

柑桔遗传转化技术的研究进展

黄涛, 李耿光, 张兰英, 董高峰

(中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650)

摘要: 柑桔是当今世界种植面积最大的果树。遗传转化技术的发展为柑桔育种提供了一条全新的途径。该文就柑桔遗传转化的研究进展, 包括外源 DNA 的直接转化与农杆菌介导的转化, 作一简要的综述, 并对当前研究中存在的问题及今后的研究方向作了进一步的探讨。

关键词: 柑桔; 遗传转化; 农杆菌

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)02-0134-05

Advances in *Citrus* genetic transformation

HUANG Tao, LI Geng-guang, ZHANG Lan-ying, DONG Gao-feng

(South China Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510650, China)

Abstract: *Citrus* is the most widely grown fruit crop worldwide. A new method was provided for citrus breeding with the development of genetic transformation technique. The advance in citrus genetic transformation, including direct transformation of exogenous DNA and *Agrobacterium*-mediated transformation, was reviewed briefly. The present issue and future development of citrus genetic transformation research were also discussed.

Key words: *Citrus*; genetic transformation; *Agrobacterium*

柑桔 (*Citrus* L.) 是世界范围内种植最广泛的果树, 我国也有大面积种植。在二十世纪, 为了培育柑桔新品种, 提高柑桔的产量和品质、增强其抗病性、抗逆性及解决生产中的其它问题, 有关柑桔生物技术的研究主要涉及到组织培养、茎尖微芽嫁接脱毒、原生质体融合与细胞杂交、离体抗性育种和遗传转化等方面。其中基因工程提供了从分子水平直接进行遗传操作, 定向改造植物性状的手段。通过向柑桔细胞转入有益的外源目的基因可以培育出抗病、抗虫、抗逆及其它具有特殊性状的转基因柑桔植株。同其它作物相比, 柑桔的遗传转化研究起步较晚。本文就近年来柑桔遗传转化技术的研究进展作一简要综述。

1 外源 DNA 的直接转化

Kobayashi 和 Uchimiya(1989)首次用聚乙二醇法(PEG)将外源标记基因 *gus* 转入甜橙 (*C. sinensis* (L.) Osb.) 原生质体, 获得转基因的胚性愈伤, 但是没有获得转化植株。Vardi 等(1990)同样用 PEG 法将外源标记基因转入粗柠檬 (*C. jambhiri* Lush.) 原生质体中, 得到 9 个稳定转化的胚性愈伤系, 其中 2 个胚性愈伤系再生出转化植株。王峰等(1998)通过 PEG 法和脂质体介导法将不同调控序列下的 GUS 基因导入柑桔原生质体中, 但仅仅研究了 GUS 基因在柑桔原生质体中的瞬间表达情况。Hidaka 等(1993)通过电穿孔法将外源标记基因

收稿日期: 2003-02-25 修订日期: 2003-06-24

基金项目: 国家自然科学基金(39870539); 广东省自然科学基金(980478); 广东省百项创新工程(99B05902X)。

作者简介: 黄涛(1972-), 男, 河南正阳县人, 博士, 从事细胞工程研究。E-mail: Huangtao@scib.ac.cn

gus 转入柑橘 (*C. reticulata* Blanco cv Ohta) 愈伤组织中, 但没有再生出完整植株。Yao 等 (1996) 用基因枪法将外源标记基因 *gus* 转入柑桔品种 tangelo (*C. reticulata* Blanco × *C. paradisi* Macf.) 的悬浮细胞, 并用高渗溶液预处理细胞, 可以显著提高转化效率。

在以上几种转化方法中, PEG 法价廉、实验结果稳定、植板率较高, 但有些植物对 PEG 处理相当敏感。电穿孔法操作简便, DNA 导入效率较高, 特别适用于瞬间表达的研究, 但易造成原生质体损伤, 且仪器也较昂贵。基因枪可对整株植物进行转化, 但转化效率低, 且由于多拷贝现象导致转基因的沉默及后代遗传规律的紊乱。在柑桔中, 通过 PEG 法、基因枪法和电穿孔法进行的外源基因转化, 一般多采用单细胞受体系统。该受体系统的优点是操作简便、DNA 导入效率高、获得的转化体嵌合现象少, 易于筛选, 但是柑桔类果树中很多品种的原生质体培养周期长及再生困难, 且易发生体细胞变异等缺点, 因此较难得到能够稳定表达目的基因的转化植株。

2 农杆菌介导的外源 DNA 转化

2.1 愈伤组织的转化

Hidaka 等 (1990) 用农杆菌介导法将标记基因转入甜橙愈伤组织中, 并得到 1 株转化植株, 但转化率很低, 只有 0.07%。由于许多柑桔品种很难诱导愈伤组织分化及再生植株 (Gmitter 和 Moore, 1986), 因此通过转化愈伤组织途径来获得转基因植株在柑桔中受到很大限制。

2.2 实生苗离体组织的转化

我国研究者高峰等 (1990) 用根瘤农杆菌感染柑、红桔的子叶、叶片、胚轴, 经检测证明 Ti 质粒 T-DNA 上的章鱼碱合成酶基因已转入柑桔中, 用带 GUS 基因的农杆菌二元载体系统转化柑桔营养器官, 在获得的抗性愈伤中检测到较强的 GUS 活性, 但没有得到转化植株。Moore 等 (1992) 用枳橙 (*C. sinensis* (L.) Osb. × *P. trifoliata* Raf.) 与来檬 (*C. aurantiifolia* (Christm) Swingle) 实生苗茎段与农杆菌共感染, 经过 PCR 和 Southern 杂交证实外源标记基因转入柑桔中, 但转化率较低, 只有 5%。Pena 等 (1995a, b) 用枳橙实生苗茎段为材料, 通过延长选择时间减少了假的转化体。感染的枳橙和甜橙茎段

在筛选培养基上培养时, 先放在黑暗下处理 8 周, 再转移到光下, 则能显著提高转化率 (Pena 等, 1995a, b)。但是在枳 (Kaneyoshi 等, 1994) 与华盛顿甜橙 (Bond 和 Roose, 1998) 的上胚轴转化中, 不需经过黑暗处理也能获得较高的转化率, 这说明对于不同的柑桔品种需要不同的培养条件。进一步的研究表明, 农杆菌在感染来檬茎段时, 如果与马铃薯悬浮细胞系共培养, 则能显著提高转化率及每个外植体上的出芽数, 这是因为悬浮细胞系可以提供激活农杆菌 Vir 基因的乙酰丁香酮及其它酚类物质, 同时也可以降低农杆菌引起的外植体的伤害 (Pena 等, 1997), 通过这种培养方式, Pena 等 (1998) 成功地将 GA-C20 基因转入甜橙和酸橙中。

不同的农杆菌株系对柑桔的转化效率也不同, Kaneyoshi 等 (1994) 用枳的上胚轴为材料, 用两种农杆菌株系进行感染, 转化率在 10% 以上, 且 CaMV 35s 启动子比 rol C 启动子更能增强 GUS 基因的表达。Bond 和 Roose 用三种农杆菌株系感染不同苗龄的甜橙上胚轴切段, 发现 C58c1 株系的转化效率为 45%, EHA101-5 的转化率为 29%, 而 LBA4404 不能转化甜橙。同时, 21 d 苗龄的上胚轴切段转化率要高于 35 d 与 36 d 苗龄的上胚轴切段 (Bond 和 Roose, 1998), 这说明不同农杆菌株系对细胞的侵染能力不同, 且苗龄也影响受体细胞的敏感性。Cervera 等 (1998) 详细研究了共培养时间、外植体预培养、共培养中加入乙酰丁香酮及马铃薯悬浮细胞系、共培养基中加入高浓度生长素、筛选培养时的黑暗处理、不同卡那霉素筛选压等因素对农杆菌转化枳橙的影响, 结果发现在富含生长素的共培养基上共培养 3 d 可以提高转化率。而筛选培养时的 4 d 黑暗处理可以进一步提高转化率和减少假的转化体, 最终转化率可以达到 41.3%。但是与 Pena 等 (1997) 不同的是, 外植体的预培养时加入马铃薯悬浮细胞系并不能提高转化率。我们在研究红江橙和沙田柚的转化中发现, 红江橙在预培养 1 d 后再共培养 2 d 才能得到较高的转化率, 而沙田柚需要 2 d 预培养和 1 d 共培养才能得到较高的转化率。在预培养天数低于最适天数时, 适当延长共培养天数可以提高转化率, 而在最适或较长预培养天数的条件下, 长时间的共培养导致农杆菌的过度生长而使最终的转化率下降 (待发表)。

目前, 柑桔抗病基因的转化也通常用实生苗茎段或上胚轴为基因转化受体。在农杆菌感染过程

中,受伤害的细胞才对农杆菌的浸染敏感(Shimoda等,1990;Bidney等,1992)。Gutierrez-E等(1997)首次将柑桔衰退病毒外壳蛋白(CTV CP)基因转入酸橙中,但只从7000个外植体得到9株完全GUS活性的植株,在农杆菌感染前用基因枪轰击酸橙实生苗茎段来造成细胞伤害却不能提高基因转化效率。Dominguez等(2000)通过农杆菌介导法将CTV CP基因转入来檬中,在筛选培养基中加入高浓度生长素可以显著提高转化效率,且进一步发现CTV CP基因的表达与基因拷贝数或基因整合方式无关。韩美丽等(2000)通过延迟选择也显著提高农杆菌介导的CTV CP基因转化枳壳的效率。另外,通过农杆菌介导法,李耿光等(1999)将几丁质酶基因转入枳橙上胚轴切段,得到了表达几丁质酶基因的植株。陈善春等(1997)则将柞蚕抗菌肽D基因转入新会橙和沙田柚中。

2.3 成龄组织的转化

在柑桔基因转化的研究中,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,而由此得到的转基因植株具有童期长的缺点,且转基因植株的园艺与商品性状的评价往往需要很长时间。而由成龄组织转化得到的转基因植株则可以避免一个相当长的童期,且能保持遗传上的稳定性,但成年树离体组织的分化十分困难(Durzan,1990)。Cervera等(1998)首次报道用甜橙成年树新抽出的枝条为基因转化受体,成功地将外源标记基因转入甜橙,但同时实生苗茎段相比,成年树枝条的转化率降低了70%,这说明成龄植物组织对农杆菌浸染的敏感性低于幼嫩组织。李卫等(1997)根据沙田柚一年四季不断抽芽的特性,用农杆菌感染附体的腋芽,再离体扩繁鉴定的方法,成功地将GUS基因转入沙田柚中。这种方法既不需要无菌操作,又免去了去除农杆菌的繁琐过程。该方法不需经过细胞或原生质体再生途径,故可以克服柑桔漫长的童期,且母体上腋芽生长远比外植体再生途径容易,所以转化效率高,这种简便、快速、高效的基因转化方法为柑桔的遗传转化提供了一条新的途径。有关其它柑桔品种成龄组织的转化尚未见报道,可以相信,随着成龄组织的分化与再生体系的建立与完善,必将促进转基因柑桔的生产实用化。

3 存在的问题和展望

(1)基因转化效率低,有待于进一步优化基因转

化方法和体系。报告基因是用于检测组装的嵌合基因在导入细胞后是否具有功能的一种指示基因,其测定方法应简单灵敏。在柑桔的遗传转化中,通常用GUS基因为报告基因,对于所有的假定转基因植株都必需进行GUS活性检测,这是一个非常繁琐的过程,且GUS活性检测对于被测试材料具有破坏性。因此寻找一个简便易行的选择方法对于提高基因转化效率是很必要的。最近,Ghorbel等(1999)首次将绿色荧光蛋白基因(gfp)作为报告基因转入来檬、酸橙和枳橙中。GFP的基因产物绿色荧光蛋白在蓝光下产生绿色荧光,因而可以快速而简便地区分转化体和非转化体。转gfp基因的柑桔植株也可以在不加卡那霉素的筛选培养基上获得,这为获得不具备抗生素或除草剂抗性的转基因植株提供了一条途径,而无抗生素和除草剂抗性对于转基因植物的安全性和商品化具有重要意义,这方面的研究正在进行中。

(2)在过去的转化中,所转标记基因多,而目的基因少,因而有待于进一步开发出新的抗病、抗虫及其它具有重要应用价值的目的基因。在柑桔抗病育种中,枳壳是对CTV病毒抗性很强的品种(Garnsey等,1987;Bar-Joseph等,1989;Yoshida,1996),通过分子标记定位的方法,发现其抗性是由基因位点Ctr-R控制(Gmitter等,1996;Mestre等,1997),进一步的研究发现枳壳对CTV的抗性至少由另外一个基因Ctm参与调控(Mestre等,1997)。Fang和Roose(1999)在柚中定位一个单位点主效基因Ctv2,该基因控制着对CTV的抗性。目前,这些已定位基因的克隆及其抗病机制正在进一步的研究中。

(3)提高基因转化效率的研究多,而有关所转基因的整合及表达规律的研究少。Cervera等(2000)首次对70株4~5年株龄的转UidA和nptII基因柑桔植株的整合和表达研究表明:①基因的拷贝数与GUS活性之间存在显著的负相关;②T-DNA的重排并不影响基因的表达水平;③证实了在自然条件下转化基因在所有转化体中具有整合和表达的稳定性的。今后应进一步加强研究外源基因在植物群体中的遗传规律及行为。

(4)过去的柑桔转化中所用的受体材料多是未度过童期的幼嫩组织,而成龄组织的转化很少,可能的原因是成龄组织的分化与再生较为困难。目前,本实验室正在进行农杆菌介导的CTV CP基因转

化红江橙、沙田柚成龄组织的研究,今后还有待于加强这方面的工作,以促进转基因柑桔的生产实用化和产业化进程。

(5)在农杆菌介导的基因转化中,有关细菌与植物细胞相互作用的分子机制的研究主要在细菌的附着,Ti质粒上致瘤基因的表达、加工、转移与整合等方面进行了大量的研究(Hooykaas 和 Beijersbergen,1994;Lessl 和 Lanka,1994;Gelvin,2000)。但是,有关植物细胞本身在整个基因转化过程中的行为与作用却很少涉及。目前的研究对植物细胞本身编码的蛋白质和酶是否参与 T-DNA 的转移与整合,植物细胞对农杆菌的感受态是如何控制的,在有些转化体系中报告基因的瞬时表达效率高而最终的转化效率却很低等问题很少涉及。故目前基因转化的操作中很大一部分还停留在经验的水平上。相信随着研究的进一步深入,会在这些方面取得新的进展。

参考文献:

- 王 峰,朱 桢,李向辉. 1998. 不同调控序列控制下的 *gus* 基因在柑桔原生质体中的瞬时表达[J]. 福建农业学报, 13(2): 1-5.
- 李耿光, Chen R, 贺 红, 等. 1999. 农杆菌介导几丁质酶基因转化的柑桔植株[J]. 中国学术期刊文摘(快报), 7: 940-942.
- 李 卫, 陈 亮, 蔡得田, 等. 1997. 柑桔基因转化新方法的研究[J]. 植物学报, 39(8): 782-784.
- 陈善春, 张进仁, 黄自然, 等. 1997. 根癌农杆菌介导柞蚕抗菌肽 D 基因转化柑桔的研究[J]. 中国农业科学, 30(3): 7-13.
- 高 峰, 华学军, 范云六, 等. 1990. 用根癌农杆菌离体转化离体柑桔[J]. 中国柑桔, 19(4): 3-4.
- Bar-Joseph M, Marcus R, Lee RG. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 27: 291-316.
- Bidney D, Scelonge C, Martich J, et al. 1992. Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Mol Biol*, 18: 301-313.
- Bond JE, Roose ML. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange[J]. *Plant Cell Rep*, 18: 229-234.
- Cervera M, Pina JA, Juarez J, et al. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration[J]. *Plant Cell Rep*, 18: 271-278.
- Cervera M, Juarez J, Navarro A, et al. 1998. Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants by passing the juvenile stage[J]. *Transgenic Research*, 7: 51-59.
- Cervera M, Pina JA, Juarez J, et al. 2000. A broad exploration of a transgenic population of citrus: stability of gene expression and phenotype[J]. *Theor Appl Genet*, 100(5): 670-677.
- Dominguez A, Guerri J, Cambra M, et al. 2000. Efficient production of transgenic citrus plant expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus[J]. *Plant Cell Rep*, 19: 427-433.
- Durzan D. 1990. Adult vs. Juvenile explants; directed totipotency[A]. In: Rodriguez R, Sanchez-Tames R, Durzan DJ (eds). *Plant Aging Basic and Applied Approaches*[C]. NATO ASI Series. Series A: Life Sciences, 186: 19-25.
- Fang DQ, Roose ML. 1999. A novel gene conferring citrus tristeza virus resistance in *Citrus Maxima* (Burm.) Merrill [J]. *Hortsci*, 34(2): 334-335.
- Gao F, Hua XJ, Gan YL. 1991. *Agrobacterium*-mediated gene transfer in *Citrus reticulata* Blanco[A]. In: Huang BY, Yang Q. *Proc of Inter Citrus Sym Inter Aca Pub*[C]. 219-220.
- Garnsey SM, Barrett HC, Hutchison DJ. 1987. Identification of citrus tristeza virus resistance in citrus relatives and its potential application[J]. *Phytophylactica*, 19: 187-191.
- Gelvin SB. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and intergration. *Annu Rev. Plant Physiol*[J]. *Plant Mol Biol*, 51: 223-256.
- Ghorbel R, Juarez J, Navarro L, et al. 1999. Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plants[J]. *Theor Appl Genet*, 99: 350-358.
- Gmitter GG, Xiao SY, Huang S, et al. 1996. A localized linkage map of the citrus tristeza virus-resistance gene region[J]. *Theor Appl Genet*, 92: 688-695.
- Gmitter FG, Moore GA. 1986. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of citrus; Embryo production, germination and plant survival[J]. *Plant Cell, Tiss Org Cult*, 6: 139-147.
- Gutierrez-E MA, Luth D, Moore GA. 1997. Factors affecting *agrobacterium*-mediated transformation in citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus[J]. *Plant Cell Rep*, 16: 745-753.
- Han ML(韩美丽), Li GG(李耿光), He H(贺 红), et al. 2000. Preliminary study on establishment of transformation system in *Poncirus trifoliata* Raf. (农杆菌介导的枳壳

- 转化系统建立研究初报[J]. *Guihaia*(广西植物), **20**(1): 47-51.
- Hooykaas PJJ, Beijersbergen AGM. 1994. The virulence system of *Agrobacterium trmefaciens*[J]. *Annu Rev Phytopathol*, **32**: 157-179.
- Hidaka T, Omura M. 1993. Transformation of citrus protoplasts by electroporation[J]. *J Japan Soc Hort Sci*, **62**: 371-376.
- Hidaka T, Omura M, Ugaki M, et al. 1990. Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. from suspension cells[J]. *Japan J Breed*, **40**: 199-207.
- Kaneyoshi J, Kobayashi S, Nakamura Y, et al. 1994. A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliolate* Raf.)[J]. *Plant Cell Rep*, **13**: 541-545.
- Kobayashi S, Uchimiya H. 1989. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer[J]. *Jpn J Genet*, **64**: 91-97.
- Lessl M, Lanka E. 1994. Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells [J]. *Cell*, **77**: 321-324.
- Mestre PF, Asins MJ, Pina JA, et al. 1997a. Molecular markers flanking a citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliolate* (L.) Raf. [J]. *Theor Appl Genet*, **94**: 458-464.
- Mestre PF, Asins MJ, Carbonell EA, et al. 1997b. New gene(s) involved in the resistance of *Poncirus trifoliolate* (L.) Raf. To citrus tristeza virus[J]. *Theor Appl Genet*, **95**: 691-695.
- Moore GA, Jacono CC, Neidigh JL, et al. 1992. Agrobacterium-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants[J]. *Plant Cell Rep*, **11**: 238-243.
- Pena L, Cervera M, Juarez J, et al. 1995a. High efficiency agrobacterium-mediated transformation and regeneration of citrus[J]. *Plant Sci*, **104**: 183-191.
- Pena L, Cervera M, Juarez J, et al. 1995b. Agrobacterium-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants[J]. *Plant Cell Rep*, **14**: 616-619.
- Pena L, Cervera M, Juarez J, et al. 1997. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): factors affecting transformation and regeneration [J]. *Plant Cell Rep*, **16**: 731-737.
- Pena L, Cervera M, Juarez J, et al. 1998. Genetic transformation as a tool for the introduction of agronomically important genes into citrus plants[J]. *Acta Horticult*, **463**: 61-68.
- Shimoda N, Toyoda-Yamamoto A, Nagamine J, et al. 1990. Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic action of phenolic signal molecules and monosaccharides[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**: 6 684-6 688.
- Vardi A, Bleichman S, Aviv D. 1990. Genetic transformation of citrus protoplasts and trgeneration of transgenic plants[J]. *Plant Sci*, **69**: 199-206.
- Yao JL, Wu JH, Gleave AP, et al. 1996. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos[J]. *Plant Sci*, **113**: 175-183.
- Yoshida Y. 1996. Graft compatibility of citrus with plants in the Aurantioideae and their susceptibility to cityrus tristeza virus[J]. *Plant Disease*, **80**: 414-417.

(上接第 127 页 Continue from page 127)

- 娄远来, 邓渊钰, 沈纪冬, 等. 2002. 我国空心莲子草的研究现状[J]. *江苏农业科学*, (4): 46-48.
- 茹科夫斯基. 王道济译. 1953. 普通植物学(上册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 181-188.
- 谭万忠. 1994. 空心莲子草在我国的水平和垂直分布[J]. *杂草学报*, **8**(2): 30-33.
- 王 韧, 王 远. 1988. 我国南方水花生发生危害及生物防治调查[J]. *杂草学报*, **2**(1): 384.
- 姚东瑞. 1997. 农达对水花生的防效试验报告[J]. *杂草科学*, (4): 27-28.
- 张 彪. 2001. 两种生境条件下空心莲子草叶片解剖结构比较[J]. *杂草科学*, (4): 6-7.
- 张格成. 1993. 空心莲子草主要生物学特性研究[J]. *杂草科学*, (2): 10-12.
- 张 泓. 1988. 药用植物牛膝根中异常次生结构的发育解剖学研究[J]. *西北植物学报*, (2): 85-89.
- K. 伊稍. 李正理译. 1982. 种子植物解剖学(第二版)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 177-185.
- Wei Y(卫 云), Guo QM(郭庆梅), Ma ST(马书太), et al. 1997. 怀牛膝根内部结构的研究 (An anatomical study of the *achyanthus bidentata*) [J]. *Journal of Shandong University of TCM*(山东中医药大学学报), **21**(6): 452-455.