

文章编号: 1001-411X(2002)02-0047-04

# 农杆菌法将抗菌肽 D 基因导入蕉柑胚性细胞的研究

王声斌<sup>1</sup>, 邹伟权<sup>1</sup>, 余让才<sup>1</sup>, 房师松<sup>2</sup>, 黄自然<sup>2</sup>

(1 华南农业大学生命科学学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学艺术设计学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 用农杆菌介导的方法成功地将抗菌肽 D 基因导入到蕉柑胚性悬浮细胞. 再生芽经 PCR、Southern 杂交证明抗菌肽 D 基因已整合到其基因组 DNA 中. 在农杆菌介导的蕉柑胚性悬浮细胞转化过程中, 共培养介质中的乙酰丁香酮(As)能显著提高其转化效率, 与对照相比, 每克悬浮细胞转化后形成的抗卡那霉素细胞团数从 0 提高到 0.75. 悬浮细胞与农杆菌共培养时间对转化效率也具有显著影响, 共培养 1、2、3 d 后, 每克悬浮细胞转化后形成的抗卡那霉素细胞团数分别为 0.20、0.75、0.

**关键词:** 抗菌肽 D 基因; 柑橘; 胚性细胞; 遗传转化

中图分类号: Q785

文献标识码: A

柑橘在其生长过程中易受多种病害威胁, 其中一些病害至今仍无有效的防治措施, 这一现状迫切需要培育一些抗病品种应用于生产实践. 柑橘原生质体融合在育种上展现出了良好的发展前景, 但目前这一技术还有待完善. 利用植物基因工程技术培育抗病柑橘品种已有一些较成功的报道, Dominguez<sup>[1]</sup>、陈善春<sup>[2]</sup>等分别利用柑橘实生苗的茎段和胚轴作为受体材料获得了转基因植株, 但与其他主要农作物相比, 柑橘的遗传转化还相对落后. 利用柑橘的胚性细胞作为外源基因转化的受体材料成功获得转基因植株的报道还较少, 为此笔者在成功诱导宽皮橘蕉柑胚性愈伤组织的基础上, 将抗菌肽基因导入其体内, 对利用农杆菌介导的方法将外源基因导入柑橘胚性细胞, 培育抗病植株进行了积极探索.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

蕉柑(*Citrus reticulata* var. *tankan* Hayata)胚性愈伤组织、胚性悬浮细胞、含抗菌肽 D 基因的农杆菌分别系华南农业大学生物物理实验室诱导、建立与保存.

### 1.2 主要药品与试剂

TaqDNA 聚合酶、溶菌酶、RNase、Hind III、DNA marker、Tris、SDS 购自华美公司, Tryptone、Yeast Extract 购自 Sigma 公司, 麦芽提取物(ME)购自 Fluka 公司, DIG DNA Labeling and Detection Kit 购自 Boehringer 公司, 乙酰丁香酮(As)为中国科学院植物研究所陈大

华博士惠赠. 其余试剂均为国产.

### 1.3 农杆菌的活化培养

挑农杆菌单菌落于 LBA (LB+Km 50 mg·L<sup>-1</sup>+Cm 25 mg·L<sup>-1</sup>+Str 70 mg·L<sup>-1</sup>+Spe 70 mg·L<sup>-1</sup>)液体培养基中, 28℃培养过夜, 取 500 μL 菌液于新鲜 LBA 或 LBA+As 200 μmol·L<sup>-1</sup>液体培养基中培养约 16 h, 备用.

### 1.4 农杆菌转化蕉柑胚性悬浮细胞

取 1.3 中活化培养的农杆菌菌液 1 mL 在波长 666 nm 测定  $D_{666\text{nm}}$  值, 按  $D_{666\text{nm}} = 1$  时相当于  $2.773 \times 10^9$  个/mL 估计农杆菌密度. 5 000 r/min 离心收集菌体, 用 LB 液体培养基重新悬浮调整含菌量, 同时用滤纸过滤收集蕉柑胚性悬浮细胞. 将农杆菌与蕉柑胚性悬浮细胞按  $10^8$  个菌:100 mg 细胞(每毫升共培养介质)混合共培养, 结束后, 用滤纸过滤收集悬浮细胞, 转接到 MT+羧苄青霉素 500 mg·L<sup>-1</sup>液体培养基中培养 30 min 杀死农杆菌. 用滤纸过滤重新收集悬浮细胞, 无菌水反复冲洗后, 转接到 MT+ME 500 mg·L<sup>-1</sup>固体培养基上进行恢复培养 1 周, 然后将转化的蕉柑悬浮细胞继代到 MT+ME 500 mg·L<sup>-1</sup>+Km 90 mg·L<sup>-1</sup>固体培养基上进行筛选培养.

### 1.5 转基因柑橘及胚性细胞的总 DNA 提取

参照《基因工程技术实验指导》(华南农业大学现代生物技术实验室基因工程实验分室编, 1995, 23-26).

### 1.6 转基因柑橘的 PCR 鉴定

根据抗菌肽基因序列设计 1 对引物:

上游: Oligod(+) 5' - ATG TGG AAT CCA TTC

AAG GAA TIG-3'.

下游: Oligod(-) 5'-TTA CTT AGC CAA GGC AGT AGC TT-3'.

扩增参数: 94 °C, 60 s; 55 °C, 60 s; 72 °C, 60 s; 共完成40个循环.

### 1.7 转基因柑橘的 southern blot 鉴定

参照 DIG kit 说明书进行.

## 2 结果与分析

### 2.1 影响农杆菌转化效率的因素

#### 2.1.1 As 对农杆菌转化蕉柑胚性悬浮细胞的影响

农杆菌转化蕉柑胚性悬浮细胞后, 胚性悬浮细胞在筛选培养过程中有自发体胚的形成, 称之为抗性胚状体(图1). 表1结果显示, 共培养介质中的乙酰丁香酮(As)可以明显促进农杆菌转化蕉柑胚性悬浮细胞后的抗卡那霉素细胞团与胚状体形成. 在含As的共培养介质中, 每克蕉柑胚性悬浮细胞经筛选培养后可形成0.75个抗卡那霉素细胞团及4.25个抗性胚状体, 而在不含As的共培养介质中, 每克蕉柑胚性悬浮细胞经筛选培养后仅能产生1.5个抗性胚状体, 而没有抗性细胞团的形成.

表1 As 对农杆菌转化蕉柑胚性悬浮细胞的影响

Tab.1 Effect of As on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of citrus embryonic suspension cells

共培养介质 co-culture medium	抗性细胞团数 /(个·g <sup>-1</sup> ) clones resistant to Km /(amounts·g <sup>-1</sup> )	抗性胚状体数 /(个·g <sup>-1</sup> ) embryoids resistant to Km /(amounts·g <sup>-1</sup> )
MT	0.00	1.50
MT+	0.75	4.25
As 200 μmol·L <sup>-1</sup> †		

† 农杆菌在 LB+As 200 μmol·L<sup>-1</sup> 液体培养基中培养活化



图1 农杆菌转化蕉柑胚性悬浮细胞后胚状体的自发发生  
Fig.1 Formation of emryoids after *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of citrus embryonic suspension cells

2.1.2 共培养时间对农杆菌转化蕉柑胚性悬浮细胞的影响 表2显示, 共培养时间对农杆菌转化蕉柑胚性悬浮细胞后的抗卡那霉素细胞团与胚状体的形成具有显著影响. 共培养时间从1d提高到2d, 每克胚性悬浮细胞形成的抗卡那霉素细胞团数与胚状体数都有明显提高, 延长到3d后, 每克蕉柑胚性悬浮细胞产生的抗性胚状体数虽从4.25个增加到12.50个, 但没有抗卡那霉素细胞团的形成.

表2 共培养时间对农杆菌转化蕉柑胚性悬浮细胞的影响<sup>1)</sup>

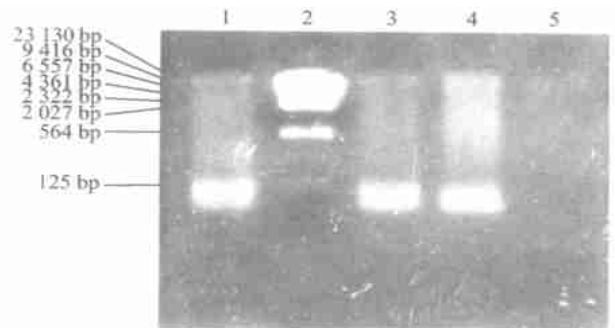
Tab.2 Effect of co-culture time on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of citrus embryonic suspension cells

共培养时间 co-culture time/d	抗性细胞团数 /(个·g <sup>-1</sup> ) clones resistant to Km /(amounts·g <sup>-1</sup> )	抗性胚状体数 /(个·g <sup>-1</sup> ) embryoids resistant to Km /(amounts·g <sup>-1</sup> )
1	0.20	0.60
2	0.75	4.25
3	0.00	12.50

1) 农杆菌在 LB+As200 μmol·L<sup>-1</sup> 液体培养基中培养活化

### 2.2 抗卡那霉素细胞团的 PCR 鉴定

以上述筛选培养获得的4块抗卡那霉素细胞团为材料, 分别抽取总DNA, 进行PCR扩增, 电泳结果如图2.



1 含抗菌肽 D 基因质粒 DNA; 2 PCR Marker(λDNA/ Hind III); 3, 4 抗卡那霉素细胞团总 DNA; 5 对照

1 plasmid DNA; 2 PCR Marker(λDNA/ Hind III); 3, 4 total DNA of cells resistant to Km; 5 CK

图2 蕉柑抗卡那霉素细胞团的 PCR 鉴定

Fig.2 PCR analysis of citrus cells resistant to Km

PCR 产物的电泳结果显示, 以抗卡那霉素细胞团总 DNA 为模板, 可以扩增到一条 120 bp 左右的特异带(图2). 此条带在电泳图片上的位置与以含抗菌肽 D 基因的质粒 DNA 为模板扩增到的特异带位置一致, 从条带的大小和电泳位置可以判断此条带是一条抗菌肽 D 基因的电泳条带. 在总共 4 个抗卡

那霉素细胞团的 PCR 鉴定中, 有 2 个抗卡那霉素细胞团的 PCR 鉴定呈阳性. 以上结果可以初步说明通过抗性筛选获得的这 2 个抗卡那霉素细胞团均含有抗菌肽 D 基因.

### 2.3 抗性芽的 PCR 鉴定

上述经 PCR 鉴定为阳性的抗卡那霉素细胞团可成功地诱导出胚状体及芽, 称之为抗性芽(图 3). 将获得的抗性芽切下, 分别抽取总 DNA, 进行 PCR 扩增, 电泳结果如图 4.

图 4 的电泳结果显示, 以抗性芽总 DNA 为模板, 可以扩增到 1 条 120 bp 左右的特异带. 此条带在电泳图片上的位置与以含抗菌肽 D 基因的质粒 DNA 为模板扩增到的特异带位置一致. 从条带的大小和电泳位置可以判断此条带是一条抗菌肽 D 基因的电泳条带. 以上结果可以初步说明抗性芽的基因组 DNA 中含有抗菌肽 D 基因.

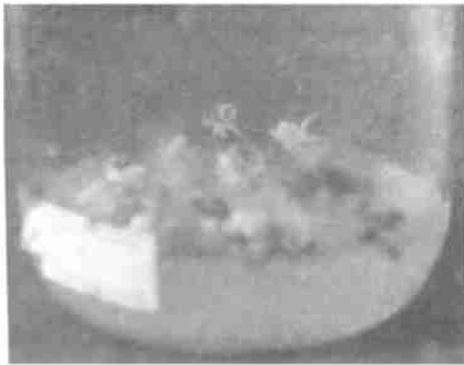
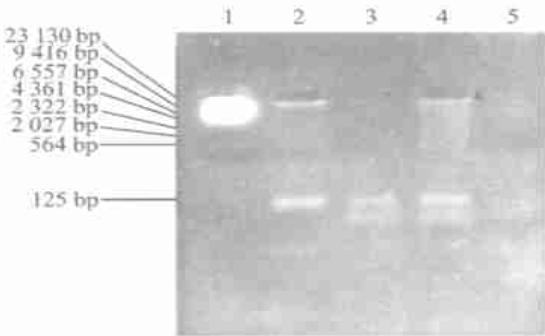


图 3 蕉柑抗卡那霉素细胞团诱导的芽

Fig. 3 Induction of shoots from embryonic cells resistant to Km



1 PCR Marker( $\lambda$ DNA/ *Hind* III); 2 含抗菌肽 D 基因质粒 DNA; 3, 4 抗性芽的总 DNA; 5 对照

1 PCR Marker( $\lambda$ DNA/ *Hind* III); 2 plasmid DNA; 3, 4 total DNA of regenerated shoots; 5 CK

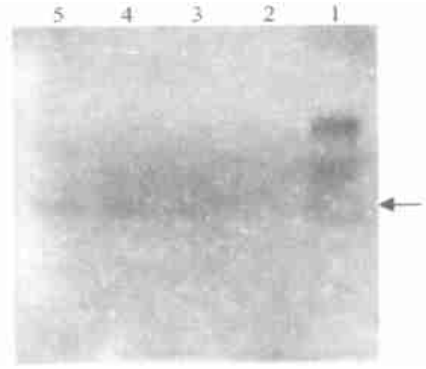
图 4 蕉柑抗卡那霉素再生芽的 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR analysis of transgenic citrus

### 2.4 抗性芽的 Southern 杂交鉴定

用上述 3 个抗性芽的抗菌肽 D 基因 PCR 产物进

行 Southern 杂交, 结果如图 5.



1 含抗菌肽 D 基因的质粒 DNA; 2 对照; 3, 4, 5 抗性芽的抗菌肽 D 基因 PCR 产物

1 Plasmid DNA; 2 CK; 3, 4, 5 PCR products of transgenic citrus  
图 5 蕉柑抗性芽的抗菌肽 D 基因 PCR 产物 Southern 杂交

Fig. 5 Southern analysis of PCR products of transgenic citrus

图 5 结果显示, 3 个抗性芽的抗菌肽 D 基因 PCR 产物经 Southern 杂交都呈阳性. 此结果再次证明抗菌肽 D 基因已整合到抗性芽的基因组 DNA 中.

## 3 讨论

乙酰丁香酮(As)作为一种主要的植物创伤信号分子, 能显著地诱导农杆菌的毒基因表达. Vernade<sup>[3]</sup>、Winans<sup>[4]</sup>、Liu<sup>[5]</sup> 等对此都有详细的报道. 目前 As 已被广泛用于农杆菌介导的植物遗传转化, 以提高转化效率. 刘明志<sup>[6]</sup>、Cheng<sup>[7]</sup>、Cruz-Hernandez<sup>[8]</sup>、Gonzalez<sup>[9]</sup> 等在进行农杆菌介导的胡萝卜悬浮细胞、小麦胚性愈伤组织、鳄梨愈伤组织、木薯胚性悬浮细胞转化中都采用了 As, 取得了显著的效果. 本试验在用农杆菌介导的方法转化蕉柑胚性悬浮细胞时也发现, 共培养介质中添加 As 可显著提高抗卡那霉素细胞团的形成数, 对进一步获得转基因的蕉柑再生苗, 转化过程中添加 As 是非常必要的.

Roberta<sup>[10]</sup>认为, 农杆菌与受体材料共培养时间过短会造成 T-DNA 转移过程不能完成, 而共培养时间过长则会由于农杆菌的旺盛生长导致植物材料受到伤害引起植株不能再生. 本试验在农杆菌转化蕉柑胚性悬浮细胞时也发现共培养时间对转化效率具有显著影响. 就本试验而言, 农杆菌与蕉柑胚性悬浮细胞共培养的时间为 2 d 较适宜. 刘明志<sup>[6]</sup>在用 As 活化的农杆菌转化胡萝卜悬浮细胞时指出共培养时间为 3 d 较合适, 可见不同作物转化试验中的最佳共培养时间存在差异.

本试验还发现, 经农杆菌转化后的蕉柑胚性悬

浮细胞在筛选培养过程中有体胚自发发生的现象,而且共培养时间越长,自发形成的体胚数目越多。这一现象在其他研究者的报道中较少见,推测可能是由于共培养过程中农杆菌的旺盛生长造成了某种逆境导致蕉柑胚性细胞的体胚自发发生。

#### 参考文献:

- [1] DOMINGUEZ A, GUERRI J, CAMBRA M, et al. Efficient production of transgenic citrus plants expression the coat protein gene of citrus tristeza virus[J]. *Plant Cell Rep*, 2000, 19: 427-433.
- [2] 陈善春, 张进仁, 黄自然, 等. 抗菌肽基因介导的柑橘抗溃疡病基因工程研究[J]. *中国农业科学*, 1996, 29: 94-95.
- [3] VERNADE D, HERRERA-ESTRELLA A, WANG K, et al. Glycine betaine allows enhanced induction of the *Agrobacterium tumefaciens* vir genes by acetosyringone at low pH[J]. *J Bacteriol*, 1988, 170(12): 5 822-5 829.
- [4] WINANS S C. Transcriptional induction of an *Agrobacterium* regulatory gene at tandem promoters by plant-released phenolic compounds, phosphate starvation, and acidic growth media[J]. *J Bacteriol*, 1990, 172(5): 2 433-2 438.
- [5] LIU C N, STECK T R, HABECK L L, et al. Multiple copies of VirG allow induction of *Agrobacterium tumefaciens* vir genes and T-DNA processing at alkaline pH[J]. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 1992, 6(1): 144-156.
- [6] 刘明志. 酚类化合物促进双元载体农杆菌对胡萝卜悬浮细胞的转化和植株再生[J]. *植物学报*, 1996, 38(3): 203-208.
- [7] CHENG M, FRY J C, PANG S Z, et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Physiol*, 1997, 115: 971-980.
- [8] CRUZ-HERNANDEZ A, LITZ R Z, LIM A G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos[J]. *Plant Cell Rep*, 1998, 17: 497-503.
- [9] GONZALEZ A E, SCHOPKE C, TAYLOR J. Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) through *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic suspension cultures[J]. *Plant Cell Rep*, 1998, 17: 827-831.
- [10] ROBERT H S, ELIZABETH E H. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons[J]. *Crop Science*, 1995, 35(2): 301-309.

## *Agrobacterium tumefaciens*—Mediated Transformation of Citrus Embryonic Cells

WANG Sheng-bin<sup>1</sup>, ZOU Wei-quan<sup>1</sup>, YU Rang-cai<sup>1</sup>, FANG Sheng-song<sup>2</sup>, HUANG Zi-ran<sup>2</sup>

(1 College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 College of Art Design, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Two clones resistant to kanamycine were obtained in MT+Km 90 mg °L<sup>-1</sup> medium from citrus embryonic cell suspensions after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Several shoots regenerated from these clones resistant to kanamycine (90 mg °L<sup>-1</sup>). Integration of cecropin D gene into these shoots genome was confirmed by PCR and Southern blot. The efficiency of transformation was markedly increased by co-cultivation of citrus embryonic cells with *Agrobacterium tumefaciens* that was induced with 200 μmol °L<sup>-1</sup> Acetosyringone (As). More clones resistant to kanamycine (90 mg °L<sup>-1</sup>) were obtained by the treatment of 2 days co-cultivation of citrus embryonic cells with *Agrobacterium tumefaciens*.

**Key words:** cecropin D gene; citrus; embryonic cells; genetic transformation

【责任编辑 柴 焰】