

根癌农杆菌介导的芦荟遗传转化条件的研究

陈廷速¹ 张 军² 夏宁邵^{2*} 陈如凯³ 李杨瑞⁴

- (1. 广西农科院生物技术研究所, 南宁 530007)
- (2. 厦门大学肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)
- (3. 福建农林大学, 福州 350002)
- (4. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007)

摘 要 以美国库拉索芦荟 (*Aloe. arborescens*) 的横切薄层切片 (transverse thin cell layer, tTCL) 作为转化受体, 通过受体材料对抗生素的敏感性实验和 *Gus* 基因瞬时表达率的研究, 找出了较适合的外植体转化条件。研究表明: 芦荟对头孢霉素 (cefotaxime) 和羧苄霉素 (carbenicillin) 不敏感, 而对卡那霉素 (kanamycin) 和潮霉素 (hygromycin) 敏感; 用靠近顶芽的材料得到的横切薄层切片芽再生率高, 有较高的 *Gus* 基因瞬时表达率; 乙酰 番酮 (acetosyringone) 在芦荟转化是不可缺少的, 对其转化有明显的促进作用。

关键词 芦荟; 根癌农杆菌; 遗传转化; 横切薄层切片

Study on the factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Aloe* (*A. arborescens*)

CHEN Ting-Su¹ ZHANG Jun² XIA Ning-Shao^{2*} CHEN Ru-Kai³ LI Yang-Rui⁴

- (1. Biotechnology Research Institute, Guangxi Academy of Agriculture Sciences, Nanning 530007)
- (2. Tumour Cell Engineering Lab, Xiamen University, Xiamen 361005)
- (3. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)
- (4. Guangxi Key Lab for Crop Improvement and Biotechnology, Nanning 530007)

Abstract Susceptibility of the acceptors to antibiotics and transient expression of β -glucuronidase (*Gus*) gene were used to determine the optimized conditions for transformation of transverse thin cell layer (tTCL) of aloe (*A. arborescens*) mediated by *Agrobacterium Tumefaciens*. The results showed that both cefotaxime and carbenicillin were insusceptible while both kanamycin and hygromycin were rather sensitive to aloe. The transverse thin cell layer (tTCL) from top part of the bud had higher percentage of shoot generation and *Gus* gene transient expression. Acetosyringone (AS) was necessary in aloe genetic transformation.

Key words *Aloe*; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation; transverse thin cell layer

芦荟 (*Aloe spp.*) 属多年生百合科多浆常绿 海南等地都有栽培, 是一种很有开发前途的经济
草本植物, 原产非洲。我国的广西、广东、云南、 植物新资源, 可做药用、制作饮料、化妆品等。

* 通讯联系人: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn

基金项目: 福建省自然科学基金项目, 项目编号: C9910004, 厦门凯立生物制品有限公司资助。

第一作者简介: 陈廷速 (1966—), 男, 博士, 主要从事植物基因工程。

收稿日期: 2003-05-08

世界上芦荟属植物有 300 多种,但目前应用广泛、具有开发价值的芦荟品种主要有库拉索芦荟 (*A. arborescens*)、日本木立芦荟 (*A. barbadensis*)、中华斑纹芦荟 (*A. vera* var. *chinensis*)。芦荟的遗传转化国内外尚未见报道。在我们用芦荟表达人表皮生长因子的研究中,通过横切薄层切片途径建立了较理想的再生体系,对影响根癌农杆菌介导的芦荟遗传转化条件进行初步探讨,以期为最终能建立理想的受体材料和转化方法积累工作基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

所选用的材料为美国库拉索芦荟 (*A. arborescens*) 的无菌试管苗。由广西农科院生物技术研究所植物组培种苗研究中心提供。选择分化好的无菌试管苗,在超净工作台上将植株的叶片去除,将去除叶片的芽分为芽的上部、中部和下部。参考周根余等方法^[1],沿两边对称叶片的中央纵切 (LC1) 和沿叶片的中心线纵切 (LC2),再进行横切成 1 mm 左右的薄层切片得到两种薄层切片 (分别为 TCL1, TCL2) 即为所需的实验材料。

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 p1301EGF (含有 *Gus* 基因、*npt* II 基因、*hpt* 基因、人表皮生长因子基因 *hEGF*、35S 启动子)。

1.3 培养基及培养条件

(1) 薄层切片芽诱导培养基 (AM₁): 改良的 MS+ BA 3.5 mg/L + IBA 0.3 mg/L (单位下同); (2) 丛芽增殖培养基 (AM₂): 改良的 MS 培养基 + BA 2.5 mg/L + IBA 0.2 mg/L; (3) 生根培养基 (AM₃): 改良的 MS+ NAA 0.5 mg/L; (4) 重悬菌液的培养基 (AM₄): 1/2 改良的 MS 培养基 + AS150 μmol/L + 蔗糖 100 g/L + 1/4V YEB, 不加琼脂, pH 5.0; (5) 共培养阶段的培养基 (AM₅): AM₁ + AS100 μmol/L, 培养温度为 26℃; (6) 筛选培养基 (AM₆): AM₁ + Cef 400 mg/L + Hyg 5 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%, pH 5.8, 培养温度为 25℃; 除壮苗生长和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 25 mg/L 的培养基

中,在 28℃和 180~250 r/min 条件下振荡培养至 OD₆₀₀为 0.8~1.0。将培养好的菌液在 4500 r/min 条件下离心 10 min,然后将菌体重悬于 AM₄ 培养基中 (1:1), 28℃条件下振荡培养 8~10 h 用于转化。

1.5 芦荟横切薄层切片与农杆菌共培养

将准备好的芦荟横切薄层切片移入准备好的菌液中,在 27℃、120 r/min 条件下振荡 15 min,取出薄层切片转入 AM₅ 培养基中培养 4 d,再转入 AM₆ 进行筛选。

1.6 抗生素敏感性实验

在进行抗生素的敏感性实验时,通过预实验确定头孢霉素和羧苄霉素的浓度为: 300、600、1000 mg/L; 卡那霉素和潮霉素的浓度为: 0、5、10、15、20、25、30 mg/L; 每 5 d 对实验进行观察并记录生长情况,每个实验设计 3 个重复,40 d 统计结果。

1.7 *Gus* 报告基因的检测

外植体转化 4 d 后,参考改进的 Jefferson 方法^[2],将外植体置于 X-Gluc 染色液 (X-Gluc 0.89 mg/mL, chloramphenicol 250 mg/mL, NaH₂PO₄ 1.0 mol/L, methanol 20%, pH 7.0~8.0) 中,37℃水浴 4~8 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) × 100%。

2 结果和分析

2.1 抗生素对芦荟横切薄层切片芽分化的影响

芦荟横切薄层切片的抗生素敏感性实验结果 (表 1, 表 2, 表 3) 说明芦荟对头孢霉素和羧苄霉素不敏感,而对卡那霉素和潮霉素很敏感。在头孢霉素和羧苄霉素浓度为 1000 mg/L 时薄层切片仍有不定芽的形成,以至经较长时间培养植株也能生长。本研究主要使用头孢霉素作为抑菌剂。使用卡那霉素和潮霉素的筛选浓度分别为 10 mg/L 和 5 mg/L。研究发现使用卡那霉素筛选时所用的筛选时间较长 (70 d),而潮霉素仅用 40 d 即可得到筛选结果。

2.2 外植体条件对 *Gus* 基因瞬时表达率的影响

我们在香蕉的遗传转化研究中发现,用低代材料幼嫩组织进行转化得到的 *Gus* 基因瞬时表达率最高,而用代数高或其它材料不仅瞬时表达率低,而且组织褐化十分严重^[3]。在本研究中我们发现,在芦荟的转化中用靠近顶芽的材料能得到相当

表 1 头孢霉素和羧苄霉素对芦荟横切薄片切片芽分化的影响

Table 1 Effect of cefotaxime and carbenicillin on shoot regeneration of *Aloe* transverse thin cell layer

统计项目 Statistical item	头孢霉素浓度 (mg/L) Cefotaxime (mg/L)				羧苄霉素浓度 (mg/L) Carbenicillin (mg/L)			
	ck	300	600	1000	ck	300	600	1000
	薄层切片总数 Number of thin cell layer	24	24	24	24	24	24	24
出芽的薄片数 Number of thin cell layer with shoots	21	20	21	7	20	18	17	7
不定芽数 Adventitious buds	53	42	48	13	54	47	39	43
芽分化率 Percentage of bud regeneration (%)	88	83	88	29	83	75	71	29

表 2 卡那霉素对芦荟横切薄片切片芽分化的影响

Table 2 Effect of kanamycin on shoot regeneration of *Aloe* transverse thin cell layer

统计项目 Statistical item	卡那霉素处理浓度 (mg/L) Kanamycin concentration (mg/L)						
	0	5	10	15	20	25	30
薄层切片总数 Number of thin cell layer	15	15	15	15	15	15	15
出芽外植体数 Explants with shoots	14	12	13	12	13	15	13
正常不定芽数 Normal shoots	38	56	0	0	0	0	0
白化苗总数 Chlorotic shoots	0	0	24	23	16	16	17
芽分化率 Percentage of bud regeneration (%)	93	80	87	80	87	100	87

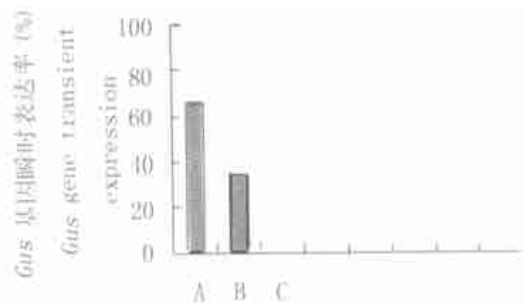
表 3 潮霉素对芦荟横切薄片切片芽分化的影响

Table 3 Effect of hygromycin on shoot regeneration of *Aloe* transverse thin cell layer

统计项目 Statistical item	卡那霉素处理浓度 (mg/L) Kanamycin concentration (mg/L)						
	0	5	10	15	20	25	30
薄层切片总数 Number of thin cell layer	15	15	15	15	15	15	15
出芽外植体数 Explants with shoots	10	5	5	4	4	0	0
正常不定芽数 Normal shoots	28	0	0	0	0	0	0
白化苗总数 Chlorotic shoots	0	13	7	5	4	0	0
芽分化率 Percentage of shoot regeneration (%)	67	33	33	27	27	0	0

高的 *Gus* 基因瞬时表达率 (图 1), 而其它部位的 *Gus* 基因瞬时表达率较低, 组织褐化严重。我们用横切薄片切片研究芦荟再生体系时^[1] 也发现靠近顶芽的部位芽分化率高, 产生的不定芽数及每块薄片切片的不定芽数都较多, 主要是这些部位存在腋芽及细胞脱分化的能力强; 但如果薄片切片带有顶芽, 不定芽的分化能力就少, 可能是顶端激素影响了不定芽的分化。

2.3 乙酰丁香酮 (AS) 对芦荟遗传转化的影响研究表明在芦荟的遗传转化中乙酰丁香酮 (AS) 是必不可少的 (图 2)。在没有 AS 存在的条件下, 无论用何种材料, 都没有检测到 *Gus* 基因的瞬时表达; 在 80~150 $\mu\text{mol/L}$ 时 *Gus* 基因瞬时表达率较稳定, 但过高的 AS 浓度并不能提高 *Gus* 基因的瞬时表达率。通过多次重复实验证明, 在进行侵染的重悬液使用 150 $\mu\text{mol/L}$ AS, 而在共培养阶

图 1 外植体条件对 *Gus* 基因瞬时表达率的影响Fig. 1 Effects of explant conditions on *Gus* gene transient expression

注: A—材料上部; B—材料中部; C—材料下部。

Not: A— the top part of materials; B— the middle part of material; C— the bottom part of material.

段的培养基中附加 100 $\mu\text{mol/L}$ AS, 是比较理想的。一个不可忽视的问题是 AS 浓度的使用同侵染菌液处理时间也有关系, 在较低的 AS 浓度下,

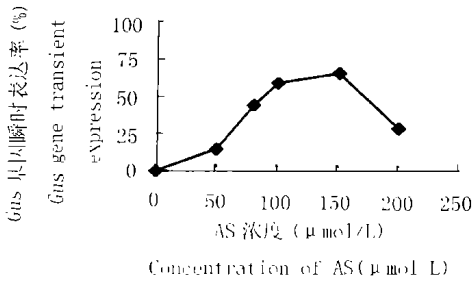


图 2 AS 浓度对 *Gus* 基因瞬时表达率的影响
Fig. 2 Effects of AS concentrations ($\mu\text{mol/L}$) on *Gus* gene transient expression

如果延长振荡时间也有 *Gus* 基因的瞬时表达。

3 讨论

植物分生细胞的存在一般认为是成功转化的必要条件, 一定的细胞壁结构的存在也是不可缺少的^[4~6]。要得到转基因植株, 植物细胞还必须具有分化能力^[7~9]。不同年龄、处于不同生理状态的植物组织及不同的组织和细胞类型对农杆菌的感受性不同。分生组织及伴有活跃细胞分裂的外植体对农杆菌的侵染最为敏感; 幼叶、茎尖、顶端分生组织、愈伤组织等由于组织或细胞分裂旺盛, DNA 大量合成, 有利于 T-DNA 的摄入和整合, 且年幼的组织可能含有较少的抑制因子等, 故最易转化^[8~9]。芦荟的节间较短, 每个腋芽都有可以分化成植株的潜力。本研究采用的横切薄层切片培养诱导芽分化, 本质上是腋芽细胞中有分化能力的细胞分化的结果。由于靠近顶芽的部位腋芽细胞脱分化的能力强, 分化成芽的数量也多。如果用带有顶芽的薄层切片, 不定芽的分化能力减少, 可能是因为顶端激素影响了不定芽的分化。

在最初进行芦荟遗传转化实验时, 我们发现经过侵染后的横切薄层切片没有农杆菌的生长, 这可能是芦荟本身含有的物质能抑制农杆菌的生长缘故。后来我们在重悬液中附加了 LB 培养基, 才使侵染后的薄层切片周围生长农杆菌, 并观测到 *Gus* 基因的瞬时表达。

芦荟是单子叶植物, 是较难用农杆菌转化的植物之一, 在转化中 AS 是不可缺少的。AS 是一种酚类化合物, 它的使用可以减少植物基因型的差异^[10]。一些自身不能产生对 *vir* 基因具有高效诱导的酚类化合物的植物 (单子叶植物和少数双子叶植物), 使用 AS 能产生较好的效果。在单子叶植物特别在禾本科植物中不能产生这类化合物,

或即使能产生也不足作为信号分子, 因此 *vir* 基因表达的诱导是实现转化成功的主要因素^[11]。AS 的作用是它通过与 *vir* 蛋白结合, 激活 *virG* 表达, 然后通过 *virA* 和 *virG* 蛋白组成的信号级联放大系统共同控制其它 *vir* 基因的表达。除 AS 之外, 儿茶酚、没食子酸、邻苯二酚等一些植物中常见的酚类化合物的混合物也可激活 *vir* 基因。这些诱导物都来自于植物损伤细胞为抵御微生物侵染或增强细胞壁而合成的。它们既可作为农杆菌的趋化物, 又可作为 *vir* 基因的诱导物, 且与 T-DNA 的转移与整合有关, 现已被广泛用于增强许多植物的转化频率, 并扩大了一些农杆菌的宿主范围。

参 考 文 献

1. 周根余, 丁洪峰, 施望敏, 等. 芦荟的无性快速繁殖. 园艺学报, 1999, 26 (6): 410~ 411
2. Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the *Gus* gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reports*, 1987, 11: 38~ 47
3. 陈廷速, 张军, 夏宁邵, 等. 影响根癌农杆菌介导的香蕉转化因素研究. 广西农业生物科学, 2002, 21 (1): 26~ 31
4. 李宝健, 欧阳学智, 许耀. 应用农杆菌 Ti 质粒系统将外源基因转入籼稻细胞研究. 中国科学 B 辑, 1990, 2: 144~ 149
5. 余淑文. 植物生理与分子生物学 (第 1 版). 北京: 科学出版社, 1992, 63~ 83
6. Hamid R, Shuji Y, Kinya T, *et al.* Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice. *Plant Cell Reports*, 1996, 15: 727~ 730
7. Dennis B, Chris S, Joanie M, *et al.* Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 1992, 18: 301~ 313
8. Raineri D M, Bottino P, Gordon M P, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* transformation of rice (*Oryza sativa* L.). *Biotech*, 1990, 8: 33~ 38
9. Vijayachandra K, Palanichelvam K, Veluthambi K, *et al.* Rice scutellum induces *Agrobacterium tumefaciens vir* genes and T-strand generation. *Plant Molecular Biology*, 1995, 29: 125~ 133
10. Delzer B W, Somer D A, Orf J H. *Agrobacterium tumefaciens* susceptibility and plant regeneration of 10 soybean genotypes in maturity groups 00 to II. *Crop Sci*, 1990, 30: 320~ 322
11. Potrykus I. Gene transfer to cereal: an assessment. *Bio Technology*, 1990, 6: 535~ 542