

提高埃及糖橙遗传转化效率的研究

胡威^{1,2}, 杨莉^{1,2}, 谢玉明^{1,2}, 周潇^{1,2}, 葛红娟^{1,2}, 李大志^{1,2}, 邓子牛^{1,2*}

(1.湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2.国家柑橘改良中心长沙分中心, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 为提高农杆菌介导的甜橙遗传转化效率, 以埃及糖橙实生苗上胚轴节间茎段为外植体, 对实生苗生长过程中的光照条件和农杆菌侵染时的共培养条件进行优化, 并将无核基因转入糖橙中。结果表明, 暗培养 20 d 后光照 10 d 实生苗外植体的再生率和转化率均较高; 乙酰丁香酮(AS)浓度是影响转化效率的主要因素, 共培养基中加入质量浓度 20 mg/L 的 AS、共培养温度控制在 19 ℃、共培养基 pH 为 5.4~5.7 时最有利于转化, 经 GUS 染色分析, 最高 GUS 阳性率可达 29.4%; 经 PCR 进一步分析, 可以初步确证外源基因已经整合到糖橙基因组中。

关 键 词: 埃及糖橙; 农杆菌介导; 遗传转化; 光照; 共培养

中图分类号: S571.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)04-0371-06

Further study on improving genetic transformation efficiency of succari orange

HU Wei^{1,2}, YANG Li^{1,2}, XIE Yu-ming^{1,2}, ZHOU Xiao^{1,2}, GE Hong-juan^{1,2}, LI Da-zhi^{1,2}, DENG Zi-niu^{1,2*}

(1.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.National Center of Citrus Improvement, Changsha Subcenter, Changsha 410128, China)

Abstract: To increase the genetic transformation efficiency of sweet orange infected by *Agrobacterium*, an explant derived from internode stem segments of succari orange seedling was adopted to optimize light regimes and co-cultivation condition for the growth. Meantime, seedless gene was transferred to succari orange. The results revealed that explant from seedling had higher regeneration and transformation rate under the condition of cultured 20 d in darkness first and then exposed 10 d in lighting environment. Acetosyringone (AS) concentration was a key factor impacting transformation rate, and the optimal performance of transformation was under 20 mg/L concentration of co-cultivated medium with a temperature 19 ℃ and pH 5.4–5.7. The positive rate could reach 29.4% through the analysis of GUS staining, which were further proved by PCR analysis that the foreign gene was indeed integrated into the host genome.

Key words: *Citrus sinensis* Osbeck cv. Succari; *Agrobacterium*-mediated; genetic transformation; light; co-cultivation

转基因技术是柑橘遗传改良的重要辅助手段。

提高甜橙转基因效率已成为近年研究的重点, 且多数报道以 GUS 阳性率和 PCR 阳性率作为衡量其转化效率的指标^[1-3]。因为 GUS 染色及 PCR 检测均存在假阳性, 所以实际的转化效率(成活的转基因苗/农杆菌侵染的外植体茎段)并不高, 大多在 5% 以下,

且品种间的差异很大。

提高甜橙转化效率的研究主要集中在对外植体基因型及外植体类型、共培养条件^[2]、不定芽的筛选条件^[3]等影响因素上。笔者所在实验室曾针对上述因素对湖南省内部分甜橙品种遗传转化效率的提高进行了研究, 确定了适宜的苗龄、侵染程序、

收稿日期: 2013-06-14

基金项目: 现代农业(柑橘)产业技术体系岗位科学家项目(CAR-27); 湖南省重点项目(2011WK2007); 国家自然科学基金青年基金项目(31201596)

作者简介: 胡威(1984—), 男, 湖北孝感人, 硕士, 主要从事柑橘遗传育种研究, tigerhw@gmail.com; *通信作者, deng7009@163.com

再生培养基及筛选条件^[4-6]。为进一步提高甜橙的遗传转化效率,笔者在上述研究^[4-6]的基础上,以湖南引进品种埃及糖橙(*Citrus sinensis* Osbeck cv. Succari)为试验材料,对外植体实生苗生长过程中的光照条件和共培养过程中的培养温度、培养基中乙酰丁香酮(AS)浓度、共培养基 pH 值等 4 个因素进行研究,以优化糖橙的遗传转化体系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

将埃及糖橙种子去外种皮后,在超净工作台上用 75% 的乙醇和 1% 的 NaClO 溶液消毒,将种胚播种于 MS 培养基上, (26±2) °C 培养。选择 30 d 苗

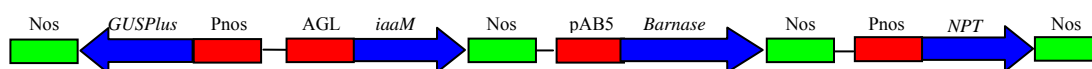


图 1 载体 C-D 的 T-DNA 区域

Fig.1 Diagram of T-DNA region of C-D vector

1.2 方法

1.2.1 外植体遗传转化条件的确定

在柑橘实生苗的遗传转化中,实生苗通常在黑暗条件下培养 20~60 d 后再进行 16 h/8 h 光暗培养^[7],因此,将本研究中糖橙实生苗生长过程中的光照模式设置为 4 种处理: T₁, 仅光照 30 d; T₂, 暗培养 20 d 后光照培养 10 d; T₃, 暗培养 20 d 后光照培养 10 d; T₄, 暗培养 30 d。采取 16 h/8 h 光暗周期培养方式。每处理重复 3 次。

农杆菌 *vir* 基因的诱导、T-DNA 的组装与转运通常在 AS 质量浓度 10~40 mg/L^[8]、温度 19~25 °C、pH 值 5.0~5.6 时的效率最高^[9],因此,在确定实生苗生长期的最佳光照模式后,针对转化过程中的共培养温度(19、22、25、28 °C)、共培养基 pH 值(4.8、5.1、5.4、5.7)、共培养基 AS 质量浓度(0、10、20、40 mg/L)进行 3 因素 4 水平正交试验,以 GUS 阳性率为考察指标,得出较佳的共培养条件。

1.2.2 不定芽再生培养条件

将未用农杆菌侵染的节间茎段放入 MS+3 mg/L 6-BA(灭菌前 pH 为 5.7)培养基中暗培养 3 d 后,转

龄的粗约 1.5~2.0 mm 的糖橙实生苗,将其上胚轴斜切成长约 1 cm 的节间茎段用于再生和遗传转化。

1.1.2 农杆菌菌株及载体

农杆菌 EHA105 包含载体 pCambia-Pnos-PNN-*iaaM*-*Barnase*(以下简称 C-D)。此载体由美国康涅狄格大学李义教授提供。载体 T-DNA 区段(图 1, 图片彩版见封三)中包含花粉特异启动子 pAB5 驱动的雄性不育基因 *Barnase* 和果实特异启动子 AGL5 驱动的色氨酸加氧酶基因 *iaaM*、标记基因 *NPTII*、报告基因 *GUSPlus*。*GUSPlus* 中插入了来自植物基因的内含子,使 *GUSPlus* 基因不能在农杆菌中表达。另外,由 Nos 启动子驱动基因只在植物的维管组织中表达。

移到 MS+1 mg/L 6-BA(灭菌前 pH 为 5.7)培养基中,温度(26±2) °C, 16 h/8 h 光暗周期下培养。

1.2.3 糖橙的遗传转化程序

将农杆菌用含 25 mg/L Rif 和 100 mg/L Kan 的 YEB 液体培养基 28 °C、200 r/min 摇至菌液 OD_{600 nm} 为 0.5~1.0, 室温 6 000 r/min 离心 15 min 后去上清液,用 MS+3 mg/L 6-BA+20 mg/L AS 液体培养基重悬,调整菌液 OD_{600 nm} 至 0.7。外植体经农杆菌液侵染 15 min 后转入共培养基中培养。在研究实生苗光照模式阶段所用的共培养基为 MS+3 mg/L 6-BA(灭菌前 pH 为 5.7);在研究共培养条件阶段则将外植体分别放入正交试验设计的各培养基中。共培养 3 d 后将外植体转入筛选培养基(MS+1 mg/L 6-BA+75 mg/L Kan+500 mg/L Cef, 灭菌前 pH 为 5.7)中,16 h/8 h 光暗周期培养,每 15 d 更换 1 次培养基。

1.2.4 组织化学法检测及 PCR 分子检测

对含 pBI121 载体和 C-D 载体的农杆菌进行 GUS 染色。取 0.8 mL 菌液室温 6 000 r/min 离心 15 min 后去上清液,用 GUS 染色液重悬菌体后,于 37 °C 恒温培养箱中处理 12 h。待抗性芽长出 2~3 片

完全展开叶后切取部分叶片和部分茎段,进行 GUS 染色。染色时将组织浸泡在染色液中,放入 37 °C 恒温培养箱中处理 12 h,之后用 75%的乙醇脱色,在体式显微镜下观察染色结果。

PCR 检测参照 Chen 等^[10]的方法,采用改良 CTAB 法提取 GUS 阳性植株和野生型的植株叶片总 DNA,以 C-D 质粒为对照,采用琼脂糖凝胶电泳方法将植物基因组 DNA 与质粒 DNA 分离,并回收植物基因组 DNA。以 500 ng 回收后的 DNA 为模板进行 PCR 检测。*GUSplus* 的检测引物为 pGUSP-F (5'-CCACTGAACACGTATCTCTACC-3')和 pGUSP-R (5'-GCCATCG AA GTACCATCC-3');另外一对引物正向和反向序列分别位于 pAB5 启动子和 *Barnase* 基因中,序列为 pP5Barn-F (5'-ACAGAAA AAGCCCATTGG-3')和 pP5Barn-R (5'-AGTCGCTT GAGTAAAGAATCC-3')。

1.2.5 数据统计及分析

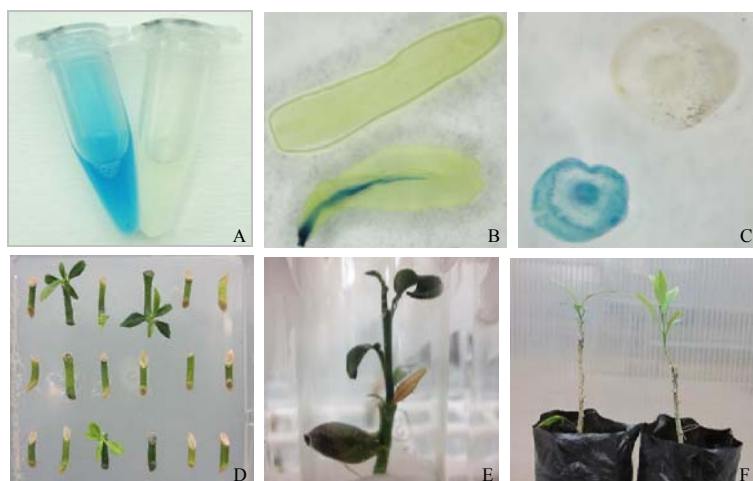
再生及遗传转化试验,均在外植体培养 45 d 后统计不定芽再生率(再生茎段数/总节间茎段数)、再生系数(不定芽总数/再生茎段数)和 GUS 阳性率(GUS 阳性芽总数/总节间茎段数)。计算芽总数时仅对茎高 0.5 cm 以上的芽进行统计。采用 SPSS 软件进行方差分析,用 Duncan's 新复极差法($P \leq 0.05$)对

差异显著的数据进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 GUS 染色结果及繁殖的抗性芽

由于 pBI121 载体中包含的 *GUS* 基因没有插入内含子,因此可在含有该载体的农杆菌中检测到 GUS 活性,而在含 C-D 载体的农杆菌中没有检测到 GUS 活性(图 2-A,图片彩版见封三),表明 *GUSplus* 基因不能在农杆菌中表达。C-D 载体中所用的 Nos 启动子是一种维管组织特异启动子,仅在根、茎、叶脉中起作用。由糖橙抗性芽叶片及茎横切面 GUS 染色结果(图 2-B、C,图片彩版见封三)可见,在主叶脉和茎的横切面上均检测到了 GUS 活性,但在叶肉中未能检测到,表明 *GUSplus* 基因和 Nos 启动子的结合能够排除由农杆菌引起的 GUS 假阳性,GUS 阳性芽即可认定为转基因植株。为了对 GUS 阳性芽进行快速繁殖,以 14 d 苗龄的枳橙实生苗为砧木,对 GUS 阳性芽(图 2-D,图片彩版见封三)进行试管嫁接。待嫁接苗生长至 2~3 片叶(图 2-E)后,选择一年生酸橙砧木,将试管嫁接苗进行温室二次嫁接。二次嫁接约 45 d 后,嫁接苗即可生长出足够的用于分子检测的叶片(图 2-F)。



A 中左为含 pBI121 载体的农杆菌,右为含 C-D 载体的农杆菌;B 中上为非转基因叶片(对照),下为转基因叶片;C 中上为非转基因茎段横切面(对照),下为转基因植株茎段横切面;D 为抗性芽;E 为试管嫁接的 GUS 阳性芽;F 为温室二次嫁接的 GUS 阳性芽。

图 2 GUS 染色结果及繁殖的抗性芽

Fig. 2 GUS staining results and the breeding shoots with resistance

2.2 实生苗生长过程中适宜的光照模式

表 1 结果表明, T_3 、 T_4 处理的实生苗不定芽再

生率均达 100%, 显著高于另外 2 个处理;农杆菌侵染处理后, T_3 处理实生苗的再生能力仍然是 4 种

光照模式处理中最强的,其 GUS 阳性率也最高,因此,T₃处理最有利于提高糖橙实生苗的遗传转化效率;T₄处理实生苗的再生能力虽强,但其 GUS 阳性率在 4

表 1 不同光照处理下外植体的再生率和转化率

Table 1 Regeneration and transformation rate of the explant in different light conditions

处理	不定芽再生率/%		不定芽再生系数		GUS 阳性率/%
	无农杆菌侵染	农杆菌侵染	无农杆菌侵染	农杆菌侵染	
T ₁	(73.4±1.0)b	(12.2±1.3)ab	3.1±0.2	1.7±0.3	(3.2±0.5)a
T ₂	(60.6±1.3)c	(6.6±2.2)b	3.0±0.4	1.1±0.7	(1.4±1.0)ab
T ₃	100a	(16.8±2.1)a	2.6±0.3	1.3±0.6	(3.5±0.2)a
T ₄	(99.7±0.3)a	(13.9±3.1)a	3.6±0.9	1.5±0.3	(1.0±0.3)b

个处理中是最低的;T₁处理实生苗不定芽的再生率虽低,但其 GUS 阳性率较高。可见,再生率与转化率之间无必然联系。由于 T₁处理实生苗上胚轴长度仅 1~2 cm,获得节间茎段困难,而 T₃处理实生苗上胚轴长 8~12 cm,因此,T₃处理的实生苗更适合于遗传转化。

2.3 共培养条件的优化结果

由表 2 中极差 R 可知,AS 浓度是影响 GUS 阳性率的主要因素,pH 值是影响抗性芽再生率的主要因素。AS 质量浓度为 20 mg/L、温度 19 ℃、pH 值为 5.7 时是最佳共培养条件组合。

表 2 共培养条件优化的正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal optimizational experiment of co-cultured conditions

处理编号	A(共培养基 pH)	B(AS 质量浓度/ (mg · L ⁻¹))	C(共培养温度/℃)	D(空白列)	GUS 阳性率/%	抗性芽再生率/%
1	4.8	0	19	1	15.16	19.47
2	4.8	10	22	2	4.24	18.78
3	4.8	20	25	3	9.84	29.56
4	4.8	40	28	4	4.10	27.71
5	5.1	0	22	3	2.31	37.11
6	5.1	10	19	4	11.90	23.58
7	5.1	20	28	1	8.54	39.21
8	5.1	40	25	2	10.97	43.90
9	5.4	0	25	4	5.93	33.06
10	5.4	10	28	3	10.69	42.81
11	5.4	20	19	2	19.09	38.26
12	5.4	40	22	1	12.88	27.92
13	5.7	0	28	2	0.00	48.06
14	5.7	10	25	1	9.70	37.53
15	5.7	20	22	4	29.38	41.26
16	5.7	40	19	3	14.51	36.71
GUS 阳性率	K ₁	8.33	5.85	15.16	11.57	
	K ₂	8.42	9.13	12.20	8.57	
	K ₃	12.14	16.71	9.11	9.34	
	K ₄	13.40	10.61	5.83	12.82	
	R	5.06	10.86	9.33	4.25	
抗性芽再生率	K ₁	23.88	34.42	29.50	31.03	
	K ₂	35.95	30.67	31.27	37.25	
	K ₃	35.51	37.07	36.01	36.55	
	K ₄	40.89	34.06	39.45	31.40	
	R	17.01	6.40	9.94	6.22	

表 2 结果表明,随温度升高,GUS 阳性率下降,28 ℃时最低。不定芽再生率对温度的反应恰好相反,随温度的上升,不定芽再生率逐渐升高,表明再生率与转化率之间不存在必然联系。

表 2 结果表明,共培养基 pH 为 4.8~5.7 时对 GUS 阳性率无显著影响,但对抗性芽再生率影响显著;pH 为 5.7 时抗性芽再生率最高。结合 GUS 阳性率及抗性芽再生率结果分析可知,共培养基 pH

值为 5.4~5.7 时均适宜糖橙的转化。

由表 3 可知，共培养温度、AS 浓度对 GUS 阳性率的影响显著，AS 质量浓度为 20 mg/L 时的 GUS 阳性率显著高于其他浓度处理。AS 浓度对不定芽再生无显著影响，表明 AS 浓度只与农杆菌附着和 T-DNA 转运相关，而与细胞的再生无直接联系。

表 3 正交试验的方差分析结果

Table 3 Variance analysis of orthogonal experiment

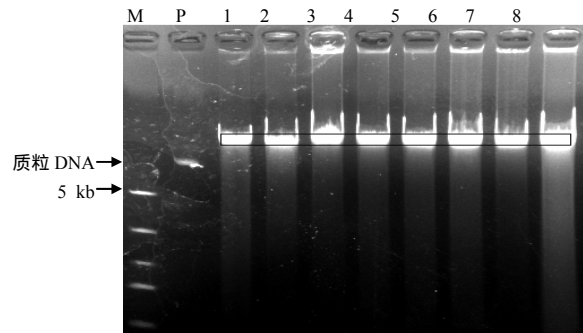
变异来源	因变量	SS	df	s ²	F	F _{0.05}
pH 值	GUS 阳性率	0.017	3	0.006	1.899	3.05
	抗性芽再生率	0.125	3	0.042	5.515*	3.05
AS 质量浓度	GUS 阳性率	0.050	3	0.017	5.762*	3.05
	抗性芽再生率	0.017	3	0.006	0.733	3.05
温度	GUS 阳性率	0.038	3	0.013	4.339*	3.05
	抗性芽再生率	0.050	3	0.017	2.179	3.05
试验误差	GUS 阳性率	0.064	22	0.003		
	抗性芽再生率	0.167	22	0.008		
总变异	GUS 阳性率	0.523	32			
	抗性芽再生率	4.064	32			

以最佳正交组合进行验证试验，所得抗性芽的再生率为(31±1.3)%，再生系数为(1.5±0.3)，GUS 阳性率为(29.4±3.1)%，表明在经正交试验优化的共培养条件下，糖橙的实生苗 GUS 阳性率。

2.4 PCR 检测结果

图 3 结果表明，琼脂糖凝胶电泳可将植物 DNA 与质粒 DNA 分离，因此，抗性植株 DNA 经回收后能去除质粒 DNA。图 4 结果表明，6 个样品中 4 个可以扩增出目的条带。以上结果初步表明，外源基因已整合到糖橙基因组中。由于部分植株过小，不能提取到足够的 DNA 用于回收检测，所以，最终

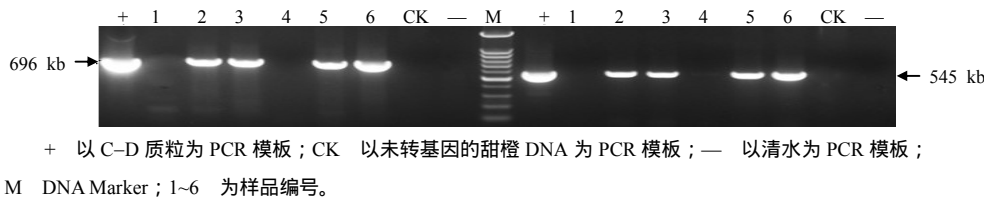
转化效率未能计算出来。



M DNA Marker ;P 质粒 C-D ;1~8 为 GUS 阳性苗 DNA(方框内为准备回收的 DNA)。

图 3 糖橙基因组 DNA 与质粒 C-D 电泳图谱

Fig. 3 Gel electrophoresis gene of succari orange DNA and C-D plasmid



+ 以 C-D 质粒为 PCR 模板；CK 以未转基因的甜橙 DNA 为 PCR 模板；— 以清水为 PCR 模板；M DNA Marker；1~6 为样品编号。

图 4 GUS 阳性芽 PCR 检测电泳图谱

Fig.4 PCR results of positive shoots in GUS staining

3 结论与讨论

本研究结果表明，在实生苗生长过程中，暗培养可以促进上胚轴伸长，从而获得足够的外植体材料，而光照培养是遗传转化效率提高的必要条件；在共培养基中添加 AS 及在较低温度下进行共培

养，可以显著提高农杆菌的侵染效率。本研究中以暗培养 20 d 后光照培养 10 d 的实生苗上胚轴节间茎段为外植体，在添加 20 mg/L AS 的共培养基(pH 为 5.7)中 19 ℃培养时可获得较高的 GUS 阳性率(29.4%)。

光照会降低细胞的再分化能力,因此未光照的植物细胞在离体条件下更易分化。本研究中光照培养 30 d 实生苗的再生率低而转化率高,表明再分化能力低的细胞耐农杆菌和抗生素伤害的能力更强。

酚类化合物能诱导农杆菌吸附植物细胞。本研究中添加 AS 可显著提高糖橙实生苗的转化效率,这与枳橙遗传转化时的结果(在共培养基中加入 18 mg/L AS 获得的 GUS 阳性率比不加入 AS 的高出 1 倍)^[11]相似,而粗柠檬转化的研究结果(需要添加 36 mg/L AS 才可获得较高的转化率)^[12]表明受体材料的基因型不同,需添加的 AS 浓度也不同。

关于烟草在 15~29 °C 的转化效率研究结果^[13]表明,在 22 °C 烟草能够获得较高的 GUS 阳性率。Su 等^[14]的研究结果表明,20 °C 的共培养温度不仅能显著提高烟草的 GUS 阳性率,而且能提高愈伤组织生长量。本研究结果与上述研究结果相似,糖橙在共培养温度 19 °C 时可获得较高的转化效率。

pH 对农杆菌 vir 区的活化有显著影响。pH 为 4.8 更适于甘薯的转化^[15]。较低的 pH 更适于毛白杨的遗传转化^[16]。本研究中共培养基 pH 对糖橙转化效率的影响无统计学意义,说明 pH 对转化效率的影响具有品种特异性。

转基因植株一般必须采用 Southern 杂交。Southern 杂交操作复杂,耗时长,如能以常规方法得到相同结果将会给转基因研究带来极大便利。Chen 等^[10]采取在报告基因中插入内含子、使用组织特异启动子、分离 T-DNA 质粒、设计特异的 PCR 引物等手段来排除农杆菌对检测的干扰。本研究参考以上研究方法,目前已检测到部分转基因植株。

参考文献:

- [1] Oliveira M L, Febres V J, Costa M G, et al. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration[J]. Plant Cell Rep, 2009, 28(3): 387-395.
- [2] Yu C, Huang S, Chen C, et al. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 71(2): 147-155.
- [3] Boscariol R, Almeida W, Derbyshire M, et al. The use of the PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck) [J]. Plant Cell Reports, 2003, 22(2): 122-128.
- [4] 敖小平,熊兴耀,胡新喜,等.高效的‘大红’甜橙实生苗上胚轴离体培养与植株再生体系的建立[J].植物生理学通讯,2007,43(4):689-692.
- [5] 罗赛男,邓子牛,钟晓红,等.用单性结实基因 *defH9-iaaM* 转化糖橙的研究[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2008,34(2):177-181.
- [6] 谢玉明,邓子牛,郭琛,等.农杆菌介导甜橙遗传转化的初步研究[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2006,31(6):627-630.
- [7] Pena L, Cervera M, Juarez J, et al. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): Factors affecting transformation and regeneration[J]. Plant Cell Reports, 1997, 16(11): 731-737.
- [8] 邓艺,曾炳山,赵思东,等.乙酰丁香酮在农杆菌介导的遗传转化中的作用机制及应用[J].安徽农业科学,2010(5):2229-2232.
- [9] 邹智.农杆菌 *vir* 基因诱导因子研究进展[J].中国生物工程杂志,2011,31(7):126-132.
- [10] Chen Y, Lu L, Deng W, et al. *In vitro* regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Euonymus alatus*[J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(10): 1043-1051.
- [11] Cervera M, Pina J, Juarez J, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: Factors affecting transformation and regeneration[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18(3): 271-278.
- [12] Ali S, Mannan A, Oirdi M E, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of rough lemon (*Citrus jambhiri-lush*) with yeast *HAL2* gene[J]. BMC Research Notes, 2012(5): 285.
- [13] Dillen W, Clercq J, Kapila J, et al. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants[J]. The Plant Journal, 2002, 12(6): 1459-1463.
- [14] Su G. Low co-cultivation temperature at 20 °C resulted in the reproducible maximum increase in both the fresh weight yield and stable expression of gus activity after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tobacco leaf disks[J]. American Journal of Plant Sciences, 2012, 3(4): 537-545.
- [15] 毕瑞明,高峰.甘薯(*Ipomoea batatas* L.)遗传转化几个因素的研究[J].生物技术,2007,17(4):55-58.
- [16] 郝贵霞,朱祯,朱之悌.豇豆蛋白酶抑制剂基因转化毛白杨的研究[J].植物学报,1999,41(12):1276-1282.

责任编辑:王赛群

英文编辑:王 库