

南丰蜜橘胚性愈伤组织诱导及其转化研究

段艳欣^{1,2}, 范净¹, 郭文武¹

(¹华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070;

²青岛农业大学园林园艺学院, 山东青岛 266109)

摘要:南丰蜜橘是原产于中国的古老柑橘品种,其果实皮薄而肉甜,深受消费者喜爱,当前南丰蜜橘的品质发生劣变,影响了其商品价值。为采用基因工程育种以改善南丰蜜橘品质,通过诱导其愈伤组织并以其为试材进行了转基因研究。南丰蜜橘自种子实生苗下胚轴处长产生出愈伤组织,挑选胚性愈伤组织进行增殖后,采用根癌农杆菌介导法进行开花相关基因 API 的转化。结果获得 22 团抗性愈伤组织,平均产出率为 7.3 团/皿,表明该品种有较高的转化率。抗性愈伤组织经 PCR 分析、Southern blot 检测证实为转化子。研究结果表明南丰蜜橘胚性愈伤组织是基因工程改良的良好受体,可用于其他基因的转化研究。

关键词:根癌农杆菌介导转化;胚性愈伤组织;南丰蜜橘;PCR 分析;Southern blotting 检测

中图分类号:S666 文献标识码:A

Research of Embryogenic Callus Induction and Transformation of 'Nanfeng' Tangerine

Duan Yanxin^{1,2}, Fan Jing¹, Guo Wenwu¹

(¹National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;

²College of Landscape and Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao Shandong 266109)

Abstract: 'Nanfeng' tangerine (*Citrus reticulata*), favorite for its sweet-fleshed and thin-rind fruit, is one of the oldest citrus cultivars in China. However, the decline of its fruit quality affected its commodity value. In order to explore a rapid and effective breeding programme for cultivar improvement, we performed Agrobacterium-mediated transformation of this cultivar using embryogenic callus induced from hypocotyl of seedling. Ti plasmid pROKII with the *Arabidopsis APETALA1 (API)* gene and a neomycin phosphotransferase II (NPTII) gene was used in this experiment. Totally, twenty-two resistant callus clusters were obtained with a mean number of 7.3 cell lines per plate. Further PCR and Southern blot analysis confirmed that transgenes were integrated into citrus genome. Though we have not succeeded in regenerating whole transgenic plants, this study indicate that embryogenic callus of 'Nanfeng' tangerine is ideal explants for genetic engineering.

Key words: Agrobacterium-mediated transformation, embryogenic callus, 'Nanfeng' tangerine, PCR analysis, Southern blot analysis

南丰蜜橘原产于中国,是江西省南丰县特有的果树种质资源。迄今已有 1300 多年栽培历史,是古老的柑橘品种。其果实皮薄核少,汁多化渣,酸甜适口,营

养丰富深受消费者喜爱。但是,当前南丰蜜橘的品质发生劣变,如风味变淡,化渣性能下降等,这些严重影响了其商品价值限制了其产业的发展。因此,探寻高

基金项目:国家 863 项目“特色植物高效转化技术的建立”(2007AA10Z182);霍英东基金项目“柑橘 LFY、API 基因转化及其育种应用”(91030);IFS 项目“柑橘 API 基因转化缩短童期的研究”(D/2895-3)。

第一作者简介:段艳欣,女,1978 年出生,河北衡水人,讲师,研究方向:果树基因工程。通信地址:266109 青岛农业大学园林园艺学院, Tel: 0532-86080740, E-mail: duanyanxin@yahoo.com.cn。

通讯作者:郭文武,男,1970 年出生,湖北省郧县人,教授,博士生导师,研究方向:细胞工程、分子育种。通信地址:430070 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, Tel: 027-87281543, E-mail: guoww@mail.hzau.edu.cn。

收稿日期:2008-12-16,修回日期:2009-03-06。

效快速的育种途径,培育高品质的南丰蜜橘品种显得尤为重要。柑橘常规育种受珠心胚干扰、性器官败育、育种周期长以及遗传上高度杂合等影响^[1-2],进展较缓慢,短期内难以满足生产与消费的需求;在实际生产中也受到许多因素制约,如周期性冻害、黄龙病、速衰病等危害而导致品质和产量下降。转基因技术可以缩短育种周期,打破物种界限,定向改良目标性状等,在植物遗传改良中已取得令人瞩目的成就。遗传转化在很多柑橘品种中均有成功的报道^[3],而对于南丰蜜橘这一古老的具有中国特色的柑橘品种,截至目前还没有人开展此类研究。

在柑橘的遗传转化中,根癌农杆菌介导法是普遍采用的方法,其转化受体多为实生苗上胚轴、童期或成年态茎段等^[3]。南丰蜜橘种子较小,其实生苗上胚轴细弱,再生率与转化效率较低。而且实生苗来源的外植体由于其种子具有多胚性,转化材料的遗传背景可能不一致;同时由于器官发生再生途径容易产生嵌合

体和逃逸体^[4-6]。胚性愈伤组织通过体胚发生途径再生频率高,且单细胞的起源大大减少嵌合体的再生频率;此外,转基因愈伤组织可用于细胞融合研究或其他研究^[7]。

因此,笔者以南丰蜜橘胚性愈伤组织为试材,采用根癌农杆菌介导法实现该品种的遗传转化,为其基因工程改良提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验时间与地点

试验于2004—2005年在华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室柑橘课题组研究室内进行。

1.2 材料

1.2.1 外植体材料 南丰蜜橘果实由武汉市果品批发市场购买。

1.2.2 供试农杆菌菌株和质粒 采用菌株为卸载的农杆菌EHA105。质粒载体为pROKII(西班牙Peña博士惠赠),*APETALA1*(*API*)位于CaMV35s启动子下(图1)。

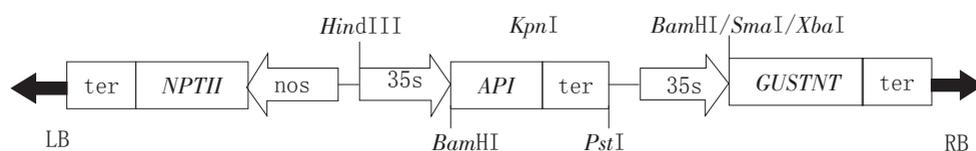


图1 质粒pROKII-API构建图

1.3 方法

1.3.1 愈伤组织的诱导 将南丰蜜橘成熟果实的种子用自来水洗净后,用1 mol/L NaOH浸泡10 min去除果胶后冲洗干净;在超净工作台上用70%酒精浸泡2~3 min,用2%的次氯酸钠浸泡灭菌20 min,中间摇动数次,最后用无菌水洗涤3次,每次5 min;将上述灭菌的种子在超净工作台上剥去内外种皮,置于装有固体MT + GA₃ 1.0 mg/L培养基的试管中,于(26±2)°C暗培养30~45天用于诱导愈伤组织。

1.3.2 遗传转化与筛选再生 挑取状态好的颗粒性强的愈伤组织在固体MT培养基上继代25天,用于转化实验,转化方法参照Li等^[8]报道略做修改。共培养温度设为23 °C。共培养后的愈伤组织转入筛选培养基SM(MT基本培养基+头孢霉素400 mg/L+卡那霉素50 mg/L),28 °C暗培养6~8周后,每30天继代筛选1次。胚状体诱导采用实验室常用的EIM1(MT + 20 mg/L glycerol)、EIM2(MT + 50 g/L lactose)、EIM3(MT + 0.5 g/L malt extract)等3种培养基。胚状体诱导培养基中附加头孢霉素200 mg/L和50 mg/L卡那霉素。

1.3.3 转化子的PCR、Southern杂交鉴定 PCR引物设计及扩增程序参照Peña等^[9]。DNA提取参照程运江等^[10]采用CTAB法分别从未转基因对照和抗性愈伤组

织中提取。质粒DNA提取采用SDS碱裂解法小量制备。NPTII基因正向引物:5'-GACGAGGCAGCGCGGCTAT-3';反向引物:5'-AAGAAGGCGATAGAAGGCGA-3',预期扩增产物大小为597 bp的片段。Southern杂交:随机取3团抗性愈伤组织分别提取DNA,取15 μg DNA用Hind III(MBI公司)进行酶切12 h,酶切产物转移至尼龙膜上。以API和NPTII基因引物扩增的PCR产物为探针(分别为712 bp和597 bp)用放射性同位素³²P标记做探针,与转好的膜于65 °C杂交16 h,进行洗膜、曝光、放射自显影。

2 结果与分析

2.1 南丰蜜橘胚性愈伤组织诱导及转API基因抗性材料的获得

南丰蜜橘种子在固体MT+GA₃ 1.0 mg/L培养基上培养30~45天后,愈伤组织自实生苗下胚轴处分化长出(图2-A),部分愈伤组织颗粒性强且有绿色球形胚状体产生(图2-B),表明其具有体胚发生能力。将这些愈伤组织转移至MT培养基上培养25天后用于遗传转化。由于该愈伤组织量较少,仅做了1次实验,共铺3皿,获得22团抗性愈伤组织,平均7.3团/皿,表明该基因型容易转化。抗性愈伤组织呈淡黄

色,颗粒较大,转移至新鲜的筛选培养基上后能较快增殖(图2C~D),但用胚状体诱导培养基EIM1、EIM2、EIM3均不能诱导出胚状体,甚至会导致愈伤组织褐化。在后期培养中,有一瓶愈伤组织在饥饿状

态下分化出少量胚状体,胚状体呈不规则状的大颗粒组织(图2E)。遗憾的是该组织在后期培养中又返回愈伤状态。目前,该基因型转化细胞系均滞留在愈伤组织阶段。

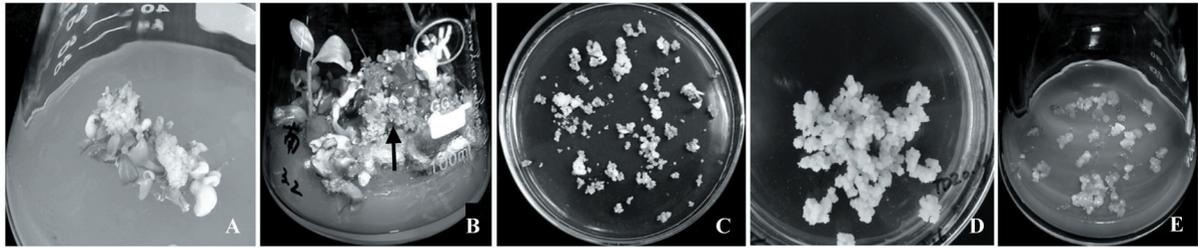


图2 南丰蜜橘胚性愈伤组织的诱导及转API基因再生

A: 愈伤组织诱导; B: 愈伤组织的体胚发生(箭头所示); C: 抗性愈伤组织产生; D: 抗性愈伤组织第二次继代; E: 抗性愈伤组织在饥饿状态下产生胚状体。

2.2 PCR、Southern 杂交表明外源基因已成功转入柑橘基因组中

利用API、NPTII基因特异引物对得到的抗性愈伤组织DNA进行PCR扩增。结果显示所测材料中均分别扩增出预期的目标带(597 bp的NPTII条带和712 bp的API条带),而未转化对照中没有扩增出目标带(图

3),表明外源基因已经转化成功。API和NPTII基因片段为探针杂交时,3个转基因样品中均有杂交条带,且均为1个拷贝,而未转化对照中没有杂交信号,表明外源基因(API和NPTII基因)已经成功整合到南丰蜜橘基因组中(图4A~B)。

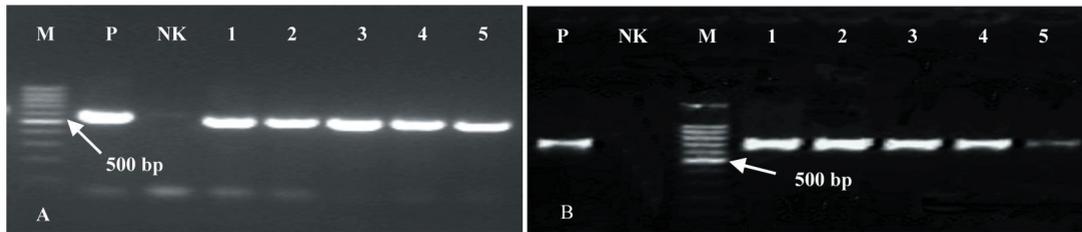


图3 南丰蜜橘转API基因胚性愈伤组织的PCR检测

A: NPTII基因的PCR检测; B: API基因的PCR检测; M: DNA分子量标记(100 bp ladder); P: 质粒; NK: 未转化愈伤组织; 1~5: 转基因愈伤组织。

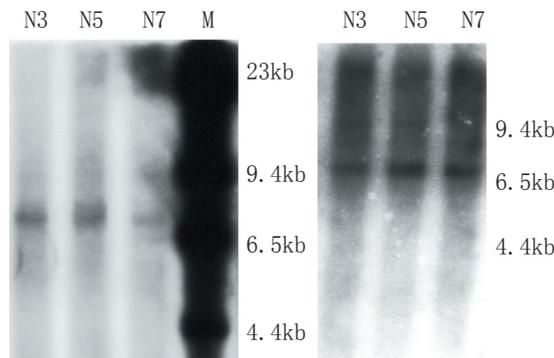


图4 南丰蜜橘转API基因愈伤组织的Southern blotting分析

A: API基因杂交结果; B: NPTII基因杂交结果

3 讨论

笔者从种子诱导获得了南丰蜜橘的胚性愈伤组织,并以其为外植体进行了遗传转化研究,得到了抗性愈伤组织,并经PCR分析、Southern blot检测证实为转化子,成功地实现了该品种的遗传转化。笔者共获得20多团南丰蜜橘抗性愈伤组织,平均7.3团/皿,其转化率远高于笔者已发表的其他品种^[11-12],表明该品种易于

转化,这为以后通过基因工程手段进行该品种的目标性状改良奠定了基础。获得的转API基因愈伤组织系若用于细胞融合,将有可能获得早花的体细胞杂种植株。尽管笔者获得了较高的遗传转化率,但未能获得转基因植株,因此,该品种的培养再生体系有待进一步探索和完善。

参考文献

- [1] Moore GA, Jacono CC, Neidigh JL, et al. Transformation in Citrus// Bajaj YPS (eds) Plant protoplasts and genetic engineering IV. NewYork, Springer-Berlin Heidelberg, 1993:194-208.
- [2] Soost RK, Roose ML. Citrus//Janick J, Moore JN (eds) Fruit breeding. NewYork,John Wiley,1996:257-323.
- [3] Deng XX and Duan YX. Modification of perennial fruit trees. In Fladung M and Ewald D (eds) Tree transgenesis: Recent Developments. Germany, Springer-Verlag Berlin Heidelberg,2006: 47-66.
- [4] Peña L, Cervera M, Juarez J, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Rep,1995 14:616-619.
- [5] Luth D and Moore GA. Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1999, 57:219-222.
- [6] Domínguez A, Cervera M, Pérez RM, et al. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. Molecular Breeding, 2004, 14:171-183.
- [7] Cai XD, Liu X, Guo WW. GFP expression as an indicator of somatic hybrids between transgenic Satsuma mandarin and calamondin at embryoid stage. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2006, 87(3):245-253.
- [8] Li DD, Shi W and Deng XX. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses of Ponkan mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. Plant Cell Report, 2002, 21:153-156.
- [9] Peña L, Martín-Trillo M, Juárez J, et al. Constitutive expression of *Arabidopsis LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. Nature Biotechnology, 2001, 19:263-267.
- [10] Cheng YJ, Guo WW, Yi HL, et al. An efficient protocol for genomic DNA extraction from Citrus species. Plant Molecular Biology Reporter, 2003, 21:177-177.
- [11] 刘歆,段艳欣,范净,等.绿色荧光蛋白基因转化柑橘胚性愈伤组织与高效再生.果树学报,2006,23(6):670-675.
- [12] 李东栋,邓秀新.柑橘不同品种对根癌农杆菌介导遗传转化的反应差异.分子植物育种,2005,3(1):52-56.