

人工合成柞蚕抗菌肽 D 基因转化沙田柚^{*}

郑启发¹ 陈大成¹ 黄自然² 胡桂兵¹

(1 华南农业大学园艺系, 广州, 510642; 2 华南农业大学蚕桑系)

摘要 采用根癌农杆菌介导法将柞蚕抗菌肽 D 基因导入沙田柚上胚轴等外植体, 经卡那霉素筛选, 获得了若干转基因植株. 对这些植株进行胭脂碱电泳检测、点印迹杂交、PCR 扩增和 Southern 杂交分析, 结果表明: 抗菌肽 D 基因已转入到沙田柚细胞中.

关键词 沙田柚; 根癌农杆菌; 抗菌肽 D 基因; 基因转化

中图分类号 S 666.3; Q 78

柑桔黄龙病和溃疡病是影响柑桔生产的主要病害. 通过基因工程培育抗病新品种, 是传统的果树育种方法所难以达到的高效抗病育种途径. 它既可以从根本上提高柑桔品种的抗病力, 又能保持果实原有的优良品质, 降低因为生产中使用大量农药而造成的环境污染和果实中的农药残留. 据报道, 柞蚕抗菌肽对柑桔黄龙病病原类细菌(bacterial like organism, BLO)及溃疡病黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. citri, Dye)有非常显著的杀灭作用(张清杰等, 1995; 黄自然等, 1986); 人工合成的抗菌肽 D(AP-D)基因已成功地导入到我国柑桔的主栽品种锦橙(*Citrus sinensis* Osbeck)中(陈善春等, 1996). 本研究以两广主栽名优品种、素有“天然罐头”之称的沙田柚(Shatian Pummelo, *Citrus grandis*)幼苗子叶、上胚轴和下胚轴为外植体, 导入 AP-D 基因. 旨在为广东柑桔建立高效的遗传转化系统, 创造柑桔抗病新种质, 为根本解决华南柑桔黄龙病、溃疡病等危险性病害的严重威胁探索有效的新途径.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 外植体 供试种子由梅州农校提供. 去种皮的种子消毒后, 接到 $1/2$ MS 培养基上培养 35 d. 然后分别剪取幼苗的子叶、上胚轴、下胚轴、新梢及叶片为外植体材料.

1.1.2 培养基 愈伤组织诱导培养基为 MS+2, 4-D (1.5 mg/L)+KT (0.25 mg/L)+复合 AA (10 g/L); 愈伤组织分化和外植体直接成芽的培养基为 MS+IAA (0.5 mg/L)+BA (2.5 mg/L); 新梢生根培养基为 $1/2$ MS+IBA (0.5 mg/L)+活性炭 (0.8 g/L). 培养基均为 $\rho(\text{蔗糖})=30 \text{ g/L}$ 和 $\rho(\text{琼脂})=7.5 \text{ g/L}$, pH 5.7.

1.1.3 AP-D 基因及质粒 含人工合成 AP-D 基因的根癌农杆菌是由抗菌肽基因重组子 M13 mp 8 克隆于 Bluescript M 13 质粒再克隆于过渡质粒 pCo 24, 用三亲交配法与根癌农杆菌 SE 和大肠杆菌 PRK 13 混合培养、筛选获得的苗株(李丹青等, 1990; 徐飞等, 1988), 由华南农业大学蚕桑系提供. pCBD(含有抗菌肽 B、D 的双价质粒)由中国热带农业大学张银东博士惠赠.

1.1.4 引物 采用黄亚东(1997)合成的一对引物, 具有 21 个 AP-D 基因的同源碱基, 长度为 27 bp.

1997-12-25 收稿 郑启发, 男, 32 岁, 讲师, 博士研究生

^{*}农业部“九五”重点农业高新技术与基础研究(95 农-15-03-02)和华南农业大学校长基金资助项目

Oligod(+): 5'-GGCGGATCCTGGAATCCATTCAAGGAA-3';
BamHI

Oligod(-): 5'-GCCGAATTCTTACTTGGCCAAGGCAGT-3'.
EcoRI

1.1.5 试剂药品 试验用的 *EcoRI*、*BamHI* 等限制性内切酶、*Taq* 聚合酶购自华美公司。尼龙膜购自 DuPont 公司。同位素购自北京亚辉生物医学公司。其它试剂均为分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 外植体的接种感染 农杆菌液(OD 值为 0.5)用无菌水稀释 5 倍后, 将外植体材料放入其中处理 15 min, 然后捞入垫有灭菌滤纸的培养皿中。

1.2.2 抑菌处理 将外植体分类接种于含不同浓度组合抗生素的培养基中培养 25 d, 培养基中卡那霉素(Km)质量浓度(ρ)均为 50 mg/L。羧苄青霉素(Cef)质量浓度(ρ)或头孢霉素(Cb)质量浓度(ρ)分别为 0、100、200、300、400、500 mg/L。培养后第 3、5 及 20 d 对抑菌效果进行统计。每处理统计 5 瓶。

1.2.3 Km 的筛选策略 经感染过的外植体杀菌培养 15 d 后, 转入 $\rho(Km)=25\text{ mg/L}$ 的培养基中培养。有小芽长出时, $\rho(Km)$ 提高到 50、75 mg/L。诱导生根阶段 $\rho(Km)$ 用 100 mg/L。

1.2.4 培养条件 温度(24±1)℃, 用 2 支 40 W 日光灯与培养物距 42 cm 进行照明, 12 h/d。

1.2.5 植株 DNA 的制备 分别剪取经 nos 检测阳性株系、非转化株的茎、叶, 用保鲜膜包裹编号, 于-40℃冰箱中过夜。具体方法参考 Hiroaki (1989)。

1.2.6 沙田柚转基因植株的检测鉴定 AP-D 基因转化株胭脂碱(nop)电泳检测以确定 nos 基因的表达: 参照许耀等(1987)的方法。AP-D 基因转化株点印迹杂交: nop 检测为阳性的植株, 抽提其 DNA, 设 pCo24, pCBD 为阳性对照, 非转化株为阴性对照。探针制备中模板 DNA 用 pCo 24。具体方法参考彭秀玲等(1987)。AP-D 基因转化 PCR 扩增: 参见朱平等(1992)方法。AP-D 基因转化株 Southern 杂交: 将初步判断为转基因的植株抽提其总 DNA, 设 pCo 24 为阳性对照, λ -DNA、非转株 DNA 为阴性对照。探针制备同点杂交, DNA 片段用 $\rho=8\text{ g/L}$ 琼脂糖凝胶 30 V 电泳 8 h。具体步骤参见 Sambrook 等(1992)方法。

2 结果

2.1 抗生素的筛选和转基因植株的获得

2.1.1 抗生素对农杆菌的抑菌效果 抗生素对农杆菌生长的抑制效果见表 1。由表 1 可见, $\rho(\text{Cef})$ 或 $\rho(\text{Cb})=300\text{ mg/L}$ 以上能有效地抑制农杆菌的生长达 20 d。

表 1 羧苄青霉素(Cef)和头孢霉素(Cb)对农杆菌的作用

$\rho(\text{Cef})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	0	100	200	300	400	500
$\rho(\text{Cb})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	0	100	200	300	400	500
$t_{\text{抑菌}}/\text{d}$	< 3	< 3	< 3	> 20	> 20	> 20

2.1.2 抗生素对沙田柚愈伤组织的产生和分化的影响 子叶在 $\rho(\text{Cef})=300\text{ mg/L}$ 及不同 $\rho(Km)$ 的培养基上培养。结果是: $\rho(Km)=0\sim25\text{ mg/L}$ 时可产生愈伤组织而 $\rho(Km)=50\sim75\text{ mg/L}$ 时不能产生或几乎不产生。

将愈伤组织分别接到 $\rho(\text{Cb})=300\text{ mg/L}$ 和不同 $\rho(Km)$ 的培养基上培养 28 d。在 $\rho(Km)=50\text{ mg/L}$ 以下的可分化出芽并生长良好; 在 $\rho(Km)=75\text{ mg/L}$ 以上的则停止生长, 如图版-1。图中 1、2、3 的 $\rho(Km)$ 分别为 75、50、0 mg/L。

由此可见, 沙田柚遗传转化中, $\rho(\text{Cb})=300\text{ mg/L}$ 不会对子叶愈伤组织的产生和分化构成威胁, $\rho(Km)=50\text{ mg/L}$ 可用于抗性愈伤组织的筛选, $\rho(Km)=75\text{ mg/L}$ 可用于愈伤组织抗性芽

的筛选.

2.1.3 抗生素对沙田柚上、下胚轴形成芽的影响 将上、下胚轴分别接种于 $\rho(\text{Cb})=300 \text{ mg/L}$ 和不同 $\rho(\text{Km})$ 的培养基上, 培养 21 d 后, $\rho(\text{Km})=0, 25 \text{ mg/L}$ 处理有不定芽长出, 继代培养 56 d 后, 芽可长至 1 cm 左右; 而 $\rho(\text{Km})=50 \text{ mg/L}$ 处理未见有不定芽形成, 如图版—2, 3. 图中 1、2、3 的 $\rho(\text{Km})$ 分别为 0、25、50 mg/L .

2.1.4 抗生素对新梢发根、生长的影响 将 1 cm 左右的沙田柚幼苗新梢接到 $\rho(\text{Cb})=300 \text{ mg/L}$ 和不同 $\rho(\text{Km})$ 的生根培养基中, 14 d 左右均可诱导出 1 cm 左右的嫩根; 但 $\rho(\text{Km})=100 \text{ mg/L}$ 处理的新梢长根后 14 d 左右便逐渐停止生长直至死亡, 如图版—4. 图中 1、2、3 中 $\rho(\text{Km})$ 分别为 100、50、0 mg/L .

2.1.5 沙田柚转 AP—D 基因、抗 Km 株的获得 经一系列的培养筛选, 最终从经感染的 1 125 段(块)外植体中产生了若干抗性芽, 如图版—5. 图中 1 为子叶经愈伤组织形成芽; 2 为上胚轴直接形成芽; 3 为下胚轴直接形成芽. 后经进一步诱根形成了 13 株 Km^r 植株, 如图版—6. 图中 1~2 为子叶形成的植株; 3 为上胚轴形成的植株; 4~5 为下胚轴形成的植株.

2.2 沙田柚 AP—D 基因转化株的检测鉴定

2.2.1 沙田柚 AP—D 基因转化株胭脂碱电泳检测 分别取 5 株 Km 抗性(Km^r)株及 1 株未经 Ti 感染的沙田柚健株叶片进行胭脂碱测定, 设 nop 为阳性对照. 结果图版—7, 图中 1 为下胚轴产生的 Km^r 株; 2~3 为上胚轴产生的 Km^r 株; 4~5 为子叶产生的 Km^r 株; 6 为未感染株(CK); 7 为标准 Arg; 8 为标准 nop . 所有的 Km^r 株 nos 基因均有颜色反应, 未感染的植株未着色.

2.2.2 沙田柚 AP—D 基因转化株 DNA 点印迹杂交检测 将经 nop 检测为阳性的 4 株拟转基因株进行点印迹杂交, 结果如图版—8, 图中 1、8 分别为 pCo 24、pCBD 质粒, 阳性对照, 有杂交斑; 2~3 为未感染株, 阴性对照, 无杂交斑; 4~7 为含有 nop 的 Km^r 株, 均有杂交斑.

2.2.3 沙田柚 AP—D 基因转化株的 PCR 扩增检测 分别以 4 株转基因植株的 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 设非转基因的植株 DNA 为负对照, 分别取样进行琼脂糖凝胶电泳. 结果如图版—9, 其中 1 为未上样; 2 为 pEGM—3 Zi/Hae III(DNA marker); 3 为 pCo 24, 阳性对照; 4 为非转基因株, 阳性对照; 5~8 为转基因株, 均有一条明显的、对照植株没有的特异带.

2.2.4 沙田柚 AP—D 基因转化株的 Southern 印迹杂交检测 将点印迹杂交阳性的 4 株, 进一步进行 Southern 印迹杂交, 结果如图版—10. 1、3 分别为 λ —DNA、非转化株 DNA, 阴性对照, 无杂交带斑; 2 为 Co 24 重组质粒 DNA, 阳性对照, 有 3 条带斑; 4~7 均为点印迹杂交阳性的转化株 DNA, 其中 4、7 各有 1 条带斑, 5、6 无杂交带斑.

通过检测, 证明至少 4、7 号株为真正的转基因株, AP—D 基因已成功地转入沙田柚中.

3 讨论

以农杆菌介导法进行植物遗传转化中, 有假阳性的 Km^r 的报道(陈善春等, 1994; Moore, 1992). 但笔者对 13 株转化株进行检测, 均发生有胭脂碱, 未发现有未着色的. 这既说明了 Km 抗性与 nos 基因表达有较高的同源性(陈善春等, 1994), 也可能由于 Km 筛选策略的正确.

从转基因株的 DNA 点印迹杂交结果来看, AP—D 基因亦已转入沙田柚中, 但用 PCR 法并未全部调出 AP—D 基因. 结合 Southern 杂交结果可认为点杂交、PCR 的结果可信度不如 Southern 杂交的结果高.

由结果可见, 由根癌农杆菌的 Ti 质粒携带 AP—D 基因(122 bp)感染沙田柚外植体, 经 Km 筛选, 可得到真正的转基因株. 下一步将对转基因株进行抗病性检测, 获得可供使用的沙田柚

抗病新品系.

致谢 试验得到蚕桑系曹阳教授、黄亚东博士及生物技术学院庄楚雄博士的大力支持, 谨此致谢.

参 考 文 献

- 朱 平. 1992 PCR 基因扩增实验操作手册. 北京: 中国科学出版社, 1~619
- 许 耀 贾敬芬, 郑国昌. 1987 植物组织中冠瘿碱合成酶活性检测的一种简便有效方法. 遗传, 9(5): 41~43
- 张清杰, 张景宁, 黄自然, 等. 1995. 柞蚕抗菌肽对柑桔黄龙病及溃疡病病原菌的杀菌作用. 蚕业科学, 21(2): 77~88
- 李丹清 徐 飞, 黄自然, 等. 1990 人工合成的抗菌肽 D 基因转入根癌农杆菌. 蚕业科学, 16(2): 110~112
- 陈善春, 张进仁, 高 峰, 等. 1994 柑桔遗传转化系统的建立及抗菌肽 D 基因的导入. 广东蚕业, 28(2): 62
- 陈善春, 张进仁, 黄自然, 等. 1996 抗菌肽基因介导的柑桔溃疡病基因工程的研究. 中国农业科学, 29(2): 54~55
- 徐 飞, 施 文, 王启松, 等. 1988 柞蚕抗菌 D 基因的合成. 科学通报, 21: 1 656~1 659
- 黄亚东. 1997. 柞蚕抗菌肽 D 基因在昆虫杆状病毒载体中表达的研究: [学位论文]. 广州: 华南农业大学蚕桑系
- 黄自然, 郑庭辉, 梁怡章, 等. 1986 柞蚕抗菌肽的抑菌效应. 科学通报, 14: 1 107~1 109
- 彭秀玲, 袁汉英. 1987. 基因工程实验技术. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1~184
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 著. 1992 分子克隆: 实验指南. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1~1 062
- Hiroaki M. 1989. Isolation of total mulberry DNA. J Seric Sci Japan, 58(4): 349~350
- Moore G A. 1992. Agrobacterium-mediated transformation of Citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Report, 11: 238~242

Transformation of the Shatian Pummelo (*Citrus grandis*) with the Synthetic Oak Silkworm Antibacterial Peptide D Gene

Zheng Qifa¹ Chen Dacheng¹ Huang Ziran² Hu Guibing¹

(1 Dept. of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642;

2 Dept. of Sericulture, South China Agric. Univ.)

Abstract Some transgenic plantlets of Shatian pummelo, *Citrus grandis* were obtained by infection with *Agrobacterium tumefaciens* which contained the NPT II gene, nos gene, CaMV 35s promoter and Ap-D gene. The infected tissues and buds were selected on MS medium containing different concentration of Km as necessary. The transformants were selected on the basis of Km resistance (Km^r), nopaline electrophoretic detection, DNA dot blotting, PCR amplification and Southern hybridization. The results showed that the Antibacterial peptide D gene had been integrated into the genome of transgenic pummelo plant cells.

Key words Shatian pummelo (*Citrus grandis* Osbeck); *Agrobacterium tumefaciens*; antibacterial peptide D gene; gene transformation