

文章编号: 1000-3142(2000)01-0047-05

## 农杆菌介导的枳壳转化系统建立研究初报

S666.034

S188

韩美丽<sup>1</sup>, 李耿光<sup>1</sup>, 贺红<sup>1</sup>, 张银东<sup>2</sup>, 张兰英<sup>1</sup>, 陆荣生<sup>3</sup>

(1. 中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650; 2. 中国农科院华南生物技术重点实验室, 海南海口 510000; 3. 广西林业科学院, 广西南宁 530001)

**摘要:** 以枳壳为对象, 进行了农杆菌介导的上胚轴转化系统建立研究, 得到了携带柑桔衰退病毒外壳蛋白基因的枳壳转化植株。研究表明: 枳壳各类外植体中, 上胚轴是较好的转化材料; 上胚轴出芽部位主要在形态学上端。以卡那霉素为选择剂, 外植体水平面放置时, 选择剂的剂量是 50~70 mg/L。转化研究中发现感染液中乙酰丁香酮 100  $\mu$ mol/L 的加入促进转化外植体 Gus 表达阳性率的提高。延迟 1 d 的选择培养, 有助于 Gus 阳性芽的增多。所得 Gus 阳性无性系经 Southern blot 杂交检测, 证明外源基因已稳定整合到了植物基因组中, 所得 Gus 阳性植株确为携带柑桔衰退病毒外壳蛋白基因的转化植株。

**关键词:** 枳壳; 转化; 上胚轴; 农杆菌; 抗病育种; 衰退病毒外壳蛋白基因

**中图分类号:** Q943.1 **文献标识码:** A

## Preliminary study on establishment of transformation system in *Poncirus trifoliata* Raf.

HAN Mei-li<sup>1</sup>, LI Geng-guang<sup>1</sup>, HE Hong<sup>1</sup>, ZHANG Ying-dong<sup>2</sup>,  
ZHANG Lan-ying<sup>1</sup>, LU Rong-sheng<sup>3</sup>

(1. South China Institute of Botany, Academy Sinica, Guangzhou 510650, China; 2. Biotechnology Laboratory of Agriculture Academy of China, Haikou 510000, China;  
3. Forestry Academia of Guangxi, Nanning 530001, China)

**Abstract:** Transformation and regeneration of *Poncirus trifoliata* Raf. plants were studied by *Agrobacterium*-mediated. Transgenic plants with CTV-cp have been obtained. Of the various explants, epicotyls are suitable for transformation research. Shoot is formed on basal end of the epicotyls segment. As a selection agent, the concentration of kanamycin is 50~70 mg/L. The frequency of explants with Gus positive was promoted when 100  $\mu$ mol/L acetosyringone was added in *Agrobacterium* suspension liquid. It is useful for Gus positive shoot producing when selectable cultivation is postponed for 1 day.

**收稿日期:** 1999-03-01

**作者简介:** 韩美丽(1963-), 女, 博士, 高级工程师, 目前从事生物技术育种研究。现工作单位及通信地址为: 广西南宁市邕武路 23 号, 广西林业科学研究院, 邮编: 530001。

**基金项目:** 国家自然科学基金(39870539), 广东省自然科学基金(980478)资助项目的一部分

DNA fragment from plasmid pGA482GG, which was cut by Nco I E, was used as probe, foreign gene is proved going to *P. trifoliata* by Southern blot.

**Key words:** *Poncirus trifoliata* Raf.; transformation; epicotyls; *Agrobacterium*

遗传转化技术是 80 年代兴起的一门新型育种技术,自它问世以来,就以其严格的定向性、高效性受到育种工作者的欢迎。枳壳是柑桔种中的一个重要品种,它既是柑桔的优良砧木,又有重要的医药价值,可治疗多种常见内外科疾病。随着柑桔种植业及医药行业的发展,对枳壳产量品质的要求也日益提高,培育抗病优质的枳壳新品系已为当前的急迫任务。国内外已有多起柑桔属植物转基因成功的报道(Kobayashi S, et al, 1989; Moore GA, et al, 1992; Leandro P, et al, 1995),但转入基因多为报告基因及选择基因,目的基因转入的公开报道尚很少。因此我们以枳壳为对象,柑桔衰退病病毒外壳蛋白基因为目的基因,农杆菌为载体进行了转化研究,已建立了有效的上胚轴转化系统。

## 1 材料与方方法

**植物材料:** 枳壳(*Poncirus trifoliata* Raf.)种子,经常规方法消毒,播种于 MS 固体培养基中,25~30℃ 黑暗下萌发待用。

**再生系统建立:** 以 MT 附加 BA5 mg、NAA0.5 mg/L 为分化培养基,研究外植体种类、放置方式等因素对外植体再生影响,并确定选择剂的浓度。

**农杆菌菌株与质粒:** 农杆菌菌株为 EHA101,含质粒载体 pGA482GG。质粒上插有 35s 启动子驱动的外源目的基因:柑桔衰退病病毒外壳蛋白基因(CTV-cp)及 Gus、NTP-Ⅰ 基因,CTV-cp 基因全长 669 bp,插入位点为 Nco I 位点。该质粒图谱如图 1。

农杆菌液体培养基为 YEP 附加卡那霉素(Km)50 μg/ml,拟潮霉素 60 μg/ml。转化前挑单菌落接种于 50 mL 液体培养基中,28℃ 黑暗下 120 r/min 振荡培养至对数期(OD<sub>600</sub> = 0.8~1.0),然后 3 000 r/min 离心 10 min,除去上清液,用再悬浮液悬浮待用。

**转化方法:** 将实生苗上胚轴切 0.5 cm 长,在农杆菌悬浮液中浸泡 20 min,滤纸吸去多余的菌液,放共培养基上,26~28℃ 黑暗下共培养 3 d,转至选择培养基上选择培养。为了提高转化效率,进行了不同浓度酚类化合物、延迟选择时间对 Gus 阳性芽产生率的影响研究。农杆菌悬浮液、共培养基、分化培养基的基本成分均为 MT,分化培养基附加先锋霉素(Cef)300 mg/L 及相应的卡那霉素(Km)。选择过程均在 26~28℃ 光下进行,光照强度 1 400 lx,光照时间每天 12 h。

Gus 基因表达测定:采用组织化学染色法<sup>[2]</sup>。

植物 DNA 及质粒 DNA 提取分别采用 SDS 法<sup>[1]</sup>、碱裂解法<sup>[2]</sup>。质粒 DNA 经 Nco I 酶切消

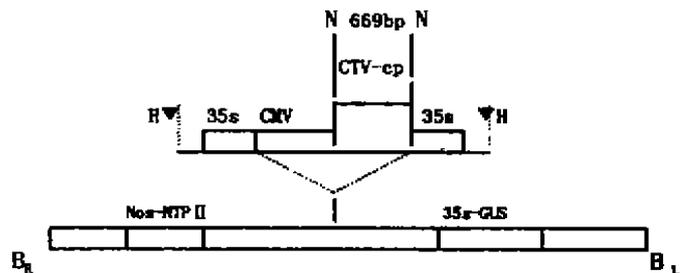


图 1 携带柑桔衰退病病毒外壳蛋白基因(CTV-cp)的质粒 pGA482GG 简图

Fig. 1 Schematic representation of the pGA482GG transformation plasmid.

R—Right border; L—Left border; 35s—35s promoter; H—Hind III; N—Nco I  
R—右边界; L—左边界; 35s—35s 启动子; H—Hind III;  
N—Nco I—CTV-cp—柑桔衰退病病毒外壳蛋白

化后,采用 DiG 标记法制成探针(《DiG DNA Labeling and Detection Kit》User's Guide, 1989)。

Southern blot 分析采用 DiG 成套试剂盒试剂及反应条件(《DiG DNA Labeling and Detection Kit》User's Guide, 1989)。植物 DNA 经 Nco I 酶切消化后,4 ℃下 0.8% 琼脂糖上电泳 12 h,经变性,转移至 NC 膜上。烘干膜后进行预杂交、杂交及显色。

## 2 结果与讨论

### 2.1 外植体类型对不定芽诱导效果的影响

从表 1 可看出,外植体类型对不定芽诱导效果有较大的影响。从外植体出芽百分率来看,所有外植体中上胚轴出芽率最高,带根上胚轴次之,子叶最差。从丛生芽所占比例来看,也以上胚轴最高,下胚轴、子叶较低。

从出芽所用的时间来看,带根上胚轴最短,仅 10~15 d 既可产生大量的不定芽;上胚轴与嫩茎 20 d 时不定芽开始大量出现;而子叶、下胚轴则需要 30 d 以上才陆续出芽。

综上,从农杆菌介导的转化角度看,以上胚轴为转化材

料较好,因其除出芽率高、丛生芽所占比例高外,材料来源也较其它外植体充足,且上胚轴出芽均在切口处,易于转化材料的筛选。

### 2.2 外植体在培养基中的放置方式对不定芽形成的影响

从表 2 可看出,接种后 20 d,形态学上端插入培养基者,出芽率为 0,形态学下端插入培养基者出芽率为 38.0%,平放出芽率达 48.0%。随着分化时间的延长,至接种后 40 d,平放与形态学下端插入培养基的 2 个处理,出芽率均达到 100%,而形态学上端插入培养基的处理出芽率仅为 8.0%。另外,平放外植体出芽部位几乎均在形态学上端这部分,另一端基本不出芽,或出芽很晚。由此可以认为外植体放置方式对出芽的影响主要在形态学上端是否入培养基中,如形态学上端插入培养基中,则另一端出芽率很低。因而转化研究中应注意,无论采用何种放置方式,都需形态学上端暴露于培养基表面,以便于转化芽的选择。

### 2.3 不同浓度卡那霉素对上胚轴出芽的影响

从表 3 可看出:外植体在培养基中放置方式不同,对卡那霉素(Kanamycin, Km)的承受能力也不同。以形态学下端垂直插入培养基方式培养时,外植体对 Km 的承受水平明显高于水平放置时的承受水平。竖放时,Km 180 mg/L 时,芽分化率才完全受到抑制。水平放置时 Km 50 mg/L 时,出芽即被完全抑制。外植体放置方式对 Km 的承受力差别可能在于:平放时,Km 从

表 1 外植体类型对不定芽诱导效果的影响

Table 1 Effect of different explants on adventitious bud formation in *P. Trifoliata* Raf.

外植体类型 Explants	外植体数(个) No. of explants	出芽外植体 百分比(%) Percent of explants with bud	芽丛大于 3 的外植 体百分比(%) Percent of explants with bud clum
上胚轴 Epicotyl	45	57.7	96.2
带根上胚轴 Epicotyl with root	40	53.3	23.3
子叶 Cotyledon	46	0	0
下胚轴 Hypocotyl	48	47.3	83.3
嫩茎 Stem	46	44.4	80.8

表 2 外植体放置方式对枳壳上胚轴出芽的影响

Table 2 Effect of explants orientation on shoot formation of epicotyl of *P. trifoliata* Raf.

放置方式 Explant orientation	外植体数 No. of explants	出芽外植体百分率(%) Percent of explants with shoot		
		20(d)	30(d)	40(d)
平放 Horizontal	50	38.0	82.0	100
形态学上端插入培养基 Basal end of the segment protruding	50	0	4.4	8.0
形态学下端插入培养基 Apical end of the seg- ment protruding	50	48.0	80.0	100

培养基到外植体的运输距离短,因而细胞中 Km 的有效浓度高;竖放时,Km 从培养基到外植体的运输距离长,故 Km 的有效浓度低。因而在选择培养时应注意外植体的放置方式。

#### 2.4 酚类添加剂的浓度对外植体 Gus 瞬时表达阳性率的影响

前人的许多研究表明,酚类化合物的添加对农杆菌向植物细胞的附着、转移有较大的促进作用,因而有助于转化效率的提高(Kaneyoshi et al. 1994, Nobyoshi S et al. 1990)。在本研究中也表现了这一点。结果见表 4。

从表 4 可看出,农杆菌感染液中一定浓度的乙酰丁香酮(As)的添加有助于 Gus 瞬时表达阳性外植体百分率的提高。不加 As 时,Gus 瞬时表达阳性的外植体百分比仅 48.0%,而加 As 后,Gus 阳性外植体的比例明显上升,至 As 100  $\mu\text{mol/L}$  时,Gus 阳性外植体百分率最高达 84.0%;As 浓度超过 100  $\mu\text{mol/L}$ ,促进作用逐渐下降;As 190  $\mu\text{mol/L}$  时,开始有抑制作用。可以认为一定浓度 As 的加入促进了植物细胞内与农杆菌天然素和力有关的基因的高效表达,因而 Gus 阳性外植体的比例有所提高。但由于酚类化合物对植物细胞也有一定的杀伤力,故 As 加入浓度不可过高,时间也不可过长,以免造成外植体死亡。

#### 2.5 延迟选择时间对 Gus 阳性芽产生百分率的影响

转化细胞选择过程中,选择剂的加入时间及加入的起始浓度对转化效率的高低有很大的影响。加入时间过早,浓度过高,转化细胞尚未恢复生长,且抗性基因也未充分表

达,因此外植体易于死亡,从而造成总的转化率下降;加入时间过晚,或浓度过低,未转化的细胞有可能未经选择剂的破坏而存活下来,造成假抗性芽大量的发生,给测定工作带来一定困难。

从表 5 中可看出,适当的延迟选择有助于转化效率的提高。在 Km 70 mg/L 的浓度下,延迟 0 d 与 1 d 选择的转化效率最高,产生抗性芽的外植体的百分率分别为 15.0%、22.6%,产生 Gus 阳性芽的外植体的百分率分别达到 13.3%、20.3%。延迟 3 d 以后,具抗性芽的外植体所占百分率上升,而具 Gus 阳性芽的外植体的百分率下降,假抗性芽增多。因而最佳的延迟时间应为 1 d。

另外要注意的是,共培养 3 d 所调查的不同品种的 Gus 阳性外植体所占比例,仅是 Gus 基因瞬时表达的情况,外源基因与植物基因组的结合是极不稳定的,在选择过程中常存在外源基因丢失现象,这种现象的存在,使实验结果出现一些矛盾现象,即共培养后 Gus 瞬时表达率高而经长期选择后得到的转化植物却很少,甚至没有。这种现象在表 5 中也得到证实。这种现象的产生可能与外源基因稳定整合与瞬时表达所需的植物生理状态不同有关,需在这方面进一

表 3 卡那霉素浓度对枳壳上胚轴芽形成的影响

Table 3 Effect of kanamycin on shoot formation of epicotyl in *P. trifoliata* Raf.

外植体放置方式 Explant orientation	卡那霉素浓度(mg/L) Concentration of Km	外植体出芽率(%) Rate of explants with shoot
	0	66.7
水平放置 Horizontal	30	4.4
	50	0
	70	0
形态学下端 插入培养基 Basal end of the segment protruding	0	60.0
	80	57.8
	140	28.9
	180	0

各处理外植体数均为 45 No. of explants per treatment is 45

表 4 乙酰丁香酮(As)对外植体 Gus 瞬时表达阳性率的影响

Table 4 Effect of concentration of As on frequency of explants with Gus transient expression positive in *P. trifoliata* Raf.

As 浓度( $\mu\text{mol/L}$ ) Concentration of As	0	30	70	100	130	160	190
Gus 阳性外植体百分率(%) Rate of explants with Gus positive	48.0	52.0	64.0	84.0	76.0	52.0	40.0

各处理外植体数为 50 个 No. of explants per treatment is 50

步研究以提高转化效率,并且在转化研究不能仅以抗性产生率为选择标准,必需经过 Gus 检测及分子检测,以排除假抗性及假阳性芽。

## 2.6 转化体的分子鉴定

在 Gus 测定阳性基础上,以枳壳的 Gus 阳性无性系为对象,进行了分子检测,以确定外源基因是否稳定整合到了植物基因组中。

从 Southern blot 杂交结果可看出:所测定的 6 个枳壳 Gus 阳性无性系与质粒均在预期的 669bp 位点处

出现同一条杂交带,对照则无,因而可以证明,柑桔衰退病病毒外壳蛋白基因已稳定整合到了植物基因组中,所获得的枳壳植株确为转基因植物。

## 3 小 结

柑桔衰退是柑桔生产中危害较为严重的一种病毒病,常规防治方法主要有药物防治及抗病品种选育,利用遗传转化技术进行抗衰退病品种培育则是一种新的尝试。与其它果树品种相比,柑桔属难转化作物,前人柑桔的研究方面转入基因多为报告基因,且所得转化率均较低。本实验从枳壳外植体再生系统建立研究出发,对转化研究中选择剂的使用剂量、酚类化合物对外植体 Gus 阳性瞬时表达率的影响、延迟选择时间对 Gus 阳性芽百分率的影响进行了较详细的研究,并对所得 Gus 阳性无性系进行了分子检测,最终得到了携带柑桔衰退病病毒外壳蛋白基因的转化植株,转化率达 20%。目前国内外尚未有衰退病病毒外壳蛋白基因转入枳壳的公开报道,因而本研究的出现正好填补了这方面的空白,并为柑桔衰退病病毒外壳蛋白基因向其它品种的转移研究工作的开展打下了基础,因而具有一定的理论与实际意义。

## 参考文献:

- [1] 孙敬三主编.植物细胞工程手册[M].北京:中国科学技术出版社,1995.297~298
- [2] 傅荣昭,孙勇如,贾士荣主编.植物遗传转化技术手册[M].北京:中国科学技术出版社,1994.168~170
- [3] Kobayashi S, Hirofumi U, Akitsu B, *et al.* Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* (L.) protoplasts by direct DNA transfer[J]. *Jpn J Genet.* 1989, **64**:91~97
- [4] Leandro P, Magdalena C, Jose J, *et al.* *Agrobacterium*-mediated of sweet orange and regeneration plant[J]. *Plant Cell Reports.* 1995
- [5] Moore GA, Jacobo CC, Neidigh L, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus* stem segment and regeneration of transgenic plants[J]. *Plant Cell Reports.* 1992, **11**:238~242
- [6] Nishiyoshi S, Akiko Touzla K, Jun N, *et al.* Control of expression of *Agrobacterium* vir genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990, **9**: 6681~6688