

## ‘幻想’矮牵牛遗传转化受体再生体系建立

马方芳, 岳远征, 黄雪, 孙健, 胡惠蓉\* (华中农业大学园艺林学学院, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 湖北武汉 430070)

**摘要** [目的]建立‘幻想’矮牵牛的高效遗传转化受体再生体系。[方法]以‘幻想’矮牵牛嫩叶片为外植体,对其暗培养时间、出芽和生根培养基的生长素种类及浓度、筛选抗生素和抑菌抗生素进行优化。[结果]诱导叶片分化的最佳暗培养时间为2 d;最佳出芽培养基为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;最佳生根培养基为MS+IBA 0.1 mg/L;适宜出芽和生根阶段的卡那霉素筛选压为15 mg/L;适宜的抑菌抗生素头孢霉素浓度为300 mg/L。[结论]该研究为后期‘幻想’矮牵牛分子及育种研究奠定了基础。

**关键词** ‘幻想’矮牵牛;遗传转化;再生体系;暗培养时间;生长素;抗生素

**中图分类号** S681.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)04-01462-02

Establishment of Regeneration System for Genetic Transformation of *Petunia hybrida* ‘Fantasy’

MA Fang-fang et al (Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

**Abstract** [Objective] The paper was to establish efficient regeneration system for genetic transformation of *Petunia hybrida* ‘Fantasy’. [Method] The effects of dark incubation time, auxin types and concentrations of sprouting medium and rooting medium, screening antibiotics and antibacterial antibiotics on shoot regeneration and rooting were studied by using young leaves of *P. hybrida* ‘Fantasy’ as explants. [Result] The best dark incubation time for the induction of leaf differentiation was 2 days; the best medium for sprouting was MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L; the best rooting medium was MS+IBA 0.1 mg/L; the appropriate kanamycin screening pressure in the sprouting and rooting stage was 15 mg/L; the suitable concentration of antibacterial antibiotics cefotaxime was 300 mg/L. [Conclusion] The study laid the foundation for the late molecular and breeding research of *P. hybrida* ‘Fantasy’.

**Key words** *Petunia hybrida* ‘Fantasy’; Genetic transformation; Regeneration system; Dark incubation time; Auxin; Antibiotics

矮牵牛(*Petunia hybrida* Vilm.)又名碧冬茄、杂种撞羽朝颜、灵芝牡丹等,属茄科多年生草本植物,常作一年生栽培。因其株矮丛满、花大色艳、适应性强,被长期广泛应用于世界各地园林,并被誉为花坛之王;又因其生命周期短、基因组较小、变异性状易识别,从而在开花的分子生物学研究上成为模式植物。矮牵牛易于进行根瘤农杆菌介导的基因导入<sup>[1]</sup>,为通过转基因验证基因功能<sup>[2-3]</sup>及创造新品种<sup>[4-5]</sup>提供了有利条件。目前国内外对矮牵牛再生体系的研究较为深入,其花瓣、花粉粒、叶、叶肉原生质体、茎段、茎分生组织、根分生组织等都曾作为外植体获得再生植株<sup>[6-11]</sup>。但矮牵牛再生方式受基因型限制,现有的再生体系通用性均不强,因此,研究特殊品种的遗传转化受体再生体系具有重要的基础价值。

‘幻想’矮牵牛(‘Fantasy’),由Goldsmith公司培育,花朵虽只有硬币大小,但株型紧凑,花期一致,花朵丰盛,深受大家喜欢,被评为1996年全美选种组织(All America Selections)设立的花坛花卉奖。此外,因具备耐雨水的特点,该品种被认为较适合中国的城市栽培<sup>[12]</sup>。笔者所在课题组在研究‘幻想’矮牵牛开花光周期调控时,发现一种无花冠的变异花*del*,因此拟筛选变异表达基因,并进一步通过转基因进行功能验证及育种工作<sup>[13]</sup>。该研究以‘幻想’矮牵牛为材料,对其作为遗传转化受体的再生体系条件进行筛选,为后期的分子及育种研究奠定基础。

## 1 材料与方法

1.1 材料 以‘幻想’矮牵牛(*Petunia hybrida* Vilm. ‘Fantasy’)

实生苗为材料,以植株顶端刚刚完全展开的2枚幼嫩叶片作为外植体。MS培养基含3%蔗糖和0.75%琼脂,pH值为5.8。培养条件:光照时间16 h/d,光照强度(90±10) μmol/(m<sup>2</sup>·s),温度24℃,湿度40%。

## 1.2 方法

**1.2.1 外植体消毒。**选取幼嫩叶片,流水冲洗表面10 min,75%酒精消毒25 s,无菌水冲洗2次,0.1%升汞消毒10 min,无菌水冲洗3~5次,用滤纸吸干水分。

**1.2.2 叶片诱导分化最佳暗培时间的筛选。**去除叶片的中脉和边缘,并切成1.0 cm×1.0 cm大小方块,接种于MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L的培养基上,远轴面朝下,分别暗培0、1、2 d,再转至光照条件下培养。每处理30个外植体,重复3次。15 d后统计叶片褐化状况,选择最佳的暗培时间。

**1.2.3 叶片诱导出芽时生长素种类和浓度的筛选。**在最佳暗培条件下,以MS+6-BA 2.0 mg/L为基础培养基,分别加入NAA(0.1、0.2、0.3 mg/L)或IBA(0.1、0.3、0.5 mg/L),共6个处理,每处理接种30个叶片,重复3次,2周换一次皿,30 d后统计出芽率,以长1 cm分化完全的芽为统计对象。出芽率=出芽外植体数/外植体总数。

**1.2.4 不定芽诱导生根时生长素种类和浓度的筛选。**切取“1.2.3”中分化的长约2 cm的幼芽分别接种于MS、MS+IBA(0.1、0.2、0.3 mg/L)或MS+NAA(0.05、0.10、0.15 mg/L)7种生根培养基中,每种培养基接种30棵芽,15 d后统计生根率。生根率=生根外植体数/外植体总数。

**1.2.5 不定芽诱导时筛选抗生素卡那霉素(kanamycin, Km)筛选压的确定。**将按“1.2.2”规格切好的叶片分别接种于MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+0、5、10、15、20 mg/L Km培养基中,每处理30个外植体,重复3次,2周换一

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目(30972020)。

**作者简介** 马方芳(1987-),女,浙江杭州人,硕士研究生,研究方向:园林植物育种与分子生物学,E-mail: mafangfang311@126.com。\*通讯作者,副教授,从事园林植物育种与分子生物学研究,E-mail: huhuirong@mail.hzau.edu.cn。

**收稿日期** 2012-12-24

次皿,40 d 后统计分化出芽情况。

**1.2.6 不定芽诱导时抑菌抗生素头孢霉素 (cephamycin, Cef) 浓度的确定。** 将按“1.2.2”规格切好的叶片分别接种于 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 0、100、200、300、400、500 mg/L Cef 培养基中,每处理 30 个外植体,重复 3 次,2 周换一次皿,40 d 后统计分化出芽情况。

**1.2.7 生根诱导时筛选抗生素 Km 筛选压的确定。** 切取“1.2.3”中分化的长约 2 cm 的幼芽分别接种于 MS + IBA 0.1 mg/L + 0、5、10、15、20 mg/L Km 培养基中,每种培养基接种 30 棵芽,重复 3 次,20 d 后统计生根率。

**1.2.8 数据处理。** 采用 Microsoft Excel 2003 进行数据处理,出芽率、生根率等百分数均经反正弦转换后用 SPSS 13.0 软件进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

**2.1 暗培养时间对叶片诱导分化的影响** 暗培处理结果表明,暗培天数对叶片状态影响显著:直接放在光照条件下培养的叶片,全部褐化,边缘无膨大分化迹象;暗培 1 d,叶片中间呈绿色,边缘一圈褐化,慢慢向内扩展,有少数分化点;而暗培 2 d 的叶片呈绿色,膨大,边缘出现许多淡绿色分化小点,状态良好。

**2.2 不同种类和浓度的生长素对叶片直接出芽诱导的影响** 生长素种类或浓度的不同,对出芽率和出芽的状态均有影响。如表 1 所示,在该试验范围内,NAA 处理的诱导出芽效果普遍比 IBA 处理好,且随着浓度的增加,两者的出芽率均先提高后下降,其中以 NAA 0.2 mg/L 时的诱导出芽率最高,且芽的分化程度高,叶色深绿,长势好。其他处理下的芽则出现不同程度的衰退:叶色渐淡,由黄绿至白化;芽体弱小,直至玻璃化。

未出芽叶片,其叶片边缘均有愈伤组织的出现,其颜色与数量、质地分别受生长素种类和浓度的影响。NAA 诱导的愈伤组织呈白色,而 IBA 诱导的呈绿色;低浓度生长素诱导的愈伤组织较为稀疏、呈颗粒状,高浓度诱导的致密、堆积成坚硬的球状;且以上愈伤组织都不能再分化成芽。

表 1 生长素对‘幻想’矮牵牛叶片诱导出芽的影响

生长素	浓度//mg/L	出芽率//%
IBA	0.1	23.66 ± 3.36 c
	0.3	82.80 ± 9.16 b
	0.5	29.79 ± 1.28 c
NAA	0.1	71.26 ± 2.83 d
	0.2	94.74 ± 3.85 a
	0.3	71.59 ± 5.97 d

注:表中数据为平均值 ± 标准误;用 LSD 测验法进行平均数的多重比较,同列不同英文字母表示数据间差异极显著 ( $P=0.05$ )。下同。

**2.3 不同种类和浓度的生长素对不定芽生根诱导的影响** ‘幻想’矮牵牛在 MS 及分别添加不同浓度 IBA 或 NAA 的培养基中,生根率均可达 100%,但根的数量、颜色和长度有明显差异。MS 中芽的生根较少、根呈白色、长度中等;NAA 处理中芽的生根较多、根呈黄色、长度较短,随浓度增高而略长;IBA 处理中芽生根较多、根呈白色、长度较长,但随浓度增高而伸长受限。

**2.4 筛选抗生素卡那霉素对不定芽诱导的影响** 如图 1 所示,‘幻想’矮牵牛叶片对 Km 非常敏感,所有 Km 处理的出芽率均显著低于对照,且随浓度的增高显著降低,当浓度增至 15 mg/L 时接近不出芽。不出芽的叶片通常黄化,渐渐变灰,最后出现水渍、死亡。

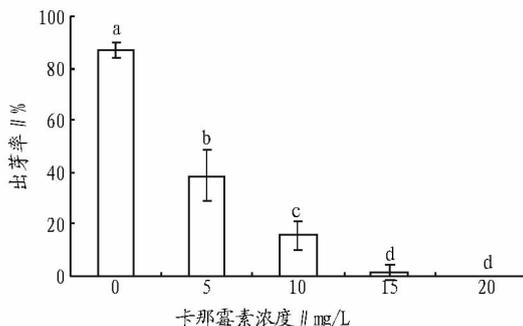


图 1 卡那霉素对‘幻想’矮牵牛叶片诱导出芽的影响

**2.5 抑菌抗生素头孢霉素对不定芽诱导的影响** 如图 2 所示,不同 Cef 浓度下外植体的出芽率都较高,均在 75% 以上。但随着 Cef 浓度的增加,白化芽数量变多。将高 Cef 浓度下诱导出的芽放至生根培养基中,其生长缓慢,甚至死亡;但 Cef 浓度过低,在将来转化中又难以抑制农杆菌。因此,结合实验室农杆菌菌株,选择 300 mg/L 的 Cef 抑制农杆菌生长。

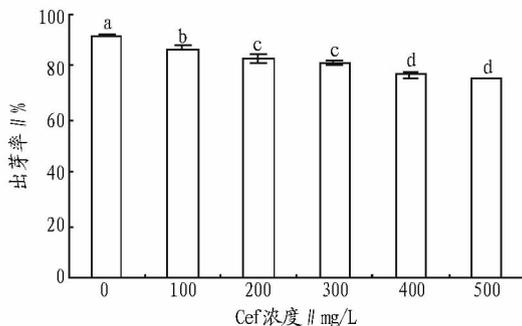


图 2 头孢霉素 (Cef) 对‘幻想’矮牵牛叶片诱导出芽的影响

**2.6 筛选抗生素卡那霉素对不定芽生根的影响** 如图 3 所示,Km 对不定芽的生根影响显著。与对照相比,随着 Km 浓度增加,生根率降低,生根数明显减少,且植株叶片从基部开始发黄,进而死亡。当 Km 浓度为 15 mg/L 时,幼芽几乎都不能生根。

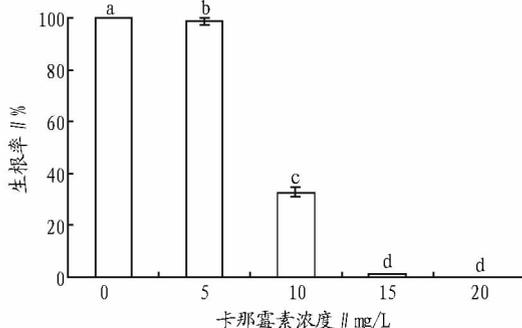


图 3 卡那霉素对‘幻想’矮牵牛不定芽生根的影响

- Joint International Conference on Sustainable Energy and Environmetn, 2004;350-352.
- [8] 王月霞. 沼液农田消解利用技术及其土壤环境效应研究[D]. 杭州:浙江农业,2010.
- [9] 叶志诚. 沼液浸种实效显著[J]. 中国沼气,1990,8(3):41.
- [10] 朱自芬,周美兰,李仕华,等. 水稻施用沼液效果研究[J]. 云南农业科技,2009(4):36-41.
- [11] 徐卫红,王正银,权月梅,等. 沼液对葛笋和生菜硝酸盐含量及营养品质的影响[J]. 农村生态环境,2003,19(2):34-37.
- [12] 高同国,陈楠,李伟群,等. 新型高效沼液营养液在蔬菜产量及品质上的效果[J]. 安徽农业科学,2011,39(21):12684-12686.
- [13] 岑汤校,张硕,胡宇峰,等. 单季稻不同用量沼液的肥效试验[J]. 中国土壤与肥料,2012(2):83-86.
- [14] 陈璧瑕. 沼液农用对玉米产量、品质及土壤环境质量的影响研究[D]. 雅安:四川农业大学,2012.
- [15] 陈志贵. 沼肥对蔬菜产量和安全性及土壤安全承载力的影响[D]. 上海:上海交通大学,2010.
- [16] 史一鸣. 稻田生态系统消解沼液的潜力及风险评估[D]. 杭州:浙江大学,2010.
- [17] 倪亮,孙广辉,罗光恩. 沼液灌溉对土壤质量的影响[J]. 土壤,2008,40(4):608-611.
- [18] 陈道华,刘庆玉,艾天,等. 施用沼肥对温室内土壤理化性质影响的研究[J]. 可再生能源,2007,25(1):23-25.
- [19] 段文霞,牟树森,徐可南,等. 厌氧发酵液在土壤生态系统中的循环与

- 利用研究[J]. 农业环境科学学报,1993(4):181-182.
- [20] 刘长喜. 沼肥和化肥合理配合施用技术的研究[J]. 中国沼气,1986(4):8-12.
- [21] 康凌云,赵永志,曲明山,等. 施用沼渣沼液对设施果类蔬菜生长及土壤养分积累的影响[J]. 中国蔬菜,2011(Z1):57-62.
- [22] 邓欧平,姜丽娜,陈丁江,等. 大量沼液施灌稻田的氨挥发特征[J]. 水土保持学报,2011,25(6):233-236.
- [23] 吴华山,郭德杰,马艳,等. 猪粪沼液施用对土壤氨挥发及玉米产量和品质的影响[J]. 中国生态农业学报,2012,20(2):163-168.
- [24] 刘喜龙,刘建伟,刘宾. 沼液安全利用研究现状及进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(2):968-971.
- [25] GUIQUIANI P L, CONCEZZI L, BUSINELLI M, et al. Fate of pig sludge liquid fraction in calcareous soil[J]. Journal of Environmental Quality, 1998,27(2):364-371.
- [26] STORAGE, KUCHTA S L, CESSNA A J. Lincomycin and spectinomycin concentrations in liquid swine manure and their persistence during simulated manure[J]. Arch Environ Contam Toxicol,2009,57(1):1-10.
- [27] 叶伟宗,成国良,陆宏,等. 沼液对甘蓝产量、品质及土壤肥力的影响[J]. 长江蔬菜,2006(9):50-51.
- [28] 孙广辉. 沼液灌溉对蔬菜产量和品质以及土壤质量影响的研究[D]. 杭州:浙江大学,2006.
- [29] 段然,王刚,杨世琦,等. 沼肥对农田土壤的潜在污染分析[J]. 吉林农业大学学报,2008(3):310-315.

(上接第1463页)

### 3 结论与讨论

在植物再生体系建立中,外植体的褐变对再生体系的初期阶段能否成功有较大影响<sup>[14]</sup>。植物的基因型不同,其褐化率和褐化程度不同。光照是影响褐化的主要因素之一<sup>[15]</sup>。该研究表明,2 d的暗培时间能有效降低外植体的褐化,为之后再生体系成功建立奠定了基础。

矮牵牛再生方式受基因型影响,‘幻想’矮牵牛以直接出芽为主,在MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L培养基中直接再生出芽率达94.7%,无明显愈伤。这与吕晋慧等<sup>[16]</sup>研究10个不同品种矮牵牛再生时5个品种的再生方式相同。此方式产生嵌合体 and 变异的几率较小<sup>[17]</sup>,有利于降低假阳性率。此外,直接再生获得芽的时间较短,且接种于生根培养基中生根快,长势好<sup>[18]</sup>。该研究同时发现,不适宜的生长素浓度也会影响其直接出芽,如NAA和IBA浓度偏高或偏低时,直接出芽率均较低,多分化出难以成芽的愈伤组织。可见适宜的生长素及浓度对出芽方式和出芽率影响重大。

范小峰等<sup>[19]</sup>研究发现,1/2MS作为生根基本培养基并外加激素时,矮牵牛生根率和生根状况良好。笔者所在课题组在预试验中用1/2MS作基本培养基,虽能生根,但根细,植株矮小,叶片黄绿。改用MS基本培养基后,状态有所改良。IBA和NAA都能促进根数量的增加,但NAA会抑制根的伸长,不利于栽植。而IBA浓度增加反而会抑制根的伸长,当培养基为MS+IBA 0.1 mg/L时,根质量最好。

在前人研究中,多采用高浓度Km作为选择抗生素<sup>[2]</sup>,Cef作为抑菌抗生素,而武术杰等研究的‘Tidal Wave’品种在高浓度Cef中出芽率很低,适宜的抑菌抗生素为羧苄青霉素<sup>[20]</sup>。该研究发现,‘幻想’品种对Km很敏感。低浓度Km即能抑制叶片再生出芽和生根。初步筛选出15 mg/L Km为出芽和生根的抗性筛选质量浓度。‘幻想’品种对Cef不敏感,以300 mg/L Cef作为抑菌抗生素的初步筛选质量浓度。

### 参考文献

- [1] 国凤利,孟繁静. 矮牵牛花器官发育的研究进展[J]. 植物生理学通讯,1997,33(4):292-296.
- [2] 彭春秀. 根癌农杆菌介导的Ipt基因对矮牵牛遗传转化的研究[D]. 重庆:西南农业大学,2003.
- [3] 李岩,赵德刚. Ipt基因促进矮牵牛遗传转化效率及热激启动子驱动基因删除[J]. 基因组学与应用生物学,2011,30(2):145-151.
- [4] WEISS D, VANDERT LUIT A, KNEGT E, et al. Identification of endogenous gibberellins in petunia flower, induction of anthocyanin in biosynthetic gene expression, and the antagonistic effect of abscisic acid[J]. Plant Physiol,1995,107:695-702.
- [5] 邵莉,李毅梁,晓文,等. 查尔酮合酶基因转化矮牵牛-改变花色的新途径[J]. 生物学通报,1995(6):11-12.
- [6] MICHAEL J, BECK M J, CAMPER N D. Shoot regeneration from petunia leaf discs as a function of explant size, configuration and benzyladine exposure[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,1991,26:101-106.
- [7] PRAKASH A P, KUMAR P P. Inhibition of shoot induction by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxyytidine in *Petunia* involves DNA hypomethylation[J]. Plant Cell Reports,1997,25(1):719-724.
- [8] ZHAO Y, XU N, MA Z Y, et al. Effect of Different Plant Growth Regulators on Callus Induction and *in vitro* Rapid Propagation of Wild *Petunia* Juss. [J]. Agricultural Science & Technology,2012,13(5):931-934.
- [9] 陈林晶,冯慧,丛日晨. 矮牵牛花药植株再生体系的建立[J]. 山西农业大学学报,2009,29(4):343-347.
- [10] 吕海燕. 矮牵牛突变自交系离体培养及变异植株稳定性观察[D]. 武汉:华中农业大学园艺林学学院,2009.
- [11] 宗宪春,宗灿华,刘静. 不同激素配比对重瓣矮牵牛组织培养的影响[J]. 安徽农业科学,2010,37(17):8877-8878.
- [12] 施雪波. 矮牵牛育种[M]//程金水. 园林植物遗传育种学. 北京:中国林业出版社,2000:234-239.
- [13] 胡惠蓉. ‘幻想’矮牵牛开花的光周期调控及一种新型突变花的初步研究[D]. 武汉:华中农业大学园艺林学学院,2006.
- [14] WANG P Z, ZHAO X, ZHANG Z S. Study on the Browning in Cell Suspension Culture of *Taxus cuspidata* [J]. Agricultural Science & Technology,2012,13(5):935-937,983.
- [15] 陈菲,李黎,官伟. 植物组织培养的防褐化探讨[J]. 北方园艺,2005(2):69.
- [16] 吕晋慧,王玄,王媛,等. 讨论用不同基因型矮牵牛高频再生体系建立的研究[J]. 山西农业大学学报,2011,31(2):99-103.
- [17] 宁国贵,白三平,包满珠. 矮牵牛细胞的长期离体培养及再生植株的ISSR分析[J]. 中国农业科学,2007,40(7):1479-1485.
- [18] 陶妹英,贾彩虹,徐碧玉. 直接诱导不定芽的矮牵牛再生体系的建立[J]. 农业生物技术科学,2006,22(6):62-65.
- [19] 范小峰,赵国栋,徐均泉. 矮牵牛愈伤组织的诱导及植株再生研究[J]. 北方园艺,2009(6):94-96.
- [20] 武术杰,李邱华. 矮牵牛Tidal Wave品种遗传转化受体再生体系的建立[J]. 东北林业大学学报,2007,35(4):14-15.