

文章编号: 1000-5692(2007)04-0433-04

发根农杆菌介导的杨梅遗传转化研究初报

何新华^{1,2}, 陈力耕², 郭长禄^{2,3}

(1. 广西大学 园艺系, 广西 南宁 530004; 2. 浙江大学 园艺系, 浙江 杭州 310029; 3. 哈尔滨工业大学 海洋学院, 山东 威海 264209)

摘要: 为了建立发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 介导的杨梅 *Myrica rubra* 遗传转化体系, 利用携带拟南芥 *Arabidopsis thaliana* *LEAFY* cDNA 片段的发根农杆菌 R15834 感染东魁杨梅 *M. rubra* ‘Dongkui’ 和荸荠杨梅 *M. rubra* ‘Boji’ 的子叶、叶片和茎段。结果表明, 只从东魁杨梅子叶上诱导出毛状根, 而且产生毛状根东魁杨梅子叶数在 10% 以下。杨梅子叶产生毛状根受多种因素影响, 新种子比旧种子容易产生毛状根, 在 1/2 MS (Murashige and Skoog) 培养基培养较在 MS 培养基上培养好。东魁杨梅子叶上的毛状根经聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测和 Southern 杂交检测, 证实已将拟南芥的 *LEAFY* cDNA 片段成功导入并整合到东魁杨梅子叶中。图 2 参 10

关键词: 经济林学; 杨梅; 遗传转化; 发根农杆菌

中图分类号: S667.6 **文献标志码:** A

杨梅 *Myrica rubra* 是我国特有的水果, 树体能共生固氮, 耐旱耐瘠, 省工省肥, 是一种非常适合山地退耕还林和保持生态的理想树种^[1], 而且是山区农民脱贫致富的优良经济林果, 已被国家林业局列为退耕还林生态公益林备选树种之一, 近几年发展较快。发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 是根癌菌属 *Agrobacterium* 的一种土壤细菌, 能侵染几乎所有的双子叶植物和少数单子叶植物。利用发根农杆菌转基因在林果上研究不多。Bell 等^[2] 将 *rolC* 基因导入西洋梨 *Pyrus communis* ‘Sativa’, 改良了梨树砧木高生长的特性; Welander 等^[3] 和 Zhu 等^[4] 利用 *rolB* 基因转化苹果 *Malus pumila* 砧木获得成功, 转基因植株对生长素的敏感性显著提高, 生根能力改善。国内李名扬等^[5] 以发根农杆菌转化甜橙 *Citrus sinensis* 子叶获得了完整的植株; 林顺权^[6] 和曾黎辉等^[7] 分别进行过发根农杆菌转化紫果西番莲 *Passiflora eduli* 和龙眼 *Dimocarpus longan* 的研究, 但国内尚未见杨梅转基因的研究报道。*LEAFY* 基因是控制开花的基因, 能促进植物提早开花^[8]。笔者的研究利用发根农杆菌将 *LEAFY* 基因转化杨梅, 对杨梅的遗传转化进行了探索性的工作, 目的是通过发根农杆菌建立杨梅转基因体系, 最终建立一个杨梅-菌共生基因表达体系, 为杨梅遗传转化及杨梅与 *Frankia* 菌共生固氮机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

东魁杨梅 *Myrica rubra* ‘Dongkui’ 和荸荠杨梅 *M. rubra* ‘Boji’ 的种子、叶片和茎段。

收稿日期: 2006-11-03; 修回日期: 2007-04-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30560007); 浙江省自然科学基金资助项目(302362)

作者简介: 何新华, 教授, 博士, 从事果树生物技术和生物固氮等研究。E-mail: honest66222@163.com

1.2 供试菌株和质粒

供试菌株为发根农杆菌野生型毒性菌株 R15834, 抗链霉素和利福平。

表达载体 pDC202 (陈大明教授惠赠)携带拟南芥 *Arabidopsis thaliana* *LEAFY* cDNA 片段、CaMV 35S 启动子和 *nos* 终止子, 抗卡那霉素。

1.3 pDC202 转化农杆菌

参照 Sambrook 等^[9] 分子克隆第 2 版的方法制备农杆菌感受态细胞, 取 1 管农杆菌感受态细胞, 加入 0.1~1.0 μg pDC202 质粒, 用液氮冻融转化。已转化的农杆菌用碱裂法少量制备农杆菌中的质粒酶切, 并用聚合酶链反应 (PCR) 验证。将已转化成功的、携带 pDC202 质粒的 R15834 菌株命名为 R15834D。

1.4 杨梅的转化

1.4.1 发根农杆菌的培养 挑取 R15834D 菌株新鲜单菌落于含 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 利福平, 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素和 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素的酵母附加体质粒 YEP (yeast episomal plasmid) 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 剧烈振荡培养 (在摇床中进行, 180~200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 至对数生长期。取菌液于 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 收集沉淀, 用 MS (Murashige and Skoog) 或 1/2 MS 液体培养基等体积悬浮后, 用于接种。

1.4.2 杨梅外植体的预培养 转化前, 将去壳的东魁杨梅和荸荠杨梅种子去种皮, 用体积分数为 75% 的乙醇处理 2 min, 1.0 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ HgCl_2 消毒 10 min, 无菌水洗涤 3 次, 将种子分成 2 瓣, 在子叶的两面各轻轻地划 2~3 个伤口或针刺。在叶片和茎段上用同样的方法制造伤口, 置于 MS 或 1/2MS 固体培养基上, (26 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 条件下暗培养 2 d。

1.4.3 共培养法诱导毛状根 以无菌液体培养基为对照, 将经预培养的材料, 放入制备好的菌液 (加或不加乙酰丁香酮) 中处理 15 min, 取出用无菌滤纸吸干, 放入预培养时的培养基中共培养 3 d, 然后转入相同培养基附加 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 头孢霉素诱导毛状根。每 2 周继代 1 次, 继代过程中逐渐降低头孢霉素的质量浓度, 直至不含头孢霉素。(26 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 条件下暗培养。

1.5 转化材料的检测

1.5.1 PCR 检测 ①杨梅根微量 DNA 提取。切下经头孢霉素处理脱菌后的毛状根 1~2 根或正常的杨梅根, 放入 1.5 mL 离心管中, 加 300 μL 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的磷酸三甲苯酯 (TCP) 抽提缓冲液 [100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.0), 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA (pH 8.0), 20 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ CTAB, 10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ PVP] 匀浆; 匀浆液在 65 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min, 加入等体积的氯仿:异戊醇 (24:1) 充分混匀, 8 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 加等体积的酚氯仿抽提, 8 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 收集水相加 1/10 体积的 3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠和 2 倍体积的乙醇, 冰上放置 10 min, 8 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集沉淀, 加少量体积分数为 70% 乙醇洗涤, 8 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 沉淀溶于 RNase 的 TE 缓冲液 (pH 7.5), 存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。② PCR 检测。根据 *LEAFY* cDNA 编码区两端序列设计引物, 5' 端引物为 5'-TTCCATGGATCCTGGAAGGTTTCAC-3', 3' 端引物为 5'-CCAAACTAGAAACGCAAGT-3'。PCR 反应体系为: 10 \times PCR Buffer for *Taq* Plus 5 μL , DNA 模板 1 μL , 引物各为 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, dNTP 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, *Taq* Plus DNA 聚合酶 (上海生工) 41.67 nkat, 加水至 50 μL , 反应在 HyBaid 的 PCR Express 扩增仪上进行。热循环条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物于 10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5.2 Southern 检测 参照王关林和方宏筠主编《植物基因工程原理与技术》的方法^[10], 将供试材料的 PCR 产物在 8 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 琼脂糖凝胶上电泳分离, 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠变性 35 min 后, 用毛细管法将 DNA 转移到尼龙膜上。采用随机引物法标记探针, 同位素为 [α -³²P] dCTP。杂交在 Church & Gilbert 杂交液中进行, 65 $^{\circ}\text{C}$ 24 h。在 2 \times SSC 和 1 \times SSC 溶液中室温下洗膜, 然后放射自显影。

2 结果与分析

2.1 不同杨梅品种对 R15834D 的敏感性

从多次试验来看, 荸荠杨梅种子、子叶、叶片和茎段对农杆菌 R15834D 菌株敏感性较差, 无论

是新鲜种子还是在 4 °C 冰箱或常温下保存的种子, 刀划伤痕或针刺, 加乙酰丁香酮和采用真空渗透都未获得毛状根。

R15834D 菌株能侵染东魁杨梅种子和子叶。一般在接种后 10 d 左右开始长出毛状根, 20 d 后产生毛状根的子叶数不会再增加, 但已诱导出毛状根的子叶还会诱导出毛状根。毛状根一般从有微伤口的愈合组织上长出, 开始是白色突起, 不断生长形成毛状根, 有的表面光滑, 有的布满毛茸茸的根毛, 随着培养时间的增加, 毛状根的颜色逐渐变成肉色, 与正常根的颜色没有差别(图 1)。在无菌条件下, 尚未从东魁杨梅叶片和茎段诱导出毛状根。

2.2 影响 R15834D 转化东魁杨梅子叶的因素

为了建立有效的转化体系, 我们采用了不同的方式处理和转化东魁杨梅子叶。结果表明, 新鲜种子比储存一段时间的种子对 R15834D 敏感, 容易获得毛状根; 刀划伤痕比针刺更容易转化成功, 乙酰丁香酮的有无和是否辅以真空渗透对转化率影响不大, 1/2 MS 培养基较 MS 培养基好。总之, R15834D 转化东魁杨梅种子子叶的转化率不高, 产生毛根的子叶数在 10% 以下。

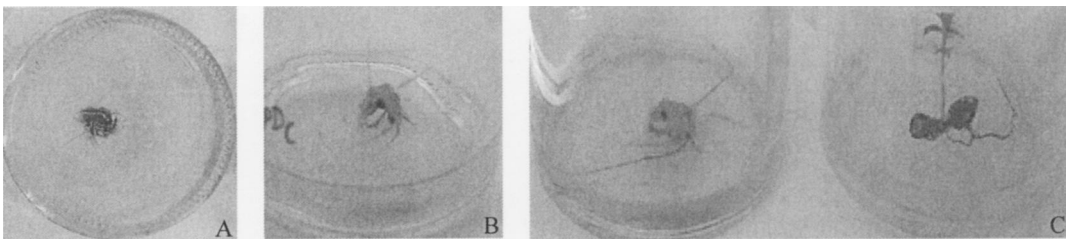


图 1 发根农杆菌 R15834D 诱导杨梅子叶产生毛状根

A 和 B: R15834D 诱导杨梅子叶产生毛状根; C: 左为毛状根(R15834D 侵染后 50 d), 右为种子播种正常生长 4 个月的植株

Figure 1 Hairy roots from cotyledons of *Myrica rubra* induced by *Agrobacterium rhizogenes* R15834D

A and B: hairy roots induced by R15834D (40 d); C: left is hairy roots induced by R15834D (50 d), right is four month seedlings growth on 1/2 MS

2.3 PCR 检测和 Southern 杂交

对部分毛状根进行了 PCR 检测和 Southern 杂交试验, 结果如图 2。从图 2 可以看出, PCR 从转化了 R15834D 的毛状根扩增出一条与转化菌一致的 1.27 kb 的条带。Southern 杂交也证实了拟南芥 *LEAFY* cDNA 片段已经成功地转入杨梅子叶中。

3 讨论

杨梅组织培养生根比较困难, 本实验利用发根农杆菌侵染杨梅子叶, 使杨梅子叶长出毛状根, 经 PCR 和 Southern 杂交等检测, 已成功将拟南芥 *LEAFY* cDNA 片段导入并整合到东魁杨梅中, 为解决杨梅生物技术发根困难提供了一条有效的途径, 同时为杨梅的遗传转化及杨梅和 *Frankia* 菌共生固氮机制的研究奠定了基础。

不同杨梅品种对发根农杆菌 R15834D 的敏感性不同, 同一杨梅品种不同外植体对发根农杆菌 R15834 的敏感性也不同, 新鲜杨梅种子的子叶比较容易转化成功, 杨梅叶、茎转化较困难, 尚未获得毛状根。目前 R15834D 转化东魁杨梅种子子叶的转化率不高, 产生毛根的子叶数在 10% 以下, 如何提高发根农杆菌的转化效率, 需要深入研究。作

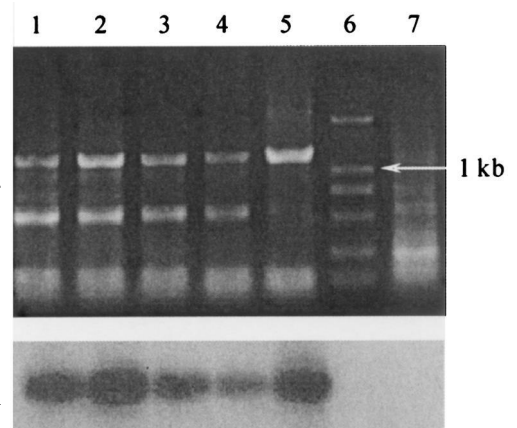


图 2 毛状根的 PCR 检测和 Soughem 杂交
上图: PCR 检测; 下图: Soughem 杂交
1~4. 4 个子叶上的毛状根; 5. R15834D 菌液;
6. DL2000 Marker; 7. 正常根

Figure 2 PCR electroporesis maps and Soughem hybridization of hairy roots
up: PCR electroporesis maps; down: Soughem hybridization;
L1-4: hairy roots; L5. R15834D strain; L6 DL2000 Marker; L7. normal root

者的实验仅进行了杨梅转基因的初步研究和探索性工作, 如何使毛状根分化发育成完整的植株和如何使转化的目的基因稳定表达, 尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 何新华, 陈力耕, 胡西琴. 杨梅——我国生态重建的优良经济林果[J]. 福建热作科技, 2002, 27 (4): 42—43.
- [2] BELL R L, SCORZA R, SRINIVASAN G, *et al.* Transformation of beurre bosc pear with *rolC* genes [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1999, 124 (6): 570—574.
- [3] WELANDER M, PAWLICKI N, HOLEFORS A, *et al.* Genetic transformation of apple rootstock M26 with *rolB* gene and its influence on rooting [J]. *J Plant Physiol*, 1998, 53: 371—380.
- [4] ZHU L H, HOLEFORS A, AHLMAN A, *et al.* Transformation of the apple rootstock M. 9/29 with *rolB* gene and its influence on rooting and growth [J]. *Plant Sci*, 2001, 160: 433—439.
- [5] 李名扬, 罗金华, 陈红. 发根农杆菌对柑橘的离体转化和植株再生作用[J]. 西南农业学报, 1996, 9 (1): 90—95
- [6] 林顺权. 发根农杆菌感染导致紫果西番莲遗传转化[J]. 福建农业大学学报, 1998, 27 (2): 255—256.
- [7] 曾黎辉, 陈振光, 吕柳新. 发根农杆菌转化龙眼研究初报[J]. 福建农业大学学报, 2000, 29 (1): 27—30.
- [8] WEIGEL D, ALVAREZ J, SMYTH D R, *et al.* *LEAFY* control floral meristem identity in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 1992, 69: 843—859.
- [9] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATI S. *Molecular Cloning—a Laboratory Manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] 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.

Genetic transformation of *Myrica rubra* mediated by *Agrobacterium rhizogenes*

HE Xin-hua^{1, 2}, CHEN Li-geng², GUO Chang-lu^{2, 3}

(1. Department of Horticulture, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China; 2. Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang, China; 3. School of the Ocean, Harbin Institute of Technology, Weihai 264209, Shandong, China)

Abstract: *Myrica rubra* (China bayberry) is a particular fruit tree to China. It is also a ideal tree species of afforestation. The purpose is to establish a genetic transformation system of *Myrica rubra* mediated with *Agrobacterium rhizogenes*. Cotyledons, leaves, and stem segments of *M. rubra* ‘Dongkui’ and *M. rubra* ‘Boji’ were infected with *A. rhizogenes* R15834 containing a pDC202 vector carrying the *LEAFY* gene, which controls floral meristem, cultured in 1/2 Murashige and Skoog (MS) or MS medium. Results showed that only less than 10% of the cotyledons of *M. rubra* ‘Dongkui’ induced hairy roots. Hairy roots were produced from new seeds of *M. rubra* ‘Dongkui’ more easily than old seeds, and the cotyledons grew hairy roots on the 1/2 MS media more readily than the MS media. By PCR and Southern hybridization test, it was proved that the *LEAFY* gene of *Arabidopsis thaliana* was successfully transferred and integrated into a nuclear genome through cotyledons of *M. rubra* ‘Dongkui’. [Ch, 2 fig. 10 ref.]

Key words: cash forest; *Myrica rubra*; genetic transformation; *Agrobacterium rhizogenes*