

Ri 质粒介导 TMV 和 CMV 外壳蛋白基因转化甜椒研究

郭亚华¹, 徐香玲², 邓立平¹, 张军民¹, 张欣¹

(1. 黑龙江省农科院园艺分院, 哈尔滨 150069; 2. 哈尔滨师范大学生物系)

摘要: 利用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)的 Ri 质粒介导的二元载体, 将 PBTC-8 质粒上的 TMV-cp 和 CMV-cp 基因导入甜椒中, 用共培养的方法, 诱导愈伤组织, 经卡那霉素的抗性筛选, 进一步的培养获得再生植株, 经 PCR 和 ELISA 的检测呈阳性反应, 转化植株田间人工接种为抗性, 证明 TMV-cp 和 CMV-cp 基因导入甜椒植株并已表达。

关键词: 甜椒; 转化植株; 转基因

中图分类号: S603. 6 S641. 3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2000)04-0017-02

甜椒为茄科蔬菜, 受 TMV(烟草花叶病毒)和 CMV(黄瓜花叶病毒)危害严重, 生产上常因病害减产而造成很大的经济损失。从 80 年代初至 90 年代中期, 国家科委组织了全国有关专家进行长达十几年的攻关研究, 在抗 TMV(烟草花叶病毒)上获得良好的进展。但对 CMV(黄瓜花叶病毒)则举步艰难, 其原因是, 国内外至今没有在茄果类蔬菜上找到抗 CMV(黄瓜花叶病毒)的抗源。植物基因工程的迅速发展, 为防治植物病毒病开辟了一条新途径。本文利用发根农杆菌菌体中存在的能够诱发植物产生毛状根的质粒, 称为 Ri 质粒。利用 Ri 质粒感染植物外植体, 通过离体培养诱导产生毛状根, 进而获得转基因再生植株。

1 材料与方法

1.1 供试材料

卫星 87-2、9662 甜椒由本室提供, 二元载体由哈尔滨师范大学生物系提供, 其中 PBTC-8 质粒具有 TMV-cp 和 CMV-cp 基因, 受体菌 R1000(PiA4b)提供 Vir 区, TMV-cp 为 0.7kb, CMV-cp 为 1.0kb。

1.2 菌株

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) E. coli, MM-294(PBTC-8 带有 TMV-cp 和 CMV-cp 基因)由哈师大生物系提供。

1.3 实验方法

1.3.1 无菌苗的获得 取精选的甜椒种子, 在超净工作台上用 75%酒精消毒 30s, 再用 0.1%氯化汞浸泡 8min, 用无菌水冲洗 3~5 遍, 接种于 2%琼脂蔗糖培养基上, 于 25℃条件下培养。

1.3.2 转化方法 针刺和共培养的方法, 当无菌苗长出两片子叶而真叶尚未展开时, 在无菌条件下, 将子叶、下胚轴切成 0.5cm 长的小段, 用 10 倍、20 倍的菌液, 分别进行针刺和共培养法处理, 将处理好的切块用滤纸吸干表面菌液, 接种于含有羧苄青霉素的 MS 培养基上, 除菌, 每隔 2~3d 转一次, 两周后再转入含有卡那霉素和羧苄青霉素的选择培养基上, 诱导抗性芽, 待不定芽长至 2~3 片叶子时转入生根培养基中, (1/2MS) 诱导生根, 根系发达后移栽于盆中。

1.3.3 检测方法 PCR 检测。用常规的方法提取植株 DNA, TMV-cp 的引物: 5 端为 CCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTC, 3 端为 CCTGCGTGCAATCCATCTTG, CMV-cp 的引物: 5 端为 GATTAGAGTCCGCAATTAT, 3 端为 AGACCGCAACAGGATTCAA。PCR 的反应体系: 95℃预变性 5min, 加入 1uTag 酶, 然后按 94℃ 50s, 55℃ 60s, 72℃ 90s, 35 个循环, 反应结束后, 在含 EB 的 0.8%琼脂糖上 50V 电泳 1h, 紫外灯下观察。板式间接酶联法(Lindirect-ELISA)检测: ①包被: 将试验抗原用碳酸钠缓冲液稀释成适当倍数, 包被于 40 孔的酶联板上, 每孔加样 100ul, 于 37℃温箱中保温 2h, 用 PBST 洗三次, 每次 3min。②加抗血清: 加入用 PBS(含 2%PVP)稀释成适当倍数的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 结合物, 每孔加入 100ul, 于 37℃温箱内孵育 1h, 同上法洗涤。③加酶标物: 加入用 PBST 稀释成适当倍数的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 结合物, 每孔加入 100ul, 于 37℃温箱内孵育 1h, 用上法洗涤。④加底物: 每孔加入 100ul 的邻苯二胺底物液, 于 37℃反应 20~30min。⑤终止: 每孔加入 50ul2M 的 H₂SO₄ 终止反应。⑥结果测定: 目测结果

及在 DG3022 酶联免疫检测仪上测定 490 毫微米波长的光密度值(最低检出量 1~110 纳克)。

2 实验结果与分析

通过实验观察到, (1) 胚轴切段和子叶与菌液共培养, 在胚轴或子叶切口处诱导出绿色小芽, 待小芽长到 1 cm 左右大时, 再转入加激素的 MS 培养基上, 使其继续伸长。(2) 于胚轴、子叶多点针刺注射感染转化子液 1~2 周左右诱导出毛状根, 由毛状根产生再生植株。经卡那霉素抗性筛选, 两周后将已生长的芽转入生根培养基中, 待生出发达的根系后, 将其移栽于盆中, 放在温室中培养。本次试验共获得 64 株转化植株, 这些转化株田间表现各异, 有的矮化, 叶片皱缩, 节间短, 开花少, 多数不育或败育, 这些现象都表现具有 Ri 质粒 T-DNA 插入寄主植物基因组, DNA 出现的典型形态特征。

2.1 稀释不同菌液浓度感染的结果

将甜椒无菌苗的子叶及茎切块与农杆菌共培养, 倍数为 10 倍、20 倍两个浓度, 试材为 87-2、9662。

其试验结果如下:

代号	菌液 块数	子叶 块数	胚轴 块数	外植 体数	出芽 数	频率 %	愈 伤 组织数	诱导 率%	毛状 根
87-2	20	47	18	65	4	6.15	6	9.23	12 18.46
87-2	10	105	2	107	5	4.67	3	2.80	31 28.97
9662	20	80	78	158	15	9.49	13	8.23	100 63.29
9662	10	142	47	189	7	3.70	9	4.76	52 27.51

从上表可以看出, 品种之间进行转化差异不大, 而倍数是有直接影响, 从设计的两个不同浓度的菌液看, 稀释 20 倍要比 10 倍转化率无论从愈伤组织或顶芽诱导率都要高, 所以我们认为本试验用 20 倍的转化子液进行甜椒转化诱导效果好。

2.2 在所设计的各种诱导及分化培养基组合中, 以无激素培养基组合, 即可直接诱导并分化出苗。因为 Ri 质粒上具有激素基因。

2.3 ELISA 检测结果

供检测材料 18 份, 其检测结果如下: 检测结果有 3 份材料> 阴性, 呈阳性反应, 分别是: 454, 463, 609。

TMV-ELISA 检测(> 3X 阴性为阳性)

编号	453	454	455	456	457	458	459	460	461
平均值	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0	0.02	0.01	0.02
编号	462	463	464	404	406	407	420	609	610
平均值	0.00	0.1	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.1	0.01

CMV-ELISA 检测(> 3X 阴性为阳性)

编号	454	463	459	455	457	458
平均值	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

通过对 18 份材料的 CMV、TMV 检测, 证明有 3 株导入 TMV 基因, 1 株导入 CMV 基因, 其中 454 植株含有双抗 CMV、TMV 两种基因, 说明所获得的植株是两种目的基因同时被整合到植物细胞中。并表达。

2.4 PCR 检测

通过 Ri 质粒转化辣椒细胞, 获得再生植株 64 株, 提

取其幼叶的 DNA, 进行 PCR 检测, 结果有 7 株扩增出片段在 0.7kb 和 1.0kb 左右, 与阳性对照(PBTC-8 质粒)扩增结果一致。呈阳性反应, 单抗 6 株, 双抗 1 株, 转化率为 10.93%。

3 结束语

3.1 甜椒转基因报导的较少, 其主要原因是甜椒的再生植株频率低, 转化率低。

3.2 本实验得出, 外植体进行转化, 转化子液的浓度以 20 倍较为适宜, 品种差异不大。

3.3 本实验利用农杆菌介导的方法获得一批材料, 经一系列检测, 获得双抗(CMV、TMV)转基因材料一份, 单抗 TMV 材料 3 份, 从而为进一步开展抗病育种提供资源。(参加本试验并撰写本文的还有本课题组的谢立波)

参考文献

- 1 王玉文等. 甜椒的离体再生及基因转化[J]. 植物学报, 1991, 33(10): 780~786
- 2 叶志彪等. 辣椒转基因植株再生[J]. 植物学报, 1993, 35(增刊): 88~93
- 3 徐香玲等. 利用 Ri 质粒向大豆导入马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因的初步研究[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 1994, 10(6): 22~26
- 4 徐香玲等. 利用发根农杆菌介导二元载体向番茄导入 TMV, CMV 外壳蛋白基因的研究[J]. 植物研究, 1994, 14(4): 416~423
- 5 邓立平等. 外源基因导入黄瓜获得突变新品系[J]. 遗传, 1995, 17(2): 33
- 6 郭亚华等. 采用花粉通道技术将外源 DNA 导入黄瓜青椒研究初报[J]. 哈尔滨师范大学学报, 1995, 11(2): 91
- 7 刘伟华. Ri 质粒诱导的植物发根培养基及其应用[J]. 生命科学, 1997, 9(2):

有机生态型无土栽培技术函授班招生

近年来, 为加快有机生态型无土栽培技术的推广和应用, 中国农业科学院蔬菜花卉研究所每年举办一次培训班, 收效良好。但目前这一形式已不能满足社会各界的需求。为了使广大农民朋友和农业技术推广人员更快、更好地掌握该技术, 中国农业科学院蔬菜花卉研究所决定采取函授的方式, 向希望学习、利用有机生态型无土栽培技术进行蔬菜生产的社会各界朋友传授该项技术。

凡具有一定蔬菜种植经验或具有初中文化程度的广大农民、农业技术推广人员和农业企业中的技术人员, 以及社会各界人士均可报名。通过函授学习, 可以运用此项技术进行小面积(333m²~667m²)的生产栽培试验, 积累 1a(年)经验后即可进行较大面积生产。欢迎垂询, 简介备索。联系地址: 北京白石桥路 30 号, 中国农业科学院蔬菜花卉研究所 邮政编码: 100081 电话: (010) 68918797 电子信箱“WTZP@ihw.com.cn” 联系人: 蒋卫杰 余宏军 刘伟