

# 提高八楞海棠遗传转化植株再生率技术的研究\*

刘玉冬, 杨静慧, 刘艳军, 黄俊轩,  
李建科, 杨恩芹, 柳树梧

(天津农学院 园艺系, 天津 300384)

**[摘要]** 为进一步提高八楞海棠遗传转化效率, 以八楞海棠试管苗不同组织部位(叶片、叶柄、节间茎段、破坏生长点的茎尖)为外植体, 在含有0, 1, 3, 5, 10 mg/L 除草剂草丁膦(glyphosate)的分化培养基(MS+ 4 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA)上进行筛选压力的确定, 其中3 mg/L 除草剂为适宜的筛选压力; 在此筛选压力下, 以八楞海棠不同外植体进行遗传转化, 其中破坏生长点的茎尖处理组获得的再生芽效率最高, 通过对部分再生苗进行PCR及Southern杂交检测, 均鉴定为转化苗。

**[关键词]** 八楞海棠; 遗传转化; 外植体; 筛选压力

**[中图分类号]** Q 785

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2005)02-0099-04

苹果是重要的落叶果树, 其童期长, 自交不亲和, 杂合程度高, 易于离体再生, 因此, 采用基因转移技术获得转基因植株已逐渐成为苹果育种的重要手段。James等<sup>[1]</sup>和刘庆忠等<sup>[2]</sup>以苹果叶片为外植体已成功地获得了转基因植株, 但转化效率低, 获得转基因植株率仅有0.1%~0.5%。本研究以八楞海棠试管苗的不同组织部位(叶片、叶柄、节间茎段、破坏生长点的茎尖)为外植体, 通过带抗缺铁黄化*FRO2*基因<sup>[3]</sup>(图1)的农杆菌C58C1转化试验, 寻找最适合转化的除草剂筛选质量浓度及外植体部位, 以期对苹果及其砧木的高效遗传转化研究提供可行的参考方法。

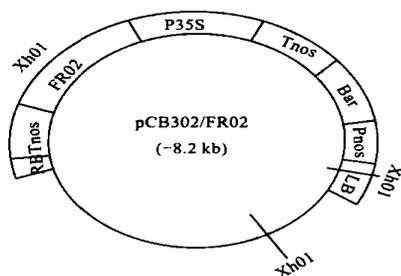


图1 *FRO2* 基因表达载体构建示意图

Fig. 1 Construction of the *FRO2* expression vector

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

八棱海棠(*Malus robusta*)试管苗及转化所用带抗缺铁黄化*FRO2*基因的农杆菌C58C1均由天津农学院园艺系园林植物实验室提供。PCR引物由上海生物工程公司合成。

P1: 5'-ATGGA GATCGAAAAA GCAA TAACGGTGG-3';

P2: 5'-TCA CA GCTGAAACTGA TA GA TTCAAAA TG-3'。

### 1.2 方法

1.2.1 除草剂质量浓度的筛选 取长出5~8片叶子生长健壮八楞海棠试管苗, 分别以叶片、叶柄、节间茎段、破坏生长点的茎尖为外植体, 放在含有0, 1, 3, 5, 10 mg/L 除草剂草丁膦的分化培养基(MS+ 4 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA)上进行再生芽诱导。其中叶片剪掉叶缘及叶柄; 叶柄保留部分茎段组织, 但不带腋芽; 叶间茎段长2 mm; 茎尖长度为2~3 mm, 并将其生长点用解剖针破坏。每种外植体在不同除草剂质量浓度培养基上分别接种200块, 培养条件为28℃, 光照24 h, 光照强度2 000 lx。接种后每7 d观察1次, 主要观察外植体及其伤口部位颜色的变化和愈伤、再生芽的生长情况。经28 d培养后, 统计每种处理的再生率。

\* [收稿日期] 2004-03-08

[基金项目] 国家杰出青年科学基金项目(39825118); 国家自然科学基金项目(39570500)

[作者简介] 刘玉冬(1967-), 男, 天津人, 讲师, 主要从事园艺和生物技术研究。

1.2.2 不同外植体转化处理 取农杆菌C58C1的1个单菌落,接种到LB液体培养基中过夜振荡培养,待其OD值为0.4时取出,浸染八楞海棠不同外植体,处理的外植体数分别为叶片205,节间茎段281,叶柄256,破坏生长点的茎尖74,然后放在带有滤纸的MS固体培养基上,黑暗条件下共培养2 d。2 d后将其移到含有除草剂(3 mg/L)、羧苄青霉素(500 mg/L)和卡那霉素(50 mg/L)的分化培养基上,诱导转化芽。培养条件为28℃,24 h光照,光照强度2 000 lx。接种后每7 d观察1次,主要观察外植体及其伤口部位颜色的变化和愈伤、再生芽的生长情况。经28 d培养后,统计每种处理的再生率。

1.2.3 转化芽的分子水平检测 将除草剂筛选的转化苗转入生根培养基(1/2 MS+0.5 mg/L

BA)。待苗长到3 cm时随机选取4株,各取200 mg叶片,采用柱式DNA提取试剂盒提取转化苗基因组DNA,以FRO2基因的两端序列为引物,进行PCR扩增,扩增产物用0.8%琼脂糖凝胶电泳。同时对这4株进行Southern Blot检测,所用探针为800 bp的35S启动子基因片段,探针标记采用随机引物法<sup>32</sup>P dCTP10~20 μCi放射标记。进一步验证除草剂筛选转化株的可靠性。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同质量浓度除草剂对不同外植体的筛选效果

培养28 d后,每种处理再生率的统计结果见表1。

表1 不同质量浓度除草剂对八楞海棠不同外植体的筛选效果

Table 1 Regeneration frequencies of different explants of *M. alus robusta* on MS medium containing A of different concentration

除草剂/(mg·L <sup>-1</sup> ) Glufosinate	再生率/% Regeneration frequencies			
	叶片 Leafs	节间茎段 Internode segment	叶柄 Petiole	破坏生长点的茎尖 Tip shoot with destroyed growth point
0	11.5	22.6	34.1	100.0
1	10.9	23.0	28.1	100.0
3	0	0	0	0
5	0	0	0	0
10	0	0	0	0

从表1可以看出,在无除草剂时,不同外植体的再生率有差异,其中破坏生长点的茎尖再生率最高,叶片最低。从培养过程来看,在诱导再生初期外植体的伤口部位都先长出愈伤组织,但从愈伤的颜色上看,叶片、节间茎段多为白色,而叶柄、破坏生长点的茎尖为绿色,随培养时间的增加,再生芽很快从愈伤组织上分化出来。

当除草剂质量浓度为1 mg/L时,基本不影响外植体的转化率;而质量浓度达到3 mg/L时,所有外植体都无再生芽。从培养过程来看,在诱导再生的初期(大约7 d)1~5 mg/L除草剂处理的外植体伤口

部位都无变化,10 mg/L处理的外植体开始变黄。14~21 d后,3,5 mg/L处理开始变黄,伤口部位也出现萎缩,而1 mg/L处理的外植体一直较绿,除伤口部位有再生芽分化外,外植体的大小和颜色基本无变化。到28 d后,3~10 mg/L处理的外植体颜色开始从黄变黑,最后枯萎、死亡。

### 2.2 不同外植体对基因转化率的影响

从表2可以看出,以八楞海棠试管苗不同部位为外植体时,FRO2基因转化率存在明显差异。以破坏生长点的茎尖为外植体的转化率最高,而叶片最低。

表2 不同外植体对基因转化率的影响

Table 2 Efficiency of *M. alus robusta* transformation of FRO2 gene from different explants

不同接种部位 Different explants	接种外植体数 Number of inoculations	再生芽数 Number of regeneration shoots	转化率/% Regeneration frequencies
叶片 Leafs	205	1	0.48
节间茎段 Internode segment	281	4	1.42
叶柄 Petiole	256	11	4.29
破坏生长点的茎尖 Tip shoot with destroyed growth point	74	8	10.8

从诱导过程看,在接种初期(7 d),所有外植体都无较大差异。14~21 d后外植体之间开始出现明显的不同:叶片处理组,大部分接种的叶片组织开

始变黄,少数叶片的伤口部位有白色愈伤组织长出;叶柄处理组,变黄的数量较叶片处理组略少,但愈伤多出现在叶柄与茎连接一端,且多为绿色或淡绿色,

而另一端很少见到; 节间茎段处理组, 多数是两端先失绿, 后全部变黄, 而少数保持绿色的也在其两端长出白色愈伤组织; 破坏生长点的茎尖处理组, 变黄的外植体最少, 愈伤也都为绿色, 并有个别转化芽分化出来。28 d 后, 大部分没有再生芽或愈伤的外植体都基本变黄、变黑至死亡。

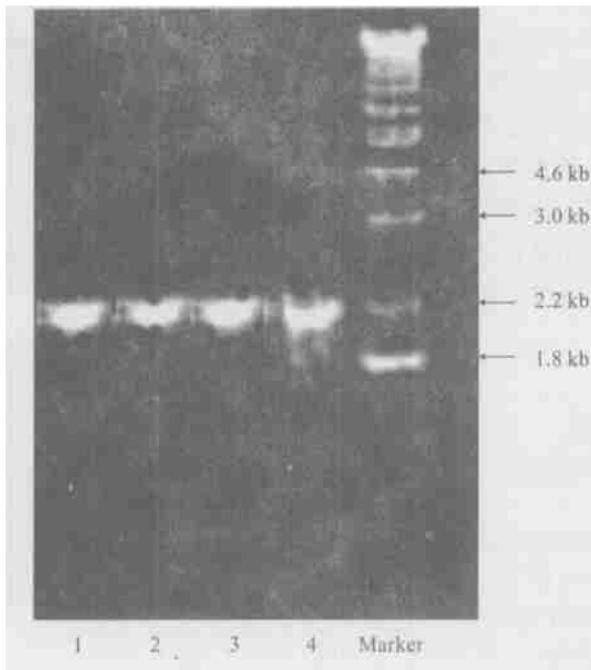


图2 转化苗的PCR 检测

1~ 4 转化的再生苗

Fig 2 Electrophoresis of PCR product of *FRO2* gene of some transformation shoots

1- 4 Transformation shoots

### 2.3 利用PCR 及Southern B lot 技术检测转化苗

从图2 可以看出, 4 株转化苗在2 178 bp 处均有1 条特异扩增的电泳带, 表明外源基因已经整合到八楞海棠基因组中。由图3 可以看出, 35S 启动子基因片段DNA 和转化植株DNA 均有杂交信号, 而未转化植株的DNA 无杂交信号。

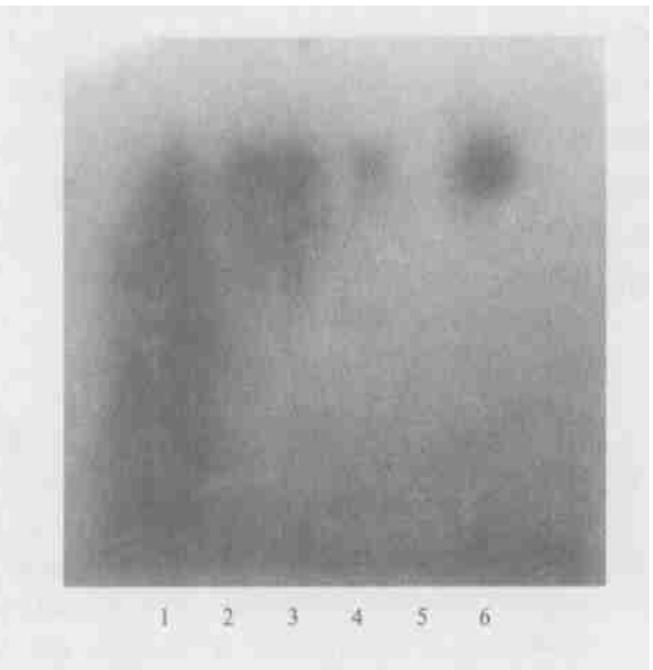


图3 转化苗的Southern B lot 检测

1. 35S 启动子基因片段;

2, 3, 4, 6 转化的再生苗; 5 未转化植株

Fig 3 The result of Southern B lot

1. 35S promoter fragment; 2, 3, 4, 6 DNA of transformation plants; 5 DNA of wild plants

## 3 讨论

### 3.1 除草剂筛选质量浓度的确定

抗缺铁黄化*FRO2* 基因的农杆菌C58C1 转化筛选标记为*Bar* 基因, 即用除草剂作为转化芽的筛选标记, 因此, 准确确定除草剂的筛选质量浓度是提高转化率的关键。而除草剂对每种植物的筛选质量浓度存在差异<sup>[4]</sup>, 因此在进行遗传转化前, 首先要对所要转化的植物进行除草剂筛选质量浓度的确定, 以便找到准确合理的除草剂筛选质量浓度。另外, 据报道<sup>[5]</sup>, 筛选标记*Bar* 基因在选用除草剂时, 所用的除草剂种类不同, 对*Bar* 基因的筛选效果也不一样。因此在筛选除草剂质量浓度时, 一定要根据所用的除草剂类型进行筛选。若改变除草剂类型, 还应对新用除草剂质量浓度进行重新确定。

本研究结果表明, 当除草剂为1 mg/L 时, 基本不影响外植体的再生, 而达到3 mg/L 时, 没有外植体再生。如果将3 mg/L 的除草剂质量浓度为筛选质量浓度, 则转化再生出来的芽为转化芽, 但如果除草剂的筛选质量浓度高于合理的除草剂筛选质量浓度, 则会对转化芽的生长起抑制作用<sup>[6]</sup>, 为此本研究曾补做了2 mg/L 除草剂, 因在筛选结果中有个别外植体有再生芽产生, 因此最后确定3 mg/L 除草剂作为筛选质量浓度, 进行转化研究。

除草剂对转化芽筛选时, 筛选时间很关键。若筛选时间过短, 除草剂的筛选效果还未充分表现出来, 此时对筛选质量浓度的确定是不准确的。筛选时间过长, 外植体会缺乏再生所需营养, 同时, 农杆菌也会快速生长。在本研究中确定除草剂所用时间为28 d, 此时除草剂的筛选效果正好充分表现出来, 后又对处理观察到35 d, 结果无变化。在实际转化研究

中,应尽量采用恰当的筛选时间。

### 3.2 不同外植体对转化效率的影响

从转化率来看,八楞海棠不同部位外植体转化率的大小顺序依次为:叶片、节间茎段、叶柄、破坏生长点的茎尖。这些部位中,转化率高的,其再生率也高,这说明高再生率是高转化率的前提。

从再生情况来看,多数外植体都有愈伤产生,但只有少数愈伤组织能再生出芽。从愈伤的颜色看,能再生芽的多为绿色的愈伤组织。在不同外植体中,分生组织的多少是再生的关键。叶片中分生细胞较少,因此再生率最低,而茎尖组织中分生组织最多,再生率也最高<sup>[7]</sup>。绿色愈伤组织容易再生,这可能与其细胞质的浓度有关,细胞质浓度大,营养充沛,利于细胞的分化生长。

在以分生组织较多的部位为外植体时,一般不用茎尖等有生长点组织,这主要是由于在用这类组织时,由于原生长点细胞分裂旺盛,筛选压力对生长的抑制作用较弱,从而得到假转化苗,或为嵌合体。但在本研究中已对茎尖生长点进行了破坏,同时在进行转化时,一直保持较高的筛选压力,在3 mg/L除草剂下不但对破坏生长点的茎尖起到严格的抑制,而且对没有破坏生长点的茎尖也得到了很好的控制,随着在培养基上时间的延长,没有破坏生长点的茎尖也都从黄到黑,最后枯萎、死亡,因此用茎尖生长点为转化外植体是可行的。PCR及Southern Blot检测结果证明,在3 mg/L除草剂筛选压力下,采用破坏生长点的茎尖为外植体,八楞海棠转化效率可以得到较大的提高。

### [参考文献]

- [1] James D J, Dandekar A M. Regeneration and transformation of apple [A]. Lindsey K. Plant Tissue Culture Manual [C]. Vol B8 Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. 1- 18
- [2] 刘庆忠, 赵红军, Freddi Hammerschlag. 提高苹果转化效率的研究[J]. 果树科学, 2000, 17(3): 159- 163
- [3] Robinson N J, Procter C M, Connolly E L, et al A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils[J]. Nature, 1999, 397: 694- 697.
- [4] 盖树鹏, 孟祥栋. 转基因植物的筛选与检测[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2000, 31(1): 95- 100
- [5] 段发平, 梁承邨, 黎垣庆. Bar基因和转Bar基因作物的研究进展[J]. 广西植物, 2001, 21(2): 166- 172
- [6] 师校欣, 王 斌, 杜国强. 根癌农杆菌介导丑豆胰蛋白酶抑制剂基因转入苹果主栽品种[J]. 园艺学报, 2000, 27(4): 282- 284
- [7] 孙爱君, 章 镇, 张新生. 苹果遗传转化的研究进展[J]. 遗传, 2001, 23(6): 583- 587.
- [8] 孙爱君, 章 镇, 姚泉洪. 苹果与八楞海棠的试管苗外植体植株再生[J]. 上海农业学报, 2000, 16(2): 23- 30

## Study on enhancing efficiency of *Malus robusta* transformation

L IU Yu-dong, YANG Jing-hui, L IU Yan-jun, HUANG Jun-xuan,

L I Jian-ke, YANG En-qin, L IU Shu-wu

(Department of Horticulture, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** In order to enhance efficiency of *Malus robusta* gene transformation, different parts of *Malus robusta* plantlets were used as explants to determine screening stress on the development media (MS+ 4 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA) containing 0, 1, 3, 5, 10 mg/L glufosinate, of which 3 mg/L was the acceptable screening stress. The gene transformation was made by using *M. robusta* explants under screening stress. Regeneration rates of those shoots with destroyed growth points were the highest. Some generation plants were confirmed to be transformation plants by PCR and Southern crossing analysis.

**Key words:** *Malus robusta*; transformation; explant; screening stress