

转基因河套蜜瓜新品系育种过程的方法及其生态适应性

秦伟闻, 哈斯阿古拉, 潮洛蒙

(内蒙古大学 生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010021)

摘要: 1-氨基环丙烷-1-羧酸合成酶(ACS)是高等植物中乙烯合成的关键酶。以成熟河套蜜瓜果实的 RNA 为模板, 经反转录和 PCR 扩增合成和克隆了河套蜜瓜 ACS 基因 cDNA 片段(627 bp), 将 ACS 基因 cDNA 反向构建到植物表达载体 pGA643, 配制成 DNA 溶液后用花粉管通道法导入外源基因, 对转基因河套蜜瓜的叶片用 CTAB 法提取总 DNA, PCR 扩增检测, 结果表明某些果实的部分种子已整合外源基因。目前, 该转基因新品系正在进行生态适应性研究及“环境释放”和“生产性试验”的安全性评价。

关键词: ACS 基因; PCR 扩增技术; 花粉管通道法; CTAB 法; 生态适应性

中图分类号: S652.603.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2005) 专辑-0119-03

Breeding Methods of the New Strain of Genetically Modified Hetao Melon and its Ecological Suitability

QIN Wei-wen, HASI Agula, CHAO Luo-meng

(College of Life Sciences of Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China)

Abstract: 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS) is the key enzyme in the biosynthesis of ethylene. Total RNA was isolated from ripe Hetao melon fruits. Using oligo(dT)15 as primer, the fruits strand of ACC cDNA was synthesized and a 627 bp DNA fragment was obtained with PCR technique. This ACC cDNA fragment was cloned into site of vector pGA643. Using the pollen-tube pathway to introduce exogenous genes, then total DNA was isolated from the genetically modified Hetao melon by CTAB method, and was detected for PCR amplification, the result indicated that some seeds had integrated exogenous genes. Presently, the new strain which had been genetically modified was being done environmental release and generative test.

Key words: ACC gene; PCR amplification technique; Pollen-tube pathway; CTAB method; Ecological

河套蜜瓜 (*Cucumis melo* L. cv Hetao) 属葫芦科甜瓜种, 俗称华莱士瓜, 主要产于内蒙古西部河套地区, 其外观色泽金黄, 香味浓郁, 集香蕉、苹果、鸭梨、蜜桃、玫瑰味于一体, 皮呈金黄色, 含糖量高, 抗逆性强, 在我区已有 60 多年的栽培历史, 目前已成为河套地区的支柱产业之一。但是, 它软化速度快, 不耐贮藏, 完熟果实采后贮存 5~6d 即开始软化腐烂^[1], 历年来均因此造成很大经济损失。经过多年的研究, 确定该种果实属呼吸跃变型果实, 其成熟与果实内乙烯的释放有密切关系^[2], ACC 合成酶(ACS)和 ACC 氧化酶(ACO)在河套蜜瓜成熟过程中为乙烯合成过程中的限速酶。已合成和克隆

了河套蜜瓜的 ACS 基因^[3]和 ACO 基因 cDNA, 并应用转基因技术获得了相应的 ACS 反义工程植株果实^[4]。本文将 ACS 基因为例, 对用花粉管通道法导入外源基因获得具有耐贮性状的转基因河套蜜瓜新品系育种过程及用到的经典技术作一综述, 对该新品系在大田试验期的生态适应性作一介绍。

1 目的基因的克隆与载体构建

1.1 材料和方法

总 RNA 提取: 取-80℃保存的果实的果皮组织 5g 按异硫氰酸胍法提取总 RNA^[5]。第一链 cDNA 的合成: 以提取的总 RNA 为模板, oligo(dT)15

为引物,按 AMV 反转录试剂盒说明书所述合成单链 cDNA。PCR 扩增^[3]。cDNA 克隆与序列分析。

1.2 PCR 扩增技术

聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 扩增技术是利用单链核苷酸引物对特异 DNA 片段进行体外快速扩增技术的一种方法^[4],由变性、退火、延伸三个基本反应步骤构成。经过 30 个循环后目的基因片段的 DNA 量达到 106 倍,经 PCR 扩增所得目的片段的特异性取决于引物与模板 DNA 间结合的特异性。变性:模板 DNA 经加热至 94 左右一定时间后,使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离,使之成为单链,便于与引物结合。退火:模板 DNA 经加热变性成单链后,突然降至 T_m (解链温度) 值以下时,引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合。延伸:在 Taq DNA 聚合酶的作用下,以 dNTP 为反应原料,靶序列为模板,合成一条新的与模板 DNA 链互补链。

2 目的基因的转化

2.1 材料和方法

将自行合成和克隆的 ACS 基因 cDNA 反向构建到植物表达载体 pGA643。花粉管通道法导入外源基因^[2]。

2.2 花粉管通道法

花粉管通道法 (pollen-tube pathway) 介导基因转化是利用植物授粉后,所形成的天然的花粉管通道,经珠心通道,将外源 DNA 携带入胚囊,已达到遗传转化的效果。花粉管通道法具有其独特的优点,主要表现在:方法简便,一般常规育种工作者易掌握;单胚珠和多胚珠植株的单双子叶植物均可应用;育种时间缩短,基因纯化速度快,可以任意选择生产上的当家品种进行外源 DNA 导入,达到目的性状基因的转移。该方法也存在一些缺点和局限性,主要表现在:DNA 大小和纯度应加注意,过大易于断裂,过小遗传功能丧失;如果是不受单基因或单片断 DNA 控制的多基因性状则不能或很难通过该法导入植物;局限于开花植物的开花时间才能应用;转化效率低,重复性差。

3 目的基因的检测

3.1 材料和方法

从每个转化的河套蜜瓜果实取 30 粒种子,

在室内萌发。CTAB 法提取总 DNA^[2]。用 Southern 法对提取总 DNA 进行 PCR 检测^[2]。

3.2 CTAB 法

十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 是一种去垢剂,这种去垢剂能够和核酸一起形成不溶的混合物^[5]。当 CTAB 加入到植物细胞提取液中时,核酸-CTAB 混合物就能够沉淀出来,经过离心后,沉淀混合物聚集在离心管底部,而碳水化合物、蛋白质以及其他杂质仍然保留在悬液中。接下来,将混合物沉淀再溶于低浓度 NaCl 溶液,使 CTAB 与核酸分离,这样就能够利用乙醇沉淀进行浓缩并利用核糖核酸酶处理除去 RNA。与 SDS 法相比,该方法的最大优点是通过高盐缓冲液的选择性沉淀能很好地去糖杂质,对于含糖较高的材料可优先采用^[3]。在提取前期能同时得到高含量的 DNA 和 RNA,如果后继实验对二者都需要,则可分别进行纯化,如只需 DNA 则可用 RNase 水解掉 RNA。

4 转基因新品种的生态适应性研究

4.1 材料和方法

将获得的一部分种子 (T_0 代) 播种于田间,进行自交,采收果实,观察其耐贮性状,研究其生态适应特征。收集 T_1 代种子,播种于田间,进一步筛选目标性状的果实和选育纯和品系。

4.2 生态适应性

生态适应性 (ecological suitability), 是指生物有机体或其各部分在环境的长期相互作用中形成的一系列具有生存价值的特征,依靠这些特征能免受各种环境的侵害,并能有效从其生境中获得所需要的物质和能量,使个体的发育不致异常和中断。适应包括^[6]: 进化适应:物种通过漫长的过程,调整遗传成分以适合于改变的环境条件;生理适应:生物通过生理过程的调节适合于气候条件,养料或食物等环境条件改变;感觉适应:感觉器官对他们所能感觉到的环境刺激改变的调整;通过学习的适应:动物通过学习以适合于多种多样的环境改变。

5 小结与展望

转基因河套蜜瓜的研究的结果表明某些果实的部分种子已整合外源基因,成功获得耐贮性状,河套蜜瓜的贮藏期由以前的 7~10d 延长至 40~60d,解决了保鲜难题。这一成果已通过了自治区科技成果鉴定。为申报新品种,进行商品化生产奠定

了基础。这是我国首例转基因耐贮藏甜瓜的成功培育。项目组还在国内外学术期刊上发表论文多篇,具有较高的学术价值。相信在不久的将来,转基因河套蜜瓜一定能实现商业化,为河套地区的经济发展作更大的贡献。

参考文献:

- [1] 骆 蒙,方天祺,哈斯阿古拉,等.ACC含量、EFE活性在甜瓜乙烯生成中的变化与乙烯生成限速的初探 [J].内蒙古大学学报(自然科学版),1997,28(2):243-247.
- [2] 王关林,方宏筠.植物基因工程(第二版)[M].北京:科学出版社,2002.
- [3] 尹 俊,哈斯阿古拉,方天祺.河套蜜瓜 ACC 合成酶 cDNA 片断的克隆和序列分析 [J]. 生物技术,1997,7(3):10-13.
- [4] 哈斯阿古拉,等.用反义 ACC 合成酶基因转化河套蜜瓜的研究[J].云南大学学报(自然科学版),1999,21(增刊):200-201.
- [5] 魏 群,等.基因克隆和 DNA 分析[M].北京:高等教育出版社,2003.30-31.
- [6] 李振基,等.生态学[M].北京:科学出版社,2000.19-20.
- [7] 周明亮,等. - 酪蛋白基因的研究进展[J].内蒙古农业科技,2005,(2):12-14.
- [8] 曹丽霞.应答非生物胁迫的植物转录因子[J].内蒙古农业科技,2005,(5):10-14.
- [9] 梁 莉,等.河套蜜瓜试验鉴定与筛选[J].内蒙古农业科技,2005,(2):17-18.
- [10] 马立晖,胡秀臣.转基因技术在大豆抗病虫害育种上的应用[J].内蒙古农业科技,2004,(专辑):76-77.
- [11] 贾利敏,等.玉米组织培养和植株再生的研究现状[J].内蒙古农业科技,2002,(3):10-13.
- [12] 滕文星,等.利用生物技术进行玉米育种的探讨[J].内蒙古农业科技,2002,(3):13-14.
- [13] 郝云凤,等.春小麦杂交组合配制和基因型差异对花培的影响[J].内蒙古农业科技,2003,(5):14-15.
- [14] 张淑琴.转基因植物在现代化农业生产中的应用[J].内蒙古农业科技,2000,(增刊):173-174.