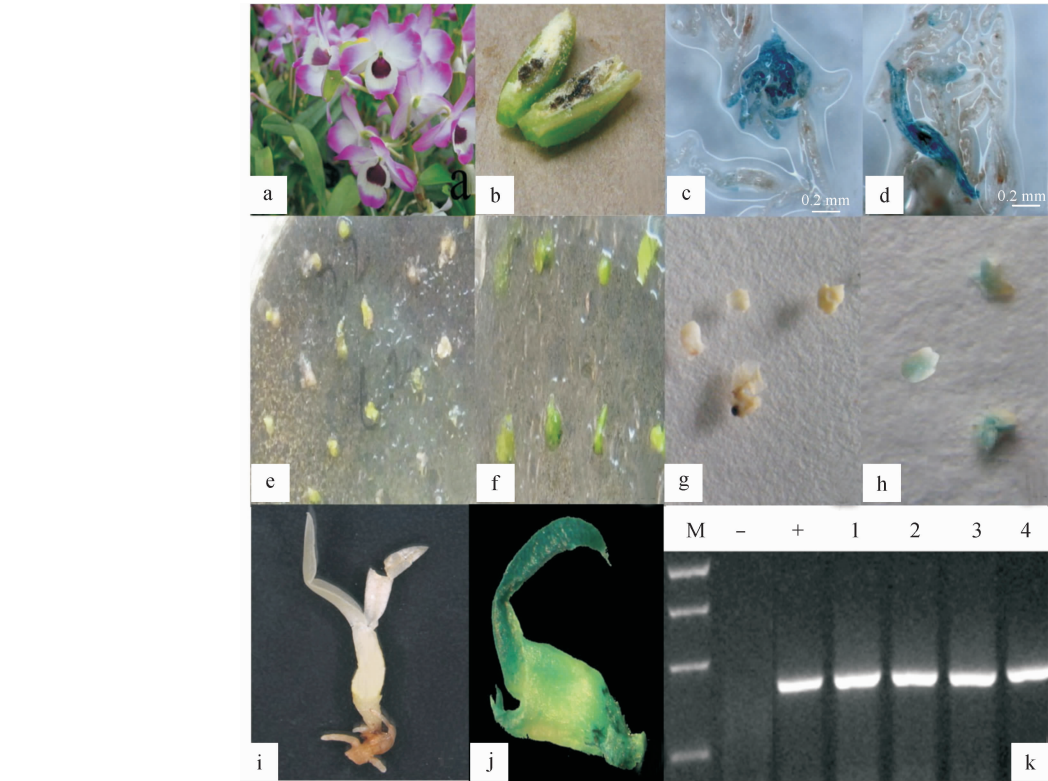
表 1 种子 GUS 染色及原球茎潮霉素筛选结果
Tab.1 The results of GUS assay of seeds and hygromycin-resistance screening

<i>t</i> _{授粉后} / d	种子 GUS 染色率/%	获得原球 茎数	经抗性筛选后 的原球茎数	抗性 幼苗数
40	3	5	3	1
45	18	6	5	2
50	13	35	8	4
60	10	54	7	4

2.3 无菌播种

采用 N16 固体培养基无菌播种培养, 只对果皮消毒金钗石斛种子的污染率为 0, 种子的萌发率高, 可达 85%. 对注射过工程农杆菌的果实仅对果皮进行消毒后, 采用注射部位的种子培养时, 100% 的种子被污染. 在对注射过工程农杆菌的果实经消毒后再对种子进行消毒后播种, 仍有 70% ~ 80% 的种子染菌, 而对照的果荚同样处理染菌率仅为 5%.

采用注射部位的种子在 N16 固体培养基上培养, 45 d 后形成原球茎, 由于污染高, 授粉后 40、45、50 和 60 d 的果实播种后分别只得到 5、9、35、54 个原球茎, 大部分萌发的原球茎因污染而死亡.



- 为阴性对照, + 为阳性对照, 1 ~ 4 为抗性植株, M 为 DNA marker DL2000.

a: 开花的金钗石斛植株; b: 金钗石斛成熟果实; c、d: 经 GUS 染色呈蓝色的种子; e: 经潮霉素筛选的原球茎, 存活者呈绿色; f: 经 3 次更新培养基获得的抗性原球茎; g: 对照原球茎经 GUS 染色, 均没有蓝色出现; h: 抗性原球茎经 GUS 染色, 均呈现蓝色; i: 幼苗阴性对照; j: 幼苗 GUS 染色呈现蓝色; k: PCR 检测.

图 1 农杆菌子房注射法对金钗石斛的活体转化

Fig. 1 In planta transformation of Dendrobium nobile by ovary-injection of Agrobacterium

2.4 原球茎潮霉素筛选结果

将萌发获得的原球茎依次转入含 30、40 和 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 潮霉素的选择培养基上各培养 15 d 进行抗性筛选,共计培养 45 d 后,授粉后 40、45、50 和 60 d 获得的抗性原球茎数分别为 3、5、8、7 个,除各取 2 个进行 GUS 组织化学染色外,其余均转入无潮霉素的 N16 培养基上培养,40 d 后能形成完整植株。

2.5 原球茎和幼苗的 GUS 组织化学染色

对经过抗性筛选的原球茎切片进行 GUS 染色,均可呈现蓝色,如图 1 h。而 4 个注射时期获得的原球茎各取 2 个共 8 个进行的 GUS 检测结果全部为阳性。其余除 4 个死亡外,11 个发育成 11 株植株,随机取 4 株经 GUS 组织化学染色,整株各个部位均呈现蓝色,特别是幼叶和根部染色最深,说明这些部位代谢比较活跃(图 1i)。

2.6 转化植株分子检测

随机挑选 4 株经潮霉素筛选之后生长良好的植株,提取基因组,进行 PCR 检测,抗性植株均可获得与阳性对照相同的条带,而对照植株没有该条带(图 1j)。抗性植株扩增出目的条带说明外源基因已经整合到植株基因组内。

3 讨论与结论

目前,兰科植物转化体系通常采用农杆菌介导法和基因枪方法,这 2 种方法操作复杂,而且转化效率较低,仅在石斛 *Dendrobium*、蝴蝶兰 *Phalaenopsis*、文心兰 *Oncidium* 等少数几个属的物种中有成功报道,但是在相关报道中转化效率普遍较低^[13-20]。农杆菌子房注射法和在拟南芥转基因中常用的 *in planta* 方法原理相同,结合了子房注射法和农杆菌介导法的优点,具有操作简单、不需要复杂的实验技术即能获得转化植物的特点^[21-23],但彭珍子等^[23]报道,棉花一般在 24 d 内完成受精,授粉之后 24 h 时处理达到最高的转化效率。在用农杆菌进行活体转化时,要考虑农杆菌进入子房内部的时间,即生殖细胞处于较高的感受态,也要考虑农杆菌能进入胚囊中且不对受精作用产生影响。

兰花的种子无胚乳,自然条件下萌发率很低,种苗生产常采用无菌播种,而兰科植物相对于其他植物的最大优点在于兰科植物种子数量巨大,一般一个果荚中种子数量在数万至数十万个以上,应用农杆菌子房注射法进行活体遗传转化时,即使转化效率较低,也能获得较多的转化植株。但兰科植物从授粉到受精过程一般需要几十天,因此该种方法的转

化效率对处理时间比较敏感。由于金钗石斛从授粉至受精的时间现在还没有确定,本试验选用了较大的时间跨度(10~60 d)进行子房注射。在授粉后 10~30 d 注射时不能得到发育良好的成熟果实的原因可能是授粉后子房发育初期生存力较弱,需要一个较稳定的环境生长,此时进行子房注射易对果实发育造成较大伤害,最后导致果实败育脱落,而过了这段较敏感的时期,对子房进行注射能得到成熟果实。试验中在授粉之后 45 d 时达到最高的转化效率,可能是因为此时大、小孢子发育成熟,即将发生或已经发生精卵融合,合子处于较高的感受态,容易接受外来遗传物质。

农杆菌子房注射法所得到的兰花种子无菌播种时需要采用双重消毒处理,若种子消毒不彻底,后期污染率较高,难以获得原球茎;若消毒方式太过强烈,有可能伤害种子并导致种子萌发率降低。本试验中,由于对消毒方法未进行系统的研究,获得无菌的抗性植株的比例较低。以后的试验中,需在播种培养基中加上广谱抗生素,频繁更换培养基等方法来控制污染,以提高种子的萌发率。

据相关报道,兰花受精过程发生在授粉之后 30~70 d^[24],而本试验 45 d 的处理取得了最高的转化效率,说明子房注射农杆菌法的原理和花粉管通道转化法在原理上有一致性,即主要是在受精前后,生殖细胞或者受精卵没有细胞壁或者细胞壁比较薄弱,处于较为敏感的感受态,较容易被转化。处理时间较早容易导致胚珠发育败育,而处理时间较晚,胚珠珠孔已经闭合,外源物质很难进入到胚珠内部。

另外,通过对抗性植株的 PCR 检测,结果均呈阳性,说明外源基因已经整合到基因组内,证明农杆菌子房注射法能应用于兰科植物转基因育种中,至于是否能稳定遗传尚需进一步验证。

参考文献:

- [1] 王琳,叶庆生,刘伟.金钗石斛研究概况[J].亚热带植物科学,2004,33(2):73-76.
- [2] The Royal Horticultural Society. The International Orchid Register, 2011 [EB/OL]. [2011-12-31]. <http://apps.rhs.org.uk/horticulturaldatabase/orchidregister/orchidregister.asp>.
- [3] 刘莉,李智敏,李晚谊.金钗石斛的研究进展[J].云南大学学报:自然科学版,2009,31(S1):509-513.
- [4] VAIN P, BUYSER D J, TRANG V B, et al. Foreign gene delivery into monocotyledonous species [J]. Biotechnol Adv, 1995, 13(4): 653-671.

- [5] 叶健明,唐克轩,沈大棱.植物转基因方法概述[J]. 生命科学,1999,11(2): 58-60.
- [6] 奚亚军,任鹏,刘曙东,等.花粉管通道法转化小麦影响因素的研究[J]. 中国农学通报, 2004,20(6): 23-25.
- [7] YANG Aifu, SU Qiao, AN Lijia, et al. Detection of vector-and selectable marker-free transgenic maize with a linear *GFP* cassette transformation via the pollen-tube pathway [J]. J Biotechnol, 2009,139(1):1-5.
- [8] 张文珠,魏爱民,杜胜利,等. 黄瓜农杆菌介导法与花粉管通道法转基因技术[J]. 西北农业学报, 2009, 18(1): 217-220.
- [9] 马利加 P, 克莱森 D F, 格瑞森姆 W, 等. 植物分子生物学实验指南[M]. 刘进元, 译. 北京: 科学出版社, 2000: 47-52
- [10] 陈之林,段俊,曾宋君,等. 原球茎为转化受体的农杆菌介导石斛遗传转化[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007,46(1): 86-90.
- [11] MALIGA P, KLESSIG D K, CASHMORE A R, et al. Methods in plant molecular biology: A laboratory course manual[M]. New York: Cold Pring Harbor Laboratory Press,1995.
- [12] ZENG Songjun, CHEN Zhilin, WU Kunlin, et al. Asymbiotic seed germination, induction of calli and protocorm-like bodies, and *in vitro* seedling development of the rare and endangered *Nothodoritis zhejiangensis* Chinese orchid [J]. Hort Science, 2011,46(3):460-465.
- [13] KUEHNLE A R, SUGII N. Transformation of *Dendrobium* orchid using particle bombardment of protocorms [J]. Plant Cell Rep, 1992, 11(9): 484-488.
- [14] BELARMINO M M, MII M. Agrobacterium-mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* orchid [J]. Plant Cell Rep, 2000, 19(5):435-442.
- [15] KNAPP J E, KAUSCH A P, CHANDLEE J M. Transformation of three genera of orchid using the bar gene as a selectable marker[J]. Plant Cell Rep, 2000, 19(9):893-898.
- [16] CHAI M L, XU C J, SENTHIL K K, et al. Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Sci Hort, 2002,96(1/2/3/4): 213-224.
- [17] MEN Shuzhen, MING Xiaotian, LIU Rongwei, et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2003, 75(1):63-71.
- [18] CHAN Yuanli, LIN Kuanghung, SANJAYA, et al. Gene stacking in *Phalaenopsis* orchid enhances dual tolerance to pathogen attack[J]. Transgenic Res, 2005, 14(3):279-288.
- [19] SEMIARTI E, INDRIANTO A, PURWANTORO A, et al. Agrobacterium-mediated transformation of the wild orchid-species *Phalaenopsis amabilis* [J]. Plant Biotechnol, 2007, 24(3): 265-272.
- [20] QIN Xuyin, LIU Yang, MAO Shanjing, et al. Genetic transformation of lipid transfer protein encoding gene in *Phalaenopsis amabilis* to enhance cold resistance[J]. Euphytica, 2011, 177(1):33-43.
- [21] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant J, 1998, 16(6): 735-743.
- [22] BENT A F. *Arabidopsis* in planta transformation. uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species[J]. Plant Physiol, 2000, 124(4):1540-1547.
- [23] 彭珍子, 赵燕, 曾潜, 等. 农杆菌子房注射法对棉花的活体转化[J]. 棉花学报, 2011, 23(4): 311-316.
- [24] 唐源江, 叶秀麟, 陈泽濂. 五唇兰雌配子体发育和胚胎发生的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 1998, 6(4):289-292.

【责任编辑 李晓卉】