

辣椒 *CaNPR1*-RNAi 表达载体的构建及其对辣椒的转化

罗欢^{1,2}, 段承杰^{1,2}, 陈保善^{1,2}, 唐纪良^{1,2}, 冯家勋^{1,2*}

(1. 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 南宁 530005; 2. 广西大学 生命科学与技术学院, 南宁 530005)

摘要: 从辣椒中克隆到一个与拟南芥系统获得抗性正调节基因 *NPR1* 同源的 *CaNPR1* 基因的全长 cDNA。辣椒 *CaNPR1* 基因与拟南芥 *NPR1* 基因在 mRNA 水平上同源率为 62.9%, 两者的编码产物一致性为 49.7%, 相似性为 65.7%。为鉴定该基因的功能, 构建了一个以 *CaNPR1* 基因为靶基因的 RNA 干扰辣椒表达载体 p*CaNPR1*-RNAi, 并用根癌农杆菌介导法转化辣椒桂研五号, 共获得了 6 株卡那霉素抗性再生苗, 经 Southern 杂交证实, 这些再生苗均为转基因植株, 为进一步鉴定该基因的功能奠定了基础。

关键词: *CaNPR1* 基因; 克隆; RNA 干扰; 辣椒遗传转化

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2008)01-0107-06

Construction of pepper *CaNPR1*-RNAi expression vector and its transformation to pepper

LUO Huan^{1,2}, DUAN Cheng-Jie^{1,2}, CHEN Bao-Shan^{1,2}
TANG Ji-Liang^{1,2}, FENG Jia-Xun^{1,2*}

(1. *Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresources Conservation and Utilization, Guangxi University, Nanning 530005, China*; 2. *College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China*)

Abstract: Full-length cDNA of *CaNPR1*, a homologous gene of the positive regulatory gene *NPR1* in systemic acquired resistance of *Arabidopsis thaliana*, was cloned from pepper (*Capsicum annuum*). *CaNPR1* and *NPR1* share 62.9% homology at mRNA level and their encoded products have 49.7% identity and 65.7% similarity. In order to identify the function of *CaNPR1* in SAR of pepper, an expression vector p*CaNPR1*-RNAi for silencing *CaNPR1* in pepper was constructed. Pepper cultivar Guiyan5 was transformed with p*CaNPR1*-RNAi by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Six kanamycin-resistant transgenic seedlings were obtained. Southern analysis confirmed that all the six seedlings carried the introduced transgene.

Key words: *CaNPR1* gene; cloning; RNA interference; pepper transformation

辣椒 (*Capsicum annuum*), 又名番椒、秦椒、青椒、海椒等, 为茄科辣椒属作物, 在我国各地广为栽培。但是辣椒青枯病、疫病、病毒病等病害常年发生, 严重时造成 50% 以上的辣椒死亡甚至绝收 (葛红莲等, 2004; 张淑莲等, 2003)。由于新品种选育历程较长和常规育种方法的局限性, 使辣椒增产及品

质改良存在着一定的困难。近几年来, 基因工程迅速发展, 使人们能将有益外源基因导入辣椒基因组中进行辣椒品质改良 (李颖等, 2005; 毕玉平等, 1999), 为培育抗病害的辣椒品种提供了新的手段。

植物系统获得抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 是植物受物理、化学或生物因子作用后,

收稿日期: 2006-06-30 修回日期: 2007-01-24

基金项目: 广西创新能力建设项目 (0322027-2); 教育部高等学校骨干教师资助计划 ([2000]65) [Supported by Innovation Capacity Development program of Guangxi (0322027-2); Foundation for Distinguished Teachers in High Schools of State Education Ministry ([2000]65)]

作者简介: 罗欢 (1980-), 女, 广西桂林人, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: feng@public.nn.gx.cn)

在较长的时间内整株表现出的对较广泛的病原微生物(病毒、细菌、真菌)的抗性(Durrant等,2004)。拟南芥 *NPR1* (nonexpressor of *PR* genes) 基因/*NIM1* (nonimmunity) 基因/*SAI1* (salicylic acid insensitivity) 基因是拟南芥抗病信号传导途径中正向调节其系统获得抗性的关键基因(Cao等,1997; Ryals等,1997; Shah等,1997)。至今已在多种植物如油菜、白菜、番茄、马铃薯、玉米、小麦、烟草、水稻、苹果和桔子中发现存在有 *NPR1* 基因的同源序列(Liu等,2002; Cao等,1998)。在拟南芥(Cao等,1998; Friedrich等,2001)、番茄(Lin等,2004)、水稻(Chern等,2001)中过量表达 *NPR1* 基因可显著提高植物的抗病能力。

RNA 干涉(RNA interference, RNAi)是广泛存在于真核生物中、通过正反义 RNA 形成双链 RNA(dsRNA)从而特异性地抑制靶基因的转录后表达的现象(Wang等,2005)。应用 RNAi 技术能够获得基因表达受抑制的转基因植株(Wesley等,2001),这将有助于我们对基因功能进行分析。本研究从辣椒中克隆到一个与拟南芥 *NPR1* 同源的 *CaNPR1* 基因的全长 cDNA,构建了一个针对 *CaNPR1* 基因的 RNA 干涉辣椒表达载体,并将其通过根癌农杆菌介导法转化辣椒桂研五号,共获得六个独立的转基因阳性株系,从而为下一步进行 *CaNPR1* 基因的功能鉴定提供了很好的植物材料。

1 材料与方 法

1.1 材料

(1)细菌菌株和质粒:本工作所用细菌菌株及质粒见表1。(2)细菌培养基和培养条件:大肠杆菌用 LB 培养基(Sambrook等,2001)37℃培养。根癌农杆菌用 YEB 培养基(Van等,1977)28℃培养。(3)辣椒品种:桂研五号。(4)辣椒 *CaNPR1* 基因全长 cDNA 克隆所使用的引物(表2),由上海鼎安生物科技有限公司合成。(5)辣椒组织培养和遗传转化的培养基(表3)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 操作 质粒 DNA 的提取、纯化、酶切、回收, DNA 的连接,质粒的转化等均按标准程序(Sambrook等,2001)。

1.2.2 辣椒 *CaNPR1* 基因全长 cDNA 的克隆 使用小量柱离心式植物总 RNA 抽提试剂盒(上海华

舜)提取辣椒总 RNA。以辣椒总 RNA 为模板,用 SMART RACE cDNA Amplification Kit(BD Biosciences)反转录合成 3'RACE 第一链 cDNA。以 AP 及 PNF1 为引物、辣椒 3'RACE 第一链 cDNA 为模板进行第一次 PCR;以 AUAP 和 PNF2 为引物、第一次 PCR 产物(稀释 20 倍)作模板进行第二次 PCR,即得到 3'RACE 产物。

表 1 本研究使用的质粒和菌株

Table 1 Plasmids and bacterial strains used in this study

质粒或菌株 Plasmids or Strains	有关特性 Relevant characteristics	来源 Source
pCAMBIA 1301-int	含有马铃薯 GA20 氧化酶基 因第一个内含子(199bp)	This labo- ratory
pBI121	植物表达载体, Km ^r	Datla 等, 1992
pBI121-int	含有马铃薯 GA20 氧化酶基 因第一个内含子的 pBI121	This work
pCaNPR1- RNAi	针对 <i>CaNPR1</i> 基因的 RNA 干涉辣椒表达载体	This work
pRK2073	Tra ⁺ Mob ⁺ ColE1 复制子, Spe ^r	Leong 等, 1982
大 肠 杆 菌 DH5α	F ⁻ <i>recA</i> Φ80d <i>lacZ</i> Δm15	Hanahan 等,1983
根 癌 农 杆 菌 EHA105	消除了 EHA101 中的 pTiB 0542 质粒及 Km ^r 基因	Hood 等, 1993

以辣椒总 RNA 为模板, RT 为引物, 使用 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司)反转录合成 5'RACE 第一链 cDNA。按 5'-Full RACE Core Set(TaKaRa)说明书程序将 5'RACE 第一链 cDNA 进行环化形成首尾连接物,以 A1 和 S1 为引物、连接产物(稀释 10 倍)为模板进行第一次 PCR,以 A2 和 S2 为引物、第一次 PCR 产物(稀释 10 倍)为模板进行第二次 PCR,即得到第一次 5'RACE 产物。

将第一次 5'RACE 产物测序,根据测序所得序列设计第二次 5'RACE 的引物 RT'¹、A1'¹、S1'¹、A2'¹ 和 S2'¹,第二次 5'RACE 的方法与第一次 5'RACE 的完全相同,以 RT'¹为引物进行反转录,以 A1'¹和 S1'¹为引物进行第一次 PCR,以 A2'¹和 S2'¹为引物进行第二次 PCR,即得到第二次 5'RACE 产物。

将经测序的 3'RACE 序列和两次 5'RACE 序列拼接起来得到全长 cDNA 序列,根据该序列设计引物 UPNPR1 和 DPNPR1, RT-PCR 扩增含 *CaNPR1* 基因全长 cDNA 完整 ORF 的 DNA 片段,回收该片段并与 pGEM-3zf(+)载体相连,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,筛选阳性重组子,即得到含 *CaNPR1* 基因

全长 cDNA 完整 ORF 的克隆并测序证实。 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 反应 30 个循环, 最后上述 PCR 扩增条件均为 95 °C 变性 2 min 后, 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 反应 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。

表 2 辣椒 *CaNPR1* 基因全长 cDNA 克隆所使用的引物
Table 2 Primers used in full length cDNA cloning of *CaNPR1*

引物 Primers	序列 Sequence	用途 Use
AP	5'-GCGCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	3' RACE
PNF1	5'-CGGTTATGCATTGAGATTCTGGAGC-3'	
AUAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'	
PNF2	5'-CGATGATTTGCGTATGAAGCTGTTATAACC-3'	
RT	5'-AGCGCCATAAGCCGATTCA-3' (5' end having-P)	Frist time 5'
RACEA1	5'-ATCAACTTGAGCAATGTCCATTGC-3'	
S1	5'-AAGATGGCTGATGCACAGAGGA-3'	
A2	5'-CAAGGTATAGCAGCTTCATACGCA-3'	
S2	5'-CAGTGGATTTGAACGAAGCTCC-3'	
RT'	5'-CAAGCTCAGTGCCTGAATCA-3' (5' end having-P)	Second time 5' RACE to reach the extreme 5' end
A1'	5'-ATAACCCTTGATAAGGCTTTGCCTAATGAC-3'	
S1'	5'-GCAGCTTTGTTAAGAATATCCAACAGGTGT-3'	
A2'	5'-AGGCTTTGCCTAATGACATCGTAAAAC-3'	
S2'	5'-GCTTTGTTAAGAATATCCAACAGGTGTCTC-3'	
UPNPR1	5'-ACCGAATTCTCTCTTTCCCTTTCTCCATAAACATAC-3'	RT-PCR of full length cDNA
DPNPR1	5'-GGCGGATCCGGAACAGGTGTTATATGTATGACACAACAAATGT-3'	

表 3 用于辣椒组织培养和遗传转化的培养基
Table 3 Media used for pepper tissue culture and transformation

培养基 Medium	成分 Component
MS	MS mineral, MS vitamins, 30 g/L sucrose, 3 g/L phytagel, pH5.8
GC	MS medium, 2 mg/L 6-BA, 0.5 mg/L IAA, 100 uM AS, 2 mg/L AgNO ₃ , 3 g/L phytagel, pH5.8
MS-AS	MS medium, 100 uM AS, pH5.8
FH	MS medium, 2 mg/L ZT, 0.5 mg/L IAA, 200 mg/L cefotaxime, 50 mg/L Km, 2 mg/L AgNO ₃ , 3 g/L phytagel, pH5.8
SC	MS medium, 1 mg/L ZT, 0.2 mg/L IAA, 200 mg/L cefotaxime, 50 mg/L Km, 2 mg/L AgNO ₃ , 2 mg/L GA3, 3 g/L phytagel, pH5.8
1/2MS	1/2 MS mineral, MS vitamins, 30 g/L sucrose, 3 g/L phytagel, 0.5 mg/L NAA, 0.2 mg/L IAA, 100 mg/L cefotaxime, pH5.8

1.2.3 RNA 干涉辣椒表达载体的构建 参考 Wesley 等(2001)的构建策略。根据马铃薯 GA20 氧化酶基因的第二个内含子核苷酸序列设计引物 intF (5'-GACGGATCCTGTTAACCACGTGAAGTACTAGTGTACGGACCGTACTACTCTATTCGTT-3') 和 intR1 (5'-GACGAGCTCCCGGGGGTACCCTATA TAATTTAAGTGGAAAAAAGGTTAAC-3'), 以质粒 pCAMBIA1301-int 为模板进行 PCR 扩增, 扩增条件为 95 °C 变性 2 min 后, 94 °C 30 s, 48 °C 30 s, 72 °C 40 s, 反应 10 个循环, 再进行 94 °C 30 s,

65 °C 30 s, 72 °C 40 s, 反应 20 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。根据辣椒 *CaNPR1* 基因全长 cDNA 序列设计引物 PNIF1 (5'-GGCGGATCCGAGCTCGCGTATGAAGCTGCTATACCTTGAA-3') 和 PNIR1 (5'-CCGACTAGTGGTACCCGGTGAACGCTTTGGTCAGAA-3') 以扩增 cDNA 的 ORF 中 1248-1651 位核苷酸序列, 以 3' RACE 扩增产物为模板进行 PCR 扩增, 扩增条件为 95 °C 变性 2 min 后, 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 2 min, 反应 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。先将 PCR 扩增的内含子片段克隆到植物表达载体 *pBI121* 启动子下游 *Bam*HI/*Sac*I 位点, 得到中间载体 *pBI121-int*, 然后将用引物 PNIF1 和 PNIR1 扩增的产物反向克隆到中间载体 *pBI121-int* 上内含子的下游 *Kpn*I/*Sac*I 位点, 再将同样的片段正向克隆到中间载体 *pBI121-int* 上内含子的上游 *Bam*HI/*Spe*I 位点。

1.2.4 用于转化辣椒的根癌农杆菌菌株的构建 运用三亲本接合法(Harding 等, 1987)将 RNA 干涉辣椒表达载体在质粒 pRK2073 的帮助下导入根癌农杆菌菌株 EHA105。

1.2.5 RNA 干涉辣椒表达载体对辣椒的转化 挑选颗粒饱满的桂研五号种子按常规表面灭菌后植于 MS 培养基上, 光照培养 14~18 d 后剪取 Flamingo Bill 外植体(Javier 等, 2001), 于 GC 培养基上预培养 2 d。将经过预培养的外植体用已悬浮于 MS-AS

的根瘤农杆菌菌液(OD₆₀₀ = 0.3~0.4)浸泡 10 min 后接回 GC 培养基上共培养 2~3 d, 转接入 FH 培养基上进行分化筛选 2~3 周。将分化出芽的外植

体转入 SC 培养基诱导芽的伸长及进一步的筛选, 1~2 周后将伸长至 2~3 cm 的小芽从外植体上切下, 插入 1/2 MS 培养基中诱导生根, 2~3 周后即可移栽至土壤中。

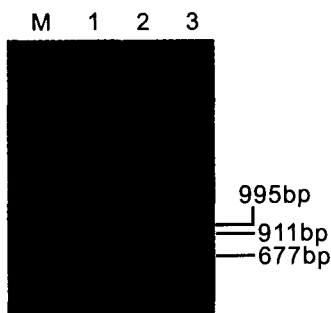


图 1 3'RACE and 5'RACE 产物电泳分析

Fig. 1 Electrophoretic analysis of the PCR products of 3'RACE and 5'RACE of *CaNPR1*

M: 100bp DNA 分子量标准; 1: 3'端 PCR 扩增产物; 2: 远 5'端 PCR 扩增产物; 3: 近 5'端 PCR 扩增产物。

M: 100bp DNA Marker; 1: 3'RACE product; 2: First round 5'RACE product; 3: Second round 5'RACE product.

1. 2. 6 Southern 杂交 用 CTAB 法 (Draper 等, 1988) 提取辣椒总 DNA。10 μg 总 DNA 经 *Hind*III 完全酶切后凝胶电泳。杂交探针为 RNA 干扰辣椒表达载体上 404 bp 的 *Bam*HI/*Spe*I 片段。杂交方法按文献 (Sambrook 等, 2001)。用 Typhoon9410 (Amersham Biosciences 公司) 磷屏扫描仪扫描磷屏获得杂交结果。

1. 2. 7 *CaNPR1* GenBank 索引号 DQ648785。

2 结果与讨论

2.1 辣椒 *CaNPR1* 基因全长 cDNA 的克隆

3'RACE 扩增出一条 677bp 的特异性 DNA 片段 (图 1, 1 泳道), 第一次 5'RACE 扩增出一条 911bp 的

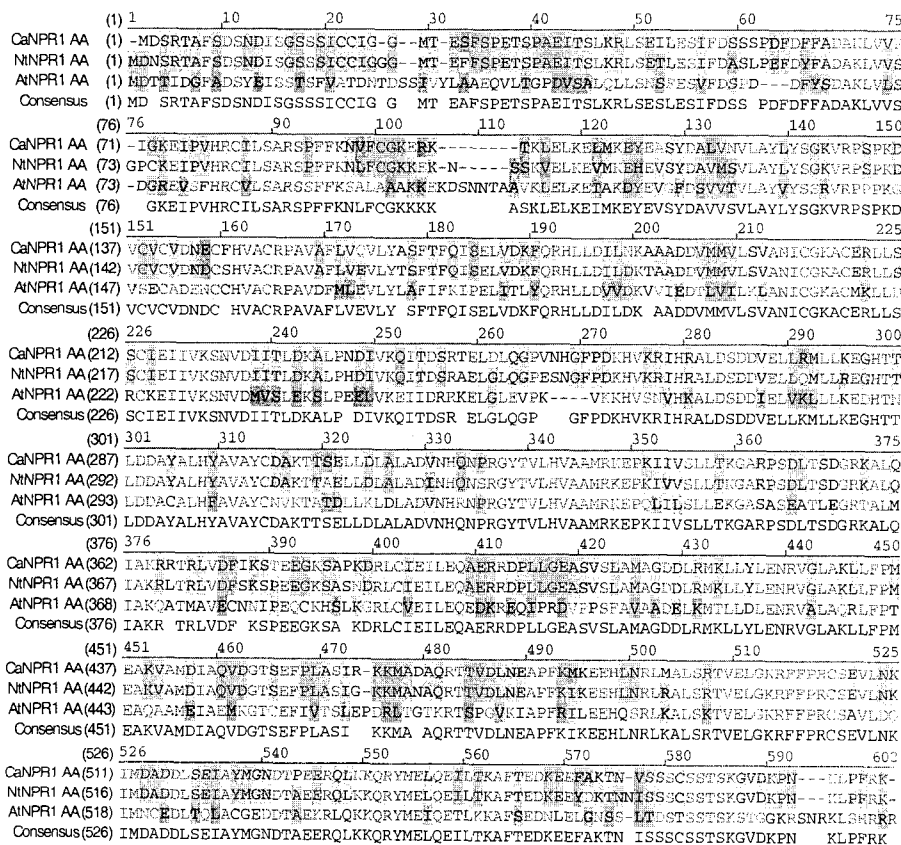


图 2 *CaNPR1*, *NiNPR1* 和 *AtNPR1* 编码的氨基酸序列的比对

Fig. 2 Alignments of encoded amino acid sequences of *CaNPR1*, *NiNPR1* and *AtNPR1*

特异性片段(图 1, 2 泳道)。由于第一次 5'RACE 没有得到包括 ORF 的起始密码子 ATG 的 5'端全序列, 距

离 ATG 还差 508 个核苷酸, 因此我们又根据第一次 5'RACE 所得序列设计引物(表 2)进行了第二次 5'

RACE,第二次 5'RACE 扩增出一条 995bp 的特异性片段(图 1,3 泳道)。将经测序后的三段序列拼接(assembly)起来,即得到全长 cDNA 序列(共 2191bp, GenBank 索引号: DQ648785)。我们将该基因命名为 *CaNPR1* 基因。该基因与同是茄科的烟草 *NPR1* 基因(*NtNPR1*, GenBank 索引号: AF480488)在 mRNA 水平上同源率为 90.4%, 编码产物具有 90% 的一致性和 93% 的相似性,说明该基因在同科植物中具有较高的保守性。与十字花科植物拟南芥 *NPR1* 基因(*AtNPR1*, GenBank 索引号: NM_105102)在 mRNA 水平上同源率为 62.9%, 两者的编码产物具有 49.7% 的一致性和 65.7% 的相似性(图 2)。

根据所拼接序列设计引物 UPNPR1 和 DPNPR1 (表 2), RT-PCR 扩增得到一条包括完整 ORF 的长 1917bp 的 DNA 片段(图 3,1 泳道)。将该片段克隆到载体 pGEM-3zf(+) 上, 获得含该基因全长 cDNA 完整 ORF 的克隆(图 3,2 泳道), 测序表明该片段序列与全长 cDNA 中所对应部分的序列完全一致。

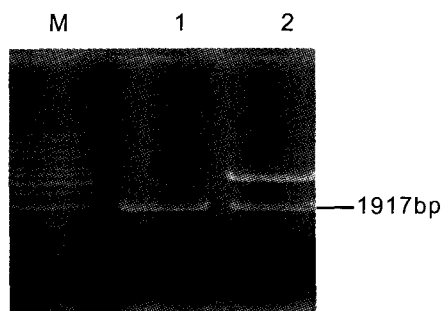


图 3 含 *CaNPR1* 完整 ORF 的 cDNA 克隆
Fig. 3 *CaNPR1* cDNA clone containing the complete ORF

M: 1kb DNA 分子量标准; 1: RT-PCR 扩增产物; 2: 重组质粒经 *Bam*HI+*Eco*RI 消化。
M: 1kb DNA Marker; 1: RT-PCR amplification product; 2: Recombinant plasmid digested by *Bam*HI+*Eco*RI.

2.2 针对辣椒 *CaNPR1* 基因的 RNA 干扰辣椒表达载体 p*CaNPR1*-RNAi 的构建

将马铃薯 GA20 氧化酶基因的第二个内含子和 *CaNPR1* 基因全长 cDNA 的 ORF 中 1248-1651 位核苷酸序列依次克隆到载体 pBI121 上, 获得针对辣椒 *CaNPR1* 基因的 RNA 干扰辣椒表达载体 p*CaNPR1*-RNAi(图 4)。质粒 p*CaNPR1*-RNAi 用 *Bam*HI/*Sac*I 双酶切后得到 1 045bp 的外源 DNA 片段(图 5,1 泳道), 用 *Bam*HI/*Spe*I 双酶切后得到 417bp 的正向插入的 DNA 片段(sense insert, 图 5,2 泳道); 用 *Kpn*I/*Sac*I 双酶切后得到 417bp 的反向插入的 DNA 片段

(antisense insert, 图 5,3 泳道), 证实构建的 RNA 干扰表达载体含有完整的反向重复序列结构。

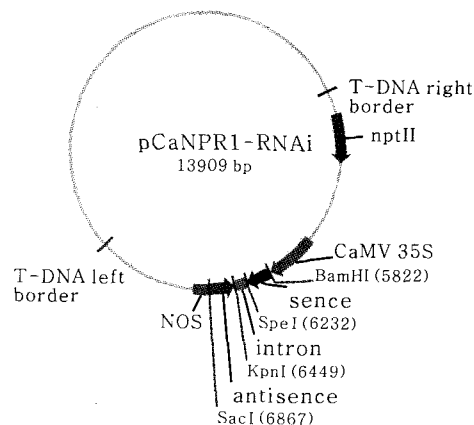


图 4 *CaNPR1* 基因的 RNAi 辣椒表达载体 p*CaNPR1*-RNAi 的结构

Fig. 4 Structure of RNAi pepper expression vector p*CaNPR1*-RNAi of *CaNPR1*

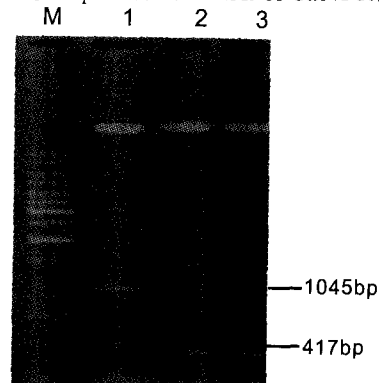


图 5 *CaNPR1* 基因的 RNAi 辣椒表达载体 p*CaNPR1*-RNAi 的酶切验证

Fig. 5 Restriction analysis of RNAi pepper expression vector p*CaNPR1*-RNAi of *CaNPR1*

M: 1kb DNA 分子量标准; 1: p*CaNPR1*-RNAi 经 *Bam*HI+*Sac*I 消化; 2: p*CaNPR1*-RNAi 经 *Bam*HI+*Spe*I 消化; 3: p*CaNPR1*-RNAi 经 *Kpn*I+*Sac*I 消化。

M: 1kb DNA Marker; 1: p*CaNPR1*-RNAi/*Bam*HI+*Sac*I; 2: p*CaNPR1*-RNAi/*Bam*HI+*Spe*I; 3: p*CaNPR1*-RNAi/*Kpn*I+*Sac*I.

2.3 RNA 干扰辣椒表达载体 p*CaNPR1*-RNAi 对辣椒的转化

将培养了 14~18 d 的辣椒无菌小苗制备成 Flamingo-bill 外植体, 在 GC 培养基上预培养 2 d。将预培养后的外植体用已悬浮于 MS-AS 的 EHA105/p*CaNPR1*-RNAi 根癌农杆菌菌液 ($OD_{600} = 0.3 \sim 0.4$) 浸泡 10 min 后接回 GC 培养基上共培养(图 6-A)。2~3 d 后转入 FH 培养基上进行分化筛选(图 6-B), 7 d 后开始观察到芽分化, 将分化出芽的外植体转入 SC 培养基诱导芽的伸长及进一

步骤的筛选。将伸长至2~3 cm的小芽从外植体上切下,插入1/2MS培养基中诱导生根(图6-C),当幼苗长至瓶口时开瓶炼苗3 d后即可移栽至土壤中。

整个转化过程大约需要60 d。总共进行了四次转化,每次80个Flamingo-bill外植体,共获得抗卡那霉素再生苗22株,最终移栽成活6株(图6-D)。

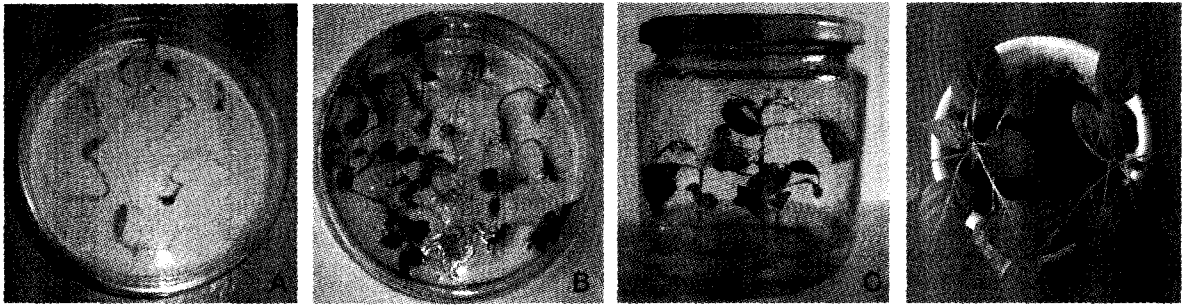


图6 pCaNPR1-RNAi对辣椒桂研五号的转化

Fig. 6 The transformation of pepper cultivar Guiyan 5 with pCaNPR1-RNAi

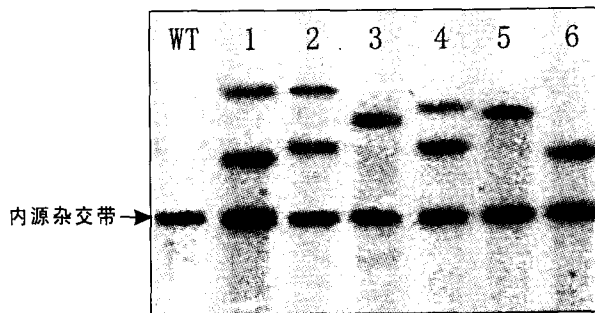


图7 T0代卡那霉素抗性植株的Southern杂交分析

Fig. 7 Southern analysis of T0 progeny of Km^r transgenic lines of pepper

WT:野生型桂研五号;1-6:T0代转基因植株R1,R2,R3,R4,R5和R6。

2.4 卡那霉素抗性植株的Southern杂交验证

为证实6株卡那霉素抗性植株是否为转基因植株,对它们的T0代植株进行Southern杂交分析。结果表明,所有六个株系的植株除了出现一条与野生型共有的内源杂交带外还出现了至少一条含有CaNPR1基因部分序列的外源杂交带(图7),说明获得的六个株系均为转基因株系。其中R1、R2和R4为双拷贝插入,R3、R5和R6为单拷贝插入。

本研究从辣椒中克隆到一个与拟南芥NPR1同源的CaNPR1基因的全长cDNA,构建了一个针对CaNPR1基因的RNA干扰辣椒表达载体,并将其通过根癌农杆菌介导法转化辣椒桂研五号,共获得六个独立的转基因阳性株系,从而为进一步鉴定CaNPR1基因的功能奠定了基础。

参考文献:

张淑莲,田全福. 2003. 蔬菜病虫害无公害综合防治技术(三)辣椒[J]. 西北园艺,5:39-41
Bi Y P(毕玉平), Shan L(单蕾), Wang X J(王兴军), et al. 1999. Regeneration of transgenic pepper plants resistant to TMV and CMV and its resistance assay(双抗TMV+CMV辣

椒转基因工程植株的再生及抗病毒鉴定)[J]. *Acta Agric Boreali-Sin*(华北农学报),14(3):103-108
Cao H, Glazebrook J, Clarke J D, et al. 1997. The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats[J]. *Cell*,88(1):57-63
Cao H, Li X, Dong X. 1998. Generation of broad spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(11):6 531-6 536
Chern M S, Fitzgerald H A, Yadav R C, et al. 2001. Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*[J]. *Plant J*, 27(2):101-113
Datla R S, Hammerlindl J K, Panchuk B. 1992. Modified binary plant transformation vectors with the wild-type gene encoding NPTII[J]. *Gene*,122(2):383-384
Draper J, Scott R, Armitage P, et al. 1988. Plant genetic transformation and gene expression; A Laboratory Manual[M]. Boston: Blackwell Scientific Publications
Durrant W E, Dong X. 2004. Systemic acquired resistance[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 42:185-209
Friedrich L, Lawton K, Dietrich R, et al. 2001. NIM1 overexpression in *Arabidopsis* potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 14(9):1 114-1 124
Ge H L(葛红莲), Zhao H L(赵红六), Guo J H(郭坚华). 2004. Screening and identification for biocontrol agent against *Ralstonia solanacearum*(辣椒青枯病拮抗细菌的筛选及其鉴定)[J]. *J Zhoukou Teachers Coll*(周口师范学院学报),21(2):71-75
Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. *J Mol Biol*,166(4):557-580
Harding N E, Cleary J M, Cabanas D K, et al. 1987. Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*[J]. *J Bacteriol*, 169: 2 854-2 861
Hood E E, Gelvin S B, Melchers L S, et al. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plant[J]. *Transgen Res*, 2:208-218
Javier P R, Guy H, Luis C, et al. 2001. Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67:173-180
Leong S A, Ditta G S, Helinski D R. 1982. Heme biosynthesis in (下转第99页 Continue on page 99)

还能改变培养基环境的渗透压(潘瑞炽等, 1995)。本实验中, 当蔗糖浓度达到 60 g/L 时, 存活率开始下降, 可能是因为高浓度的蔗糖改变培养基的渗透强度过大, 致使试管苗吸水困难, 对保存效果不利。

离体保存成功的试验表明, 在培养基中添加适当的生长调节剂, 能延长培养物的保存时间, 提高试管苗素质和促进试管苗转接后恢复(潘瑞炽等, 2006)。在本实验中, 不添加生长调节剂, 单独使用 MS、1/2MS、1/4MS 时, 试管苗的保存效果一般, 差别不明显。在 MS 培养基上附加四种生长调节剂时, 以 PP₃₃₃ 浓度 0.2~1.0 mg/L 对促进巴戟天试管苗的健壮生长效果最好, 保存 360 d 时存活率相对最高, 转接后能较快恢复生长, 可以用于保存培养。但是, 在实际保存时发现, PP₃₃₃ 附加在 1/2MS、1/4MS 培养基上较附加在 MS 培养基上对保存更加有利, 试管苗保存时间更长, 存活率更高。可见, 生长调节剂与不同浓度的无机营养配比时, 对保存能够产生不同的效果。另外, CCC、ABA 和 MH 对巴戟天试管苗生长的抑制作用明显, 但植株不够健壮, 存活率下降, 相对而言, 低浓度较高浓度的效果好, 因此, 适当调整三种调节剂浓度或改变培养基无机盐浓度, 可能会取得好的效果, 有待进一步实验。

在本实验观测过程中发现, 试管苗死亡的主要因素除了调节剂浓度过高, 抑制强度过大, 导致顶芽退化而死亡外, 根系上形成大量的愈伤, 覆盖在培养基表面, 使植株无法吸收营养, 由茎段基部最先开始

枯萎, 逐渐向上, 最后导致整株枯萎死亡。因此, 在巴戟天试管苗的保存过程中, 调控根和愈伤的生长, 可以取得更好的效果。

参考文献:

- 潘瑞炽, 等. 2006. 园艺生理[M]. 北京: 科学出版社: 103-104
 潘瑞炽, 董惠得. 1995. 植物生理学[M]. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社: 225-233
 Wang JF(王家福), Liu YX(刘月学), Lin SQ(林顺权). 2002. A study of the preservation *in vitro* of loquat germplasm II: Effect of plant growth inhibitor(枇杷种质资源的离体保存研究II生长调节剂的影响)[J]. *Subtrop Plant Sci*(亚热带植物科学), 31(4): 1-4
 Luo JF(罗吉凤), Cheng ZY(程治英), Long CL(龙春林). 2006. Studies on the rapid propagation and *in vitro* storage of *Dendrobium candidum*(铁皮石斛快速繁殖和离体种质保存的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 26(1): 69-7
 Shi YZ(史永忠), Pan RC(潘瑞炽), Wang XJ(王小菁), et al. 1999. *In vitro* conservation of germplasm at room temperature in *Dendrobium officinale*(铁皮石斛种质室温离体保存)[J]. *J South China Normal Univ*(华南师范大学学报), (4): 73-77
 He H(贺红), Lin XH(林小桦), Zhang GF(张桂芳), et al. 2004. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Morinda officinalis*(根瘤农杆菌对巴戟天遗传转化的影响因素)[J]. *Guihaia*(广西植物), 24(5): 411-413
 Kartha K K, Mroginski L A, Pahl K K, et al. 1981. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica*) by *in vitro* culture of shoot apical meristems[J]. *Plant Science Letters*, 22: 301-307
 Bertrand-Desbunais A, Noirot M, Charrier A. 1992. Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp)[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31: 105-110

(上接第 112 页 Continue from page 112)

- Rhizobium, Identification of a cloned gene coding for delta-aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti* [J]. *J Biol Chem*, 257(15): 8 724-8 730
 Li Y(李颖), Yu X L(余小林), Li N J(李乃坚), et al. 2005. Evaluation of resistance to bacterial wilt and systemic breeding in *Cecropin-GM Capsicum*(转抗菌肽基因辣椒株系的青枯病抗性鉴定及系统选育)[J]. *Mol Plant Breed*(分子植物育种), 3(2): 217-221
 Lin W C, Lu C F, Wu J W, et al. 2004. Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis* NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases[J]. *Transgen Res*, 13: 567-581
 Liu Y, Schiff M, Marathe R, et al. 2002. Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus[J]. *Plant J*, 30: 415-429
 Ryals J, Weymann K, Lawton K, et al. 1997. The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription

- factor inhibitor Ikb[J]. *Plant Cell*, 9(3): 425-439
 Sambrook J, Russell D W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd edition. Cold spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
 Shah J, Tsui F, Klessig D F. 1997. Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sal1*) of *Arabidopsis thaliana* identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 10(1): 69-78
 Van L, Genetello C, Hernalsteens J P, et al. 1977. Transfer of Ti plasmids between *Agrobacterium* strains by mobilization with the conjugative plasmid RP4[J]. *Mol Gen Genet*, 152: 119-124
 Wang M B, Metallaff M. 2005. RNA silencing and antiviral defense in plants[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 8: 216-222
 Wesley S V, Hellivell C A, Smith N A, et al. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants[J]. *Plant J*, 27(6): 581-590