

谢立波,郭亚华,邓立平,徐香玲,王雪

**摘要:**采用花粉管通道及Ri质粒介导两条途径的转基因工程技术,将CMV-cp、TMV-cp基因导入甜椒,获得转基因植株及导入后代,通过PCR分子检测证实转基因表达,进一步通过常规选育,连续多代田间鉴定,获得稳定遗传的抗病、高产新资源。

中图分类号:S641.303.6 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2004)02-0043-03

1 研究目的及意义

辣椒是人们喜爱的主要蔬菜之一,其营养丰富,富含人体生命活动中必要的多种元素及营养物质。其适应性强,分布广,是世界性蔬菜。但随着栽培历史的延长,病害种类日益增多,危害日益加重,尤其是毒病,严重的威胁着辣椒的生产,由于毒病的危害,造成常年减产30%左右,重者毁产。近年来,植物和病毒分子生物学研究的不断深入以及植物基因工程技术的发展给植物抗病病毒育种开辟了新途径,为从根本上解决植物对毒病的抗性提供了可能,具有高效、经济、无污染等优点。

本项研究将CMV、TMV外壳蛋白基因通过花粉管通道法及Ri质粒介导法导入甜椒中,建立适于甜椒基因植物转化体系,创造甜椒CMV、TMV抗源材料,填补当前甜椒抗病种质资源短缺,为甜椒抗病毒育种做贡献。

2 材料与方法

2.1 供试植物材料

龙椒二号甜椒、KL9262麻辣甜椒,以上两个材料均属本单位自筹品种(品系)。其中,龙椒二号(以下简称“龙二”)是常规育种选育而成的纯系(果实方型、味甜脆);KL9262(以下简称“162”)等采用航天诱变获得的稳定新品系,果实为梯形,味麻辣。

2.2 试验用菌种及来源

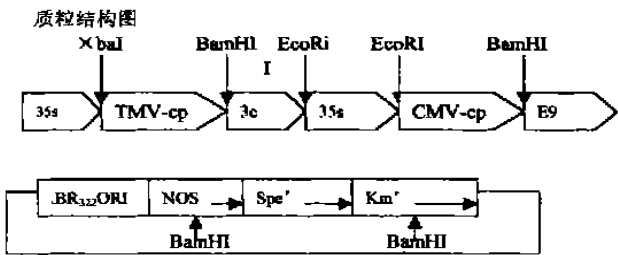
供试质粒由哈师大提供的PBTC-8质粒,带有CMV-cp、TMV-cp基因及卡那霉素(K<sup>r</sup>m)抗性基因、壮观霉素抗性基因cspe<sup>r</sup>,链霉素抗性基因(sm<sup>r</sup>)。

菌种及来源

菌株	所含质粒	来源
R <sub>1000</sub>	PkiA <sub>4</sub>	哈师大
EcoliHB <sub>101</sub>	PRK <sub>2013</sub>	哈师大
EcoliMM <sub>294</sub>	PBT <sub>c-8</sub>	哈师大

试验质粒

质粒	大小	抗性标记	目的基因	来源
PBT <sub>c-8</sub>	14.7kb	Km <sup>r</sup> spe <sup>r</sup> sm <sup>r</sup>	TMV-cp、CMV-cp	哈师大



质粒结构图

2.3 导入途径及方法

2.3.1 Ri质粒介导

2.3.1.1 外植体准备 取参试品种(品系),挑选籽粒饱满、整齐、色泽光亮的种子,在无菌条件下,用70%~75%酒精消毒30s(秒)。倒去酒精液,加入0.1%升汞,浸泡10min~15min(分钟)取出,用无菌水冲洗4~5次,接种于无激素1/2MS(大量元素)的培养基上,置于25℃条件下,10h(小时)补助光照,光照4000Lx(勒克斯),培养无菌苗,两周后,当无菌苗长出两片子叶时,切成:子叶、带生长点的下胚轴、下胚轴等3部分,并在MSO(无激素的MS培养基)固体培养基上。

2.3.1.2 PBTC-8质粒导入发根农杆菌及转化子菌液的制备 以发根农杆菌R<sub>1000</sub>为受体,大肠杆菌(以下简称Ecoli)HB<sub>101</sub>为诱导体,EcoliMM<sub>294</sub>为供体菌,通过三亲交配,将PBTC-8质粒导入发根农杆菌R<sub>1000</sub>。将三种活化后转化子菌液分别接种于5ml(毫升)CB(大肠杆菌)和YEB(发根农杆菌)液体培养基中,28℃(发根农杆菌)和37℃(大肠杆菌)培养,当三种菌长到OD<sub>600</sub>为0.5左右时,从三个菌的培养基中各取0.5ml(毫升)加入4ml(毫升)YEB培养基内,28℃静止培养过夜,用10mg/L(毫克/升)MgSO<sub>4</sub>稀释10<sup>-1</sup>~10<sup>-7</sup>。取稀释液涂抹于含50mg/lsm,50mg/lKm和100mg/lspe的固体培养基中,2d(天)后挑去转化子,再接入相同的选择平板上,选出年菌落,接到YEB固体培养基上保存备用。在无菌条件下,从保存的YEB培养平板上挑取单细胞克隆菌落,加于含有sm,spe,km三种抗生素的液体YEB培养基上,再置于28℃黑暗条件下,在100rpm摇床上震荡24h~36h(小时)。即制成转化子菌液,此菌液通过紫外灯下检测合格后,即可备用。

2.3.1.3 转化子菌液感染外植体 采用针刺法及共培养两种方法,分别用10x、15x两种浓度的转化子菌液感染外植体,共培养时间分别为10s(秒)、15s(秒),感染后的外植体放入筛选和分化培养基上(培养条件同前)。

2.3.1.4 除菌和抗性筛选 外植体在分化培养基上培养24h(小时),转入除菌培养基上,并每隔2d~3d(天)更换一次新的除菌培养基,当细胞开始启动后,转入选择培养基上。

2.3.1.5 转基因植株的诱导 在选择培养基上,诱导愈伤组织和不定芽,每2~3周继代一次,4周左右,从愈伤组织上产生不定芽,2~3周后,不定芽长成小植株,并在原培养基上生

\* 黑龙江省科技厅“十五”攻关项目  
收稿日期:2003-10-27

根,形成完整小植株。

### 2.3.2 花粉管通道法

将外源目的基因(带有 CMV-cp、TMV-cp 基因的转化子菌液)直接导入甜椒的花粉管中。

2.3.2.1 导入时间 导入时间是影响导入效果的一个关键因素,应当选择授精过程和胚胎发育早期,细胞分裂最旺的阶段导入,这时受体卵子或合子及初期胚胎细胞不具备细胞壁或细胞壁不健全,易于外源 DNA 导入转化。但外源 DNA 能否导入并聚合,是 DNA、细胞、环境三者互作的结果,因而,花粉管通道法具有很大的随机性。要视具体作物、具体品种,其花器大小、柱头长短、花粉管伸长的速度等都会直接影响授精时间。

本项研究经多年实践,认为对甜椒而言,导入时期应选择“二萼椒”的花,其开花前一天的白色大花蕾进行套袋,防止风或昆虫的异花授粉,待开花后,当花瓣平展或下斜展时(大约开花后 12 h(小时)左右)将套袋取下进行导入。导入后仍将袋套上,并挂牌,以保持空气湿度,保护菌液在柱头上与伸长的花粉管一起进入花柱。

2.3.2.2 导入方法 本试验采用两种方法:①注射法:去掉柱头,用微量注射器将转化子菌液直接注入子房。②涂抹法:将菌液直接抹在柱头上。采用上述两种方法均得到了果实并採收了种子。但子房注射法有畸形果现象,果实皱褶,且单果的种子量少,有些果实无籽,这可能是注射器注入子房时,造成了机械损害,影响了果实与种子的发育。而柱头涂抹法多数果实发育正常,种子量较多。

2.3.2.3 解除套袋及采收 外源 DNA 导入后 7 d~10 d(天),子房明显膨大,即可解除套袋,当果实红熟期可采收倒籽。

### 2.4 转基因植株及导入后代的检测

#### 2.4.1 介导法转基因植株及导入后代的检测

2.4.1.1 Km 筛选 采用介导法获得的再生植株已通过 Km 抗性筛选,初步认为是转化株。但这种方法有出现假阳性的可能,因而还需要进一步做分子验证。

2.4.1.2 PCR 检测 取经过 K' m 筛选的植株叶片提取 DNA,按设计好的引物,对 TMV-cp 和 CMV-cp 扩增,从扩增产物的电泳表明:本试验检测的 6 个 K' m 抗性植株的 DNA 具有与质粒 PBTC-8 的 DNA 相对应的 TMV-cp 和 CMV-cp 基因片段扩增谱,而对照(非转基因植株)的 DNA 则无对应的扩增带,说明外源 DNA 中的目的基因(CMV-cp、TMV-cp)已被整合到甜椒基因中(见图版 1—1;1—2)。

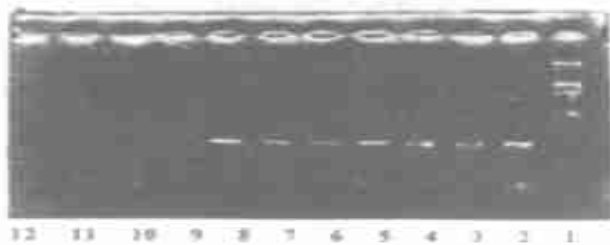


图 1-1 TMV-cp 基因的 PCR 检测结果(从右至左)

Lane 1: λDNA Hind III+ Eco R I Marker  
Lane 2: 质粒  
Lane 3—8: 转基因植株及后代  
Lane 9—12: 非转基因植株

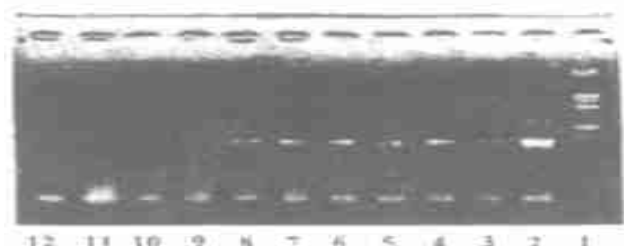


图 1-2 CMV-cp 基因的 PCR 检测结果(从右至左)

Lane 1: λDNA Hind III+ Eco R I Marker  
Lane 2: 质粒  
Lane 3—8: 转基因植株及后代  
Lane 9—12: 非转基因植株

转基因甜椒田间产量与毒病调查统计表(2002、2003)

代号	导入途径	2002 年						2003 年						备注			
		产量		与对照比±%			毒病	产量(斤)		与对照比±%			毒病				
		区产	折合产量	比CK	比CK <sub>1</sub>	比CK <sub>2</sub>	病情	区产	折合产量	比CK	比CK <sub>1</sub>	比CK <sub>2</sub>	病情		比CK	比CK <sub>1</sub>	比CK <sub>2</sub>
		7m <sup>2</sup>	667m <sup>2</sup>	±%	±%	±%	指数	7m <sup>2</sup>	667m <sup>2</sup>	±%	±%	±%	指数		±%	±%	±%
D <sub>3</sub>	花粉管通道	57.3	6364.3	+2.96		-4.0	0	60.7	6612.9	+44.9		+19.7	16.3	-9.28		-74.8	长梯果
D <sub>3-1</sub>	花粉管通道	65.0	7275.8	+16.9		+9.1	0	44.54	4850.5	+6.29		-13.9	7.27	-332.3		-292.0	梯形果
D <sub>4</sub> (长方)	花粉管通道	27.7	3079.3	-105.9	-52.7		3.5	60.9	6637.1	+45.43	+56.6		18.13	-73.3	-82.8		大方果
D <sub>7</sub>	花粉管通道	58.7	6525.5	+10.6		-1.5	0	47.8	5210.2	+14.1		-6.1	28.67	-9.6		+0.6	梯形果
R <sub>9</sub>	Ri 质粒介导	79.0	7540	+42.1	+86.8		1.8	61.7	6725.3	+47.6	+58.6		25.29	-24.3	-29.1		方形果
R <sub>9-1</sub>	Ri 质粒介导	67.4	7492.3	+21.1	+59.3		0	59.6	6496.4	+42.4	+53.2		30.61	-2.7	-9.3		方形果
R <sub>9-3</sub> ②	Ri 质粒介导	69.7	7748.3	+25.4	+64.8		3.8	69.5	7575.5	+66.0	+78.7		31.18	-0.8	-11.1		长方形
R <sub>10-3</sub>	Ri 质粒介导	65.3	7259.2	+17.4	+54.4		3.5	61.6	6710.5	+47.04	+58.4		18.62	-68.9	-79.7		长方形
R <sub>10-4</sub>	Ri 质粒介导	108.0	12006.0	+94.2		+81.2	8.9	91.5	8195.0	+95.6		+90.3	13.5	-123.8		-111.1	梯形果
R <sub>11-3</sub>	Ri 质粒介导	70.5	7839.3	+26.8	+66.7		15.6	54.6	5951.4	+30.41	+40.4		22.23	-41.4	-50.5		长方形
R <sub>12</sub>	Ri 质粒介导	52.8	5869.6	-5.3	+24.8		12.0	47.5	5177.17	+13.44	+22.1		11.52	-172.8	-190.5		方形果
R <sub>12-1</sub>	Ri 质粒介导	66.0	7337.0	+18.7		+10.7	1.3	55.2	6016.8	+31.8		+8.9	16.25	-93.4		-75.4	梯形果
R <sub>12-2</sub>	Ri 质粒介导	70.9	7881.7	+27.5		+19.0	5.0	65.4	7128.6	+56.2		+29.0	12.5	-151.4		-128.0	梯形果
R <sub>13-1</sub>	Ri 质粒介导	75.2	8559.7	+35.3	+77.8		1.1	56.1	6120.2	+33.9	+44.2						方形果
R <sub>14-1</sub>	Ri 质粒介导	95.1	10572.0	+71.04	+124.8		0	68.4	7456.9	+63.3	+57.8		7.88	-298.9	-324.6		长方形
R <sub>14-2</sub>	Ri 质粒介导	60.0	6736.7	+9.0	+43.3		4.7	61.2	6670.8	+46.1	+57.3		22.6	-39.1	-48.1		大方果
R <sub>14-1</sub> 自交	Ri 质粒介导	65.3	7259.2	+17.4		+4.6	13.3	55.4	6042.8	+32.41		+9.3	20.57	52.8		-38.6	梯形果
CK		55.6	6182.9	0			8.9	41.9	4563.7	0			31.43	0			方形果
CK <sub>1</sub>		42.3	4030.6		0		10.2	38.9	3706.6		0		33.46				方形果
CK <sub>2</sub>		6	5393.2			0	5.1	50.7	4831.0			0	28.5				梯形果

注:2002 年田间毒病的病情指数均很轻,故未统计转基因后代与对照的增减百分数。表中,CK 为哈椒一号,省指定对照品种;CK<sub>1</sub>(龙椒二号)为亲本 1;CK<sub>2</sub>(KL9262)为亲本 2。

## 2.4.2 花粉管通道法导入后代的检测

2.4.2.1 通过花粉管通道法获得的种子在无菌条件下接种于1/2MS(大量元素)无激素培养基上,诱导无菌苗,当无菌苗形成完整植株时,剪去根部,插入含有Km的MSO培养基上,诱导生根,能生根的无菌苗视为含有Km的植株。

2.4.2.2 PCR检测(方法同上) 本试验通过PCR检测,获得转基因后代14份。

## 2.5 转基因后代的田间鉴定与筛选

转基因植株中后代经连续加代、扩繁、及筛选,获得稳定株系66份,其中花粉管植株导入后代(代号D)17份,Ri质粒介导后代(代号R)49份。从中精选出17份优良株系经连续二年田间鉴定,获得稳定抗病、高产材料3份,高抗材料1份(见表)。由表显示:转基因后代的毒病病情指数均不同程度低于对照及其亲本,而产量多数高于对照。其中有11份连续两年增产17%以上。从中筛选出稳定、高产、高抗新品系(种质)三份:R<sub>9</sub>、R<sub>10-4</sub>、R<sub>14-1</sub>,两年分别增产42.1%~47.6%、92.1%~95.6%、71.04%~63.3%;毒病的病情指数分别减轻24.3%、111.1%、298.9%。1份高抗毒病新种质:D<sub>3-1</sub>,这份材料于2002年毒病指数为“0”级,2003年在田间毒病严重的情况下,该材料的毒病的病情指数仅为“7.27”,比指定对照品种“哈一”减轻332.3%,比原亲本“KL9262”减轻292.0%。

## 3 结语

3.1 通过外源DNA导入试验,提高甜椒的自身抗病毒的能力,从而大幅度提高作物产量,证实了应用转移抗病基因改善

甜椒抗性是甜椒抗病育种的最佳途径之一。

3.2 关于应用外壳蛋白基因(CP)培育抗病毒的安全性问题,因为甜椒是一个主要的果蔬类蔬菜,直接与人们身体健康有关,很容易引起人们的担心。其实利用CP基因培育抗病毒植物是十分安全的,因为CP基因转入甜椒核染色体,其基因产物是病毒外壳蛋白,这种蛋白本身无毒,不会象卫星RNA那样突变成新的病毒,因此不会产生危害人类的新物质。

3.3 本项研究者用已获得的新种质开展杂种优势利用研究,先后配制一批新组合已初步进行田间杂种优势鉴定,获得超双亲的高产、高抗新组合,目前正在进一步试验中。

## 参考文献:

- [1] 郭亚华,邓立平等.采用花粉管通道技术将外源DNA导入青椒、黄瓜的研究初报[J].哈师大自然科学学报,1995,11(2):82.
- [2] 王玉文,杨美珠等.甜椒的离体再生及基因转化[J].植物学报,1991,33(10):780~786.
- [3] 叶志彪,李汉霞等.辣椒转基因植株再生[J].植物学报,1993,35(增刊)88~93.
- [4] 周光宇等.农业分子育种——授粉后外源DNA导入植物的技术[J].中国农业科学,1988,21(3):1~6.
- [5] Fushs R L, Ream J E, Hammond BG, et al. Safety assessment of Neomycin Phospho transferase Protin[J]. Biol Technology, 1993, 11: 1543~1546.

(1.黑龙江省农科院园艺分院,哈尔滨 150069;2.哈尔滨师范大学,150040)

# 芦笋丰产栽培技术

## 于保营

芦笋的食用器官是嫩茎,由于其营养丰富,质脆味美,而越来越受到人们的喜爱,作为食用蔬菜,其具有较高的药用价值,能促进人体的新陈代谢,和胃利气,防止心脑血管疾病,抗癌防癌,增进身体健康,既可鲜食,也可加工制罐,是我国重要的出口创汇蔬菜。

## 1 对栽培环境要求

芦笋产于温带,性喜凉爽气候,不耐热,也不抗寒。最佳生长气温为20℃~30℃,15℃以下生长缓慢,低于5℃~6℃和高于35℃~37℃都会停长,气温30℃时,嫩茎生长伸长最快,但笋尖易张开,品质差。芦笋耐旱但不耐涝,喜土层深厚,有机质含量高,土质松软的砂土或砂质壤土。芦笋忌酸性土壤,pH值以6.5~7.0为最适宜。

## 2 栽培要点

2.1 芦笋是多年生连续采收作物,栽培后可连续采收10年以上,选土壤肥沃,地面平整的砂壤土,在普施底肥全面深翻的基础上,再开挖定植沟,定植沟南北走向,深、宽各40cm(厘米),行距,白芦笋1.6m~1.8m(米),绿芦笋1.4m~1.6m(米)为宜,667m<sup>2</sup>(平方米)沟施圈肥5000kg~10000kg(公斤),将沟土回填20cm~25cm(厘米),并与肥料混匀踩实,使定植沟深15cm~20cm(厘米),春秋均可定植,以春季为好。为提高早期产量,近年推广提前保护地育苗,小苗带土坨定植,定植期一般在5月中旬~6月上旬。

2.2 定植时,边起苗边定植,实行大中小苗分级定植,地下茎顺沟排放,方向一致,每沟单行,保持一条直线,定植深度以覆盖住根盘即可。株距30cm(厘米),白芦笋为1.6~1.8m×0.3m(米),每667m<sup>2</sup>(平方米)1200~1400株,绿芦笋为1.4~1.6m×0.3m(米),每667m<sup>2</sup>

(平方米)1400~1600株,栽后立即浇水,芦笋不耐涝,可避免笋田积水,及时排涝。

2.3 定植后到采收前管理 定植后一个月开始发新根,发新根期进行第一次追肥,以后每间隔一个月再追肥,追肥应前轻后重,每次追肥后培土,每次培土厚度为5cm(厘米),雨季到来前应填平定植沟,防止积水沤根。其次注意中耕除草,及时防治茎枯病,每月定期防治一次,尤其雨后要立即防治,用600~800倍多菌灵、甲基托布津、代森锰锌、粉锈宁等喷雾。

2.4 采笋期管理 白芦笋栽后第一次收期,在定植后第二年春天进行,采购前要培土软化,在3月下旬培土,4月10日前后开始采笋。绿芦笋不需培土软化。在留母茎的情况下,自3月下旬开始可一直采到10月底11月初。不管白芦笋或绿芦笋,采前都要进行培土处理,绿芦笋培土高度以15cm(厘米)为宜,白芦笋多在25cm~30cm(厘米),培成上窄下宽,断面为梯形的土埂,埂上宽30cm~40cm(厘米),下部宽50cm~60cm(厘米),埂要直,高度一致,笋行居中,采笋后还要放垄,放垄后管理同采购期。

## 3 采收

一般清明前后为采笋始期,白芦笋第一年可连续采收30d(天),第二年为40d(天),第三年为60d(天),第四年后80d~90d(天),采笋期间,每天上午查看埂面,见有点状潮湿或“龟裂”、“顶瓦”,下面即有应采嫩笋,伸出食指和中指,两指分开3cm(厘米),两指在笋间两侧轻扒茎土,使嫩笋露出5cm(厘米),用左手拇指、食指中指轻掐笋尖下3cm(厘米),右手持采笋刀距嫩笋3cm(厘米)插入土内,使刀柄与地呈75°角;土内发出响声,嫩茎切断,左手将笋提出,按级分别放进三格提盒内,用湿布遮盖避光保温,然后用湿土将采笋口封严拍实,绿芦笋采收,用镰刀自地平面平割,应于上午10时至下午4时采收为宜,为提高绿笋质量,维持生产力,应适当保留母茎,当年生留2株,二年生留2~3株,三年以上留3~4株,夏季高温多雨,以春季、秋季采收为好。

(山东省枣庄市市中区安城成教中心,277119)