

# 农杆菌介导的几丁质酶基因和β-1,3-葡聚糖酶基因转化辣椒研究

谢立波, 郭亚华, 王 雪, 高永利, 周 宇

(黑龙江省农业科学院 园艺分院, 黑龙江 哈尔滨 150069)

**摘 要:**以苗龄 7~10 d 的辣椒组培苗为被侵染的外植体,通过农杆菌介导几丁质酶基因和β-1,3-葡聚糖酶基因,研究基因型、外植体类型、抗生素浓度对辣椒遗传转化的影响,以期获得抗真菌病的转基因辣椒植株。结果表明:不同基因型间、外植体类型、抗生素种类和浓度对辣椒的遗传转化影响存在较大差异。以几丁质酶和β-1,3-葡聚糖酶为目的基因,应用根癌农杆菌介导法对辣椒进行了遗传转化,获得了 3 株抗性植株。

**关键词:**几丁质酶基因;β-1,3-葡聚糖酶基因;辣椒;转化

**中图分类号:**S 641.303.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2011)23-0097-05

辣椒(*Capsicum annuum* Linn)是茄科辣椒属植物,果实内含有丰富的维生素 C、蛋白质、糖类营养物质,深受人们喜爱。辣椒在我国的栽培面积较大,是世界主要的辣椒出口国。但是一直以来各种病害的大量发生给辣椒生产造成了极大的影响,大大地降低了其产量和品质<sup>[1-2]</sup>。随着分子生物学技术的快速发展,运用基因工程技术改良植物的抗病性已成为作物抗病育种的重要途径。

几丁质酶和β-1,3-葡聚糖酶是绝大多数真菌细胞壁的主要成分,存在于大多数植物细胞中,属于 PR 蛋白,通常植物体内的几丁质酶和β-1,3-葡聚糖酶只有低水平的组成型表达<sup>[3-4]</sup>。但在病原菌侵染、诱导物处理和各种伤害时可诱导产生几丁质酶和β-1,3-葡聚糖酶,积累在侵入植物体内的菌丝周围,抑制菌丝生长和孢子的萌发<sup>[5]</sup>。该研究通过农杆菌介导法将几丁质酶基因和β-1,3-葡聚糖酶基因导入辣椒,以期获得抗真菌病的转基因辣椒植株,为辣椒的抗病分子育种提供基础材料和理论依据,从而为解决辣椒抗真菌病的问题探索新途径。

第一作者简介:谢立波(1973-),女,硕士,副研究员,现主要从事空间诱变育种研究工作。E-mail:xielibow730215@sina.com。

责任作者:郭亚华(1953-),女,研究员,现主要从事植物空间诱变育种和生物技术工作。E-mail:guoyahua@sina.com。

基金项目:航天育种工程资助项目(2006HT20012);黑龙江省自然科学基金重点资助项目(ZD200818-01);黑龙江省自然科学基金资助项目(C200943)。

收稿日期:2011-09-10

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 植物材料、质粒和菌株 辣椒品种 1 号、2 号、3 号,由黑龙江省农业科学院园艺分院生物技术室提供。菌种为根癌农杆菌 LBA4404 (Rif<sup>R</sup>);质粒为 pBLGC (km<sup>R</sup>)上构建有几丁质酶基因和β-1,3-葡聚糖酶基因。菌种与质粒均由哈尔滨师范大学生物系遗传研究室提供。

1.1.2 培养基 辣椒组织培养基:MS 培养基;预培养和共培养基培养基均为:MS + 6-BA 5 mg/L + IAA 0.2 mg/L;脱菌培养基:MS + 6-BA 5 mg/L + IAA 0.2 mg/L + 不同浓度的 Km 和 Cef;生根培养基:MS + NAA 0.1 mg/L + 不同浓度的 Km 和 Cef;农杆菌培养基:YEB 培养基。

### 1.2 试验方法

1.2.1 材料处理 选取籽粒饱满的辣椒种子,在 50℃ 热水中浸泡 1 h,期间轻轻摇动,然后于 30℃ 水中浸种 48 h。用 70%乙醇消毒,同时用 20% NaClO 溶液浸泡 20 min,然后无菌水冲洗 4 次,冲洗后用无菌吸水纸吸干水分,播种于 MS 培养基上,28℃ 暗培养 3 d,然后移至光照条件下继续培养,每天光照 16 h,光照强度为 1 600~1 800 lx,培养温度为(26±1)℃。取苗龄为 7~10 d 的动苗作为被侵染的外植体。

1.2.2 基因型和外植体类型的影响 采用 1 号、2 号和 3 号 3 种基因型作为转化受体。同时对 3 种不同的外植体类型进行不定芽诱导,包括子叶节、子叶和下胚轴 3 种转化受体的筛选。

1.2.3 辣椒对 Km 的敏感性试验 芽分化阶段 Km 浓度的确定:初步筛选浓度试验:取 7~10 d 苗龄的辣

椒子叶和下胚轴各 20 块接种于含 Km 浓度为 0、25、50、75、100 mg/L 的诱导愈伤组织培养基上,3 次重复,14 d 后继代于分化培养基上,3 周后统计分化结果。最终筛选浓度的确定:以初步筛选结果为基础,进行第 2 次浓度梯度设计,设 0、30、40、50、60 mg/L 5 个梯度,方法同上,3 周后统计不同处理的分化结果。生根过程中 Km 浓度的确定:当芽长至 2~3 cm 时在超净工作台上切下,然后接种于生根培养基上,同时设置不同的 Km 浓度,分别为 0、5、10、15、20 mg/L,同时观察并记录生根情况。

1.2.4 抑菌试验 挑取农杆菌单菌落接种于含有抗生素的 YEB 液体培养基中培养(28℃,200 r/min),当 OD<sub>600</sub> 值测定约 0.5 时,对预培养 2 d 的辣椒子叶进行菌液侵染,共培养 2 d 后,将 1 号、2 号辣椒子叶外植体转移到含有不同浓度和不同种类脱菌剂的脱菌培养基上培养,观察各种抗生素对农杆菌的抑菌效果,记录培养基上出现肉眼可见的菌落的时间,并调查子叶生长情况。

1.2.5 转基因植株的 PCR 检测 以遗传转化后获得

表 1 外植体类型对辣椒再生频率的影响

Table 1 Effect of different explants on regeneration frequency of pepper

外植体类型 Types of explant	接种外植体数			分化外植体数			分化率		
	No. of explant inoculated			No. of explant differentiated			Frequency of differentiation/%		
	1 号 No. 1	2 号 No. 2	3 号 No. 3	1 号 No. 1	2 号 No. 2	3 号 No. 3	1 号 No. 1	2 号 No. 2	3 号 No. 3
子叶节 Cotyledon node	60	60	60	60	60	55	100	100	90.9
子叶 Cotyledon	60	60	60	60	60	53	100	100	88.3
下胚轴 Hypocotyls	60	60	60	34	33	32	56.7	55	53.3

2.2 基因型类型对转化的影响

由表 2 可知,不同基因型之间子叶和下胚轴的不定芽分化率不同,其中供试品种 1 号、2 号与 3 号再生频率存在较大的差异,而且不同基因型的同一种外植体再生频率差异较为显著,1 号品种的子叶和下胚轴

表 2 不同基因型对辣椒再生频率的影响

Table 2 Effect of genotypes on regeneration frequency of pepper

基因型 Gene type	接种外植体数		分化外植体数		分化率	
	No. of explant inoculated		No. of explant differentiated		Frequency of differentiation/%	
	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyls	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyls	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyls
1 号 No. 1	60	60	60	34	100	56.7
2 号 No. 2	60	60	60	33	100	55
3 号 No. 3	60	60	53	32	88.3	53.3

2.3 辣椒对 Km 的敏感性试验

2.3.1 芽分化阶段 Km 浓度的确定 初步筛选试验时,Km 设 0、25、50、75、100 mg/L 5 个浓度梯度。在 Km 为 50、75、100 mg/L 的培养基上,辣椒 1 号、2 号和 3 号子叶培养 3 周以后无任何愈伤和芽产生,并且逐渐黄化死亡。Km 浓度越高,黄化速度越快。而对照子叶 3 周后仍然为绿色,且分化大量愈伤组织,继代培养分化大量芽。由表 3 可知,Km 为 25 mg/L 时,辣椒

的再生植株叶片作为检测用材料。PCR 引物的合成及分子生物学试剂均由上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司提供。其中几丁质酶基因引物 1 的序列为 5'-CAGAATTCGGATGAAAAAAGCAGTCA-3'引物 2 的序列为 5'-CCGAGCTCTTAAGAAAGTATGATGGTGATG-3'。β-1,3 葡聚糖酶基因引物 1 的序列为 5'-GCGGATCCGACCATGGCTGCTATCACACTGC-3';引物 2 的序列为 5'-CGGTGACCTACCATCTCACTTACGAGA-3'。

2 结果与分析

2.1 外植体类型对转化的影响

由表 1 可知,由于外植体的类型不同,分化率差异较为显著,其中在同一基因型中子叶节、子叶的分化率最高,下胚轴最低。但继代培养后发现,子叶节上再生的芽伸长困难,并且畸形芽较多,这也许是由于每一子叶节上形成的芽数量较多的原因;而子叶和下胚轴上再生的芽伸长较为容易,并且芽生长正常。但下胚轴的分化率偏低,因此在以后的遗传转化中,主要选用子叶作为转化受体,下胚轴次之。

分化率分别为 100%和 56.7%;2 号品种的子叶和下胚轴分化率分别为 100%和 55%;3 号品种子叶和下胚轴分化率分别为 88.3%和 53.3%。1 号、2 号子叶再生频率与 3 号相比较高。

子叶分化受到明显抑制。当 Km 为 50 mg/L 时,则完全抑制愈伤组织的分化。因此,在此基础上,重新设置浓度梯度,分别为 0、30、40、50、60 mg/L。

由图 1 可看出,不同基因型对 Km 的敏感性不同。在 Km 为 40 mg/L 时,3 号的子叶出愈率均为 0,而 1 号、2 号子叶出愈率分别为 23.5%和 16.9%。这说明 3 号对 Km 敏感。因此,Km 使用浓度确定为:1 号子叶为 50 mg/L;2 号子叶为 50 mg/L,3 号子叶为 40 mg/L。

表 3 卡那霉素浓度梯度初步试验

Km 浓度		子叶出愈率		
Concentration of Kanamycin/mg · L <sup>-1</sup>		Callus induction rate of cotyledon/%		
		1 号	2 号	3 号
		1 号 Cotyledon No. 1	2 号 Cotyledon No. 2	3 号 Cotyledon No. 3
0		100	100	88.3
25		91.3	88.9	41.7
50		0	0	0
75		0	0	0
100		0	0	0

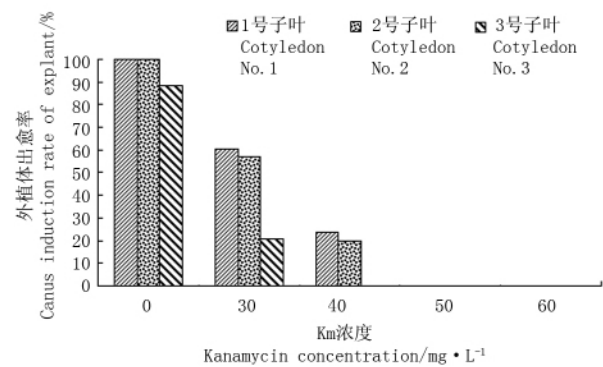


图 1 卡那霉素对辣椒子叶分化愈伤组织的影响

Fig. 1 The effect of kanamycin on callus differentiation of hypocotyl and cotyledon from pepper

2.3.2 不定芽生根阶段 Km 筛选浓度的确定 只在不定芽分化阶段探讨 Km 的适宜浓度来进行一次性筛选,效果不理想,容易增加假阳性抗性芽的获得。在生根阶段,试验将 Km 设 0、5、10、15、20 mg/L 5 个浓度梯度来探讨其对不定芽生根的影响。由表 4 可知,对照的生根率为 76.7%;当 Km 浓度为 5 mg/L 时,不定芽生根率明显受到抑制,下降到 30%;Km 浓

度达到 15 mg/L 时,则完全抑制不定芽的生根,接种的不定芽全部没有生根,随着培养时间的延长,不定芽逐渐黄化死亡。另外发现,在加 Km 的培养基和对照上,不定芽生根部位明显不同。只要培养基里含有 Km,根则从不定芽基部的培养基上方长出,而对照上的根从培养基中长出,这表明不定芽的根对 Km 极为敏感。因此确定不定芽生根阶段时卡那霉素的筛选压力为 15 mg/L。

表 4 卡那霉素对不定芽生根的影响

Effect of Kanamycin on root regeneration of adventitious bud			
Km 浓度	接种芽数	生根不定芽数	生根率
Concentration of Kanamycin/mg · L <sup>-1</sup>	No. of shoots inoculated/个	No. of explants differentiated/个	Rooting rate/%
0	30	23	76.7
5	30	9	30
10	30	1	3.3
15	30	0	0
20	30	0	0

2.4 抗生素对辣椒愈伤组织的诱导和分化的影响

由表 5 可知,抗生素浓度越高,则抑菌时间越长。而且对于进口和国产抗生素,当头孢霉素的浓度为 300 mg/L,均可以在 10 d 内抑制农杆菌的生长,并且进口抗生素抑菌的效果较好,可达到 15 d 以上。当国产头孢霉素为 400 mg/L 时,抑菌时间达到 15 d 以上。所以,在选用抗生素抑菌时,进口抗生素使用浓度选用 300 mg/L,而国产抗生素浓度选用为 400 mg/L,并且只要接种后 2 周转移 1 次即可,若不及时转移,则可能因抗生素 20 d 后效力减弱,农杆菌会过度繁殖。

表 5 抗生素对农杆菌抑制效果

抗生素种类 Antibiotics	浓度 Concentration							
	200 mg/L		300 mg/L		400 mg/L		500 mg/L	
	子叶 Cotyledon 1 号 No. 1	2 号 No. 2	子叶 Cotyledon 1 号 No. 1	2 号 No. 2	子叶 Cotyledon 1 号 No. 1	2 号 No. 2	子叶 Cotyledon 1 号 No. 1	2 号 No. 2
Cef(进口 Import)	+4	+3	+17	+16	—	—	—	—
Cef(国产 Domestic)	+3	+3	+13	+14	+18	+18	—	—

注:“+”表示有农杆菌;“—”表示无农杆菌;“+”后数字为农杆菌长出时间(d)。  
Note: ‘+’ show have *Agrobacterium rhizogenes*; ‘—’ show No *Agrobacterium rhizogenes*; figure after ‘+’ show the develop time(d) of *Agrobacterium rhizogenes*.

2.5 转基因植株的 PCR 检测

以转基因辣椒的总 DNA 为模板,以质粒 DNA 为阳性对照,未转化辣椒 DNA 为阴性对照,对转基因株系进行 PCR 鉴定。鉴定结果见图 2 和图 3,阳性对照及转基因株系均扩增出 0.9 kb 和 1.1 kb 左右的专一条带,而阴性对照都没有扩增出相应条带,这初步证明几丁质酶基因和 β-1,3 葡聚糖酶基因已经整合到辣椒基因组中。同时对辣椒 13 株转化株进行 PCR 检测,

结果发现,在 13 株转化株有 3 株阳性株,阳性率为 23.08%。

3 讨论

3.1 抗生素浓度对芽再生的影响

该试验结果表明,芽分化阶段 Km 的致死浓度分别为 1 号子叶为 50 mg/L,2 号子叶为 50 mg/L,而 3 号子叶为 40 mg/L,不定芽生根阶段对 Km 极为敏感,

致死浓度为 15 mg/L。该研究的致死浓度比文献报道的都低,这可能与辣椒的基因型和抗生素的来源有关。

王永勤等认为,筛选压力不宜确定为外植体的致死浓度<sup>[6]</sup>,筛选压力应该以能够可以抑制大部分不定芽分化的浓度为宜。这主要是由于农杆菌的侵染过程可以使植物细胞受到伤害,而没有转化细胞的全部死亡会使转化细胞得不到营养而死亡;另外外源基因在植物体内表达需要时间,转化细胞中的外源基因如果还没及时表达即被全部杀死,因而不能得到转化植株。

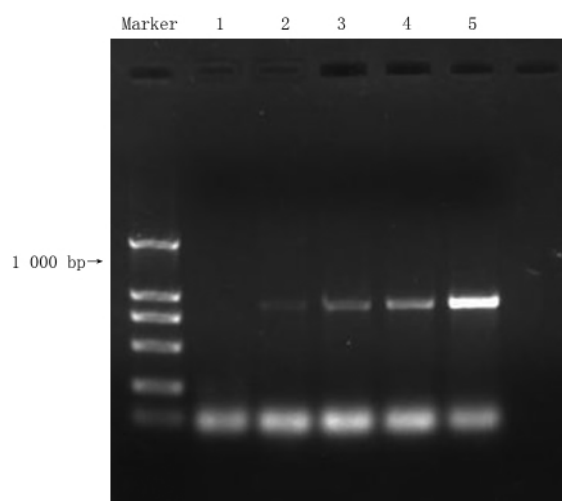


图 2 转基因植株 PCR 检测(几丁质酶基因)

注:1:阴性对照;2、3、4:转基因植株;5:阳性对照。

Fig. 2 PCR detection of transgenosis plant(chitinases gene)

Note: 1: negative control; 2, 3, 4: transgenosis plant; 5: positive control.

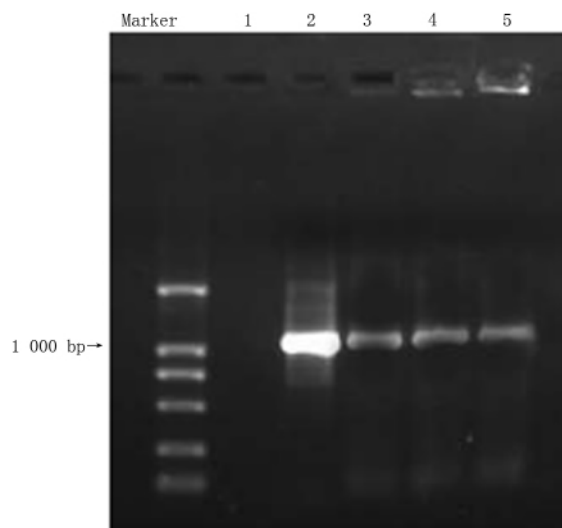


图 3 转基因植株 PCR 检测( $\beta$ -1,3 葡聚糖酶基因)

注:1:阴性对照;2:阳性对照;3、4、5:转基因植株。

Fig. 3 PCR detection of transgenosis plant( $\beta$ -1,3-glucanase)

Note: 1: Negative control; 2: Positive control; 3, 4, 5: Transgenosis plant.

### 3.2 抑菌剂的选择和浓度的确定

采用农杆菌介导转化法,在培养过程中必须使用抗生素以抑制农杆菌的生长。头孢霉素是目前使用较多的抑菌抗生素。该试验发现,国产的头孢霉素抑菌效果与进口的抗生素相似,均能抑制住农杆菌的生长,只是国产抗生素的使用浓度相对高于进口抗生素的使用浓度。但国产的头孢霉素能很好地抑制农杆菌生长,并且随着抗生素浓度的增加,抑菌效果增强,而外植体的出芽率也明显下降。并且在辣椒遗传转化中,要使用大量的抗生素,但是进口抗生素价格昂贵,因此建议以国产抗生素替代进口抗生素,从而降低试验费用。要达到既能很好地抑制农杆菌的生长,又能尽可能地减少对外植体的伤害,最好使用头孢霉素来除菌,使用浓度为 350 mg/L。

### 3.3 基因工程防治真菌病害的策略及存在的问题

几丁质酶基因转入植物防治真菌病害被广泛研究。几丁质酶具有抗真菌活性,相继报道不同来源的几丁质酶基因对立枯丝菌等 20 多种真菌表达出体外抑菌活性<sup>[7]</sup>。但由于单个基因的抑菌谱窄或选择性抑菌等原因,有时即使转化成功,获得的转基因植株抗病性也不太理想。生物体的多数性状都是由多基因控制的,因此,要获得能同时抗几种病菌或对某种病菌有较完全抗性的植株,最好同时导入多个目的基因。

几丁质酶基因和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶可直接破坏真菌顶端生长平衡,核糖体灭活蛋白阻碍真菌蛋白质的合成。蓝海燕等<sup>[8]</sup>将组成型表达几丁质酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的双价植物表达载体转化油菜,转基因植株活体接种油菜菌核病菌,转基因植株比对照显示较强抗病性。由于该试验中,获得的转化植株数量有限,用于测定的植株数偏小,所以抗病性无法进行统计学分析。

### 参考文献

- [1] 杨致芬,郭春绒. 空间诱变育种研究进展及其在辣椒中的应用[J]. 山西农业科学,2008,36(6):21-25.
- [2] 郭亚华,谢立波,王雪,等. 辣椒空间诱变育种技术创新及新品种(品系)培育[J]. 核农学报,2004,18(4):265-268.
- [3] 蓝海燕,田颖川,王长海,等. 表达  $\beta$ -1,3 葡聚糖酶及几丁质酶基因的转基因烟草及其抗真菌病的研究[J]. 遗传学报,2000,27(1):70-77.
- [4] 蒋昌顺,邹冬梅. 几丁质酶基因在大肠杆菌中的表达及其酶对柱花草胶炭疽病原菌的抑菌效果[J]. 草地学报,2000,8(2):107-114.
- [5] 许明辉,唐祚舜,谭亚玲,等. 几丁质酶和葡聚糖酶双价基因导入滇型杂交稻恢复系提高稻瘟病抗性的研究[J]. 遗传学报,2003,30(4):330-334.
- [6] 王永勤,肖兴国,张爱民. 农杆菌介导的小麦遗传转化几个影响因素的研究[J]. 遗传学报,2002,29(3):260-265.
- [7] 高必达. 植物几丁质酶的分子生物学研究进展[J]. 湖南农业大学学报,1996,22(6):587-602.
- [8] 蓝海燕,陈正华. 农杆菌介导的芸薹属植物遗传转化技术的研究进展[J]. 生物技术通报,1999(3):15-18.

不同品种菊花组织培养比较研究

丁世民<sup>1</sup>, 王泽宇<sup>2</sup>, 宋健云<sup>3</sup>, 朱明辉<sup>4</sup>, 郝会军<sup>1</sup>

(1. 潍坊职业学院 园林工程系, 山东 潍坊 261031; 2. 山东农业大学, 山东 泰安 271000; 3. 诸城市园林处, 山东 诸城 262200; 4. 海阳市园林处, 山东 海阳 265100)

摘 要:以“大地红”、“金丝菊”、“红线金钩”、“天王山”、“风清月白”、“东海月”、“富士丽花”、“北京红”、“彩霞万缕”、“金龙盘红”、“光辉”、“金钩挂月”、“星火”、“墨荷”、“美国粉”、“绿牡丹”、“满江红”、“红世界”、“清水岸”、“绿朝云”20 个菊花品种为试材,以菊花的花蕾作为外植体,在相同的培养条件下,对不同菊花品种愈伤组织的诱导、丛生芽的诱导及生根状况进行研究。结果表明:不同的菊花品种无菌繁殖系的建立、愈伤组织的诱导、芽的诱导以及生根状况都存在着较大的差异。

关键词:菊花;花蕾;组织培养  
中图分类号:S 682. 1<sup>+</sup>1 文献标识码:A 文章编号:1001—0009(2011)23—0101—03

菊花为菊科菊属多年生宿根花卉,原产我国,是世界四大切花之一。近年来,随着世界花卉业的发展和人们物质生活水平的提高,通过传统的扦插、嫁接等繁殖方法已不能满足人们的需要,而组织培养方法不仅繁殖系数高、繁殖速度快,而且还可以进行品种的脱毒复壮、种质资源保存等。菊花的花蕾发育程度较高,由它经组织培养形成的幼苗,能够较好的保持原品种的优良特性。该试验通过对不同品种菊花花蕾的组织培养,研究不同品种菊花在相同培养条件下的差异性。

第一作者简介:丁世民(1964-),男,山东安丘人,硕士,教授,主要研究方向为园林植物病虫害防治与生物技术。E-mail:dingshimin@126.com。  
收稿日期:2011—09—08

1 材料与方法

1.1 试验材料  
试验用菊花取自潍坊职业学院菊花品种资源圃,选取菊花花蕾作为试验外植体,不同品种菊花名称及代码见表 1。

表 1 不同品种菊花名称及代码

品种名	代码	品种名	代码
“大地红”	A	“光辉”	K
“金丝菊”	B	“金钩挂月”	L
“红线金钩”	C	“星火”	M
“天王山”	D	“墨荷”	N
“风清月白”	E	“美国粉”	O
“东海月”	F	“绿牡丹”	P
“富士丽花”	G	“满江红”	Q
“北京红”	H	“红世界”	R
“彩霞万缕”	I	“清水岸”	S
“金龙盘红”	J	“绿朝云”	T

Study on the Transforming Chitinase and β-1,3-glucanase to Pepper Via *Agrobacterium tumefaciens*

XIE Li-bo, GUO Ya-hua, WANG Xue, GAO Yong-li, ZHOU Yu  
(Horticultural Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069)

**Abstract:** *In vitro* plant of pepper at about 7~10 d were used as material of infection for transformation of fungi resistant genes Chitinase and β-1,3-glucanase via *Agrobacterium tumefaciens* to study the impact from genotype, explant type and concentration of antibiotic on genetic transformation of pepper, in order to obtain resistant plant through gene modification. The results showed that significant difference appeared in the transformation with various genotypes, explants types, varieties of antibiotics and the concentration. Three resistant pepper plants were gained after transformation of genes of chitinase and β-1,3-glucanase via *agrobacterium tumefaciens*.

**Key words:** chitinase; β-1,3-glucanase; pepper; transformation