核 农 学 报 2009,23(3):423～428
Journal of Nuclear Agricultural Sciences

文章编号:1000-8551(2009)03-423-06

美洲拟鲽抗冻蛋白基因遗传转化草莓的研究

孙瑞芬[1] 李天然[2] 安玉麟[1] 李芳[3] 石慧芹[3] 牛素清[1] 赵京惠[4]

(1. 内蒙古农牧业科学院生物技术中心,内蒙古 呼和浩特 010031;2. 内蒙古大学生命科学学院,内蒙古 呼和浩特 010021;
3. 内蒙古农牧业科学院园艺研究所,内蒙古 呼和浩特 010010;4. 呼和浩特市蔬菜技术推广站,内蒙古 呼和浩特 010070)

摘 要:以草莓品种星都 2 号和全明星的无菌苗叶盘和叶柄基部为外植体,采用携带美洲拟鲽编码 *pre*、*pro* 和 *mature* 3 种抗冻蛋白(AFP)基因的双元载体系统的根癌农杆菌进行转化,获得 7 个 Km 抗性株系。经 PCR 扩增及 PCR-Southern 杂交检测,6 个株系呈阳性,结果表明,编码 *pre*、*pro* 和 *mature* 的 AFP 基因分别整合到了星都 2 号和全明星染色体 DNA 中,其中获得 *pre*、*pro* 和 *mature* 转星都 2 号株系各 1 个,转化率分别为 1.56 %、1.49 %和 1.67 %;*mature* 基因转全明星株系 3 个,转化率为 4.05 %。

关键词:草莓;美洲拟鲽;抗冻蛋白(AFP)基因;遗传转化;PCR-Southern 杂交

THE GENETIC TRANSFORMATION OF STRAWBERRY WITH WINTER FLOUNDER ANTIFREEZE PROTEIN GENE

SUN Rui-fen[1] LI Tian-ran[2] AN Yu-lin[1] LI Kun[3] SHI Hui-qin[3] NIU Su-qing[1] ZHAO Jing-hui[4]

(1. *Biotechnology Research Center, Inner Mongolia Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Huhhot, Inner Mongolia* 010031;
2. *College of Life Science, Inner Mongolia University, Huhhot, Inner Mongolia* 010021;
3. *Institute of Horticulture, Inner Mongolia Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Huhhot, Inner Mongolia* 010010;
4. *Vegetable Technology Extend Station of Huhhot, Huhhot, Inner Mongolia* 010070)

Abstract: Antifreeze protein (AFP) of *Pseudopleuronectes americanus* gene encoding *pre*, *pro* and *mature* was introduced into strawberry (*Fragaria* × *ananassa cv*. Xingdu 2 and Allstar) by mediated *Agrobacterium* gene transfer of a binary vector, and the axenic leaf discs and lower part of petioles of strawberry were used as explants. The results showed that the foreign AFP gene encoding *pre*, *pro* and *mature* was integrated independently into the genome of six transgenic strawberry plants by PCR and PCR-Southern bloting analysis of seven Kmamycin-resistant transformed plants. Three regenerated Xingdu 2 lines were positive for *pre*, *pro* and *mature*, and their transformation efficiency was 1.56 %, 1.49 % and 1.67 % respectively. Three regenerated Allstar lines were positive for *mature* and its transformation efficiency was 4.05 %.

Key words: strawberry; winter flounder; antifreeze protein (AFP) gene; gene transfer; PCR-Southern blotting

草莓(*Fragaria* ×*ananassa Duch*.)是一种非常重要的水果经济作物,因其具有丰富的营养价值和重要的保健作用在国内外水果市场上占有重要的地位,然而低温、冻害成为寒冷地区草莓生产的主要限制因素,因此提高草莓的抗寒性,培育抗寒品种是草莓生产的迫切需要。传统的育种方法往往受到品种内遗传多样性的限制,而基因工程技术的发展和应用打破了物种间的界限,能够将来自相同或其他不同物种的特异性状导入植物体内。目前,抗冷冻蛋白基因克隆和转化的成功,为作物抗寒育种开辟了一条新途径。

抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)是一类具有降低生物体液冰点和抑制冰晶生长的生物活性蛋白,在低温生物的生存中起着重要的作用。目前,已从鱼类、昆虫、植物、真菌中分离了许多抗冻蛋白,而研究最深入、

收稿日期:2008-10-28 **接受日期**:2009-02-17
基金项目:内蒙古自治区科技重点攻关项目(NK20030082)
作者简介:孙瑞芬(1963-),女,内蒙古乌兰察布人,硕士,研究员,主要从事生物技术研究工作。E-mail: sunruifen3231@sina.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

应用最广泛的是鱼类抗冻蛋白。鱼类 AFP 是一些生活在两极高纬度海域中的硬骨鱼类为保护其血液在环境温度低于血液冰点时不致因冻结造成机体死亡而在肝脏中合成的一类特殊的血清蛋白。鱼类 AFP 已转入到鱼类、昆虫、植物中并获得表达,而特别令人瞩目的是将鱼类 AFP 基因转入植物中提高了植物的抗寒性。Cultur 等[1]采用真空渗入法将北极鱼 AFP 基因转入到马铃薯、油菜和拟南芥等植物的叶片中,使叶片和细胞免受冻害的温度降低约 1.8 ℃。Strizhor[2]把北极鱼 AFP cDNA 克隆获得的 AFP 基因转入烟草中表达,使烟草可耐 - 6.5 ℃的低温。Geroges 等[3]将人工合成的 AFP 基因,用电激法转入到玉米原生质体中,通过 CAT 活性、Western 杂交及免疫学检测,证实 AFP 基因在玉米原生质体中表达。美洲拟鲽(*Pseudopleuronectes* americanus)是生活在寒带和寒温带的一种海鱼,能产生大量的抗冻蛋白。黄永芬等[4]采用花粉管通道和子房注射法将美洲拟鲽 AFP 基因导入番茄中获得表达。李天然等[5]将美拟鲽 AFP 基因转入甜菜中,获得 AFP 基因整合表达的工程植株,使甜菜可耐 - 6.5 ℃的低温,但国内外对 AFP 基因转化草莓的研究未见报道。

本研究在草莓再生体系建立[6]的基础上,通过农杆菌介导进行草莓优良品种转化 *AFP* 的研究,获得了转基因植株,为草莓基因工程育种研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

草莓品种星都 2 号、全明星取自内蒙古农牧业科学院园艺研究所草莓试验地。AFP 基因是从北极鱼(美洲拟鲽 *Pseudopleuronectes am* ericanus)的血液中提取的 3 种抗冻肽,由特异的 mRNA 反转录合成 cDNA。cDNA 包括 *pre*、*pro* 和 *mature* 3 部分,其中 *mature* 基因 189bp,pro(含 *mature* 基因)252bp,*pre*(含 *pro* 和 *mature* 基因)310bp。3 种 AFP 基因已被分别组装于表达盒子(expression cassette)上,并构建到植物表达载体 pPCV002 中,用于 AFP 基因的遗传转化。*E. coli* S_{17-1} 菌株(带有编码 *pre*、*pro* 和 *mature* AFP 基因的双元载体质粒 p PCV002,代号分别为 2183、2184、2185)和农杆菌 GV3101(p Mp90Rk)由李天然教授提供,质粒及 AFP 基因表达盒子见图 1-A、B、C。

1.2 方法

1.2.1 引物 选用 *pre*、*pro* 和 *mature* 3 个基因共有部分的 173bp 碱基序列设计引物,引物由南京依贝生物工程公司合成。序列为:Primer 1:5'GAC ACC GCC TCT GAT 3'(15mer); Primer 2:5'TCC GTC GAT CCT TAA CCT CTG 3'(21mer)。

1.2.2 *E. coli* S_{17-1} 和农杆菌 GV3101 的融合 供试菌株 *E. coli* S_{17-1} 的质粒 pPCV002(分别含 pre、pro、mature)是一种新型双元载体系统,含有复制和动员单位(mob),它可以在 *E. coli* 和农杆菌间来回转移,具有 RK_2 的辅助功能[7],所以将质粒 pPCV002 转化到含 Vir 区质粒(pMP90RK)的根癌农杆菌 GV3101 中,不需要另外的辅助质粒,结合程序如下:(1)挑取农杆菌 GV3101(Km^r)单菌落,接种于 5ml YEB 液体培养基(含 Km 50mg/L、Rif 20mg/L)中,于 28 ℃以 300r/min 振荡培养 2d;(2)分别挑取含 *pre*、*pro* 和 *mature* 基因的 3 种 *E. coli* S_{17-1} 单菌落,接种于 5ml 含 Amp 100mg/L 的 LB 液体培养基中,于 37 ℃以 300r/min 水浴振荡培养过夜;(3)将 GV3101 和 3 种 *E. coli* S_{17-1} 的培养物以 5000r/min 离心 10min,去上清,沉淀分别悬浮于 10ml YEB 和 LB 液体培养基中。(4)吸取 3 种 *E. coli* S_{17-1} 培养物 30μl,分别与 50μl 农杆菌培养物混合均匀涂布于 YEB 固体平板培养基(不含任何抗菌素)上,于 28 ℃培养过夜,长菌落;(5)用 1ml 无菌 ddH_2O 洗脱 YEB 平板上的菌落并用 Tip 头吸打数次,使其混匀;(6)分别取 100μl 上述菌液,用无菌 ddH_2O 稀释成 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6} 稀释液;(7)吸取各梯度稀释液 100μl,分别涂布于 YEB 固体培养基(含 Amp 100mg/L、Km 50mg/L、Rif 20mg/L)上,28 ℃培养 2d,长菌落。同时在同样的平板上分别涂 GV3101、S_{17-1} 作为对照;(8)挑取分离好的单菌落划线培养于含 Amp 100mg/L、Km 50mg/L、Rif 20mg/L 的 YEB 培养基上,28 ℃培养 2d,得到形态、颜色、大小均匀一致的菌落为融合的双元载体克隆。

1.2.3 草莓外植体的转化 取 3 种转化农杆菌的过夜培养物 5ml(含 Km 50mg/L),用 MS 液体培养基(不加抗生素)稀释菌液到 OD_{600nm} 值为 0.5 左右,分别侵染星都 2 号和全明星的无菌苗叶盘及叶柄基部 5min。取出外植体,用无菌滤纸吸干多余菌液,将其接种于不含抗菌素的 MS(B_5 有机,即将 MS 培养基中的有机成分换成 B_5 培养基中的有机成分) + 6-BA 2.3mg/L + IAA 1.8mg/L 的培养基上,在黑暗条件下与农杆菌共培养 3d。

1.2.4 小植株再生和筛选 将共培养 3d 后的外植体转入含 Km 25mg/L、cef 500mg/L 的相同培养基中诱导生芽,将诱导出的芽转接在继代培养基 MS + 6-BA 1.0mg/L + NAA 0.01mg/L(含 Km 25mg/L)中生长并增

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

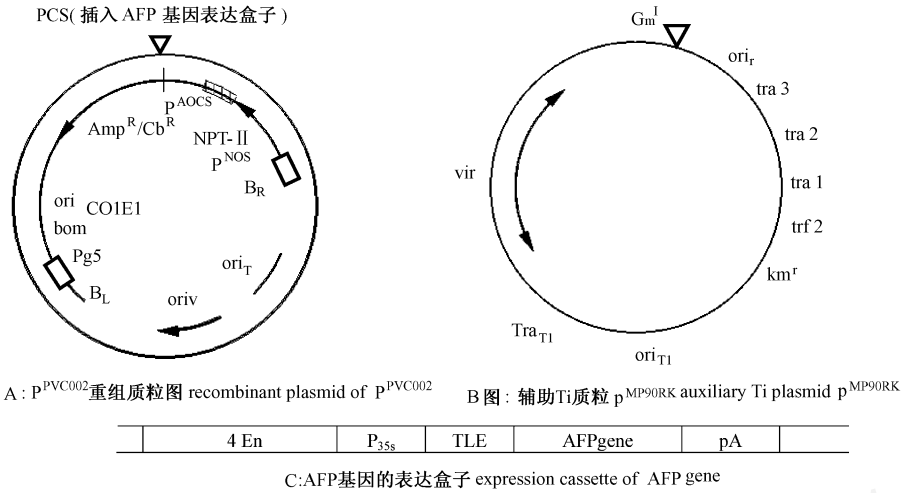

图 1　质粒及 AFP 基因表达盒子

Fig. 1　Plasmid and expression cassette of AFP gene

A 图 : P^{NOS} :胭脂碱合成酶基因启动子 ; P^{AOCS} :章鱼碱合成酶基因的多聚腺苷酸化序列 ; *NPT*- II:新霉素磷酸转移酶 ; B_L 和 B_R : T-DNA_S 的左右边界序列 ; Pg5 : T_L-DNA 基因的截短启动子。B 图 :vir : Ti 质粒的毒区 ; tra_{Ti} : Ti 质粒的转移位点 ; ori_{Ti} : Ti 质粒的复制原点 ; $tra_{1\sim3}$ 和 trf_2 :来自辅助质粒 RK_2 的转移基因。C 图 :4 En :4 个增强子 ; TLE : TMV △Ω(转译增强序列) ; P_{35S} : CaMV35S 的启动子 ; pA : CaMV35S 的 polyA 中止序列

Figuer A : P^{NOS} :promoter of nopaline synthase gene ; P^{AOCS} :polyadenylation sequence of octopine synthase gene ; *NPT*- II:neomyein phosphotransferase gene ; B_L and B_R :left and right border sequences of vecter T-DNA_S ; Pg5 :truncated promoter of T_L-DNA gene. Figuer B :vir :toxic origin of Ti plasmid ; tra_{Ti} :transfer site of Ti plasmid ; ori_{Ti} :replication origin of Ti plasmid ; $tra_{1\sim3}$ and trf_2 :transfer gene from auxiliary plasmid RK_2. Figuer C :4 En :4 enhancers ; TLE : TMV △Ω(translation enhanced sequence) ; P_{35S} :promoter of CaMV35S ; pA :polyA pause sequence of CaMV35S

殖,待小植株长出 4～5 片幼叶时,将其转接到 MS + IBA 0.5mg/L (含 Km 25mg/L) 培养基中生根。

1.3　测定

1.3.1　3 种转化农杆菌质粒 pPCV002 的电泳检测　用碱裂解法[8] 提取 3 种融合后的农杆菌质粒和 3 种 *E. coli* S_{17-1} 重组质粒,用 1.0 %琼脂糖凝胶电泳检测并照相。

1.3.2　转化农杆菌重组质粒中 *pre*、*pro* 和 *mature* 基因的 PCR 检测　对 *E. coli* S_{17-1} 质粒以及转化农杆菌质粒中 *pre*、*pro* 和 *mature* 基因进行 PCR 扩增。扩增条件为: 94 ℃预变性 5min ,94 ℃变性 1min ,56 ℃退火 1min ,72 ℃延伸 0.5min ,30 个循环 ,72 ℃保温 10min。2.5 %琼脂糖凝胶电泳检测并照相。

1.3.3　转化体鉴定　提取抗 Km 的转化植株总 DNA ,方法按照北京天为时代科技有限公司 Plant Genomic DNA Kit 产品说明书进行,以含 *mature* 基因的农杆菌质粒 DNA 的扩增片断作阳性对照 , 以未转化植株的 DNA 扩增产物为阴性对照 ,PCR 扩增目的基因进行转化体的鉴定 ,PCR 反应条件同上。

1.3.4　PCR-Southern 杂交检测　探针制备是将农杆菌重组质粒 pPCV002/mature 的 PCR 扩增产物回收纯化 ,以其作为模板进行标记 ,按照 Roche 产品 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit Ⅰ产品说明书进行。凝胶转膜是将转化植株总 DNA 的 PCR 产物和质粒 DNA 的 PCR 扩增产物(阳性对照)以及非转化植株总 DNA 的 PCR 扩增产物(阴性对照)进行 2.5 %琼脂糖凝胶电泳 , Southern 吸印转移到 Total BLOT + ™ Nylon Membranes(Mandel 产品) 上。转膜按王关林等[9] 的方法进行。杂交按照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit Ⅰ产品说明书进行。

2　结果与分析

2.1　转化农杆菌中重组质粒的检测

转化的农杆菌能在含有 Km、Amp、Rif 的 YEB 固体培养基上生长,而对照不能生长,初步说明 3 种重组质粒 pPCV002 已分别转进农杆菌中。

采用碱裂解法提取 *E. coli* 及转化农杆菌的 3 种质粒并用琼脂糖凝胶电泳分析证明,从融合后的农杆菌 GV3101 中分别获得了约 10.49 kb (含 *pre*) 、10.43 kb (含 *pro*) 、10.38 kb (含 *mature*) 的重组双元载体质粒,其迁移速率正好与 *E. coli* S_{17-1} 中的重组质粒一致(图 2) ,进一步证明 3 种重组质粒分别转进了农杆菌 GV3101 中。

2.2　转化农杆菌中 pre、pro 和 mature 基因的 PCR 检测

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

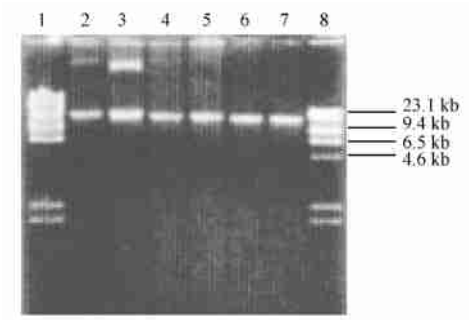

图 2 转化农杆菌重组质粒电泳检测

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid in *Agrobacterium*

1、8:λDNA/*Hind* Ⅲ标准样品;2、4、6:含有 *pre*、*pro* 和 *mature* 基因的农杆菌重组质粒; 3、5、7:含有 *pre*、*pro* 和 *mature* 基因的大肠杆菌重组质粒

1,8:λDNA/*Hind* ⅢMarker; 2,4,6:recombinant plasmid with *pre*, *pro* and *mature* gene in *Agrobacterium*;

3,5,7:recombinant plasmid with *pre*, *pro* and *mature* gene in *E. coli*

进一步对 *pre*、*pro* 和 *mature* 基因进行 PCR 扩增,电泳结果表明(图 3),从转化农杆菌质粒中扩增出的条带大小与从 *E. coli* 质粒中扩增出的条带大小相同,为 173bp,均为 *mature* 基因的片段,再一次证明含有 *pre*、*pro* 和 *mature* 基因的 3 种质粒分别转化进了农杆菌中。

2.3 草莓外植体的转化和抗性小植株的再生

将 2 个草莓品种的叶盘和叶柄基部分别在含 *pre*、*pro* 和 *mature* 基因的农杆菌中侵染 5min,共培养 3d 后,在 MS 附加 6-BA 2.3mg/L、IAA 1.8mg/L、Km 25mg/L、cef 500mg/L 培养基中培养 15d,从星都 2 号和全明星的叶柄基部切口处产生小绿点继而分化成丛芽(图 4-a、b)。

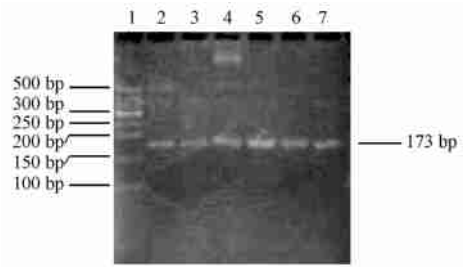

图 3 转化农杆菌重组质粒 PCR 检测

Fig. 3 PCR analysis of recombinant plasmid in *Agrobacterium*

1:50bp DNA 标准样品(北京天为时代产品);

2、4、6:农杆菌质粒 *pre*、*pro* 和 *mature* 的 PCR 扩增;

3、5、7:大肠杆菌质粒 *pre*、*pro* 和 *mature* 的 PCR 扩增

1:50bp DNA Ladder Marker;2,4,6:PCR product of *pre*, *pro* and *mature* gene in *Agrobacterium*;3,5,7:PCR product of *pre*, *pro* and *matur* gene in *E. coli*

再生芽长到 2～3cm 时,从转化的外植体上切下来,转接到新鲜的具选择标记(Km 25mg/L)的继代培养基中继续培养一段时间后,有的小植株逐渐变黄死亡,这些是非转化细胞再生的不定芽。由筛选下来的小植株扩繁出转化芽的无性繁殖株系见图 4-c、d。

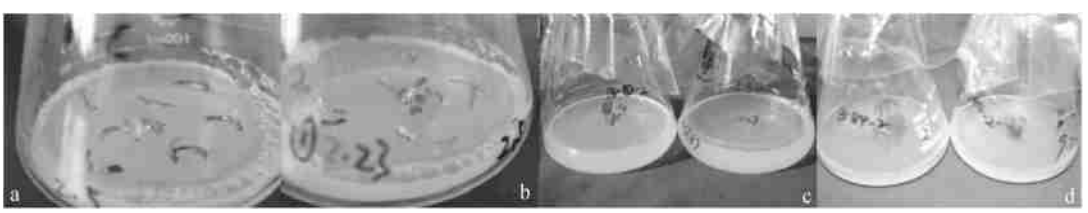

图 4 抗性芽(a,b)及其无性繁殖株系(c,d)

Fig. 4 Km-resistant shoots (a, b) and clone lines(c,d)

将各株系的小植株转移到 MS 附加 IBA 0.5mg/L 和 Km 25mg/L 生根培养基中,进一步筛选掉可能由于外植体在培养过程中吸水膨胀发生弯曲而离开筛选培养基所产生的一些假阳性植株。筛选后的植株在生根培养基中能够很好地生根(图 5)。而与叶柄基部同时转化的叶盘无转化芽产生,并逐渐变褐死去,由此也说明叶柄基部是草莓遗传转化较合适的受体。

3 种 *AFP* 基因转化草莓的结果表明,用 *pre*、*pro* 和 *marture* 基因转化的星都 2 号均获得了抗性植株;而转化的全明星中,只获得了 *mature* 基因转化的抗性植株,最后得到 7 个转化植株的无性繁殖株系(表 1)。

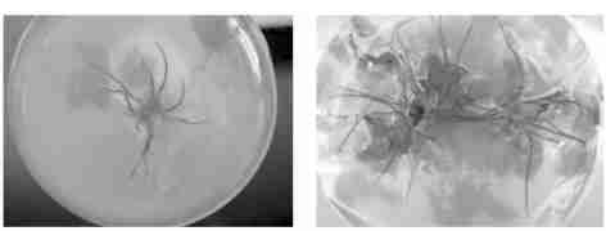

图 5 生根的转基因植株

Fig. 5 Transgenic plants for inducing roots

2.4 转化植株的 PCR 检测

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　3 种 AFP 基因对草莓品种的转化结果

Table 1　The transformation results of strawberry with three different *AFP* genes

目的基因 target gene	草莓品种 varieties of strawberry	接种外植体数量 total number of explants	再生芽的外植体数量 number of explants regenerated shoots	再生芽数量 number of regenerated shoots	卡那霉素抗性芽数量 number of Km-resistant shoots	卡那霉素抗性生根株系数量 number of rooting Km-resistant lines	PCR-Southern 检测阳性株系数量 number of PCR-Southern positive lines	目的基因的转化频率 frequency of target gene transformation (%)
pre	星都 2 号 Xingdu 2	64	10	10	3	1	1	1.56
	全明星 Allstar	62	9	9	2	0	0	0
pro	星都 2 号 Xingdu 2	67	12	12	3	1	1	1.49
	全明星 Allstar	71	3	3	0	0	0	0
mature	星都 2 号 Xingdu 2	60	1	3	2	1	1	1.67
	全明星 Allstar	74	8	8	5	4	3	4.05

只要从 *pre*、*pro* 和 *marture* 转化的植株中均扩增出 *mature* 基因的片断,就可初步证明含 *pre*、*pro* 和 *marture* 的 AFP 基因已整合到草莓基因组 DNA 中。电泳结果表明(图 6),从 6 个转化株系中均扩增出与阳性对照大小一样的片段(173bp),而阴性对照中没有扩增出预期片断。

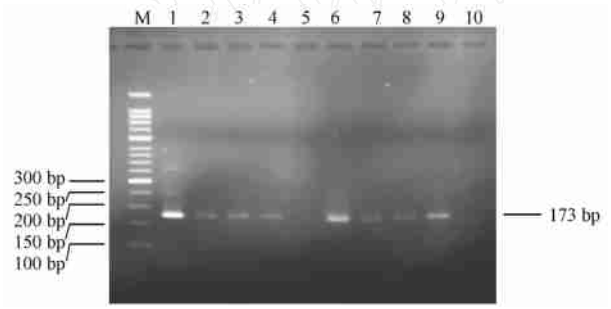

图 6　转基因植株的 PCR 检测

Fig. 6　PCR analysis of transgenic plants

M:50 bp DNA 标准样品(TaKaRa 产品);1、6:阳性对照;2、3、4: *pre*、*pro* 和 *mature* 转化星都 2 号的转基因株系;5、10:阴性对照;7、8、9: *mature* 转化全明星的转基因株系

M:50bp DNA Ladder Marker; 1,6:positive control; 2,3,4:transformed lines of Xingdu 2 with *pre*, *pro* and *mature*; 5,10:negative control; 7,8,9:transformed lines of Allstar with *mature*

2.5　转化植株的 PCR-Southern 杂交检测

为了进一步证实 PCR 扩增产物的真实性,将 PCR 扩增产物电泳后印迹转移到硝酸纤维素膜上,以 pPCV002/mature 质粒的 PCR 回收产物为探针进行 PCR-Sonthern 杂交,结果表明,PCR 阳性植株显示出较强的杂交信号(图 7),而阴性对照植株没有显示出杂交信号,进一步证明目的基因已成功整合进草莓基因组中,最终获得转基因株系 6 个,其中 *pre*、*pro* 和 *mature* 转星都 2 号株系各 1 个,转化率分别为 1.56 %、1.49 %和 1.67 %; *mature* 基因转全明星株系 3 个,转化率为 4.05 %(表 1)。

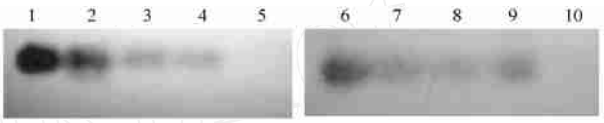

图 7　转基因植株 PCR-Southern 杂交检测

Fig. 7　PCR-Southern blotting detection of transgenic plants

1、6:阳性对照;2、3、4: *pre*、*pro* 和 *mature* 转化星都 2 号的转基因株系;5、10:阴性对照;7、8、9: *mature* 转化全明星的转基因株系

1,6:positive control; 2,3,4:transformed lines of Xingdu 2 with *pre*, *pro* and *mature*; 5,10:negative control; 7,8,9: transformed lines of Allstar with *mature*

3　讨论

植物转化过程中,掌握好外植体在农杆菌中的侵染时间是转化成功的关键之一。侵染时间太短,农杆菌不能充分接种到外植体伤口表面,共培养时无农杆菌生长,不能转化;侵染时间太长,外植体因受农杆菌的毒害缺氧而软腐坏死。侵染时间因作物不同而不同,一般不超过 30min[9]。本试验中草莓外植体在农杆菌中的最适侵染时间为 5min,试验中也曾进行过 30 和 60min 乃至 1～2d 的侵染试验,但都未获得再生植株,原因是在以后的培养中农杆菌过度生长致使外植体受毒害而坏死。但有些转化研究表明,农杆菌侵染 2d 也可获得理想的转化结果[5,10]。

多数研究者用草莓的叶片作为遗传转化的受体[11～15],而在本试验中,叶盘作为转化受体没有获得转基因植株,而用叶柄基部作转化受体时获得了转基因植株,因此认为草莓的叶柄基部可以作为草莓遗传转化的起始受体,这与李天然等[5]在研究 AFP 基因转化甜菜的试验结果是一致的。

Km 对转化有很大影响,不同的品种对 Km 的耐受程度不同。邓馨[14]在研究 Km 对草莓 M14 转化叶片

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Journal of Nuclear Agricultural Sciences
2009,23(3):423～428

再生时,用 50mg/L 的 Km 作为筛选转化细胞的浓度。秦永华等[16]在研究丰香草莓遗传转化中得出适宜的 Km 筛选浓度为 20mg/L。高庆玉等[17]在农杆菌介导 TCS 及 RIP 转化草莓森嘎拉和戈雷拉研究中,确定森嘎拉的 Km 最终筛选压力为 20mg/L,戈雷拉为 25mg/L。朱海生等[18]利用带有内含子 *gus* 基因的瞬时表达,研究影响根癌农杆菌介导鬼露甘草莓遗传转化的若干因素,结果表明:草莓叶片外植体对 Km 较为敏感,适宜的筛选浓度为 20mg/L。金万梅等[19]在冷诱导转录因子 CBF1 转化草莓的研究中用 25mg/L Km 筛选转化植株。本试验用 50mg/L Km 作为筛选浓度时无转化芽产生,而用 25mg/L Km 时获得了转化植株。

关于外植体在转化前是否要进行预培养,不同的植物研究结果不一致,一般认为对外植体进行一定时间的培养可以促进细胞分裂,呈分裂状态的细胞更容易整合外源基因,从而提高外源基因的瞬时表达和转化率。朱海生等[18]的研究发现,对鬼露甘草莓叶盘进行预培养是必要的,不经预培养直接用农杆菌感染,叶盘会很快褐化、死亡,预培养时间过短(1d),叶盘还未形成感受态细胞,细胞转化率较低;若预培养超过 4d,伤口快要愈合,农杆菌难以浸染,转化效率降低,而且即使获得不定芽,假阳性很高,经 Km 抗性选择便逐渐白化。这可能是本试验转化效率低的原因之一。

Nehra 等[20]在对草莓进行转化时发现,将侵染后的外植体在无抗生素的培养基中培养 10d 后,再加入选择压进行筛选,结果转化率从 3%提高到 7%,故认为延迟选择是提高转化率的关键。秦永华等[16]的研究表明,延迟 2 周筛选能显著提高丰香草莓转化率。通过延迟筛选提高转化率的方法值得我们借鉴。

近年来,国内外有关草莓遗传转化的报道比较多,本试验用北极鱼的 3 种 AFP 基因转化草莓品种星都 2 号和全明星,获得的转化植株经 PCR 和 PCR-Southern 杂交检测,证明 *pre*、*pro* 和 *mature* 基因分别整合到草莓染色体 DNA 中,叶柄基部可以作为草莓遗传转化的起始受体,有关这方面的研究,国内外尚未见报道,而关于 AFP 基因在转基因中的表达还需进一步进行田间抗寒性鉴定。

致谢:本试验承蒙内蒙古大学生命科学学院李天然教授悉心指导,在此向李天然教授表示深切的怀念。

参考文献:

[1] Culter A J, Saleem M, Kendall E, Lawrence V C, Georges F. Winter Flounter Antifreeze Protein Improve the Cold hardiness of plant Tissue[J]. Plant Physiol, 1989,135:351～354

[2] Strizhov N. Report to the Scientific Advisory Board of the Max-Planck Institut fur Zuchtungsforschung[J]. Cologne,1991,147

[3] Georges F, Saleem M, Cutler A J. Design and cloning of a synthesis gene for the flounder antifreeze protein and its expression in plant cells[J]. Gene, 1990,91(2):159～165

[4] 黄永芬,汪清胤,付桂荣,赵晓祥,杨志兴. 美洲拟鲽抗冻蛋白基因(afp)导入番茄的研究[J]. 生物化学杂志, 1997,13(4):418～422

[5] 李天然,张剑峰,李旭刚. 抗冷冻蛋白基因转化甜菜的研究[J]. 内蒙古大学(自然科学版),1998,29(1):144～146

[6] 孙瑞芬,李天然,李 莹,邓香兰,石慧芹,张颖力,贾利敏. 草莓组培快繁及叶片诱导植株再生的研究[J]. 华北农学报, 2002,17(4):49～53

[7] Csaba Koncz, Jeff Schell. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector[J]. Mol Gen Genet, 1986,204:383～396

[8] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T 著. 金冬雁,黎孟枫等译. 分子克隆实验指南(第 2 版)[M]. 北京:科学出版社, 1998,19～22

[9] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京:科学出版社,1998,224,620～621

[10] 张鹤龄,李天然,哈斯阿古拉,额尔敦,张彤,孙燕,庞瑞杰. 抗卷叶病毒(PLRV)转基因马铃薯栽培种及其抗病性研究[J]. 病毒学报,1995,11(4):342～350

[11] Nehra N S, Chibbar R N, Kartha K K, Datla R S S, Crosby W L, Stushnoff C. Agrobacterium-mediated transformation of strawberry calli and recovery of transgenic plants[J]. Plant Cell Reports,1990,9:10～13

[12] Nyman M and Wallin A. Tranient gene expression in strawberry (*Fragarina X ananassa* Duch.)[J]. Plant Cell Reports, 1992,11:105～108

[13] 张志宏,吴禄平. 草莓主栽品种 Tudla 遗传转化体系的建立[J]. 农业生物技术学报,1998,6(2):200～204

[14] 邓 馨,胡文玉. 草莓叶片再生芽及遗传转化体系的建立[J]. 植物学通报,2000,17(2):174～178

[15] 金万梅,尹淑萍,鲁韧强,袁维风,董 静,王桂霞. CO 基因对草莓遗传转化及抗病性鉴定[J]. 分子植物育种,2005,3(6):797～800

[16] 秦永华,张上隆. 影响根癌农杆菌介导的丰香草莓遗传转化因素分析[J]. 核农学报,2007,21(5):461～465

[17] 高庆玉,黄士杰,张丙秀. 农杆菌介导 TCS 及 RIP 基因转化草莓的研究[J]. 中国果树,2008 (2):14～18

[18] 朱海生,潘东明,林义章,张志忠,温庆放. 根癌农杆菌介导草莓遗传转化研究[J]. 核农学报,2008 ,22(1):36～40

[19] 金万梅,董 静,尹淑萍,闫爱玲,陈梅香. 冷诱导转录因子 CBF1 转化草莓及其抗寒性鉴定[J]. 西北植物学报,2007,27(2):0223～0227

[20] N S, Chibbar R N, Kartha K K, et al. Genetic transformation of strawberry by agrobacterium tumefaciens using leaf disk regeneration system[J]. Plant Cell Reports, 1990 (9):293～398

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net