

农杆菌介导的 Lyz-GFP 基因对匍匐剪股颖 Penn A-1 转化和表达的研究

安惠惠^{1,2,3}, 马晖玲^{1,2,3*}, 李坚⁴, 白生军^{1,3}, 马祥^{1,3}

(1. 草业生态系统教育部重点实验室 甘肃农业大学, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省草业工程实验室, 甘肃 兰州 730070; 3. 中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070; 4. 陆地水循环及地表过程重点实验室 中国科学院地理科学与资源研究所, 北京 100101)

摘要:以匍匐剪股颖 Penn A-1 成熟胚为供试材料, 建立了其植株高效再生体系。利用农杆菌介导法将溶菌酶与绿色荧光蛋白 Lyz-GFP 二元基因转入匍匐剪股颖 Penn A-1 胚性愈伤组织中, 经培养获得抗病转基因植株。并对 Lyz-GFP 二元基因转化 Penn A-1 的适宜条件进行了研究。研究表明, 在 2.0 mg/L 2, 4-D+0.1 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上 Penn A-1 愈伤组织诱导率最高, 可达 36%, 且质量最好。愈伤组织在 MSO+0.5 mg/L NAA 上分化率最高, 达 42.5%; 浓度为 300 mg/L 的头孢霉素(Cef)可抑制农杆菌 LBA4404 的生长; Penn A-1 胚性愈伤组织经携有 pBI121-Lyz-GFP 的农杆菌 LBA4404 (OD₆₀₀ 值 0.3~0.5) 侵染 10~15 min, 共培养 3 d 后, 转化愈伤组织生长状况良好, 转化率达 12.5%, 且在后期的生长和转化苗的再生中有良好的表现, 转化苗再生率为 27.5%; 转化植株有较强的荧光表达量, 并经 PCR 检测, 获得的 2 株匍匐剪股颖 Penn A-1 转化植株中均扩增出 750 bp 的目标基因片段。

关键词:匍匐剪股颖; 基因转化; 溶菌酶 Lyz 基因; 绿色荧光蛋白 GFP 基因

中图分类号:S543⁺.903; Q943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-5759(2012)02-0141-08

* 匍匐剪股颖(*Agrostis stolonifera*)为禾本科剪股颖属多年生草本植物, 原产欧亚大陆, 在我国甘肃、河北、浙江、江西、贵州、云南等地均有分布。它具有较强的耐寒性、耐旱性、耐瘠性、耐荫性, 横向蔓延能力强, 能迅速覆盖地面形成密度大的草坪, 耐低修剪, 能形成一个细致、植株密度高、均一的高质量草坪。被广泛用于高尔夫球场果岭、发球盘、保龄球场等, 亦可用于一般园林绿化、厂矿区绿化等各类草坪。随着国外草种的大量引进、绿地面积的不断扩大及草坪集约化管理程度的提高, 草坪病害成为当今影响草坪利用价值、遏制当今草坪业发展的主要因素之一^[1]。草坪真菌病害是草坪草上的主要病害, 占病害总数的 80% 以上^[2]。其中匍匐剪股颖抗病性较差, 尤其在盛夏高温潮湿环境下极易感病, 如立枯病、钱斑病、褐斑病、白粉病等^[3]。近年来在草坪建植中广泛使用的匍匐剪股颖 Penn 系列品种之一 Penn A-1 所形成的草坪密度高, 色泽美, 草质优, 但其对币斑病(由 *Sclerotinia homoeocarpa* 所致)比较敏感, 易感染。植物病害给草坪生产和经营带来极大损失, 因此培育匍匐剪股颖抗病新品种迫在眉睫。

传统育种周期长、病原小种的更新速度远高于新品种培育速度。随着生命科学和生物技术不断取得重大突破, 生物经济将在提高人民健康水平、保障粮食安全、缓解能源压力、改善生态环境等方面发挥着重要的、不可替代的作用, 亦将成为新科技革命的重要推动力^[4]。运用转基因技术将外源基因导入植物体获得转基因植株也已成为目前改良草坪草包括匍匐剪股颖的重要手段。Chai 等^[5]首次在匍匐剪股颖、细弱剪股颖(*Agrostis tenuis*)和结缕草(*Zoysia japonica*)上进行试验, 用农杆菌介导法成功地获得了转基因植株。随后, 国内外一些研究小组相继报道了在匍匐剪股颖基因转化和改良上所取得的成果^[6-12]。

溶菌酶(lysozyme)是一种广谱性抗病基因, 专门作用于微生物细胞壁的水解酶, 又称细胞壁溶解酶。是一类抗菌蛋白, 具有几丁质酶的活力, 能选择性地分解细菌或真菌细胞壁组分中多糖的 β -1, 4-糖苷键, 从而破坏细菌

* 收稿日期: 2010-12-01; 改回日期: 2011-01-05

基金项目: 草业生态系统教育部重点实验室(甘肃农业大学)开放课题(CYZS-2011-002)和甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室项目-匍匐剪股颖抗病转基因植株的选育(033160)资助。

作者简介: 安惠惠(1983-), 女, 甘肃天水人, 硕士。E-mail: anhh2004@163.com

* 通讯作者。E-mail: mahl@gsau.edu.cn

细胞壁的致密网状结构,以抵御病原菌的侵染^[13],将溶菌酶基因植入植物细胞中,使其表达,最终可获得抗病植株。目前溶菌酶基因已被较广泛的应用到植物基因转化中并获得了一批抗病植株,1993年 Düring 等^[14]将 T4 噬菌体溶菌酶基因导入马铃薯(*Solanum tuberosum*),获得抵抗胡萝卜欧氏杆菌(*Erwinia carotovora*)引起病害的转基因植株。1995年 Nakajima 等^[15]将鸡蛋清溶菌酶基因或人溶菌酶基因导入烟草(*Nicotiana tabacum*),获得的转基因植株对病原细菌和真菌均表现出抗性^[16],许明辉等^[17]将 T4 噬菌体的溶菌酶基因导入溲型杂交稻恢复系南 29 的基因组,转基因材料较受体对照具有明显的抗性。然而溶菌酶基因在匍匐剪股颖中的转化还未见有报道。

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)来源于水母,当其受到紫外或蓝光激发时,绿色荧光蛋白发射绿色荧光。目前,GFP 作为一种新型的报告分子广泛应用于生命科学的众多领域,尤其在基因表达和定位等方面更具优越性^[18]。

本研究建立了匍匐剪股颖 Penn A-1 高效再生体系,为后继的基因转化研究奠定了基础。同时将绿色荧光蛋白(GFP 蛋白)作为报告基因,利用农杆菌介导法首次将 *Lyz*-GFP 二元基因成功导入匍匐剪股颖 Penn A-1 中,摸索出基因转化的适宜条件,并获得剪股颖转基因植株,检测到转基因植株的表达情况。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料:匍匐剪股颖 Penn A-1 种子由北京克劳沃集团提供。

pBI121-*Lyz*-GFP 表达载体由柴燕文等^[19]构建。该质粒载体含有 CaMV35S 启动子及其控制下的 *Lyz* 基因和 GFP 标记基因。

1.2 方法

本试验于 2009 年 5 月—2010 年 9 月期间进行。

1.2.1 种子消毒及培养条件 挑选匍匐剪股颖 Penn A-1 成熟种子,将种子包在纱布中,自来水室温浸泡 12 h,在超净工作台中用 70%酒精浸泡 1~2 min,无菌水洗涤 3~4 次,再用 0.1%的升汞浸泡 10 min,无菌水洗涤 5 次。用无菌滤纸吸干种子并接种到诱导培养基中。于 25℃暗培养箱培养 50 d 左右,将诱导出的愈伤组织转到继代培养基上(同诱导培养基),培养条件相同,继代培养周期为 21 d。

1.2.2 愈伤组织的诱导与分化 以 MS 为基本培养基,添加 0.1 mg/L 的 6-BA,另附加不同浓度的 2, 4-D (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mg/L)进行愈伤组织的诱导,每个处理 5 个重复。在超净工作台中将消毒好的种子接种在诱导培养基上,每皿接 50 个种子。暗培养 50 d 后统计愈伤组织出愈率。

以 MSO(MS 大量+MS 微量+MS 铁盐+B5 有机+蔗糖+琼脂)、MS 为诱导芽分化培养基,将继代培养 2 次的愈伤组织添加不同浓度 NAA(萘乙酸)(0.3, 0.5, 0.7, 1.0 mg/L),每皿接 10 块愈伤组织,每个处理 5 个重复,30 d 后统计分化率。培养条件:白天(25±2)℃,夜晚(18±2)℃,光照强度 1 000~2 500 lx,光周期为光照 16 h,黑暗 8 h。

待分化出的小苗长至 1~2 cm 时转入生根培养基,以 MSO、1/2 MS 培养基为诱导生根培养基,分别添加 0.3 mg/L NAA。

以上培养基中均附加 30 g/L 的蔗糖,7 g/L 琼脂粉,pH 值 5.8。

1.2.3 抗菌素及其抑菌浓度的设定 选取头孢霉素(Cef)和羧苄青霉素(Carb)2 种抗菌素作为 LBA4404 抑菌素。分别设 12 个浓度梯度(50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 mg/L),取含供试质粒 pBI121-*Lyz*-GFP 的农杆菌 LBA4404 液 100 μL 于含有不同抗菌素种类及浓度的 6 mL 液体发根农杆菌培养基(YEB)中,28℃,200 r/min,暗培养 24 h 摇床过夜培养。取不同抗生素及不同抗生素浓度梯度的 YEB 液体培养基各 2 mL,用紫外分光光度计测定其紫外吸收值 OD₆₀₀,每个处理 3 个重复。以未加菌液的液体 YEB 为空白,未加抗生素的液体 YEB 为对照。

1.2.4 农杆菌 LBA4404 侵染条件的确立 —80℃保存的含 pBI121-*Lyz*-GFP 质粒的 LBA4404 农杆菌在固体 YEP[含 50 mg/L 卡那霉素(Kan)、20 mg/L 利福平(Rif)]培养基上划线,正面放置 30 min 后倒置于 25℃培养箱

暗培养 2 d 后,挑取其上单克隆菌落于 YEP(含相同抗生素)液体培养基上 28℃、200 r/min 摇床过夜培养。

取 Penn A-1 继代培养 7 d 质地良好的胚性愈伤组织,用上述活化的农杆菌(设置 OD_{600} 为 0.3~0.5)浸泡待转化的愈伤组织一定时间(分别设置为 5, 10, 15 和 20 min),共培养 3 d 后转入含 300 mg/L 头孢霉素的分化培养基。20 d 后观察愈伤组织生长情况。

1.2.5 再生植株的炼苗和移栽 待根长至 1.0~2.5 cm、苗高 5~8 cm 时准备移栽,打开封口炼苗 7 d 后,洗净根部固体培养基,剪掉发黄的叶片并修剪植株高度为 5 cm 左右,移栽到装有珍珠岩、营养土、蛭石(用前高温灭菌)按 1:1:1 的比例拌匀的花盆中。

1.2.6 荧光检测 取匍匐剪股颖 Penn A-1 转化植株及非转化植株的叶片组织以及根进行压片,在 OLYPUS BX51/BX52 型荧光显微镜下,用蓝光激发组织,观察并照相。

1.2.7 DNA 提取和 PCR 分子检测 采用植物试剂盒提取 DNA。引物序列由柴燕文等^[19]设计,上海生工生物工程公司合成。GFP 基因的序列设计扩增引物序列:P1(5'-CGCGGATCCATGAGTAAAGGAGAAGAAC-3'),P2(5'-GCGCCCGGGTTTGTATAGTTCATCCAT-3')。PCR 反应条件:94℃预变性 4 min;94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,30 个循环;72℃延伸 7 min。保持电流 80 mA,1%琼脂糖凝胶电泳。电泳 40 min 后,紫外透射仪下观察结果并照相。

2 结果与分析

2.1 胚性愈伤组织的诱导及分化效果

大量研究表明,在禾草类植物中,2, 4-D 诱导愈伤组织的效果最好,其与 6-BA 配合使用会大大提高愈伤组织诱导率。本试验在不同的 2, 4-D 浓度下添加 0.1 mg/L 的 6-BA,进行了 Penn A-1 愈伤组织的诱导培养(图 1)。在 2.0 mg/L 2, 4-D+0.1 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上,Penn A-1 愈伤组织诱导率最高,且质量最好,诱导率达 36%,其他次之。

在 MSO 培养基上,Penn A-1 愈伤组织分化率普遍高于 MS 培养基(图 2),在 MSO+0.5 mg/L NAA 培养基上 Penn A-1 愈伤组织分化率高达 42.5%。

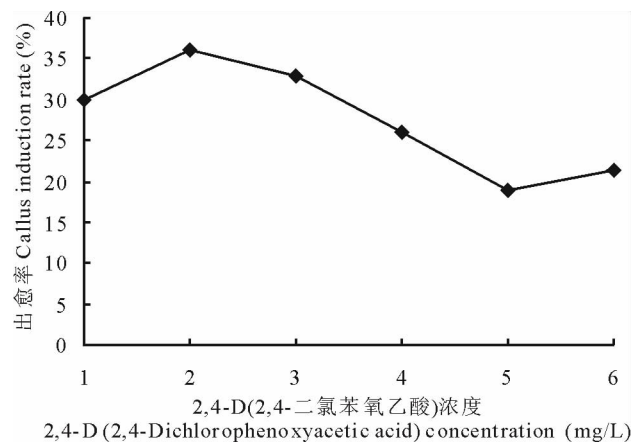


图 1 不同 2, 4-D 浓度对 Penn A-1 愈伤组织诱导率的影响

Fig. 1 The effect of 2, 4-D concentrations on calli induction rate

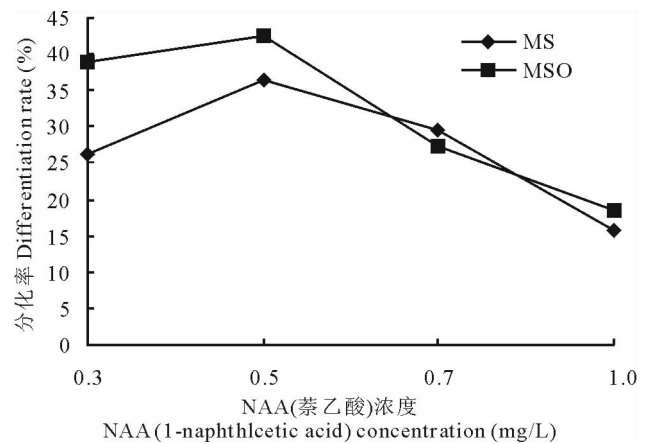


图 2 不同培养基及 NAA 浓度对愈伤组织分化的影响

Fig. 2 The effect of media and NAA concentration on differentiation of calli

MSO 培养基与 1/2 MS 培养基在诱导生根时没有明显的区别,均在苗长至 3 cm 左右时开始生根。此阶段可添加 0.3 mg/L NAA 促进生根。

图 3 显示了匍匐剪股颖 Penn A-1 愈伤组织的形成及植株再生过程。

2.2 适宜抗菌素及抑菌浓度的确定

针对特定的农杆菌菌株,选择合适的抗生素类型及适宜的浓度是植物基因转化过程中非常重要的一个环

节^[20]。研究结果显示(图 4),当头孢霉素(Cef)的浓度为 300 mg/L 时,就已经抑制了农杆菌 LBA4404 的生长,而同等浓度下羧苄青霉素(Carb)的 OD₆₀₀ 还处于 0.2 左右,只有当羧苄青霉素的浓度达到 500 mg/L 时,才能抑制住农杆菌的生长。且添加不同浓度的羧苄青霉素可造成愈伤组织褐化和后期污染,在共培养后的脱菌培养中,2 种抗生素的抑菌效果差异较大,故在后续的脱菌过程中,选择 300 mg/L 的头孢霉素来抑制农杆菌 LBA4404 的生长。

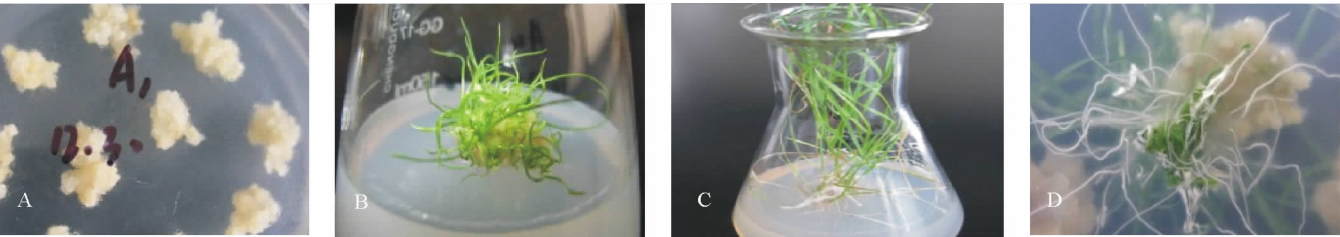


图 3 匍匐剪股颖 Penn A-1 愈伤组织及再生苗生长的不同时期

Fig. 3 Different growth stages from calli to regenerated seedlings in Penn A-1

A: 继代 3 次的匍匐剪股颖愈伤组织; B: 分化出芽的愈伤组织; C: 分化出的小苗; D: Penn A-1 根的生长。 A: calli of Penn A-1 after 3 times of sub-culture; B: differentiated calli with sprouts; C: regenerated seedlings; D: root growth of Penn A-1.

2.3 适宜的基因转化条件的确立

农杆菌侵染时间过短,不利于菌体附着在伤口表面,T-DNA 不能有效整合,大大降低转化效率,侵染时间太长,农杆菌繁殖过多,不易除菌甚至导致植物培养材料的死亡。本研究结果表明,LBA4404 对匍匐剪股颖 Penn A-1 最佳侵染时间为 10~15 min。侵染 5 min 时农杆菌与供体材料接触时间短,农杆菌不能很好地附着在愈伤组织表面,而侵染 20 min 时,则污染严重。

当 LBA4404 菌液 OD₆₀₀ 在 0.1 时,Penn A-1 愈伤组织成活率虽高达 70%(表 1),共培养 3 d 后材料表面几乎没有菌迹,但转化率低。OD₆₀₀ 在 0.3~0.5 时,愈伤组织成活率在 46%~53%,共培养后,愈伤组织周围可见淡淡菌迹。OD₆₀₀>0.7 后,污染十分严重,愈伤组织成活率低于 10%。本研究发现 Penn A-1 对农杆菌比较敏感,且后期农杆菌污染严重。

根据上述试验结果,在农杆菌介导的 Lyz-GFP 双元基因对匍匐剪股颖 Penn A-1 的转化中,选择 LBA4404 的 OD₆₀₀ 为 0.3~0.5、浸泡 10~15 min 为宜。在这样的转化条件下可获得转化苗,最终经荧光检测得知,转化率最高可达 12.5%。

2.4 转基因植株再生苗的炼苗和移栽

把继代培养 2~5 次的胚性愈伤组织经农杆菌侵染且共培养 3 d 后,转移至有抗生素的分化培养基中,30 d 左右分化出再生小苗,再生苗苗高 5~8 cm、根长至 1.0~2.5 cm 时移栽。本实验共侵染 179 块愈伤组织,经后

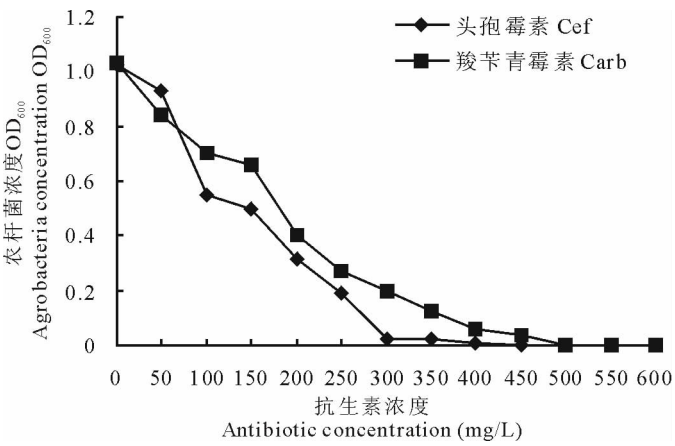


图 4 不同抗生素对农杆菌 LBA4404 的抑制效果

Fig. 4 The restraining effect of two antibiotics on agrobacteria

表 1 农杆菌 LBA4404 对 Penn A-1 愈伤组织成活率的影响

Table 1 The effect of agrobacteria concentrations on survival ratio of calli

项目 Item	菌液浓度 OD ₆₀₀				
	Agrobacteria concentration OD ₆₀₀				
	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
外植体数 Number of explants (No.)	30	30	30	30	30
成活数 Number of lives (No.)	21	16	14	3	2
成活率 Live rate(%)	70.0	53.3	46.7	8.6	3.1

续分化培养,2/3 转化愈伤组织被农杆菌侵蚀而死亡,存活 59 块转化组织。愈伤组织的分化率为 27.5%,共获得 16 株转化苗。研究表明,再生苗培养时间太长,根、茎、叶明显老化,移栽不易成活,待根长至 1.0~2.5 cm 时移栽最佳。春天移栽有助于匍匐翦股颖的生长,夏季高温对其不利,生长缓慢。

2.5 Penn A-1 转基因植株荧光检测分析

本课题组先期将溶菌酶基因和具有发光机制的 GFP 基因共同插入到同一植物表达载体上,获得重组质粒 pBI121-Lyz-GFP^[19]。本研究利用农杆菌介导法将其导入匍匐翦股颖 Penn A-1 植株。在获得的 Penn A-1 转基因植株中,GFP 作为报告基因,随时表达出荧光活性,实现植物组织中基因的活体定位,通过荧光检测手段,可在基因转化早期方便地检测到含有目的基因的转基因植株。在本研究中经荧光定量分析,16 株转化苗中有 2 株表现了强烈的荧光表达。含重组质粒 pBI121-Lyz-GFP 的匍匐翦股颖 Penn A-1 的叶片组织和根均在显微镜(蓝光激发)下呈现出黄绿色荧光(图 5),初步确定外源基因 Lyz-GFP 转入翦股颖植株中。

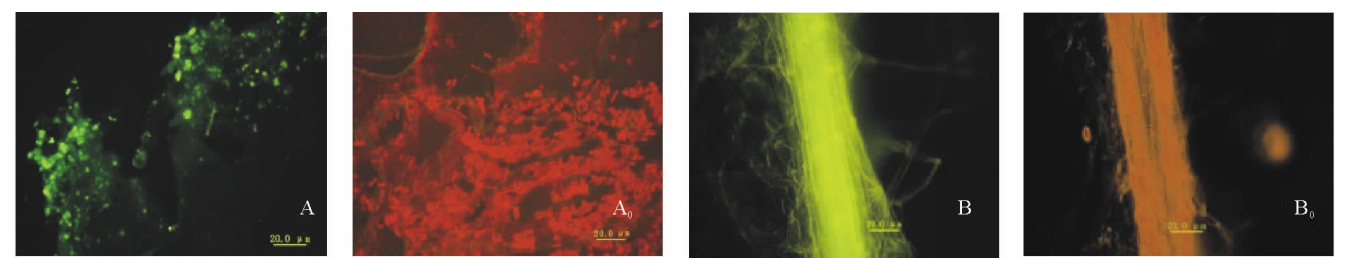


图 5 匍匐翦股颖 Penn A-1 转基因植株不同部位的 GFP 基因的荧光表达图

Fig. 5 Fluorescent expression maps of GFP gene taken from various parts of transgenic plant of creeping bent grass

A: 叶片细胞组织 GFP 基因荧光表达;A₀: 未转化植株叶组织的阴性对照;B: 根组织中的 GFP 基因荧光表达;B₀: 未转化植株根组织中的阴性对照。A: fluorescent expression of GFP gene in the leaf cells; A₀: negative control in leaf cells;B: fluorescent expression of GFP gene in roots; B₀: negative control in roots.

2.6 匍匐翦股颖 Penn A-1 转基因植株的 PCR 扩增

为进一步确定目的基因是否成功整合到匍匐翦股颖细胞基因组中,排除可能出现的假阳性,选取荧光检测显示阳性的再生植株,分别提取 DNA 进行 PCR 扩增分析。结果显示,2 株荧光检测为阳性的植株均扩增出预期大小为 750 bp 的 GFP 基因条带,而未转化的对照再生植株均无扩增的条带出现(图 6)。可见外源基因 Lyz-GFP 已成功转入匍匐翦股颖 Penn A-1 再生植株中。

3 讨论

3.1 匍匐翦股颖 Penn A-1 植株高效再生的影响因素分析

成功的基因转化首先依赖于良好的植物受体系统的建立^[21],大量文献表明,愈伤组织再生体系是基因转化最理想、最常用的再生体系之一^[22]。对不同的草坪草,基因型的差异对其愈伤组织的诱导有极大影响^[23]。在本课题组进行的匍匐翦股颖 Penn 系列品种的愈伤组织诱导和分化研究中,与其他 Penn 系列品种相比,Penn A-1 的种子萌发率和愈伤组织诱导率均比较低。这可能是品种基因型所致。

本试验选择 MS 培养基加 2.0 mg/L 2, 4-D+0.1 mg/L 6-BA 作为匍匐翦股颖 Penn A-1 愈伤组织诱导的最

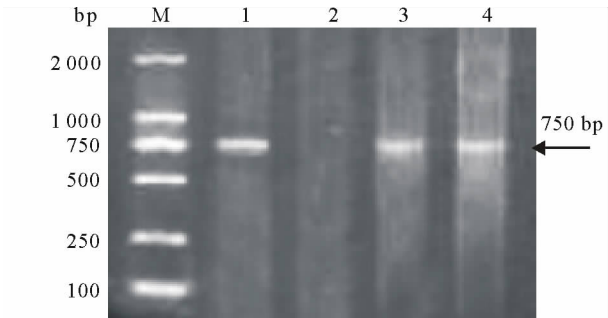


图 6 转基因匍匐翦股颖 Penn A-1 的 GFP 基因 PCR 扩增图

Fig. 6 PCR detection map of GFP gene from transgenic plant of Penn A-1

M:DNA 分子量标准 DL2000;1: 阳性对照;2:阴性对照;3,4:Penn A-1 转基因植株;箭头示目的片段。M:DNA marker DL2000; 1: positive control; 2: negative control;3,4: PCR of transformed GFP gene in Penn A-1; arrow indicates fragment.

佳激素组合,其诱导率可达 36%,这与孙榕江等^[24]在研究匍匐剪股颖 Penn A-1 愈伤组织诱导所用 2, 4-D 浓度一致。

愈伤组织继代培养的目的,除了愈伤组织扩繁外,还在于将非胚性愈伤转为胚性愈伤组织^[25]。而诱导胚性愈伤组织是建立高效的植株再生体系的首要条件^[26],在上述激素配比下,诱导出的愈伤组织大部分是胚性愈伤组织,可作为后续的基因转化受体材料。本试验从匍匐剪股颖成熟种子诱导出胚性愈伤组织,并进一步使之形成体细胞胚,其分化率高达 42.5%。研究发现,色泽鲜黄、质地较硬、干爽且不松散的愈伤组织更容易分化,而愈伤组织表面水渍化、无限增殖质地松散的愈伤组织,则失去分化能力。激素配比不佳可能会造成愈伤组织的水渍化,影响愈伤组织的生长和分化。而愈伤组织质地松散可能与继代生长时间过长、愈伤组织失去胚性有关。

3.2 适宜的农杆菌侵染条件的确定

根癌农杆菌对植物的侵染过程是受到植物伤口分泌的酚类化合物诱导,菌体先吸附于组织表面,然后将 Ti 质粒上的 T-DNA 转移并整合进植物基因组中^[22]。侵染时间过短或过长均不利于基因的转化,太短不利菌体附着降低转化效率,太长农杆菌繁殖过多导致外植体死亡。大量文献表明,农杆菌菌液浓度和侵染时间的确定由受体植物品种和取材的部位而决定^[27],应针对不同的菌株类型,不同供试材料建立相应的转化条件。本研究表明,农杆菌 LBA4404 的 OD₆₀₀ 为 0.3~0.5、侵染 10~15 min 可作为 Penn A-1 适宜的侵染条件。Penn A-1 愈伤组织与农杆菌共培养后,其表面可见淡淡菌迹。并在后续培养中 Penn A-1 表现出对农杆菌极强的敏感性,农杆菌侵蚀致使 2/3 植物材料死亡。匍匐剪股颖 Penn A-1 对农杆菌 LBA4404 具有较高的敏感性,这是否与其较低的转化率有关尚待探索。本课题组正在继续实施相关的研究,以求探索出减少农杆菌 LBA4404 对匍匐剪股颖 Penn A-1 生长和分化的影响的措施和方法。

农杆菌和外植体共培养的时间是整个转化过程非常重要的环节,T-DNA 的转移以及整合都在共培养时间内完成。共培养时间过短则不能完成复杂的转化过程,影响转化率,时间过长农杆菌对受体材料毒害严重,影响其分化甚至停止生长。本试验以 3 d 作为共培养时间,共培养后受体材料及周围有淡淡菌斑,后续分化阶段施加 300 mg/L 头孢霉素抑菌则不会影响愈伤组织的生长。

3.3 pBI121-Lyz-GFP 表达载体的优越性

为了方便转化植株的鉴定、降低后期检测工作量,常插入选择标记基因和报告基因作为初期筛选检测的手段。GUS(β -D-葡萄糖醛酸酶)基因作为报告基因,其表达量通过细胞组织化学方式而得以检测。然而 GUS 作为标记的一个主要局限在于检测时对材料的破坏性,这对需要进一步进行基因表达的材料来说极不方便^[28],由于植物细胞其他因素的干扰,以及有些植物材料本身也能产生内源 GUS 活性,反应颜色的深浅有时不能说明 GUS 活性高低或有无^[29]。

本研究所用植物表达载体 pBI121-Lyz 恰好去除了载体中的 GUS 基因,代之以 Lyz 基因,并在该目的基因片段后面插入报告基因 GFP^[19]。GFP 作为报告基因具有诸多优点:1)材料无需前处理,可以活体观察。2)不需任何反应底物和辅助因子。3)植物本身不含 GFP,不会出现假阳性结果。4)无毒害,GFP 生活的细胞基本无毒害,对目的基因的功能也没有影响,转化后细胞仍可以连续传代。5)GFP 的表达几乎不受属种范围的限制,GFP 没有细胞种类和位置上的限制,在各个部位都可以表达发出荧光^[19]。本研究将 pBI121-Lyz-GFP 双元基因转入匍匐剪股颖 Penn A-1,以 GFP 作为报告基因对转化植株进行初期鉴定和筛选,在 2 株转化苗中均灵敏地检测到 GFP 基因的荧光表达,方便地活体定位到目的基因在转化植株中的存在及其荧光表达部位,充分体现了 GFP 作为报告基因的优越性。

3.4 匍匐剪股颖转化植株的筛选

本研究所采用的 pBI121-Lyz-GFP 表达载体有新霉素磷酸转移酶基因(npt II)筛选标记基因。研究结果表明,卡那霉素对匍匐剪股颖转化植株的筛选效果甚微。王渭霞等^[12]在匍匐剪股颖转 CBF1 基因的研究中指出禾本科植物本身对卡那霉素具有较高的天然抗性,陈智勇等^[23]也认为卡那霉素不适于作为匍匐剪股颖转化植株的筛选剂。本研究所用的上述表达载体在对匍匐剪股颖的基因转化中还有一定的欠缺处,即在前期作业中无法通过卡那霉素选择压进行匍匐剪股颖转基因植株的筛选,致使后期检测工作量加大,因此,本研究所用的 pBI121-

Lyz-GFP 表达载体还需进一步改造和完善。本课题组拟将在之后的研究中用抗除草剂的 bar 基因作为选择标记基因,用以筛选禾草类转基因植株。

参考文献:

- [1] 古丽君,徐秉良,梁巧兰,等. 兰州市草坪禾草根腐病的发生及病原菌鉴定[J]. 草业学报,2009,18(4): 175-180.
- [2] 何秋,刘建秀. 草坪草真菌病害的研究进展[J]. 草业科学,2006,23(4): 95-104.
- [3] 张丽梅,刁立峰,陈忠林. 匍匐剪股颖草坪主要病虫害发生规律及防治[J]. 辽宁林业科技,1997,(3): 35-36.
- [4] 梁哲,姜三杰,未丽,等. 三叶草基因工程研究进展[J]. 草业学报,2009,18(2): 205-211.
- [5] Chai M L, Senthil K K, Kim D H. Transgenic plants of colonial bentgrass from embryogenic callus via Agrobacterium-mediated transformation[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 77: 165-171.
- [6] Hartman C L, Lee L, Day P R, et al. Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) by biolistic transformation[J]. Bio-Technology, 1994, 12(9): 919-923.
- [7] Lee L, Laramore C L, Day P R, et al. Transformation and regeneration of creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) protoplast[J]. Crop Science, 1996, 36(2): 401-406.
- [8] Xiao L, Ha S B. Efficient selection and regeneration of creeping bentgrass transformants following particle bombardment[J]. Plant Cell Reports, 1997, 16(12): 874-878.
- [9] Zhong H, Bolyard M G, Srinivasan C, et al. Transgenic plants of turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus[J]. Plant Cell Reports, 1993, 12(1): 1-6.
- [10] 胡繁荣. 农杆菌介导获得转基因抗虫匍匐剪股颖植株[J]. 农业生物技术学报,2005,13(2): 262-263.
- [11] 叶晓青,余建明,王松凤,等. 农杆菌介导法获得匍匐剪股颖转 GO 基因植株[J]. 江苏农业学报,2008,24(3): 251-256.
- [12] 王渭霞,朱廷恒,玄松南. 农杆菌介导的匍匐剪股颖胚性愈伤组织的转化和转 CBF1 基因植株的获得[J]. 中国草地学报,2006,28(4): 59-64.
- [13] 许明辉,李成云,李进斌,等. 溶菌酶基因水稻稻瘟病抗谱分析[J]. 中国农业科学,2003,36(4): 387-392.
- [14] Düring K, Porsch P, Fladung M, et al. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* [J]. Plant Journal, 1993, 4(3): 587-598.
- [15] Nakajima H, Muranaka T, Ishige F, et al. Fungal and bacterial disease resistance in transgenic plants expressing human lysozyme[J]. Plant Cell Reports, 1997, 16: 674-679.
- [16] Trudel J, Potvin C, Asselin A. Secreted hen lysozyme in transgenic tobacco: recovery of bound enzyme and in vitro growth inhibition of plant pathogens[J]. Plant Science, 1995, 106(1): 55-62.
- [17] 许明辉,李成云,李进斌,等. 转溶菌酶基因水稻稻瘟病抗谱分析[J]. 中国农业科学,2003,36(4): 387-392.
- [18] 金元昌,李璐,李景鹏. GFP 与 GnRH/TRS 融合基因表达载体的构建及表达[J]. 动物医学进展,2005,6(11): 84-87.
- [19] 柴燕文,马晖玲,谢小冬,等. pBI121-Lyz-GFP 表达载体的构建及其在和田苜蓿愈伤组织中的转化[J]. 农业生物技术学报,2008,16(5): 842-846.
- [20] 马晖玲,卢欣石,曹致中,等. 紫花苜蓿基因转化的影响因素分析[J]. 草业学报,2006,15(5): 92-104.
- [21] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社,1998: 185-189.
- [22] 丁路明,龙瑞军. 早熟禾再生体系建立的研究现状[J]. 草原与草坪,2003,(2): 6-9.
- [23] 陈智勇,易自力,蒋建雄,等. 匍匐剪股颖农杆菌转化体系的研究[J]. 中国草地学报,2007,19(5): 59-63.
- [24] 孙榕江,李阳春,刘自学,等. 匍匐剪股颖愈伤组织诱导及其分化的研究[J]. 草原与草坪,2006,(4): 42-45.
- [25] 赵智燕,潘俊松,何亚丽,等. 两个高羊茅无性系的营养器官组织培养及再生体系的建立[J]. 草业学报,2009,18(5): 168-175.
- [26] 徐子勤. 重要禾谷类植物转基因研究[J]. 生物工程进展,2001,21(1): 59-74.
- [27] 刘小琳,王继峰,胡晓艳,等. 根癌农杆菌介导的紫花苜蓿遗传转化体系的建立与优化[J]. 中国草地学报,2007,29(2): 102-106.
- [28] 孙晓红,姚泉洪,陈明杰,等. 含绿色荧光蛋白及 trp3iar 基因的草菇表达载体的构建[J]. 上海水产大学学报,2006,15(1): 12-15.

[29] 黄国存,朱生伟,董越梅,等. 绿色荧光蛋白及其在植物研究中的应用[J]. 植物学通报, 1998, 15(5): 24-30.

**A study on transformation and expression of the Lyz-GFP genes mediated by agrobacteria
in creeping bentgrass variety Penn A-1**

AN Hui-hui^{1,2,3}, MA Hui-ling^{1,2,3}, LI Jian⁴, BAI Sheng-jun^{1,3}, MA Xiang^{1,3}

(1. Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Ministry of Education, Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, Lanzhou 730070,

China; 3. Sino-U. S. Centers for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China;

4. Key Laboratory of Water Cycle and Related Land Surface Processes, Institute of Geographic

Sciences and Natural Resources Research, CAS, Beijing 100101, China)

Abstract: Mature embryos of bentgrass (*Agrostis stolonifera*) Penn A-1 were used to establish a highly efficient regeneration system. The dual genes Lyz-GFP (Lysozyme gene and green fluorescence protein gene) were transformed into embryonic calli of creeping bentgrass by an agrobacterium-mediation method to obtain transgenic plants with disease resistance capability. The best conditions for transformation of the Lyz-GFP genes in Penn A-1 were studied. The callus induction ratio of Penn A-1 was highest at 36% on MS medium supplemented with 2.0 mg/L 2, 4-D and 0.1 mg/L 6-BA, and the calli had the optimum growth status. The highest differentiation ratio was 42.5% on MSO medium supplemented with 0.5 mg/L NAA. The study also showed that growth of agrobacterium LBA4404 was restrained by 300 mg/L cefotaxime (Cef). Transformed calli performed well in later growth periods as well as in the regeneration of transgenic plants after infection with agrobacterium LBA4404 (OD₆₀₀: 0.3—0.5) carried with pBI121-Lyz-GFP for 10—15 min, and co-cultured for 3 days. The transformation ratio of calli was 12.5%; the regeneration ratio of transgenic plants was 27.5%; the transgenic plants strongly expressed fluorescence, and the 750 bp target fragments of the GFP gene were amplified by PCR from 2 acquired transgenic plants with expression of Penn A-1 fluorescence.

Key words: creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*); gene transformation; lysozyme; green fluorescence protein gene