

农杆菌介导佛手遗传转化主要影响因素的研究

周春丽^{1,3}, 郭卫东^{2*}, 路梅², 陈瑾², 李玉萍¹

(1. 江西科技师范学院生命科学院, 南昌 330013; 2. 浙江师范大学环境与生命科学院,

浙江 金华 321004; 3. 西北农林科技大学园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 采用根癌农杆菌介导的佛手叶盘转化法, 在建立转海藻糖合酶基因 (*TPS*) 佛手体系过程中, 对影响农杆菌转化频率的各种因素进行了研究。结果表明, 佛手叶盘需在黑暗条件下 MT 培养基上预培养 2-3 d, 与农杆菌共培养 3 d 较合适; 农杆菌菌液浓度 OD₆₀₀ 约为 0.6-0.8, 感染时间 20 min; 抑制农杆菌生长的抗生素浓度以头孢霉素 (Cef) 250 mg L⁻¹ 和羧苄青霉素 (Cb) 250 mg L⁻¹ 且延迟筛选时间 4 d 最好; 共培养基中添加 100 μmol/L 乙酰丁香酮 (AS) 和 400 mg L⁻¹ 半胱氨酸 (L-Cys) 对佛手遗传转化有明显的促进作用。经 *GUS* 报告基因和 PCR 技术检测, 初步证实 *TPS* 基因已整合到佛手基因组中, 且 *GUS* 报告基因瞬时表达率为 5.9%。

关键词: 佛手; 农杆菌; 遗传转化; 海藻糖合酶基因 (*TPS*)

中图分类号: Q813

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)05-0374-08

Factors Effecting the Transformation of *Citrus medica* L. var. *sarcodactlis* Mediated by *Agrobacterium*

ZHOU Chun-li^{1,3}, GUO Wei-dong^{2*}, LU Mei², CHEN Jin², LI Yu-ping¹

(1. College of Life Sciences, Jiangxi Normal University of Science and Technology, Nanchang 330013, China;

2. Academy of Life and Environment Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China;

3. College of Horticulture, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus medica* L. var. *sarcodactlis* was performed by leaf disc. The binary vector harbors the gene of interest *TPS* and *NPTII* gene driven by CaMV 35S promoter. The presence of *TPS* gene integration in the genome was detected and confirmed by *GUS* assay and PCR, respectively. Transformation parameters optimized were bacterial concentration, pre-culture period, immersion time, concentrations of antibiotics (cefotaxime, Cef and carbenicilline, Cb) and reagents (acetosyringone, AS and L-cysteine, L-Cys). Results were obtained based on the percentage of *GUS* positive transient expression. *A. tumefaciens* strain LBA4404 at OD_{600 nm} 0.6 showed the highest virulence on the leaf explants of *C. medica* with 20 min of immersion. Two to three days of pre-culture on MT medium in dark and 3 days of co-cultivation were optimum for *C. medica*. The mixture containing 250 ml L⁻¹ Cef and 250 ml L⁻¹ Cb gave the highest rate of callus induction for *C. medica*. Addition of 100 μmol/L AS and 400 mol/L L-Cys enhanced the transformation efficiency of *C. medica*. Under the optimal condition, the percentage of *GUS* transient expression was 5.9%.

Key words: *Citrus medica* L. var. *sarcodactlis*; *Agrobacterium*; Genetic transformation; Trehalose synthase gene

收稿日期: 2005-12-16 接受日期: 2006-04-17

基金项目: 浙江省科技计划项目 (2003C32043) 资助

* 通讯作者 Corresponding author

佛手(*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle), 为芸香科柑桔属枸橼类植物香橼的变种, 常绿小乔木或灌木。我国的浙江、广东、广西、云南、四川等地都有零星栽培, 其中在浙江金华种植面积最大, 且品质最佳。佛手是我国特有的一种重要赏果植物, 同时又具有良好的药用价值, 其根、茎、叶、花、果均可入药, 具有舒肝理气、和胃止痛、祛湿化痰、抗肿瘤和提高抗应激能力等功效, 是传统的名贵中药^[1], 开发利用前景广阔。

但是, 目前我国佛手品种少, 其抗寒力较差, 严重制约了佛手产业的发展。在浙江, 佛手必须在塑料大棚或日光温室内才能安全越冬, 这无疑增加了生产成本。此外, 金华现有的佛手品种虽然比广佛手、川佛手株形矮小, 但还不能满足培育袖珍型佛手盆景精品的要求。另外, 佛手果实贮存过程中失水萎蔫的现象也有待改善。佛手是由子房壁发育成果实, 不产生种子, 进行常规的杂交育种很困难, 通过传统的杂交育种方法改良性状难度较大, 而突变育种又具有盲目性, 很难选育出同时改良上述三种性状的新品种。现今, 基因工程已经广泛应用于多种作物的性状改良, 是一种有效的定向改良性状的技术手段^[2-3]。海藻糖合酶基因是一种抗寒基因, 一旦整合到佛手基因组中, 通过海藻糖合酶基因的表达使佛手植株内大量累积海藻糖, 从而能提高植株的抗寒能力, 当累积量足够大时又能阻碍植物的旺盛生长, 达到矮化目的^[4]。同时海藻糖的累积还能使植物器官离体后不易失水萎蔫, 有利于贮藏保鲜。

目前, 佛手再生体系和基因转化的研究报道很少, 在国内, 仅有广佛手^[5]和金佛手组织培养^[6]及利用基因枪方法探索转化金佛手^[7]的研究报道。在国外, 尚未见研究报道。本研究利用海藻糖合酶基因探讨农杆菌介导转化佛手的可行性, 对影响农杆菌介导的佛手遗传转化条件进行初步探索, 以期为最终能建立佛手的转基因技术体系和转基因育种研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

金华佛手(*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle), 取自浙江师范大学生化学院实验材料基地和张锦林佛手基地。取健康幼嫩的佛手叶片作为外植体。

1.2 实验菌株

农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, 由海南热带农业科学院生物技术研究所提供, 含有目的 *TPS* 基因、*NPTII* (新霉素磷酸转移酶) 基因 (抗卡那霉素, Km^+), *NOS* 基因、*GUS* (β - 葡糖苷酸酶) 报告基因。以上基因的表达由 *CaMV35S* 启动子调控。

1.3 实验设计

1.3.1 菌种的活化和预处理

取出在 -70°C 下保存的农杆菌菌株 LBA4404, 涂平板接种于附加 $50\text{ mg L}^{-1} Km$ 的 YEP[®] (Yeast Extract Peptone) 平板上, 在 28°C 下倒置培养 36 h, 待菌落长出, 挑取一个单菌落, 接种于 30 ml 附加 $50\text{ mg L}^{-1} Km$ 的 YEP 液体培养基中, 28°C 下置摇床上震荡培养 (200 r min^{-1} , 16–20 h), 进行预活化。取 $100\ \mu\text{l}$ 菌液接种于 30 ml 相同培养基中, 在相同条件下培养至对数生长期。取对数生长期菌液在室温下 $5\ 465\ \text{xg}$ 离心 10 min, 弃上清液, 以 MT (Murashige and Tucker)[®] 液体培养基 (不加琼脂, $\text{pH}=7$) 重悬菌体 (1:100), 用于转化。

1.3.2 佛手叶预培养

把佛手叶用自来水漂洗, 70% 乙醇消毒 30 s, 0.1% 的升汞消毒 20–25 min, 无菌水冲洗 3–4 遍, 剪成约 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 大小的叶盘, 接种于愈伤组织诱导培养基 MT (含 $1.5\text{ mg L}^{-1} 2,4\text{-D}$, $1.0\text{ mg L}^{-1} \text{NAA}$ 和 $0.4\text{ mg L}^{-1} 6\text{-BA}$) 上预培养 0 d、1 d、2 d、3 d、4 d。预培养条件: 28°C , 暗培养。

1.3.3 农杆菌介导佛手过程

设置不同浓度的农杆菌和侵染时间 (图 1), 其间不停摇动。将侵染后的外植体取出, 用无菌滤纸将多余菌液吸干, 移至诱导培养基 MT 上, 进行共培养, 用附加有 500 mg L^{-1} 头孢霉素 (Cef) 和 400 mg L^{-1} 羧苄青霉素 (Cb) 的无菌水洗 3–4 遍, 再用无菌滤纸吸干残留液体, 最后分别转接到附加不同浓度的 Cef 和 Cb 的 MT 培养基中, 进行抑菌处理, 最后转移到筛选培养基 ($\text{MT}+50\text{ mg L}^{-1} Km^+$) 上培养 2 周。农杆菌介导的佛手转化过程见图 1。

1.3.4 乙酰丁香酮 (AS) 和半胱氨酸 (L-Cys) 的添加

AS 的添加设计: YEP + $100\ \mu\text{mol/L AS}$, MT; YEP + $100\ \mu\text{mol/L AS}$, MT + $100\ \mu\text{mol/L AS}$; YEP, MT + $100\ \mu\text{mol/L AS}$; 设空白对照 YEP, MT。

L-Cys 的添加设计: MT + $400\text{ mg L}^{-1} \text{L-Cys}$; 设

空白对照 MT。

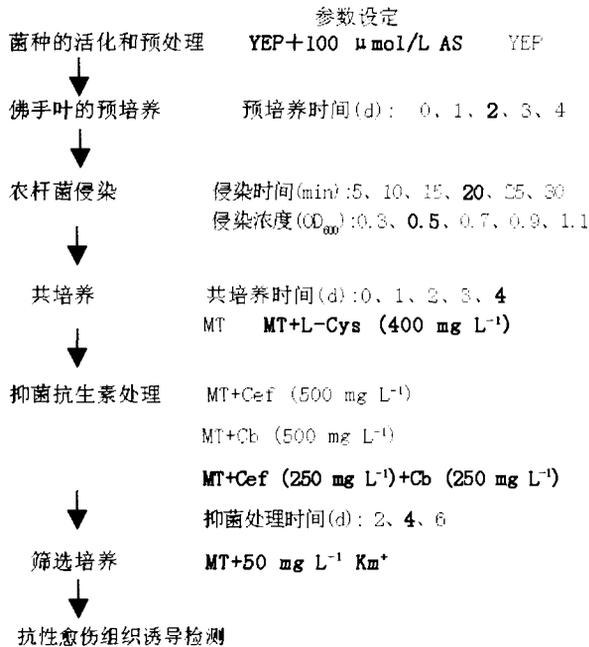


图 1 转化参数优化步骤

Fig. 1 Procedure for screening optimum parameters

粗体字示最优参数, 各步最优参数均作为后步实验参数。The optimum parameters are presented in bold which are used for the following steps.

1.4 抗性愈伤组织诱导检测

1.4.1 抗性愈伤组织观察

统计分析叶盘的愈伤组织诱导率和农杆菌被抑制的情况。愈伤组织质地疏松, 黄绿色且活力强者是抗 Km, 反之, 则为不抗 Km。

1.4.2 GUS 报告基因活性的检测

GUS 组织化学染色液 磷酸缓冲液 100 mmol/L, Na₂EDTA 10 mmol/L, K₃Fe(CN)₆ 0.5 mmol/L, K₄Fe(CN)₆ 0.5 mmol/L, TritonX-100 0.1%, MeOH 10%, X-gluc 0.5 mg ml⁻¹。

染色操作步骤 按王关林等^[10]的方法。在浸染后的叶盘中加入 GUS 染液至淹没叶盘; 真空抽气 5 min, 37℃温育 3 h; 置 FAA 固定液脱色 3 h; 依次用 20%和 50%乙醇浸泡 2 h; 用 80%乙醇的 FAA 固定液脱色脱至白色; 镜检, 照相, 统计蓝色反应叶盘数和蓝色斑点数量; 将染色后的材料放在含 80%乙醇的 FAA 固定液中长期保存。

1.4.3 PCR 检测

佛手总 DNA 的提取, 参照王传堂^[11]的方法进

行适当改进, 将离心转速设为 24 336 ×g, 65℃水浴保温时间设为 40 min。PCR (Polymerase chain reaction)特异性引物为 p1: 5'-GCGGATCCATGGC-TCCCTCCCCACCAG-3'; p2: 5'-CCGGGCCCTCA-TCCCTGCACATGCAGTTCG-3'。反应程序为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 58℃退火 1 min, 72℃延伸 2.5 min, 循环 35 次; 72℃延伸 5 min, 4℃保存。空白对照为不加模板 DNA。

2 结果和分析

2.1 预培养时间对遗传转化的影响

预培养可以促进细胞分裂, 分裂状态的细胞更容易整合外源 DNA, 因而可以提高转化效率^[12]。在农杆菌感染叶片之前, 对外植体进行一定时间的预培养可以提高转化率, 未经预培养直接用农杆菌感染, 叶盘褐化现象十分严重且出现大量死亡, 在筛选培养基中几乎得不到愈伤组织, 预培养时间过短 (1 d) 叶盘愈伤组织诱导不明显或微弱, 感染后也会产生较严重的褐化和死亡现象, 转化率较低, 若预培养时间超过 4 d, 外植体伤口处呈膨大疏松状, 且伤口逐渐愈合致使农杆菌难以浸染, 从而使愈伤组织诱导率和转化效率降低。从表 1 可见, 进行 2-3 d 的预培养可以得到较高的 Km 抗性愈伤组织诱导率, 分别为 5.38%和 7.25%。

表 1 预培养时间对遗传转化的影响

Table 1 Effect of pre-culture period on transformation

预培养时间 Pre-culture time (d)	接种外植体数 No. of explants	抗性愈伤组织诱导率 Frequency of callus with Km ^r (%)
0	190	0.53
1	196	2.55
2	186	5.38
3	193	7.25
4	190	3.16

2.2 农杆菌感染时间和菌液浓度对遗传转化的影响

农杆菌感染的浓度和时间是影响转化率的一个重要因素。从表 2 可看出, 佛手叶片在农杆菌 OD₆₀₀ 值为 0.5-0.7, 感染 20 min 时效果较好, 抗性愈伤组织诱导率分别达到 2.38%和 2.44%。采用 OD₆₀₀ 值 0.3-1.1 进行短时间感染 (5 min), 尽管褐化程度减轻, 但感染时间过短, 农杆菌未能充分吸附到叶片受伤处细胞, 因而抗性愈伤组织诱导率很

表 2 农杆菌感染时间和浓度对遗传转化的影响

Table 2 Effect of bacterial concentration and immersion time on transformation

感染时间 Immersion time (min)	菌液浓度 (OD ₆₀₀) Bacterial concentration	外植体数 No. of explants	抗性愈伤组织诱导率(%) Frequency of callus with Km ^r
5	0.3	200	1.50
	0.5	215	1.86
	0.7	199	1.01
	0.9	224	0.89
	1.1	203	1.48
10	0.3	198	1.01
	0.5	202	1.49
	0.7	213	1.88
	0.9	220	1.82
	1.1	201	1.49
15	0.3	205	1.95
	0.5	207	1.93
	0.7	198	1.52
	0.9	204	0.98
	1.1	210	0.95
20	0.3	205	1.46
	0.5	210	2.38
	0.7	205	2.44
	0.9	199	1.01
	1.1	201	1.49
25	0.3	206	0.98
	0.5	193	1.55
	0.7	199	1.51
	0.9	200	1.00
	1.1	201	1.49
30	0.3	205	0.98
	0.5	211	0.95
	0.7	204	1.47

低; 感染时间超过 30 min 时, 即使菌液浓度较低 (OD₆₀₀ 值 0.5–0.9), 叶片也会出现褐化现象, 且抗性愈伤组织诱导率降低。

2.3 共培养时间对遗传转化的影响

共培养是转化过程中最为关键的一环。T-DNA 的转移及整合都在此时完成。农杆菌附着外植体后不能立即转化, 附着 16 h 之后才能诱发肿瘤经过“细胞调节期”, 使 T-DNA 发生转移^[3], 因此共培养时间必须长于 16 h。但共培养时间过长, 也可能导致农杆菌过度增殖使植物细胞受到毒害而死亡。农杆菌过度增殖主要由侵染时的菌液浓度过高引起, 因此侵染菌液必须稀释到合适浓度才能使用

不同的物种和外植体, 农杆菌的最佳共培养时间也不同。对于佛手叶而言, 共培养 3 d 是最合适的, 超过 3 d, 农杆菌生长过度, 外植体受到毒害, 在筛选过程中很快褐化、死亡 (表 3)。

表 3 共培养时间对遗传转化的影响

Table 3 Effect of co-culture time on transformation

共培养时间 Co-culture time (d)	外植体数 No. of explants	抗性愈伤组织诱导率 Frequency of callus with Km ^r (%)
1	185	1.00
2	245	1.41
3	233	2.44
4	216	1.91

2.4 抗生素的抑菌处理对遗传转化的影响

2.4.1 不同抗生素的抑菌效果

目前最常用的抑菌抗生素有羧苄青霉素 (Carbenicillin, Cb), 头孢霉素 (Cefotaxime, Cef)。由表 4 可知, 以单独用 Cb (500 mg L⁻¹) 抑菌时, 对农杆菌的抑制最明显 (外植体死亡率最低, 为 43.78%), 而单独使用 Cef (500 mg L⁻¹) 对农杆菌的抑制最不明显 (外植体死亡率升高达 67.35%), Cb+Cef 组合

(浓度各为 250 mg L⁻¹) 的抑菌效果介于上述二者之间, 但愈伤组织诱导率最高。可见, 两种抗生素组合使用的抑菌效果较好。

2.4.2 抑菌处理时间对遗传转化的影响

使用以 250 mg L⁻¹ Cef 和 250 mg L⁻¹ Cb 为组合, 进行抑菌处理, 结果见表 5。可见, 以抑菌处理 4 d 的效果最佳, 抗性愈伤组织诱导率达到 7.5% (表 5), 且褐化率最低, 为 4.7%。

表 4 不同抗生素对农杆菌抑菌效果及遗传转化的影响

Table 4 Effect of different antibiotics on the inhibition of *Agrobacterium* and transformation

抗生素 Antibiotic	浓度 (mg L ⁻¹) Concentration	接种数 No. of explants	死亡率 (%) Death rate	愈伤组织诱导率 (%) Callus induction frequency
Cb	500	65	43.78	1.56
Cef	500	60	67.35	0.12
Cb + Cef	250 + 250	68	45.31	4.52

表 5 抑菌处理时间对遗传转化的影响

Table 5 Effects of days of antibiotic treatment on transformation

抑菌处理时间 Days of antibiotic treatment	接种数 No. of explants	褐化率 Browning rate	愈伤组织诱导率 (%) Callus induction frequency
0	103	7.8	1.9
2	120	9.2	3.3
4	106	4.7	7.5
6	112	5.3	4.5

2.5 AS 和 L-Cys 对佛手转化效率的影响

有研究证明, 酚类化合物中诱导效果最佳的是 AS, 最适浓度为 50 mg L⁻¹⁰⁰。本研究经 3 代 (6 周) 筛选, 发现在 YEP 液体培养基和共培养基 (MT) 中同时加入 100 μmol/L AS 所诱导的抗性愈伤组织 (88.2%) 明显高于其它处理, 这说明 AS 对其转化有明显的促进作用。在共培养基中添加 L-Cys 的卡那霉素抗性愈伤组织诱导率是不加 L-Cys 的 1.74 倍。

2.6 GUS 瞬时表达率的影响

适当的菌液浓度对遗传转化的成败至关重要, 菌液浓度过低时, 会由于农杆菌细胞数目不足使得转化效率较低, 而菌液浓度过高, 则由于营养不足造成菌液中死菌数目过多, 具有感染能力的农杆菌数目实际减少, 此外, 菌体会产生某些有害代谢产物对植物细胞造成伤害。从表 7 可以看出, 在其它条件均为最优时, 当菌液浓度 OD₆₀₀ 值小于 0.6, GUS

表 6 AS 和 L-Cys 对遗传转化率的影响

Table 6 Effects of AS and L-Cys on transformation

添加剂 Reagent	浓度 (μmol/L) Concentration	培养基 Media	接种数 No. of explants	愈伤组织诱导率 (%) Callus induction frequency
AS	100	YEP	50	40
	100	YEP MT	51	88.2
	100	MT	49	44.9
	0	YEP MT	50	12
L-Cys	400	MT	50	80
	0	MT	50	46

表7 不同浓度菌液对的 *GUS* 瞬时表达率的影响
Table 7 Effects of different concentrations of bacterium on *GUS* transient expression

菌液浓度(OD ₆₀₀) Bacterial concentration	外植体数 No. of explants	<i>GUS</i> 瞬时表达率 (%) Percentage of <i>GUS</i> positive transient expression
0.2	50	0
0.4	55	0
0.6	51	5.9
0.8	53	3.8
1.0	51	0



图2 愈伤组织经农杆菌侵染后的 *GUS* 染色

Fig. 2 *GUS* staining of callus after *Agrobacterium* infection
A. OD₆₀₀ 0.6; B. OD₆₀₀ 0.8, ×10

均没有瞬时表达,当 OD₆₀₀ 值为 0.6 时, *GUS* 瞬时表达率达 5.9%, 当 OD₆₀₀ 值达到 0.8 时, *GUS* 的瞬时表达率下降到 3.8%, OD₆₀₀ 值继续增加到 1.0 时, *GUS* 不表达。综合表 2 结果, 发现 OD₆₀₀ 值为 0.5-0.8 时, 对佛手的愈伤组织诱导和转化都较适合。 *GUS* 的瞬时表达情况见图 2。蓝色斑点(箭头所示)即为 *GUS* 的表达。

2.7 抗性愈伤组织的分子生物学鉴定

为进一步确定佛手是否转化成功, 从在筛选培

养基上正常生长的愈伤组织中随机挑取 7 块进行 PCR 检测, 结果如图 3 所示, 其中 2 块经扩增得到 *TPS* 基因片段, 该片段大小与预期分子量(约 2.2 kb)一致, 其余抗性愈伤组织未扩增出该大小的片段。说明经过初步选择筛选出的转化体, 假阳性很高, 需要多种分子生物学方法加以鉴别。其中的 2 块虽然获得了阳性扩增片段, 亦只能初步断定为转化体, 还需要进一步作其它分子生物学检测。

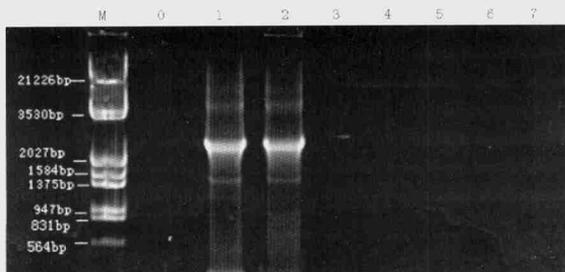


图3 抗性愈伤组织的 PCR 检测

Fig. 3 PCR analysis of Kanamycin-resistant callus

M: DNA Marker; 0: 对照 Control; 1-7: 经 Km 筛选后的愈伤组织 Callus after Kanamycin-resistant screening

3 讨论

本研究以金华佛手叶盘为受体材料,通过抗 Km 筛选,探讨了叶盘预培养、农杆菌浸染、共培养时间、AS 及 L-Cys 添加等多种因素对农杆菌介导佛手转化的影响,确定了适宜的转化条件。比较各种参数,我们认为 AS 和 L-Cys 的添加对转化影响较大。刘明志^[14]、林树柱^[15]、王永勤^[16]等在进行农杆菌介导的胡萝卜 (*Daucus carota*) 悬浮细胞、大豆 (*Glycine max*)、小麦 (*Triticum aestivum*) 转化中都采用了 AS,他们仅在共培养基、预培养基中添加 AS,取得了显著的效果。本研究发现,同时在培养农杆菌和共培养过程中添加 100 $\mu\text{mol/L}$ AS 可显著提高抗卡那霉素愈伤组织的诱导率。L-Cys 具有抑制褐变的作用^[17]。Olhoft 通过在共培养基中附加适量的硫化物包括硫酸钠、dithiothreitol 和 L-Cys 共培养,获得从平均 0.7% 增加到 16.4% 的转化率^[18]。Pei 在大豆遗传转化中的共培养基中加入 400 mg L^{-1} L-Cys,增加了农杆菌浸染能力、提高了转化效率,平衡了除草剂选择压和农杆菌浸染之间的关系,优化了选择体系^[19]。本研究参考 Pei 的方法,在共培养基中添加 400 mg L^{-1} L-Cys,发现其明显抑制了佛手叶盘褐化。这与 Pei 的研究结论相吻合。此外,许多试验研究了菌液浓度和浸染时间、共培养、预培养^[20-21]对转化的影响,尽管所试材料和菌株不同,但获得的一般结果是:预培养 2-3 d,共培养 3-4 d,菌液浓度 OD_{600} 0.5-1.0,浸染时间 15-20 min。本研究结果与此一致。

选择适宜的能抑制农杆菌生长的抗生素也是必须的,Cef、Cb、Cef + Cb 均可达到除菌效果,芸香科植物因品种不同所用抑菌抗生素种类和浓度也不同,转化枳壳 (*Poncirus trifoliata*) 用 300 mg L^{-1} 的 Cef^[22],而转化沙田柚 (*Citrus grandis*) 采用 50 mg L^{-1} Cb 抑菌^[23]。本实验中使用 250 mg L^{-1} Cef + 250 mg L^{-1} Cb,与荨麻科植物苧麻 (*Boehmeria nivea*) 所用抑菌抗生素种类一致,但浓度不同^[24]。抑菌处理可以使经农杆菌感染后的外植体生理状态有一个恢复过程,有利于转化细胞的增殖。另外,当外源基因进入受体细胞后,整合与表达以及表达量的积累都需要有一个过程。前人在研究西兰花 (*Brassica oleracea* var. *italica*) 和卷心菜 (*B. oleracea* var. *capitata*) 转化时,认为抑菌处理时间的

长短会影响到转化的成败^[25]。本研究结果与他们的结论一致。

佛手为芸香科植物,绝大多数芸香科的柑橘品种都对农杆菌比较敏感^[3],佛手也不例外。本文利用农杆菌方法转化海藻糖合酶基因,优化了一系列影响转化的因子,获得了外源基因的瞬时表达,利用分子生物学方法初步检测到外源基因整合到植物基因组中。我们曾利用基因枪方法探索佛手转化条件^[2],同样筛选了影响此方法转化效率的几个关键因子,获得了较高的 GUS 瞬时表达率(最高瞬时表达率达 17.8%),但未得到 GUS 的稳定表达。我们认为,两种方法各有优缺点,农杆菌方法步骤繁琐,工作量大,但实验成本低,常规的实验器材和药品即可操作。基因枪方法步骤简单易行,但实验成本非常高,特别是基因枪仪器昂贵。因为两种方法的重复次数有限,从初步得出的实验结果和植物材料特性出发,我们建议使用农杆菌方法,既节约成本,又能达到目的。

对于初步鉴定的抗性愈伤组织,目前首要的工作是建立佛手高效再生体系。同时,还需要做进一步分子生物学检测,如 GUS 稳定表达和 Southern 杂交。

参考文献

- [1] Chen P(陈鹏), Wang L(王莉), Gu Y J(顾跃君), et al. Study on the leaf-purpose characters of finger-citron [J]. J Yangzhou Univ (Agri Life Sci) (扬州大学学报 农业与生命科学版), 2004, 25(3):74-78.(in Chinese)
- [2] Jiang D(蒋迪), Xu C J(徐昌杰), Chen D M(陈大明). Status and prospect of research in *Citrus* transgene [J]. Fruit Sci(果树学报), 2002, 19(1):48-52.(in Chinese)
- [3] Wang Z C(王子成), Deng X X(邓秀新). Progress of transgenic research in *Citrus* [J]. J Huazhong Agri Univ(华中农业大学学报), 2002, 21(5):494-499.(in Chinese)
- [4] Penna S S. Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants [J]. Trends Plant Sci, 2003, 8(8): 355-357.
- [5] Zhang G F(张桂芳), He H(贺红). A study on the control contamination on tissue culture of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* [J]. Chin Arch Trad Chin Med(中医学刊), 2005, 23(2):269-296.(in Chinese)
- [6] Zhou C L(周春丽), Guo W D(郭卫东), Zhang Y Y(张燕燕). Selective test of sensitivity to Kanamycin and tissue culture of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* [J]. Northwest For Univ (西北林学院学报), 2005, 20(4):76-79.(in Chinese)
- [7] Zhou C L(周春丽), Guo W D(郭卫东), Wang D J(王德解), et al.

- Exploration of the transformation parameters of leaf discs of bergamot by particle bombardment in virtue of transient expression of *GUS* gene [J]. *Acta Bot Boreal-Occid Sin*(西北植物学报), 2005, 25(11):2145-2150.(in Chinese)
- [8] Li Z M(李志邈), Zhang H K(张海扩), Cao J S(曹家树), et al. Construction of an activation tagging library of *Arabidopsis* and cloning for mutant genes [J]. *Plant Physiol Mol Biol*(植物生理与分子生物学学报), 2005, 31(5):499-506.(in Chinese)
- [9] Murashige T, Tucker D P H. Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture [J]. *Proc First Int Citrus Symp*, 1969, 3:1155-1161.
- [10] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 第一版, 北京: 科学出版社, 1998. 562-564.
- [11] Wang C T(王传堂), Huang Y(黄粤), Yang X D(杨新道), et al. Isolation of DNA from peanut: Comparison between modified CTAB and high salt, low pH method [J]. *Peanut Sci*(花生学报), 2002, 31(3):20-23.(in Chinese)
- [12] Wang Y(王瑶), Lin M L(林木兰). Xylophyta genetic transformation by *Agrobacterium* [J]. *Biotechn Inform*(生物技术通报), 1999, 16(6):23-27.(in Chinese)
- [13] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 2002. 393.
- [14] Liu M Z(刘明志). Promotion of carrot suspension cell transformation and plant regeneration by *Agrobacterium* harboring binary vector pretreated with phenolic compounds [J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 1996, 38(3):203-208.(in Chinese)
- [15] Lin S Z(林树柱), Cao Y P(曹越平), Wei Z M(卫志明). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of soybean [J]. *Biotechnology*(生物工程学报), 2004, 20(6):817-820.(in Chinese)
- [16] Wang Y Q(王永勤), Xiao X G(肖兴国), Zhang A M(张爱民). Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Acta Genet Sin*(遗传学报), 2002, 29(3):260-265.(in Chinese)
- [17] Richard-Forget F C, Rouet-Mayer M A, Goupy P M, et al. Oxidation of chorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by apple polyphenol oxidase [J]. *Agri Food Chem*, 1992, 40:2114-2122.
- [18] Olhoft P M, Fligel L E, Donovan C M, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary node method [J]. *Planta*, 2003, 216:723-735.
- [19] Zeng P Y, Schlereth J, Wang L, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of elite public soybean genotypes for soybean functional genome study [J]. *Plant Anim Micro Genom Conf*, 2002, 1:12-16.
- [20] Wu G T(吴关庭), Hu Z H(胡张华), Lang C X(郎春秀), et al. Establish of *Agrobacterium*-mediated transformation system for tall fescue [J]. *Acta Agri Nucl Sin*(核农学报), 2005, 19(5):340-346.(in Chinese)
- [21] Gao L P(高莉萍), Bao M Z(包满珠). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation *Rosa hybrida* [J]. *J Beijing For Univ*(北京林业大学学报), 2005, 27(4):60-64.(in Chinese)
- [22] He H(贺红), Pan R C(潘瑞焱), Han M L(韩美丽), et al. *In vitro* culture of explants and the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Poncirus trifoliata* [J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 1998, 20(4):459-463.(in Chinese)
- [23] Han M L(韩美丽), Wu Y J(吴耀军), Lu R S(陆荣生), et al. Preliminary study on establishing high efficiency transformation system in *Citrus grandis* (L.) Osbeck cv. [J]. *Guangxi For Sci*(广西林业科学), 2005, 34(1):1-4.(in Chinese)
- [24] Chen J R(陈建荣), Guo Q Q(郭清泉), Zhang X W(张学文), et al. Study on *Agrobacterium*-mediated transformation system of ramie leaves [J]. *Chin Agri Sci Bull*(中国农学通报), 2005, 21(6):63-66.(in Chinese)
- [25] Metz T D, Dixit R, Earle E D. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*) [J]. *Plant Cell Rep*, 1995, 15:287-292.