

## 中国樱桃品种“对樱”再生体系的优化和转基因初探

赵玉辉<sup>1,3</sup> 郭印山<sup>1</sup> 周宇<sup>2</sup> 张开春<sup>2,\*</sup> 李作轩<sup>1</sup> 王力华<sup>3</sup>

<sup>1</sup>沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110061; <sup>2</sup>北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093; <sup>3</sup>中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016

**摘要** 优化了中国樱桃品种“对樱”不定根离体再生体系, 用农杆菌介导法, 将抗菌肽B基因导入“对樱”, 通过抗性筛选获得了44株抗性转化植株。PCR检测有9株为阳性, 初步说明抗菌肽基因已整合到“对樱”基因组中。

**关键词** 中国樱桃; 抗菌肽; 转基因

## Preliminary Study on the Optimization of Regeneration and Genetic Transformation of Chinese Cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl. cv. Duiying)

ZHAO Yu-Hui<sup>1,3</sup>, GUO Yin-Shan<sup>1</sup>, ZHOU Yu<sup>2</sup>, ZHANG Kai-Chun<sup>2,\*</sup>, LI Zuo-Xuan<sup>1</sup>, WANG Li-Hua<sup>3</sup>

<sup>1</sup>College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110061, China; <sup>2</sup>Institute of Forestry & Pomology, Beijing Academy of Agriculture & Forestry Sciences, Beijing 100093, China; <sup>3</sup>Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China

**Abstract** The system of regeneration *in vitro* from adventitious roots in Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl. cv. Duiying) was optimized. The antibacterial peptide B gene was transformed to cherry with *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system. The 44 plants regenerated which had resistance to Gent were detected by PCR, and 9 plants were positive. It indicated that the antibacterial peptide gene had been integrated into the genome of cherry.

**Key words** Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl. cv. Duiying); antibacterial peptide; genetic transformation

中国樱桃品种“对樱”(*Prunus pseudocerasus* Lindl. cv. Duiying)是北京地区的半野生种, 综合性状优良<sup>[1,2]</sup>, 可作为甜樱桃的砧木和育种材料。樱桃根癌病危害严重, 抗菌肽基因可提高樱桃砧木的抗菌能力<sup>[3]</sup>。我们已建立了“对樱”不定根的离体再生体系<sup>[4]</sup>, 本文对此再生系统又进行了优化, 并进行了抗菌肽B基因的转化, 以期能获得对根癌病有高抗的樱桃砧木抗性种质。

### 材料与方法

中国樱桃品种“对樱”(*Prunus pseudocerasus* Lindl. cv. Duiying)试管苗以F14附加6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>、IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>、GA<sub>3</sub> 0.2 mg·L<sup>-1</sup>的培养基培养, 每3周继代1次; 取生长健壮的茎接种于F14附加IBA 0.02 mg·L<sup>-1</sup>、NAA 0.02 mg·L<sup>-1</sup>的生根培养基上培养, 以完整的根系为外植体。体细胞胚的诱导以MS为基本培养基, 附加蔗糖40 g·L<sup>-1</sup>, 生长调节物质为2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2, 4-D和0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA,

连续光照, 光强36.36 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。

所用基因工程农杆菌菌系为GV3101, 携带pPZP质粒, 该质粒携带有北京农业科学院林业果树研究所合成的长130 bp的抗菌肽B基因, 启动子为损伤诱导型启动子——马铃薯蛋白酶抑制剂II的启动子, 植物选择标记为Gent基因(抗庆大霉素)。农杆菌划线培养于YEB固体培养基中, 转化前挑取单菌落, 接种于YEB液体培养基上, 于27℃下振荡培养, OD值达0.5, 浸染外植体时加入乙酰丁香酮(AS)使其终浓度达到100 μmol·L<sup>-1</sup>。取已剪好的整体根, 放入农杆菌菌液中浸染5 min, 用无菌滤纸吸干表面多余菌液, 于愈伤诱导培养基(MS+2, 4-D 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>)中共培养3 d后, 将外植体在无菌水中清洗3次,

收稿 2005-04-19 修定 2005-10-24

资助 北京市自然科学基金重点项目(6041002)。

\*通讯作者(E-mail: zhangkaichun@baafs.net.cn, Tel: 010-82596007)。

再置于选择培养基MS+2, 4-D 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+庆大霉素(Gent) 60 mg·L<sup>-1</sup>+头孢霉素(Cef) 200 mg·L<sup>-1</sup>上进行培养。

分别取转化植株和非转化植株叶片, 采用CTAB法<sup>[5]</sup>提取总DNA。根据抗菌肽B基因的序列设计引物, PCR检测扩增引物BFP58: 5' ATGAA-ATGGAAAGTCTTCAAGAAAATTG 3' 及BFP59: 5' TTATTATCCTAGCGCTTTGGCTTC 3'。PCR反应条件为: 95℃ 4 min; 95℃ 45 s, 58℃ 1 min, 72℃ 45 s, 39个循环; 72℃延伸5 min。阳性对照为pPZP质粒, 阴性对照为未转基因的植株。

## 结果与讨论

### 1 体细胞胚再生体系的优化及发生过程

以“对樱”无菌生根苗的整体根作为外植体, 基本培养基为MS, 附加蔗糖40 g·L<sup>-1</sup>, 生长调节物质为2.0 mg·L<sup>-1</sup>2, 4-D、0.5 mg·L<sup>-1</sup>6-BA, 连续光照(表1), 光强36.36 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 培养10 d左右, 根上诱导出成串红色愈伤组织(图1-a); 20 d左右, 愈伤组织分化出根、芽两极的体细胞胚(图1-b、c)。体胚形成过程为先发出根, 随后芽萌发。将再生苗从母体上小心分离, 转到继

代培养基上, 诱导的体细胞胚再生植株生长正常(图1-d)。

### 2 “对樱”不定根再生抗性芽的筛选及转化植株的获得

用根癌农杆菌侵染不定根, 然后放在选择培养基上进行愈伤组织的诱导和体胚的分化, 10 d左右, 根上诱导出成串的红色愈伤组织, 20 d左右, 愈伤组织开始分化出体细胞胚, 从6个整体根系上共得到132株再生植株, 小心分离体细胞胚于含60 mg·L<sup>-1</sup>的庆大霉素的继代筛选培养基中继续培养。继代筛选2~3次。

### 3 PCR检测结果

挑选44株抗性状态好的转化植株, 分别进行PCR检测。结果显示, 其中9株转化植株有与阳性对照相同的约130 bp的特异扩增带, 与抗菌肽基因的外源片段大小相符, 而非转基因对照植株中未见相应扩增带(图2), 初步说明抗菌肽基因已经整合到“对樱”基因组中。

根据以上结果可以得到如下几点印象:

(1) 本实验对蔗糖浓度(附加高糖40 g·L<sup>-1</sup>)及培养条件(连续光照)进行了调整。适当高浓度的蔗糖可以提高体细胞胚的诱导率<sup>[6]</sup>, 高浓度蔗糖可

表1 不同培养条件下“对樱”整体根的再生

Table 1 Regeneration of intact root system of Chinese cherry 'Duiying' in different conditions of tissue culture

培养条件		胚性愈伤组织的形成	体细胞胚的诱导
蔗糖浓度/g·L <sup>-1</sup>	光照		
20	16 h光周期	可产生大量浅红色的胚性愈伤组织, 继续培养, 愈伤组织转为浅绿色	体细胞胚(54.5%), 不定芽(45.5%)
40	连续光照	可诱导大量红色或深红色的胚性愈伤组织, 直到分化出体细胞胚, 红色也不消失	体细胞胚(100%), 没有不定芽的发生

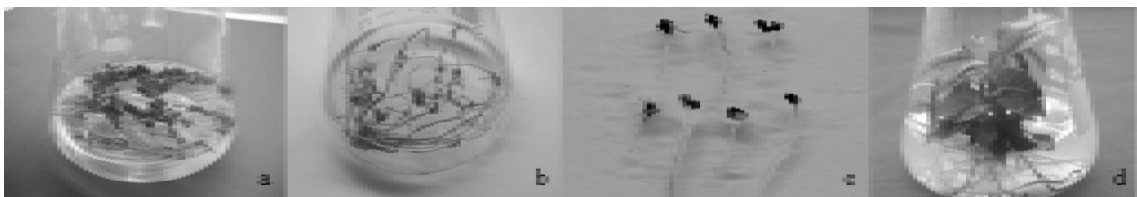


图1 “对樱”整体根再生体细胞胚

Fig. 1 Somatic embryos regeneration from *in vitro* intact root systems of Chinese cherry 'Duiying'

a: 诱导出的愈伤组织; b: 愈伤组织分化的体细胞胚; c: 体细胞胚; d: 具有根芽两极的体细胞胚转基因植株。

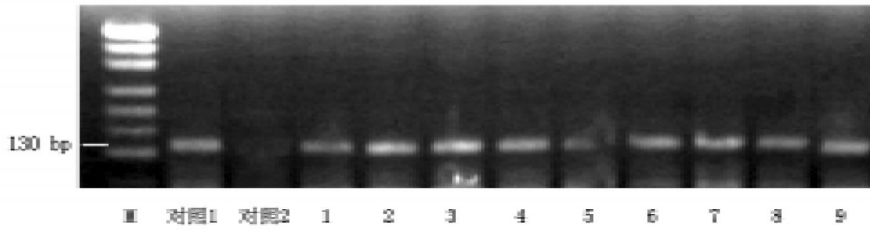


图2 PCR检测结果

Fig. 2 The results of detection by PCR

对照 1: 质粒 DNA; 对照 2: 未转基因苗; 1~9: 转基因苗。

提高培养基的渗透压, 减少细胞内的水分, 细胞内含物增加, 有利于体胚的发育。体胚发生对光/暗周期的要求因植物种类而异<sup>[7]</sup>。本文发现连续光照可促进“对樱”体胚的发生, 无不良影响。高浓度糖和光照可促进花色素的合成<sup>[8]</sup>。

(2) 体细胞胚是由卵细胞特性的胚性细胞发育而来。这些胚性细胞具有很强的接受外源 DNA 的能力, 是理想的基因转化感受态细胞; 而且胚性细胞繁殖量大, 同步性好, 转化后的胚性细胞即可发育成转基因的胚状体及完整的植株。许多研究表明, 胚状体的发生多数是单细胞起源, 转化获得的转基因植株嵌合体少, 可以克服诱导形成的愈伤组织再分化不定芽途径所产生的弊端。

### 参考文献

- 1 陈君帆, 李青, 孙钊. 中国樱桃半野生种对樱桃的茎尖培养. 园艺学报, 2003, 30(3): 317~318
- 2 曲泽洲主编. 北京果树志. 北京: 北京出版社, 1990. 450
- 3 方宏筠, 王关林, 王火旭等. 抗菌肽基因转化樱桃矮化砧木获得抗根瘤病的转基因植株. 植物学报, 1999, 41(11): 1192~1198
- 4 阎国华, 张开春, 周宇等. 中国樱桃“对樱桃”不定根离体再生植株研究. 园艺学报, 2003, 30(5): 583~585
- 5 王关林, 方宏筠主编. 植物基因工程. 北京: 科学出版社, 2002. 744
- 6 袁澍, 贾勇炯, 林宏辉. 诱导植物体细胞胚发生的几个生理因素. 植物生理学通讯, 2003, 39(5): 508~512
- 7 王进茂, 杨敏生, 杨文利等. 我国木本植物体细胞胚胎发生研究进展. 河北林果研究, 2004, 19(3): 295~301
- 8 张学英, 张上隆, 骆军等. 果实花色素苷合成研究进展. 果树学报, 2004, 21(5): 456~460