

根癌农杆菌介导库拉索芦荟 遗传转化因素优化

潘颖南¹, 蒙平¹, 何铁光¹, 苏宾¹, 陈廷速^{1,2}, 李杨瑞²

(1. 广西农业科学院生物技术研究所, 广西南宁 530007; 2. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 广西南宁 530007)

摘要: 以美国库拉索芦荟的横切薄片(transverse thin cell layer, tTCL)作为转化外植体, 初步研究了以根癌农杆菌介导的多种因子对芦荟遗传转化的影响。结果表明: 菌株 EHA105 比 LBA4404 及 AGL1 转化率高; 除了乙酰丁香酮(acetosyringone)外, 菌液的预处理和重悬液的 pH 值也是影响转化的主要因子; 菌液的预处理和适合的蔗糖浓度对转化也有促进作用; 感染时间为 12~18 min, 共培养的温度和时间分别以 25 °C 及 5 d 为佳。

关键词: 芦荟; 根癌农杆菌; 遗传转化

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2005)02-0125-04

Factors optimization for genetic transformation in *Aloe arborescens* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

PAN Ying-nan¹, MENG Ping¹, HE Tie-guang¹, SU Bin¹,
CHEN Ting-su^{1,2}, LI Yang-rui²

(1. *Biotechnology Research Institute, Guangxi Academy of Agriculture Sciences, Nanning 530007, China;*
2. *Guangxi Cropgenetic Development and Biotechnology Laboratory, Nanning 530007, China*)

Abstract: Transient expression of β -glucuronidase(Gus) gene were used to determine the optimized conditions for transformation of transverse thin cell layer(tTCL) of *Aloe arborescens* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The results showed that EHA105 was more efficient than both LBA4404 and AGL1 in the genetic transformation. Besides acetosyringone(AS), pretreatment of the *Agrobacterium* liquid and the pH value of the suspension liquid(1/2MS) were also important in the genetic transformation. An appropriate concentration of sugar accelerated the transformation. The optimum infection time was 12 to 18 minutes. The best temperature and co-cultivation time were 25 °C and 5 days, respectively.

Key words: *Aloe*; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation

芦荟(*Aloe* spp.)属多年生百合科多浆常绿草本植物, 具有广泛的药理活性, 可做药用、饮料、化妆品等, 是一种很有开发前途的经济植物新资源; 开展芦荟的生物技术研究具有重要的理论和应用价值。

目前对于芦荟的遗传转化尚未见报道。我们在用库拉索芦荟表达人表皮生长因子的研究中(陈廷速等, 2002a), 以横切薄片外植体建立了较理想的再生体系(陈廷速等, 2003), 并对影响以根癌农杆菌介导的

收稿日期: 2003-12-19 修订日期: 2004-05-18

作者简介: 潘颖南(1966-), 女, 广西武鸣人, 副研究员, 从事植物组织和细胞培养等工作。

库拉索芦荟遗传转化的一些条件进行了初步研究,旨在建立根瘤农杆菌介导的高效转化体系,为用库拉索芦荟作为生物反应器表达药物积累工作经验。

1 材料和方法

1.1 实验材料

材料为美国库拉索芦荟(*Aloe arborescens*)的无菌试管苗。在超净工作台上将试管苗的叶片去除,参考周根余等(1999)的方法,沿两边对称叶片的中央纵切(LC1)和沿叶片的中心线纵切(LC2),再横切成约1 mm的薄片得到两种薄片(分别为TCL1, TCL2),作为实验材料。

1.2 农杆菌菌株与质粒

根瘤农杆菌菌株为EHA105、LBA4404和AGL1,植物表达载体p1301EGF(含有*Gus*基因、*nptII*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)薄片芽诱导培养基(AM₁):改良的MS+BA 3.5 mg/L(单位下同)+IBA 0.3;(2)丛芽增殖培养基(AM₂):改良的MS+BA 2.5+IBA 0.2;(3)生根培养基(AM₃):改良的MS+NAA 0.5;(4)重悬菌液的培养基(AM₄):1/2改良的MS+AS(acetosyringone)150 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+AS 100 μmol/L,培养温度为26℃;(6)筛选培养基(AM₆):AM₁+Cef(cefotaxime)400+Hyg(hygromycin)5。以上培养基如无特别说明均附加蔗糖3%,琼脂0.56%,pH5.8,培养温度为25℃;除壮苗生长和生根在光照下培养外,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℃和180~250 rpm的条件下振荡培养至OD₆₀₀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AM₄培养基中(1:1),28℃条件下振荡培养8~10 h用于转化。

1.5 库拉索芦荟横切薄片与农杆菌共培养

将准备好的库拉索芦荟横切薄片移入准备好的菌液中,在27℃、120 rpm条件下振荡15 min,取出薄片转入AM₅培养基中培养4 d,再转入AM₆进

行筛选。

1.6 *Gus* 报告基因的检测

外植体转化4 d后,参考改进的Jefferson(1987)的方法,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, methano 120%, pH7.0~8.0)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%。每个处理检测的外植体数量为20个,3次重复,结果为平均值,对照为未进行转化的薄片。

2 结果与分析

2.1 农杆菌菌株、菌液浓度及外植体侵染时间对*Gus*基因瞬时表达率的影响

不同农杆菌菌株和菌液浓度对库拉索芦荟薄片的*Gus*基因瞬时表达率的影响如图1,在所供试的三个菌株中以EHA105的侵染能力最强,AGL1的侵染能力最差;并以稀释一倍的菌液浓度效果为最好。本实验主要使用菌株EHA105来进行转化。

在一系列侵染时间的实验中,外植体在EHA105菌液中侵染时间长达120 min仍可检测到*Gus*基因瞬时表达,但由于农杆菌长得过于旺盛会对筛选不利,侵染时间以15 min为好(图2)。另外还发现侵染菌液预处理时间对*Gus*基因瞬时表达率有影响(图3)。当农杆菌振荡培养到OD值为0.8时,经离心后用BM₄培养基进行悬浮。在重悬液中加入1/4 YEB的培养基能使库拉索芦荟的薄片周围长出农杆菌,*Gus*基因的瞬时表达率也提高了;而用不加YEB的重悬液来侵染材料时,仅有部分薄片周围长有农杆菌;这可能与库拉索芦荟本身含有抑制细菌生长的物质有关系。

2.2 农杆菌重悬液pH值及蔗糖浓度对*Gus*基因瞬时表达率的影响

从图4可知,重悬液pH值过高或过低对*Gus*基因瞬时表达率影响很大,以pH值在5.2~5.5之间*Gus*基因的瞬时表达率为高,而且相当稳定。而农杆菌重悬液中的蔗糖浓度对库拉索芦荟的转化也有影响(图5),在100~120 g/L蔗糖浓度时其*Gus*基因的瞬时表达最好。但蔗糖100 g/L时对其芽分化较好,因此采用此蔗糖浓度。

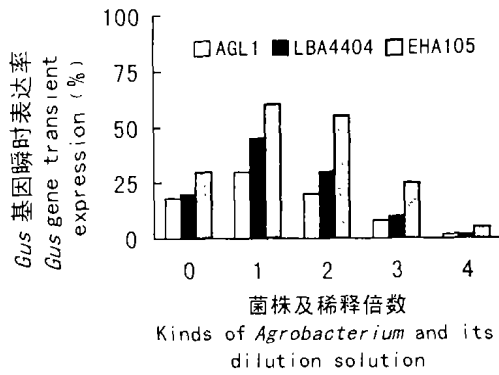


图 1 菌株及稀释倍数对 *Gus* 基因瞬时表达率的影响
Fig. 1 Effect of kinds and concentration of *Agrobacterium* on *Gus* gene transient expression

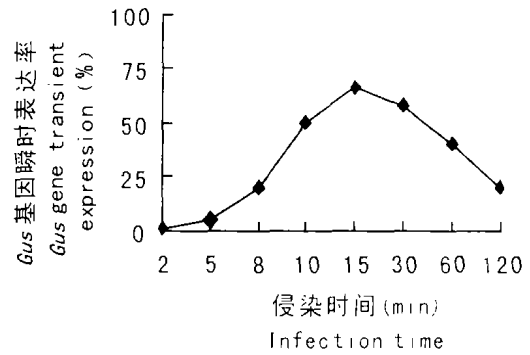


图 4 重悬液 pH 值对 *Gus* 瞬时表达率的影响
Fig. 4 Effect of pH value of resuspension liquid on *Gus* gene transient expression

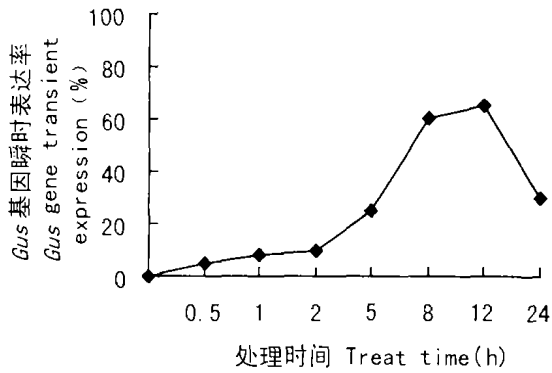


图 2 EHA105 菌株侵染时间对 *Gus* 基因瞬时表达率的影响
Fig. 2 Effect of infection time of EHA105 on *Gus* gene transient expression

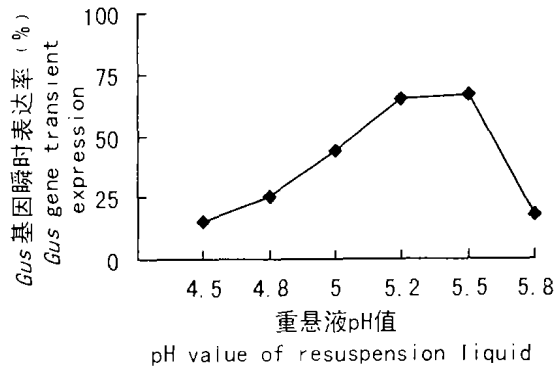


图 5 蔗糖浓度对 *Gus* 基因瞬时表达率的影响
Fig. 5 Effects of sucrose concentrations on *Gus* gene transient expression

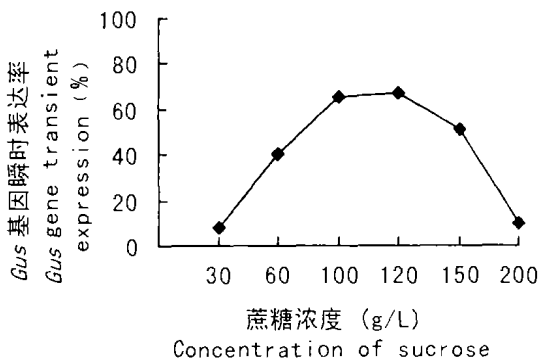


图 3 侵染菌液处理时间对 *Gus* 基因瞬时表达率的影响
Fig. 3 Effect of treating time of *Agrobacterium* solution on *Gus* gene transient expression

2.3 外植体与农杆菌共培养温度及共培养时间对 *Gus* 基因瞬时表达率的影响

在正常的培养温度(25℃)下,*Gus* 基因的瞬时

表达率较高,同时库拉索芦荟薄片不定芽分化也较好。而温度偏高或偏低时 *Gus* 基因的瞬时表达率都较低(图 6)。

共培养时间的长短影响到转化率和下一步的筛选,由图 7 可知,受体与农杆菌共培养 4~5 d,其 *Gus* 基因的瞬时表达率较高;随着培养时间的延长农杆菌生长过多,在筛选时很难抑制农杆菌的生长,检测不到 *Gus* 基因的瞬时表达。此外,由于薄片在菌液中时间过长,因浸泡及缺氧而软腐,丧失芽分化的能力;这与香蕉中遗传转化的情况(陈廷速等, 2002b)是一样的。

2.4 *Gus* 基因表达检测

外植体与农杆菌共培养 4 d 后,进行 *Gus* 基因瞬时表达活性的检测,在组织中可测到 *Gus* 活性,显蓝色(图版 I : 1)。无 *Gus* 活性者(图版 I : 2)及对照(图版 I : 3)。

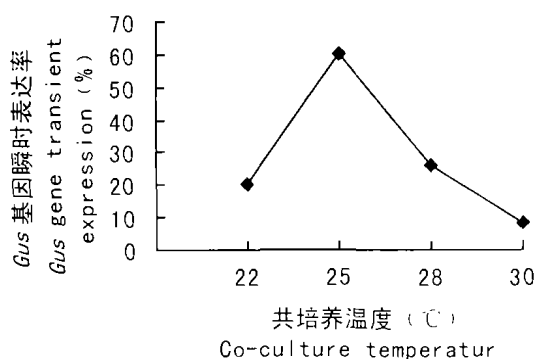


图 6 菌株与外植体共培养温度
Gus 基因瞬时表达率的影响

Fig. 6 Effects of co-culture temperature
on Gus gene transient expression

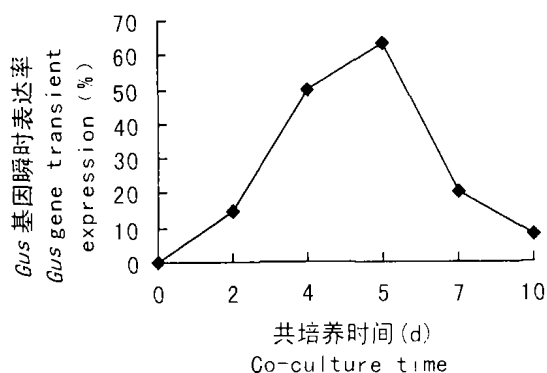


图 7 菌株与外植体共培养时间
Gus 基因瞬时表达率的影响

Fig. 7 Effects of co-culture time on Gus
gene transient expression

3 讨论与小结

在以根癌农杆菌介导的库拉索芦荟遗传转化中,除了必须使用 AS 外,偏酸性的感染条件、适合的共培养温度和时间、蔗糖浓度等诱导 *vir* 基因的表达,促进了 T-DNA 的转移,得到较高的瞬时表达率。重悬液的 pH 值过高(大于 6.0)或过低(小于 4.0),都很难检测到有 *Gus* 基因的瞬时表达,只有在适当偏酸的培养条件,才有利于农杆菌 *vir* 区基

因的表达。农杆菌重悬液 pH 值对植物的转化有明显影响,特别是在单子叶植物的转化上是一个很重要的因素。一些研究也认为,在农杆菌与植物细胞进行共培养时,使用较低 pH(5.2 以下)的培养基有利于转化频率的提高(Hiei 等,1994)。但在水稻的转化中,pH 值在 4.8~6.2 的范围内,培养基的 pH 值对转化率影响较小(刘志学等,1999)。看来不同植物遗传转化所要求的条件有较大的差别,需要分别进行研究。

参考文献:

- Chen TS(陈廷速), Yang HJ(杨海杰), Zhang J(张 军), et al. 2002a. The cloning and identifying of human epidermal growth factor(HEGF) and its expression plasmid construction in plant(人表皮生长因子基因的合成、鉴定及植物表达质粒的构建)[J]. *J Guangxi Univ*(广西大学学报), **27**(2): 122-127.
- Chen TS(陈廷速), Zhang J(张 军), Xia NS(夏宁邵), et al. 2002b. Optimization of the conditions for banana(*Musa spp.*) genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*(香蕉农杆菌介导高效转化体系)[J]. *Southwest China J Agri Sci*(西南农业学报), **15**(1): 20-23.
- Chen TS(陈廷速), Zhang J(张 军), Xia NSH(夏宁邵), et al. 2003. Plantlet regeneration from transverse thin-cell-layer culture of *Aloe*(芦荟横切薄层培养再生植株)[J]. *Subtrop Plant Sci*(亚热带植物科学), **32**(2): 58.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of boundaries of the T-DNA[J]. *The Plant Journal*, **6**(2): 271-282.
- Zhou GY(周根余), Ding HF(丁洪峰), Shi WM(施望敏), et al. 1999. Fast asexual propagation of *Aloe vera*(芦荟的无性快速繁殖)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **26**(6): 410-411.
- Liu ZhX(刘志学), Zhang X(张 旭), Xu YN(徐亚南), et al. 1999. Optimization of the conditions for rice genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404/pCAMBIA series(用 LBA4404/pCAMBIA 系列转化水稻的最佳条件)[J]. *J Fudan Univ(Nat Sci)*(复旦学报,自然科学版), **38**(4): 339-443.
- Jefferson RA. 1987. Assaying chimeric genes in plants; the *Gus* gene fusion system[J]. *Plant Molecular Biology Reports*, **11**: 38-47.