

一种快速筛选转抗霜霉病基因甜瓜种子的方法研究

宁雪飞, 韩小路, 王贤磊, 高兴旺, 李冠

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要:以用花粉管通道技术转入抗霜霉病基因 *At2* 的甜瓜 T1 代转基因种子为试材, 采用组培技术得到膨大的外植体, 利用 PCR 技术对组培得到的外植体进行检测, 以期尽快筛选出阳性植株。结果表明: 在甜瓜外植体培养过程中, 筛选到的种子最佳灭菌条件为 72℃、干灭 4 h, 抑菌效果最好的培养基组分是 MS 无机盐+B5 维生素+2 mg/L 6-BA +7 g/L 琼脂+500 mg/L 头孢噻肟钠+1.1 g/L 甲基托布津; 对 1 100 个转抗霜霉病基因 *At2* 的 T1 代种子外植体进行 PCR 检测, 阳性率为 4.5%。

关键词:甜瓜; 霜霉病; *At2* 基因; 转基因植株筛选

中图分类号:S 685. 21 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)01-0102-04

甜瓜霜霉病是广泛发生于甜瓜产区的真菌病害, 其致病菌是古巴假霜霉菌 (*Pseudoperonospora cubensis* Rostov.), 是一种专性寄生菌^[1]。霜霉病主要危害甜瓜中、下部功能叶片, 叶片感染病菌后会出现黄褐色病斑。条件适宜时, 这种病斑会迅速扩大或融合成大斑块, 叶片上卷或干枯, 中下部叶片全部干枯, 15 d 左右即可导致植株枯死^[2]。该病传播快, 再侵染频率高, 病菌潜育期短。目前, 大部分的甜瓜品种对霜霉病没有抗性, 因而该病在各甜瓜产区不少年份流行成灾, 极大地降低了甜瓜产量和品质^[3-4]。此外, 近几年我国在甜瓜种植季节雨水增多, 导致了霜霉病迅速扩散, 对生产造成巨大的经济损失, 有时甚至颗粒无收。

目前, 霜霉病的防治主要依靠化学制剂^[2], 然而长期使用化学制剂会使得病原菌对大部分制剂产生较强的耐药性, 防治效果减弱甚至消失。此外, 化学制剂的大量使用对环境会造成不可逆的危害。因此, 提高甜瓜品种自身的抗病性是解决甜瓜霜霉病最有效、最经济的办法。随着生物技术发展, 越来越多的甜瓜霜霉病抗性基因被人们所了解。甜瓜抗霜霉病基因转基因技术研究也取得一定的进展^[5]。目前报道的抗霜霉病基因有 *Pc-1*、*Pc-2*、*Pc-3*、*Pc-4* 和 *Pc-5*^[6], 相关抗性基因序列为

mp-19^[7], *MRGH-J*^[8] 等。

在转基因研究过程中, 对转基因后代植株的检测是至关重要的。传统转基因植株检测一般是将子代育苗后, 采用 PCR 检测等分子手段鉴定植株, 鉴定完毕后进行移苗田间种植。这种方法需对所有子代都育苗, 其工作量较大, 在移苗过程中, 由于环境或操作等原因, 对幼苗造成损害或降低成活力, 存在一定的风险, 因此迫切需要一种快速、简单、对植株生长无损的检测方法来进行转基因植株的筛选。该试验在不破坏种子田间种植活力的前提下, 切取小分子叶外植体进行培养, 提取外植体 DNA, 通过 PCR 技术对花粉管通道法导入 *At2* 基因的甜瓜 T1 代种子进行快速检测, 探讨了转基因甜瓜种子期检测的可能性和实用性, 优化并建立了转基因甜瓜种子小分子叶外植体的培养条件以及利用 PCR 等分子手段进行转基因快速筛选的体系, 以期缩短转基因植株筛选的周期, 并快速筛选出对霜霉病抗性能力较强的转基因甜瓜, 为后期转基因抗病甜瓜的研究提供理论依据, 以便培育出适合新疆甜瓜种植区需求的抗性甜瓜新品种。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的用花粉管通道技术转入抗霜霉病基因 *At2* 的甜瓜 T1 代种子由 2011 年田间转化新疆当地品种‘伽师’获得。

试剂: *At2*-pPTN133 由新疆大学生命科学与技术学院实验室构建保存; CTAB, RNase A 购自上海生工; 用于 PCR 反应的相关试剂及 Marker 购自宝生物(大连)有限公司(TaKaRa); 6-苄氨基嘌呤(6-BA)购自 Sigma 公司; 其余常用试剂均为国产或进口分析纯; 头孢噻肟钠

第一作者简介:宁雪飞(1987-), 女, 博士研究生, 研究方向为生化与分子生物学。E-mail:ningxuefei120@163.com

责任作者:李冠(1949-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为植物生理生化与分子生物学。E-mail:guanli@xju.edu.cn

基金项目:新疆自治区高技术研究发展计划资助项目(20111120); 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2012211B03); 国家自然科学基金资助项目(31260258)。

收稿日期:2013-09-23

(东盛公司);70%可湿性粉剂甲基托布津(美国阿普盾有限公司);50%可湿性粉剂多菌灵(安徽省无为县花卉肥料厂);杀菌王(浙江省诸暨市农化厂)。

培养基:基本培养基(MS 无机盐+B5 维生素+2 mg/L 6-BA +7 g/L 琼脂)。

主要仪器:Tissuelyer-24 多样品组织研磨机(上海,净信科技),TECHNE TC-512PCR 仪(英国),ECP3000 三恒电泳仪(中国北京)。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体培养条件的优化 种子干热灭菌时间的筛选:将甜瓜种子去壳,进行 2、4、6、8 h 72℃干热灭菌处理;参照张铁钢等^[9]方法,选择基本培养基加 500 mg/L 头孢噻肟钠以抑制部分细菌生长;从处理后的种子子叶末端(远轴端)切下 1 mm 外植体,放入固体培养平板中,使用玻璃板封闭,于 25℃(16 h 光照/8 h 黑暗)培养 6~7 d 后观察,重复 3 次,统计并分析结果。培养基的筛选:将灭菌处理后的种子切下 1 mm 外植体,放入含有不同灭菌剂的固体培养平板中,于 25℃(16 h 光照/8 h 黑暗)培养 6~7 d 后观察,重复 3 次,统计并分析结果。灭菌剂筛选所用培养基配方见表 1。为了促进外植体快速膨大,缩短培养时间,在培养基配方中添加比常用组培体系多 1 倍的 6-BA。

表 1 灭菌剂筛选所用培养基

Table 1 Culture media of antifungal agent screening

培养基 Media	基本成分 Basic component	头孢噻肟钠 Cefotaxime	灭菌剂 Bactericidal agent
MSB0	MS 无机盐+维生素 B5+ 2 mg/L 6-BA +7 g/L 琼脂		
MSB1	MS 无机盐+维生素 B5+ 2 mg/L 6-BA +7 g/L 琼脂	500 mg/L 头孢 噻肟钠	
MSB2	MS 无机盐+维生素 B5+ 2 mg/L 6-BA +7 g/L 琼脂	500 mg/L 头孢 噻肟钠	1.1 g/L 甲基托布津
MSB3	MS 无机盐+维生素 B5+ 2 mg/L 6-BA +7 g/L 琼脂	500 mg/L 头孢 噻肟钠	8.3 mL/L 杀菌王
MSB4	MS 无机盐+维生素 B5+ 2 mg/L 6-BA +7 g/L 琼脂	500 mg/L 头孢 噻肟钠	5 g/L 多菌灵

1.2.2 转基因植株种子快速检测 外植体大量培养:将筛选出的培养基倒入长约 18 cm,宽为 9.8 cm 长盒中,制成固体培养平板。将待检测 T1 代转基因植株的种子灭菌处理后,从子叶末端切下 1 mm 外植体,编号后放入固体培养平板,用玻璃板封闭,于 25℃(16 h 光照/8 h 黑暗)培养 6~7 d,含胚的种子部分编号与培养基中种子的子叶小末端——对应,标记保存。甜瓜 DNA 的提取:采用简化 CTAB 法提取膨大外植体的基因组 DNA。外植体培养 5~6 d 后,将不同的组织块依次取出,用组织研磨机研磨,加入 500 μ L 的 2 \times CTAB 溶液,60℃水浴 10 min。恢复室温后,加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1),颠倒混匀,12 000 r/min 离心 5 min。小心吸取上层清液约 400 μ L,加入等体积预冷的异丙醇颠倒混

匀,12 000 r/min 离心 5 min。取出离心管,小心弃去上清液,室温下于通风橱中晾干。将沉淀溶于 15 μ L TER 溶液(TE 溶液+7.5% 1 mg/mL RNase)。转基因甜瓜的 PCR 检测:参照王文玲等^[10]方法,根据 GenBank 中 At2 基因(PUB-MED 14688292)序列设计 PCR 引物,扩增转基因种子中的 At2 基因。引物如下:P1:5'-CGG-GATCCATGGATTACGTTTATGCA-3'; P2: 5'-CGGA-GCTCAATTACATGGACATGGGAGA-3'。PCR 反应程序:94℃预变性 3 min,94℃、30 s,48~40℃每个循环退火降低 1℃,每个温度 30 s,72℃、90 s,30 个循环,72℃延伸 5 min。

2 结果与分析

2.1 外植体培养条件的优化

2.1.1 种子灭菌时间的筛选 由图 1 可知,当种子 72℃干热灭菌 2 h 时,未能达到理想的抑菌效果,需要增加种子灭菌时间,减少外植体染菌率。种子灭菌 4~8 h 与不灭菌外植体的染菌率差异显著($P<0.05$)。灭菌 8 h 抑菌效果最好(约 50%左右),灭菌 4 h 次之(约为 55%),但灭菌 4、6、8 h 无显著差异。考虑到种子高温灭菌时间太长对种子的活性有一定的伤害,因此,选择 72℃干热灭菌 4 h 处理种子。

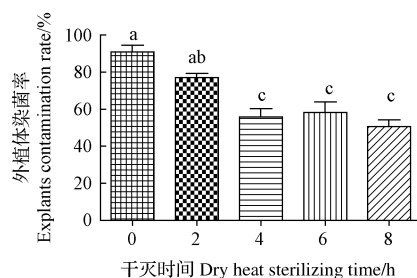


图 1 种子最适干热灭菌时间的筛选

注:相同字母间表示无显著性差异,不同字母为差异性显著($P<0.05$)。下同。

Fig. 1 Optimization of seed dry heat sterilizing time

Note: Same letters represent no significant differences and different letters represent significant differences ($P<0.05$). The same as below.

2.1.2 培养基的筛选 由于采用 72℃干热灭菌 4 h,培养基中添加 500 mg/L 头孢噻肟钠的处理方法,种子切除的外植体组织块在培养过程中仍存在真菌染菌情况。因此,该试验设计向培养基中添加不同的真菌抑菌剂,以抑制真菌生长。图 2 表明,添加 500 mg/L 头孢噻肟钠真菌抑菌剂处理与不添加任何抑菌剂培养存在显著差异。由图 3 可知,MSB2 和 MSB3 培养基能够明显降低外植体感染率,其中 MSB2 培养基抑制效果最好(20%左右)。与 MSB0 培养基相比,MSB4 没有达到预期抑制效果,二者感染率均在 50%以上,没有显著差异。因此,MSB2 为最适培养基,即 MSB0 培养基+500 mg/L 头孢噻肟钠+1.1 g/L 甲基托布津。

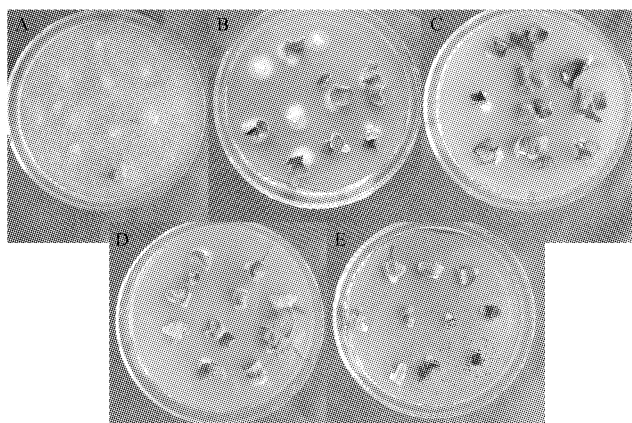


图2 不同抑菌剂的抑菌效果

注:A:MSB0 培养基;B:MSB1 培养基;C:MSB2 培养基;D:MSB3 培养基;E:MSB4 培养基;A~E 为培养 7 d 后各外植体生长情况

Fig. 2 Inhibitory effects of different antifungal agent

Note:A:MSB0; B:MSB1; C:MSB2; D:MSB3; E:MSB4; A~E: The growth status of each explant after culturing for 7 days.

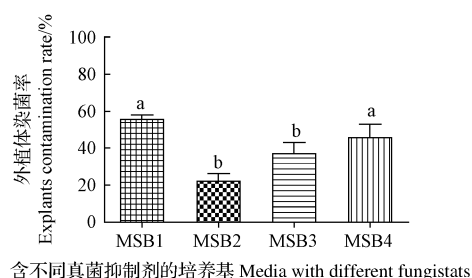


图3 最适合抑菌剂的筛选

Fig. 3 Optimization of the antifungal agent

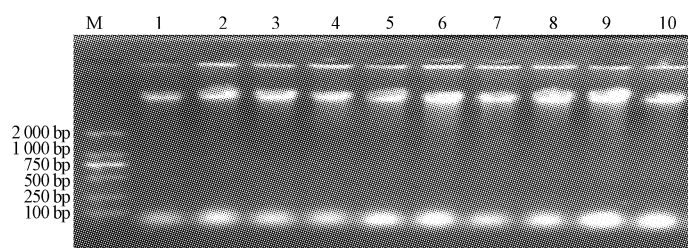


图5 转基因甜瓜外植体膨大组织 DNA 电泳结果

注:Marker DL 2 000;1~10. 不同植株。下同。

Fig. 5 Genomic DNA extracted from transformed melon explants

Note:Marker DL 2 000;1~10 represent different transgenic melon. The same as below.

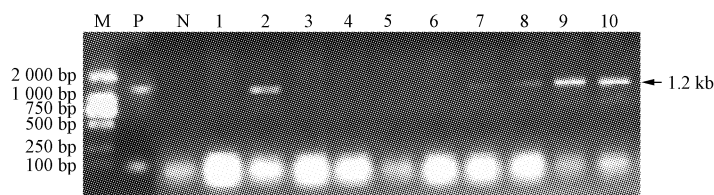


图6 T1 代转基因植株 At2 基因的 PCR 检测结果

注:P:阳性对照;N:未转基因植株。

Fig. 6 PCR results of At2 gene from T1 melon

Note:P:Positive control;N:Wild type plant.

2.2 转基因植株种子快速检测

2.2.1 最适灭菌条件下外植体在最适培养基中生长情况 通过试验分析得出最适灭菌处理方法为 72℃干热灭菌种子 4 h,最适外植体培养基为 MS 无机盐+维生素 B5+2 mg/L 6-BA +7 g/L 琼脂+500 mg/L 头孢噻肟钠+1.1 g/L 甲基托布津。以最适的种子处理方法处理 1 100 粒种子,在最适培养基中进行大批培养。如图 4 所示,培养 5 d 后外植体明显膨大,且染菌率低。

2.2.2 甜瓜 DNA 的提取 采用简化 CTAB 法提取膨大外植体的 DNA,图 5 为 DNA 电泳检测图。所提 DNA 经电泳和光度吸收检测,结果表明样品质量、纯度较好,可以满足后续的 PCR 扩增检测。

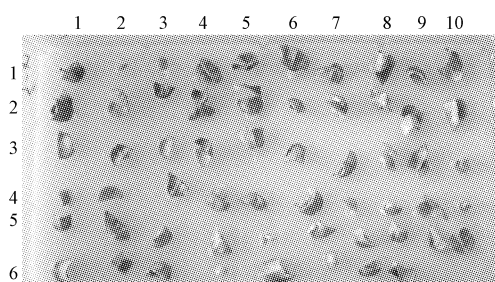


图4 最适灭菌条件下外植体在最适培养基中生长情况

Fig. 4 The growth status of explants in the optimal sterilization conditions and optimal medium

2.2.3 转基因甜瓜的 PCR 检测 以提取的外植体 DNA 作为模板,用 At2 的引物对提取的 1 100 个外植体进行 PCR 检测。电泳检测结果显示 5 个样品扩增出了 1.2 kb 左右的目的条带,分别为 2 号、7 号、8 号、9 号和 10 号(图 6)。转基因种子 PCR 检测的阳性率为 4.5%。

将这 5 粒转基因种子进行大田种植,以期用于后续进一步分子检测及生理检测验证。

3 结论与讨论

在组培过程中,对种子的消毒是非常重要的第一步。甜瓜种子有许多内生菌,消毒不彻底将会造成严重的污染,极大的影响组培的成功率^[9]。一般常采用消毒灭菌的方法是 NaClO 或 HgCl₂ 处理消毒。这些灭菌方式虽然灭菌彻底,但甜瓜种子经过液体处理后,存在不易长时间储存的问题。通过高温干热灭菌可以在一定程度上杀死种子表面细菌,并且处理后的种子能够长期保存并用于后续研究^[11]。该试验采用干热灭菌法对种子进行灭菌。但灭菌温度过高或时间过长,均会导致种子失水或对种子活性有影响,且灭菌时间越长,对种子萌发影响也越大。因此,该试验中对灭菌时间进行了筛选,最终将最适宜种子灭菌条件确定为 72℃,干热灭菌种子 4 h。为了进一步减少外植体培养的染菌率,向培养基中添加合适的抑菌剂以抑制真菌生长。结果表明,甜瓜外植体最适培养基为 MS 无机盐+维生素 B5+2 mg/L 6-BA+7 g/L 琼脂+500 mg/L 头孢噻肟钠+1.1 g/L 甲基托布津,1 100 株花粉管导入法转 *At2* 基因的 T1 代的种子进行检测,阳性率为 4.5%。

转基因植株随着繁衍代数增加,其后代种子量加大,如何能快速、省时地进行转基因筛选是一个有着重要意义的问题^[12]。该研究通过优化后的条件对转基因植株种子的一小部分进行组织培养,进而进行分子检测筛选,可以实现在对转基因种子无损的情况下,进行快速筛选。这种检测方法绕过了传统的苗期培养后检测,周期短,苗期培养的检测方法从种子到可采集样品需要 2~3 周培养期,该方法可直接从种子快速鉴定,仅需 5~6 d 左右时间;占地少,苗期培养的检测方法在检测大量样品时,需要相应的设施种植植株,该方法在 18 cm×9.8 cm 的培养盒中可完成对 60 株植株的检测;减少消

耗。苗期培养的检测方法要所有待检测的种子进行种植培养,筛选出目的植株后,需移苗才可大田种植,存在检测后植株损伤,移苗困难等许多问题。该方法在种植前即可完成对种子的检测,由于仅用一小部分种子材料,对种子损伤轻,筛选出的种子可直接在大田种植,省时省力。目前,该课题组已将这 5 粒阳性转基因种子进行大田种植,以进一步开展抗霜霉病转基因甜瓜的分子及生理生化检测。

参考文献

- [1] 杨柳燕,徐永阳,徐志红,等.甜瓜霜霉病研究进展[J].中国瓜菜,2011,24(3):38-43.
- [2] 李剑华.海南反季节设施甜瓜霜霉病的发生与防治[J].热带农业科学,2012,32(8):31-32.
- [3] 杨柳燕,徐永阳,徐志红,等.甜瓜霜霉病抗性遗传及 SRAP 分子标记[J].江苏农业学报,2012,28(5):1200-1202.
- [4] 史香芝,康双辉,韩利红,等.甜瓜霜霉病的发生与防治[J].天津农林科技,2011(6):19-20.
- [5] Galperin M,Patlis L,Ovadia A,et al. A Melon Genotype with Superior Competence for Regeneration and Transformation[J]. Plant Breeding, 2003, 122(1):66-69.
- [6] 王贤磊,高兴旺,张铁钢,等.甜瓜抗病基因同源序列的克隆与分析[J].新疆大学学报(自然科学版),2011,28(2):136-145.
- [7] Zhao H X, Li G. Cloning and Expression Analysis of Downy Mildew Resistance-Related Cdna Sequences in Melon[J]. Agricultural Sciences in China, 2005, 4(11):839-844.
- [8] 李金玉,李冠,赵惠新,等.甜瓜抗霜霉病基因同源序列克隆与分析[J].植物生理学通讯,2006,42(3):435-440.
- [9] 张铁刚,宁雪飞,王贤磊,等.新疆甜瓜“皇后”再生体系的建立[J].北方园艺,2012(15):122-125.
- [10] 王文玲,王贤磊,熊丽曼,等.*At2* 基因双 T-DNA 植物表达载体的构建[J].北方园艺,2012(12):107-112.
- [11] 周贤达,睢祥琨,陈路路,等.砧木(葫芦)种子干热灭菌消毒处理研究[J].中国瓜菜,2013,26(2):38-39.
- [12] 常晶,孟凡立,李永光,等.利用种子萌发法快速检测抗草铵膦转基因大豆[J].大豆科学,2012,31(4):534-537.

The Screening of Transgenic Plants Resistant to Downy Mildew Disease in Melon

NING Xue-fei, HAN Xiao-lu, WANG Xian-lei, GAO Xing-wang, LI Guan
(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

Abstract: Taking T1 melon of transgenic plant seed that transgened into *At2* downy mildew resistant gene though pollen-tube pathway technology as material, swollen explants was gotten through tissue culture technology. Then PCR analysis was performed on the explant, which were obtained from transgenic seed to screen out positive transgenic plant rapidly. The result indicated that the optimal sterilization condition was 72℃ for 4 h and the optimal medium components with antifungal effect was MS salts+B5 vitamins+2 mg/L 6-BA+7 g/L agar +500 mg/L cefotaxime+1.1 g/L thiophanate-methyl, during the culture processes of melon explants. 1 100 T1 generation seed explants transformed with downy mildew resistance genes *At2* were detected using PCR technique, and the positive rate was 4.5 %.

Key words: melon; downy mildew; *At2* gene; transgenic plants screening