

## 农杆菌介导法转化切花菊‘神马’

### 1. 农杆菌感受态制备

- ① 从 YEB 平板培养基上挑取农杆菌单克隆，接种于 5 mL YEB（含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  利福平）液体培养基中，28 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm，过夜培养；
- ② 取 2 mL 过夜培养液接种于 50 mL 上述含有利福平的 YEB 液体培养基中，28 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm，摇床培养至 OD 达到 0.5；
- ③ 菌液冰浴 30 min，转至预冷的 50 mL 离心管中，4 $^{\circ}\text{C}$ ，5000 rpm，离心 10 min，收集菌体；
- ④ 2 mL 预冷的 50 mM 无菌  $\text{CaCl}_2$  溶液（含 15% 甘油）悬浮菌体，即为感受态细胞；以 100  $\mu\text{l}$ /管分装，液氮速冻后，保存于 -70 $^{\circ}\text{C}$  冰箱，备用。

### 2. 质粒转化农杆菌感受态

- ① 吸取构建好的表达载体质粒 5  $\mu\text{l}$ ，加入到 100  $\mu\text{l}$  感受态细胞中，混匀；
- ② 冰浴 30 min，液氮冷冻 5 min，37 $^{\circ}\text{C}$  热击 5 min；
- ③ 加入 800  $\mu\text{l}$  YEB 液体培养基，28 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm，摇床培养 5 h；
- ④ 离心，留 200  $\mu\text{l}$  上清重悬沉淀，将菌液涂于 YEB 固体培养基（含质粒对应的抗生素），28 $^{\circ}\text{C}$  培养 2 d，挑取单克隆，检测筛选阳性克隆，摇菌后 -70 $^{\circ}\text{C}$  保存，用于下一步植物转化。

### 3. 叶盘法转化菊花‘神马’

① 取 25~30 d 苗龄‘神马’无菌苗，用手术刀在无菌操作台中把无菌苗顶端叶片切成 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 的叶盘，置于预培养培养基（MS+6-BA 1.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$ +NAA 0.5 mg $\cdot$ L $^{-1}$ ）中预培养 2~3 d。

② 然后浸入备好的农杆菌菌株的菌液（OD 为 0.5~0.6）中感染 10 min，用滤纸吸干叶盘表面的菌液后再接种到共培养基（MS+6-BA 1.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$ +NAA 0.5 mg $\cdot$ L $^{-1}$ ）上黑暗中培养 3 d，然后转入脱羧培养基（MS + 6-BA 1.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$  + NAA 0.5 mg $\cdot$ L $^{-1}$  + Carb 500 mg $\cdot$ L $^{-1}$ ）上延迟培养 5 d。

③ 转入选择培养基（MS + 6-BA 1.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$  + NAA 0.5 mg $\cdot$ L $^{-1}$  + Carb 300 mg $\cdot$ L $^{-1}$  + Kan 10 mg $\cdot$ L $^{-1}$ ）上继代培养 3~4 代，两周继代一次，逐渐降低筛选压。

④ 分化出的抗性芽长至 2~3 cm 时，将抗性芽转入生根筛选培养基（1/2MS + Carb 200 mg $\cdot$ L $^{-1}$  + Kan 7.5 mg $\cdot$ L $^{-1}$ ）上进行筛选，初步获得抗性植株。

⑤ DNA 鉴定抗性苗是否含有已转入的表达载体，RT-PCR 鉴定抗性苗转入基因的表达量。最后对抗性苗进行炼苗移栽。将抗性株系移栽大田，越冬后取脚芽进行分子检测。