

农杆菌介导几丁质酶基因转化南瓜的研究

王晶晶, 屈淑平, 崔崇士

(东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 选用“金辉一号”为试验材料, 通过农杆菌介导成功地将菜豆几丁质酶基因导入到南瓜中, 4株转化植株的PCR检测结果为阳性, 扩增出900bp的目标带, 初步证明几丁质酶基因整合到南瓜基因组中。

关键词: 南瓜; 根癌农杆菌; 几丁质酶基因; 遗传转化

中图分类号: S 642.103.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2007)10-0184-02

南瓜营养丰富, 具有较高的食用价值和经济价值。但栽培中南瓜的真菌病害大大降低了南瓜的产量和品质。而通过常规育种方法选择抗病品种周期长, 很难满足南瓜生产的需求。因此, 近年来以导入目的基因创造新种质的生物技术手段的应用, 为南瓜抗病育种的选育开辟了一条新途径。试验是用广谱抗真菌的几丁质酶基因转化南瓜, 试图为南瓜抗病育种寻求一条快速有效途径。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验选用“金辉一号”南瓜品种为农杆菌介导转化的外植体, 由东北农业大学南瓜实验室提供。

1.2 菌株及质粒

试验所用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株为EHA 105, 内含双元载体PBCH, 由黑龙江省农业科学院李柱刚惠赠, 其结构如图1。质粒PBCH含有新霉素磷酸转移酶基因(NPT II)和菜豆几丁质酶基因, PBCH质粒大约是13.4 Kb, 目的基因900 bp左右。

1.3 转化与筛选

1.3.1 菌液准备 将含有目的基因的农杆菌涂布在含有抗生素的固体LB(胰化蛋白胨10 g/L+酵母提取物5 g/L+NaCl 10 g/L+氯霉素25 mg/L+卡那霉素50 mg/L, pH值7.0)平板上, 28℃暗培养1~2 d, 至长出单菌落。挑取单菌落接种于含有相应抗生素的5 mL液体LB培养基中, 28℃, 200 rpm。进行二次活化, 当菌液浓度达到OD₆₀₀=0.4~0.6时, 吸取菌液于无菌离心管中,

2 000 rpm离心10 min, 弃上清, 用等体积的液体MS培养基重悬菌体, 作为转化用菌液。

1.3.2 转化 南瓜种子用70%乙醇浸泡30 s, 转入0.1%升汞中处理8 min(期间不断摇动), 用无菌水冲洗3~4次, 用灭菌后的滤纸吸干水分后放入培养基(MS+蔗糖30 g/L+琼脂8 g/L)培育无菌苗, 选取7 d左右苗龄的南瓜无菌苗的子叶切成5 mm×5 mm的叶块预培养2 d, 放入上述重悬的菌液中侵染15 min后取出, 用无菌滤纸吸去表面的菌液, 然后将其放到培养基(MS+1.0 mg/L 6-BA+0.8 mg/L NAA+30 g/L蔗糖+8 g/L琼脂+30 mg/L乙酰丁香酮, pH值5.5)中于26℃、黑暗环境中培养2 d。

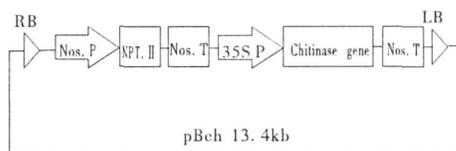


图1 质粒PBCH的结构图

1.3.3 转化体的筛选 共培养2 d后转移至加有除菌剂的MS液体培养基中, 除菌剂为头孢霉素, 浓度为500 mg/L, 静置15 min, 然后用无菌滤纸吸干水分, 接种于培养基(MS+1.0 mg/L 6-BA+0.8 mg/L NAA+30 g/L蔗糖+8 g/L琼脂+90 mg/L卡那霉素+500 mg/L羧苄青霉素, pH值为5.8)诱导芽分化。待芽长至2~3 cm高时, 切下转入诱导生根培养基(1/2MS+0.05 mg/L NAA+30 g/L蔗糖+卡那霉素70 mg/L+羧苄青霉素500 mg/L琼脂+8 g/L)中选择生根, 能生根的植株经PCR鉴定后, 驯化移栽。

1.4 转基因植株的鉴定

取筛选出的植株的叶片用CTAB法提取植物总DNA, 用PCR技术扩增部分几丁质酶基因的目标序列, 对抗性植株进行PCR鉴定。两个特异性引物(由上海生物工程有限公司合成)分别为菜豆几丁质酶基因编码区

第一作者简介: 王晶晶(1980-), 女, 东北农业大学硕士研究生, 研究方向: 蔬菜育种。

通讯作者: 崔崇士, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 蔬菜遗传育种和生物技术研究。E-mail: shwkj@mail.neau.edu.cn。

基金项目: 2006年哈尔滨市科技攻关资助项目(2006AA6BE163)。

收稿日期: 2007-06-07

两端的部分序列:

引物 1: 5'-AGCAGTGTGGAAGGCAAGCAG-3';

引物 2: 5'-CTGACCTTGTACCTCTCAG-3'.

以提取的再生植株的叶片总 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。反应体积为 20 μ L (2.0 mM dNTP 1.6 μ L, 25 mM 10 \times 含 Mg 离子反应缓冲液 2 μ L, 引物 1、引物 2 各 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 4 u/uL Taq 酶 0.4 μ L, 水 13 μ L)。反应程序为 95 $^{\circ}$ C, 变性 10 min, 然后在 94 $^{\circ}$ C, 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min 的条件下进行 30 个循环, 最后在 72 $^{\circ}$ C, 再延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。反应结束后, PCR 扩增产物在 1.4% 琼脂糖凝胶上电泳。

2 结果

2.1 转化体的筛选

试验进行了两轮筛选, 小苗在分化筛选培养基上长到 2~3 cm 高左右时被切下转到含 70 mg/L 卡那霉素的生根培养基中进行第二轮筛选。结果表明, 27 株苗能在两周之内长出健壮的根系, 未经转化的苗在筛选生根培养基中不能生根而且白化。

2.2 转基因植株的鉴定

对 27 株转化植株进行了 PCR 鉴定, 4 株为阳性反应, 如图 2, 而未经转化的对照植株为阴性, 初步证明几丁质酶基因整合到了这 4 株植株的基因中。

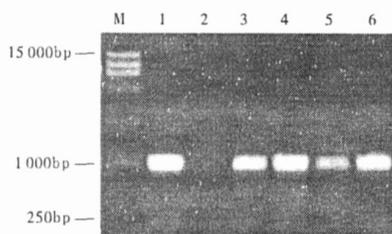


图 2 抗性植株 PCR 检测

注: M: Marker DL15.00Q; 1: 质粒对照; 2: 阴性对照; 3~6: 转化植株

3 讨论

南瓜属于双子叶植物, 植株体内的酚类物质含量较高, 组培过程中外植体与培养基接触部位极易出现褐化现象, 褐化会使外植体其余部位由于不能正常吸收养分、水分而死亡。通过试验发现以下方法可以缓解南瓜

褐化现象: 适当减小外植体的体积, 将体积过大的愈伤组织切分开, 并及时继代入新鲜培养基中; 缩短继代周期, 切除褐化部位: 将继代周期控制在 20 d 以内, 在继代时用刀片将已经褐化部位尽量全部切除可有效减少进一步的褐化; 适当增加培养基的 pH 值: 将培养基的 pH 值控制在 5.8 左右, 有利于增加培养基的强度、韧性, 减少培养瓶内的空气湿度, 对减少褐化有明显的作用。

研究中经过分化和生根两轮筛选的植株的 PCR 检测部分为阳性, 说明在南瓜转化系统中用卡那霉素 90 mg/L 和 70 mg/L 进行分化和生根两轮筛选后仍出现了假阳性植株, 原因可能为: 外植体的生长和扩大, 使其一部分翘于培养基之上, 致使这一部分选择压不足; 转化体的代谢物质可能转至邻近的非转化体中, 使其在一定程度上耐受选择压, 继续分化; 出现生理抗性植株; 抗生素加入的时机不当, 加入时筛选培养基温度过高 (60 $^{\circ}$ C 以上) 会导致抗生素的分解, 其药效下降; 筛选后期培养基的杂菌轻度污染也会使得幼苗存活更长时间, 因为杂菌能在培养基上生长, 那么它就有分解抗生素的可能和能力, 分解后的局部区域自然抗生素的效能下降, 而使幼苗存活下来。此外, 由于 PCR 扩增过分灵敏, 有时 PCR 检测本身会出现假阳性扩增, 因而对外基因是否整合还应进行 Southern 杂交检测和田间生物学检测, 进一步的验证正在进行中。

参考文献

- [1] 陈鹏, 李学俊, 李振岐等. 植物抗真菌病害基因工程研究进展[J]. 西北植物学报, 2003, 23(2): 356-362.
- [2] 周思军, 李希臣, 南相日, 等. 通过农杆菌介导将菜豆几丁质酶基因导入马铃薯[J]. 中国马铃薯, 2000, 14(2): 70-72.
- [3] 李贞霞, 李新峥, 董卫华. 南瓜组织培养体系建立研究[J]. 北方园艺, 2005(3): 75-76.
- [4] 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 9.
- [5] 陈少波, 吴根福. 几丁质酶研究进展[J]. 科技通报, 2004, 20(3): 258-262.
- [6] Anand A, Zhou T, Trick H N, et al. Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatococcus chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(384): 1101-1111.
- [7] Bieri S, Potrykus I, Fütterer J. Expression of active barley seed ribosome inactivating protein in transgenic wheat[J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 755-763.

Introduction of Chitinase Gene Into Pumpkin By Agrobacterium-Mediated Transformation

WANG Jing-jing, QU Shu-ping, CUI Chong-shi

(Horticultural College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The chitinase gene from kidney bean was introduced into Pumpkin Jinhui I by Agrobacterium mediated transformation, four transformed plants were positive and got 900 bp the target bands by PCR method and the gene has been introduced into the genome.

Key words: Pumpkin; Agrobacterium tumefaciens; Chitinase gene; Genetic-transformation