

转 *roIC* 基因八棱海棠组培苗生物学特性的研究

丛 郁, 孙爱君, 姚泉洪, 章 镇

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要: 【目的】通过研究转 *roIC* 基因八棱海棠不同株系的转基因拷贝数, 在转录水平上的表达丰度, 以及转基因组培苗的生物学特性, 为进一步深入阐明 *roIC* 基因在八棱海棠中的表达机制和培育优良的苹果砧木奠定理论基础。【方法】以通过 *gus* 染色和 PCR 检测的 3 个转 *roIC* 基因八棱海棠株系组培苗为试材。Southern 杂交鉴定 *roIC* 基因整合拷贝数。Northern 杂交鉴定 *roIC* 基因在转录水平上的表达丰度。调查转基因植株组培苗在含有不同种类和浓度的植物生长调节剂的培养基上茎段增殖、叶片再生、生根能力等生物学特性; 将生根后的组培苗进行炼苗, 移入温室 4 个月后, 研究株高、节间数、节间长度、叶面积等生物学特性。【结果】Southern 杂交结果表明, *roIC* 基因分别整合进入 3 个八棱海棠株系基因组, 其中株系 20a 和 33a 分别获得了 1 个 *roIC* 基因拷贝, 株系 20b 获得了 2 个 *roIC* 基因拷贝。Northern 杂交结果表明, 3 个转基因株系中的 *roIC* 基因均在转录水平上得到了表达, 且该基因在单拷贝株系的表达丰度高于双拷贝株系。转基因组培苗生物学特性研究结果表明: (1) 3 个转 *roIC* 基因八棱海棠株系茎段增殖系数、叶片再生率、生根所需外源激素浓度均显著低于对照植株, 单拷贝株系的以上指标亦显著低于双拷贝株系。(2) 3 个转基因八棱海棠株系组培苗平均生根数显著高于转基因株系, 双拷贝株系显著低于单拷贝株系; 根长情况正好相反; 对照植株根粗和转基因株系根粗之间均无显著差异。(3) 3 个转基因八棱海棠株系的株高、节间长度、节间数、叶面积均显著小于对照植株。其中单拷贝株系显著小于双拷贝株系。【结论】*roIC* 基因整合进入 3 个八棱海棠转基因株系基因组, 并分别在转录水平上得到表达。外源 *roIC* 基因的表达导致转基因植株体内内源激素含量和植株形态学的改变, 且 *roIC* 基因的整合拷贝数对它的表达有一定的影响。

关键词: 八棱海棠 (*Malus robusta* Rehd.); *roIC* 基因; 拷贝数; 组培苗; 生物学特性

Study on the Biology Characteristics of *roIC*-Transgenic *Malus robusta* Rehd. *in vitro*

CONG Yu, SUN Ai-jun, YAO Quan-hong, ZHANG Zhen

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: 【Objective】The purpose of this research was to investigate the copy numbers, expression quantities at transcription level and biology of *roIC* gene in transgenic *Malus robusta* Rehd. The study also aimed to provide basic information for investigating the expression of *roIC* gene in genome of *Malus robusta* Rehd and breeding excellent apple rootstocks. 【Method】Three clones of *roIC*-transgenic *Malus robusta* Rehd., which have been firstly screened through the *gus* and PCR tests, were selected for further investigation. Molecular hybridizations were made to identify *roIC* gene integrated copy numbers and expression quantities at the transcription level in *Malus robusta* Rehd. The biology of transgenic *Malus robusta* Rehd, such as shoots proliferation, leaf differentiation and rooting abilities, were surveyed. Other characteristics of transgenic *Malus robusta* Rehd, such as plantlet height, nodes number, the length of internodes and leaf area, were researched after they grew in a greenhouse for 4 months. 【Result】Southern hybridization demonstrated that *roIC* gene had been integrated in the genome of three clones of *roIC*-transgenic *Malus robusta* Rehd. Two of these transformants had a single copy and one had double copies of the integrated *roIC* gene. Northern

收稿日期: 2005-10-30; 接受日期: 2006-05-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370987) 和江苏省科技研究资助项目 (BJ2003309)

作者简介: 丛郁 (1978-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 博士, 研究方向为果树基因工程。Tel: 025-81581961; E-mail: congyu780903@163.com。通讯作者
章镇 (1947-), 男, 江苏镇江人, 教授, 研究方向为果树分子生物学。Tel: 025-84396792; E-mail: zhangzhen_nj@hotmail.com

hybridization showed that the expressions of *rolC* gene in transgenic clones were influenced via different integrated copy numbers. At the transcription level, its expression quantity in the clone with double *rolC* copies was less than that of other two clones with a single *rolC* copy number. Studies revealed that: (1) The rates of shoots propagation, rooting and leaves regeneration of all three *rolC*-transgenic *Malus robusta* Rehd. clones were lower than that of the non-transgenic plantlet at significant level. And these indexes of clones with one *rolC* gene copy were significantly lower than that of the clone with two *rolC* gene copies. (2) The root numbers of these three *rolC*-transgenic *Malus robusta* Rehd clones were more than that of the non-transgenic plantlet at significant level. Among transformants, the data showed that clones with one *rolC* gene copy were significant larger than that of the clone with two *rolC* gene copies. The root length of the non-transgenic is significant longer than that of three transformants. This length of one *rolC* gene copy clones is significant shorter than that of two *rolC* gene copies clone. The root diameter had no difference between the non-transgenic plantlet and the transgenic clones. (3) All three *rolC*-transgenic *Malus robusta* Rehd clones display the obvious characteristic of *rolC* phenotype, such as dwarf shoot, shorter internodes, smaller leave area, plantlet shorter than non-transgenic clones. And the clones carrying one *rolC* gene copy were significant shorter than the clone with two *rolC* gene copies. 【Conclusion】The *rolC* gene has been integrated into the genome of *Malus robusta* Rehd. It was expressed at the level of transcription. The expression of exogenous *rolC* gene changes endogenous hormone contents and morphology of transgenic *Malus robusta* Rehd. The integrated copy number of *rolC* gene played an important role at the expression of *rolC* gene in transgenic clones.

Key words: *Malus robusta* Rehd; *rolC* gene; Integrated copy number; Transgenic plant *in vitro*; Biologic characteristic

0 引言

【本研究的重要意义】八棱海棠 (*Malus robusta* Rehd.) 原产于中国华北地区, 为小乔木, 树势强健, 具有一定的抗逆性, 是中国苹果的主要砧木之一^[1]。但是乔化砧木不能满足现代化果树矮化密植生产的要求。南京农业大学果树生物技术组用农杆菌介导法将 *rolC* 基因导入八棱海棠基因组并通过 *gus* 染色检测和 PCR 检测, 初步证明 *rolC* 基因已成功导入八棱海棠基因组^[2]。【前人研究进展】*rolC* 基因来源于发根农杆菌 Ri 质粒, 具有导致植株矮化、节的数量减少、节间长度缩短、侧枝增多、生根能力增强、花变小、花粉量减少, 雄性不育等作用, 是对某些植物性状进行改良的重要基因, 在分别以马铃薯^[3]、烟草^[4]、梨^[5]、玫瑰砧木^[6]为受体进行 *rolC* 基因的研究中已有成功转化报道。【本研究的切入点】虽然已经初步证明 *rolC* 基因整合进入八棱海棠基因组, 但是关于 *rolC* 基因在八棱海棠植株内的表达情况以及 *rolC* 基因对八棱海棠生物学特性的影响情况尚未清楚。【拟解决的关键问题】本文选取 3 个转 *rolC* 基因的八棱海棠株系, 从 *rolC* 基因整合拷贝数、转录后的表达情况以及转基因株系组培苗的生物学特性等几个方面进行研究, 从而为选育优良的苹果矮化砧木提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

选取 *gus* 染色和 PCR 检测呈阳性的 3 个转 *rolC*

基因八棱海棠株系: 20 a、20 b、33 a 和未转基因的八棱海棠为试验材料, 在 MS+0.5 mg·L⁻¹ BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA(转 *rolC* 基因株系附加 50 mg·L⁻¹ Km)培养基上, 1 500 lx, 14 h 光照培养条件下保存试材。

1.2 试剂

Southern 杂交和 Northern 杂交所用 Dig DNA Labeling and Detection Kit I 试剂盒以及探针回收试剂盒均购于 Roche 公司; 内切酶 *EcoR* I 和 *Hind*III 购于南京博飞生物试剂公司。

1.3 转 *rolC* 基因八棱海棠的分子杂交检测

1.3.1 八棱海棠基因组 DNA 和总 RNA 的提取 参考张智俊^[7]的方法, 稍加修改, 从 1 份八棱海棠叶片材料中同时提取基因组 DNA 和总 RNA。

1.3.2 探针的标记 用内切酶 *EcoR* I 和 *Hind*III 对质粒 *proC1*DNA 进行双酶切, 用回收试剂盒 (Roche) 回收 1 600 bp 左右的酶切产物。以回收产物为模板, 按 Dig DNA Labeling and Detection Kit I 说明书用随机引物扩增法标记探针。

1.3.3 Southern 杂交 取 3 个转基因株系的总 DNA 和未转化植株的总 DNA 各 10 μg 分别用 *EcoR* I 和 *Hind*III 进行单酶切后, 在 35 V 电压下电泳 12 h, 用毛细管法转移到尼龙膜上, 按 Dig DNA Labeling and Detection 说明书进行 Southern 杂交。

1.3.4 Northern 杂交 取 3 个转基因株系的总 RNA 和未转化植株的总 RNA 各 15 μg, 电泳, 转膜后按 Dig DNA Labeling and Detection Kit I 说明书进行 Northern 杂交。

1.4 转 *rolC* 基因八棱海棠生物学特性研究

1.4.1 增殖能力 取各个株系八棱海棠试管苗长 1.5 cm 的茎段接入 BA 浓度分别为 3.0、2.0、1.0、0.5、0.1 mg·L⁻¹, NAA 浓度为 0.1 mg·L⁻¹ 的 MS 培养基中。培养 30 d 后, 观察其生长情况, 统计株高 >0.5 cm 的增殖苗总数, 计算增殖率 (增殖率=增殖苗总数/初始接入茎段数)。每个处理 3 个重复, 每个重复 15 个茎段。

1.4.2 叶片再生能力 取各个株系八棱海棠继代 30 d 后试管苗的中部叶片, 剪成 30 mm×30 mm 大小, 接入 BA 浓度分别为 8.0、4.0、2.0、0 mg·L⁻¹, NAA 浓度为 0.2 mg·L⁻¹ 的 MS 培养基中。30 d 后 (起初 20 d 暗培养) 观察叶片再生情况, 统计形成愈伤组织叶片数和每个愈伤组织形成的株高 >0.5 cm 的再生苗数。每个处理 3 个重复, 每个重复 30 个外植体。

1.4.3 生根能力 取各个株系八棱海棠继代 30 d 后长 1.5 cm 的茎段接入含不同浓度 IBA 对 1/2MS (大量元素减半) 培养基中, 20 d 后 (起初 3 d 暗培养), 观察生根情况, 统计生根率 (生根率=生根株数/初始接入茎段数)。每个处理 3 个重复, 每个重复 15 个茎段。40 d 后, 统计在 IBA 浓度 0.2 mg·L⁻¹ 处理条件下, 各个株系的生根数、根长和根粗。

1.4.4 植株生长特性 取株高 2 cm 左右, 带 3~5 片叶子的各个株系八棱海棠试管苗, 将其基部浸入 1 000 mg·L⁻¹ 的 IBA 中数秒, 移栽入消毒后的混合基质中 (沙: 珍珠岩=1: 1)。起初 7 d, 用透明的塑料杯罩住保持湿度。4 个月后, 统计株高, 节间数, 叶片大小。

2 结果与分析

2.1 *rolC* 基因的 Southern 杂交检测

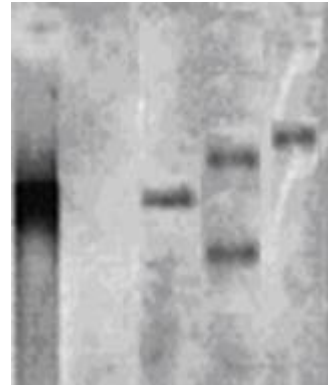
3 个转 *rolC* 基因八棱海棠株系的基因组分别经两种内切酶 *EcoR* I 和 *Hind*III 酶切后, 与含有 *rolC* 基因的探针杂交后均显示出特异的杂交条带, 而对照植株没有出现杂交条带, 证明 *rolC* 基因已经转化进入八棱海棠基因组 (图 1, 图 2)。在用 *EcoR* I 和 *Hind*III 两种内切酶单酶切的 Southern 杂交中, 株系 20a 和 33a 均出现 1 条杂交带, 初步证明这 2 个株系的基因组中整合了至少 1 个拷贝的 *rolC* 基因; 而株系 20b 出现 2 条杂交带, 证明其基因组中整合了至少 2 个拷贝的 *rolC* 基因。

2.2 *rolC* 基因的 Northern 杂交检测

3 个转 *rolC* 基因八棱海棠株系的总 RNA 与用 DIG

标记的含 *rolC* 基因的 DNA 探针杂交后均显现出特异的杂交条带, 而对照植株则没有出现杂交条带, 证明 *rolC* 基因已在转录水平上正常表达 (图 3)。另外, 杂交结果显示 (图 3): 含有 1 个 *rolC* 基因拷贝的株系 20a 和 33a, Northern 杂交信号强于含有 2 个 *rolC* 基因拷贝的 20b 株系。

proIC CK 20a 20b 33a



proIC. 质粒 (阳性对照); CK. 非转基因植株 (阴性对照); 20a、20b、33a 分别为转基因株系 20a、20b、33a。下同

proIC. Plasmid (positive control); CK. Non-transformed control (negative control); 20a, 20b, 33a. Transgenic lines 20a, 20b and 33a, respectively. The same as below

图 1 *EcoR* I 酶切的 Southern 杂交结果

Fig. 1 The result of Southern hybridization after digestion with *EcoR* I

proIC CK 20a 20b 33a

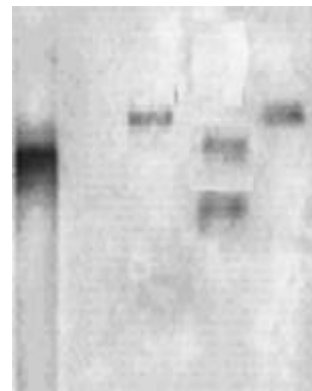


图 2 *Hind* III 酶切的 Southern 杂交结果

Fig. 2 The result of Southern hybridization after digestion with *Hind*III

2.3 *rolC* 基因对八棱海棠组培苗生物学特性的影响

2.3.1 *rolC* 基因对八棱海棠增殖能力的影响 由表 1 可以看出, 3 个转 *rolC* 基因八棱海棠株系和对照植

株的增殖系数均随着培养基中 BA 浓度的增加, 呈先上升, 后下降的趋势。当 BA 浓度 $\leq 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 3 个转 *rolC* 株系的增殖系数均显著高于对照植株; 当 BA 浓度 $> 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对照植株的增殖系数则显著高于 3 个转 *rolC* 基因株系, 并且在 BA 为 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时增殖系数达到峰值。2 个单一 *rolC* 基因拷贝株系在 BA 浓度 $\leq 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 增殖系数显著高于双 *rolC* 基因拷贝株系; 当 BA 浓度 $> 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 双 *rolC* 基因拷贝株系增殖系数则显著高于 2 个单 *rolC* 基因拷贝株系。单 *rolC* 基因拷贝株系 20a, 在 BA 浓度 $\leq 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时增殖系数显著高于另一个单 *rolC* 基因拷贝株系 33a; 当 BA 浓度 $> 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 这 2 个株系的增殖系数无显著差异。从增殖苗的生长情况来看, 在相同的 BA 浓度处理中, 对照植株的增殖苗直立性较强, 节间较长; 而 3 个转 *rolC* 基因株系的增殖苗均呈丛生状, 且节间较短。当 BA 浓度达到 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 3 个转 *rolC* 基因株系的增殖苗均出现玻璃化现象, 而对照植株在 BA 浓度达到 $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 也出现玻璃化现象。

2.3.2 *rolC* 基因对八棱海棠叶片再生能力的影响 由表 2 可以看出, 当再生培养基中 BA 浓度 $\leq 4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 3 个转 *rolC* 基因八棱海棠株系叶片的再生率均显著高于对照植株, 且每叶片的平均再生芽数量也显著高于对照植株。当 BA 浓度 $> 4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对照植株叶

片的再生率和每叶片的平均再生芽数显著高于 3 个转 *rolC* 基因八棱海棠株系。2 个单 *rolC* 基因拷贝株系在 BA 浓度 $\leq 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 叶片再生率和每叶片平均再生芽数量均显著高于双 *rolC* 基因拷贝株系; 当 BA 浓度 $> 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 双 *rolC* 基因拷贝株系的叶片再生率和每叶片平均再生芽数量显著高于 2 个单 *rolC* 基因拷贝株系。单 *rolC* 基因拷贝株系 33a 在 BA 浓度 $\leq 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 叶片再生率和每叶片平均再生芽数量显著高于另一个单 *rolC* 基因拷贝株系 20b; 当 BA 浓度为 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

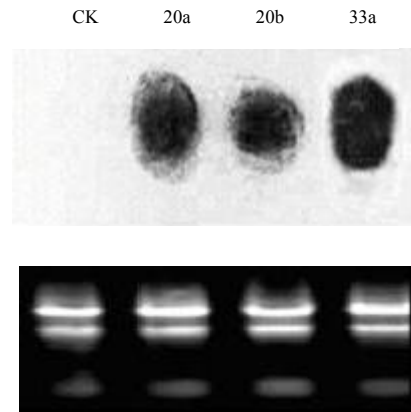


图 3 Northern 杂交结果
Fig. 3 The result of northern hybridization

表 1 转 *rolC* 基因八棱海棠株系和对照植株在不同 BA 浓度 MS 培养基上的增殖率

Table 1 The propagation rate of the *rolC*-transgenic and non-transformed plants on MS media containing different BA concentration

株系 Clone	BA3.0+NAA0.1	BA2.0+NAA0.1	BA1.0+NAA0.1	BA0.5+NAA0.1	BA0.1+NAA0.1
CK	5.67 A	7.33 A	5.40 D	3.20 D	1.85 D
20a	4.14 C	6.22 C	6.80 B	5.86 B	2.56 B
33a	4.15 C	6.22 C	7.80 A	6.40 A	2.93 A
20b	5.23 B	6.80 B	6.53 C	5.13 C	2.12 C

基本培养基为 MS, 激素浓度单位均为 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 不同大写字母表示 1% 显著性差异。下同
The basic medium is MS. All measurement units of hormone concentration are $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The different capital letters show significant difference at $P < 0.01$ level. The same as below

表 2 转 *rolC* 基因八棱海棠株系和对照植株在含有不同 BA 浓度的 MS 培养基上的叶片再生率 (%)

Table 2 The regeneration rate of the transgenic and non-transformed leaves on media containing different concentration proportion of hormones

株系 Clone	BA8.0+NAA0.2		BA4.0+NAA0.2		BA2.0+NAA0.2		BA0+NAA0.2	
	再生率 Rediffere-ntiation rate	平均再生苗数 Average the number of regenerated shoot	再生率 Rediffere-ntiation rate	平均再生苗数 Average the number of regenerated shoot	再生率 Rediffere-ntiation rate	平均再生苗数 Average the number of regenerated shoot	再生率 Rediffere-ntiation rate	平均再生苗数 Average the number of regenerated shoot
CK	100.00 A	3.12 A	66.67 D	2.10 D	40.00 D	1.25 D	6.67 D	0.00 D
20a	50.00 C	1.32 C	80.00 B	2.42 B	90.00 B	2.67 B	26.67 B	1.88 B
33a	30.00 D	1.26 D	78.52 B	2.55 B	100.00 A	3.56 A	36.67 A	2.12 A
20b	73.30 B	2.23 B	93.33 A	3.32 A	73.33 C	2.23 C	13.33 C	1.67 C

时, 两者无显著差异; 当 BA 浓度为 $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 株系 20a 的这两项指标则均显著高于株系 33a。

从再生苗的生长情况来看, 3 个转 *rolC* 基因株系在 BA 浓度达到 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 叶片再生苗有一定的玻璃化现象, 而对照植株叶片的再生苗生长正常; 当 BA 浓度达到 $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对照植株也出现了玻璃化现象, 而 3 个转 *rolC* 基因株系的叶片再生苗的玻璃化程度更为严重。

2.3.3 *rolC* 基因对八棱海棠植株生长特性影响 由表 3 可以看出, 对照植株的株高、节间数和叶面积均显著高于 3 个转 *rolC* 基因八棱海棠株系; 而其节间长度显著高于单 *rolC* 基因拷贝株系 20a 和 33a, 但和双 *rolC* 基因拷贝株系 20b 相比则无显著差异。2 个单 *rolC* 基因拷贝株系的株高、叶面积以及节间数均显著低于双 *rolC* 基因拷贝株系 20b, 而节间长度则和 20b 无显著差异。单 *rolC* 基因拷贝株系 20a 的叶面积和株高均显著高于另外 1 个单 *rolC* 基因拷贝株系 33a, 而节间数和节间长度则无显著差异 (图 4)。以上结果表明 *rolC* 基因的转入, 导致八棱海棠植株矮化, 节间数和叶面积变小。但是转基因植株节间长度的变化不一致, 对照植株的节间长度和单 *rolC* 基因拷贝株系相比有显著差异, 而与双 *rolC* 基因拷贝株系的节间长度之间无显著差异。

2.3.4 *rolC* 基因对八棱海棠生根率和根系形态影响 由表 4 可以看出, 无论是 3 个转 *rolC* 基因八棱海棠株系还是对照植株, 随着生根培养基中 IBA 浓度的

增高, 生根率都呈逐渐上升的趋势。当 IBA 浓度 $\leq 0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 3 个转 *rolC* 基因八棱海棠株系生根率均显著高于对照植株。在不含 IBA 的 1/2MS 培养上, 对照植株不能生根, 3 个转 *rolC* 基因八棱海棠株系却表现出一定的生根能力。当 IBA 浓度 $> 0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 3 个转 *rolC* 基因八棱海棠株系和对照植株的生根率都达到 100%。2 个单 *rolC* 基因拷贝株系在 IBA = $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 生根率达到 100%, 显著高于双 *rolC* 基因

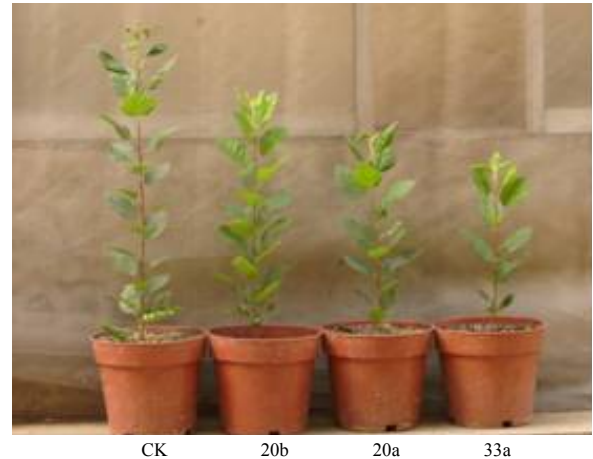


图 4 转 *rolC* 基因八棱海棠株系和对照植株移栽 4 个月后地上部生长情况

Fig. 4 The overground part growth of *rolC*-transgenic and non-transgenic control of *Malus robusta* Rehd. after transplant 4 months

表 3 移栽 4 个月后转基因植株和对照植株地上部分的生长情况

Table 3 Average height, number of nodes, internode length and leaf area of three transformed clones and non-transformed control plantlets

株系 Clone	株数 Plant (No.)	株高 Plant height (cm)	节间数 Nodes (No.)	节间长度 Internode length (cm)	叶面积 Leaf area (cm ²)
CK	7	43.12 A	16.26 A	2.65 A	36.23 A
20a	10	20.24 C	11.16 C	1.81 B	22.76 C
33a	8	18.63 D	10.87 C	1.71 B	18.56 D
20b	8	26.66 B	12.28 B	2.17 AB	28.43 B

表 4 转 *rolC* 基因八棱海棠株系和对照植株在含有不同 IBA 浓度的 1/2MS 培养基上的生根率 (%)

Table 4 The rooting percentage of the *rolC*-transgenic and non-transformed plants on 1/2MS media containing different IBA concentration

株系 Clone	IBA 0	IBA 0.05	IBA 0.10	IBA 0.20
CK	0.00 D	60.00 C	80.00 B	100.00 A
20a	53.33 B	100.00 A	100.00 A	100.00 A
33a	62.22 A	100.00 A	100.00 A	100.00 A
20b	35.36 C	90.00 B	100.00 A	100.00 A

拷贝株系 90% 的生根率。IBA 提高到 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 双 *rolC* 基因拷贝株系 20b 才能达到 100% 的生根率。从根系的生长情况来看, 在相同的 IBA 浓度处理中: 对照植株比 3 个转 *rolC* 基因株系生根数量少, 根长长; 2 个单 *rolC* 基因拷贝株系比双 *rolC* 基因拷贝株系生根数量多, 根长较短。

由表 5 可以看出, 在含有 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 1/2MS 培养基上生根培养 40 d 后, 对照植株的平均根数和平均根长与 3 个转 *rolC* 基因八棱海棠株系相比均有显著差异, 而平均根粗则无显著差异。2 个单 *rolC* 基因拷贝株系平均根数显著高于双 *rolC* 基因拷贝株系, 但它们的平均根粗无显著差异; 而单 *rolC* 基因拷贝株系 33a 的根长显著低于双 *rolC* 基因拷贝株系 20b, 另一个单 *rolC* 基因拷贝株系 20a 的根长与双 *rolC* 基因拷贝株系 20b 的根长相比则无显著差异。单 *rolC* 基因拷贝株系 20a 的平均根数和平均根长与另一个单 *rolC* 基因拷贝株系 33a 相比均有显著差异, 而它们之间的根粗无显著差异 (图 5)。



图 5 转 *rolC* 基因八棱海棠株系和对照植株在 IBA 浓度 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 1/2MS 培养基上生根 40 d 后的生长情况

Fig. 5 The root growth of *rolC*-transgenic and non-transgenic control of *Malus robusta* Rehd. on the 1/2MS medium with $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA after 40 days

表 5 转基因植株和对照植株在含有 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 的 1/2M S 培养基上 40 d 后的生根情况

Table 5 The root growth characteristics of the transgenic and non-transformed plants on media containing $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA after culturing 40 days

株系 Clone	平均根数 Average root number (No.)	平均根长 Average root length (mm)	平均根粗 Average root diameter (mm)
CK	4.56 D	120.2 A	2.5 A
20a	11.23 B	78.8 B	2.5 A
33a	13.67 A	64.2 C	2.6 A
20b	7.33 C	77.3 B	2.7 A

3 讨论

研究结果普遍认为转 *rolC* 基因受体植物有着矮化、发侧枝能力增强、花叶等器官变小、生根能力增强、早花、雄性不育等形态特征。在果树生产上, 使用矮化和根系发达的砧木能使果树树型矮化, 吸收功能增强, 不仅便于经营管理, 也大大提高果树的生产率。为了改良梨树砧木高生长的特性, Bell 等^[5]将 *rolC* 基因导入了西洋梨 (*Pyrus communis* L.) 中, 并成功地获得了生长高度下降、茎节数减少、叶片变小的转基因植株。Kaneyoshi 等^[8]将 *rolC* 基因转入柑橘砧木枳中, 获得了比对照植株矮化 40% 且生根能力显著增强的转基因植株。本试验对转 *rolC* 基因的苹果砧木八棱海棠进行形态学鉴定, 3 个转 *rolC* 基因的株系均出现了株高变矮、节间数变少、叶面积变小、根长变短、生根数增多等形态学变化。而且 2 个获得单拷贝 *rolC*

基因八棱海棠的节间长度比对照植株显著变短, 而双 *rolC* 基因八棱海棠株系的节间长度和对照植株相比无显著差异。3 个转 *rolC* 基因株系的根粗和对照植株相比无显著差异。由此可以证明: 3 个转 *rolC* 基因的八棱海棠株系在形态学上发生的变化和前人在其它转 *rolC* 基因植物上得到的结论基本相符。

Ove 等^[9]将 *rolC* 基因转入多年生木本植物杂交白杨, 并对转 *rolC* 基因杂交白杨的多种内源细胞分裂素 (包括 iPA、ZR、Z、DHZ、ZOG、ZROG) 进行了测定。结果表明, 无论是在顶端组织还是在叶片中, 转基因植株的内源细胞分裂素含量与对照植株相比均有显著的提高; Mitiouchkina 等^[10]在转 *rolC* 基因菊花中发现转基因植株体内的细胞分裂素比对照植株提高了 50 倍。本试验虽然没有对 3 个转 *rolC* 基因八棱海棠的内源细胞分裂素进行测定, 但是通过调查在不同 BA 浓度条件下转 *rolC* 八棱海棠株系的增殖能力和叶片

再生能力,发现转 *rolC* 基因八棱海棠在显著低于对照植株所需 BA 浓度的条件即可获得较大的增殖系数和叶片再生率。此结论间接证明上述观点: 转 *rolC* 基因可在一定程度上提高八棱海棠的内源细胞分裂素水平。转 *rolC* 基因康乃馨叶片再生试验^[11]的结果与本试验相似。

关于 *rolC* 基因整合拷贝数与其表达水平之间的关系,文献报道结果不一致。Bell 等^[5]将 *rolC* 基因转入梨品种 Beurre Bosc 获得的转基因植株,经鉴定包括 3 个拷贝数不同的株系: F24 (3 个拷贝数)、F23 (1 个拷贝数) 和 F22 (2 个拷贝数)。但 3 个株系在植株高度、节间距离上均无显著差异; 转 *rolC* 基因苹果砧木 Marubakaidou 植株的表现型与拷贝数无关^[12]; Fladung 等^[3]在转 *rolC* 基因马铃薯中发现,随着拷贝数的增加,该基因表达效果越强,但这种现象只在试管中表现明显。转 *rolC* 基因的牵牛花品种 Mitchell 植株高度、花叶大小、发侧枝能力,随着拷贝数的增加,而显著变化^[13]。

4 结论

本试验通过 Southern 杂交鉴定出转 *rolC* 基因八棱海棠株系 20a 和 33a 分别获得了 1 个 *rolC* 基因拷贝,株系 20b 获得了 2 个 *rolC* 基因拷贝。Northern 杂交结果表明,单 *rolC* 基因拷贝株系 20a 和 33a 的 *rolC* 基因表达丰度高于双 *rolC* 基因拷贝株系 20b。外源 *rolC* 基因的转入导致八棱海棠产生形态学上的变化,单 *rolC* 基因拷贝株系 20a 和 33a 的株高、节间数、叶面积、根长、生根数等指标和双 *rolC* 基因拷贝株系 20b 相比均有显著差异; 并且显著降低了八棱海棠组培苗增殖和叶片再生对 BA 浓度、八棱海棠组培苗生根对 IBA 浓度的要求。

References

- [1] 曲泽洲, 孙云蔚. 果树种类论. 北京: 农业出版社, 1990: 13-19.
Qu Z Z, Sun Y W. *Discussion of Fruit Trees Varieties*. Beijing: Agriculture Press, 1990: 13-19. (in Chinese)
- [2] 孙爱君. 农杆菌介导 *rolC* 基因转化八棱海棠的研究. 南京农业大学硕士论文, 1999.
Sun A J. Study on agrobacterium mediated transformation of *Malus robusta* Rehd. with *rolC* gene. The dissertation Submitted to Nanjing Agricultural University for Master Degree, 1999. (in Chinese)
- [3] Fladung M. Transgenic potato plants can be used to evaluate stability of foreign genes: reversions and chimeras in multiple copies of *rolC* harboring clones. *Agronomie*, 1996, 16: 113-121.
- [4] 章镇, 孙爱君, 房经贵, 盛炳成. 农杆菌介导 *rolC* 基因转化烟草植株的研究. 南京农业大学学报, 2001, 24(1): 25-29.
Zhang Z, Sun A J, Fang J G, Sheng B C. Study on agrobacterium-mediated transformation of tobacco plant with *rolC* gene. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2001, 24(1): 25-29. (in Chinese)
- [5] Bell R L, Scorza R, Srinivasan C, Webb K. Transformation of 'Beurre Bosc' pear with the *rolC* gene. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 1999, 124 :570-574.
- [6] Van der Salm T P M, Van der Toorn C J G, Bouwer R, Ten Cate C H H, Dons H J M. Production of *ROL* gene transformed plants of *Rosa hybrida* L. and characterization of their rooting ability. *Molecular Breeding*, 1997, 3: 39-47.
- [7] 张智俊, 谭晓风, 陈永忠. 油茶总 RNA 及 mRNA 的分离与纯化. 中南林学院学报, 2003, 23(2): 76-78.
Zhang Z J, Tan X F, Chen Y Z. Isolation and purification of total RNA and mRNA from *Camellia oleifera*. *Journal of Central South Forestry University*, 2003, 23(2): 76-78. (in Chinese)
- [8] Keneyoshi J, Kobayashi S. Characteristics of transgenic trifoliolate orange(*Poncirus trifoliata* Raf.) possessing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid. *Journal of the Japanese of Society for Horticulture Science*, 1999, 68: 734-738.
- [9] Nilsson O, Moritz T, Sundberg B, Sandberg G, Olsson O. Expression of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene in a deciduous forest tree alters growth and development and leads to stem fasciation. *Plant Physiology*, 1996, 112: 493-502.
- [10] Mitiouchkina T Y, Dolgov S V, Cadic A. Modification of chrysanthemum plant and flower architecture by *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes* introduction. *Acta Horticulturae*, 2000, 508: 163-169.
- [11] Casanova E, Valdés A E, Zuker A, Fernández B, Vainstein A, Trillas M I, Moysset L. *rolC*-transgenic carnation plants: adventitious organogenesis and levels of endogenous auxin and cytokinins. *Plant Science*, 2004, 167: 551-560.
- [12] Igarashi M, Ogasawara H, Hatsuyama Y, Saito A, Suzuki M. Introduction of *rolC* into Marnbakaidou [*Malus prunifolia* Borkh. var. ringo Asami Mo 84-A] apple rootstock via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 2002, 163: 463-473.
- [13] Winefield C, Lewis D, Arathoon S, Deroles S. Alteration of *Petunia* plant from through the introduction of the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes*. *Molecular Breeding*, 2000, 5: 543-551.