

黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因转化辣椒的研究

吴丽君, 胡开林, 吴智明

(华南农业大学园艺学院, 广东广州 510642)

摘要: 以辣椒品种‘B162’为试材, 探讨了通过根癌农杆菌介导法将黄瓜花叶病毒外壳蛋白(CMV-CP)基因转化辣椒的适宜条件。结果表明, 将辣椒带柄子叶进行预培养2 d后, 用OD₆₀₀为0.3的根癌农杆菌菌液浸泡7 min, 再经过共培养2 d后转移到筛选分化培养基中进行培养, 有利于获得辣椒抗性不定芽。通过对获得的10株抗性不定芽进行PCR检测, 其中有2株扩增出目的条带, 初步证明CMV-CP基因已经转入辣椒不定芽中。

关键词: 辣椒; 根癌农杆菌介导; CMV-CP基因; 不定芽; PCR

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2007)02-0069-04

Transformation of *Capsicum annuum* with Coat Protein

Gene of Cucumber Mosaic Virus

WU Li-jun, HU Kai-lin, WU Zhi-ming

(College of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Agrobacterium-mediated transformation of pepper ‘B162’ with coat protein gene of cucumber mosaic virus (CMV-CP) was studied. Results showed that the best transformation system was: cotyledons explants were precultured for 2 d, and then inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* (OD₆₀₀ = 0.3) for 7 min, transferred onto selection differentiation medium after co-cultured for 2 d. 10 green adventitious buds with Kan-resistance were screened by Polymerase chain reaction. Two of them were amplified with the band of the fragment of 740 bp. The result showed the CMV-CP gene had been incorporated into the plant genome successfully.

Key words: *Capsicum annuum*; Agrobacterium-mediated; CMV-CP gene; adventitious buds; PCR

辣椒 *Capsicum annuum* 是我国人民喜食、营养丰富、栽培面积较大的蔬菜作物之一。但在生产上, 自1921年Dolittle首次发现黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus CMV)侵染辣椒以来, 至今全球已发现38种植物病毒能够侵染辣椒, 其中在亚洲(包括我国)和欧洲以黄瓜花叶病毒和烟草花叶病毒(TMV)发生范围最广。我国自20世纪70年代以来, 辣(甜)椒病毒病危害越来越严重, 造成减产达30%~70%, 已成为辣(甜)椒生产的最大障碍^[1]。目前防治病毒病的有效方法是选育抗病品种, 但是, 通过常规方法

选育抗CMV辣椒品种, 在世界各国都进展较慢, 其原因主要是在辣椒种质资源中普遍缺乏免疫或高抗CMV的选育种材料。因此, 通过基因工程技术培育抗性材料受到许多研究者的重视, 其中将黄瓜花叶病毒外壳蛋白(CMV-CP)基因导入辣椒, 已被证明可有效减轻黄瓜花叶病毒对辣椒的危害^[2-3]。本试验在建立辣椒离体培养再生植株体系^[4]的基础上, 以辣椒品种‘B162’为材料, 利用根癌农杆菌介导转化法, 对影响转化的条件进行了比较研究, 目的是为利用基因工程技术创造辣椒抗CMV种质提供参考依据。

收稿日期: 2006-06-13

作者简介: 吴丽君(1980—), 女, 硕士, 现在湖南省长沙市中南林业科技大学资源与环境学院工作; 通讯作者: 胡开林(1963—), 男, 教授, E-mail: hukailin@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30370978); 广东省科技计划项目(2004A20103001, 2002A2070601)

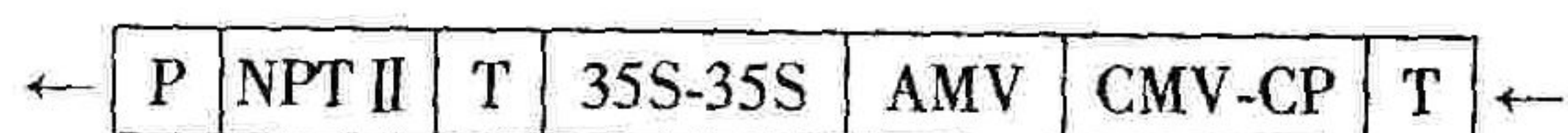
1 材料与方法

1.1 供试辣椒品种

以经过吴丽君等^[3]筛选的离体培养再生植株频率较高的辣椒品种‘B162’作为转化受体材料。‘B162’辣椒种子由华南农业大学园艺学院蔬菜系提供。

1.2 根癌农杆菌菌株和质粒

试验采用的根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株为 LBA4404, 内含工作质粒 pBI121, 其 T-DNA 包含卡那霉素 (Kan) 抗性基因 NPT II 和以 CaMV 35S 双启动子和 AMV 增强子调控的目的基因 CMV-CP, 结构如下:



构建好的菌株由华南农业大学资源环境学院李华平教授提供。

1.3 辣椒无菌苗的培养

取辣椒‘B162’的种子, 用 $\varphi = 70.0\%$ 的乙醇浸泡 30 s, 然后用 $\varphi = 15.0\%$ 的饱和次氯酸钠溶液灭菌 20 min, 再用无菌水洗 3~4 次, 播于 1/2MS + 蔗糖 15.0 g/L + 琼脂 7.5 g/L 的培养基上 (pH 5.8)。播种后放于 26 °C、光照 (2 000 lx) 14 h/d 的培养室中培养 (以下培养条件相同) 获得无菌苗。取 12 d 苗龄的带叶柄子叶作为转化受体。

1.4 根癌农杆菌的活化与培养

将携带 CMV-CP 基因的根癌农杆菌 LBA4404 划线于含 50.0 mg/L Kan 和 25.0 mg/L 链霉素 (Str) 的 LB 固体培养基平板, 28 °C 暗培养。待 1~2 d 分离出单菌落后, 从平板上取一单菌落接种于 4 mL LB 液体培养基, 28 °C 下 200 r/min 振荡培养 1~2 d 活化农杆菌。从中取 100 μ L 菌液注入 50 mL 新鲜 LB 液体培养基中, 100 r/min 振荡培养 12 h ($D_{600\text{nm}} \approx 1.0$)。将菌液转入灭菌离心管中, 于室温下 4 000 r/min 离心 5 min, 去掉上清液, 菌体用 1/2 MS 液体培养基 (pH 5.2) 稀释 20 倍并重悬, 使其 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.3。

1.5 Kan 对抑制辣椒子叶外植体分化不定芽的作用

将辣椒带叶柄子叶外植体分别接种于含 Kan 25.0、35.0、50.0、75.0、100.0 mg/L 和不含 Kan 的 MB 分化培养基 [MB (MS_{矿质元素} + B5_{有机}) + IAA 1.0 mg/L + 6-BA 5.0 mg/L + 蔗糖 20.0 g/L + 琼脂 7.5 g/L] 中, 置于 26 °C 的光照培养室进行培养。培养 40 d 后统计不定芽的分化率。

1.6 羧苄青霉素 (Carb) 对抑制根癌农杆菌增殖的作用

设置了 Carb 0、100.0、200.0、300.0 和 500.0 mg/L 5 个不同的处理。用灭菌接种环在 LB 固体培养基平

板上划线, 置于 22 °C 培养箱中, 将平板倒置暗培养 48 h 后, 观察根癌农杆菌的生长情况。

1.7 预培养时间对分化抗性不定芽的作用

将辣椒子叶外植体在 MB 分化培养基上分别预培养 1、2 和 3 d, 设没有进行预培养的处理为对照, 然后用稀释的根癌农杆菌菌液 ($D_{600\text{nm}}$ 为 0.3) 浸泡 7 min, 浸菌后的子叶外植体转移至 MB 分化培养基中, 置于 22 °C 的培养箱中黑暗条件下进行共培养 2 d, 再移至筛选分化培养基 [MB 分化培养基 + Kan 35.0 mg/L + Carb 500.0 mg/L] 中, 置于 26 °C, 光照培养室进行培养, 40 d 后统计抗性不定芽的分化率。

1.8 根癌农杆菌菌液浓度以及浸菌时间对辣椒子叶外植体培养的影响

将活化培养后的根癌农杆菌用分光光度计测其 $D_{600\text{nm}}$, 再用无激素的 1/2 MS 液体培养基 (pH 5.2) 将其分别稀释至 $D_{600\text{nm}}$ 为 1.0、0.5、0.3 和 0.1, 用于侵染辣椒子叶外植体。浸菌时间设置了 4 个不同的处理: 1、4、7 和 10 min。以菌液完全浸泡辣椒子叶外植体开始计时, 期间不断振荡。浸菌完毕后, 倒掉菌液, 用灭菌滤纸吸干多余的菌液, 挑取没有萎蔫、颜色鲜绿的子叶外植体接种到 MB 分化培养基中, 置于 22 °C 培养箱中黑暗条件下共培养 2 d, 然后移至筛选分化培养基中, 置于 26 °C、光照培养室培养。30 d 后统计诱导形成的抗性愈伤组织的数量。

1.9 辣椒抗性不定芽的 PCR 检测

将筛选培养获得的 23 株抗 Kan 的辣椒不定芽转接到添加 Kan 35 mg/L 的伸长培养基^[4] [MB (MS_{矿质元素} + B5_{有机}) 添加 IAA 1.0 mg/L、6-BA 3.0 mg/L、GA3 2.0 mg/L、AgNO₃ 10.0 mg/L 和 $\varphi = 10.0\%$ 的 CM] 中, 使不定芽伸长。

切取抗 Kan 的伸长不定芽和对照不定芽的叶片约 0.2 g, 参照 Hadidi 等^[5]的方法分别提取总 DNA。质粒 DNA 的提取和纯化用碱裂解法^[6]。根据 CMV-CP 基因序列^[7]设计并合成 PCR 引物 (由上海生物工程公司合成), 引物 1: 5'-CATCGACCATGGACAAATCAAC-3'; 引物 2: 5'-CTCTCCATGGCGCATTC-3'。

以抗性不定芽和对照不定芽的总 DNA 以及质粒 DNA 为模板, 参照李华平等^[8]的方法进行 PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 辣椒子叶外植体对 Kan 的敏感性

将辣椒子叶外植体接种到不添加 Kan 的 MB 分化培养基中进行培养时, 不定芽分化率达到 87.5%。但当接种到添加 Kan 25.0 mg/L 的 MB 分化培养基中时, 辣椒子叶外植体分化不定芽则受到了明显的抑制, 不定芽分化率仅为 25.0%, 显著低于对照, 而

且子叶变成黄绿色.当接种到添加 Kan 35.0 mg/L 或以上的 MB 分化培养基中时,辣椒子叶外植体切口褐化严重,不定芽完全不能分化(表 1).因此认为 Kan 35.0 mg/L 可以作为选择压.

表 1 卡那霉素对辣椒子叶外植体分化不定芽的影响¹⁾

Tab. 1 Effect of Kan on adventitious buds differentiation of cotyledon explants of pepper

$\rho(\text{Kan})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	外植体数 no. of explants/个	分化的外植体数 no. of differentiated explants/个	不定芽分化率 differentiation rate of adventitious buds/%
0	24	21	87.5a
25.0	24	6	25.0b
35.0	24	0	0c
50.0	24	0	0c
75.0	24	0	0c
100.0	24	0	0c

1) 同列数据后字母不同表示在 0.05 水平差异显著 (Duncan's 法); 培养基为 MB + IAA 1.0 mg/L + 6-BA 5.0 mg/L

2.2 Carb 对抑制根癌农杆菌增殖的效果

在添加不同质量浓度 Carb 的 LB 培养基中,接种根癌农杆菌培养 2 d 后,观察的结果表明,在添加 Carb 100.0 mg/L 的培养基中,根癌农杆菌的增殖几乎不受影响;在 Carb 为 200.0 和 300.0 mg/L 的培养基中,根癌农杆菌的增殖受到了明显的抑制;而在 Carb 为 500.0 mg/L 的培养基中,根癌农杆菌的增殖则完全受到抑制(表 2).所以,抑制根癌农杆菌增殖的适宜 Carb 质量浓度为 500.0 mg/L.

表 2 羧苄青霉素对抑制根癌农杆菌生长的影响¹⁾

Tab. 2 Inhibition effect of Carb on growth of *Agrobacterium tumefaciens*

$\rho(\text{Carb})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	根癌农杆菌生长情况 growth of <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
0	+++
100.0	+++
200.0	++
300.0	+
500.0	-

2.3 预培养时间对辣椒子叶外植体分化抗性不定芽的影响

与不进行预培养的对照相比,将辣椒子叶外植体进行预培养处理能够显著提高抗性不定芽的分化率,其中以预培养 2 d 的效果最好,培养 40 d 后抗性不定芽分化率达到 20.0% (表 3).

2.4 根癌农杆菌菌液浓度对诱导辣椒子叶形成抗性愈伤组织的影响

用 $D_{600 \text{ nm}}$ 为 1.0 的根癌农杆菌菌液浸泡外植体

表 3 预培养时间对子叶外植体分化抗性不定芽的影响¹⁾

Tab. 3 Effect of preculture time on Kan-resistant adventitious buds formation of cotyledon explants of pepper

$t(\text{预培养})/\text{d}$ pre-culture /d	外植体数 no. of explants/个	抗性不定芽分化率 differentiation rate of Kan-resistant adventitious buds/%
0	60	10.0c
1	60	15.0b
2	60	20.0a
3	60	5.0d

1) 表中同列数据后字母不同表示在 0.05 水平差异显著 (Duncan's 法)

1 min 后,外植体出现颜色变暗以及萎蔫.用 $D_{600 \text{ nm}}$ 为 0.1 的根癌农杆菌菌液浸泡外植体,从外观上几乎没有发生变化,当移至筛选分化培养基后,外植体初期出现膨大但不分化,最终与对照一样,褐变死亡.用 $D_{600 \text{ nm}}$ 为 0.3 或 0.5 的根癌农杆菌菌液浸泡外植体 7 min 后,经过共培养 2 d,也有部分外植体褐变死亡,但在随后的筛选分化培养过程中,在一部分的外植体上形成了愈伤组织,其中以根癌农杆菌菌液的 $D_{600 \text{ nm}}$ 为 0.3 时,形成的愈伤组织较多(表 4).

表 4 根癌农杆菌菌液浓度对辣椒子叶外植体形成愈伤组织的影响¹⁾

Tab. 4 Effect of *Agrobacterium tumefaciens* concentration on Kan-resistant callus formation of cotyledon explants of pepper

$D_{600 \text{ nm}}$	外植体数 no. of explants/个	形成抗性愈伤组织外植体数 no. of explants induced Kan-resistant callus/个
1.0	60	0c
0.5	60	2b
0.3	60	4a
0.1	60	0c

1) 表中同列数据后字母不同表示在 0.05 水平差异显著 (Duncan's 法)

2.5 根癌农杆菌浸染时间对诱导辣椒子叶形成抗性愈伤组织的影响

根癌农杆菌在外植体细胞表面的附着是实现 T-DNA 转移和整合的前提,但是,如果浸染时间过长,外植体受伤严重,则不利于外源基因的转化;与之相反,如果浸染时间太短,附着于外植体的根癌农杆菌不够,也不利于外源基因的转化.本试验将辣椒子叶外植体分别浸泡于 $D_{600 \text{ nm}}$ 为 0.3 的根癌农杆菌菌液中 1、4、7 和 10 min 后,经共培养 2 d,再转移至筛选分化培养基中,培养 30 d 后,只有浸染时间为 7 min 时,才能够诱导形成愈伤组织;在其他的浸染时间处理中,均未形成愈伤组织(表 5).因此,认为浸染时间以 7 min 为宜.

表5 根癌农杆菌浸染时间对辣椒子叶外植体形成抗性愈伤组织的影响¹⁾

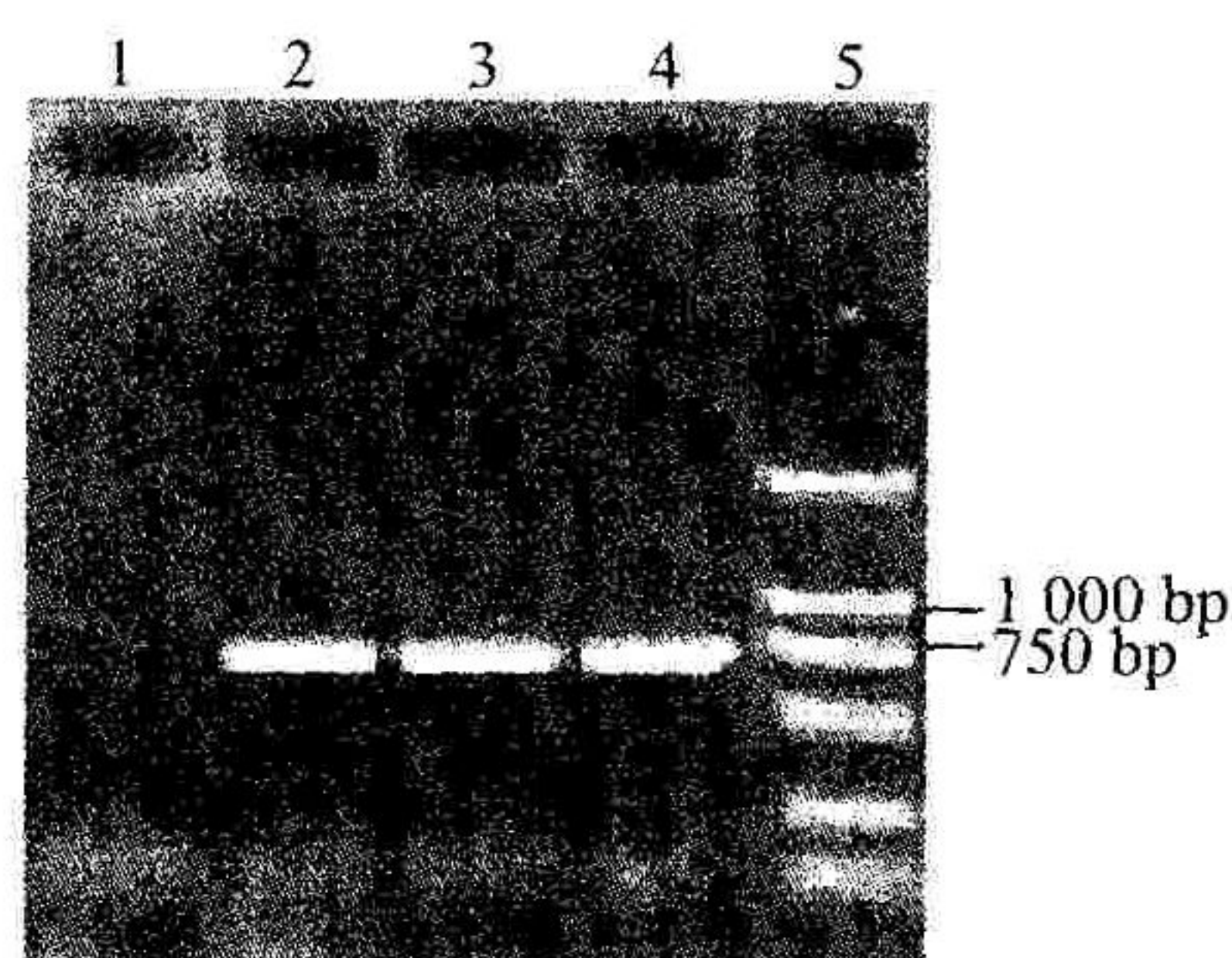
Tab. 5 Effect of *Agrobacterium tumefaciens* inoculation time on Kan-resistant callus formation of cotyledon explants of pepper

<i>t</i> (浸菌 inoculation) /min	外植体数 no. of explants/个	形成抗性愈伤组织外植体数 no. of explants induced Kan-resistant callus/个
1	60	0b
4	60	0b
7	60	3a
10	60	0b

1)表中同列数据后字母不同表示在 0.05 水平差异显著 (Duncan's 法)

2.6 伸长抗性不定芽总 DNA 的 PCR 检测

以质粒 DNA 为阳性对照,未转化的(对照)不定芽总 DNA 为阴性对照,对 10 株伸长的辣椒抗性不定芽总 DNA 进行 PCR 扩增的结果表明,阳性对照及 10 株抗性不定芽中的 2 株扩增得到预期的 740 bp 的 DNA 谱带,而阴性对照没有扩增出该 DNA 谱带(图 1)。初步证明 *CMV-CP* 基因已转入辣椒不定芽中。



1:未转化不定芽 DNA(阴性对照); 2:pBI121 质粒 DNA(阳性对照); 3~4:抗性不定芽总 DNA; 5:DNA marker DL2000

1: genome DNA of non-transgenic adventitious buds (negative control); 2: DNA of pBI121 plasmid DNA (positive control); 3-4: genome DNA of transgenic adventitious buds; 5: DNA marker DL2000

图1 抗性不定芽的 *CMV-CP* 基因 PCR 扩增电泳

Fig. 1 PCR electrophoretogram of the Kan-resistant adventitious buds

3 讨论

根癌农杆菌浸泡时间是影响转化效果的重要因素之一。不同的植物种类以及品种,其适宜的浸泡时间也有所差异。有关根癌农杆菌浸泡辣椒外植体的适宜时间,已有报道的结果差异不大,一般是浸泡 5~10 min^[9-10]。在本试验中,只有将辣椒子叶外植体浸泡于根癌农杆菌菌液中 7 min 时,才能诱导形成抗性愈伤组织,结果与已有报道基本相符。

关于预培养对外源基因转化的影响,因植物种类而异。在毛白杨的遗传转化中,预培养不利于外源

基因的转化^[11]。但在辣椒上,预培养 2~3 d 可提高子叶外植体不定芽的分化率^[12-13],本试验比较了预培养 1~3 d 的效果,发现与不经预培养的对照相比,预培养不仅降低了褐化率,且提高了抗性不定芽的分化率,其中以预培养 2 d 的效果最好,这与前人的研究结果基本一致。值得一提的是,预培养在提高抗性不定芽分化率的同时,可能也会增加假阳性不定芽的比例,本试验共检测了 10 株不定芽,其中只有 2 株扩增出预期的目的 DNA 谱带,比例稍偏低,其原因是否与经过预培养有关,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展[M]. 北京:科学出版社,1995:497-505.
- [2] 张宗江,周钟信,刘艳军,等. 黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因转化辣椒及其在转基因株后代的表达[J]. 华北农学报,1994,9(3):67-71.
- [3] 商鸿生,王旭,徐秉良,等. *CP* 基因转化的线辣椒抗卡那霉素和抗 *CMV* 特性的遗传[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2001,29(5):103-106.
- [4] 吴丽君,胡开林. 辣椒离体培养再生植株的研究[J]. 华南农业大学学报,2007,28(1):73-76.
- [5] HADIDI A, MONTASSER M S, LEVY L, et al. Detection of potato leafroll and strawberry mild yellow-edge lutes viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification[J]. Plant Dis,1993(77):595-601.
- [6] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆试验指南[M]. 2版. 金冬雁,黎孟枫,等译. 北京:科学出版社,1996:19-22.
- [7] 李华平,胡晋生, BARRY K,等. 黄瓜花叶病毒香蕉株系的衣壳蛋白基因克隆和序列分析[J]. 病毒学报,1996,12(3):235-242.
- [8] 李华平,胡晋生, BARRY K,等. 黄瓜花叶病毒香蕉株系的衣壳蛋白转基因烟草的研究[J]. 病毒学报,1996,12(2):162-169.
- [9] 柳建军,于洪欣,周玉,等. 辣椒的离体再生及抗虫基因转化的研究[J]. 山东师范大学学报:自然科学版,2002,17(4):74-76.
- [10] 上官小霞,吴霞,张林水,等. 辣椒农杆菌介导转化体系的建立及外源基因的转化[J]. 华北农学报,2003,18(2):5-8.
- [11] 刘斌. 反义磷脂酶 *Dy* 转化毛白杨的研究[J]. 遗传,2002,24(1):40-44.
- [12] 袁静,吴涛,刘中来. 影响农杆菌介导的辣椒基因转化因素的研究[J]. 华中师范大学学报:自然科学版,2003,37(2):227-230.
- [13] LI D, ZHAO K, XIE B, et al. Establishment of a highly efficient transformation system for pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Plant Cell Rep,2003,21:785-788.

【责任编辑 柴 焰】