

文章编号:1001-4829(2002)01-0020-04

# 香蕉农杆菌介导高效转化体系

陈廷速<sup>1,2</sup>, 张军<sup>1</sup>, 曾定<sup>1</sup>, 夏宁邵<sup>1\*</sup>, 陈丽娟<sup>2</sup>, 陈如凯<sup>3</sup>, 李杨瑞<sup>2</sup>

(1. 厦门大学肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 广西农业科学院, 广西 南宁 530007; 3. 福建农业大学, 福建 福州 350002)

**摘要:**以香蕉 (*Musa spp.*) 的横切薄层切片 (tTCL) 外植体作为转化受体, 研究影响根癌农杆菌转化香蕉的因素。研究表明, 菌液的预处理和重悬液的 pH 值是影响香蕉转化的主要因子, 而乙酰丁香酮 (AS) 是香蕉遗传转化中必需的酚类物质, 80  $\mu\text{mol/L}$  是较理想的浓度; 感染时间以 8 ~ 15 min, 共培养的时间和温度分别以 4 ~ 5 d 及 26  $^{\circ}\text{C}$  为最佳的条件。

**关键词:**香蕉; 根癌农杆菌; 遗传转化; 横切薄层切片

**中图分类号:** S668.1; S336 **文献标识码:** A

## Optimization of the conditons for banana (*Musa spp.*) genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

CHEN Ting-su<sup>1,2</sup>, ZHANG Jun<sup>1</sup>, ZENG Ding<sup>1</sup>, XIA Ning-shao<sup>1</sup>, CHEN Li-juan<sup>2</sup>, CHEN Ru-kai<sup>3</sup>, LI Yang-rui<sup>2</sup>

(1. Tumour Cell Engineering Lab., Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Guangxi Academy of Agricultural Science, Nanning 530007, China; 3. Fujian Agricultural University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** In this study, transient GUS expression was used to optimize the biological conditons mediated by *Agrobacterium tumefaciens* for transverse thin cell layer (tTCL) of fruit Banana (*Musa spp.*). Results showed that low generation of *in vitro* plantlets had greater shoot regeneration and higher transient GUS expression when tTCL was used. The pretreatment of *Agrobacterium* liquid, pH of resuspension (1/2MS) and the concentration of sugar were the main factors affecting banana genetic transformation, Acetosyringone (AS) (80  $\mu\text{mol/L}$ ) was the necessary phenol for banana genetic transformation other optimum conditons included 5 to 8 minutes of infection time, 4 to 5 days of co-cultivation at 26  $^{\circ}\text{C}$ .

**Key words:** banana; *Agrobacterium tumefaciens*; Genetic transformation; transverse thin cell layer (tTCL)

香蕉的转基因植株获得始于 1995 年<sup>[1~2]</sup>, 但都依赖于基因枪将报告基因转入并获得植株。李华平等人以香蕉茎尖为材料, 先用基因枪 (金粉包含有外源基因的 DNA 质粒) 轰击并培养 3 d 之后, 再用农杆菌进行转化, 获得了转基因植株<sup>[3]</sup>。国内近年来有一些研究人员对香蕉遗传转化的再生体系和利用基因枪转化体系进行了研究<sup>[4~5]</sup>。但仅利用农杆菌进行香蕉遗传转化的研究, 国内外尚未见报道。基因枪法是目前单子叶植物首选的基因转化方法, 这一方法克服了物种及转化系统的局限性, 可将外

源基因转入植物组织和器官, 操作方便简单。然而基因枪价格及使用费高, 并且外源基因多是以多拷贝插入植物 DNA, 这影响转基因植株的遗传稳定性。近年来农杆菌在水稻的转基因研究上取得重大进展, 证明用农杆菌介导法转化单子叶植物是可行的。在我们所进行的利用香蕉作为生物反应器生产口服疫苗的研究中, 对影响农杆菌转化的一系列因子进行了研究并取得了初步进展, 建立了很好的再生体系 (结果待发表) 和转化体系, 并得到报告基因较高的 GUS 基因瞬时表达。本文报道影响根癌农杆菌介导的香蕉遗传转化的一些因素。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试香蕉品种为威廉斯 (Williams), 由广西农

收稿日期: 2001-08-06

基金项目: 福建省自然科学基金、厦门凯立生物制品有限公司资助

作者简介: 陈廷速 (1966-), 男, 博士研究生, 研究方向是植物基因工程。

\*联系通信人: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn

科院生物所提供。从田间取回香蕉吸芽,经过一定处理在超净工作台上剥取其顶芽,接种于芽诱导培养基(BM1),经过3代的增殖(培养基BM2),并横切成薄层切片即得所用的材料。

### 1.2 农杆菌菌株与质粒

根癌农杆菌菌株为 EHA105、LBA4404 和 AGL1,植物表达载体 pCambia1301HBsAg (含有 GUS 基因、NPT 基因、HPT 基因、乙型肝炎表面抗原基因 HBsAg),结构如图。



### 1.3 培养基及培养条件

横切薄层切片芽诱导培养基(BM1):改良的 MS + BA4.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L; 丛芽增殖培养基(BM2):改良 MS 培养基 + BA3.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L; 生根培养基(BM3):改良的 MS + NAA0.5 mg/L; 重悬菌液的培养基(BM4):1/2 改良 MS 培养基 + AS (acetosyringone) 80  $\mu$ mol/L + 蔗糖 100 mg/L,不加琼脂,pH5.0; 共培养阶段培养基(BM5):BM1 + AS 80  $\mu$ mol/L,培养温度 26  $^{\circ}$ C;

筛选培养基(BM6):BM1 + Cef (Cefotaxime) 400 mg/L + Hyg (Hygromycin) 10 mg/L。以上培养基及培养条件如无特别说明均附加蔗糖 3%,琼脂 0.56%,pH5.8,培养温度 30  $^{\circ}$ C;除生根需要在光照下进行培养外,其余均进行暗培养。

### 1.4 农杆菌在转化前的预处理

取菌液接种于 YEB + Kan (Kanamycin) 25 mg/L 的培养基中,在 28  $^{\circ}$ C 和 180 ~ 250 rpm 条件下振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.8 ~ 1.0。将培养好的菌液在 4500 rpm 条件下离心 10 min,然后将菌体重悬于 BM4 培养基中(1:1),28  $^{\circ}$ C 条件下振荡培养 10 ~ 12 h 用于转化。

### 1.5 香蕉横切薄层切片(tTCL)与农杆菌共培养

将低代香蕉试管苗除去假茎和褐化的组织,仅留顶芽和有分化能力的组织并将之横切成 1 ~ 2 mm 的薄层切片,移入准备好的菌液中,在 28  $^{\circ}$ C、120 rpm 条件下振荡 8 ~ 10 min,取出薄层切片转入 BM5 培养基中培养 4 d,再转入 BM6 进行筛选。

### 1.6 GUS 基因组织化学检测

外植体转化 4 d 后,参考改进的 Jefferson 方法<sup>[6]</sup>,将外植体置于 X-Gluc 染色液(X-Gluc 0.89 mg/mL, chloramphenicol 250 mg/L, meThanol 20.0%,pH7.0 ~ 8.0 中,37  $^{\circ}$ C 水浴 12 h,镜检观察。瞬时表达率(%) = (GUS 基因瞬时表达的外植体数 / 总外植体数)  $\times$  100%。

## 2 结果和讨论

### 2.1 农杆菌菌株、菌液浓度及接种外植体时间对转化效率的影响

菌液浓度因转化系统的不同而有很大的差别,其范围在 OD<sub>600</sub> = 0.5 ~ 0.7 之间。对农杆菌感染比较敏感的材料易产生过敏反应而导致外植体切口褐化,因此常采用较低的菌液浓度和较短的接种时间<sup>[7]</sup>。在对香蕉的转化效率的研究中,发现较高的菌液浓度会促使横切薄层切片的表面褐化而坏死。在这种情况下即使是转化的细胞,其生长也会受到影响。

本研究以 EHA105、LBA4404 和 AGL1 3 种菌株进行香蕉遗传转化中 GUS 基因瞬时表达率的比较。将各菌株振荡培养到其菌液浓度 OD<sub>600</sub> = 0.8 ~ 1.0,并做了不同稀释处理以研究与瞬时表达的关系。结果(图 2)表明 AGL1 的瞬时表达率最低,而 EHA105 效果最好,其稀释倍数在一定范围内瞬时表达相当稳定。而用 EHA105 进行接种时间的实验时,结果(图 1)以 5 ~ 8 min 接种时间瞬时表达率较高,随着接种时间的延长未能提高瞬时表达率,相反会引起在共培养阶段农杆菌的过度生长,很难用抗生素来抑制,致使薄层切片褐化腐烂。

### 2.2 外植体与农杆菌共培养时间对 GUS 基因瞬时表达率的影响

香蕉横切薄层切片经接种农杆菌后,在滤纸上吸去过量的菌体,然后在固体培养基(BM5)进行共培养。在不同的时间进行 GUS 基因瞬时表达的检测,结果(图 3)显示共培养 4 ~ 5 d 瞬时表达率较高,当培养到第 8 d 时瞬时表达量相当低。随着共培养时间的延长,农杆菌过度生长而难以用抗生素来抑制,最终薄层切片无法分化。这是由于薄层切片在菌液中时间过长,因浸泡及缺氧而软腐,丧失芽分化

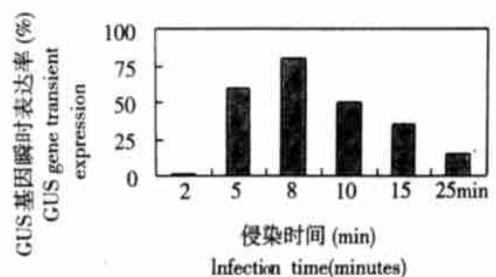


图 1 EHA105 菌株感染时间对 GUS 基因瞬时表达的影响

Fig. 1 Effect of infection time on frequency of explants with transient GUS expression

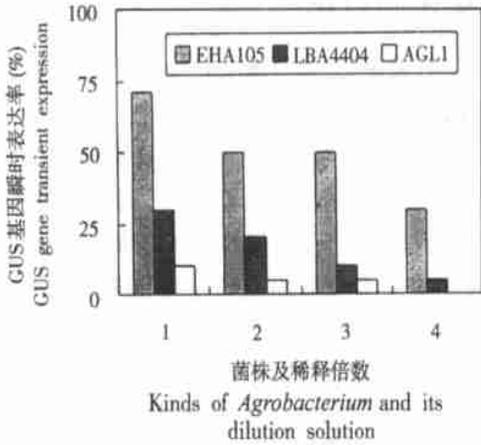


图2 菌株及稀释倍数对瞬时表达的影响  
Fig. 2 Effect of kinds and concentration of Agrobacterium on transient GUS expression

的能力。

### 2.3 外植体和农杆菌共培养时期温度对 GUS 基因瞬时表达率的影响

农杆菌 vir 基因 (virD、virG) 的活化除了受酚类化合物、pH 值和糖浓度等影响外,还受温度的影响。Hiei 等<sup>[8]</sup>在籼稻品种的转化研究中,成功地获得了转基因植株。其中关键在于选择外植体和附加 AS,同时对共培养的温度进行了控制。他认为温度是影响转化的因子。香蕉是热带作物,在离体培养条件下,30~35 及暗培养能达到最好的芽增殖效果。我们研究发现温度在香蕉的转化中也是一个重要的因子,26 左右是香蕉转化中较理想的温度(图 4)。

### 2.4 乙酰丁香酮(AS)对香蕉遗传转化的影响

农杆菌对植物酚类化合物具有趋化性,它可使农杆菌质粒上的 vir 基因 (virA、virG) 活化和表达。Stachel 等<sup>[9]</sup>首次从烟草的组织提取物中分离出 AS 和 OH-AS。迄今为止,已证明包括邻苯二酚、没食子酸等 40 多种酚类化合物对 vir 基因有诱导活化作用。其机理被认为是当农杆菌染色体上的 chv 基因组成型表达时(即农杆菌已贴到植物细胞壁上),vir

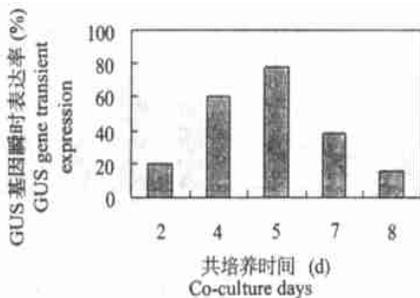


图3 菌株与外植体共培养时间(d)对 GUS 基因瞬时表达效率的影响  
Fig. 3 Effect of coculture time on frequency of ex-plants with transient GUS expression

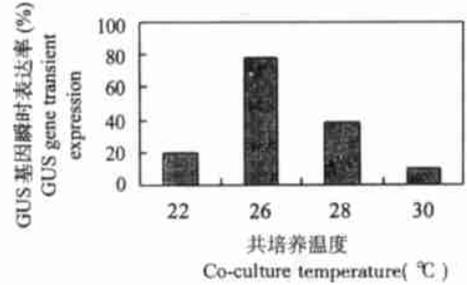


图4 温度对薄层切片 GUS 基因瞬时表达效率的影响  
Fig. 4 Effect of culture temperature on transient GUS expression

基因仍处于沉默状态,只有当植物产生酚类化合物如 AS 及 OH-AS 时,才诱导 vir 基因的活化。

酚类化合物的发现及其在水稻遗传转化上的成功应用,可以说是开创了单子叶植物转化的里程碑。我们以用得最多的 AS 对香蕉的遗传转化进行了研究,结果(图 5)表明,AS 是香蕉遗传转化中必不可少的,在我们所用的转化方法中,80 mol/L 的 GUS 基因瞬时表达率最高,而且相当稳定。进一步提高 AS 浓度,并未能提高 GUS 基因的瞬时表达。这可能是由于 AS 浓度过高,对 vir 基因的活化有抑制作用,对此有待进一步深入研究证实。

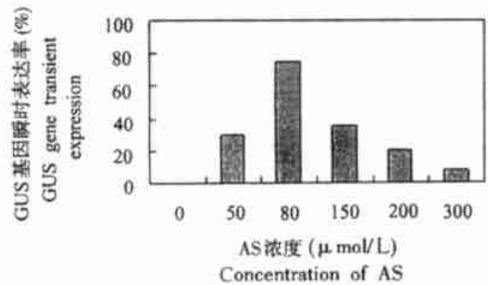


图5 AS 浓度对瞬时表达的影响  
Fig. 5 Effect of AS concentrations (μmol/l) on transient GUS expression

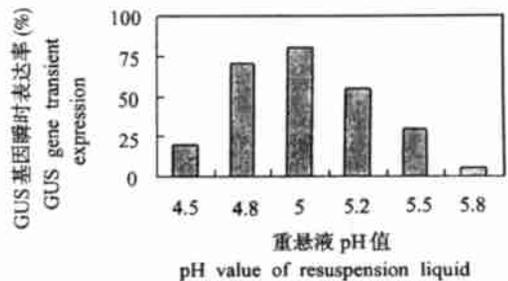


图6 重悬液 pH 值对 GUS 基因瞬时表达的影响  
Fig. 6 Effect of pH value on resuspension transient GUS expression

## 2.5 农杆菌重悬液 pH 值对 GUS 基因瞬时表达率的影响

农杆菌 vir 基因的活化要求 pH 值为 5.4 ~ 5.6。Holford 等<sup>[10]</sup>在农杆菌的致瘤试验中认为 pH 值为 5.1 ~ 5.2 的条件下 vir 基因活性高,致瘤效果较佳。Godwin 等<sup>[11]</sup>在对几种植物的转化研究中发现,改变 pH 值对转化效率有明显的影响。在我们的香蕉遗传转化研究中,发现重悬液的 pH 值是诸多因素中最为重要的因子。由于培养基在消毒灭菌后 pH 都会有所下降,并且下降的幅度依培养基的缓冲能力而不同。我们对重悬液的 pH 在消毒前后都进行准确定量,并形成完整的转化系统。研究结果(图 6)表明,在 pH 值为 4.8 ~ 5.2 的范围内瞬时表达率都较高,并有很好的重复性。

## 3 展 望

香蕉是世界上第一大宗水果,年产约 8000 万 t,是几乎 4 亿人的主要食物。在我国的广东、广西、海南、福建等地区,香蕉已成为重要的产业。如何提高香蕉的商品价值和降低蕉农的生产风险是香蕉发展中极为重要的问题。在提高香蕉外观和内在品质的基础上培育优良的新品种,特别是利用香蕉表达口服疫苗的研究有潜在的商业价值,也将为人类尤其是落后的国家和地区的人民健康带来福音,因而利用基因工程技术对香蕉品种进行定向遗传改良具有

广阔的应用前景。

### 参考文献:

- [1] Gregory D. May, Rowan Afza, et al. Generation of transgenic banana *Musa acuminata* plant *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Biotechnology*, 1995, 13:486 - 492
- [2] Sagi L., Panis b., et al. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment [J]. *Biotechnology*, 1995, 13:481 - 485.
- [3] 李华平, 胡晋生, 王 敏, 等. 香蕉茎尖遗传转化法研究[J]. *热带作物学报*, 2000, 21(4):33 - 38.
- [4] 黄 霞, 黄学林. 果用香蕉薄片培养再生植株[J]. *植物生理学通讯*, 1998, 34(4):268.
- [5] 王鸿鹤, 黄 霞. 基因枪法转化香蕉薄片外植体的参数优化[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2000, 39(2):87-91.
- [6] Jefferson R. A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system[J]. *Plant Molecular Biology Reports*, 1987, 11:38 - 47.
- [7] 莽克强. 农业生物工程[M]. 北京:化学工业出版社, 1996. 97.
- [8] Hiei Y., Ohia S., et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. *The Plant Journal*, 1994, 6:271 - 28.
- [9] Stachel S. E., Messens E., et al. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Nature*, 1985, 318:624 - 629.
- [10] Holford P., Hernandez N. Factors influencing the efficiency of T-DNA transfer during cocultivation of *Antirrhinum majus* with *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Cell Rep.*, 1992, 11:196 - 199.
- [11] Godwin L., Todd G. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species[J]. *Plant Cell Rep.*, 1991, 9:671 - 675.

(责任编辑 陈国琨)