

# 抗真菌病害基因转化苹果的研究

徐凌飞,王贵章,梁东,张军科,马锋旺

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 利用抗真菌病害基因转化苹果主栽品种“嘎拉”,以期提高其对真菌病害的抗性。通过对影响农杆菌介导苹果遗传转化因素的研究,建立了农杆菌介导的嘎拉叶片遗传转化体系。利用叶盘法转化受体材料,将-1,3-葡聚糖酶基因及几丁质酶基因导入苹果中。对获得的“嘎拉”转化植株进行 PCR 检测,结果初步表明,外源基因已经整合到“嘎拉”苹果基因组中。

[关键词] 苹果;抗真菌病害基因;农杆菌介导;遗传转化

[中图分类号] S661.1;Q785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)09-0127-05

## Study on transformation of apple with antifungal gene

XU Ling-fei, WANG Gui-zhang, LIANG Dong, ZHANG Jun-ke, MA Feng-wang

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** The objective of the present research was to introduce genes with antifungal potential into the commercially important apple cvs. Gala in order to improve its resistance against fungal diseases. By studying factors affecting *A. grobacterium* mediated genetic transformation, the *A. grobacterium* mediated genetic transformation system of Gala was established. And the -1,3-glucanase and chitinase genes were introduced into Gala by means of leaf discs and finally the objective seedlings of Gala was obtained. The transformation plants were tested by PCR detection and the result showed that the exogenous genes had been introduced into the regeneration plants genome.

**Key words:** apple (*Malus domestica* Borkh.); antifungal gene; *A. grobacterium* mediated; genetic transformation

苹果是落叶果树中的主要栽培树种之一。我国是苹果生产大国,多年来栽培面积和产量均居世界第一。据 FAO 统计,2005 年中国苹果栽培面积为 193.455 万  $\text{hm}^2$ ,总产量为 2401.75 万 t,因此苹果产业化发展在我国具有重要经济意义<sup>[1]</sup>。病害是限制苹果生产的重要因素,每年给世界各地的苹果生产带来严重损失。苹果的真菌病害主要有斑点落叶病、褐斑病、轮纹病等,采用传统的化学防治方法不但增加了资金投入、造成农药残留,而且引起了生态

破坏和环境污染。通过选育抗病品种来提高苹果的免疫能力,解决苹果因病害感染而引起的减产问题具有重要意义<sup>[2]</sup>。

苹果是多年生木本果树,由于童期长、自交不亲和、杂合程度高等原因,通过常规杂交育种的方法改良品种相当困难,且效率低下,而采用基因工程方法则可克服上述缺点,缩短育种周期,并且利用该方法已经在许多作物,包括木本果树上获得了抗病性的转基因植株,有的已经进入大田试验阶段<sup>[3]</sup>。

[收稿日期] 2006-07-25

[基金项目] 陕西省重大科技专项(2006kz05-G4);西北农林科技大学“拔尖人才支持计划”项目

[作者简介] 徐凌飞(1969-),男,陕西乾县人,博士,副教授,主要从事果树生物技术与育种研究。

[通讯作者] 马锋旺(1964-),男,山东汶上人,博士,教授,博士生导师,主要从事果树抗性生理与生物技术改良研究。

E-mail: fwm64@sina.com

本试验以“嘎拉”为试材,通过农杆菌介导法,将几丁质酶和 -1,3-葡聚糖酶双价基因导入苹果中,以期提高苹果自身对真菌病害的抗性,实现在短期内对品种抗病性改良的目的,为苹果的抗性育种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验于 2005-04 ~ 2006-05 在陕西杨凌西北农林科技大学园艺学院园艺植物育种与生物技术实验室完成。试验材料为“嘎拉”(Gala) 无菌试管苗;试验用根癌农杆菌菌株 EHA105,其中含有携带 -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶基因及选择标记基因新霉素磷酸转移酶(*Npt*)的 pBinCG 质粒。

### 1.2 试剂与培养基

头孢霉素(Cefotaxime, Cef) 购自润德生物公司,卡那霉素(Kanamycin, Km) 和链霉素(Streptomycin, Str) 购自上海生工公司。其他试剂均为分析纯。

农杆菌活化培养基 LB: NaCl 10 g/L + 酵母提取物(Yeast extract) 5 g/L + 蛋白胨 10 g/L + 琼脂(Agar) 15 g/L + Km 100 mg/L + Str 50 mg/L, pH 7.2。

芽增殖培养基 MS1: MS + 6-苄基氨基嘌呤(6-benzylaminopurine, BA) 1.0 mg/L + 萘乙酸(Naphthalacetic acid, NAA) 0.1 mg/L + Agar 7 g/L, pH 5.8。

叶片再生培养基 MS2: MS + BA 5.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L + Agar 7 g/L, pH 5.8。

脱菌培养基 MS3: MS2 + Cef 300 mg/L, pH 5.8。

筛选培养基 MS4: MS3 + Km 10 mg/L, pH 5.8。

筛选培养基 MS5: MS1 + Km 10 mg/L + Cef 300 mg/L, pH 5.8。

叶片再生液体培养基 MS6: MS + BA 5.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L, pH 5.4 ~ 5.8。

生根培养基 MS7: 1/2 MS + 吲哚丁酸(Indolebutyric acid, IBA) 1.0 mg/L + Km 10 mg/L, pH 5.8。

### 1.3 培养条件

培养温度为(25 ± 2) °C, 光周期为 13 h, 光源为日光灯, 光照强度为 2 000 lx。

### 1.4 农杆菌介导的苹果遗传转化

1.4.1 农杆菌的培养 平板上挑取农杆菌单菌落,

接种于 10 mL LB 液体培养基中,在恒温摇床上,于 28 °C、180 r/min 震荡培养过夜,直至对数生长期(OD<sub>600</sub> = 0.5 左右);将 OD<sub>600</sub> 为 0.5 左右的菌液转入无菌离心管中,于室温下 4 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,菌体用叶片再生液体培养基 MS6 稀释重悬,在 28 °C、180 r/min 条件下震荡培养 2 h 左右,OD<sub>600</sub> 达到 0.3 ~ 0.4 时用于转化。

1.4.2 叶片转化 采用叶盘法进行叶片转化。以生长 30 d 左右、生长健壮的“嘎拉”无菌试管苗顶部 3 ~ 5 片展开的幼嫩叶片为受体材料,手术刀灭菌后垂直于叶片中脉划割数刀,同时保持其完整,放入 1.4.1 制备的菌液中,侵染 8 min,其间不断摇动,使农杆菌与外植体充分吸附。用滤纸迅速吸干叶片表面菌液,接种于叶片再生培养基 MS2 上,以近轴面接触培养基。暗培养 3 d,至肉眼可见微小菌落出现时,立即将叶片转入脱菌培养基 MS3 中,进行脱菌培养 4 d 左右,转入筛选培养基 MS4 中。暗培养共计 3 周后,更换 1 次新鲜培养基 MS4 并转至光下培养。出芽后将不定芽切下,转入筛选培养基 MS5 中。经过 3 ~ 4 次的筛选培养后,转入芽增殖培养基 MS1 中进行扩繁,待抗性植株生长至 2 cm 左右时,剪取生长健壮的不定梢,接种至生根培养基 MS7 中,进行生根筛选培养。

叶片再生频率/% = 再生芽的叶片数/接种的叶片数 × 100 %。

### 1.5 苹果转化植株的 PCR 检测

抗性芽经过一段时间的增殖扩繁培养后建立起无性系,以无菌试管苗的叶片为材料,采用 CTAB 微量提取法,分别提取转化植株和非转化植株的基因组 DNA<sup>[4]</sup>。农杆菌 Ti 质粒 DNA 提取参考王关林等<sup>[4]</sup>的方法。转化植株检测用 PCR 法,分别用 -1,3-葡聚糖酶基因和几丁质酶基因 2 种基因的特异性检测引物进行 PCR 扩增。

检测 -1,3-葡聚糖酶基因的引物序列为:p1: 5'-ATGGCTGCTATCACACTCC-3'; p2: 5'-CTCACATCTCACTTACGAGAG-3'。检测几丁质酶基因的引物序列为:j1: 5'-GTGGA TGCTGTTGTTGTTG-3'; j2: 5'-TGGTGGGAAAAGTGTTATTGG-3'。引物由上海生工合成。

PCR 反应体系(25 μL)为:10 × buffer 2.5 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 2.5 μL, dNTPs (2 mmol/L) 2.5 μL, 引物 1 (10 μmol/L) 2.5 μL, 引物 2 (10 μmol/L) 2.5 μL, 模板 DNA 1 μL (100 ~ 200 ng), Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.3 μL, ddH<sub>2</sub>O 11.5

μL。PCR 反应程序:94 预变性 3 min;94 变性 1 min,53 退火 1 min,72 延伸 1 min,循环 30 次;72 延伸 10 min;4 保存。

以农杆菌质粒 pBinCG 为阳性对照,以非转化植株的 DNA 为阴性对照,用 8 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

## 2 结果与分析

### 2.1 侵染时间对苹果转化的影响

农杆菌的侵染时间是决定转化过程能否顺利进行的重要影响因素。本试验研究了不同侵染时间对苹果遗传转化的影响,以确定适宜的侵染时间。侵染菌液浓度为 OD<sub>600</sub> = 0.43,在预试验基础上,分别将侵染时间设 4,6,8,10 和 12 min 5 个梯度。结果(表 1)发现,侵染时间短,不利于农杆菌在伤口中的附着,对转化不利;侵染时间长,叶片伤口附着的菌体容易对伤口造成伤害,出现叶片褐化甚至死亡,且在共培养和其后的筛选培养中,也易发生农杆菌的污染。

由表 1 可见,叶片在菌液中侵染 6~8 min 时,有不定芽形成,侵染 8 min 时“嘎拉”叶片的再生频率最高,为 6%,因此确定 8 min 为适宜的侵染时间。

表 1 侵染时间对苹果转化的影响

Table 1 Effect of agrobacterium infection period on transformation of apple

侵染时间/ min Infection period	接种叶片数 No. of leaf	再生频率/ % Regeneration frequency
4	100	0
6	100	3
8	100	6
10	100	0
12	100	0

### 2.2 苹果抗性芽的获得与选择培养

本试验采用延迟筛选法,苹果叶片与农杆菌经过 3 d 的暗培养后,转接在含抑菌素 300 mg/L Cef 的脱菌培养基 MS2 上培养 4 d,而后转入含 10 mg/L Km 的筛选培养基 MS4 中筛选。经过共计 3 周左右的暗培养,更换 1 次新鲜培养基 MS4,转至光下培养。随着培养时间的延长,有的叶片产生愈伤组织并进而分化出不定芽(图 1)。

将不定芽连同叶片一起转到筛选培养基 MS5 上,经过连续 30 d 左右的选择培养后,部分不定芽发生白化并死亡(图 2),只有部分抗性芽继续生长分化(图 3)。将获得的独立抗性芽转到芽增殖培养基 MS1 上扩繁。

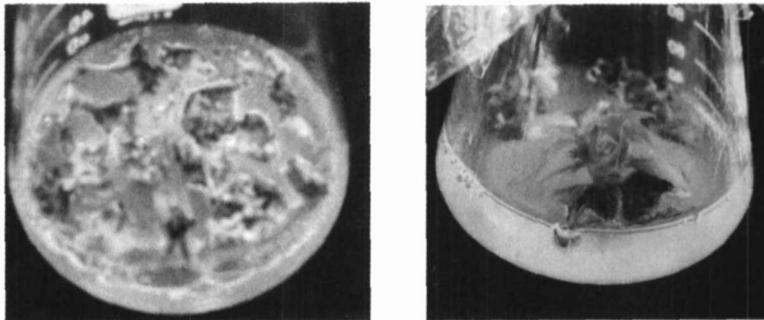


图 1 初步获得的“嘎拉”苹果抗性芽

Fig. 1 Resistant Gala shoots obtained on medium containing Km initially

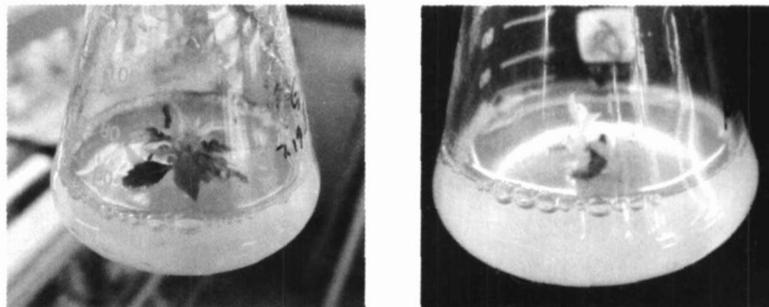


图 2 在筛选培养基上白化的“嘎拉”苹果逃逸芽

Fig. 2 Escape shoots etiolated on selection medium containing Km

### 2.3 苹果转化植株的生根检测

剪取生长健壮的抗性芽增殖的不定梢 2 cm 左

右,接种到附加 Km 10 mg/L 和 Cef 300 mg/L 的生根培养基 MS7 上,35 d 后统计生根情况,发现 60%

以上的不定芽生根(图 4)。

#### 2.4 苹果转化植株的 PCR 检测

对获得的 29 个株系进行 PCR 检测可知,有 2 个株系的 DNA 经 PCR 扩增后得到与阳性对照相

同的特异条带,其中  $\alpha$ -1,3-葡聚糖酶 cDNA 片段大小约 1.1 kb,几丁质酶 cDNA 片段大小约 1.1 kb,初步说明外源 DNA 已经整合到“嘎拉”苹果基因组中(图 5 和图 6)。



图 3 获得的“嘎拉”苹果抗性芽  
Fig. 3 Resistant Gala shoots obtained on selection medium containing Km

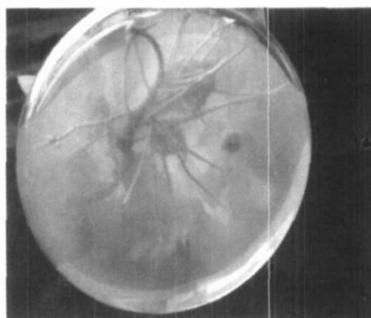


图 4 生根的“嘎拉”苹果抗性芽  
Fig. 4 Resistant shoots rooted on selection medium containing Km

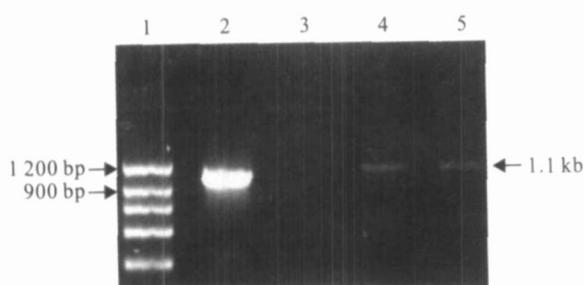


图 5 导入几丁质酶基因转基因苹果的 PCR 检测结果

1. DNA 分子量 Marker; 2. 阳性对照;  
3. 非转化植株; 4~5. 转化植株

Fig. 5 PCR test of apple transformed plants with Chitinase primers

1. DNA Marker; 2. Positive control; 3. Untransformed plant;  
4 - 5. Transformed plants

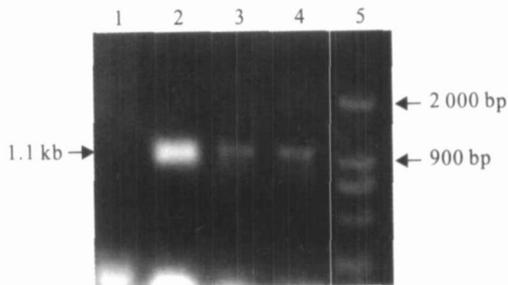


图 6 导入  $\alpha$ -1,3-葡聚糖酶基因转基因苹果的 PCR 检测结果

1. 非转化植株; 2. 阳性对照; 3~4. 转化植株;  
5. DNA 分子量 Marker.

Fig. 6 PCR test of apple transformed plants with  $\alpha$ -1,3-Glucanase primers

1. Untransformed plant; 2. Positive control;  
3 - 4. Transformed plant; 5. DNA Marker

### 3 讨 论

苹果的遗传转化研究已经进行了多年,目前在富士等<sup>[5]</sup>许多苹果品种上得到了转化植株,转化时多选用叶片作受体材料,由于再生频率的影响转化率还很低<sup>[6]</sup>。因此,建立高效稳定的再生和转化体系是非常必要的。在本试验中发现,转化成功的关键是要处理好以下几个问题:

(1) 共培养是农杆菌介导转化过程中的一个重要环节,农杆菌附着、T-DNA 的转移及整合均在这一时期完成,因此优化共培养条件十分重要。本试验发现,农杆菌与受体材料共培养时间的长短影响转化效率,时间过长,农杆菌过度增殖,引起外植体

褐化,给抑菌带来困难;共培养时间过短,会造成 T-DNA 转移过程不能完成,因为农杆菌还未在受体细胞创伤部位诱发肿瘤,从而影响农杆菌的转化效率。由本试验结果可知,共培养 3 d 有利于苹果的转化,也有利于控制此后培养中农杆菌的过度增殖。

(2) 叶片与农杆菌共培养后,必须采取有效的抑菌措施。本试验发现,Cef 浓度低于 200 mg/L 时不能抑制农杆菌的生长;而 Cef 浓度为 500 mg/L 时,虽然可以有效抑制农杆菌的生长,但同时影响了转化细胞的分化。综合农杆菌侵染后的抑菌效果,本试验选用 300 mg/L 作为 Cef 适宜浓度。

(3) 选择适宜的抗生素浓度是基因转化中的关键。不同植物对抗生素的敏感性有很大差异。

Radchuk 等<sup>[7]</sup>以 100 mg/L Km 作为苹果品种 Florina 的选择压,获得了 *rolB* 基因的转化植株。师校欣等<sup>[8]</sup>以 5~10 mg/L Km 作为乔纳金、王林等苹果品种的选择压,获得了豇豆胰蛋白酶抑制剂基因的转化植株。本试验发现,“嘎啦”叶片对 Km 非常敏感,10 mg/L Km 即可抑制非转化不定芽的分化,尽管 5 mg/L Km 也可以明显抑制非转化不定芽的分化,但为了减少假阳性植株的发生频率,本试验采用在含 10 mg/L Km 的筛选培养基上进行 3~4 次的筛选,可以有效地筛选掉逃逸芽。

(4) 延迟筛选法可以使经过农杆菌侵染的外植体有一个缓冲,即其生理状态得到一个恢复过程,有利于转化细胞的分化。刘静等<sup>[9]</sup>研究认为,在共培养后延迟 3 d 进行选择,可以提高苹果砧木 M26 的转化效率。笔者认为共培养后进行 4 d 的延迟筛选对“嘎啦”叶片转化具有重要意义,虽然非转化细胞也同时得到了恢复,但其后在筛选培养基上连续筛选,再转到含有 10 Km mg/L 的生根培养基上诱导生根,可有效地淘汰非转化植株,转化植株的生根率达到了 60% 以上。

在遗传转化中难免会出现假阳性芽,这就需要从分子生物学水平上进行 Southern 和 Northern 杂交的进一步检测,以确定外源基因确实整合到受体

植物的基因组中。本试验的杂交检测和抗病性鉴定等工作正在进行。

#### [参考文献]

- [1] 联合国粮食及农业组织统计数据库 [DB/OL]. <http://www.fao.org>.
- [2] 董汉松. 植物诱导抗病性原理和研究 [M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [3] 杨莉, 徐昌杰, 陈昆松. 果树转基因研究进展与产业化展望 [J]. 果树学报, 2003, 20(5): 331-337.
- [4] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [5] Eun S S, Kwan J S, Sung J, et al. Silver nitrate and aminethoxyvinylglycine affect Agrobacterium mediated apple transformation [J]. Plant Growth Regulation, 2005, 45: 75-82.
- [6] 刘庆忠, Salih S, Hammerschlag F A. 茎段外植体白化处理促进“皇家嘎啦”苹果不定芽再生 [J]. 落叶果树, 2001(1): 4-7.
- [7] Radchuk V V, Korkhovoy V I. The *rolB* gene promotes rooting *in vitro* and increases fresh root weight *in vivo* of transformed apple cultivar ‘Florina’ [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005, 81: 203-212.
- [8] 师校欣, 王斌, 杜国强, 等. 根癌农杆菌介导豇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.
- [9] 刘静, 邵建柱, 徐继忠, 等. 农杆菌介导将 *LFY* 基因导入苹果的研究 [J]. 河北农业大学学报, 2006, 29(3): 6-9.

(上接第 126 页)

- [10] Kenji O, Masami S, Jun L, et al. Toxicity of theophylline depends on plasma concentration by single and also repeated dosint in rats [J]. Pharmacological research, 2001, 44(2): 81-87.
- [11] Crozier R H, Crozier Y G, Mackinlav A G. The *CO* and *CO* region of honeybee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial DNA evolutionary rates [J]. Molecular Biology Evolution, 1989, 6: 399-411.
- [12] Peak J G, Pilas B, Dudek E J, et al. DNA breaks caused by mono chromatic 365nm ultraviolet-A radiation and their re-pair in human epithelioid and xeroderma pigmentosum cell [J]. Photo Chem Photobiol, 1991, 54(2): 197-203.
- [13] Heo M Y, Kim S H, Yang H E, et al. Protection against ultraviolet B and C-induced DNA damage and skin carcinogenesis by the flowers of *Prunus persicae* extract [J]. Mutation Research, 2001, 496: 47-59.
- [14] 余多慰, 柯惟中. 水溶液中 DNA 紫外辐射损伤的分子机制研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2000, 20(3): 311-314.
- [15] 都二霞, 郭剑文, 赵惠燕. 紫外线诱导桃蚜 DNA 变异的研究 [J]. 应用生态学报, 2006, 17(7): 1245-1249.