

DOI:10.11937/bfyy.201612024

# 新疆野扁桃自交不亲和相关基因 *PetSSK1* 转“梦幻”矮牵牛的研究

夏江宏<sup>1</sup>, 曾 斌<sup>1</sup>, 王建友<sup>2</sup>, 李伟阳<sup>1</sup>, 田 嘉<sup>1</sup>, 李 疆<sup>1</sup>

(1. 新疆农业大学 林学与园艺学院, 新疆农业大学果树学新疆特色果树研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830052;

2. 新疆林业科学院推广站, 新疆 乌鲁木齐 830063)

**摘 要:**以新疆野扁桃(*Prunus tenella*)花粉为试材,构建其自交不亲和性相关基因 *PetSSK1* 的植物表达载体 pCambia1303-*PetSSK1*,采用根癌农杆菌介导法,将该基因导入矮牵牛,并研究了不同种类及浓度抗生素对矮牵牛再生的影响。结果表明:该试验成功获得了转化新疆野扁桃自交不亲和相关基因 *PetSSK1* 的矮牵牛植株,并筛选出矮牵牛的卡那霉素(Kan)和头孢霉素(Cef)的敏感浓度分别为 25、300 mg · L<sup>-1</sup>,并进一步通过 PCR 分子检测确认其为转基因阳性植株。

**关键词:**野扁桃; *PetSSK1*; 植物表达载体; 根癌农杆菌介导; 矮牵牛

**中图分类号:**S 681.603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)11-0096-05

野扁桃(*Prunus tenella*)属蔷薇科李亚科桃属扁桃

**第一作者简介:**夏江宏(1990-),男,重庆垫江人,硕士研究生,研究方向为果树学。E-mail:939414098@qq.com

**责任作者:**曾斌(1970-),男,湖北松滋人,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事果树种质资源及生物技术的教学与科研等工作。E-mail:zbxcnd@163.com

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31260465);国家林业公益性行业科研专项资助项目(201304701-1);新疆维吾尔自治区科技计划资助项目(201130102-1-5);新疆维吾尔自治区果树学重点学科资助项目(201007)。

**收稿日期:**2015-12-16

亚属植物,也称野巴旦杏,属新生代第3纪遗留物种,是世界上古老的野生果树之一,现今只有哈萨克斯坦和中国新疆塔城和阿勒泰地区有少量分布<sup>[1]</sup>。而随着过度放牧,自然环境的恶化等因素对野扁桃的生存造成了很大威胁<sup>[2]</sup>。通过对张一婧等<sup>[3]</sup>发现的一种新基因 *SKP1-like* 进行同源克隆,获得一个新的基因 *PetSSK1*,该试验拟验证野扁桃 *PetSSK1* 基因是否与野扁桃的自交不亲和相关。

矮牵牛(*Petunia hybrida* Vilm)属配子体自交不亲和多年生草本植物,又名碧冬茄,常作一二年生栽培。株高 20~45 cm,茎匍地生长,被有粘质柔毛,叶质柔软,

## Tissue Culture of Endangered Plant *Syringa pinnatifolia*

CHENG Ming<sup>1</sup>, LI Houhua<sup>2</sup>, HE Zisen<sup>1</sup>, JIANG Zaimin<sup>3</sup>, CAI Jing<sup>1</sup>

(1. College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. College of Landscape Architecture and Arts, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 3. College of Life Science, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** The buds and seeds of endangered plant *Syringa pinnatifolia* were used as the test materials, the influence of different disinfection methods, concentration combinations of sucrose and hormone on primary culture of seeds, combinations of basal media and hormones on shoots proliferation and rooting by plant tissue culture method were studied, in order to provide basis for tissue culture propagation, germplasm resources protection and exploitation of *Syringa pinnatifolia*. The results showed that the suitable explants were shoots. The appropriate disinfection methods were 75% ethanol for 30 seconds, 0.1% mercuric chloride for 7 minutes, the best proliferation medium was MS+5.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA+0.01 mg · L<sup>-1</sup> IBA; the optimal initial, proliferation and rooting medium for seed was MS+20 g · L<sup>-1</sup> sucrose+3.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA+0.10 mg · L<sup>-1</sup> IBA, MS+7.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA+0.05 mg · L<sup>-1</sup> IBA and WPM+2.0 mg · L<sup>-1</sup> IBA respectively according to this study.

**Keywords:** *Syringa pinnatifolia*; tissue culture; bud; seed

卵形,近无柄,全缘,互生,上部叶对生;花单生,呈漏斗状,重瓣花球形,花白、紫或各种红色,并镶有它色边,花期4月至降霜;蒴果,种子细小。主要分布于南美洲,因颜色艳丽、花期长,适应性强,而颇受人们喜爱。又因其生长周期短、易成活,且易于农杆菌的导入,而成为研究植物基因工程的优选材料<sup>[4-5]</sup>,同时也是最早被应用于基因工程育种的植物之一。

现构建新疆野扁桃自交不亲和性相关基因 *PetSSK1* 的植物表达载体,通过根癌农杆菌介导法,将其导入矮牵牛,并检测转基因矮牵牛中是否具有自交亲和植株。以期为进一步开展自交亲和性分子辅助育种提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料:新疆野扁桃的花粉取自新疆维吾尔自治区裕民县野扁桃自然保护区用于提取 RNA;EHA105 根癌农杆菌株(*Agrobacterium tumefaciens*)、pCambia1303 植物双元表达载体购自上海生工生物公司;矮牵牛品种“梦幻”购自大连保尔世纪园艺有限公司。

供试试剂:EDTA- $\text{Na}_2$ 、琼脂粉、胰蛋白胨、牛肉浸粉、葡萄糖等药品均为分析纯,购自北京鼎国昌盛生物公司;卡那霉素(Kan)、头孢霉素(Cef)、利福平(Rif)、DNA Marker、*Taq* DNA Polymerase、Trans Script First-Strandc DNA Synthesis Super Mix 购自北京全式金生物公司;大肠杆菌感受态细胞(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京鼎国昌盛生物公司;pMD19-T 载体购自中国大连 TaRaKa 公司;*Pst*I、*Bam*HI等限制性内切酶购自 NEB 公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒、RNA 提取试剂盒均购自天根生化科技有限公司。

供试仪器:电泳仪(DYY-7C)、霉菌培养箱(MJX-160B-Z)、超净工作台(SW-CJ-ZF)、PCR 仪、高速低温离心机、立式压力蒸汽灭菌器(LDZX-5 OKB S)、电子天平(AL204-1 C)、电热鼓风干燥箱(DHG-9140A)、全温摇床(HZQ-B)、分光光度计、水浴锅。

### 1.2 试验方法

2013—2014 年在新疆农业大学林学与园艺学院特色果树研究中心进行基因的克隆及分子鉴定,2015 年在新疆维吾尔自治区乌鲁木齐县农牧局技术管理站进行矮牵牛再生体系的建立以及转基因等相关试验。

1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 合成 将野扁桃花粉在液氮中研磨至粉状用 RNAprep Pure Plant Kit(Tiangen 公司)提取其总 RNA,用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA

的完整性。反转录反应参照 TransScript™ First-Strand cDNA Synthesis SuperMix(Transgen 公司)合成第 1 链 cDNA 并-20℃保存。

1.2.2 *PetSSK1* 基因的克隆 以 cDNA 为模板,用上游引物 SSK1F(AATCCCTCTCATAATCTCCAC)和下游引物 SSK1R(GCTCAGTCCTCATCAACTCC)进行 PCR 扩增,反应体系为 50  $\mu\text{L}$ :ddH<sub>2</sub>O 37  $\mu\text{L}$ ,DNA 1  $\mu\text{L}$ ,10 $\times$  buffer 5  $\mu\text{L}$ ,引物(10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )各 1  $\mu\text{L}$ ,dNTP(0.2 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$ ) 4  $\mu\text{L}$ ,*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U) 1  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序为 94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃复性 30 s,72℃延伸 1 min,反应 35 个循环;72℃终延伸 10 min,4℃保存,PCR 产物用 2%的凝胶进行电泳检测。

1.2.3 克隆质粒 pMD19-*PetSSK1* 的构建及鉴定 根据天根生物公司的胶回收试剂盒对 1.2.2 中的试验产物进行胶回收。将胶回收产物连接到 pMD19-T 载体并进行转化,待平板中长出单菌落后,在无菌条件下挑取白色单菌落接种到 5 mL 含 50 mg  $\cdot \text{L}^{-1}$  氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃振荡培养(220 r  $\cdot \text{min}^{-1}$ )过夜。按 Genview 质粒提取试剂盒说明进行质粒提取,采用 *Eco*R I 和 *Hind* III 进行双酶切验证,双酶切反应体系为 *Eco*R I 0.5  $\mu\text{L}$ ,*Hind* III 0.5  $\mu\text{L}$ ,重组质粒 5  $\mu\text{L}$ ,buffer 2  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 12  $\mu\text{L}$ ,37℃反应 3 h,将酶切正确的质粒进行测序,命名为 pMD19-*PetSSK1*。

1.2.4 双元表达载体 pCambia1303-*PetSSK1* 的构建及鉴定 将阳性 pMD19-*PetSSK1* 质粒和 pCambia1303 载体分别用 *Pst*I 和 *Bam*HI 进行双酶切,利用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段,利用 T4 DNA 连接酶 16℃连接 30 min,以连接体系转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,将转化产物涂布于含有 50 mg  $\cdot \text{L}^{-1}$  卡那霉素(Kan)的 LB 固体培养基中,37℃过夜培养,挑取单菌落在含有 50 mg  $\cdot \text{L}^{-1}$  卡那霉素(Kan)的 LB 液体培养基中培养过夜,提取质粒,利用双酶切鉴定,将阳性的双元表达载体测序,命名为 pCambia1303-*PetSSK1*。

### 1.3 农杆菌介导遗传转化体系的建立

1.3.1 根癌农杆菌的活化与培养 采用冻融法<sup>[6-8]</sup>将 pCambia1303-*PetSSK1* 重组质粒加入到 EHA105 根癌农杆菌感受态细胞中,混匀后,冰浴 30 min,迅速放入液氮 5 min,取出后 37℃水浴 2 min,加 1 mL 不含抗生素的 YEB 液体培养基,28℃,150 r  $\cdot \text{min}^{-1}$  激活 1 h,取出后涂在含 50 mg  $\cdot \text{L}^{-1}$  Kan、50 mg  $\cdot \text{L}^{-1}$  Rif 的 YEB 平板上,在霉菌培养箱中 28℃,培养 2 d。然后挑取单菌落在上述 YEB 液体培养基中 28℃,250 r  $\cdot \text{min}^{-1}$  过夜培养,然后取其中 1 mL 接种于 50 mL 上述 YEB 液体培养

基中进行扩繁,至菌液 OD<sub>600</sub> 为 0.8 时,5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,用 YEB 液体培养基重悬至 OD<sub>600</sub> 为 0.6 时备用。

1.3.2 转化外植体的获得 称取 0.017 3 g 矮牵牛种子约 100 粒,将矮牵牛种子置于 1.5 mL 离心管中,用无菌水浸泡过夜,在无菌条件下,以 75% 酒精灭菌 30 s,再用次氯酸钠处理 10 min,最后用无菌水冲洗 5~6 次,每次 1 min,然后接种于 1/2MS+IBA 0.2 mg·L<sup>-1</sup> 培养基 (MS<sub>1</sub>)<sup>[9-10]</sup>,置于光照培养室内,每天光照 10 h(温度 25 ℃,光照强度 5 000 lx)。选取 40 d 的无菌矮牵牛叶片,用解剖刀除去主脉和叶片的边缘部分,剪成 0.25 cm<sup>2</sup> 大小作为外植体,接种至培养基 MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup> 中 (MS<sub>2</sub>)。

1.3.3 抗生素敏感试验 参考孙瑶等<sup>[10]</sup>、李颖等<sup>[11]</sup> 的方法在最佳芽诱导分化培养基中加入不同配比的卡那霉素(Kan)以及头孢(Cef),接种外植体,观察培养过程中出现愈伤的时间以及出愈率,确定最佳抗生素浓度。出愈率(%)=愈伤数/外植体数×100。

1.3.4 矮牵牛的遗传转化 通过常规方法<sup>[12]</sup> 获得侵染用农杆菌菌液 (OD<sub>600</sub> = 0.6),使用改良叶盘法侵染预培养后的试管苗矮牵牛幼叶,预培养时间 2 d。侵染方法:将预培养的外植体置入 OD<sub>600</sub> 为 0.6 的农杆菌菌液中轻摇 10 min,共培养 2 d,然后再将外植体转接到筛选培养基中筛选,将获得的诱导芽进行继代然后生根以及定植。

#### 1.4 抗性苗的 PCR 扩增检测

采用改良 CTAB 法提取<sup>[13-15]</sup> 转化成功的矮牵牛阳性植株和未经遗传转化的再生型植株的 gDNA,以此为模板,以 1.2.1 中的引物进行 PCR 扩增。扩增程序为 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

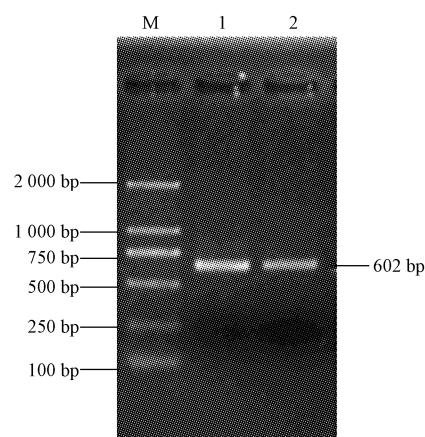
## 2 结果与分析

### 2.1 *PetSSK1* 基因的克隆及双元表达载体 pCAMBIA1303-*PetSSK1* 的双酶切鉴定

由图 1 可知,目的基因片段大小为 602 bp,测序结果与野扁桃 *PetSSK1* 基因一致,符合后续试验要求。对转化得到的双元表达载体 pCAMBIA1303-*PetSSK1* 进行双酶切鉴定(图 2),并通过测序证实该质粒含有目的基因,符合后续试验要求。

### 2.2 不同浓度 Kan 对矮牵牛愈伤诱导率的影响

在不同 Kan 浓度的 MS<sub>2</sub> 培养基上接种外植体 30 d 后,对分化芽进行统计。由表 1 可知,Kan 对矮牵牛诱导芽的生长及分化有明显的抑制作用。随着 Kan 浓度的

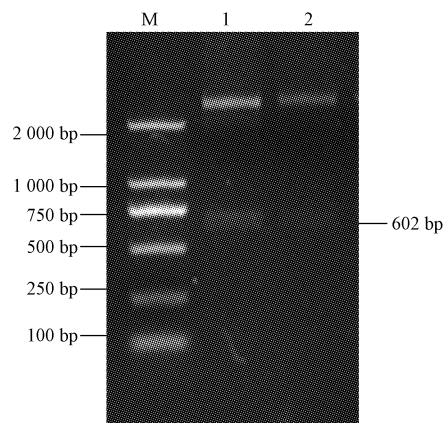


注:M,DL 2 000 DNA Marker;1 号 and 2 号泳道为目的基因。

Note:M,DL 2 000 DNA Marker;1 and 2 were *PetSSK1* gene.

图 1 *PetSSK1* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *PetSSK1* gene



注:M,DL 2 000 DNA Marker;1~2,pCAMBIA1303-*PetSSK1* 用 *Pst*I 和 *Bam*HI 进行双酶切。

Note:M,DL 2 000 DNA Marker;1~2,pCAMBIA1303-*PetSSK1* was digested with *Pst*I and *Bam*HI.

图 2 pCAMBIA1303-*PetSSK1* 的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pCAMBIA1303-*PetSSK1* by double enzyme digestion

升高,愈伤组织诱导率逐渐下降。在未添加 Kan 的培养基中,外植体可以正常诱导出愈伤组织,诱导率高达 95% 以上,且生长情况良好;当 Kan 浓度为 20 mg·L<sup>-1</sup> 时,外植体诱导愈伤能力降低,诱导率仅为 12.5%,当 Kan 浓度为 25 mg·L<sup>-1</sup> 时,外植体愈伤生长缓慢,且逐渐发白并死亡,此浓度为矮牵牛愈伤诱导的临界值。

### 2.3 不同浓度 Cef 对侵染后的矮牵牛外植体的影响

在 MS<sub>2</sub> 培养基中加入不同浓度的 Cef,培养 15 d 后观察反菌率。由表 2 可以看出,高浓度 Cef 对根癌农杆菌的生长有抑制作用。随着 Cef 浓度的升高,侵染后的外植体反菌率逐渐降低。当 Cef 浓度为 0 mg·L<sup>-1</sup> 时,侵染后的外植体反菌率高达 100%,当 Cef 浓度增加到 200 mg·L<sup>-1</sup>

时,反菌率降低;当浓度增加到 300 mg · L<sup>-1</sup> 和 400 mg · L<sup>-1</sup>时,侵染后的外植体可以正常生长并分化出不定芽。所以 300 mg · L<sup>-1</sup> 的 Cef 浓度为矮牵牛再生的最适宜浓度。

表 1 不同 Kan 浓度对矮牵牛愈伤再生的影响

Table 1 Effect of different concentration of Kan on regeneration of <i>Petunia</i> callus				
处理 Treatment	Kan 浓度 Concentration of Kan/(mg · L <sup>-1</sup> )	外植体数 No. of cotyledon inoculated	出愈率 Callus induction rate/%	愈伤再生情况 Situation of callus regeneration
1	0	24	100.0	愈伤生长良好,芽分化数多
2	5	24	90.0	愈伤生长良好,芽分化数多
3	10	24	55.6	愈伤正常生长,部分外植体无分化芽
4	15	24	41.6	愈伤生长,部分外植体无分化芽
5	20	24	12.5	少量愈伤生长,外植体局部发白,有少量分化芽
6	25	24	0.0	外植体整体变白,切口局部变厚,无分化芽并逐渐死亡

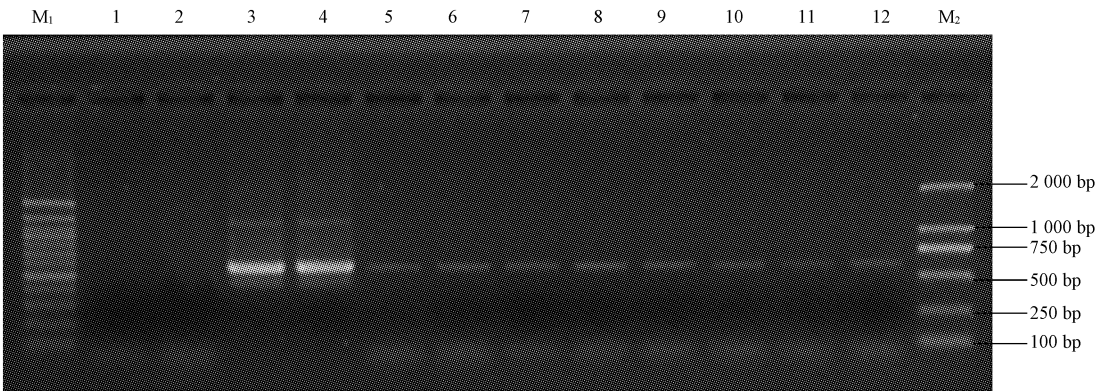
表 2 不同 Cef 浓度对矮牵牛再生的影响

Table 2 Effect of different concentration of Cef on regeneration of <i>Petunia hybrida</i>				
处理 Treatment	Cef 浓度 Concentration of Cef/(mg · L <sup>-1</sup> )	外植体数 No. of cotyledon inoculated	反菌率 Contamination rate/%	外植体生长情况 Situation of explant growth
1	0	24	100.0	全部反菌
2	100	24	50.0	有愈伤无不定芽
3	200	24	20.8	有愈伤无不定芽
4	300	24	0.0	愈伤生长良好,并且有 4 个外植体分化出不定芽
5	400	24	0.0	愈伤生长良好,有 1 个外植体分化出不定芽

2.4 矮牵牛转化苗的 PCR 检测

由图 3 可知,转化成功的阳性植株能扩增出与目的基因大小接近的条带,介于 500~750 bp,而未转化的植

株则不能扩增出条带。将 PCR 扩增产物回收、测序,得到结果与目的基因一致。



注:M<sub>1</sub>,Trans 15 kb DNA Marker;M<sub>2</sub>,DL 2 000 DNA Marker;1,2 为阴性对照;3,4 为阳性对照;5~12 为矮牵牛抗性苗。  
Note:M<sub>1</sub>,Trans 15 kb DNA Marker,M<sub>2</sub>,DL 2 000 DNA Marker;1,2,non transgenic *Petunia hybrida*;3,4,positive control;5-12,transformants.

图 3 转基因苗的 PCR 检测

Fig.3 PCR amplification of transgenic plants

3 讨论与结论

自交不亲和性是指具有完全花并可以形成正常雌、雄配子,但自花授粉不能正常繁育后代的一种自交不育性<sup>[16]</sup>。主要分为两大类:孢子体自交不亲和性<sup>[17]</sup>,花粉亲和与否的表现型由产生花粉的二倍体亲本(即孢子体)S 基因型决定,如甘蓝、白菜型油菜、甜菜、白菜和甘薯等十字花科植物;配子体自交不亲和性<sup>[18]</sup>,花粉亲和与否的表现型由单倍体花粉(即配子体)自身的 S 基因型决定,分布最为广泛的是一种称为 S 核酸酶类的自交不亲和性,主要存在于茄科、蔷薇科、车前科等植物中。

20 世纪末,CLARKE 实验室在花烟草(*Nicotiana glauca*)的花柱中分离到一种与特定单倍型共分离的糖蛋白<sup>[19]</sup>。通过测序和随后的 cDNA 克隆首次得到了茄科植物中参与自交不亲和反应的花柱 S-基因<sup>[19]</sup>-S-Rnase。21 世纪初,LAI 等<sup>[20]</sup>利用已构建的金鱼草细菌人工染色体(BAC)文库筛选得到了 1 个含有 S<sub>2</sub>-Rnase 的 63.7 kb 的 BAC 克隆,并在其中距 S<sub>2</sub>-Rnase 9 kb 的位置发现了 1 个新的编码带有 F-box 结构域的蛋白基因,命名为 AhSLF-S<sub>2</sub>(*Antirrhinum hispanicum* S-locus F-box S<sub>2</sub>)。此为科学家首次克隆的自交不亲和花粉 S 决定因

子<sup>[20]</sup>。2006年HUANG等<sup>[21]</sup>以酵母双杂交的方法从cDNA文库中筛到了AhSSK1。SSK1(SLF-interacting SKP1-like1)是位于S-位点外的一类新的植物自交不亲和相关基因。其后人们从苹果、梨、甜樱桃等植物中成功克隆出了相应的SSK1基因。

该试验从新疆野扁桃克隆得到的自交不亲和相关基因PetSSK1具有完整的开放阅读框,与Prunus avium的SSK1(JQ322646)基因高度同源,相似度高达98%。为了验证PetSSK1基因的功能,该试验已经成功构建pCambia1303双元表达载体,并通过根癌农杆菌介导矮牵牛,成功进行了遗传转化。而该基因在转化植株中是否行使功能,仍需后续试验进一步验证。

### 参考文献

- [1] 吕志江,李疆,吾买尔夏提·塔汉,等.新疆野扁桃种质资源遗传多样性的ISSR分析[J].果树学报,2010,27(6):918-923.
- [2] 李疆,曾斌,罗淑萍,等.我国野扁桃资源的保护及引种繁育[J].新疆农业科学,2006,43(1):61-62.
- [3] 张一婧,薛勇彪.基于S-核酸酶的自交不亲和性的分子机制[J].植物学通报,2007,24(3):372-388.
- [4] 郑亚东,郭余龙,陈旭,等.GhMADS3基因组型表达对矮牵牛花形和花色的影响[J].园艺学报,2007,34(4):985-990.
- [5] 彭春秀.根癌农杆菌介导的Ipt基因对矮牵牛遗传转化的研究[D].重庆:西南农业大学,2003.
- [6] 戴艺民,林江波,王伟英,等.农杆菌介导的蓝色基因转化中国水仙[J].农业生物技术学报,2010,18(2):231-238.
- [7] 王学全,沈晓,何赞绵,等.根癌农杆菌EHA105和LBA4404冻融法转化条件的优化研究(英文)[J].药物生物技术,2011,18(5):382-386.
- [8] 王萍,高世庆,郭永来,等.抗逆相关基因GmDREB导入农杆菌的研究[J].吉林农业大学学报,2007,29(2):148-151.
- [9] 林静,李疆,田嘉,等.杜梨子叶离体再生体系的建立[J].中国农学通报,2015,31(19):41-47.
- [10] 孙瑶,田嘉,林静,等.根癌农杆菌介导fw2.2和PL基因对Micro-Tom番茄的遗传转化研究[J].新疆农业大学学报,2015,38(3):187-192.
- [11] 李颖,马锋旺.抗坏血酸过氧化物酶基因转化苹果的研究[J].西北农业学报,2010,19(1):140-143,163.
- [12] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].北京:科学技术出版社,2002:386-389.
- [13] 陈月.库尔勒香梨及其芽变类型的生长结果习性观测及SRAP分子检测[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2014.
- [14] 李杰.(60)Co-γ辐射诱变库尔勒香梨枝条的生长发育特性观测及SRAP分子标记检测[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2014.
- [15] 杨天灵.新疆大蒜及其野生近缘种遗传多样性研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2014.
- [16] 吴华清,张绍铃,李晓,等.植物自交不亲和性的分子生物学进展[J].南京农业大学学报,2006,29(4):119-126.
- [17] 牛俊海,鲁晓民,汤继华,等.禾本科植物自交不亲和性及其分子生物学研究进展[J].分子植物育种,2006,4(2):269-274.
- [18] 夏江宏,曾斌,李伟阳,等.新疆野扁桃自交不亲和基因SSK1的克隆及生物信息学分析[J].中国农学通报,2015,31(25):107-112.
- [19] ANDERSON M A, CORNISH E C, MAU S L, et al. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in Nicotiana glauca[J]. Nature, 1986, 321(321):38-44.
- [20] LAI Z, MA W, HAN B, et al. An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of Antirrhinum is expressed specifically in pollen and tapetum[J]. Plant Mol Biol, 2002, 50:29-32.
- [21] HUANG J, ZHAO L, YANG Q, et al. Ah SSK1, a novel SKP1-like protein that interacts with the S-locus F-box protein SLF[J]. Plant J, 2006, 46:780-793.

## Research on Wild Almond Self-incompatibility Related Gene PetSSK1 Transferring Into Petunia 'Dream'

XIA Jianghong<sup>1</sup>, ZENG Bin<sup>1</sup>, WANG Jianyou<sup>2</sup>, LI Weiyang<sup>1</sup>, TIAN Jia<sup>1</sup>, LI Jiang<sup>1</sup>

(1. College of Forestry and Horticulture/The Characteristics Fruit Tree Research Center, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052; 2. Extension Station, Xinjiang Academy of Forestry Sciences, Urumqi, Xinjiang 830063)

**Abstract:** Taking the pollen of Xinjiang wild almond (*Prunus tenella*) as material, the expression plasmid pCambia1303-PetSSK1 with self-incompatibility related gene PetSSK1 was constructed. Then it was transferred into *Petunia* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, and the effect of different kinds and concentration of antibiotics on *Petunia* regeneration was studied. The results showed that the *Petunia* taking self-incompatibility related gene PetSSK1 of Xinjiang wild almond was gotten successfully. The sensitive concentration of Kan and Cef were 25 mg · L<sup>-1</sup> and 300 mg · L<sup>-1</sup>, respectively. And the *Petunia* were further confirmed as positive plants by PCR detection.

**Keywords:** wild almond (*Prunus tenella*); PetSSK1; plant expression vector; *Agrobacterium tumefaciens*; *Petunia* hybrida