

甜椒抗菌蛋白基因(harp)转化桉树的研究

王水琦¹, 陈 坚², 甘勇辉¹

(1. 漳州职业技术学院食品与生物工程系, 福建 漳州 363000; 2. 福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003)

摘 要: 用不同浓度的2,4-D与IAA对桉树叶盘进行了愈伤组织的诱导及植株再生的试验,建立了新的桉树再生体系。进一步用含甜椒抗菌基因(harp)的农杆菌侵染桉树叶盘,发现侵染后对愈伤组织诱导率无明显影响,却抑制了桉树的植株再生。对再生苗的PCR和Southern杂交检测证实已将harp基因已转入桉树植株的基因组中。

关键词: harp基因; 抗病基因; 桉树; 基因转入; 组织培养; 植株再生

中图分类号: S722.3⁺3; S722.3⁺6

文献标志码: A

Studies of Transformation of harp Gene from Sweet Pepper into Eucalyptus

WANG Shui-qi¹, CHEN Jian², GANG Yong-hui¹

(1 Dept. of Food and Biological Engineering, Zhangzhou Institute of Vocational Technology, Zhangzhou 363000, Fujian, China;

2 Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian, China)

Abstract: After a treatment of 2,4-D and IAA with different concentrations, callus was induced from leaf disc of Eucalyptus for regenerating plantlets and a new regeneration system of Eucalyptus was established. Furthermore, the leaf disc of Eucalyptus was infected by Agrobacterium tumefaciens carrying the harp gene from sweet pepper and no obvious influence was found on the induction rate of callus after the infection, but the regeneration of callus was inhibited. The PCR test and Southern blot of regenerated plantlets show that the harp gene has incorporated into the genome of Eucalyptus.

Key Words: harp gene; resistance gene; Eucalyptus urophylla; transgenesis; tissue culture; plant regeneration

桉树Eucalyptus是国际公认的速生、丰产、短周期的商品林树种,是目前世界上最重要的木制纸原料之一,也是我国沿海地区最重要的造林树种。桉树中巨尾桉、尾叶桉和尾巨桉等新品种速生、高产、优质的特性,成为90年代以来福建省用材林速生丰产基地的首选树种。如福建省漳州市从1991年开始引种巨尾桉、尾叶桉和尾巨桉等桉树新品种已有10年的时间,据统计,2004年全市营造桉树速丰林突破800 hm²,种苗需求量达2 000万株^[1]。近几年福建省在桉树经营中主要出现有焦枯病、青枯病等病害,严重影响了桉树的正常生长,对营林生产造成巨大损失。特别是主推的尾叶桉(E. urophylla Black)、巨尾桉(E. grandis × E. urophylla)等树种易感青枯病,发病率3.3%~6.7%,严重时50%~100%^[2]。由于桉树青枯病难以用化学防治,被称为桉树的“癌症”,培育抗病品种是解决该病害的根本措施。

桉树转化的研究主要有两个方面:一是建立桉树的离体快繁系统^[3~8];二是建立基因转化系统,以获得桉树的新品种。邵志芳等^[9]首次应用人工合成蚕抗菌肽D基因通过根癌农杆菌介导于尾叶桉,获得抗青枯病的转基因植株。由于抗病基因转化的桉树可以通过无性繁殖大量获得抗病的种苗,基因工程技术已成为桉树防治青枯病的新途径。

harp基因是在甜椒中发现的一种抗病基因,它可诱发植物对革兰氏阴性病原菌的超敏反应——一种植物的抗病反应^[10]。人们发现表达甜椒harp基因的烟草对其病原菌丁香假单胞菌和软腐病菌具有抗性^[11]。为了利用这种源于植物的抗病蛋白培育抗病桉树,我们引进了甜椒harp基因,并置于35S启动子的驱动之下转化桉

收稿日期: 2007-04-17

基金项目: 福建省人事厅及福建省科技计划资助项目(2003085)。

作者简介: 王水琦(1965-),男,福建漳州人,副教授,硕士,现从事植物生物技术的教学与科研工作。

树,并初步鉴定 hrap 基因已转入桉树.

1 材料与方法

1.1 材料

供试的桉树品种为巨尾桉(*E. grandis* × *E. urophylla*)无性系,由漳州林业组培中心提供. 甜椒 hrap 基因及根癌农杆菌 LBA 4404,由北京大学生命科学学院林忠平实验室提供.

1.2 方法

1.2.1 巨尾桉组织培养及植株再生

从无菌苗中剪取叶盘 2~3 mm²,接种于附加不同浓度(0.5、1.0、4.0 mg/L)的 2,4-D 及不同浓度(10 mg/L、20 mg/L)的 IAA 的 MS 培养基上(见表 1). 每一种浓度处理水平接 10 瓶,每瓶接 2 个外植体,重复 3 次,暗培养 24 d,每 6 d 统计 1 次有愈伤组织的外植体数目,观察愈伤组织的外形,最后计算愈伤组织的成活率.

表 1 巨尾桉叶盘愈伤组织诱导及植株再生结果

Table 1 Results of callus induction and plant regeneration from leaf disco of <i>E. grandis</i> × <i>E. urophylla</i>							
激素	质量浓度 (mg · L ⁻¹)	接种外植体数	分化愈伤组织 的外植体数	诱导率 %	统计的愈伤 组织个数	分化芽的 愈伤组织数	芽分化率 %
2,4-D	0.5	60	59	98.3	48	9	18.8
	0.5(转基因)	60	57	95.0			
	1	60	59	98.3	48	2	4.2
	1(转基因)	60	57	95.0			
	4	60	15	25	48	4	8.3
	4(转基因)	60	14	23.3			
IAA	10	60	51	85	48	17	35.4
	10(转基因)	90	78	86.7	72	16	22.2
	20	60	56	93.3	48	21	43.8
	20(转基因)	90	85	94.4	72	18	25

将培养了 28 d 的愈伤组织平均转入桉树培养基附加 20 mg/L IAA + 0.5 mg/L 6-BA 的 MS 再生培养基,每瓶植入 8 块愈伤组织. 直接放在光下培养. 分化培养期间,每 5 d 观察 1 次,记录出芽的愈伤组织个数,计算愈伤组织的出芽率.

1.2.2 hrap 基因转化桉树

将切好的桉树叶盘浸入含 hrap 基因的根癌农杆菌 LBA 4404 的 LB 培养基中,摇 5~15 min. 将浸染过的外植体置于无菌吸水纸上,吸去多余菌液,在 MS 固体培养基中预培养 2 d,转至含有羧苄青霉素 500 mg/L 的愈伤诱导培养基(配方与试验 1.2.1 相同)上. 暗培养 24 d,每 6 d 统计 1 次有愈伤组织的外植体数目,观察愈伤组织的外形,最后计算愈伤组织的成活率. 将培养了 28 d 的愈伤组织转入 20 mg/L IAA + 0.5 mg/L 6-BA 的 MS 中,放在光下培养. 分化培养期间,每 5 d 观察 1 次,记录出芽的愈伤组织个数,计算愈伤组织的出芽率.

待不定芽长至 0.3~0.8 cm 时,转入含临界质量浓度卡那霉素(50 mg/L)的诱根培养基(改良 MS + BA 0.8 mg/L)以诱导生根. 最后,对再生成完整的植株进行检测.

1.2.3 转基因植株的检测

再生桉树基因组 DNA 采用 CTAB 法微量提取^[12,13]. 以质粒 pBIHRA-P 作阳性对照,用专一引物 HRA-Ps(5'-CGCGGATCCATGAAAATGAAGAACTCTC3')及 HRA-P748a(5'-GTTGGAGTTGGAAGACGAGG3')进行 PCR 分析. Southern 杂交检测方法参照 Sambrook & Russell 的方法^[14]: 用 Bgl 限制性内切酶(Promega 公司)酶切桉树基因组 DNA,完全切开后,电泳并转膜至尼龙膜进行杂交;杂交带显色及探针制备按 PCR DIG Labeling Mix(Roche 公司)使用说明进行.

2 结果与分析

2.1 不同浓度的 2,4-D 与 IAA 对巨尾桉叶盘愈伤组织诱导及植株再生的影响

不同浓度(0.5、1.0、4.0 mg/L)的 2,4-D 及不同浓度的 IAA(10、20 mg/L),对桉树叶盘外植体诱导愈伤组

织及植株再生的影响结果如下表1所示

试验结果表明: 0.5、1.0 mg/L 的2,4-D 较4.0 mg/L 的2,4-D 更有利于诱导桉树茎段产生愈伤组织, 在附加0.5 mg/L 和1.0 mg/L 2,4-D 培养基上愈伤组织的诱导率都达到了96.7%. 在附加10 mg/L IAA 的培养基上, 在培养12 d 后诱导率达到80%以上, 培养24 d 后诱导率达到86.7%. 在20 mg/L IAA 的培养基上, 在培养12 d 后诱导率达到40%以上, 培养18 d 后诱导率达到95%. 由此可见, 20 mg/L 的IAA 相对于10 mg/L 的IAA 更适于桉树愈伤组织的诱导

将原培养在附加0.5、1.0、4.0 mg/L 的2,4-D 以及10 mg/L IAA 和20 mg/L IAA 的培养基上的愈伤组织转入附加20 mg/L IAA + 0.5 mg/L 6-BA 培养基上置于见光处培养. 调查每块愈伤组织分化的不定芽数. 由试验结果可以得到: 在诱导愈伤组织时使用2,4-D, 会不同程度地抑制芽的再生; 且2,4-D 的浓度越大, 抑制作用越明显. 而当愈伤组织培养基为1.0 mg/L 2,4-D 时, 由于大量产生的愈伤组织呈白色、松散状, 不能产生再生芽, 再生率为严重下降. 由此可见, 20 mg/L 的IAA 相对于10 mg/L 的IAA 更适于桉树芽的再生. 将附加10 mg/L IAA 和20 mg/L IAA 的培养基置于见光处, 发现在培养至18 d 时, 也出现少量再生芽, 可见IAA 本身即可促进愈伤组织的再生

2.2 农杆菌侵染对巨尾桉叶盘愈伤组织诱导及植株再生的影响

农杆菌侵染对不同浓度(0.5、1.0、4.0 mg/L)的2,4-D 及不同浓度的IAA (10、20 mg/L)诱导的桉树叶盘外植体愈伤组织及植株再生的影响结果(见表1).

转入hrap 基因对桉树愈伤组织诱导的影响比较表1的数据, 发现无论为2,4-D 诱导, 还是IAA 诱导, 均可以看出转hrap 基因, 对愈伤组织的诱导率基本没有影响. 经t 测验比较, 转入hrap 基因处理与未转入处理的结果是: t 值均小于 $t_{0.025} = 2.0452$, $n = 30$

尽管转基因虽然对愈伤诱导率没有明显影响, 但我们发现愈伤组织产生的启动时间和愈伤组织的生长高峰期被明显推迟. 对于未转基因的桉树外植体, 愈伤组织生长的启动时间在前6 d 之内, 愈伤组织生长的高峰期在12~18 d (附加20 mg/L IAA 的培养基)或前12 d (其余培养基). 对于转基因后的桉树外植体, 愈伤组织生长的启动时间在6~12 d 之内, 生长的高峰期在18~24 d (附加20 mg/L IAA 的培养基)或12~18 d (其余培养基).

转入hrap 基因对桉树再生率的影响比较表1的数据. 发现用10 mg/L IAA、20 mg/L IAA 诱导的愈伤组织的再生率降低了, 经t 测验比较转入hrap 基因处理与未转入处理的结果: $t_{(10\text{ mg/L})} = 2.667 > t_{0.025} = 2.0687$, $t_{(20\text{ mg/L})} = 2.986 > t_{0.005} = 2.8073$, $n = 24$. 可见转基因过程会显著抑制了桉树芽的再生, 两处理分别抑制了37.3%和42.5%. 2,4-D 诱导的愈伤组织本身的再生率就低, 因此更不适合进行转基因操作

2.3 hrap 基因转化苗的获得及鉴定

在诱导培养基(附加10、20 mg/L IAA 的MS 培养基)中培养12~20 d 形成生长稳定的愈伤组织后, 作第1次继代, 待8~14 d 长至旺盛期后转入分化培养基(附加20 mg/L IAA + 0.5 mg/L 6-BA 的MS 培养基)以诱导分化不定芽. 待不定芽长至0.3~0.8 cm 时, 转入含临界浓度卡那霉素的诱根培养基(改良MS + BA 0.8 mg/L)以诱导生根再生成完整的植株(见图1).

本实验对首批获得的9株能再生成完整植株的生根苗进行PCR 检测, 有2株转基因植株通过PCR 扩增出与阳性对照(pB HRA P)同样大小的748 bp 片段, 而未转化的桉树植株则无特异性扩增条带, 初步证明hrap 基因已转入桉树植株的基因组中, 电泳检测结果见图2

进一步对5株PCR 检测呈阳性的转基因桉树苗进行Southern 检验, 发现有3株可以检测到有明显的杂交带. 但有2株与未转基因的对照一样没有检测出明显的杂交带(见图3).

PCR 和Southern 杂交证实, 通过我们建立起来的桉树遗传转化体系可以有效地将外源基因导入到巨尾桉基因组中, 转化频率在10%左右.



图1 经农杆菌侵染后再生完整的桉树植株
Fig 1 The complete Eucalyptus plantlet regenerated from explant infected by Agrobacterium tumefaciens

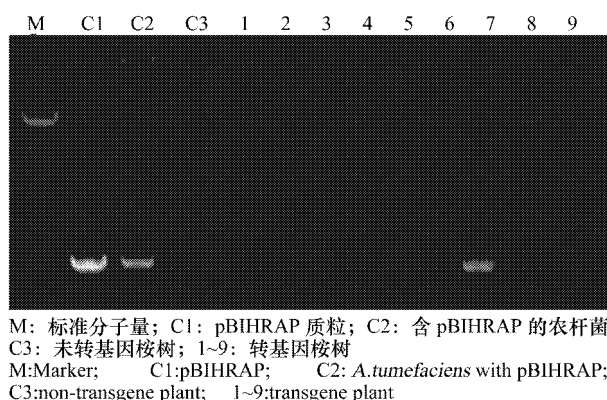


图2 转hrap 基因桉树再生植株的PCR 鉴定

Fig 2 The PCR identification of regenerated plant of *Eucalyptus* transformed by hrap gene

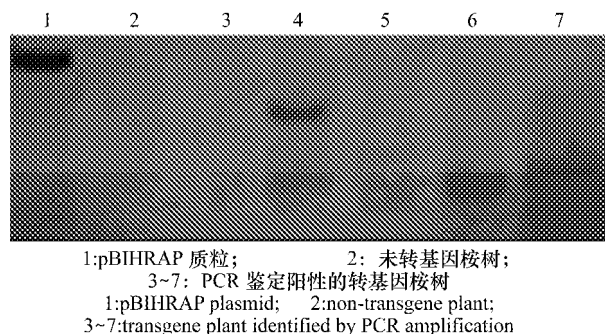


图3 转hrap 基因桉树再生植株的Southern 鉴定

Fig 3 The Southern blot of regenerated plant of *Eucalyptus* transformed by hrap gene

3 讨 论

桉树转基因成功的关键在于建立与之相关的组织培养再生技术。目前国内有一些关于不同激素对诱导桉树愈伤组织的影响的报道,主要是关于不同浓度的6-BA、BA、NAA^[3~5],而以不同浓度的2,4-D、IAA对桉树外植体(叶片)进行愈伤组织的诱导试验尚未见报道。我们的研究发现:2,4-D与IAA对桉树愈伤的诱导均较好,但再生率有极大差异。之所以会产生这种情况,可能因为2,4-D是人工合成的激素,它尽管会促进细胞的分裂,但主要是促进植物细胞无序的分裂和生长;而不能像天然的植物激素(IAA,6-BA)那样促进植物细胞无序的分裂和生长,从而形成器官。所以在诱导愈伤组织时使用2,4-D,会不同程度地抑制芽的再生;且2,4-D的浓度越大,抑制作用越明显;在浓度不合适时,还会产生白色、松散状,不能产生再生芽的愈伤组织。

我们研究发现:转基因操作虽然对愈伤诱导率没有明显影响,但会推迟愈伤组织产生的启动时间和愈伤组织的生长高峰期,并抑制了桉树芽的再生。由于邵志芳^[9]等的转基因操作过程是用头孢霉素(Cef),并摸索了其临界浓度。我们推测:我们体系中使用的羧苄青霉素的浓度在试验过程中,阻碍了植物组织细胞的生长,还需要通过试验做进一步调节,但通过我们建立的体系可以将外源基因导入到桉树中。

致谢: 本项目在研究过程中得到北京大学生命科学学院林忠平教授帮助与指导,特此致谢!

参考文献:

- [1] 鄢继文. 从福建桉树造林热探讨林业的可持续发展[J]. 武夷科学, 2005, 169-173.
- [2] 林顺德, 林朝晖, 林国金, 等. 桉树无性系抗旱及抗病能力的调查初报[J]. 福建林业科技, 2003, 30(4): 46-54.
- [3] 卜朝阳. 桉树再生系统的研究[J]. 西南农业学报, 2004, 17(4): 500-503.
- [4] 王笑春, 李峰, 蒋湘宁. 桉树组织培养与再生系统建立研究[J]. 河北建筑科技学院学报, 2006, 23(2): 71-74.
- [5] 谭德冠, 庄南生, 黄华孙. 刚果12号桉愈伤组织的诱导与再生植株快繁系统的构建[J]. 热带作物学报, 2005, 26(3): 24-28.
- [6] 蔡玲, 王以红, 吴幼娟, 等. 巨尾桉的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(4): 488.
- [7] 陈碧华, 李乾振. 巨桉组织培养及工厂化育苗技术的研究[J]. 福建林业科技, 2006, 33(1): 61-63.
- [8] 陈江平. 不同植物生长素对桉树不同无性系组培生根影响的试验[J]. 广西林业科学, 2003, 32(1): 50-55.
- [9] 邵志芳, 陈伟元, 罗焕亮, 等. 柞蚕抗菌肽D基因转化桉树培育抗青枯病株系的研究[J]. 林业科学, 2002, 38(12): 92-97.
- [10] 郑美珠. 桉树焦枯病发病规律的研究[J]. 福建林学院学报, 2006, 26(4): 339-343.
- [11] Chen C H, Lin H J, Feng T Y. An amphipathic protein from sweet pepper can dissociate hrap in Pss multimeric forms and intensify the hrap in Pss mediated hypersensitive response[J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1998, 52: 139-149.
- [12] Ger M J, Chen C H, Hwang S Y, et al. Constitutive expression of hrap gene in transgenic tobacco plant enhances resistance against virulent bacterial pathogens by induction of a hypersensitive response[J]. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 2002, 15(8): 764-773.
- [13] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 795-797.
- [14] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002: 487-512.