

辣椒诱导再生及黄瓜花叶病毒外壳蛋白 基因转化研究初报

周钟信* 栗密兰 陈德芬 宋兰英 杨静惠

(天津农学院园艺系, 天津 300381)

摘 要

用MS + 5 mg 6 BA + 0.1mg IBA诱导辣椒子叶外植体分化出叶状体。用MS + 3 mg 6 BA + 0.2mg IBA诱导出茎芽。再用MS + 0.2mg IAA诱导生根, 从而得到完整的小植株。直接以子叶外植体为受体, 以Ti质粒为载体将CMVcp (黄瓜花叶病毒外壳蛋白) 基因转化进辣椒, 经再生性培养获得了转基因小植株。

关键词 辣椒 再生植株 黄瓜花叶病毒外壳蛋白 基因转化 组织培养

病毒病是为害蔬菜生产的主要病害之一。常规育种中难以找到理想的抗病毒基因而病毒传播媒介又难以控制, 致使病毒病防治仍是蔬菜生产上的一大难题。近年来基因工程技术的发展为培育抗病毒植物提供了一条新途径。先后有人克隆了TMV, AIMV, CMV, PVX, PVY病毒的外壳蛋白基因, 并引入农杆菌Ti质粒载体, 进而转化植物得到抗病毒的烟草、番茄、马铃薯〔1~4〕。

CMV (黄瓜花叶病毒) 是为害辣椒的主要病毒。辣椒属难再生的植物, 国内外获得辣椒植株再生成功的文献甚少, 这给辣椒基因转化工作带来很大困难, 这方面的工作迄今尚未见报道。本研究则是以Ti质粒为载体用CMVcp基因转化辣椒, 经再生而获得转基因小植株。

材料和方法

一、菌株准备 实验采用的Hu-2菌株由北京农业大学分子遗传组来景九教授提供, 其所带有的Ti质粒上含有CMVcp基因, 胭脂碱合成酶基因和抗卡那霉素基因, 三个基因可随T-DNA一起引入植物基因组并可表达 (中间载体见图)。因此, 用该菌株转化的植物可在含卡那霉素的培养基上生长, 并可合成胭脂碱 (Nopaline)。

菌株保存在LB+Str+Km的平板上。挑取单菌落于LB+Km中活化过夜后,用新鲜LB稀释40倍于28°C下振荡培养24小时备作转化用。

二、植物材料的准备、转化和培养 精选的种子于18%次氯酸钠中振荡30分钟,用无菌水洗涤3次后用无菌水浸种2天,然后于半量MS上发芽。

取10天龄的幼苗子叶切成0.5cm的外植体,立即浸入上述菌液中5分钟,用吸水纸吸去多余的菌液,于MS+5mgBA+0.1mg

IBA上培养24小时。将外植体转移到MS+5mgBA+0.1mgIBA+500mg头孢霉素的培养基上,在25°C和连续光照条件下培养,7天后在外植体伤口边缘出现很小的愈伤组织。将其转移到MS+3mg6BA+0.1mgIBA+500mg头孢霉素+100mg卡那霉素培养基上诱导叶丛的分化,每7天换一次培养基。待叶状丛形成后转移到MS+3mgBA+0.2mgIBA+500mg头孢霉素+100mg卡那霉素的培养基上诱导芽的分化,并每7天换培养基一次。最后将伸长的茎芽转移到MS+0.2mgIAA上,即可长根而获得再生的小植株。

三、Nopaline 检测 从小植株上任取两个小叶片,加75 μ l磷酸缓冲液研成匀浆,取5 μ l上清液于Whatman 3号滤纸上点样。同时以Nopaline和精氨酸,以及非转化材料为正负对照。风干后进行电泳。以5%乙酸为电极缓冲液,在500V下电泳35分钟。风干后浸入染色液(0.01%菲醌,5%NaOH的80%乙醇溶液)。迅速取出滤纸并风干,在254nm紫外光下观察电泳结果。精氨酸和Nopaline均激发出兰绿色荧光亮点。

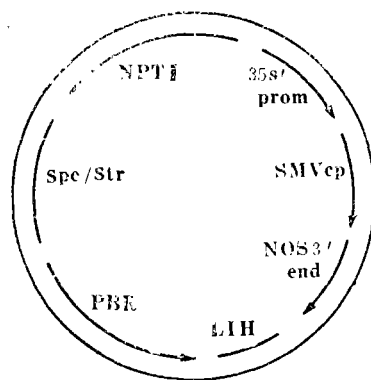


图 带有CMVcp基因的中间载体

结果与讨论

一、辣椒的再生

本实验曾进行过茄门、同丰、西郊青椒1号、吉林3号、吉农方椒、三道西等品种子叶和下胚轴的培养,结果均能形成愈伤组织。愈伤组织主要出现在外植体切口伤口处。只有来自西郊青椒1号、吉林3号、三道西的子叶外植体能分化出叶状丛。其中MS+5mg6BA+0.1mgIBA的培养基叶状丛分化率高达28%。去掉生长素则叶丛分化率下降,一部分外植

表 激素水平与叶状丛分化的关系

	接种 块数	分化叶 丛块数	叶丛 分化率(%)	注 备
3mg6BA	190	16	8	同时长愈伤
5mg6BA	190	35	18	愈伤形成少
5mg6BA+0.1mgIBA	197	55	28	愈伤小

形成较大的白绿色愈伤组织, 很难再进一步分化。当BA浓度降到3 mg时, 叶丛分化率仅为8%, 且大部分外植体形成不能再分化的愈伤组织(见表)。叶状丛形成后, 在原培养基上很难继续形成茎芽, 只有将其转入MS + 3 mgBA + 0.2mgIBA的培养基上才能形成茎芽。将茎芽转移到MS + 0.2mgIAA上则很容易形成根, 得到完整的小植株。

上述结果表明, 辣椒子叶外植体愈伤、叶状丛、茎芽、根的分化与BA和生长素的水平有关。BA水平较高并配以少量的生长素, 才有利于叶状丛的分化。这与Sadhand A. [5]的结论是一致的。对辣椒子叶外植体而言, 先用较高浓度的BA和少量的生长素诱导叶状体分化后, 再用较低浓度BA和少量生长素诱导茎芽的分化的途径是较为有效的。

二、基因转化

对西郊青椒1号子叶外植体进行CMVcp基因转化的处理和培养, 并用头孢霉素抑菌, 用卡那霉素筛选转化体, 得到了少量的再生小植株。

对转化体小植株叶片电泳分析的结果表明均有Nopaline的表达。从结果可以看出, 作为正对照的标样显示两个绿色荧光亮点, 精氨酸在前, Nopaline在后。而非转化辣椒(ck)只呈现出一个荧光点, 从其位置看显然是精氨酸。转化体则显示出了精氨酸和Nopaline两个荧光点, 这说明转化体辣椒细胞内的精氨酸的一部分在胭脂碱合成酶(Nopaline synthase)的催化下被用来合成了胭脂碱, 从而证实了外源的Nopaline synthase基因在转化体辣椒细胞中得到了表达。因为该基因与CMVcp基因均组装在T-DNA上, 因此也间接证明了CMVcp基因已经整合到辣椒转化体细胞的基因组中。

结 论

一、研制出了一个适于辣椒子叶外植体经过叶状丛再生植株的技术程序。它适宜作辣椒基因转化的受体系统。

二、以Ti质粒为载体将外源Nopaline synthase基因和CMVcp基因引入辣椒, 并获得了转基因小植株。

参 考 文 献

- [1] 胡天华等:《科学通报》, 1989 (21): 1652~1655
- [2] Powell, A.P. et al: Science, 1936 (232): 733~743
- [3] Nilgun, E.T. et al: EMBO J., 1937 (6): 1181~1183
- [4] John, A.B.: TIBTECH., 1988 (6): 136~137
- [5] Sadhand, A. et al: Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1979 (16): 47~55

Preliminary Study on Regeneration Induction and Gene Transformation of CMVcp in Pepper

Zhou Zhongxin Su Milan Chen Defen

Liu Rong Song Lanying Yang Jinghui

(*Horticultural Department, Tianjin Agricultural College, Tianjin*)

Abstract

A program suitable for pepper plantlets regeneration has been developed. Thallus brushes, buds and roots were induced from explants of pepper cotyledon on MS + 5 mg 6BA + 0.1mgIBA, MS + 3 mg 6 BA + 0.2mgIBA and MS + 0.2mgIAA, respectively. Thereby, got whole plantlet. Explants from pepper cotyledon were inoculated with *A. tumefaciens* cells containing a cointegrate Ti-plastid which carries NPT II, Nopaline synthases and CMVcp genes. Transformed cells were selected for kanamycin resistance and transgene plantlets has been gained after a regeneration culture.

Key words: Pepper; Regenerative plantlet; CMVcp; Gene transformation; Tissue culture