

根癌土壤杆菌介导的咖啡转化

冯勤·杨美珠 郑学勤·曾宪松·潘乃穰 陈章良**

(北京大学蛋白质工程和植物基因工程国家重点实验室, 北京)

用五种不同的根癌土壤杆菌转化咖啡栽培品种小粒种的成熟胚培养物, 筛选出对咖啡侵染力较强的菌株GV3111(pTiB6S3)和A281(pTiB0542)。在无激素的MS培养基(MSD)上得到淡黄色、松脆、生长迅速的瘤性愈伤组织, 继代培养4—6周后, 产生大量的畸胎芽。转化体经Opine检测, 分别含有特异的章鱼碱或农杆菌碱。GV3111转化体的DNA分子杂交结果表明, 在咖啡的基因组内有T-DNA的插入。用带有GUS基因和NPTⅡ基因的双元载体系统pBI121/GV3111和pBI121/A281转化咖啡子叶, 转化后第三天可以检测到GUS基因的瞬时表达。在含卡那霉素(Kanamycin, Km)的MS选择培养基上, 得到抗性愈伤组织, 这些愈伤组织仍能检测到GUS基因的表达。

关键词 咖啡转化; 根癌土壤杆菌; GUS基因。

咖啡是世界三大饮料之一, 而且在产量、消费量和产值方面均居三大饮料之首, 全世界约有七十多个国家种植咖啡。多年来, 咖啡育种学家致力于品种的品质改良及其抗病毒病、真菌病等方面的育种研究, 遗传工程技术的应用为咖啡的育种开辟了广阔的前景。

在高等植物的遗传转化研究中, 应用得最广泛的是通过根癌土壤杆菌介导的基因转移系统^[1,2], 这是通过根癌土壤杆菌所携带的Ti质粒上的T-DNA整合到宿主细胞染色体而实现的。利用Ti质粒作为外源基因载体, 在双子叶植物中已有不少成功的报道^[2-5], 但是利用木本植物作为转化受体, 获得转化植株却仅有少数几种植物^[7-9]。咖啡是多年生常绿灌木或小乔木, 有关咖啡的遗传转化, 迄今尚未见报道。我们用五种野生的根癌土壤杆菌转化了咖啡小粒种, 选出了对咖啡侵染力强的菌株, 并将双元载体PBI121导入选出的菌株, 建立了咖啡的遗传转化系统, 为今后将目的基因导入咖啡打下了基础,

同时为咖啡的育种提供了一条新的途径。

材料与方 法

(一) 植物材料培养

栽培品种小粒种咖啡(*Coffea arabica* L.)种子取自华南热带作物研究院细胞楼试验地。将种子坚硬的外种皮剥去, 用常规方法表面消毒, 无菌水浸泡36h, 使包于种胚外的胚乳变软。用解剖刀取出种胚, 接种于MS^[10]+2.0mg/L BA+0.2mg/L IAA培养基上, 28℃光下培养15天左右的幼小胚苗的下胚轴及子叶作为转化外植体用。

(二) 菌株及培养

本研究所使用的菌株及其相应的特性如表1。选用五种野生型根癌土壤杆菌, 测试咖啡的敏感性, 从中选出对咖啡侵染力强的菌株。用三亲交配法^[11]将双元载

本文于1991年1月24日收到。

* 海南省华南热带作物学院生物技术实验室。

** 北京大学生物系。

体PBI121引进选出的菌株。

表 1 本研究所用菌株及其相应特性

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this work and their relevant characteristic

Strain	Relevant plasmid	Binary vector	Type of opine ^a	Marker gene ^b
A281	pTiBo542	—	AGR	None
A208	pTiT37	—	NOP	None
C58	pTiC58	—	NOP	None
GV3111	pTiB6S3	—	OCT	None
A348	pTiA6	—	OCT	None
PBI121/A281	pTiBo542	PBI121	AGR	NPT ^{II} , GUS
PBI121/GV3111	pTiB6S3	PBI121	OCT	NPT ^{II} , GUS

a. AGR: 农杆菌 Agropine; OCT: 章鱼碱 Octopine; NOP: 胭脂碱 Nopaline b. NPT^{II}: 新霉素磷酸转移酶 Neomycin phosphotransferase GUS: β -葡萄糖苷酶 β -Glucuronidase

挑取单个菌落, 五种野生型根癌土壤杆菌分别放入不加任何抗生素的 LB (pH 7.5) 液体培养基中, 带有 PBI121 的菌株则放入 LB + 25.0mg/L Km. 的液体培养基中, 振荡培养 (200rpm, 28°C) 到细菌的对数生长期 ($OD_{600} = 0.6-1.0$), 菌液离心后用 1/2 MS 液体培养基重悬, 作为转化菌液。

(三) 外植体的转化

从无菌幼小的胚苗上切下子叶和下胚轴, 投入准备好的菌液, 3—5 min 后, 倒去菌液, 用滤纸吸干外植体表面的菌液, 转移到表面铺有一层滤纸的 MS 固体培养基上, 于 28°C 共培养 2—3 天后, 转移到 MS + 500mg/L 羧苄青霉素 (Carbini-cillin, Carb.) 的无激素培养基上。用 PBI 121/GV3111 和 PBI121/A281 侵染的外植体共培养后, 转移到 MS + 500mg/L Carb + 100mg/L Km. 选择培养基上, 培养条件为 28°C, 暗培养。

(四) 转化体的检测

1. Opine 检测: 所用方法为纸电泳法^[12], 电泳完成后, 将电泳纸取出风

干; 章鱼碱用 80% 的乙醇配制的 0.02% 菲醌和 2% 的氢氧化钠进行染色检测; 农杆菌的检测按照 Ellis 等人^[13]介绍的方法, 将已风干的电泳纸浸在丙酮配制的 0.2% 硝酸银溶液中 1 min, 风干, 转移到甲醇配制的 1% NaOH 溶液中 2—3 min, 最后用 5% 的硫代硫酸钠溶液固定。

2. DNA 分子杂交——Southern blot: 取未转化正常试管苗叶片和经 GV 3111 转化生成的瘤性愈伤和畸胎芽, 分别提取总 DNA^[14], 用限制酶 BamHI 进行酶切, 在 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳, 将酶切的 DNA 分开, 按照《Molecular Cloning》上的方法进行 Southern 转移和杂交^[15]。杂交所用探针是中间载体 C024 的 BamHI 5.0kb 片段, 该片段包含有与 GV3111 菌株同源的一段序列^[16]。探针标记用“Nick-translation”法^[17]。

3. GUS 基因表达检测: 转化的叶片用徒手切片, 愈伤组织则直接取样浸入事先配好的 GUS 基因反应底物 X-Gluc 溶液中, 于 37°C 保温 3h 或更长。底物溶液配制参照 Jefferson 等人的组织化学染色法^[18]。

实 验 结 果

(一) 外植体的转化

咖啡幼小胚苗的子叶和下胚轴用五种不同的根癌土壤杆菌侵染, 共培养 3 天后, 转移到含羧苄青霉素的 MS 培养基上, 培养 3 周后, GV3111 和 A281 转化的外植体在伤口处开始有愈伤组织的产生。将愈伤组织转移到新鲜的 MSO 培养基上, 2 周就能增殖一倍, 愈伤组织呈淡黄色、松脆 (图版 I—1)。继代培养 2—3 代后, 从这些瘤性愈伤组织上出现许多绿色芽点, 这些芽点继续生长, 发育成许多畸胎小芽

(图版 I—2)。小芽在 MS 培养基上不再进一步生长, 转移到添加适当外源植物激素的培养基上, 能进一步生长, 但未能诱导生根。这种畸胎芽呈簇生状, 叶裂似掌状复叶(图版 I—3a), 完全不同于正常生长的咖啡苗(图版 I—3b)。经 A208, C58 和 A348 转化的外植体, 2 周后逐渐变黄, 最后变为褐色死去。

经 pBI121/GV3111 和 pBI121/A281 侵染的外植体共培养 2—3 天后, 伤口周围的叶切片与 GUS 基因的底物 X-Gluc 溶液保温后, 观察到 GUS 基因的瞬时表达(图版 I—4)。在含卡那霉素的培养基上培养 3 周的转化外植体, 切口边缘有愈伤组织形成, 而未经转化的对照子叶, 在含卡那霉素的培养基上则逐渐变黄。抗性愈伤组织也检测到 GUS 基因的表达(图版 I—5), 在 GUS 基因表达的部位显示出深蓝色。

实验中发现, 菌株的生长状态及转化受体的生理状况与咖啡的转化频率密切相关, 对数生长期($OD_{600} = 0.6—1.0$)的菌液及萌发 2 周的胚苗对转化较为适宜。

(二) 转化体的鉴定

Opine 检测: 用正常的未经转化的试管苗作为对照, 分别取 GV3111 和 A281 转化形成的畸胎芽, 测定结果表明, 未经转化的试管苗没有相应的冠瘿碱合成(图版 I—6c, 图版 I—7a、d)、而在畸胎芽中则含有章鱼碱(图版 I—6 中 b、d、e、f) 或农杆菌(图版 I—7 中 b、c、e)。

Southern 分子杂交: 用中间载体 Co24 的 BamHI 5.0kb 片段作探针与 GV3111 转化的瘤性愈伤组织及畸胎芽的 DNA 杂交, 杂交结果表明, 未转化的咖啡苗的 DNA 没有杂交带(图版 I—8 中 c) 而转化体瘤性愈伤和畸胎芽的 DNA 都在 3.0kb 处有一条杂交带(图版 I—8 中 a、b、d、e)。

A281 转化的材料, 由于没有找到合适的探针, 所以未能作 Southern 杂交检测。

讨 论

自 Staritsky 开创咖啡组织培养, 用主轴芽成功地诱导产生了体细胞胚和再生植株之后, 又有人用成熟的叶片^[18,20]、下胚轴^[21]、果皮、胚乳和茎切片等多种外植体培养, 均可以诱导产生高频率的体细胞胚, 但是, 体细胞胚发生时间都较长(2—3 个月), 而且绝大多数的体细胞胚发育不正常^[22], 再生植株的频率也较低。这些因素都在一定程度上影响了咖啡的遗传转化, 由于野生型根癌土壤杆菌的转化组织具有激素自主性, 可以在无激素的培养基上产生肿瘤愈伤, 所以我们选用野生的根癌土壤杆菌转化咖啡, 以利于尽快地了解根癌土壤杆菌转化咖啡的可能性。

Ti 质粒的 T 区实验表明^[23], T 区 DNA 上主要有两类功能基因, 冠瘿碱合成酶的基因及其与肿瘤形态建成有关的基因, 这类基因控制形成两种形态的肿瘤, 一是无组织的肿瘤, 在无激素培养基上可无限生长但不分化; 二是畸胎瘤, 可分化形成畸形芽, 在无激素培养基上不断增殖, 但无顶端优势且难以生根。转化组织的植物激素自主性生长是 T-DNA 上编码生长素和细胞分裂素合成酶基因在转化组织中表达的结果^[24,25]。当两类致瘤基因(tms 或 tmr)同时存在于转化组织中, 就会导致转化组织形成大量快速增殖的瘤性细胞^[26]。

我们用未经改建的根癌土壤杆菌 GV3111 和 A281 菌株转化咖啡, 在无激素的 MS 培养基上获得了大量的, 增殖迅速的

瘤性愈伤组织, 以及由这些愈伤组织分化形成的大量畸胎芽, 这些芽在生根培养基上未能诱导生根。这与 Holbrook 等^[27]用不同野生型根癌土壤杆菌转化多个白菜品种的结果是一致的。

为了进一步证明 T-DNA 已经整合进咖啡的基因组, 进行了 Southern 分子杂交, 实验结果表明, 转化体 DNA 内具有相应的 DNA 杂交带。Opine 检测结果表明, 转化体内含有特异的冠瘿碱。

参 考 文 献

- [1] Uchimiya, T. et al.: *Journal of Biotechnology*, 12: 1—20, 1989.
- [2] Fraley, R. et al.: *Rev. Plant Sci.*, 4: 1—46, 1986.
- [3] Mc Cormick, S. et al.: *Plant Cell Rep.*, 5: 81—84, 1986.
- [4] Shahin, E. A. et al.: *Hortscience*, 21: 1199—1201, 1986.
- [5] Shahin, E. A. et al.: *Crop Science*, 26: 1235—1239, 1986.
- [6] Firoozabady, E. et al.: *Plant Molecular Biology*, 10: 105—116, 1987.
- [7] 王善平等: *植物学报*, 32(3): 172—177, 1980.
- [8] Dandekar, A. et al.: *Bio/Technology*, 5: 587—590, 1987.
- [9] Fillatti, J. J. et al.: *MGG*, 206: 192—199, 1987.
- [10] Murashige, T. et al.: *Physiol. Plant*, 15: 473—497, 1962.
- [11] Nishiguchi, R. et al.: *MGG*, 206: 1—8, 1987.
- [12] Otten, L. A. B. M. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 527: 497—500, 1978.
- [13] Ellis, D. et al.: *Plant Cell Rep.*, 8: 16—20, 1989.
- [14] Pan, Z. Q. et al.: *Ch. J. of Bot.*, 1(1): 18—24, 1989.
- [15] Maniatis, T. et al.: In: "Molecular Cloning", A Laboratory Manual, ed. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., Cold Spring Harbor, New York, P. 383—389, 1982.
- [16] Fraley, R. T. et al.: *Bio/Technology*, 6(3): 629—635, 1985.
- [17] Davis, L. G. et al.: In: "Basic Methods in Molecular Biology." Elsevier Science Publishing Co. New York, P. 80—83, 1986.
- [18] Jefferson, R. A. et al.: *The EMBO Journal*, 6(13): 3901—3907, 1987.
- [19] Sondahl, M. R. et al.: In: "Tissue Culture in forestry and Agriculture.", ed. Henke, R. R., Hughes, K. W., Constantin, M. J. and Hollaender, A., Plenum, New York, P. 215—232, 1985.
- [20] Takeshi, Yasuda, et al.: *Plant Cell Physiol.*, 26(3): 595—597, 1987.
- [21] 颜昌敬, 译编: *国外作物组织培养*, 23: 80—99, 1987.
- [22] Hersman, E. B. et al.: *Hortscience*, 10(6): 128—132, 1975.
- [23] Nester, E. W.: *遗传*, 11(5): 40—42, 1989.
- [24] Garfinkel, D. I. et al.: *Cell*, 27: 143—153, 1981.
- [25] Nakajima, H. et al.: *Plant Cell Physiol.*, 22: 1405—1410, 1981.
- [26] Chilton, M. P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, 77: 4060—4064, 1980.
- [27] Holbrook, L. A. et al.: *Plant Cell Rep.*, 4: 329—332, 1985.

***Agrobacterium* Mediated Transformation of Coffee (*Coffea arabica* L.)**

Feng Qin* Yang Meizhu Zheng Xueqin* Zhen Xianshong*

Pan Naisui Chen Zhangliang**

(National Lab. for Protein Engineering and Plant Genetic Engineering,
Peking University, Beijing)

We have transformed embryo-derived culture of coffee cultivars (*Coffea arabica* L.) using five different *Agrobacterium tumefaciens*. Two kinds of strain GV3111 (pTiB6S3) and A281 (pTiBo542) have been screened out in regard to their high infection capacity. Lightyellow, fragil and fast grow of tumorigenic callus was formed on the hormone-free MS medium. A mass of teratoma-like shoots developed from the tumorigenic callus after subculture 4—6 weeks on hormone-free medium. Opine detection showed all teratoma-like shoots presented specific octopine or agropine. Southern hybridization of DNA from transgenic tissue of strain GV3111 confirmed the presence of DNA fragments containing TDNA sequence in the coffee genome. Coffee cotyledons was transformed using binary vector system of PBI121/GV3111 and PBI121/A281, which containing GUS gene and NPTII gene. Three days after transformation, the transient expression of GUS gene was detected. The kanamycin-resistant callus have been obtained on the medium of MS+100mg/l km, and the expression of GUS gene was also detected.

Key words

Coffee transformation; *Agrobacterium tumefaciens*; GUS gene

* Lab for Tropical Biotechnology, South China College of Tropical Crops, Hainan 571737

**Communication address, Dept. of Biology, Peking University, Beijing 100871

图 版 说 明

Explanation of plate

1. 咖啡外植体经根瘤农杆菌GV3111或A281感染培养后, 在无激素的MS培养基上形成瘤性愈伤组织。
After inoculation with *A. tumefaciens* GV3111 or A281, coffee explants formed tumor-igenic callus on hormone-free MS medium
2. 继代培养4—6周后, 瘤性愈伤组织在无激素的MS培养基上分化出大量畸胎小芽。
A mass of teratoma-like shoots occurred from the tumorigenic callus subcultured 4—6 weeks on the hormone free MS medium
- 3a: 在添加适当外源植物激素培养基上生长的畸型芽
Teratoma shoot cultured on the medium supplemented with appropriate phytohormone
- 3b: 成熟胚培养的正常小植株
Normal coffee plantlet from mature embryos
4. GUS基因在转化的子叶切片中的瞬时表达
Transient expression of GUS gene in the transformed cotyledon
5. 抗性愈伤组织中GUS基因的表达
Expression of GUS gene in callus of kanamycin-resistant
6. GV3111转化体的章鱼碱测定
Detection of octopine synthase activities of teratoma shoots transformed by GV3111 strain. a: Standard octopine and arginine sample; b, d, e, f: Transformed shoots; c: Untransformed shoot (control)
7. A281转化体的农杆菌测定
Detection of agropine synthase activities of teratoma transformed by A281. a, d: Unt-transformed shoot (control); b, c, e: Transformed shoot
8. GV3111转化体Southern杂交结果
The result of Southern hybridization of transformant by GV3111 strain, transformant DNA was digested with BamHI, analysed on 0.8% agarose gel and transferred to nitrocellulose filter, and was hybridized with a 5.0 kb fragment of Co24 that homologous to a region of pTiBsS3. a, b: DNA from the teratomas shoot; c: DNA from the leave of untransformed plant; d, e: DNA from tumorigenic callus

冯 勤等：根癌土壤杆菌介导的咖啡转化

图版 I

Feng Qin et al., *Agrobacterium* mediated transformation of
Coffee (*Coffea arabica* L)

Plate I

