

农杆菌介导的抗菌肽 A 基因转入 沙田柚影响因素研究

韩美丽¹, 陆荣生¹, 吴耀军², 杜晓莉¹

(1. 广西农业科学院 植物保护研究所, 广西南宁 530007; 2. 广西林业科学院, 广西南宁 530001)

摘要: 以沙田柚上胚轴为对象, 进行了农杆菌介导的抗菌肽 shivaA 基因转入沙田柚影响因素研究。研究表明: 转化中抑菌抗菌素以羧苄青霉素为首选, 最佳转化条件为: 菌液稀释至 OD₆₀₀ 0.5, 浸泡时间 10 min, 共培养 3 d, 卡那霉素起始选择浓度 50 μg/mL。农杆菌再悬浮液与共培养基中加入 150 μmol/L 阿魏酸可提高转化频率。PCR 与 Southern 杂交证明, 外源基因已转入沙田柚基因组中。

关键词: 农杆菌; 沙田柚; 转化

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)05-0479-04

Studies on factors influencing ShivaA gene transformation mediated by *Agrobacterium* in *Citrus grandis* Osbeck cv. Shatianyu

HAN Mei-li¹, LU Rong-sheng¹, WU Yao-jun², DU Xiao-li¹

(1. Institute of Plant Protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; 2. Guangxi Forestry Research Institute, Nanning 530001, China)

Abstract: Transformation and regeneration of *Citrus grandis* plants were studied by *Agrobacterium*-mediated. Transgenic plants with ShivaA gene had been obtained. The carbenicillin was better to control *Agrobacterium* growing after explants were infected. Epicotyls fragment were infecting for 10 min as OD₆₀₀ of *Agrobacterium* suspending liquid is 0.5. Epicotyls fragment were co-cultured with *Agrobacterium* for 3 days. The transformation frequency of explants was promoted when 150 μmol/L ferulic acid was added in *Agrobacterium* suspension liquid & co-culture medium. It was useful for anti-Kan positive shoot producing when initial concentration of kanamycin was 50 μg/mL. Foreign gene is proved going to *C. grandis* by PCR & Southern blot detective.

Key words: *Agrobacterium*; *C. grandis* Osbeck cv. Shatianyu; transformation

沙田柚是我国主要栽培柑桔品种之一, 近年来随着种植面积不断扩大, 生产上对其品质与抗病能力的要求也不断提高。由于沙田柚为多年生木本植

物, 常规方法进行新品种培育时间长, 难度大。遗传转化技术的出现为沙田柚新品种培育研究提供了新方法。常用的遗传转化方法主要有生物法、物理法、

收稿日期: 2005-05-23 修回日期: 2005-12-08

基金项目: 国家科技攻关项目(国攻 2000-D073); 广西科技攻关项目(桂科攻 0014002); 广西农科院科技发展基金(2003002) [Supported by National Key Technologies Research and Development Program of China(2000-D073); Key Technologies Research and Development Program of Guangxi (0014002); Development Foundation for Science and Technology of Guangxi Academy of Agricultural Sciences (2003002)]

作者简介: 韩美丽(1963-), 女, 陕西铜州市人, 高级工程师, 博士, 从事生物技术研究, (E-mail) lurong@public.nn.gx.cn.

化学法,在这3种方法中,以农杆菌介导的转化方法应用最为广泛,所取得的转基因植株最多(闫新甫,2003;贾士荣等,1996)。抗菌肽是一种小分子蛋白质,具有较强的抗菌活性,体外试验表明其对细菌性病害有较好的抑制作用,已有抗菌肽基因转入马铃薯、大白菜等作物的报道(方宏筠等,1999;邵志芳等,2003;陈善春等,1997)。柑桔遗传转化研究起始较晚,国内外已有多起柑桔属植物转基因成功的报道,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很少(Pena等,1997;Rogers等,1985;Kaneyoshi等,1994),尚未见抗菌肽 shivaA 基因转入沙田柚的公开报道。本研究以沙田柚上胚轴为对象,抗菌肽 shivaA 基因为目的基因,农杆菌为载体,进行了遗传转化研究,成功地将抗菌肽 shivaA 基因转入了沙田柚,进一步的应用正在研究。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

取收集的沙田柚 (*Citrus grandis* (L) Osbeck cv. Shatianyu) 种子,经常规方法消毒,播种于 1/2 MS 固体培养基中,25~30℃ 黑暗下萌发待用。

1.2 农杆菌菌株与培养

农杆菌菌株为 LBA4404,含双质粒表达载体 pTYB1(由美国麻萨诸塞州大学遗传实验室提供)。载体 pTYB1 上插有 35s 启动子驱动的抗菌肽 shivaA 基因及筛选标记基因新霉素磷酸转移酶基因(NPT-II),shivaA 基因全长 186 bp。该质粒图谱如图 1。

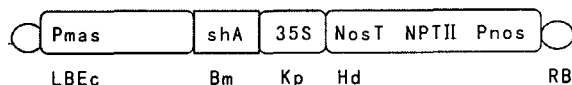


图 1 质粒 pTYB1 图谱

Fig. 1 Schematic representation of the pTYB1

农杆菌固体平板培养基为 LB 附加卡那霉素 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$,四环素 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。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($\text{OD}_{600} = 0.8 \sim 1.0$),然后 3 000 r/min 离心 10 min,除去上清液,再用悬浮液悬浮待用。

1.3 转化方法

将实生苗上胚轴切 0.5 cm 长片段,在农杆菌悬浮液中浸泡 10~15 min,滤纸吸去多余的菌液,放置培养基上,26~28℃ 黑暗下共培养 2~3 d,转至选

择培养基上选择培养。

转化中所用悬浮培养液、共培养基、分化培养基的基本成分均为 MT,上胚轴分化选择培养基附加成分为 BA 2.0 mg/L+Km 70 mg/L+Car 300~500 mg/L,生根培养基附加 NAA 0.5 mg/L,Km 70 mg/L。培养过程均在 26~28℃ 光照下进行,光照强度 1 400 lx,光照时间 12 h/d。

1.4 测定方法

转化频率(%)测定:上胚轴在分化选择培养基上连续选择 60 d,所获得的具卡那抗性芽的外植体占感染总外植体的百分率。

植物 DNA 及质粒 DNA 提取分别采用 SDS 法、碱裂解法。

PCR 测定:PCR 反应采用 25 μL 反应体系。反应体系中含:植物 DNA 20 ng,dNTPS 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$,Primer1 与 Primer 2 各 0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$,TaqDNA 酶 1 单位,10 \times PCR 缓冲液。样品 DNA 先 94℃ 变性 6 min,然后经 94℃ 1 min、56℃ 1 min 30 s、72℃ 1 min 30 s 共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 8 min。扩增产物在 1.6% 琼脂糖凝胶上电泳,并在紫外透射仪上分析结果。引物 Primer1:5'-3' TAT TTT TAC AAT TAC AAA CAA CAA Primer 2:5'-3' GGT GTG GCT AGG ACT GAT GGA GTG。预期扩增长度为 186bp。

Southern blot 杂交采用 Dig 成套试剂盒试剂及反应条件。植物 DNA 经 *Bam*H I 及 *Hind*III 酶切消化后,4℃ 下,0.8% 琼脂糖上电泳 12 h,经变性,转移至硝酸纤维素膜上。烘干膜后进行预杂交、杂交及显色。杂交带预期位点为 536 bp。

2 结果与讨论

2.1 不同种类、浓度抗菌素对沙田柚上胚轴不定芽发生率影响研究

转化选择中需加入抗菌素以抑制农杆菌生长,抗菌素在抑制农杆菌生长的同时,对外植体不定芽形成也会产生一定影响(Lin 等,1995)。因此,确定抗菌素的使用种类、浓度对转化研究的开展很有必要,我们选择了羧苄青霉素、头孢噻肟钠、头孢曲松钠进行了试验,结果见表 1。

从结果看出,不同浓度羧苄青霉素、头孢噻肟钠、头孢曲松钠对沙田柚上胚轴不定芽形成影响不同。羧苄青霉素在所用浓度范围内的加入对外植体

不定芽发生率无明显影响。头孢噻肟钠加入在浓度 500 mg/L 以下时,对不定芽发生率无影响,当加入量达 600 mg/L 时,上胚轴不定芽发生率有明显的下降,且少量外植体发黄。头孢曲松钠浓度在 200~300 mg/L 时,不定芽发生率无变化,400~600 mg/L 时,不定芽发生率明显下降。

综上,沙田柚转化以羧苄青霉素为首选、头孢噻肟钠次之,头孢曲松钠不宜采用。

2.2 菌液浸泡浓度与时间对转化频率的影响

一定密度农杆菌充分附着于外植体伤口表面是转化成功的必要条件,为了达到这一目的,外植体感染时合适的菌液浓度与浸泡时间尤为重要。植物伤口处细胞对农杆菌较为敏感,浸泡时间过长,会导致外植体褐化死亡,难以得到抗性芽;浸泡时间过短,

农杆菌不能充分地附着于表面,转化频率受到影响。

从表 2 可看出,沙田柚上胚轴转化频率高低与农杆菌菌液稀释浓度与浸泡时间有明显关系。菌液 OD₆₀₀ 值为 0.1 时,各处理均无转化芽出现;OD₆₀₀ 值为 0.3 时,浸泡 5、10 min 的二个处理无转化发生,浸泡 20 min 的处理转化频率达 2.0%;OD₆₀₀ 值为 0.5 时,浸泡 10 min,转化频率可达 11.0%,浸泡时间延长至 20 min 时,转化率下降,且外植体有死亡发生;OD₆₀₀ 值为 0.7 时,浸泡时间 5 min 时,转化频率达 6.2%,浸泡时间 10~20 min,无转化发生,且 15、20 min 二个处理外植体上农杆菌附着过多,移入抑菌培养基后一个星期,因细菌难于控制,全部腐烂死亡。因此,最适稀释浓度以 OD₆₀₀ 0.5、浸泡时间 10 min 为宜。

表 1 不同浓度抗菌素对沙田柚上胚轴不定芽发生率的影响

Table 1 Effect of antibiotics on adventitious shoot formation of epicotyls

项目 Items	对照 CK	抗生素 Concentration of antibiotics(mg/L)														
		头孢噻肟钠 Ecfotaxime sodium					羧苄青霉素 Carbenicillin					头孢曲松钠 Ceftriaxone sodium				
		200	300	400	500	600	200	300	400	500	600	200	300	400	500	600
外植体数(个)No. of explants	100	110	120	120	105	110	100	110	115	120	117	114	121	109	104	105
不定芽发生率 Rate of adventitious shoot formation (%)	93.8	94.2	93.3	92.7	92.0	79.3	93.3	94.7	94.0	93.3	91.9	92.6	91.7	84.2	74.4	52.7

表 2 菌液浸泡浓度与时间对转化频率的影响

Table 2 Effect of bacterial density & infection time on transformation frequency

菌液浓度 Bacterial density (OD ₆₀₀)	0.1				0.3				0.5				0.7			
侵染时间 Infection time (min)	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20
转化频率 Transformation frequency (%)	0	0	0	0	0	0	1.1	2.0	1.7	11.0	8.9	5.8	6.2	0	0	0

各处理外植体数均为 300。 No. of explants per treatment is 300.

表 3 酚类化合物种类、浓度对外植体抗性芽产生的影响

Table 3 Effect of phenolic compounds on frequency of Kmr shoot

酚类化合物浓度 Concentration (μmol/L)	转化频率 Transformation frequency (%)			
	乙酰丁香酮 As	邻苯二酚 o-Dihydroxybenzene	阿魏酸 Trans-ferulic acid	羟基苯甲酸 p-Hydroxybenzoic acid
0	3.1	3.0	3.0	3.1
50	7.8	3.4	8.8	4.4
100	11.1	3.6	12.1	5.8
150	9.7	3.6	13.6	7.9
200	6.1	4.1	11.7	6.2
250	1.1	2.3	6.1	1.5

各处理外植体数为 350。 No. of explants per treatment is 350.

2.3 酚类化合物种类、浓度对外植体抗性芽产生的影响

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,不同植物所需的作用浓度有较大的差异(Sangwan 等, 1993)。我们在农杆菌菌液感染液与共培养基中添加了乙酰丁香酮、阿魏酸、邻苯二酚、羟基苯甲酸 4 种酚类化合物,以研究酚类化合物对沙田柚转化的影响,结果见表 3。

从结果可看出,酚类化合物种类对转化的影响差别较大,对转化频率的促进作用大小依次为阿魏酸、乙酰丁香酮、邻苯二酚与羟基苯甲酸。阿魏酸最适浓度为 150 μmol/L,转化频率达 13.6%,

乙酰丁香酮最适浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, 转化频率达 11.1%。

2.4 卡那霉素(Km)起始浓度高低对沙田柚上胚轴抗性芽产生率的影响

转化选择过程中, 选择剂起始浓度过高, 转化细胞抗性基因尚未充分表达, 易于在选择过程中大量死亡, 降低转化率; 起始浓度过低, 未转化的细胞有可能未经选择剂破坏而发生“逃避”现象, 导致假转化体的大量发生。我们在选择的最初 7 d 对 Km 浓度做了不同程度的降低, 7 d 后均移入 Km 70 mg/L 的选择培养基上, 持续选择至 60 d, 以研究 Km 起始

浓度高低对转化频率的影响。

从结果看出, 感染后 30 d 抗性芽发生率高与 Km 起始浓度成反比, 浓度越高, 抗性芽获得率越低。随着选择时间的延长, 各处理的抗性芽数量发生变化。至感染后 60 d, 各处理抗性芽发生率均有不同程度下降。Km 起始浓度较低的处理抗性芽下降率高于其它处理。Km 起始浓度为 0 时, 感染后 60 d 抗性芽发生率只有 0.5%, 比感染后 30 d 下降 36.3%; 起始浓度 50 mg/L 的处理, 下降率只有 11.0%, 抗性芽所占比例高于 CK。因此, Km 起始浓度以 50 mg/L 为宜, 过低则假抗性芽太多, 会给

表 4 起始卡那霉素浓度对抗性芽产生率的影响

Table 4 Effect of initial concentration of kanmycin on frequency of Kmr shoot

卡那霉素浓度 Concentration of Km (mg/L)	0	30	40	50	60	70(CK)	80
外植体数(个)No. of explants	350	320	330	345	350	350	365
感染后 30 d 抗性芽发生百分率 (%) Rate of explants with Kmr shoot after culturing 30 days	38.0	28.1	23.9	21.4	17.4	14.8	8.5
感染后 60 d 抗性芽发生百分率取 (%) Rate of explants with Kmr shoot after culturing 60 days	0.5	2.5	4.8	10.4	10.3	8.0	3.3

以后的进一步抗性鉴定带来不必要的麻烦。

2.5 Km 对无菌苗生根的影响与抗性植株的初步鉴定

Km 对植物生根有抑制作用(王关林等, 1998), 利用这一特点, 在生根培养基中加入不同浓度的 Km, 以确定无菌苗生根对 Km 的敏感浓度。在此基础上, 对所得的抗性芽作进一步的选择, 结果见表 5。

从表 5 可看出, 生根培养基中添加不同浓度 Km 时, 无菌苗生根受到影响, 当 Km 浓度为 70 mg/L 时, 生根被完全抑制, 即使再移入无 Km 的生根培养基也不再有根产生, 最后植株发黄、死亡。因此 Km 70 mg/L 为沙田柚抗性无性系生根选择浓度。

切取所获得的沙田柚抗性苗, 培养于含 Km 70 mg/L 的生根选择培养基上, 生根率达 78.4%, 对照则为 0, 可以基本认定在生根选择培养基上正常生根的抗性苗为转化植株。

表 5 卡那霉素对无菌苗生根的影响

Table 5 Effect of kanmycin on seedling rooting

卡那霉素浓度 (mg/L) Concentration of Km	0	50	70	100	120
外植体数 No. of explants	120	135	110	100	100
生根率 Frequency of rooting (%)	82.5	11.4	0	0	0

2.6 转基因无性系的 PCR 与 Southern Blot 结果分析

从所得的生根抗性苗中, 随机选择 7 株进行

PCR 检测, 有 5 株在所扩增的条件下, 在 186 bp 位置扩增出一条可分辨的 DNA 带, 对照则无。

将这 5 个 PCR 阳性植株进一步进行 Southern 杂交分析, 在预期的 536 bp 位置出现杂交带。证实基因已完全转入, 并整合到植物基因组中。进一步的抗病试验仍在进行之中。

参考文献:

- 王关林, 方宏筠. 1998. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社: 226-223.
- 闫新甫. 2003. 转基因植物[M]. 北京: 科学出版社: 36-47.
- 贾士荣, 屈贤铭. 1996. 马铃薯抗菌肽基因工程[M]. 北京: 中国农业科技出版社: 14-31.
- Chen SC(陈善春), Zhang JR(张进仁), Huang ZR(黄自然), et al. 1997. Studies on *Agrobacterium*-mediated ntbacterial peptide D gene transfer in Citrus[J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), 30(3): 7-13.
- Fang HJ(方宏筠), Wang GL(王关林), Wang HX(王火旭), et al. 1999. Pathogen-resistant transgenic plant from dwarfing rootstock of cherry by introducing antibacterial polypeptide genes (抗菌肽基因转化樱桃矮化砧木获得抗根瘤病的转基因植株)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 41(11): 1192-1198.
- Kaneyoshi J, Kobayashi K, Nakamura, et al. 1994. A simple and efficient gene transfer system of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* Raf)[J]. *Plant Cell Reports*, 13: 514-545.
- Lin J J, Assadd-Garcis N, KUO J. 1995. Plant hormone effect (下转第 575 页 Continue on page 575)

表 1 *H. patula* 和 *P. libanotica* 和杂种 F₁ 花粉母细胞减数分裂中期 I 染色体配对
Table 1 Chromosome pairing at M I of PMCs in *H. patula*, *P. libanotica* and their F₁ hybrids

亲本和杂 交组合 Parent and combination	染色体数目 Chromosome No. (2n)	材料编号 Material No.	观察细胞数 No. of cells observed	染色体配对 Chromosome pairing				平均每细 胞交叉数 Chiasmata per cell	C-值 C-value
				I	II				
					总和 Total	环状 Rings	棒状 Rods		
<i>H. patula</i>	28	PI372546	57	0.18 (0~2)	13.91 (13~14)	12.91 (10~14)	1.00 (0~3)	26.82 (23~28)	0.96 —
<i>P. libanotica</i>	14	PI228391	50	0.21 (0~2)	6.89 (6~7)	6.68 (5~7)	0.21 (0~1)	13.57 (11~14)	0.97 —
<i>H. patula</i> × <i>P. libanotica</i>	21	PI372546 × PI228391	50	6.08 (1~13)	7.48 (4~10)	2.24 (0~5)	5.24 (2~8)	9.72 (5~14)	0.69 —

与 *P. libanotica* 同源, 即 *H. patula* 含有 *P. libanotica* 的 St 染色体组。

参考文献:

- Baden C, Frederiksen S, Seberg O. 1997. A taxonomic revision of the genus *Hystrix* (Triticeae, Poaceae)[J]. *Nord J Bot*, 17(5): 449—467.
- Church G L. 1967. Taxonomic and genetic relationships of eastern north American species of *Elymus* with setaceous glumes[J]. *Rhodora*, 69: 121—162.
- Dewey D R. 1982. Genomic and phylogenetic relationships among North American perennial Triticeae. In: Estes J R, Tyrl R J, Brunken J N(eds). *Grass and Grasslands: Systematics and Ecology*[M]. Norman: University of Oklahoma Press: 51—88.
- Dewey D R. 1984. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae. In: Gustafson J P(ed). *Gene Manipulation in Plant Improvement*[M]. New York: Plenum Press: 230—280.
- Jensen K B, Wang R R-C. 1997. Cytological and molecular evidence for transferring *Elymus coreanus* from the genus *Elymus* to *Leymus* and molecular evidence for *Elymus californicus* (Poaceae; Triticeae)[J]. *Int J Plant Sci*, 158(6): 872—877.
- Kimber G, Alonso L G. 1981. The analysis of meiosis in hybrids III tetraploid hybrids[J]. *Canad J Genet Cytol*, 23: 235—254.
- Löve Å. 1984. Conspectus of the Triticeae[J]. *Feddes Repert*, 95(4): 425—521.
- Moench C. 1794. Methodus plantarum horti botanici et agri marburgensis a staminum situ describendi[J]. *Margburgi Catorum*: 209—280.
- Wang R R-C. 1992. Genome relationship in the perennial Triticeae based on diploid hybrids and beyond[J]. *Hereditas*, 116: 133—136.
- Zhang HQ(张海琴), Zhou YH(周永红), Zheng YL(郑有良), et al. 2002. Morphology and cytology of intergeneric hybrids between *Hystrix duthiei* ssp. *longearistata* and *Pseudoroegneria huashanica* (Poaceae; Triticeae) (长芒猬草与华山新麦草属间杂种的形态学和细胞学研究)[J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), 40(5): 421—426.
- Zhou YH(周永红), Yang JL(杨俊良), Yan J(颜济), et al. 1999. Biosystematic studies on *Hystrix longearistata* from Japan and *Hystrix duthiei* from China (Poaceae; Triticeae) (小麦族下 *Hystrix longearistata* 和 *Hystrix duthiei* 的生物系统学研究)[J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), 37(4): 386—393.

(上接第 482 页 Continue from page 482)

- of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissue by *Agrobacterium tumefaciens* cells[J]. *Plant Sci*, 109: 171—177.
- Pena L,ervera M, Juarez J, et al. 1997. Genetic transformation of Lime; factors affecting transformation and regeneration [J]. *Plant Cell Reports*, 16: 731—737.
- Rogers S O, Bendich A T. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues[J]. *Plant Mol Biol*, 5: 69—77.
- Sangwan R S, Ducrocq C, Sangwan-Norreel B S. 1993. *Agrobacterium*-mediated transformation of pollen embryos in *Datura innoxia* and *Nicotiana tabacum*[J]. *Plant Sin*, 95: 99—115.
- Shao ZF(邵志芳), Chen WY(陈伟元), Luo HL(罗焕亮), et al. 2003. Studies on the introduction of the cecropin D gene into *Eucalyptus urophylla* to breed the resistant varieties to *Pseudomonas solanacearum* (柞蚕抗菌肽 D 基因转化桉树培育抗青枯病株系的研究)[J]. *Sci Silv Sin* (林业科学), 38(2): 92—97.