

农杆菌介导红江橙遗传转化的研究初报

贺 红¹, 韩美丽², 李耿光³

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东广州 510405; 2. 广西林业科学院, 广西南宁 530001;

3. 中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650)

摘 要: 用红江橙实生苗的上胚轴为材料, 初步研究以根癌农杆菌介导的 GUS 基因转化。结果表明: 以卡那霉素作为选择试剂进行选择培养时, Km 浓度为 50 mg/L; 外植体以平放为好; 抑菌剂选择头孢霉素较好。GUS 基因瞬时表达检测, 70.4% 的外植体呈阳性反应; GUS 基因稳定表达检测, 在获得的 12 株抗性植株中, GUS 反应呈阳性所占比例为 16.7%。

关键词: 红江橙; 农杆菌; 遗传转化

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)03-0256-03

Preliminary study on the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Citrus sinensis* Osbeck cv. *Hongjiang*

HE Hong¹, HAN Mei-li², LI Geng-guang³

(1. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405,

China; 2. Forestry Academia of Guangxi, Nanning 530001, China; 3. South China Institute of Botany,

Academy Sinica, Guangzhou 510650, China)

Abstract: The transformation of GUS gene by *Agrobacterium*-mediated was studied. The explants used for transformation were the epicotyls from *Citrus sinensis* Osbeck cv. *Hongjiang*. The results indicated that the concentration of kanamycin used as the reagent of selection was 50 mg/L; when the explants were cultured on the selection medium, they placed horizontally better than they oriented with their apical ends protruding from the medium. Cefotaxime used as antibiotics was better than carbenicillin. Histochemical GUS assay showed that 70.4% of the explants had the transient expression of GUS gene and 16.7% of the 12 resistant plants were GUS-positive.

Key words: *Citrus sinensis* Osbeck cv. *Hongjiang*; *Agrobacterium*; genetic transformation

红江橙是华南地区推广的优良柑桔品种, 其果实外形美观, 风味独特, 深受国内外消费者的欢迎, 然而由于它是橙与桔的嫁接嵌合体, 性状不稳定, 同时在抗病性方面也有待改良, 传统的育种办法很

难从根本上解决问题。近年来, 基因转移改良柑桔农艺性状的技术, 为柑桔育种开辟了一条新途径。前人在同科植物枳橙、甜橙、贡柑及枳壳方面已做了部分工作^[1~5], 但对于红江橙的遗传转化, 尚未见

报道。本试验以红江橙上胚轴为材料,初步研究了 GUS 基因对红江橙的转化过程,为建立高效的转化系统,导入有价值的目的基因,获得具有预期性状的优良品种创造条件。

1 材料与方法

1.1 植物材料

红江橙种子经表面消毒培养无菌苗,当苗长至一定大小时,采取上胚轴切成约 1 cm 长的小段作转化的外植体。

1.2 离体再生培养

分 3 步进行:①上胚轴切段诱导芽分化;②芽伸长;③芽生根。在 MT+BA 1 mg/L 培养基上诱导出芽后,转入芽伸长培养基 MT+GA₃ 1 mg/L,待芽长到 2~3 cm 时,置于生根培养基 MT+NAA 0.5~1 mg/L 诱导生根。

1.3 细菌菌株及培养

农杆菌菌株为 EHA101,含有质粒载体 pGA482GG,质粒上插入了 GUS 及 NPT II 基因。菌株在含 50 mg/L 卡那霉素的 YEP 培养基上繁殖保存,感染前,在 YEP 液体培养基中,28 ℃ 振荡 20~25 h,达到菌对数生长期,培养物即可用于感染。

1.4 外植体的转化

将红江橙上胚轴切段浸入到准备好的菌液中 20 min,随后转到无菌滤纸上以吸掉多余的菌液,将外植体接种于 MT 培养基上共培养 3 d 后,再转到含卡那霉素(Kanamycin,Km)50 mg/L 和头孢霉素(Cefotaxime,Cx)300 mg/L 的选择培养基上,诱导抗性芽的产生。

1.5 组织化学法检测 GUS 活性

GUS 组织化学染色法参见《植物遗传转化技术手册》^[6]。

2 结果与分析

2.1 选择培养基中卡那霉素浓度的确定

本试验观察了不同浓度的卡那霉素对红江橙上胚轴出芽的影响,外植体在培养基中的放置方式分两种:平放、竖放(以形态学下端朝下垂直插入),1 个月后统计结果(表 1)。在无 Km 的对照中,出芽率较高;Km 处理中,平放时,Km 25 mg/L,仅个别外植体有芽形成,当 Km 增加至 50 mg/L 以上时,

所有外植体均无芽形成,逐渐变白。外植体竖放时,Km 50 mg/L 时,仍有 57.1% 的出芽率,随着 Km 浓度的升高,白芽数增加,Km 升至 125 mg/L 时,仍有部分出芽。说明竖放外植体,对 Km 的抗性增加,这可能因为竖放时,外植体只一端接触培养基;而平放时,外植体与培养基充分接触,低浓度的 Km 就表现强的抑制作用。因此转化试验,外植体选择培养以平放为好,以 Km 50 mg/L 作为常用的选择水平。

表 1 不同浓度卡那霉素对出芽的影响
Table 1 Effect of kanamycin concentration on shoot formation

外植体放置方式 Explant orientation	卡那霉素浓度 Km concentration (mg/L)	出芽率(%) Frequency of shoot formation
水平放置 Horizontal	0	64.0
	25	2.0
	50	0
	75	0
形态学下端下插 Apical end of the segment protruding	0	96.3
	50	57.1
	100	47.4
	125	19.0

2.2 羧苄青霉素和头孢霉素对芽分化的影响

在用农杆菌转化植物细胞时,常用羧苄青霉素和头孢霉素抑制农杆菌的生长。试验结果表明,两种抗菌素在浓度为 500 mg/L 时,对外植体出芽均无明显影响。抑菌试验中,300 mg/L 的头孢霉素能完全抑制农杆菌的生长,而相同浓度的羧苄青霉素杀菌效果不太好,农杆菌仍少量生长。因此,红江橙转化试验中,抗菌素采用头孢霉素较好,浓度为 300 mg/L。

2.3 农杆菌感染和抗性植株再生

外植体与农杆菌共培养后,在选择培养基上进行培养(图版 I:1),出芽过程大大延缓,1 个多月后才可看到抗性芽的产生(图版 I:2)。从表 2 可以看出,未经感染的外植体(对照),在选择培养基上未分化出芽,经感染的外植体,分化频率仅 2.5%。随后,每过两周更换一次培养基,随着选择次数增加,部分再生芽变白,死亡。待芽长至 2 cm 左右,从外植体上切下插入生根培养基。用上述方法,最终获得 12 株红江橙抗性植株。

2.4 GUS 基因表达检测

外植体与农杆菌共培养 3 d 后,进行 GUS 基因瞬时表达活性的检测,取部分外植体进行 GUS 检

测,发现 70.4%的外植体,在切口处细胞中可测到 GUS 活性,显蓝色(图版 I : 3)。

转化处理获得的抗性植株生长 5 个月后,进行 GUS 基因稳定表达活性的检测,结果表明:经组织化学染色,12 株抗性植株中,2 株呈阳性,10 株呈阴性,占 16.7%(图版 I : 4)。

表 2 农杆菌感染的外植体再生芽情况
Table 2 Induction of shoot from epicotyl explants infected by *Agrobacterium tumefaciens*

外植体数 No. of explants	产生绿芽外植体数 No. of explants with green shoots	转化再生频率 Frequency of shoot regeneration(%)
对照 Control 152	0	0
处理 Treated 804	20	2.5

3 讨 论

目前植物基因工程发展中,基因型的依赖性被公认为是主要限制因子之一。本试验在红江橙的转化研究中,外植体抗性芽再生频率仅 2.5%;GUS 基因稳定表达检测中,在获得的 12 株抗性植株中,GUS 反应呈阳性所占比例只为 16.7%。采用同样的方法,我们用农杆菌感染枳壳,获得了较高的感染效率,外植体抗性芽发生率为 14.2%,其中 GUS 反应呈阳性所占比例为 70.0%^[5]。说明农杆菌介导的转化技术在较大程度上受到农杆菌宿主专一性的限制。

在用农杆菌转化植物细胞时,常用羧苄青霉素和头孢霉素抑制农杆菌过量生长。程振东等^[7]在用根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化中,发现两者除了抑制农杆菌的生长外,还影响植物的生长发育,头孢霉素易于引起伤口细胞褐化死亡,抑制芽的分

化;而羧苄青霉素则促进芽分化,抑制生根,因此他们认为,在转化过程的不同阶段最好用不同的抗菌素作抑菌剂;诱导茎芽分化时羧苄青霉素较好,诱导生根时头孢霉素较好。而我们在红江橙转化中并没有出现类似的结果,头孢霉素不仅杀菌效果好,而且对芽的形成无不良作用,说明抗菌素应用于不同植物类型,对生长发育可能有不同的影响。

参考文献:

[1] 李耿光, Chen R, 贺 红, 等. 农杆菌介导几丁质酶基因转化的柑桔植株[J]. 中国学术期刊文摘(科技快报), 1999, 5(7): 940—942.

[2] 高 峰. 甜橙不定芽的高频率诱导及其离体遗传转化[A]. 园艺作物品种国际学术讨论会论文集[C]. 北京: 中国农业出版社, 1993. 31—33.

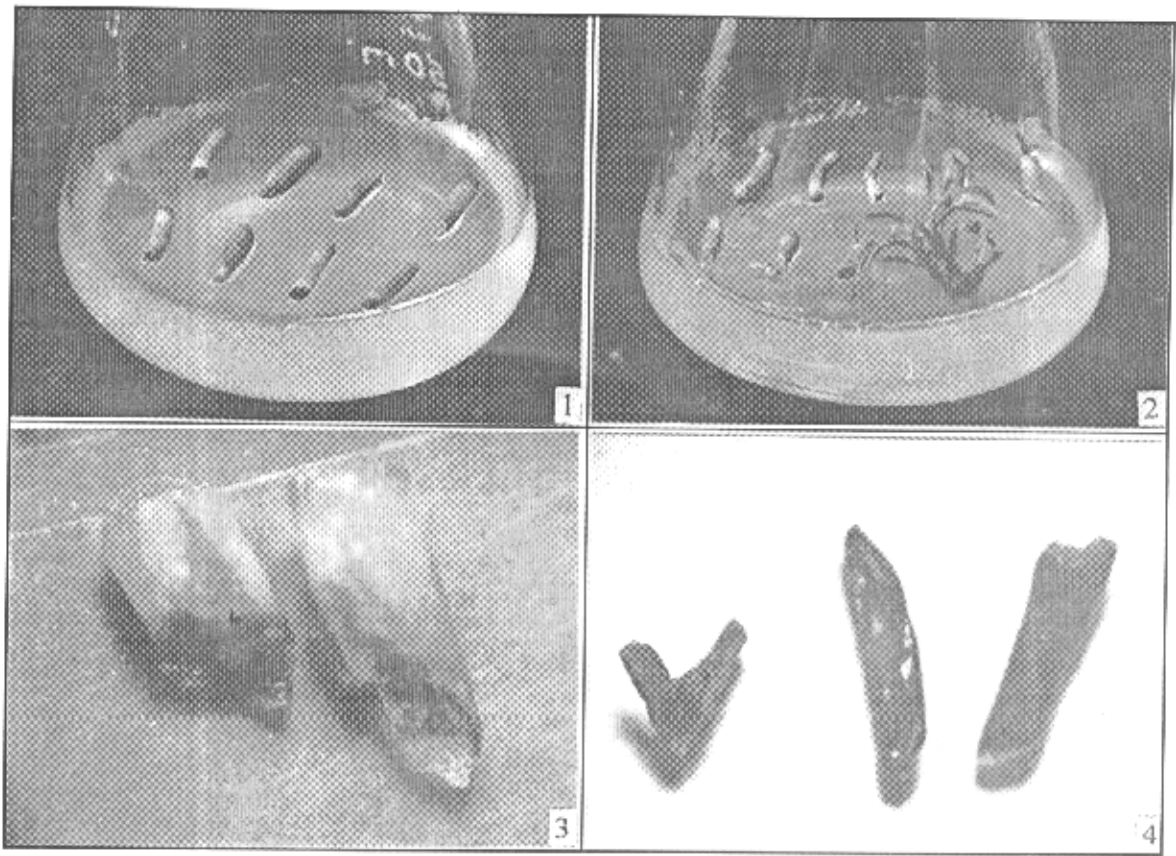
[3] Pena L, Cervera M, Juarez J, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of Sweet Orange and Regeneration of Transgenic Plants[J]. *Plant Cell Report*, 1995, 14: 616—619.

[4] 余焰华, 郭惠珊, 邹韵霞, 等. 外源基因导入贡柑体胚及其人工种子构建的初步研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1992, 3(1): 79—85.

[5] 贺 红, 潘瑞炽, 韩美丽, 等. 枳壳外植体离体再生及农杆菌介导的遗传转化[J]. 云南植物研究, 1998, 20(4): 459—463.

[6] 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣, 等. 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.

[7] 程振东, 卫志明, 许智宏. 根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化及转基因植株的再生[J]. 植物学报, 1994, 36(9): 657—663.



1-经农杆菌感染的红江橙上胚轴；2-在选择培养基上获得的抗性芽；3-GUS 基因在被感染的上胚轴中的瞬时表达；4-GUS 基因在抗性芽及抗性植株叶片和茎段中的稳定表达。
1-Epicotyls of *Citrus sinensis* Osbeck cv *Hongjiang* to *Agrobacterium* infection；2-Putatively transformed shoots on selection medium；3-Transient expression of GUS gene in the infected epicotyls；4-Stable expression of GUS gene in the shoot, leaf and stem segments from resistant plant.

作者：[贺红](#)，[韩美丽](#)，[李耿光](#)
作者单位：[贺红\(广州中医药大学中药学院, 广东广州, 510405\)](#)，[韩美丽\(广西林业科学院, 广西南宁, 530001\)](#)，[李耿光\(中国科学院华南植物研究所, 广东广州, 510650\)](#)
刊名：[广西植物](#)[ISTIC](#)[PKU](#)
英文刊名：[GUIHAIA](#)
年，卷(期)：2002, 22(3)
被引用次数：4次

参考文献(7条)

1. [李耿光;Chen R;贺红](#) 农杆菌介导几丁质酶基因转化的柑桔植株 1999(07)
2. [高峰](#) 甜橙不定芽的高频率诱导及其离体遗传转化 1993
3. [Pena L;Cervera M;Juarez J](#) Agrobacterium-mediated transformation of Sweet Orange and Regeneration of Transgenic Plants 1995
4. [余焰华;郭惠珊;邹韵霞](#) 外源基因导入贡柑体胚及其人工种子构建的初步研究 1992(01)
5. [贺红](#) 枳壳外植体离体再生及农杆菌介导的遗传转化[期刊论文]-[云南植物研究](#) 1998(4)
6. [傅荣昭;孙勇如;贾士荣](#) 植物遗传转化技术手册 1994
7. [程振东;卫志明;许智宏](#) 根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化及转基因植株的再生 1994(09)

引证文献(4条)

1. [彭爱红, 曹立, 许兰珍, 邹修平, 雷天刚, 何永睿, 姚利晓, 陈善春](#) 短童期柑桔资源“早花枳”遗传转化技术体系的建立[期刊论文]-[中国南方果树](#) 2014(03)
2. [理莎莎](#) 红果肉中华猕猴桃实生苗遗传转化体系建立的研究[学位论文]硕士 2008
3. [牙祖韧](#) 厚荚相思离体培养及农杆菌介导遗传转化技术的研究[学位论文]硕士 2007
4. [盖照](#) 红江橙嵌合体及其衍生材料的遗传背景分析[学位论文]硕士 2008

引用本文格式：[贺红, 韩美丽, 李耿光](#) 农杆菌介导红江橙遗传转化的研究初报[期刊论文]-[广西植物](#) 2002(3)