

# 新疆甜瓜高效再生体系的建立 及 *NPR1*/*HRP* 双价抗病基因转化

冯玉杰, 王爱英, 沈海涛, 祝建波

(石河子大学 农业生物技术重点实验室, 新疆 石河子 832000)

**摘要:**以厚皮甜瓜 5 d 龄无菌苗子叶为外植体, MS 和 1/2MS 为基本培养基, 研究了添加 6-BA、IAA 和卡那霉素不同浓度, 进行甜瓜再生体系与根癌农杆菌介导的转化体系的建立。结果表明:甜瓜子叶最适宜的不定芽分化培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L, 芽伸长培养基为 MS+6-BA 0.75 mg/L+IAA 0.3 mg/L, 生根培养基为 1/2MS+IAA 0.3 mg/L, 适宜的转化条件为外植体预培养 48 h, 农杆菌菌液浓度为  $OD_{600}=0.3\sim0.4$ , 侵染时间为 15 min, 22℃ 暗培养 48~55 h。经 75 mg/L 的卡那霉素筛选, 共获得再生甜瓜幼苗 21 株, 其中 8 棵经 PCR 鉴定证明 *NPR1*/*HRP* 双价抗病基因已经整合到甜瓜基因组中, 即转化率为 38%。

**关键词:**甜瓜; 再生体系; 双价抗病基因; 农杆菌介导

**中图分类号:**S 652.603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)03-0144-05

厚皮甜瓜(*Cucumis melo*) TM105 和 TM108 的杂交种, 甘美肥厚, 芳香醇郁, 细脆爽口, 皮厚肉美, 但是抗病性比较差。其中, 真菌性病害, 如疫霉病、枯萎病、白粉病等, 是造成产量锐减、品质恶化的主要原因<sup>[1]</sup>。随着植物细胞工程和基因工程技术的迅速发展, 应用组织培养、基因转化等技术手段进行甜瓜品质改良、提高抗逆性、创造新品种, 成为培育优良品质甜瓜的快速有效的新方法。相继报道将抗卡那霉素基因(*NPTII*)<sup>[2]</sup>、黄瓜花叶病毒外壳蛋白(CMV-CP)<sup>[3-4]</sup>、西葫芦黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因(*ZYMY-CP*)<sup>[5-7]</sup>等基因转入甜瓜中。国内也有相关方面的报道。这已成为进行甜瓜遗传育种、品种改良, 拓宽种植资源的一条有效途径。

植物在生存过程中经常是受到一些病原微生物的侵袭, 在与病原体长期共同进化过程中获得了一系列复杂而有效的防御机制来保护自身。系统获得性抗性(Systemic acquired resistance, SAR)就是植物抵抗病原菌侵袭的防御机制之一, 其信号转导途径一直是研究的热点。植物防御病原物侵染的抗性机制由不同水平的

多个抗性途径交叉、重叠组成, 使得植物抗病性具有多种表现形式, 包括基础抗性、诱导抗性和由抗病基因决定的抗性等。不同形式的抗病性信号传导途径有区别, 也有重叠和交叉。其中的交叉点将是调节植物整体抗病性的重要因子。近年来的研究表明, *NPR1* (non-expressor of pathogenesis related genes 1) 就是其中之一。*NPR1* 不仅对 SAR 和 ISR 起核心调控作用, 而且也是基础抗性以及由抗病基因决定的抗性的重要调控因子。*HRAP* (Hypersensitive response-assisting protein) 是从甜胡椒中克隆的基因, 它表达蛋白可以增强 Hrp 家族的 harpinss 引起的超敏反应 (hypersensitive response HR)。当植物受到病原物侵袭的情况下, 受侵染的部分会发生超敏反应, 而 *HRAP* 蛋白的含量也会迅速增加, 可以增加对病原物的敏感性, 使植物迅速发生超敏反应, 从而引发植物获得对多种病原物的广谱可持续的抗性。

*PR-1a*, *SAR8.2b* 基因是烟草系统获得性抗性中的下游防御响应基因, 它的启动子受病原物和水杨酸(SA)诱导。用 *PR-1a* 基因启动子和 *SAR8.2b* 基因启动子分别驱动 *NPR1* 基因和 *HRP* 基因的表达, 构建的双价诱导型的植物表达载体 pCambia2300-*PR1a*-*NPR1*-*SAR*-*HRP*。当植物受到病原物侵染时, 通常会引发产生 SA 信号分子, 诱发 SAR 的产生, 即而启动 *PR-1a*、*SAR8.2b* 基因启动子控制的外源 *HRP* 和 *NPR1* 基因的转录, 从而形成正向反馈和级联放大信号的作用, 加快植物产生 HR 的速度以及提高系统获得抗性的强度, 以达到提高

**第一作者简介:**冯玉杰(1984-), 男, 在读硕士, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: fengyujie175@sina.com。

**通讯作者:**祝建波(1967-), 男, 博士, 研究员, 现主要从事转基因植物研究工作。E-mail: zjbshz@126.com。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30860071); 石河子大学高技术引进人才资助项目。

**收稿日期:**2010-11-23

植物广谱抗病性的目的<sup>[8-9]</sup>。因此该项目实施对于甜瓜转基因抗病育种提供了一种切实可行的新思路。

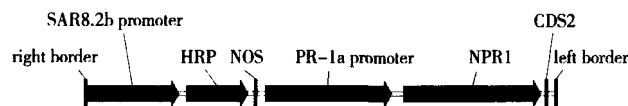


图1 pCAMBIA2300-PR1a-NPR1-SAR-HRP 植物双价表达载体

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

厚皮甜瓜 TM105 和 TM108 的杂交种,由新疆农人种子有限公司提供。根癌农杆菌 GV3101 和含 *NPR1*/*HRP* 基因的大肠杆菌由石河子大学农业生物技术重点实验室保存。生长调节剂 6-BA,KT,IAA、头孢霉素、卡那霉素、*Taq* DNA 聚合酶及其他试剂均为国产或进口分析纯试剂,引物合成由上海生物工程公司合成。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体的准备** 挑选饱满的甜瓜种子,去掉种壳后用 70%乙醇处理 15 s,0.1%的升汞处理 7~10 min,用无菌水冲洗 4~5 次,每次 4~5 min,并且不断摇动以洗去升汞。然后用灭菌滤纸吸干种子表面的水,接种到种子萌发培养基上,暗培养 48 h,后转移到 26℃,3 000 lx 光照强度,16 h/8h 光周期下培养。

**1.2.2 筛选最适的诱导不定芽的植物激素浓度** 取 5 d 苗龄的甜瓜子叶,自基部 1~2 mm 处剪下,横切为二,弃远轴端,将近轴端子叶的叶边缘去掉,正面接触培养基接种到芽诱导培养上,待 2 d 后外植体向上翻卷,为使外植体充分接触培养基,将外植体正面朝上重新接入培养基。在正常光周期下培养,诱导不定芽分化。15 d 继代 1 次,30 d 统计不定芽及愈伤组织的生长情况。

表 1 诱导不定芽分化培养基

培养基编号	培养基	6-BA/mg · L <sup>-1</sup>	IAA/mg · L <sup>-1</sup>
1	MS	0.5	0.3
2	MS	1.0	0.3
3	MS	1.5	0.3
4	MS	2.0	0.3
5	MS	2.5	0.3

**1.2.3 不定芽的伸长、生根与移栽** 将长势良好的不定芽丛从其基部切下,转移到不定芽伸长的芽生长培养基(含 0.5 mg/L 的 6-BA+0.3 mg/L 的 IAA)上,诱导簇生芽伸长。待芽长到 2~3 cm 大小时,将其从基部切下,转接到生根培养基上,在 26℃,3 000 lx 光照强度,16 h/8h 光周期下培养。待长出不定根后移栽。

**1.2.4 利用根癌农杆菌接介导的遗传转化** 将课题组实验室保存的 *NPR1*/*HRP* 双价质粒运用热击法转入 GV3101 中,挑取单克隆进行 PCR 鉴定为阳性的菌种,表明双价质粒已经转入农杆菌中,保存备用。将保存的

*NPR1*/*HRP*(GV3101)接种至含有卡那霉素(50 mg/L)+庆大霉素(40 mg/L)+利福平(50 mg/L)的 LB 液体培养基,28℃恒温培养 24~48 h;取 200 μL 上述培养物,加入到 50 mL 含相应抗生素的 LB 液体培养基中,28℃,250 r/min 振荡培养 4~5 h,至 OD<sub>600</sub>=0.3~0.4;将此培养物离心,收集菌体,用无菌 MS 液体培养基重悬菌体,备用。将预培养 48 h 的子叶外植体放入上述制备好的农杆菌侵染液中 15 min 左右。取出后用无菌滤纸吸去多余的菌液,正面朝上接种到铺有 1 层无菌滤纸的原培养基中,暗培养 48~60 h。然后转移到芽诱导培养基(MS 含 1.0 mg/L 的 6-BA,75 mg/L 的卡那霉素,500 mg/L 的头孢霉素)。大约 4 周后,长出丛生芽,切下不定芽转入芽伸长培养基(MS 含 0.5 mg/L 的 6-BA,0.3 mg/L 的 IAA,75 mg/L 的卡那霉素,500 mg/L 的头孢霉素)中,15 d 更换 1 次培养基。待不定芽伸长 2~3 cm 后,切下后接种到生根培养基(MS 含 0.25 mg/L 的 IAA,75 mg/L 的卡那霉素,500 mg/L 的头孢霉素)中,直到长出白色的根。待苗长出 4~5 片真叶后,经练苗后移栽到草炭土中,在光照培养箱中培养。

**1.2.5 转基因甜瓜的检测** 用 SDS 法提取甜瓜基因组 DNA,用 *HRP* 及 *NPR1* 特异性引物:*NPR1*-up:5' GGA TCC CGG AAC CTG TTG ATG GAC 3';*NPR1*-down:5' GAC TGA CGC CAA GGA TAG AG 3'<sup>[8]</sup>; *HRP*-up:5' GGA TCC ATG AAA ATG AAG AAC CTC TC 3'; *HRP*-down:5' GAG CTC TTA AAA TAG TTG ACC AAG GGT 3'<sup>[9]</sup>进行鉴定。反应体系:基因组 DNA 0.5 μL,上下游引物(10 μM)各 0.5 μL,10×*Taq* Plus Buffer 2.5 μL,dNTPs(2.5 U/μL) 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 14 μL,总体积 25 μL。*HRP* 反应程序:94℃预变性 4 min,94℃变性 30 s,56℃复性 30 s,72℃延伸 90 s,30 个循环后,72℃保温 7 min;*NPR1* 反应程序:94℃预变性 4 min,94℃变性 30 s,58℃复性 30 s,72℃延伸 90 s,30 个循环后,72℃保温 7 min。PCR 产物做琼脂糖凝胶电泳。

## 2 结果与分析

由于甜瓜种皮不够致密,种皮内部带菌,所以必须去除外壳<sup>[10]</sup>,但是裸露的种胚对乙醇及升汞的耐受能力比较差。试验中采用 70%乙醇处理 30 s,0.1%升汞浸泡 7 min 就能达到很好的灭菌效果。时间过长会对种子有损伤,影响种子的发芽率,时间太短灭菌不彻底。MS 培养基含有植物生长所需的物质,所以选择 MS 作为基本培养基。6-BA 对甜瓜不定芽的诱导起关键作用。从 0.5~2.5 mg/L 的 6-BA 都有丛生不定芽产生,但是随着浓度的升高,愈伤组织大量增加,影响不定芽的生长。而低浓度 6-BA 作用下,不定芽生长缓慢(表 2)。

表 2 不同 6-BA 浓度对不定芽诱导的影响

培养基编号	总外植体数 /个	再生芽外植体数 /个	再生芽频率 /%	愈伤外植体数 /个
1	20	18	90	20
2	20	19	95	20
3	20	19	95	20
4	20	15	75	20
5	20	14	70	20

所以该试验选择 1.0 mg/L 的 6-BA 作为最佳浓度,不定芽的诱导率可达到 95%。同时发现,甜瓜在培养过程中出现极性现象,不定芽几乎全部出现在近轴端,与大部分学者的研究一致。切下不定芽转移到芽伸长培养基中,低浓度的 6-BA 和 IAA 可以促进芽的伸长。当芽伸长到 2~3 cm 时,将芽体切下,转移到含低浓度 IAA 的 1/2MS 生根培养基中,生根率达 100%。

将通过筛选得到的甜瓜移栽,用 SDS 法提取 DNA,用特异性 NPR1 与 HRP 引物进行 PCR 鉴定,分别得到与大小相同的目的条带(图 2、3),说明目的基因已经整合到甜瓜中。通过根癌农杆菌介导的方法成功将 NPR1/HRP 双价基因转化入甜瓜中(图 4~7)。

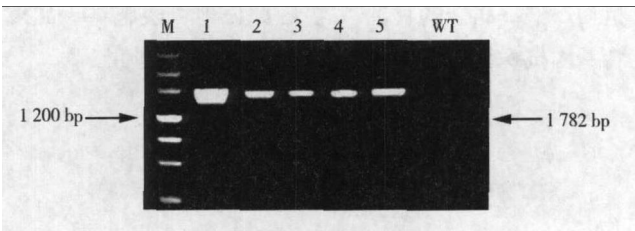


图 2 转基因甜瓜 DNA PCR 鉴定

注: Lane M, DNA markerIII; Lane 1, Amplification of NPR1 from plasmid; Lane 2~5, Amplification of NPR1 from transgenic DNA; Lane WT, negative control.

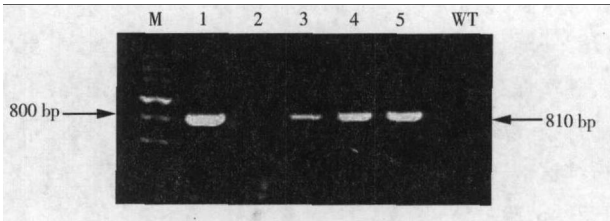


图 3 转基因甜瓜 DNA PCR 鉴定

注: Lane M, DNA markerIII; Lane 1, Amplification of HRP from plasmid; Lane 2~5, Amplification of HRP from transgenic DNA; Lane WT, negative control.



图 4 诱导出的簇生芽

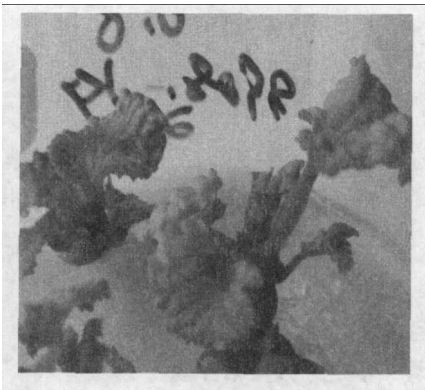


图 5 不定芽伸长



图 6 不定芽生根

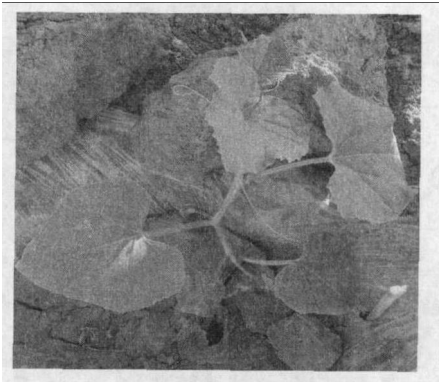


图 7 转基因甜瓜移栽到大田

### 3 讨论

建立高效的甜瓜再生体系是获得转基因甜瓜的关键,其中最重要的就是选择合适的外植体以及激素的配比。大部分学者利用子叶作为外植体<sup>[11]</sup>,主要是因为子叶易于操作,同时子叶的再生能力>胚轴>真叶>胚根<sup>[12]</sup>。6-BA是诱导不定芽的主要激素,附加低浓度的IAA更有利于不定芽的伸长。同时甜瓜子叶的分化能力出现极性现象,即不定芽总产生在子叶近轴端,这可能是跟甜瓜本身的内源激素有关。同时在试验过程中发现有褐化和玻璃化的现象。褐化主要是因为植物组织产生大量的酚类化合物氧化后所致,加氧化剂、活性炭都可以减缓褐化的发生。低浓度的6-BA不但有利于不定芽的诱导,减少畸形芽的产生,还可以减缓褐化的程度。而玻璃化主要与培养器皿内的水分、营养、激素有关。克服玻璃化的方法主要是调节激素的适当配比,避免幼苗的不正常脱分化<sup>[13]</sup>。在继代培养中逐步降低细胞分裂素的浓度都能在一定程度上减少玻璃化<sup>[14]</sup>,与该试验结果一致。

利用根癌农杆菌介导的遗传转化是一个比较复杂的过程,农杆菌侵染液浓度、侵染时间、共培养时间及选择压等都会影响转化率。大部分学者认为OD值在0.3~0.6之间的菌的活性较高,利于转化。在试验过程中发现,侵染时间超过20 min时,外植体受到农杆菌的毒害较大,但是侵染时间太短影响转化率,所以选择15 min的侵染时间。一定时间的共培养是必须的,大多数学者认为暗培养有利于提高再生频率,但是不同植物的共培养时间有所区别。试验发现,超过60 h后,农杆菌难以控制,所以48~55 h是比较理想的暗培养时间。其次外植体苗龄也是重要的影响因素,主要是因为甜瓜的再生比较困难,选择5 d苗龄的子叶作为外植体,此时的子叶的再生能力较强,同时对农杆菌的毒害的抵抗力较强。不定芽的分离要把握好时间,切下的不定芽比较小时,很难再进一步伸长,从而影响生根,所以在试验过程选择2 cm左右的不定芽切割下来,进行生根培养。对转化的甜瓜幼苗提取DNA,并进行PCR鉴定,证明目的基因已经整合到甜瓜中。该试验共获得21株生根的转基因甜瓜幼苗,但是在做PCR鉴定时,只有8株可以检测出目的基因条带,所以即使能在含有卡那霉素筛选培养基上生长并生根的幼苗,做PCR鉴定时发现会出现假阳性,可能是因为卡那霉素的浓度过低或者外植体再生部位与选择培养基未充分接触,选择压不起作用。所

以在分化再生过程中,可以通过逐渐加大卡那霉素的浓度,降低假阳性的出现。其中1棵只能检测到HRP基因,NPR1基因未检测到,因为T-DNA插入植物基因组是随机的。转移的全过程,包括农杆菌附着植物细胞壁,在农杆菌中被加工剪切,越过细菌的细胞膜、细胞壁,以及植物的细胞壁、细胞膜,最后越过核膜,整合进植物基因组,这是一个十分复杂的生物学过程。所以出现假阳性,很可能是NPR1基因在转移的过程丢失所致。甜瓜的转化率相对较低,可能是转化条件不够优化或者甜瓜本身的基因比较复杂有关系。如何提高甜瓜的转化率以及对转双价基因甜瓜的抗病性还需要进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] 孔庆军,任雪艳,祝建波.新疆伽师瓜高效再生系统建立及抗真菌病基因转化[J].西北农业学报,2008,17(2):207-211,217.
- [2] Choi P S, Soh W Y, Kim Y S. Genetic Transformation and Plant Regeneration of Watermelon Using *Agrobacterium Tumefaciens* [J]. Plant Cell Rep, 1994, 13: 344-348.
- [3] Fang G Z W, Guimet R. *Agrobacterium Tumefaciens* Mediated Transformation and Regeneration of Muskmelon Plants [J]. Plant Cell Rep, 1990, 9: 160-164.
- [4] Fang G Z W, Guimet R. Genetic Engineering of Potyvirus Resistance Using Constructs Derived from the Zucchini Yellow Mosaic Virus Coat Protein Gene [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 1993, 6: 358-367.
- [5] Valles M P, Lasa J M. *Agrobacterium*-mediated Transformation of Commercial Melon [J]. Plant Cell Rep, 1994, 13: 145-148.
- [6] Yshioka K. Successful Transfer of the cucumber mosaic virus coat protein gene to *Cucumis melo* L. Japan [J]. Breed, 1992, 42: 277-285.
- [7] 薛宝娣,陈永莹.转CMV基因的番茄、南瓜和甜瓜植株的抗病性研究[J].农业生物技术学报,1995,3(2):58-62.
- [8] 刘海亮,缪建银,祝建波.小拟南芥NPR1基因的克隆、序列分析及原核表达[J].兰州大学学报,2005,41:506-511.
- [9] 王爱英,缪建银,彭晓明,等. HRAP基因诱导型植物表达载体的构建及烟草转化[J].西北农业学报,2009,18(6):157-160.
- [10] Yadav R C, Salah M T, Grumet R. High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon [J]. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 1996, 45: 207-214.
- [11] 陶兴林,黄永红,陆璐,等.两个甜瓜品种高效再生体系的建立[J].西北植物学报,2005,25(4):806-811.
- [12] 钟俐,钟伶.新疆优质甜瓜高效离体再生体系的建立[J].新疆农业大学学报,2002,25(1):31-34.
- [13] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学出版社,1998:482.
- [14] 贾士荣,王志兴.农杆菌介导的植物遗传转化[M]//莽克强.农业生物工程.北京:化学工业出版社,1998.

# 杀菌剂在莲瓣兰原生地萌发胚培养中的应用

李海峰<sup>1</sup>, 赵志莲<sup>2</sup>, 胡侃<sup>1</sup>, 李明<sup>1</sup>

(1. 大理学院 药学院, 云南 大理 671000; 2. 云南省大理农业学校, 云南 大理 671003)

**摘要:**以莲瓣兰杂交种子原生地播种萌发突破种皮后的胚为外植体,研究了培养基中添加不同种类、不同浓度的杀菌剂对胚培养过程中真菌污染的控制作用。结果表明:培养基中添加培福朗、苯菌灵和代森锰锌能有效控制莲瓣兰杂交种子原生地萌发突破种皮后的胚培养过程中的真菌污染,胚污染率可以控制在 10.0 % 以内,培养基中添加培福朗时胚成活率显著高于添加苯菌灵和代森锰锌,胚成活率高达 92.4 %;培养基中培福朗浓度在 0.5~1.0 mg/L 范围内时胚污染率能够控制在 9.0 % 以内,胚成活率超过 92.3 %,不仅能有效控制莲瓣兰杂交种子原生地萌发突破种皮后的胚培养过程中真菌污染,还能促进胚生长发育转绿成根状茎。

**关键词:**莲瓣兰;胚培养;杀菌剂;真菌污染

**中图分类号:**S 682.2<sup>+</sup>9;S 603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)03-0148-03

莲瓣兰(*Cymbidium tortisepalum*)是兰科(Orchidaceae)兰属(*Cymbidium*)植物中主要分布在滇西北“三江”并流区的温带性地生兰<sup>[1]</sup>,别名小雪兰、卑亚兰、萱草兰,具有很高的观赏价值和经济价值。但是,由于全球“兰花热”和经济利益的驱使,从 20 世纪 80 年代至今,经

过 20 多年的挖掘,野生莲瓣兰种质资源遭到了毁灭性破坏<sup>[2]</sup>,野生种质资源濒临灭绝。

多年来,课题组对莲瓣兰杂交育种、杂交种子非共生萌发、杂交种子原生地播种共生萌发及植株形态发生过程进行研究发现<sup>[3]</sup>,莲瓣兰种间杂交亲和性较强,杂交种子在非共生条件下很难萌发,但是莲瓣兰杂交种子在原生地播种容易萌发,从播种到种子被共生萌发菌感染突破种皮只需 8~14 个月时间,可是从种胚突破种皮后经根状茎途径到完整植株再生过程极其缓慢,一般需要 4~6 a 的时间。为了缩短莲瓣兰种子萌发到完整植株形态发生过程,建立稳定的莲瓣兰杂交育种胚培养及植株再生体系,达到快速繁殖的目的。前期研究结果发

**第一作者简介:**李海峰(1971-),男,白族,云南大理人,硕士,副教授,现主要从事植物组织的研究工作。E-mail: lihfh888@sina.com。

**基金项目:**云南省大理州科技局 2007 年资助项目;大理学院药物研究所资助项目(2009yy02)。

**收稿日期:**2010-11-16

## Research on Construction of Regeneration System of Xinjiang Muskmelon and Transformation with *NPR1* and *HRP* Disease-resistance Bivalent Gene

FENG Yu-jie, WANG Ai-ying, SHEN Hai-tao, ZHU Jian-bo

(Agriculture Biotechnology of Major Lab of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000)

**Abstract:** In order to establish the regeneration and transformation system, the cotyledons of five-day muskmelon as explants, MS and half-strength MS medium as basic medium with different 6-BA, IAA and kanamycin. The results showed that the optimum medium for Adventitious buds was MS medium supplemented with 1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA, the medium for adventitious buds to elongate was MS medium supplemented with 0.75 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA, the root induction medium was 1/2 MS medium with 0.3 mg/L IAA. The optimum transformation conditions were 48 hours pre-cultured for the explants,  $OD_{600}=0.3\sim0.4$  for *Agrobacterium tumefaciens* cell density, 15 minutes for inoculation duration, 48~55 hours for co-cultivation in darkness at 22°C. Obtained 8 out of 21 transgenic plantlets with 75 mg/L kanamycin selection concentration medium, were confirmed by PCR that *NPR1* and *HRP* disease-resistance bivalent gene had transferred into the genome of muskmelon plants by *Agrobacterium*-mediated, the transformation efficiency was about 38%.

**Key words:** muskmelon; regeneration system; disease-resistance bivalent gen; *agrobacterium*-mediated