

抗菌肽 MB₃₉基因导入‘皇家嘎啦’苹果及其四倍体植株的培育

刘庆忠¹ 赵红军¹ 刘 鹏¹ Mong Rengong² Freddi A. Hammerschlag³

(¹ 山东省果树研究所, 泰安 271000; ² USDA/ARS HCRL, Corvallis, OR 97330, USA; ³ USDA/ARS, Fruit Laboratory, Beltsville, MD 20705, USA)

摘 要: 采用农杆菌介导法, 将抗菌肽 MB₃₉基因转入‘皇家嘎啦’苹果, 获得了 7 个转基因株系。通过秋水仙素诱变染色体组工程育种技术, 由转化体叶片获得了 20 个四倍体植株。经 PCR 检测和 Southern Blotting 杂交证明, 抗菌肽 MB₃₉基因已经整合到皇家嘎啦苹果的染色体组中。转基因株系 TR-1、TR-3 提高了对火疫病抗性。采用流式细胞技术 (Flow Cytometry) 确定植株为四倍体。

关键词: 抗菌肽 MB₃₉; 转基因; 苹果; 四倍体; 秋水仙素

中图分类号: S 661.1; Q 78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 05-0392-07

‘皇家嘎啦’ (*Malus domestica* Borth. cv. Royal Gala) 苹果为新西兰育成品种, 因成熟期正值晚夏水果淡季而倍受人们的欢迎, 现已成为世界上最重要的苹果品种之一。但该品种果实小, 抗病性较差, 易感火疫病、白粉病、轮纹病、腐烂病等, 给生产者造成了很大损失^[1]。抗菌肽 B 是在天蚕体内发现的一种有广谱抗细菌和真菌特性的多肽类化合物, MB₃₉系人工合成, 其结构类似于抗菌肽 B, 在生物体内活性及稳定性更高^[2]。有报道指出转 MB₃₉基因的烟草增强了对丁香假单孢菌 (*Pseudomonas syringae*) 的抗性^[3]。抗菌肽 Attacin E 导入苹果矮化砧木 M₂₆获得了抗火疫病的植株^[4]。染色体倍性操作已广泛应用于果树的育种中, 秋水仙素处理诱导多倍体已成为增大果实育种的有效手段^[5,6]。本研究的目标是采用基因工程手段将抗菌肽 MB₃₉基因导入苹果, 并通过细胞工程手段将其染色体组加倍, 获得既抗病, 果实又大的皇家嘎啦新品系。

1 材料与方法

1.1 植物材料

将离体生长的皇家嘎啦苹果新梢保存在增殖培养基上^[7], 每隔 4 周取 1 cm 新梢作为外植体转移 1 次。增殖培养基为 MS 无机盐添加肌醇 100 mg/L、盐酸硫胺素 0.5 mg/L、6-苄基嘌呤 1.0 mg/L、吲哚丁酸 0.1 mg/L、赤霉素 0.5 mg/L、蔗糖 30 g/L 和琼脂 7 g/L, pH 值 5.6。培养室温度 25℃, 光照强度 2 000 lx, 光周期为 16 h 光照、8 h 黑暗。新梢在正常条件下生长 2 周后转入全黑暗条件下生长 2 周, 进行白化处理, 获得白化新梢^[8]。

收稿日期: 2000-11-06; 修回日期: 2001-05-18

基金项目: 山东省科委良种产业化工程资助项目; 山东省人事厅资助项目; 山东省农业科学院资助项目 (98-06)

Genius非同位素地高辛 (Digoxinin) 标记探针以及核酸杂交均根据药品供应厂商 (Boehringer Mannheim) 提供的说明进行。

1.5 秋水仙素处理

取离体新梢顶部 1~2 节成熟展开的叶片, 首先切除叶柄和叶尖, 然后沿中脉处横切两刀造成两个伤口, 随即放入含有秋水仙素 25 mg/L 的液体再生培养基中培养, 每处理 30 个外植体。再生培养基的成分是 N_6 大量元素、LS 微量元素、肌醇 100 mg/L、盐酸硫胺素 0.5 mg/L、TDZ 2.0 mg/L、水解酪蛋白 300 mg/L、蔗糖 30 g/L, pH 值 5.4。培养 5 d 后将叶片外植体取出, 用无菌水冲洗两遍后转移到不含秋水仙素、其它成分相同的固定再生培养基上继续进行不定芽诱导, 6 周后将获得的不定芽芽丛进一步分割, 转移到新梢增殖培养基上继代培养。在此期间根据目测将有形态变异的新梢单独取出进行增殖。

1.6 倍性鉴定

取 10 mg 离体新梢叶片, 在 0.5 mL 的 Partec HR-A 溶液 (分离细胞核的柠檬酸缓冲液) 中研磨, 然后通过 30 μ m Partec Celltrics™微孔膜过滤到测试管中。在样品中加 0.5 mL Partec HR-B 溶液 (DAPI 溶液), 置于 Partec 倍体分析仪 (德国, Münster) 测定样品单个细胞核的 DNA 总量, 结果由仪器直接绘出 DNA 曲线图。

1.7 生根及田间移栽鉴定

将经 Southern Blotting 分析证明已转入基因、倍体分析仪测定为四倍体的材料, 在新梢增殖培养基上进行扩大繁殖, 在 1/2 MS 附加 IBA 0.1 mg/L 的生根培养基上诱导生根。生根后移栽于土壤, 先在温室条件下锻炼 4 周, 然后移栽于大田。再将大田生长的新梢取下, 高接到苹果大树上或嫁接到田间的平邑甜茶 (*Malus hupehensis*) 实生苗上。

1.8 抗火疫病性能鉴定

将获得的转基因植株移栽于生长盘中, 当植株旺盛生长到 15 cm 时, 用注射针向新梢顶部接种 cfu 5×10^7 /mL 火疫病细菌 (*Erwinia amylovora*)^[4], 试验重复 3 次, 每重复接种 7 株。接种后每隔 3 d 调查 1 次顶端坏死的长度, 直到某些植株的幼茎全部坏死时为止。采用最小差异法 (LSD) 进行显著性检验。

2 结果分析

2.1 获得转基因植株

将 200 个白化茎段外植体, 在培养基上与含有双元质粒载体 pOsmotinMB₃₉ 的农杆菌 EHA105 共培养, 其中有 3 个外植体再生出了转化体; 在另一试验中, 同样采用 200 个白化茎段外植体, 获得了 4 个转化体, 转化效率为 1.5%~2.0%。将获得的 7 个转化体在含有卡那霉素 20 mg/L 的生根培养基上诱导生根, 其生根率均超过 85%。而皇家嘎啦对照 (Wild type) 的离体新梢基部变白, 不能生根, 但其在不含卡那霉素的培养基上生根率可达 86%。同样, 在含卡那霉素的再生培养基上, 所有转化体的离体叶片均能再生不定芽, 而对照则不能。这说明苹果转化体的抗卡那霉素基因已经嵌合到苹果体内, 并得以表达。

2.2 外源抗菌肽基因的整合

从得到的 7 株转化植株叶片中提取 DNA, 分别采用 Sst 和 Hind + Xba 进行酶切 (图 2), 采用 PCR 和 Southern Blotting 分析 (图 3、图 4), 表明 MB₃₉ 基因已完全整合到皇家

嘎啦苹果的基因组内。采用 Hind + Xba

酶切、电泳、探针杂交表明, 其中 1 个株系有 1 个拷贝数, 3 个株系有 2 个拷贝数, 其它 3 个株系分别含有 3、4、7 个拷贝数 (图 4)。所转基因在植物体内拷贝数的多少, 对转入基因的表达有正面或负面的影响。采用 Sst 酶解能准确地预见所切出的片段大小, 但其中 TR-1 株系多了一个未能预见的片段 (图 4), 这表明外源基因在整合过程中发生了重组, 但基因重组后对植物本身有何影响, 需进一步研究。

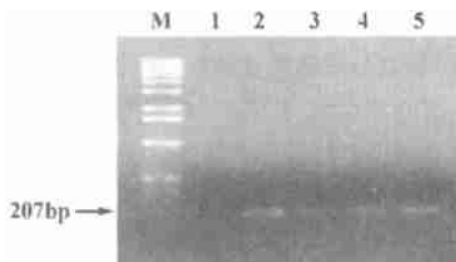


图 3 转抗菌肽 MB₃₉ 基因苹果的 PCR 分析
M: DNA 分子量标记; 1: 未转化植株 (对照);
2~5: 转化体。

Fig. 3 PCR analysis of cecropin MB₃₉ gene of putative transgenic apple

M: Marker: DNA (EcoR/ Hind); 1: Wild type;
2 - 5: Putative transgenic line.

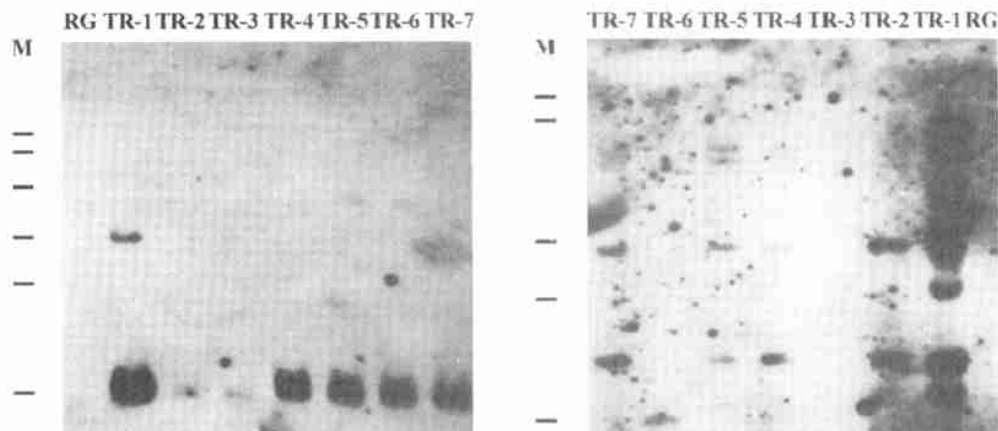


图 4 转抗菌肽 MB₃₉ 基因苹果的 Southern Blotting 分析

所有的 DNA 用限制性内切酶 Sst 消化, 以表示已知大小片段的插入 (左), 用 Xba 和 Hind 消化表示导入基因的拷贝数 (右)。M: DNA 分子量标记, 从下到上依次为 1.0、2.0、3.0、5.0、8.0 和 10.0 kb;

RG: 未转化植株 (对照); TR-1 ~ TR-7: 转化体。

Fig. 4 Southern blotting analysis of transgenic 'Royal gala'

All genomic DNA was cut with one restriction enzyme (Sst) digest to show an insert of the predicted size (Left), and the other (Xba and Hind) digest used to shown copy number (Right). M: Molecular weight markers at 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 8.0, 10.0 kb from bottom to top. RG: Wild type, TR-1 - TR-7: Putative transgenic line.

2.3 抗病性鉴定

用 $cfu\ 5 \times 10^7/mL$ 浓度的火疫病病菌悬浮液接种每个转基因株系, 以发病茎长度占整个茎长度的百分数来表示植株抗病的程度, 其结果 (图 5) 表明, 接种后第 12~17 天两个转基因株系的发病程度明显低于未转基因的对照 ($LSD_{0.05} = 12.8; 16.2; 18.8$), 此时两个转基因株系 TR-1、TR-3 新梢坏死的比例分别为 31.37%~43.2% 和 42.4%~55.3%, 而对照 RG 则为 61.3%~76.2%。在接种 12 d 前和 17 d 后, 转基因株系与对照之间的发病程度无明显差异。该项工作表明, 转抗菌肽 MB₃₉ 基因的皇家嘎啦苹果增加了对火疫病病

原细菌的抗性。

2.4 转基因四倍体植株的获得及鉴定

试验中, 将来自转基因株系 TR-1、TR-3 的各 30 个叶片外植体, 置于含有秋水仙素的不定芽再生培养基上, 分别从 9 和 11 个外植体上获得了四倍体新梢, 分别占接种外植体数的 30 % 和 36.7 %。

使用德国 Partec 倍性分析仪对诱变材料进行倍性鉴定, 并采用流式细胞技术 (Flow Cytometry) 测定离体新梢叶片单个细胞核的 DNA 含量。由倍性分析仪自动绘制的 DNA 含量分布曲线如图 6。图中显示的两个峰值为对照 (二倍体) 和诱变材料 (四倍体) 细胞核内 DNA 的含量分布, 可见诱变材料的 DNA 含量比对照高出一倍之多 (201.48 100.28), 从而证明诱变材料的染色体组比对照高出一倍, 为四倍体。

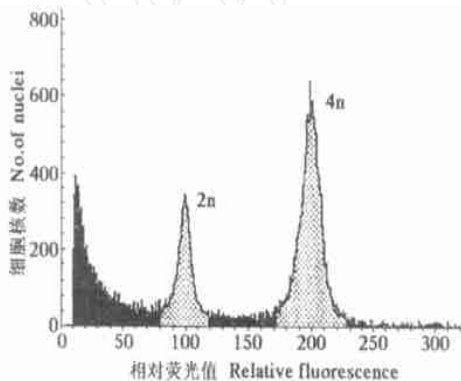


图 6 二倍体与四倍体转基因 ‘皇家嘎啦’ 苹果的 DNA 含量分布图

Fig. 6 The DNA distribution histogram of transgenic diploid and tetraploid ‘Royal Gala’ analyzed

2.5 转基因四倍体植株的营养生长特性

将生根后的转基因诱变新梢移栽于植物生长盘 (PlantCon) 内, 在培养室内生长 6 周, 测量观察表明, 所有四倍体株系生长缓慢, 植株顶端生长点较对照矮, 茎粗壮, 叶片变圆, 叶片长宽比变小 (图 7, 表 1), 叶缘锯齿深, 叶片浓绿。将其嫁接在平邑甜茶砧木上, 也表现出节间短、矮化、叶柄粗、叶片变圆等特点。这表明皇家嘎啦苹果四倍体与二倍体的形态特征有明显不同。不论是二倍体还是四倍体, 相同倍性的不同株系之间尚未看出差别。

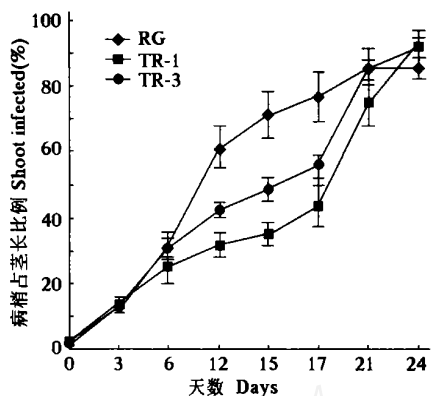


图 5 接种 *Erwinia amylovora* 细菌后生长在培养盘 (PlantCon) 内的植株火疫病病情发展

TR-1、TR-3: MB₃₉转基因株系

RG: 未转基因的 ‘皇家嘎啦’ 苹果

Fig. 5 The development of Fireblight in growth chamber-grown plants following inoculation with *Erwinia amylovora* TR-1 and TR-3 is a transgenic line. RG is nontransgenic control ‘Royal Gala’, one of fireblight susceptible apple cultivars

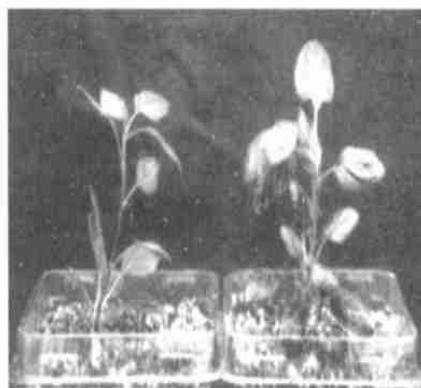


图 7 转基因皇家嘎啦苹果在植物生长盘内生长 6 周的形态特征

Fig. 7 Appearance of transgenic ‘Royal Gala’ grown in the PlantCon for 6 weeks

表 1 二倍体与四倍体转基因 ‘皇家嘎啦’ 苹果在植物生长盘内生长 6 周的形态表现

Table 1 Phenotypic characteristics of transgenic diploid and tetraploid ‘Royal Gala’ grown in the PlantCon for 6 weeks

株 系 Lines	株 高 Height (cm)		茎 粗 Stem diameter (mm)		叶片长宽比 Leaf length/ breadth ratio	
	TR-1	TR-3	TR-1	TR-3	TR-1	TR-3
二倍体 Diploid	4.82 a *	5.33 a	1.3 b	1.2 a	1.94 a	2.03 a
四倍体 Tetraploid	3.62 b	3.26 b	1.9 b	1.9 b	1.60 b	1.60 b

* 所有数据以 LSD 法检验, 字母不同者表示二倍体与四倍体之间差异显著 (P 0.05)。

*Difference letters indicate significance between diploid and tetraploid at P 0.05 by LSD test.

3 讨论

苹果的遗传转化研究已在许多品种上获得转基因植株, 如矮化砧木 M₂₆、元帅、嘎啦、乔纳金、金帅、艾斯塔等, 但均采用叶片为外植体, 所用的基因多为标记基因 GUS 和抗除草剂基因, 很难直接用于苹果的生产中去。本项研究采用白化茎段^[8]为外植体, 将抗病基因抗菌肽 MB₃₉ 转入生产上极为重要的苹果品种皇家嘎啦中去, 获得抗病转基因株系, 这对于苹果采用分子育种技术进行改良具有重要意义。

尽管采用叶片外植体已成功地获得了苹果的转基因植株, 但转化效率低, 多为 0.1 % ~ 0.5 %^[9]。在本项研究中, 以白化茎段为外植体, 采用农杆菌 EHA105 介导, 将抗菌肽 MB₃₉ 基因转入皇家嘎啦苹果, 取得了 1.5 % ~ 2.0 % 的较高转化效率。这与我们先前采用含有 pGvp35SGus 载体的农杆菌 EHA101 所取得的 2.0 % 的转化效率^[7]相一致。这从侧面进一步证明, 外植体白化处理能够促进苹果的基因转化^[8], 同时也说明我们已建立起来的采用白化茎段为外植体的苹果基因转化技术体系^[7]是可行的。

自 1930 年秋水仙素诱导多倍体技术问世以来, 许多作物获得了多倍体。就苹果而言, 以采用成年树离体叶片不定梢进行诱导更为有效, 并且可以避免童期的干扰。离体叶片于再生培养基上与低浓度秋水仙素长时间接触诱导, 使秋水仙素参与叶片不定梢原基形成的全过程, 最大限度地减少或消除了嵌合体形成的可能, 因为叶片外植体的不定梢多起源于单细胞^[10]。本项工作的目标之一是获得比原皇家嘎啦苹果果实更大的株系。Einset 和 Imhofe 已报道了因亲本染色体加倍而出现 “大果” 或 “巨型果” 的苹果芽变^[11,12]。瑞士业已培育出了四倍体的大果型品种 ‘Alpha 68’^[6]。本研究中已经获得的四倍体转抗病基因植株, 通过大树高接和田间苗木繁育, 已初步看出节间短, 株型紧凑, 叶片圆而厚, 叶色深绿等, 显现出大果型苹果品种的特点, 其经济性状与二倍体对照的比较有待进一步研究。

参考文献:

- Frecon J L. Gala's legacy of excellence. Fruit Grower, 1997 (4): 37 ~ 38
- Owen L D, Heutte T M. A single amino acid substitution in the antimicrobial defence protein cecropin B is associated with diminished degradation by leaf intercellular fluid. MPMI, 1997, 10 (4): 525 ~ 528
- Huang Y, Nordeen R O, Di M Owens L D, et al. Expression of an engineered cecropin gene cassette in transgenic tobacco plants confers disease resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tabaci. Phytopathology, 1997, 3: 494 ~ 499
- Norelli J L, Aldwinckle H S, Destefano-Beltrani L, et al. Transgenic ‘Malling 26’ apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. Euphytica, 1994, 77: 123 ~ 128
- Brown A G. Apples. In: Janick J, Moore J N eds. Advances in Fruit Breeding. West Lafayette: Purdue Univ. Press, 1975.

451 ~ 474

- 6 Scanford J C. Ploidy manipulations. In: Moore J N, Janick J eds. Methods in fruit breeding. West Lafayette ind: Purdue University Press, 1983. 172 ~ 185
- 7 刘庆忠, 赵红军, Hammerschlag F A. 提高苹果基因转化效率的研究. 果树科学, 2000, (3): 159 ~ 163
- 8 Liu Q, Salih S, Hammerschlag F A. Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus domestica*) shoots promotes high frequency shoot organogenesis and enhanced α -glucuronidase expression from stem internodes. Plant Cell Reports. 1998, 18: 32 ~ 36
- 9 James DJ, Dandekar A M. Regeneration and transformation of apple. In: Lindsey Ked. Plant Tissue Culture Manul, vol B8. Kluwer Academic Publishers, 1991. 1 ~ 18
- 10 Litz R E, Gray D J. Organogenesis and somatic embryogenesis. In: Hammerschlag F A, Litz R E eds. Biotechnology of Perennial Fruit Crops. C. A. B. International, 1992. 3 ~ 34
- 11 Einset J. The spontaneous origin of polyploid apples. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 1945, 46: 91 ~ 93
- 12 Einset J, Imhofe B. Chromosome numbers of apple varieties and sports 3. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 1951, 58: 103 ~ 108

Regeneration of Tetraploid Plants with Cecropin MB₃₉ Gene from 'Royal Gala' Apple

Liu Qingzhong¹, Zhao Hongjun¹, Liu Peng¹, Mong Rengong², and Freddi A. Hammerschlag³

(¹Shandong Institute of pomology, Tai'an, Shandong 271000; ²USDA/ARS HCRL, Corvallis, OR 97330, USA;

³USDA/ARS, Fruit Laboratory, Beltsville, MD 20705, USA)

Abstract : As part of the program to develop transgenic *Malus × Domestic*. cv. 'Royal Gala' tetraploid with improved traits, new germplasm of transgenic diploid and tetraploid plants with cecropin MB₃₉ gene were regenerated. Seven transgenic diploid plants were obtained from etiolated internodal explants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using the plasmid binary vector pGV containing a chimeric gene cecropin MB₃₉. The integration of the cecropin gene into apple genome was confirmed by PCR and Southern blotting analysis. It was proved that lines, TR-1 and TR-3, had increased the resistance to fireblight disease caused by *Erwinia amylovora*. Twenty tetraploid lines were produced by cocultivating leaf explants from wild type and transgenic diploid shoots with colchicine in apple regeneration medium. Flow cytometry was used for ploidy determination. The tetraploid plants were distinguishable from the diploid on morphological as well as cytogenetic grounds. Both the transgenic diploid and tetraploid plants are now being evaluated for growth development and disease resistance.

Key words : Cecropin MB₃₉; Transgenic; Apple; Tetraploid; Colchicine