

抗除草剂转基因黄瓜的获得及 T₁ 植株抗性鉴定

金 红¹, 杜胜利², 陈 峥¹, 魏爱民²

(1. 天津市农业科学院中心实验室, 天津 300192; 2. 天津市黄瓜研究所, 天津 300192)

摘要: 从影响黄瓜转基因体系的外植体类型、农杆菌共浸染时间、是否加入乙酰丁香酮等因素摸索, 建立了黄瓜遗传转化体系; 将抗除草剂基因 *bar* 以农杆菌共浸染法导入到黄瓜父本品种 M1 子叶中, 经历愈伤组织分化、芽诱导和生根等过程获得落地转化株系, 通过特异性引物的 PCR 鉴定, 13 个株系扩增出 *bar* 基因片段。T₀ 自交获得 T₁ 转基因植株, 经 1 000 倍除草剂巴士达喷施处理, 其中 84% 表现为较高的抗性。

关键词: 黄瓜; 基因 *bar*; 遗传转化; 抗性鉴定

中图分类号: Q785; S642.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)01-0044-03

The Obtaining of Transgenic Cucumbers Resistant to Herbicide and Resistance Detection of T₁ Plants

JIN Hong¹, DU Shengli², CHEN Zheng¹, WEI Aimin²

(1. Central Lab of Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin 300192, China;

2. Tianjin Cucumber Research Institute, Tianjin 300192, China)

Abstract: The procedure of cucumber transformation was established by studying factors such as types of explants, cotransformation with *Agrobacterium tumefaciens* and adding acetosyringone or not etc. The anti-herbicide gene *bar* was transferred into the cotyledons of the cucumber father M1 by *Agrobacterium tumefaciens* and the transformed cucumber lines were obtained by taking through the process of callus differentiation, shooting and rooting. The PCR detection showed 13 lines showed the existence of the *bar* gene fragment. T₁ plants were got by self crossing of T₀ plants, 84% of which showed higher resistance to 1 000 dilution of the herbicide of BASTA.

Key words: Cucumber; Bar gene; Transformation; Resistance characterization

转基因技术在黄瓜上的应用一直受再生频率和遗传转化频率低的限制, 国内外从事黄瓜体外再生研究主要是从原生质体培养和体细胞悬浮培养入手^[1,2], 这些方法同样难以提高遗传转化频率。因此, 建立一个高效的遗传转化体系对黄瓜转基因研究具有十分重要的意义。随着黄瓜杂交种的日益商品化, 杂种纯度的检测是种子生产和销售部门不可忽视的问题^[3]。国内外大量研究证明, 将单一的抗除草剂基因应用于农作物, 特别是自花授粉作物的杂交种纯度快速鉴定具有十分重要的意义^[4]。本研究将从潮湿霉菌(*S. hygroscopicus*)中分离克隆的 *bar*

基因导入到黄瓜制种亲本中, 获得转基因抗除草剂亲本, 为研制一种快速、有效、准确的黄瓜杂种纯度鉴定新技术奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

黄瓜亲本品种 M1 由天津市黄瓜研究所提供; 抗除草剂基因 *bar* 由 CaMV35S 控制, 构建于双元表达载体 pCAMBAR D34, 转入农杆菌 LBA4404 中; 用于检测的 PCR 引物由美国肯色斯州立大学的 S. Muthukrishnan 教授惠赠; 试验用除草剂由 Bayer 公

收稿日期: 2002-10-23

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目(003802611)

作者简介: 金 红(1967-), 女, 辽宁锦县人, 副研究员, 硕士, 主要从事植物生物技术研究工作。

司的叶天勋先生提供。

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养 从平板选取含 pCAMBAR D34 质粒的根癌农杆菌单菌落接种于 5 mL LB+ 0.25 mL (浓度为 10 ng/mL 卡那霉素) 的培养液中, 于 28℃, 200 r/min 条件下培养 16 h 后, 转接到新鲜的 50 mL LB+ 2.5 mL (10 mg/mL 卡那霉素) 的培养液中, 在同样条件下继续培养至对数生长期(4~5 h, OD ≈ 0.8~1.2), 用含有 20% 葡萄糖、pH 5.8 的液体 MS 洗涤菌液 2 次, 并重新悬浮在 MS 中, 加入 0.004% 乙酰丁香酮使其最终 OD 值达到 0.25~0.35, 即可用于转化。

1.2.2 黄瓜转基因再生体系各条件的摸索^[5]。

1.2.3 PCR 检测转基因植株 植物总 DNA 的提取^[6]。抗除草剂基因 bar 的 PCR 反应条件为: 95℃变性 5 min, 开始 30 个循环(95℃变性 1 min, 54℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min), 72℃增加延伸 10 min。引物为 5'-CTC GGT GAC GGG CAG GAC CGG ACG-3'; 5'-AGA ACG ACG CCC GGC CGA CAT-3'。

1.2.4 T₀试管苗的驯化落地、自交及 T₁植株对除草剂的抗性鉴定 将 T₀试管苗剪去根部, 插植在灭菌蛭石中, 并施入大量元素水溶液(1:10), 经几周驯化生根后落地。田间自交获得 T₀种子, T₁植株 3~4 叶期叶面均匀喷施 1 000 倍巴士达除草剂, 以未转基因植株为对照, 5~7 d 后观察抗性情况。

2 结果与分析

2.1 T₀转化植株的获得

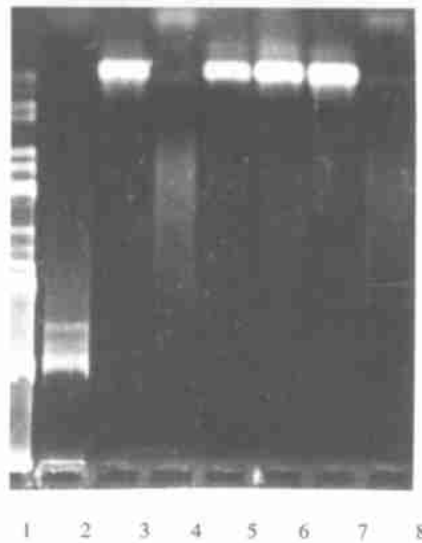
将黄瓜亲本品种 M₁ 的种子经次氯酸钙溶液灭菌后, 在 10% 水琼脂培养基上 25℃黑暗萌发 2~3 d 后, 取萌发后的子叶, 切成 5 mm 方块, 与处于对数生长期、经适当稀释、并加入适量乙酰丁香酮、OD 值在 0.25~0.35 的农杆菌 LBA 4404 菌液(含有 bar 基因)共浸染 20 min, 将浸染后的外植体转至愈伤组织分化培养基(MS 含 ABA, 6-BA 和 NAA), 25℃暗培养 2 d, 再转至含 500 mg/L 羧苄青霉素和一定量除草剂(500~700 μg/L)的诱芽培养基(MS 含 GA₃), 经 25℃暗培养 14~21 d, 产生透明或半透明的愈伤组织; 愈伤组织转至 16 h 光照/8 h 黑暗条件下继续分化培养, 诱导出抗性芽丛, 而未分化出抗性芽的愈伤组织在除草剂的作用下枯死。当抗性芽生长至 2~3 cm 时, 分别切下转至生根培养基(1/2MS+ 250 mg/L 羧苄青霉素+ 500~700 μg/L 除草剂), 获得转化

植株。

经过愈伤组织分化、芽诱导和生根 3 个阶段的培养发现, 外植体的褐化常常是诱导脱分化及芽再生的主要障碍, 不同基因型黄瓜子叶的褐化程度不同, 选择合适、再生频率高的外植体种类是培养初期的关键, 经对 M₁, Y₁ 等多个品种的外植体氧化褐变程度的筛选发现, M₁ 褐化率最低, 虽然仍有 50% 早期褐化, 但这种褐化在后期培养中会逐渐减轻, 而 Y₁ 褐化率高达 80%, 因此, 本研究采用 M₁ 为转化外植体。

2.2 T₀植株所含 bar 基因的 PCR 分子检测结果

被检落地转基因株系共 19 个, 其中 13 个株系经特异性引物的 PCR, 扩增出 bar 基因片段(540 bp), 6 个株系未扩增出该基因片段, 其阳性检出率为 68%。非转基因的对照植株未扩增出 bar 基因片段, 由图 1 可见, 第 5、6、7 号转化植株均扩增出 bar 基因片段(540 bp), 该片段大小与质粒 DNA 片段扩增出的片段大小一致, 第 4、8 号转化植株未扩增出该大小的片段。



1. DGL-2000DNA 分子量标准; 2. 对照植株;
3. pCAMBAR D34 质粒; 4~8. 均为 T₀ 转化植株

图 1 T₀ 植株所含 bar 基因的 PCR 检测结果

2.3 T₁植株对除草剂的抗性鉴定结果

T₁共 19 个株系, 经 1 000 倍除草剂巴士达处理 7 d 后, 有 13 个株系对除草剂表现为高抗, 3 个株系表现为中度药害, 3 个株系则呈现严重药害, 对照植株全部枯死, 转基因株系对除草剂的抗性达 84%。转基因抗除草剂株系表现为正常或局部轻微花叶, 调查 7 d 后, 植株上的这些花叶会自动消失而恢复正常, 对照植株则变黄枯死。

2.4 建立黄瓜高效遗传转化体系

影响黄瓜转基因体系转化频率的主要因素有黄瓜外植体的品种类型、外植体与农杆菌的共浸染时间长短、是否加入乙酰丁香酮及除草剂选择压力的大小等,我们从这几个方面入手对各因素的影响状态进行了摸索^[5]。综合各阶段的研究结果认为:外植体品种的选择是最关键的因素,是转基因体系的起点,而褐化频率的高低是选择外植体品种的主要标准。通过对多个品种子叶的摸索,选择褐化率最低的 M1 为供试亲本品种。农杆菌和外植体共浸染时间的长短是影响农杆菌中 Ti 质粒 DNA 是否能有效进入外植体细胞的重要环节,共浸染时间过短,农杆菌接触伤口面不充分,转化频率低;若时间过长,则常常由于农杆菌的毒害引起缺氧而使组织软腐致死,我们的研究发现以共浸染 20 min 为最佳。乙酰丁香酮是农杆菌中 Ti 质粒 DNA 进入外植体细胞的必须诱导物,已有研究表明,细胞渗出液中含有 0.5 ~ 1.0 mg/L 的乙酰丁香酮就可以诱导农杆菌基因组中的 Vir 基因活化,从而使 Ti 质粒上的 T-DNA 进入外植体细胞^[7]。我们的转化试验结果说明,加入乙酰丁香酮能明显增加外植体产生愈伤组织的数量,诱导频率可达到 100%。除草剂作为转基因体系中唯一的选择压力,其浓度大小也十分重要,在愈伤组织阶段以较低浓度筛选为好,以便获得更多的愈伤组织进一步分化,研究表明 500~700 mg/L 较为适宜。通过对影响黄瓜转基因体系诸因素的研究表明:外植体的褐化频率为 50%,共浸染后再生植株频率为 21%,PCR 鉴定阳性率为 68%,田间除草剂抗性鉴定阳性率为 84%,综合起来,我们筛选的黄瓜遗传转基因体系的转化频率为 6%。

3 讨论

黄瓜农杆菌遗传转化体系中,黄瓜体细胞离体培养相对困难,外植体经根癌农杆菌浸染后由于在分化培养基中加有抗菌素及除草剂等选择压力,其再生频率会更低。为此,我们对影响转化效率的外植体基因型、共浸染时间、是否加入乙酰丁香酮及除

草剂选择浓度等各因素进行摸索,建立了一个较高效的遗传转化体系。

本研究获得抗除草剂转基因黄瓜的目的,在于研究出一种快速、有效、准确的黄瓜杂种纯度鉴定新技术。黄瓜制种中由于母本自交、花粉漂移和人工隔离不完全而不可避免地混入假杂种,目前主要的鉴定方法是田间表型性状鉴定,通常要花费 3~4 个月时间,费工费时,成本高,而同工酶方法,因品种间差异较大而实际应用受到限制。将核显性抗除草剂基因转移到父本中,育成携带纯合该基因的新型父本(保留原品种优良特性),配制的杂交种应全部含有显性抗除草剂基因(Aa),施用除草剂可一次同时去除假杂种,获得整齐一致的杂种群,使杂交种的纯度鉴定在短时间内即可完成。目前,我们正在进行 T₂ 自交,其目的在于使外源导入的抗除草剂 bar 基因得到纯合,因为,只有抗除草剂基因是显性纯合的亲本用于配制杂种时,才能有效进行纯度鉴定,这方面的研究将有另文报道。

参考文献:

- [1] Raharjo S H T, Hernandez M O. Transformation of pickling cucumber with chitinase encoding genes using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Rep, 1996, (15): 591-596.
- [2] 熊新生,贾士荣,付幼英. 黄瓜胚性细胞悬浮培养及其原生质体的植株再生[J]. 园艺学报, 1988, 15(2): 120-124.
- [3] 庞金安,马德华,霍振荣. 黄瓜杂交一代纯度鉴定研究进展[J]. 天津农业科学, 2000, 6(2): 40-43.
- [4] 黄大年. 农作物抗除草剂遗传工程研究进展[J]. 生物工程进展, 1997, 17(5): 14-17.
- [5] 陈 峥,金 红,程 奕,等. 提高黄瓜农杆菌遗传转化体系再生频率的研究[J]. 天津农业科学, 2001, 7(4): 47-49.
- [6] Jungham H, Metzlaff M. A single and rapid method for the preparation of total plant DNA [J]. Biotechniques, 1990, 8(2): 176.
- [7] 王关林,方洪筠. 植物基因工程原理和技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.