

根癌农杆菌介导茶树转基因体系的建立

项 威, 史成颖, 贺志荣, 徐 燕*

(安徽农业大学教育部和农业部茶叶生物化学与生物技术重点实验室, 合肥 230036)

摘 要: 利用茶树[*Camellia sinensis*(L.)O. Kuntze]品种“农抗早”的叶片进行培养, 诱导形成愈伤组织。选择生长旺盛、致密的愈伤组织块与根癌农杆菌 EHA105 进行共培养, 通过潮霉素(Hygromycin)抗性筛选、GUS 染色及 PCR 的验证, 获得部分转基因愈伤组织。在添加 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙酰丁香酮 (AS) 处理后, 转化率约为 10%。同时试验结果证明, AS 可以提高农杆菌的转化效率, 增加渗透压却不能提高转化率。

关键词: 茶树; 转基因; 组织培养; 愈伤组织; 根癌农杆菌

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)05-0721-04

Establishment of an *agrobacterium*-mediated transformation system for tea plant (*Camellia sinensis*)

XIANG Wei, SHI Cheng-ying, HE Zhi-rong, XU Yan

(Key Laboratory of Tea Biochemistry and Biotechnology, Ministry of Education and Agriculture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Calli were induced from leaves of tea cultivar ‘Nongkangzao’, and those growing vigorously with compact tissue were chosen for *agrobacterium*-mediated transformation by EHA105. The transgenic callus was screened using hygromycin. The resistant callus was confirmed by RT-PCR and GUS dyeing. The results showed that transgenic callus was obtained using this method, and the conversion rate was about 10% after adding $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ acetosyringone (AS). The results also showed that the efficiency of *agrobacterium*-mediated transformation could be effectively improved by adding AS, but the increase in osmotic pressure had no effect.

Key words: *Camellia sinensis*; transgenesis; cell tissue culture; calli; *Agrobacterium*

茶树(*Camellia sinensis*(L.)O. Kuntze)是多年生异花授粉植物, 栽培历史悠久, 是我国重要的经济作物之一。茶叶中含有丰富的次生代谢产物, 如多酚类化合物、儿茶素及咖啡碱等。茶是中国人民的传统饮品, 被誉为“国饮”, 同时也是全球最受欢迎的无酒精饮料。

茶树在经济效益上拥有重要的地位, 也具有很高的研究价值, 但在研究茶树中还存在较多只有通过转基因技术才能解决的难题。如常规茶树育种技术制约了优质资源的充分利用, 使茶树品种在选育时难以取得突破性进展^[1], 而转基因技术既能缩短优良品种的育种周期, 实现茶树的定向育种, 又能实现茶树抗逆性状的筛选。利用转基因技术将抗病虫、抗寒、抗旱等基因导入茶树中, 可提高茶树抗

病虫、抗旱及抗寒能力, 特别是获得抗病虫转基因新品种, 可有效降低茶叶的农残问题^[2-3]。又如, 茶树次生代谢产物种类繁多, 而且在生化分析上取得很多成果, 但是这些重要的次生代谢产物的代谢途径及基因调控方面的研究却很匮乏, 需要建立相关的转基因体系来研究茶树次生代谢流的基因调控。还有很多类似的问题需要通过茶树的转基因来解决。因此转基因技术对茶树的研究具有非常重要的现实意义。

目前建立茶树转基因体系的方法主要是利用农杆菌转化技术及基因枪技术。自从发现农杆菌具有转化能力以来^[4], 农杆菌介导转基因的方法一直广泛应用在植物转基因领域^[5]。基因枪技术用在茶树遗传转化时虽然有不受体型影响的优点, 但是这

收稿日期: 2012-05-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070614)和安徽农业大学人才引进基金共同资助。

作者简介: 项 威, 男, 硕士。E-mail: xwgzyx2012@163.com

* 通讯作者: 徐 燕, 女, 博士, 副教授。E-mail: yanxu@ahau.edu.cn

项技术还处于起步阶段,还有很多问题需要更深一步地去研究,如仪器的可控性、准确性、精确性和轰击后进入受体细胞 DNA 的生物学变化及其调控理论等^[6-8]。而农杆菌介导的转基因方法操作简单易行、成本较低,可以有效的将目的基因整合到植物的基因组中^[9],不过也还存在遗传转化效率不高的问题^[10]。自 20 世纪 90 年代利用根癌农杆菌转化得到抗性愈伤组织以来,人们开始对茶树转基因技术进行探索^[11],目前的研究主要集中在优化转基因体系上,如农杆菌菌液浓度、外源药物的添加、侵染时间、共培养条件等^[12-13]。茶树基因转化虽有成功报道,但基本限定在瞬时表达,稳定表达技术仍不够成熟^[15-16],而茶树愈伤组织和悬浮细胞培养的基因转化则简单易行^[15]。本实验利用根癌农杆菌介导转化茶树愈伤组织,通过添加外源药品及增加渗透压对农杆菌转化茶树的效率及优化茶树的转基因体系进行了初步的研究。

1 材料与方 法

1.1 材料及药品

茶树品种为农抗早(高丽萍老师提供),培养基系 B5 培养基,农杆菌菌株为 EHA105,所带质粒为 pCAMBIA35S: +GUS(北京农业大学惠赠),筛选抗生素为潮霉素(Hgy⁺)(购于 Sigma 公司),脱菌抗生素为头孢霉素(Cefo)(购于索莱宝公司),乙酰丁香酮(AS)(购于索莱宝公司)。

1.2 方法

1.2.1 茶树愈伤组织的诱导 取茶树农抗早的幼嫩茎段,用自来水冲洗 1 h,然后经 70%酒精表面灭菌 30 s,0.1%升汞灭菌 10 min,最后用无菌水清洗 5 次。将已灭菌的茎段用手术刀切至约 1 cm 长度,置于 B5(含 30 g·L⁻¹的蔗糖,0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D,0.1 mg·L⁻¹ KT, pH 5.5)。固体培养基上,(25±1)℃ 黑暗条件下培养,20 d 更换 1 次培养基。

1.2.2 抗性筛选抗生素浓度的确定 试验采用液体培养法培养愈伤组织,在培养基中加入不同浓度的抗生素潮霉素(Hgy⁺),浓度分别为:0、10、20 和 30 mg·L⁻¹,每 4 d 对愈伤组织的鲜重进行称重,与空白组对照,从而确定茶树愈伤组织的生长周期以及最佳抗性筛选的抗生素浓度。

1.2.3 愈伤组织与根癌农杆菌共培养 农杆菌侵染试验分为 4 个对照(见表 1),每个对照 20 皿(每皿 8~10 块愈伤组织),设 3 个重复。取出生长旺盛,致密的愈伤组织,浸泡在培养好的农杆菌菌液中,菌液 OD₆₀₀ 约为 0.8,菌液中加入乙酰丁香酮(AS)

的浓度为 100 μmol·L⁻¹,对照组 AS 浓度为 0,侵染时间为 3~5 min。侵染结束后,用无菌滤纸吸干多余的菌液,置于共培养基 B5 上,25℃ 黑暗共培养 3 d。

1.2.4 脱菌抗性筛选 共培养 3 d 之后的愈伤组织需进行脱菌处理。就农杆菌不易脱尽的问题,本实验采用液体脱菌的方法,在脱菌的同时,加入抗生素进行筛选。在含有 Cefo 浓度为 400 mg·L⁻¹的液体 B5 培养基中加入 20 mg·L⁻¹的 Hyg⁺,将共培养的愈伤组织转入上述液体培养基中,进行脱菌,同时开始抗性筛选。在脱菌 3 d 后,更换同样的脱菌培养基,此步重复 4 个周期,愈伤组织上的农杆菌会清除干净。将脱菌完全的愈伤组织转接至含 20 mg·L⁻¹的 Hyg⁺的 B5 培养基上进行抗性筛选,每 20 d 更换 1 次培养基。

1.2.5 抗性愈伤组织的检验 共培养愈伤组织在 8 周后取出部分进行检测,检测方法分别是:GUS 染色法和 PCR 的方法。

GUS 染色法:在不同处理后愈伤组织中,每个对照及重复各随机挑取 20 块经过侵染的愈伤组织,进行 GUS 染色。以 GUS 组织化学分析的反应液进行染色,将经农杆菌转化的茶树愈伤,冲洗干净,浸于 X-gluc 染液中,37℃ 保温过夜,用 70%乙醇漂洗并保存,观察含有蓝斑的愈伤。

PCR 检测:在不同处理后愈伤组织中,每个对照及重复各随机挑取 10 块经过侵染的愈伤组织,挑取转化后的愈伤组织块上存在一定量新的愈伤突起的组织块,提取组织 RNA,反转录成 cDNA,以反转录合成的 cDNA 一链为模板,利用农杆菌中含有的 *ipt* 基因的引物进行 PCR,用于感染的农杆菌菌液 PCR 为对照,将 PCR 产物进行琼脂糖电泳,观察含有目的基因的愈伤组织。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

接种 10 d 后茎段伤口处开始膨大,15 d 后可明显看到外植体的切口处产生脱分化的愈伤组织,愈伤组织颜色为浅褐色、淡绿色。将所得的愈伤组织进行继代培养 4 个周期(每周期为 20 d)后,获得浅黄色致密的愈伤组织块,适合转化农杆菌。

2.2 抗性筛选抗生素浓度的确定

在培养基中加入不同浓度潮霉素(Hgy⁺)后,每 4 d 对愈伤组织的鲜重进行称重,与空白组对照,结果表明茶树愈伤组织的生长周期以及最佳抗性筛选的抗生素浓度为 20 mg·L⁻¹(图 1)。

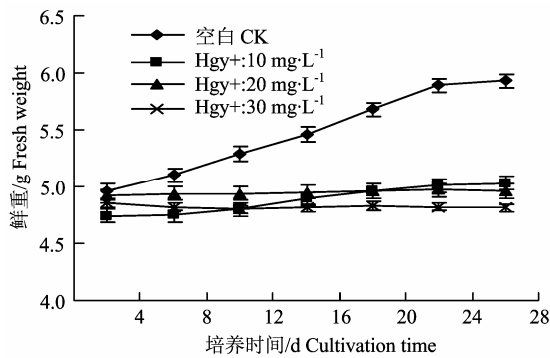


图 1 愈伤组织在不同浓度抗生素下的生长曲线

Figure 1 Growth curves of calli with addition of different concentrations of antibiotics

2.3 GUS 染色检测结果

不同处理后的愈伤组织, 在经过 GUS 染色后, 经观察发现, 在常规侵染方式以及加入 AS 的处理下的 3 个重复中, 存在一定量的蓝色细胞的愈伤组织块数分别为 2、3 和 0 块 (见图 2 和表 1), 去除转化失败的一组, 平均转化率为 $12.5\% \pm 2.5\%$, 经其他处理的愈伤组织并不能被成功染色, 在抗性筛选的过程中, 没有出现农杆菌污染的现象, 因此可

以证明有转化成功的愈伤组织, 但是转化率较低。

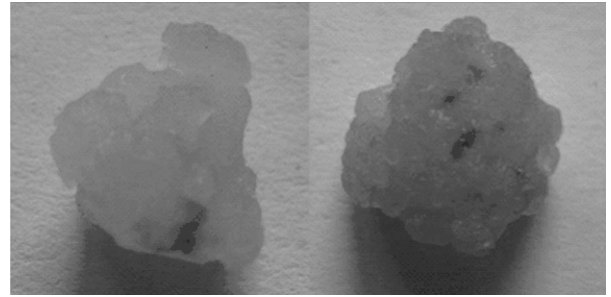


图 2 GUS 染色结果

Figure 2 Results of GUS dyeing

2.4 PCR 检测结果

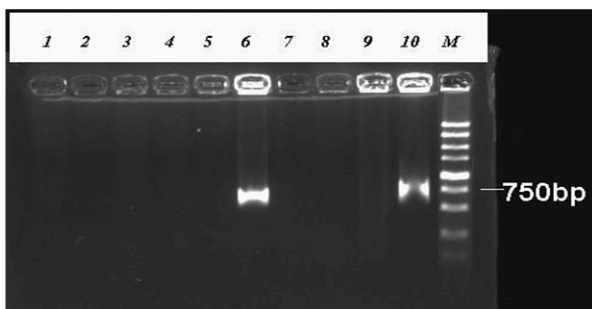
根据 PCR 反应及琼脂糖电泳结果发现, 只有常规侵染方式以及加入 AS 的处理下的 3 个重复中, 每个重复中 1 块愈伤组织的 PCR 产物中有目的基因的条带 (见图 3, 图为其中一个重复的 PCR 结果)。这证明实验中是有转化成功的愈伤组织, 转化率约为 10%。从 GUS 染色及 PCR 结果来看, 根癌农杆菌诱导转化茶树愈伤组织可以成功, 但是转化率很低。

表 1 农杆菌不同处理方式及不同侵染方式对愈伤组织转化的结果

Table 1 Effects of *Agrobacterium* infection methods on GUS transient expression

| 侵染方式 Infection mode | | 农杆菌处理方式 Treatment condition by <i>Agrobacterium</i> | |
|------------------------|--------------------------|---|-----|
| | | +AS | -AS |
| 常规 Convention | 水 Water | 0 | 0 |
| | 农杆菌 <i>Agrobacterium</i> | $12.5 \pm 2.5\%$ | 0 |
| 真空 Vacuum | 水 Water | 0 | 0 |
| | 农杆菌 <i>Agrobacterium</i> | 0 | 0 |

注: 表中结果为被成功染色的愈伤组织所占百分率。Note: The datum in the table is the percentage of the dyeing calli.



由左向右模板依次为: 1~9.已转化的愈伤组织 DNA; 10.用于侵染的农杆菌菌液; 11.Marker

From the left to the right: 1-9. DNA from the transgenic calli; 10. DNA from *Agrobacterium*; 11. Marker

图 3 以 *ipt* 基因引物对常规侵染方式以及加入 AS 处理后的愈伤组织 PCR 的电泳结果

Figure 3 The PCR result of the callus under normal growth and with adding AS using the primers of *ipt* gene

3 讨论

作者通过根癌农杆菌侵染研究乙酰丁香酮和渗透压对农杆菌介导转化茶树细胞的影响。试验中我们得到很少一部分转化成功的愈伤组织。相比于农杆菌转化茶树瞬时表达^[9], 本试验中基因转化率较低, 但是瞬时表达的实验结果较大程度上会受到残留农杆菌的影响, 而通过 GUS 染色及 PCR 检测结果来看, 本试验不会受到这方面因素的影响。综合以往有关利用农杆菌介导转化茶树组织的研究来看, 存在转化率低, 甚至转化不成功的问题的主要原因可能在两个方面: 茶树中多酚类化合物含量较高; 农杆菌致病基因 *Vir* 基因在转化茶树时功能的消减。

茶树中富含儿茶素等多酚类物质。一方面多酚

类物质本身就是一种抑菌剂,对农杆菌的生长有很大的抑制作用,从而影响转化率;另一方面它还是一种蛋白质的沉淀剂,可以拮抗农杆菌致病基因 *Vir* 基因产物(一种结合在膜上的受体蛋白),阻塞农杆菌的 T-DNA 向茶树细胞运转的通道,从而间接影响农杆菌的转化效率。所以茶树富含多酚类物质是制约农杆菌(根癌农杆菌和发根农杆菌)介导遗传转化茶树的一个关键因子^[16]。

有研究证明,农杆菌中的致病 *Vir* 基因在高渗透压条件下可以增加拟南芥中基因的表达效率^[14],但是从本试验结果来看,渗透压的增加并不能改善茶树中农杆菌介导的基因转化效率。乙酰丁香酮(AS)能够诱导农杆菌中 *Vir* 基因以及 Ti 质粒上 *repABC* 操纵子的表达是众所周知的^[18-19],有研究证实,AS 在农杆菌的加入可以提高转化拟南芥的效率^[20],然而酚类物质的存在则大大限制了农杆菌的转化效率^[21]。本试验结果也证实了 AS 在农杆菌介导转化茶树细胞时起到了积极的作用。

在今后的试验当中,将重点探究是否因为茶树中某些物质的存在,使农杆菌致病基因的表达受到抑制,从而导致农杆菌介导的基因转化茶树细胞效率低下。希望在不久的将来,农杆菌介导转化过程中存在的问题可以得到解决,提高转化效率。

参考文献:

- [1] 廖书娟,李华钧,吉当玲. 基因工程在茶树育种中的应用[J]. 茶叶科学技术, 2004(4): 6-8.
- [2] 骆颖颖,梁月荣. *Bt* 基因表达载体的构建及对茶树遗传转化的研究[J]. 茶叶科学, 2000, 20(2): 141-147.
- [3] 陆建良,林晨,路颖颖,等. 茶树重要功能基因克隆研究进展[J]. 茶叶科学, 2007, 27(2): 95-103.
- [4] Chilton M D, Drummond M H, Merio D J, et al. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis[J]. Cell, 1977, 11(2): 263-271.
- [5] Dunwell J M. Transgenic approaches to crop improvement[J]. J Exp Bot. 2000, 51(1):487-496.
- [6] 董云洲,贾士荣. 基因枪转化小麦悬浮细胞参数的优化[J]. 中国农业科学, 1998, 31(6): 79-81.
- [7] Jarl C I. Brief report plant regeneration and transient expression after particle bombardment of different barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Hereditas, 1999, 130: 83-87.
- [8] Zhang S, Cho M J, Koprek T, et al. Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using *in vitro* shoot meristematic cultures derived germinated seedling [J]. Plant Cell Rep, 1999, 18: 959-966.
- [9] Ingelbrecht I, Breynne P, Vancomperonolle A, et al. Transcriptional interferences in transgenic plants[J]. Gene, 1991, 109(2): 239-242.
- [10] Curtis I S. Transgenic crops of the world, essential protocols, XVII[M]. Springer, Berlin Heidelberg, New York, 2004.
- [11] Mondal T K, Bhattacharya A, Ahuja P S. Transgenic tea plants *Camellia sinensis* (L.)O. Kuntze obtained by *Agrobacterium*-Mediated transformation of somatic embryos [J]. Plant Cell Rep, 2001, 20(8): 712-720.
- [12] 奚彪,刘祖生,梁月荣. 发根农杆菌介导的茶树遗传转化[J]. 茶叶科学, 1997, 17(1): 155-156.
- [13] 陈志辉. 茶树不同外植体组织培养与试管苗保存研究初探[J]. 福建农业学报, 2010, 25(6): 726-730.
- [14] 董喜才,杜建中,王安乐,等. 乙酰丁香酮在植物转基因研究中的作用[J]. 中国农学通报, 2011, 27(5): 292-299.
- [15] 谭和平,周李华,钱杉杉,等. 茶树转基因技术研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2009, 27(3): 323-326.
- [16] 邓婷婷,吴扬,黄建安. 发根农杆菌转化茶树细胞的应用前景[J]. 茶叶通讯, 2009, 36(2): 44-47.
- [17] Sheikholeslam S N, Weeks D P. Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Mol Biol, 1987, 8(4): 291-298.
- [18] McCullen C A, Binns A N. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006, 22(1): 101-127.
- [19] Cho H, Winans S C. VirA and VirG activate the Ti plasmid *repABC* operon, elevating plasmid copy number in response to wound-released chemical signals [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(41): 14843-14848.
- [20] Usami S, Morikawa S, Takebe I, Machida, Y. Absence in monocotyledonous plants of the diffusible plant factors inducing T-DNA circularization and *vir* gene expression in *Agrobacterium* [J]. Mol Gen Genet, 1987, 209(2): 221-226.
- [21] Vernade D, Herrera-Estrella A, Wang K, et al. Glycine betaine allows enhanced induction of the *Agrobacterium tumefaciens vir* genes by acetosyringone at low pH [J]. J Bacteriol, 1988, 170(12): 5822-5829.