

# 以 *PMI* 为选择标记基因的雪柑遗传转化体系的优化

王会全<sup>1</sup>, 吴少华<sup>2</sup>, 余志雄<sup>1\*</sup>

(1. 福建农业职业技术学院, 福建福州 350119; 2. 福建农林大学园艺植物天然产物研究所, 福建福州 350002)

**摘要** [目的]以 *PMI* 为选择标记基因对雪柑的遗传转化体系进行优化。[方法]对农杆菌的菌液浓度、实生苗培养条件、甘露糖筛选压、2,4-D 浓度、2,4-D 预处理时间、农杆菌侵染时间、共培养时间进行梯度试验来研究转化后的再生率,并对筛选培养基中 6-BA 和 NAA 不同浓度组合进行试验来研究抗性大苗的筛选。[结果]经过暗培养 20 d 光培养 10 d 条件的实生苗外植体在农杆菌菌液 OD<sub>600</sub> 为 0.6, 1.0 mg/L 2,4-D 预处理 3 h, 农杆菌侵染 30 min, 共培养时间 4 d, 筛选压为甘露糖 20 g/L 的情况下转化后的再生率大大提高,而在筛选培养基中加入 2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 有助于抗性大苗的筛选。[结论]通过对影响转化的各种因素的优化试验建立了雪柑以 *PMI* 基因/甘露糖选择标记系统的高效遗传转化体系。

**关键词** 柑橘; 6-磷酸甘露糖异构酶; 遗传转化

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)36-0083-07

## Optimization of Genetic Transformation System of 'Xuegan' Based on the *PMI* Selection System

WANG Hui-quan<sup>1</sup>, WU Shao-hua<sup>2</sup>, YU Zhi-xiong<sup>1</sup> (1. Fujian Vocational College of Agriculture, Fuzhou, Fujian 350119; 2. Institute of Natural Products of Horticultural Plants, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002)

**Abstract** [Objective] To optimize the genetic transformation system of *Citrus* using *PMI* as a selective marker gene. [Method] Gradient experiments were carried out to study the regeneration frequency of 'Xuegan' by the concentration of bacterial solution, culture condition of seedlings, screening pressure of mannose, concentration of 2,4-D, pretreatment time of 2,4-D, infection time of *Agrobacterium* and co-culture time. The selection of resistant plantlets with different concentrations of 6-BA and NAA in screening medium was studied. [Result] The seedling explants cultured under dark culture for 20 days and light culture for 10 days were pretreated with *Agrobacterium* solution OD<sub>600</sub> for 0.6, 1.0 mg/L, 2,4-D for 3 hours, infected with *Agrobacterium* for 30 minutes, co-cultured for 4 days, and pressed with mannose for 20 g/L. The regeneration frequency of transformed seedlings was greatly increased, while 2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA added to the screening medium was helpful for screening resistant seedlings. [Conclusion] An efficient genetic transformation system of 'Xuegan' with *PMI* gene/mannose selective marker system was established by optimizing the factors affecting transformation.

**Key words** *Citrus*; 6-phosphomannose isomerase; Genetic transformation

柑橘 (*Citrus* L.) 是当今世界种植面积最大的果树,也是我国南方重要的经济果树。但柑橘作为多年生木本果树,由于童期长、遗传高度杂合性和多胚现象,柑橘育种工作困难重重。不同品种间会有 6~20 年的漫长童期<sup>[1]</sup>,这使得常规育种周期变得很长。柑橘转基因技术在过去的十多年中取得了长足的进展,为柑橘育种开辟了一条新途径。在柑橘基因转化研究中,大多采用上胚轴、子叶、试管苗叶片、茎段等未度过童期的组织作为基因转化受体,由此得到的转基因植株同样具有童期长的缺点,且转基因植株的园艺与商品性状评价往往需要很长时间。因此,缩短童期是育种工作者的重要目标之一。

目前,转基因作物的安全性问题受到极大关注。利用遗传转化技术改良柑橘品种首先要考虑生物安全性问题,其中主要是选择标记基因的使用。使用安全的选择标记基因也是最有效的方法,这些标记基因与常规标记基因不同,没有抗生素或除草剂抗性,相对来说对生物和环境是安全的。因此,安全的选择标记基因在今后的转基因研究中将具有重要的战略意义。笔者以福建传统优良甜橙品种雪柑 (*C. sinensis* L. Osb.) 为材料,在初步建立以 *PMI* (Phospho-mannose-isomerase, 磷酸甘露糖异构酶) 基因为选择标记转基因体系的基础

上<sup>[2]</sup>,进一步优化转化体系,建立雪柑转基因技术平台,为雪柑的遗传改良、基因功能研究等奠定基础,并为其他柑橘种类转基因研究中利用这一安全的选择标记系统提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 植物材料。**从新鲜成熟雪柑果实中取出种子,选取粒大饱满的完好种子,在无菌条件下于 70% 乙醇中浸泡 30 s,再用 0.1% 升汞消毒 8 min,用无菌水清洗 5~6 次,剥去外种皮,划破内种皮,接种于实生苗培养基上,在 16 h/d (光/暗) 周期下,光照度为 1 500 lx, (25±2) °C 培养。取暗培养 10 d、光照 20 d 左右的上胚轴为材料,纵切法切取 1 cm 左右上胚轴为转化材料,每次转化所用的雪柑上胚轴约 90 个。

**1.1.2 菌株及质粒。**根癌农杆菌 EHA105、双元载体质粒 pC1301-*PMI*-*LFY* 均由福建农林大学园艺学院遗传育种实验室提供,载体结构如图 1 所示。

**1.1.3 培养基及培养条件。**基本培养基: MS; 实生苗培养基: 1/2MS+蔗糖 15 g/L; 共培养培养基 CM: MS+蔗糖 30 g/L; 筛选培养基 SMS: MS+BA 2 mg/L+20 g/L 甘露糖+Carb 250 mg/L。

所用培养基均添加 7 g/L 琼脂粉,液体培养基不添加琼脂粉。用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 5.8, 121 °C 灭菌 20 min。光照培养的光照时间为 16 h/d, 光照强度为 1 500 lx, 温度 (25±2) °C。

## 1.2 方法

**1.2.1 E/pC1301-*PMI*-*LFY* 农杆菌侵染液的准备。**将超低

**基金项目** 福建省教育厅青年基金项目 (JA12423); 福建农业职业技术学院青年项目 (2016JS0004)。

**作者简介** 王会全 (1982—), 男, 山东济南人, 讲师, 博士, 从事园艺作物生产技术及分子生物学研究。\* 通讯作者, 副教授, 硕士生导师, 从事植物生理生化技术与教学工作。

**收稿日期** 2018-08-17

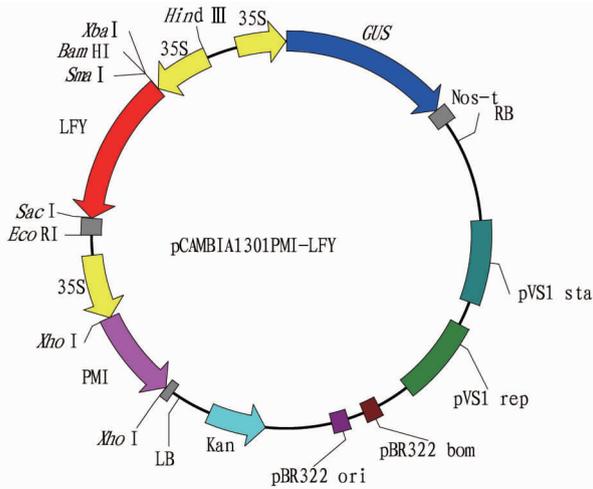


图1 重组载体 pC1301-PMI-LFY

Fig.1 Recombinant expression vectors pC1301-PMI-LFY

温保存的工程菌液接种在加有 100 mg/L Kan 和 100 mg/L Str 的 YEB 培养基上划线培养,28 ℃活化 36 h 左右,挑单菌落于 YEB 液体培养基(Kan、Str 100 mg/L)中 220 r/min 摇床过夜培养,OD<sub>600</sub> 为 0.6 左右。取菌液分装于已灭菌的 50 mL Eppendorf 管中,5 000 r/min 离心 20 min,去上清液,用等体积 MS 液体培养基重悬,220 r/min 摇床适应性培养 2 h 后,再离心、等体积 MS 重悬,稀释测其 OD<sub>600</sub>。

**1.2.2 转化的基本程序。**①取暗培养 10 d 光照培养 20 d 左右无菌雪柑实生苗的上胚轴为外植体。②将上胚轴横切成 1 cm 左右小段,再用手术刀纵切一分为二,置于盛有 2,4-D 0.5 mg/L 的无菌三角瓶中,浸泡 2 h。③预处理后,将制备好的农杆菌侵染液(OD<sub>600</sub> 为 0.4 左右)倒入无菌三角瓶中,摇动三角瓶使菌液与外植体充分接触,侵染 20 min,期间轻微振荡。④用滤纸吸干上胚轴上的菌液,纵切切口水平朝上放置于共培养培养基 CM:MS+蔗糖 30 g/L+2,4-D 0.5 mg/L 中,25 ℃黑暗条件下共培养 3 d。⑤将共培养后的上胚轴用含 250 mg/L 羧苄青霉素的无菌水洗 5~6 次,放置于无菌滤纸上吸干水分,转入附加 250 mg/L 羧苄青霉素的诱导筛选培养基 SMS:MS+BA 2 mg/L+20 g/L 甘露糖+ Carb 250 mg/L 中,光下培养。

**1.3 遗传转化条件的优化** 对影响转化率的各个因素进行优化,在单个参数优化试验中,如无特殊说明,按照以上转化基本程序进行,光下培养 30 d 后统计分化率和大苗分化率,筛选单因素的最优梯度。大苗:高度约为 1 cm 的抗性单株;分化率=至少 1 个抗性芽外植体/总外植体数×100%;大苗分化率=至少 1 个抗性单株/总外植体数×100%。

**1.3.1 农杆菌菌液不同 OD<sub>600</sub> 值对转化的影响。**农杆菌侵染液 OD<sub>600</sub> 梯度值分别为 0.1、0.4、0.6,农杆菌侵染后接种于培养皿中,每个处理接种 30 个外植体,每个处理 3 个重复,光下培养 30 d 后统计数据。

**1.3.2 不同甘露糖筛选压对转化的影响。**在筛选培养基 SMS 中,甘露糖(M)/蔗糖(S)浓度梯度设置为 30/0、20/0、20/10、25/5、15/5(g/L),每个处理接种 30 个外植体,每个处

理 3 个重复,观察甘露糖筛选压对转化的影响。

**1.3.3 雪柑无菌实生苗不同培养条件对转化的影响。**分别取完全暗培养 30 d、暗培养 10 d 光照 20 d、暗培养 20 d 光照 10 d、完全光照 30 d 的雪柑上胚轴进行转化,每个处理接种 30 个外植体,每个处理 3 个重复,观察实生苗不同培养条件对转化的影响。

**1.3.4 不同侵染时间对转化的影响。**农杆菌侵染外植体时间梯度设置为 20、30、40 min,每个处理接种 30 个外植体,每个处理 3 个重复,观察侵染时间对转化的影响。

**1.3.5 不同共培养时间对转化的影响。**外植体经农杆菌侵染后接入共培养培养基 CM 中,共培养时间梯度为 2、3、4、5 d,每个处理接种 30 个外植体,每个处理 3 个重复,观察共培养时间对转化的影响。

**1.3.6 预处理时 2,4-D 浓度对转化的影响。**在农杆菌侵染前将外植体放入附加不同浓度 2,4-D 的 MS 液体培养基中浸泡 3 h,浓度梯度为 0.5、1.0 mg/L,每个处理接种 30 个外植体,每个处理 3 个重复,比较不同浓度 2,4-D 预处理对转化的影响。同时,在共培养培养基添加相应浓度 2,4-D。

**1.3.7 2,4-D 预处理时间对转化的影响。**2,4-D 预处理时间梯度设置为 0、2、3、12、24 h。前 3 个处理用加入 2,4-D 的 MS 液体培养基浸泡,后 2 个处理用加入 2,4-D 的 MS 固体培养基培养。每个处理接种 30 个外植体,每个处理 3 个重复。同时,在共培养培养基中添加相应浓度的 2,4-D。

**1.3.8 筛选培养基 SMS 中不同生长调节剂对转化的影响。**共培养后,在 SMS 培养基中分别加入 BA 2 mg/L、BA 3 mg/L、BA 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L、BA 1 mg/L + NAA 0.5 mg/L、ZT 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L、ZT 1 mg/L + NAA 0.5 mg/L,每个处理接种 30 个外植体,每个处理 3 个重复,30 d 后观察生长调节剂对转化的影响。

## 2 结果与分析

**2.1 不同 OD<sub>600</sub> 值对转化的影响** 植物外植体进行农杆菌侵染时,菌液浓度对转化频率影响较大。菌液浓度过高会导致共培养时农杆菌过度生长,造成外植体褐化死亡;菌液浓度过低,则不能使足够的农杆菌附着在外植体的伤口处,导致转化效率严重下降<sup>[3]</sup>。

从表 1 可以看出,OD<sub>600</sub> 为 0.6 时,抗性外植体和大苗分化率远远高于其他 2 个梯度,在共培养和筛选培养时没有发现农杆菌的过度生长。在 OD<sub>600</sub> 为 0.1 和 0.4 的情况下,分化率差异不显著( $P>0.01$ )。因此,在进行雪柑外植体转化时较适合菌液浓度的 OD<sub>600</sub> 为 0.6(图 2)。

**2.2 不同甘露糖筛选压对转化的影响** 在以 PMI 基因为选择标记的遗传转化体系中,必须以甘露糖作为筛选剂。而雪柑上胚轴不定芽的诱导不能以甘露糖作为碳源<sup>[2]</sup>,所以在 SMS 中设置了甘露糖和蔗糖的不同浓度梯度。从表 2 可以看出,在 SMS 培养基中加入不同浓度的蔗糖后,抗性外植体的分化率会比单纯加入甘露糖的培养基分化率要高,但这样也同时增加了假阳性芽苗的比例。在 20 g/L 甘露糖+10 g/L 蔗糖和 25 g/L 甘露糖+5 g/L 蔗糖 2 个浓度梯度时,外植体

纵切面上出现大量的愈伤组织,随后在愈伤组织的表面形成芽,不过这些芽大多都有玻璃化现象;这些玻璃化的芽在以后的壮苗筛选中会黄化死亡,很难生长为健壮单株。而在 SMS 培养基中单纯加入 30 g/L 甘露糖,比单纯加入 20 g/L

甘露糖时抗性外植体的分化率有明显降低,这样就减少了对阳性芽苗的筛选力度。所以在雪柑上胚轴转化时,筛选培养基 SMS 中适合的甘露糖浓度为 20 g/L(图 3)。

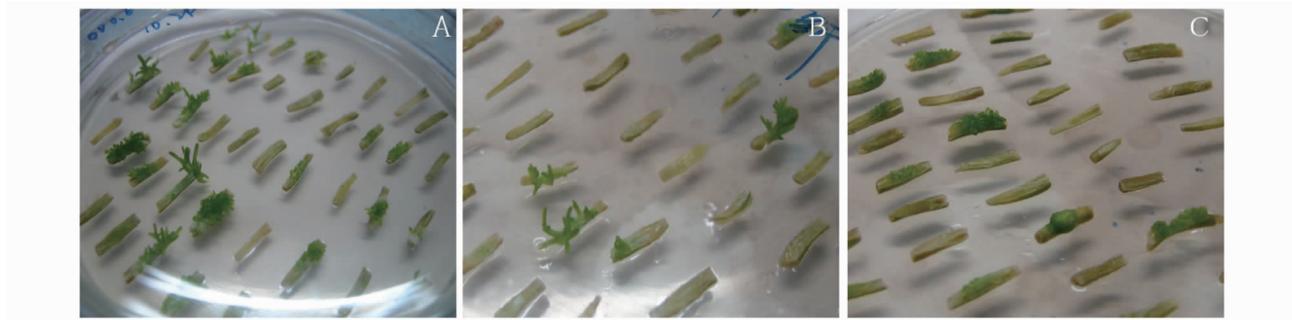
表 1 不同 OD<sub>600</sub>对转化的影响

Table 1 Effects of different OD<sub>600</sub> on transformation

OD <sub>600</sub>	外植体数 Number of explants//个	分化外植体数 Number of differentiated explants//个	分化大苗数 Number of differentiated seedlings//个	分化率 Differentiation rate //%	大苗分化率 Differentiation rate of seedling//%
0.6	112	70	13	61.3 A	10.8
0.4	119	29	6	24.5 B	5.3
0.1	94	15	0	13.2 B	0

注:邓肯氏新复极差测验,不同字母表示差异达极显著水平( $P=0.01$ )

Note: Different letters mean significantly different at the 0.01 level by Duncan's multiple range test



注: A. OD<sub>600</sub> = 0.6; B. OD<sub>600</sub> = 0.4; C. OD<sub>600</sub> = 0.1

图 2 不同 OD<sub>600</sub>对转化的影响效果

Fig.2 Effects of different OD<sub>600</sub> on transformation

表 2 不同甘露糖筛选压对转化的影响

Table 2 Effects of different mannose screening pressures on transformation

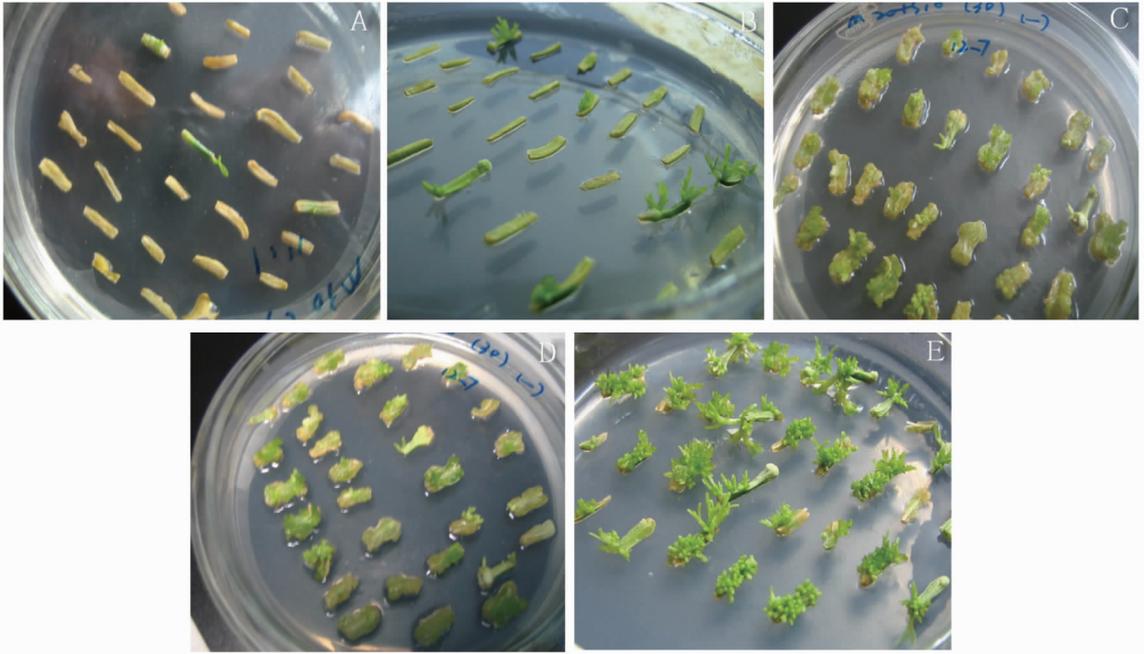
筛选压 Screening pressure//g/L		外植体数 Number of explants//个	分化外植体数 Number of differentiated explants//个	分化大苗数 Number of differentiated seedlings//个	分化率 Differentiation rate//%
甘露糖 Mannose	蔗糖 Sucrose				
30	0	80	6	0	7.30 C
20	0	90	24	0	26.67 BC
20	10	90	55	0	62.77 A
25	5	92	44	0	48.27 AB
15	5	91	71	7	78.17 A

注:邓肯氏新复极差测验,不同字母表示差异达极显著水平( $P=0.01$ )

Note: Different letters mean significantly different at the 0.01 level by Duncan's multiple range test

**2.3 雪柑无菌实生苗培养条件对转化的影响** 外植体的培养条件对转化也有影响。根据徐海峰<sup>[2]</sup>得出的结论:外植体的培养条件对雪柑不定芽的诱导存在影响,30 d 的雪柑上胚轴不定芽分化效率最高。由表 3 可知,暗培养 20 d 后再光培养 10 d 的上胚轴抗性外植体的分化率为 86.9%,大苗分化率为 14.3%,效果最好;完全光培养 30 d 的上胚轴抗性外植体分化率和大苗分化率分别为 17.6%和 0,效果最差;暗培养 10 d 光照 20 d 和完全暗培养 30 d 的上胚轴抗性外植体分化率和大苗分化率差异不显著( $P>0.01$ )。因此,以暗培养 20 d 光照 10 d 的上胚轴作为外植体进行农杆菌转化效果最好(图 4)。

**2.4 不同侵染时间对转化的影响** 用农杆菌对植物外植体进行侵染时,在一定的菌液浓度下,侵染时间是一个关键因素,时间不够附着在外植体上的农杆菌细胞不够数量,难以达到好的转化效果;而侵染时间过长又会引起植物外植体严重的农杆菌污染,即使加入高浓度的抑菌抗生素也是无法控制的。由表 4 可知,侵染 30 min 的分化率明显比 20 min 的高,达 57.2%;当侵染时间达 40 min 时,共培养 2 d 时即出现农杆菌污染,无法控制,近 1/4 外植体由于农杆菌生长过度而软腐黄化,这种现象在侵染 20、30 min 的处理中没有出现。因此,雪柑外植体用农杆菌进行侵染的最佳时间是 30 min。



注:A.30 g/L 甘露糖;B.20 g/L 甘露糖;C.20 g/L 甘露糖+10 g/L 蔗糖;D.25 g/L 甘露糖+5 g/L 蔗糖;E.15 g/L 甘露糖+5 g/L 蔗糖

Note: A. 30 g/L mannose;B.20 g/L mannose;C.20 g/L mannose + 10 g/L sucrose;D.25 g/L mannose + 5 g/L sucrose;E.15 g/L mannose + 5 g/L sucrose

图3 不同甘露糖筛选压对转化的影响效果

Fig.3 Effects of different mannose screening pressures on transformation

表3 不同雪柑上胚轴培养条件对转化的影响

Table 3 Effects of different culture conditions on transformation

苗龄 Seedling age	外植体数 Number of explants//个	分化外植体数 Number of differentiated explants//个	分化大苗数 Number of differentiated seedlings//个	分化率 Differentiation rate//%	大苗分化率 Differentiation rate of seedling//%
完全暗培养 Dark 30 d	86	37	3	41.3 B	3.3 BC
暗 10 d 光 20 d Dark 10 d, light 20 d	91	24	6	26.4 BC	6.7 AB
暗 20 d 光 10 d Dark 20 d, light 10 d	90	77	13	86.9 A	14.3 A
完全光培养 Light 30 d	92	16	0	17.6 C	0 C

注:邓肯氏新复极差测验,不同字母表示差异达极显著水平( $P=0.01$ )

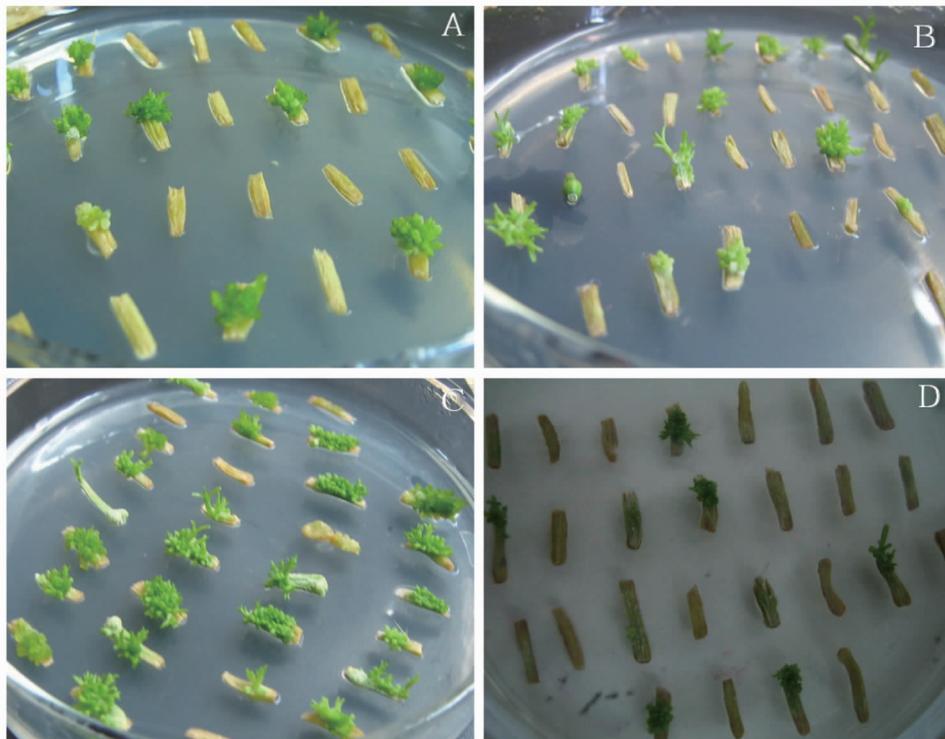
Note: Different letters mean significantly different at the 0.01 level by Duncan's multiple range test

**2.5 不同共培养时间对转化的影响** 农杆菌对植物外植体进行侵染时,必须在伤口部位存活 16 h 以上,才能进行 T-DNA 的转移,此期间涉及农杆菌向受伤部位的附着、Vir 区基因的诱导活化及 T-DNA 的转移整合<sup>[3]</sup>。在黑暗中共培养适当的时间能提高不定芽的再生效率和转化效率,对共培养时间的优化结果如表 5 所示;共培养 2 d 的抗性芽分化率只有 5.3%,其原因为培养时间过短,阻碍了 T-DNA 的有效转移;共培养 3 d 的分化率为 21.6%;共培养 4 d 的分化率最高达 45.1%;而共培养 5 d 时外植体出现大量的褐化死亡,其原因是农杆菌过度生长所致。从这个结果来看,共培养时间 4 d 是最佳的。

**2.6 不同 2,4-D 浓度预培养对转化的影响** 研究表明,2,4-D 在雪柑遗传转化中会不同程度地提高转化效率,而浓度过高会促进愈伤组织的形成,降低抗性外植体的分化效率<sup>[4]</sup>。故用添加 2 个浓度的 2,4-D 的 MS 液体培养基对外植体进行浸泡预处理 3 h,共培养培养基中加入相应浓度的

2,4-D。由表 6 可知,1.0 mg/L 2,4-D 处理后抗性外植体的分化率高达 58.2%,而 0.5 mg/L 2,4-D 处理的分化率只有 22.5%。所以选用 1.0 mg/L 的 2,4-D 对雪柑上胚轴进行预处理转化效果最好。

**2.7 不同预处理时间对转化的影响** 在预培养培养基中加入 2,4-D 起到了活化细胞、促进 T-DNA 转移的作用,但是预培养时间的长短对雪柑上胚轴的转化同样具有重要的影响。该试验在预处理培养基中加入 1.0 mg/L 2,4-D,同时在共培养培养基中加入 1.0 mg/L 2,4-D。从表 7 可以看出,预处理 3 h 时抗性外植体分化率最高达 62.7%;在 3 h 之前随着时间的增长,抗性外植体分化率逐渐增高;而经过长时间预处理时,抗性外植体分化率缓慢下降。这说明,长时间在无生长调节剂的培养基上培养,阻碍了细胞的进一步分裂生长,加快了细胞的老化,从而使农杆菌侵染效率下降;而适度的预处理则促进了细胞快速分裂,从而有助于转化效率提高。



注:A.完全暗培养 30 d;B.暗培养 10 d 光照 20 d;C.暗培养 20 d 光照 10 d; D.完全光照培养 30 d

Note: Dark 30 d; Dark 10 d, light 20 d; Dark 20 d, light 10 d; Light 30 d

图 4 不同雪柑上胚轴培养条件对转化的影响效果

Fig.4 Effects of different culture conditions on transformation

表 4 不同侵染时间对转化的影响

Table 4 Effects of different inoculation time on transformation

侵染时间 Infection time min	外植体数 Number of explants 个	分化外植体数 Number of differentiated explants // 个	分化率 Differentiation rate // %
20	104	25	24.1 AB
30	91	54	57.2 A
40	90	5	5.4 B

注:邓肯氏新复极差测验,不同字母表示差异达极显著水平( $P=0.01$ )  
Note: Different letters mean significantly different at the 0.01 level by Duncan's multiple range test

表 5 不同共培养时间对转化的影响

Table 5 Effects of different co-culture time on transformation

共培养天数 Co-culture days // d	外植体数 Number of explants 个	分化外植体数 Number of differentiated explants // 个	分化率 Differentiation rate // %
2	96	5	5.3 B
3	115	25	21.6 B
4	101	46	45.1 A
5	110	13	10.5 B

注:邓肯氏新复极差测验,不同字母表示差异达极显著水平( $P=0.01$ )  
Note: Different letters mean significantly different at the 0.01 level by Duncan's multiple range test

**2.8 筛选培养基 SMS 中添加不同生长调节剂对转化的影响** 从表 8 可以看出,2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 组合的抗性外植体分化率最高达 46.6%,大苗分化率也是最高达 13.2%。邓肯氏新复极差测验结果表明,2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 与其他浓度组合对转化效率的影响差异不显

著。这说明在筛选培养基中生长调节剂的不同浓度组合不是转化效率的主要影响因素,但是不同组合对抗性芽的筛选有影响。所以在该试验中,SMS 中的生长调节剂组合为 2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA。

表 6 不同 2,4-D 浓度预培养对转化的影响

Table 6 Effects of different pretreatment concentrations of 2,4-D on transformation

2,4-D 浓度 2,4-D concentration mg/L	外植体数 Number of explants // 个	分化外植体数 Number of differentiated explants // 个	分化率 Differentiation rate // %
0.5	120	27	22.5
1.0	96	56	58.2

注:邓肯氏新复极差测验,不同字母表示差异达极显著水平( $P=0.01$ )  
Note: Different letters mean significantly different at the 0.01 level by Duncan's multiple range test

### 3 讨论

笔者通过对影响转化的各种因素的优化试验建立了雪柑 *PMI* 基因/甘露糖选择标记系统的高效遗传转化体系。试验结果表明,在菌液  $OD_{600}$  为 0.6,1 mg/L 2,4-D 预处理 3 h,农杆菌侵染 30 min,共培养 4 d,筛选压为甘露糖 20 g/L 的情况下大大提高了转化后的再生率,而在筛选培养基中加入 2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 有助于抗性大苗的筛选,为以后的 *PMI* 基因/甘露糖选择标记系统的研究提供了可靠的依据。

**3.1 农杆菌侵染用工程菌液的制备与  $OD_{600}$  的选择** 在柑橘的遗传转化研究中,常用的农杆菌菌株主要有 LBA4404、

A518、EHA105、EHA101 和 C58, 由于它们的染色体背景和所含质粒不同, 所采用的柑橘材料也不同, 各菌株的转化效率差异显著<sup>[5]</sup>。该试验中使用的农杆菌菌株为 EHA105, 农杆菌的工程菌液和适当的 OD<sub>600</sub> 都在遗传转化体系中起到至关重要的作用。农杆菌长期在 -80 °C 中保存容易造成质粒丢失, 从而影响转化效率, 所以在转化前要使用新培养的工程菌液, 这样可以保证质粒的完整性, 而用 MS 液体培养基将离心的菌体重悬后适应性培养的时间不能过短, 这个过程是一个让农杆菌适应 MS 培养基和活化细菌的重要环节。而适当的 OD<sub>600</sub> 对转化的影响意义更大。植物外植体进行农杆菌侵染时, 菌液浓度过高会导致共培养时农杆菌过度生长, 造成外植体褐化死亡; 菌液浓度过低则不能使足够的农杆菌附着

在外植体的伤口处, 导致转化效率严重下降。在农杆菌侵染外植体时的试验操作方面, 要考虑到农杆菌与受体细胞的互动, 二者充分接触, 使农杆菌能够稳定附着在受体细胞上<sup>[2]</sup>。外植体上胚轴在农杆菌菌液中是悬浮的, 必须隔几分钟轻微摇动三角瓶使侵染混合体系中每个外植体都能浸没到菌液中与之充分接触, 力度也不能太大, 否则农杆菌难以附着在外植体细胞上。侵染混合体系比例合适, 50 mL 的三角瓶装工程菌液 30 mL, 外植体数 90 个左右, 过多或过少都影响转化效率, 过多了农杆菌无法充分接触外植体细胞, 过少了外植体往往附着农杆菌太多, 共培养时农杆菌容易过度生长导致外植体死亡。

表 7 不同 2,4-D 预处理时间对转化的影响

Table 7 Effects of different pretreatment time of 2,4-D on transformation

预处理时间 Pretreatment time//h	外植体数 Number of explants//个	分化外植体数 Number of differentiated explants//个	分化大苗数 Number of differentiated seedlings//个	分化率 Differentiation rate//%	大苗分化率 Differentiation rate of seedling//%
0	90	11	0	12.5 B	0 B
2	94	24	6	28.7 AB	6.3 AB
3	92	57	8	62.7 A	8.6 A
12	87	28	6	32.2 AB	6.8 AB
24	99	51	0	51.4 AB	0 B

注: 邓肯氏新复极差测验, 不同字母表示差异达极显著水平 ( $P=0.01$ )

Note: Different letters mean significantly different at the 0.01 level by Duncan's multiple range test

表 8 不同生长调节剂对转化的影响

Table 8 Effects of different growth regulators on transformation

生长调节剂 Growth regulator//mg/L			外植体数 Number of explants//个	分化外植体数 Number of differen- tiated explants//个	分化大苗数 Number of differen- tiated seedlings//个	分化率 Differentiation rate//%	大苗分化率 Differentiation rate of seedling//%
BA	NAA	ZT					
2			87	24	2	27.6 A	2.2 BC
3			90	40	2	44.5 A	2.2 BC
2	0.5		90	41	12	46.6 A	13.2 A
1	0.5		91	26	8	28.6 A	8.7 AB
	0.5	2	90	34	0	37.7 A	0 C
	0.5	1	80	17	0	21.2 A	0 C

注: 邓肯氏新复极差测验, 不同字母表示差异达极显著水平 ( $P=0.01$ )

Note: Different letters mean significantly different at the 0.01 level by Duncan's multiple range test

**3.2 甘露糖作为筛选剂在 PMI 选择系统中的应用** 甘露糖是一种正筛选底物, 本身不会对植物组织造成伤害, 但是非转化细胞不能利用甘露糖, 而在 PMI 的作用下可以将 6-磷酸甘露糖转化为 6-磷酸果糖, 6-磷酸果糖可以进入糖酵解途径为植物所应用, 这就是甘露糖作为筛选底物的原理<sup>[6]</sup>。如同抗生素浓度过高会造成转化细胞的生长受到强烈抑制一样, 只加甘露糖不加蔗糖也会造成大量转化细胞极度饥饿, 而一定浓度的蔗糖可以缓解这种负面影响<sup>[2]</sup>。甜菜转化时, 在 MS 基本培养基中添加 30 g/L 蔗糖, 在甘露糖浓度达 2.5~3.0 g/L 时, 苗再生完全被抑制, 但获得最佳转化率的甘露糖筛选浓度却在 1.25 g/L 左右, 有 20%~30% 的外植体诱导再生苗<sup>[7]</sup>; 转化玉米时筛选培养基中碳源最佳组合为 5 g/L 蔗糖+10 g/L 甘露糖<sup>[8]</sup>; 转化水稻时采用 30 g/L 甘露糖筛选压不变, 而将蔗糖含量由 30 g/L 逐渐递减至 5 g/L, 可以得到理想的转化效果<sup>[9]</sup>; 转化辣椒时筛选培养基中碳源组合

为 20 g/L 蔗糖+15g/L 甘露糖<sup>[10]</sup>。该试验参照徐海峰<sup>[2]</sup> 在建立雪柑转化体系时的甘露糖浓度, 按一定的梯度试验寻找合适的筛选压, 发现在有蔗糖的筛选培养基 SMS 中, 抗性芽的比例都会比较高, 但外植体上长出了大量的丛生芽, 多为假阳性植株, 这为以后的筛选增加了难度。在转基因植株的继代筛选中, 可适当地加入蔗糖加快抗性芽的生长, 加快筛选进度。

**3.3 共培养在转化中的作用** 外植体与农杆菌接种后的共培养在整个转化过程中是一个非常重要的环节。农杆菌的附着及 T-DNA 的切割、转移和整合都是在共培养期间完成。所以, 共培养技术条件的掌握是成功转化的关键因素之一。共培养时间对转化效率有很大影响, 不同转化材料或不同菌株类型所需的最佳共培养时间不同。农杆菌接种到外植体上后不能立即转化, 只有在创伤部位生存 16 h 后才能把 T-DNA 转移到植物细胞内<sup>[3]</sup>, 因此共培养时间必须长于 16 h。

共培养时间过短,农杆菌尚未附着,T-DNA 还没有充分切割、转移和整合;时间过长,植物细胞易受毒害,后续培养时难以除菌,农杆菌容易过度生长。根据试验确定在该系统中最佳的共培养时间为 4 d,超过时间,外植体大量的褐化死亡,农杆菌过度生长。在很多研究中,为了防止共培养时农杆菌过度生长,在共培养培养基上放置不同层数的滤纸,而该研究中未使用滤纸,在 4 d 时农杆菌没有过度生长,这样就降低了试验操作难度。

有研究表明共培养时的温度对遗传转化效率存在影响<sup>[11]</sup>。而该试验由于条件限制,未能完成对共培养温度的试验,有待于进一步证明共培养温度对雪柑遗传转化的影响。

**3.4 生长调节剂在转化中的作用** Cervera 等<sup>[12]</sup>发现在共培养和预培养时使用 0.2~1.0 mg/L 2,4-D 可以促进愈伤组织形成,进而提高转化率和再生率。Ghorbel 等<sup>[13]</sup>和 Domínguez 等<sup>[14]</sup>也报导了 2,4-D 的加入对不定芽的再生关系不大,推测其可导致植物细胞形成感受态,促进其接收外源 DNA,从而提高了转化效率。Yu 等<sup>[4]</sup>用不同浓度的 2,4-D 对外植体进行预处理并在共培养培养基中加入相应浓度的 2,4-D,雪柑转化率由不进行 2,4-D 处理的 8% 提高到了 12%,其 *GUS* 阳性比例相应提高了 33.6%;枳的转化率由 40% 提高到 80%,*GUS* 阳性比例提高了 26.0%,2,4-D 浓度过高则会导致愈伤组织大量形成,过夜处理则导致转化效率降低。这说明 2,4-D 的加入活化了植物组织细胞,促进了 T-DNA 的转移,从而提高了转化效率。该研究是在已知 2,4-D 能够提高转化率的前提下,用一定浓度的 2,4-D 对雪柑外植体进行预培养,并在共培养时加入相应浓度的 2,4-D,来优化雪柑转化中所选 2,4-D 的浓度。从抗性不定芽的长势来看,1 mg/L 2,4-D 的处理使抗性不定芽筛选后期长势较好。但预培养时间过长则抗性芽的比例下降,这与 Yu 等<sup>[4]</sup>的结论一致。

从该试验结果可以看出,在筛选培养基中加入 BA、NAA、ZT 3 种不同浓度的生长调节剂,对抗性芽分化率没有

太明显的影响,但是对抗性大苗分化率影响较大。这也说明在筛选培养基中加入生长调节剂不能从根本上影响转化率的提高,而只是在芽的生长分化中起到了作用,加快了其形态建成,这也与以往外源激素在组织培养中的作用研究得到统一。在筛选培养基中不同浓度生长调节剂的组合促进了抗性大苗分化,这为后面转基因植株的筛选和培养提供了便利。

#### 参考文献

- [1] PEÑA L, MARTÍN-TRILLO M, JUÁREZ J, et al. Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time[J]. *Nature biotech*, 2001, 19: 263-267.
- [2] 徐海峰. 以 *PMI* 基因为选择标记雪柑转基因体系的建立[D]. 福州: 福建农林大学, 2007.
- [3] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [4] YU C H, HUANG S, CHEN C X, et al. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange[J]. *Plant cell tissue and organ culture*, 2002, 71: 147-155.
- [5] 黄涛, 李耿光, 张兰英, 等. 柑桔遗传转化技术的研究进展[J]. *广西植物*, 2004, 24(2): 134-138.
- [6] 杨莉, 徐昌杰, 陈昆松. *PMI*/甘露糖筛选体系在植物转基因中的应用[J]. *林业科学*, 2005, 41(3): 137-141.
- [7] JOERSBO M, DONALDSON I, KREIBERG J, et al. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet[J]. *Mol Breed*, 1998, 4(2): 111-117.
- [8] NEGROTTO D, JOLLEY M, BEER S, et al. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation[J]. *Plant Cell Rep*, 2000, 19(8): 798-803.
- [9] LUCCA P, YE X D, POTRYKUS I. Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent[J]. *Molecular breeding*, 2001, 7(1): 43-49.
- [10] KIM J Y, JUNG M, KIM H S, et al. A new selection system for pepper regeneration by mannose[J]. *Journal plant biotechnology*, 2002, 4(3): 129-134.
- [11] 胡繁荣, 夏英武. 辐照对高羊茅愈伤组织诱导及农杆菌介导转化的影响[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2005, 23(2): 158-162.
- [12] CERVERA M, PINA J A, JUÁREZ J, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: Factors affecting transformation and regeneration[J]. *Plant cell reports*, 1998, 18: 271-278.
- [13] GHORBEL R, JUÁREZ J, NAVARRO L, et al. Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plants[J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 350-358.
- [14] DOMÍNGUEZ A, GUERRI J, CAMBRA M, et al. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus[J]. *Plant Cell Rep*, 2000, 19: 427-433.
- [9] 谷海燕, 谢孔平, 李世丽, 等. 石蒜属植物的无性繁殖研究[J]. *中国林副特产*, 2012(2): 32-35.
- [10] WANG R, XU S, JIANG Y M, et al. *De novo* sequence assembly and characterization of *Lycoris aurea* transcriptome using GS FLX titanium platform of 454 pyrosequencing[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): 1-10.
- [11] 钱彬彬, 李宜奎, 李洁, 等. 忽地笑 CYP98A 的分子克隆与表达分析[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(11): 3533-3541.
- [12] MA R, XU S, ZHAO Y, et al. Selection and validation of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in *Lycoris aurea*[J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 536.
- [13] HALL T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symp Ser*, 1999, 41(2): 95-98.
- [14] OMASITS U, AHRENS C H, MULLER S, et al. Protter: Interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(6): 884-886.
- [15] MALÁ Š, DVO ŘÁKOVÁ H, HRABAL R, et al. Towards regioselective synthesis of oligosaccharides by use of  $\alpha$ -glucosidases with different substrate specificity[J]. *Carbohydr Res*, 1999, 322(3/4): 209-218.
- [16] OKUYAMA M, SABURI W, MORI H, et al.  $\alpha$ -glucosidases and  $\alpha$ -1,4-glucan lyases: Structures, functions, and physiological actions[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(14): 2727-2751.
- [17] SUGIMOTO M, FURUI S, SASAKI K, et al. Transglucosylation activities of multiple forms of  $\alpha$ -glucosidase from spinach[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(5): 1160-1163.

(上接第 82 页)

**本刊提示** 文稿题名下写清作者及其工作单位名称、邮政编码;第一页地脚注明第一作者简介,格式如下:“作者简介:姓名(出生年—),性别,籍贯,学历,职称或职务,研究方向”。