

黄瓜‘新津春四号’遗传转化体系的建立

许娜*, 储俊, 夏海武, 赵岩, 钱立生

(安徽科技学院生命科学院, 安徽 凤阳 233100)

摘要: 对根癌农杆菌介导‘新津春四号’黄瓜(*Cucumis sativus* L.)遗传转化的影响因素进行了研究。结果表明, 黄瓜叶片适宜的潮霉素(Hygromycin, Hyg)筛选浓度为 40 mg L^{-1} ; 500 mg L^{-1} 羧苄青霉素(Carbenicillin, Carb)可有效抑菌。预培养 2 d 有利于转化; 共培养 2 d 有利于提高转化频率并避免农杆菌的过度生长; 添加 $150 \text{ }\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮(Acetosyringone, AS), 农杆菌浸染液 pH 5.7、浓度 0.8, 浸染时间 8 min 为最佳遗传转化条件。再生植株经 *gus* 基因的瞬时表达检测及 PCR 检测证明 *hpt* 基因已成功转化。

关键词: 根癌农杆菌; 黄瓜; 遗传转化

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)06-0679-06

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2010.06.015

Establishment of Genetic Transformation System of Cucumber ‘New Jinchun 4’

XU Na*, CHU Jun, XIA Hai-wu, ZHAO Yan, QIAN Li-sheng

(College of Life Science, University of Anhui Science & Technology, Fengyang 233100, China)

Abstract: The genetic transformation system of cucumber ‘New Jinchun 4’ mediated by *Agrobacterium tumefaciens* were studied. The cucumber leaves as explants were pre-cultured on MS + 1.0 mg L^{-1} 6-BA + 0.15 mg L^{-1} IAA for 2 days. After infected by *Agrobacterium* ($\text{OD}_{600} = 0.8$, pH = 5.7) for 8 min supplemented with $150 \text{ }\mu\text{mol/L}$ acetosyringone (AS), the explants were co-cultured on MS + 1.0 mg L^{-1} 6-BA + 0.15 mg L^{-1} IAA + 500 mg L^{-1} Carb + 40 mg L^{-1} Hyg for 2 days. The *hpt* gene were transformed successfully to regenerated plantlets by *gus* instantaneous expression and PCR test.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*; Cucumber; Genetic transformation

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)不仅味甘性凉, 具有清热、解毒、利尿的功效, 而且脆嫩多汁, 营养丰富, 是常见蔬菜。黄瓜津研系列品种的育成^[1], 标志着我国黄瓜抗病育种跨上了一个新台阶, 实现了我国栽培黄瓜品种的第一次更新换代。由于种内资源有限, 基因工程技术将是黄瓜品种改良的有效手段^[2]。

黄瓜的转基因研究多采用农杆菌介导法、花粉管通道法和电激法等, 以根癌农杆菌介导为主^[3]。由于黄瓜体细胞离体培养较为困难, 外植体经农杆菌浸染后, 分化培养时经抗生素及除草剂等选择,

黄瓜的再生频率会更低。本文在前期建立的黄瓜再生系统^[4]的基础上, 从抗生素种类与浓度、浸染菌液浓度、pH 与时间、乙酰丁香酮浓度、预培养时间、共培养时间等方面, 探讨各种因素对黄瓜遗传转化的影响, 以期建立一个高效的黄瓜转化体系, 为黄瓜抗病与基因工程育种研究提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料和培养基

材料为黄瓜(*Cucumis sativus* L.)‘新津春四号’种子。根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)

收稿日期: 2010-04-014

接受日期: 2010-05-20

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金一般项目(KJ2010B294, KJ2010B052)资助

* 通讯作者 Corresponding author, email: nxdingding@yahoo.com.cn

为 JV3101, 具有卡那霉素(kanamycin, Kan)、庆大霉素(gentamicin, Gen)抗性。植物表达载体 pCAMBIA-1300 携带有转 β -葡糖醛酸酶(β -glucuronidase)基因(*gus*)和潮霉素磷酸转移酶(Hygromycin-B-phosphotransferase)基因(*hpt*)。以上材料均为本实验室保存。

预培养和共培养培养基 MS1: MS + 1.0 mg L⁻¹ 6-BA + 0.15 mg L⁻¹ IAA; 筛选培养基 MS2: MS + 1.0 mg L⁻¹ 6-BA + 0.15 mg L⁻¹ IAA + 500 mg L⁻¹ Carb + 40 mg L⁻¹ Hyg; 生根培养基 MS3: 1/2MS + 0.2 mg L⁻¹ IAA + 40 mg L⁻¹ Hyg。以上培养基均附加蔗糖 3%, 琼脂 6 g L⁻¹, pH 5.7。YEP 培养基为 10 g L⁻¹ 蛋白胨 + 10 g L⁻¹ 酵母提取物 + 5 g L⁻¹ NaCl + 50 mg L⁻¹ Kan + 50 mg L⁻¹ Gen, pH 7.0。

经农杆菌液浸染预培养 2 d 的黄瓜外植体, 用无菌滤纸吸干后在 MS1 上共培养 2 d, 转接 MS2 上进行筛选和再生培养, 30 d 左右将抗性芽移至 MS3 上进行生根培养。28 d 左右生根良好的小苗经闭瓶炼苗、开瓶炼苗、移栽, 即可定植。

1.2 农杆菌的培养

取农杆菌 JV3101 菌液 200 μ L 于 YEP 固体培养基上划线培养 48 h。挑取单菌落接种于 3 mL YEP 液体培养基, 28℃ 振荡培养过夜。取 1 mL 菌液接入 50 mL YEP 液体培养基, 28℃ 振荡培养 24 h 后, 于 4℃, 3214 $\times$ g 下离心 5 min, 沉淀用 50 mL MS0(MS 培养基去除大量元素中的 NH₄NO₃)重悬, 28℃ 振荡培养 1~2 h 后备用。

1.3 抗生素敏感性试验

取 7 d 苗龄黄瓜无菌苗, 剪取长约 0.5 cm 的茎段, 叶片约 0.5 cm² 大小作为外植体。无菌水清洗外植体后, 分别接种于 MS1 + Hyg (0、20、40、60、80 mg L⁻¹) 培养基, 于光照强度 1500~2000 Lx, 光暗周期为 16 h/8 h, 温度 25 $\pm$ 2℃ 下培养。30 d 后观察统计。每处理 20 块外植体, 重复 3 次。

外植体经农杆菌浸染后分别接种于添加不同抗生素的 MS1 培养基, 抗生素有头孢霉素(Cefotaxime, Cef)、氨苄青霉素(Ampicillin, Amp), 浓度均分别设置为 100、300、500 mg L⁻¹, 以及羧苄青霉素(Carbenicillin, Carb), 浓度设置为 0、100、300、500、700 mg L⁻¹, 观察抑菌情况。每处理 20 块外植体, 重复 3 次。

1.4 菌液浓度及浸染时间对转化的影响

黄瓜外植体预培养 2 d 后, 用农杆菌液(浓度分

别为 0.6、0.8、1.0)浸染 10 min 或浓度为 0.8 农杆菌液浸染 5、8、12 min。然后在 MS1 上培养, 20 d 后统计抗性芽分化率。

1.5 乙酰丁香酮浓度对转化的影响

预培养 2 d 的黄瓜外植体用农杆菌 MS0 悬浮液浸染 8 min, 在 MS1 + AS(0、100、150、200 μ mol/L) 上培养, 20 d 后统计抗性芽分化率。

1.6 最优转化条件确定

以预培养时间、共培养时间、浸染液 pH 值 3 因素进行 L₉(3⁴) 正交试验, 观察转化的效果, 筛选最优转化条件。

1.7 转化外植体的鉴定

***gus* 基因瞬时表达检测** 采用组织化学法^[5]加以改进。将共培养后的材料用 GUS 染色液于 37℃ 浸泡 3 h, 用丙酮固定 15 min。然后加入 0.2 mol/L HCl、20% 甲醇于 57℃ 保温 15~20 min; 再加入 7% NaOH、60% 乙醇于室温下处理 15 min; 复染水, 用 40%、20% 和 10% 乙醇各浸泡 5 min; 再用 5% 乙醇、25% 甘油渗透 15 min。处理后徒手切片, 用 50% 甘油压片, 光学显微镜下观察 *gus* 基因表达情况, 数码相机拍照。

PCR 检测 用改良的 CTAB 法^[6-7]提取转化黄瓜不定芽的基因组 DNA。设计 1 对特异引物(上海生工合成) HPT-U: 5'-CGGTCGCGGAGGCTATG-GATG-3', HPT-L: 5'-GCTTCTGCGGGCGATTTGT-GTA-3'。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 然后 94℃ 60 s, 61℃ 60 s, 72℃ 60 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

2 结果和分析

2.1 潮霉素浓度筛选

叶与茎外植体均对 Hyg 十分敏感, 20 mg L⁻¹ Hyg 处理时, 外植体大量褐化, 其再生和生长受到抑制; 40 mg L⁻¹ Hyg 处理时, 外植体褐化继续增多; Hyg 浓度高于 40 mg L⁻¹ 时, 外植体全部褐化死亡, 不定芽不能分化。高浓度的抗生素能迅速杀死细胞, 而死亡细胞对周围细胞的生长有强烈的抑制作用, 不利于转化细胞的生长, 因此确定筛选压力时一般应略低于全致死浓度^[8], 因此本试验确定 Hyg 选择压为 40 mg L⁻¹。

2.2 抗生素抑菌浓度

黄瓜叶片经农杆菌浸染后分别接种于含 Amp、

表 1 潮霉素对不定芽再生的影响

Table 1 Effects of Hyg on regeneration of adventitious buds

Hyg (mg L ⁻¹)	叶外植体数 Number of leaf explants	再生频率 (%) Regeneration rate	茎外植体数 Number of stem explants	再生频率 (%) Regeneration rate
0	20	100	20	100
20	20	57.1	20	28.6
40	20	22	20	0

Cef 的培养基上,即使 Amp、Cef 的浓度达 500 mg L⁻¹ 仍难以抑制农杆菌的污染,可见这两种抗生素在本研究中不适合。Carb 浓度低于 300 mg L⁻¹ 时无抑制农杆菌的效果;300 mg L⁻¹ 具有一定的抑菌效果,仅存少量菌落散布叶缘,且不影响芽的再生;而 500 mg L⁻¹ Carb 时抑菌效果较好,仅个别菌落散布叶缘,但芽的再生频率降低,再生受到一定的抑制;当 Carb 浓度达 700 mg L⁻¹ 时虽完全抑制了农杆菌的生长,但芽的再生也受到强烈抑制,再生频率低至 50%(表 2)。因此本试验选用 500 mg L⁻¹ Carb 来抑制农杆菌过度生长。

表 2 Carb 对不定芽再生的影响

Table 2 Effects of Carb on antibacterial and regeneration of adventitious buds

Carb (mg L ⁻¹)	叶外植体数 Number of leaf explants	再生频率 (%) Regeneration rate
0	7	85.7
100	11	72.7
300	11	81.8
500	13	69.2
700	10	50

2.3 菌液浓度及浸染时间对转化的影响

在农杆菌介导的遗传转化中,菌液浓度和浸染时间都对转化效率有影响。菌液浓度过高使外植体组织褐化,容易死亡,且农杆菌的污染严重,以后的培养中难以控制;菌液浓度过低则会使转化效率降低^[9]。从表 3 可见,以菌液浓度为 0.8,浸染 8 min 较适宜。浸染 12 min 后,大量外植体出现软腐症状,最终变黑死亡;而时间太短,外植体产生较多白

化苗,不能正常生长,最终死亡。

2.4 AS 对转化效果的影响

植物受伤细胞分泌的某些酚类化合物对根癌农杆菌基因的表达有诱导作用^[10]。许多研究报道 AS 可诱导根癌农杆菌 vir 区基因的表达从而促进 T-DNA 的转移^[11-13]。本研究在共培养时分别添加 0、100、150、200 μmol/L AS,结果表明,AS 为 100 μmol/L 时的抗性芽分化率为 19%,与对照相比 (13%),AS 的添加对转化有一定的促进作用;而 150 μmol/L 的促进效果最好,抗性芽分化率为 40%;但 200 μmol/L 的促进效果降低,抗性芽分化率为 26%。因此本试验中选取 AS 的浓度为 150 μmol/L。

2.5 转化条件的优化

采用 L₉(3⁴) 正交表,对影响遗传转化的 3 个因素(预培养时间、共培养时间、浸染液 pH)进行正交试验(表 4)。以转化后的抗性芽再生率为评定指标,则预培养时间的影响最大,其次是浸染液 pH,共培养时间最小。根据极差分析可知最佳试验方案是:预培养 2 d,浸染液 pH 为 5.7,共培养 2 d。方差分析(表 5)表明,只有预培养时间对转化有显著影响($P < 0.05$),其他两因素不显著。可见预培养时间对抗性芽的分化起最主要作用,共培养时间及浸染液 pH 的影响较小。

2.6 转化外植体的鉴定

因菌株含有 gus 报告基因,可以通过 GUS 染色直观显示转化的部位,染色的深浅反映转化的强

表 3 菌液浓度及浸染时间对转化效率的影响

Table 3 Effects of bacterial concentration and infection time on transformation rate

Agrobacterium (OD ₆₀₀ nm)	抗性芽分化率 Differentiated rate of resistant buds (%)	浸染时间 Infection time (min)	抗性芽分化率 Differentiated rate of resistant buds (%)
0.6	12.8	5	10
0.8	26	8	36.7
1.0	10.8	12	26.7

表 4 正交试验表

Table 4 Orthogonal test

处理 Treatment	试验因素 Factors			抗性芽分化率 Differentiation rate of Resistant buds (%)
	预培养时间	共培养时间	pH	
	Preculture days	Coculture days		
1	1	1	5.4	6.25
2	1	2	6.0	7.14
3	1	3	5.7	5.88
4	2	1	6.0	25.00
5	2	2	5.7	36.84
6	2	3	5.4	33.33
7	3	1	5.7	16.67
8	3	2	5.4	8.33
9	3	3	6.0	3.24
K1	19.27	47.92	47.91	
K2	95.17	52.31	35.38	
K3	29.87	42.45	59.39	
k1	6.42	15.97	15.97	
k2	31.72	17.44	11.79	
k3	9.96	14.15	19.80	
R	25.3	3.29	8.01	

表 5 方差分析

Table 5 Analysis of variance

变异来源 Vaiance source	平方和 Square sum	DF	均方 Mean square	<i>F</i>	<i>F</i> _{0.05 (2,2)}
预培养时间 Preculture days	1146.77	2	573.38	21.11*	19
共培养时间 Coculture days	16.27	2	8.13	0.30	19
pH	96.14	2	48.07	1.77	19
误差 Error	56.34	2	27.17		
总和 Total	3575.47	9			

* *P*<0.05.

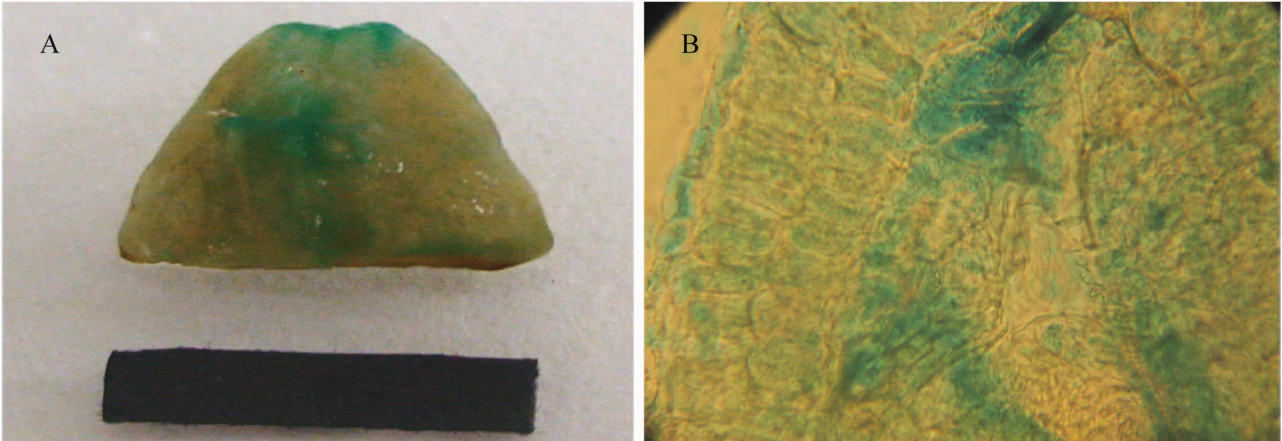


图 1 *gus* 检测

Fig. 1 *gus* expression

A: 叶片 Leaf; B: 叶片切片 Leaf slice.

度。从图 1 可见,转化后的叶片(A)经 GUS 染色后明显呈蓝绿色;将叶片的徒手切片(B)在光学显微镜下观察可见染色部位,说明 *gus* 基因已在转化植株中瞬时表达。

gus 基因的瞬时表达并不能很好地说明到稳定转化的情况,PCR 鉴定可检测到稳定表达。未转化的外植体不具备潮霉素抗性,经潮霉素处理后死亡;

而插入的外源基因携带 *hpt* 基因,使转化后的外植体具有了潮霉素抗性,可以在含有潮霉素的选择培养基上生长。通过 PCR 检测 *hpt* 基因的表达,即可证明农杆菌介导的转化是否成功。从图 2 可见,转化植株均能扩增出 1 条约为 500 ~ 750 bp 的条带,而野生型植株无扩增条带,说明 *hpt* 基因已在转化植株中表达,转化成功。

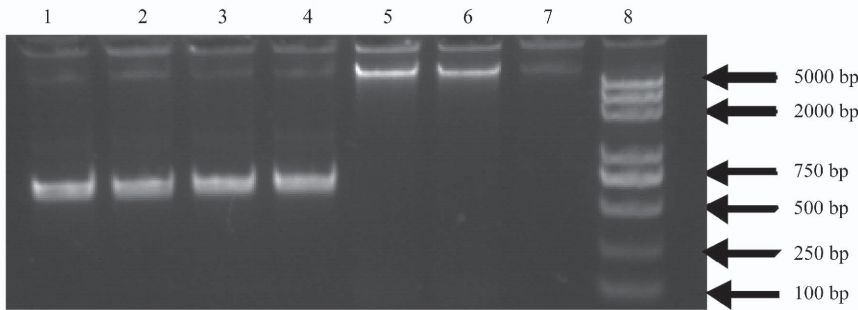


图 2 转化植株的 PCR 检测

Fig. 2 PCR detection of transformed plants

1 ~ 4. 转化植株 Transformed plants; 5, 6. 基因组 DNA Genomic DNA; 7. 野生型植株 Wild plants; 8. DNA marker

3 结论

在农杆菌介导的遗传转化中,利用抗生素筛选转化细胞是必不可少的步骤,常使用的两类抗生素是选择性抗生素和抑菌性抗生素^[5]。不同试验材料对不同抗生素的敏感程度不同,且外植体的取材时间、培养环境对抗生素的抗性有影响^[4]。抗生素的筛选浓度适宜,毒性低,浓度过大或毒性太强均能迅速杀死植物细胞,而细胞死亡过程中分泌的有毒物质会对邻近的正常细胞产生较强的抑制作用^[5]。本试验采用 40 mg L⁻¹作为 Hyg 的筛选浓度,能有效抑制非转化组织的生长。本研究结果表明,Carb 的抑菌效果明显优于 Cef 和 Amp,500 mg L⁻¹即有良好的抑菌效果,且对不定芽再生的影响也较小。

一般认为,在农杆菌浸染前对外植体进行一段时间的预培养,可以减轻伤害胁迫,调整细胞生理状态,促进细胞分裂,更易整合外源 DNA,有利于提高转化效率^[3]。但预培养时间过长,伤口处形成的愈伤组织,反而影响农杆菌的浸染,致使转化率下降,同时也会增加假阳性转化子的出现。另一方面,未进行预培养的外植体褐化死亡率高,难以分化再生植株^[15],并且浸染后农杆菌不易去除。本研究以预培养 2 d 的效果最好,这与李洪清等^[12]的研究结果一致。

目前,农杆菌介导的转化技术已应用于多种植物,但该技术受遗传和环境的影响较大,只有摸索出最佳的转化条件才能建立高效的遗传转化体系。本研究用抗生素敏感性和单因素及多因素正交试验,建立了黄瓜新津春四号农杆菌介导的稳定遗传转化体系:黄瓜叶外植体经预培养 2 d,以浓度为 0.8、pH 5.7 的农杆菌菌液浸染 8 min,共培养 2 d,添加 150 μmol/L 的 AS;选用 40 mg L⁻¹Hyg 为筛选抗生素,500 mg L⁻¹Carb 为抑菌抗生素;筛选培养基为 MS + 1.0 mg L⁻¹6-BA + 0.15 mg L⁻¹IAA + 500 mg L⁻¹Carb + 40 mg L⁻¹Hyg;生根培养基为 1/2MS + 0.2 mg L⁻¹IAA + 40 mg L⁻¹Hyg。获得的转化植株经 *gus* 瞬时表达及 PCR 检测表明 *hpt* 基因已成功整合到黄瓜基因组中。

参考文献

[1] 侯锋, 吕淑珍. 津研系统黄瓜 [M]. 天津:天津科学技术出版社, 1984: 1-5.

[2] Hou F(侯锋), Li S J(李淑菊). Advance and prospect in cucumber breeding research in China [J]. China Agri Sci(中国农业科学), 2000, 33(3): 100-102.(in Chinese)

[3] Chen Z(陈峥), Jin H(金红), Cheng Y(程奕), et al. Study on promoting the regeneration rates of *Agrobacterium tumefaciens* transformation system of cucumber [J]. Tianjin Agri Sci(天津农业科学), 2001(4): 47-49.(in Chinese)

[4] Xu N(许娜), Chu J(储俊), Xia H W(夏海武), et al. Effect of plant hormones on cucumber explant differentiation and regeneration [J].

- J Anhui Sci Techn Univ(安徽科技学院学报), 2009, 23(6): 21–26.
(in Chinese)
- [5] Wang G L(王关林), Fang H J(方宏筠). Plant Genetic Engineering [M]. Beijing: Science Press, 2002: 831–832.(in Chinese)
- [6] Song G L(宋国立), Cui R X(崔荣霞), Wang K B(王坤波), et al. A rapid improved CTAB method for extraction of cotton genomic DNA [J]. Acta Gossypii Sin(棉花学报), 1998, 10(5): 273–275.(in Chinese)
- [7] Lydia O, Lubomira D, Tomas K. Comparison of three types of methods for the isolation of DNA from flours, biscuits and instantpaps [J]. Europ Food Res Techn, 2004, 218(6): 390–393.
- [8] Tang D Q(唐东芹), Qian H M(钱虹妹), Huang D F(黄丹枫), et al. Establishment of gene transformation acceptor system of embryogenic callus in lily [J]. J Zhejiang For Coll(浙江林学院学报), 2003, 20(3): 273–276.(in Chinese)
- [9] Cai C(蔡诚), Wu D Q(吴大强), Zong F(纵方), et al. Optimization of an genetic transformation system for poplar by using orthogonal design [J]. J Nucl Agri Sin(核农学报), 2008, 22(2):136–140.(in Chinese)
- [10] Sell J, Seok Y K, Kee Y P, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of fertile transgenic plants of Chinese cabbage [J]. Plant Cell Rep, 1995, 14: 620–625.
- [11] Xiang Y(项艳), Jiang H Y(江海洋), Ma Q(马庆), et al. Studies on transformation RNA interference expression vector of starch branching enzyme gene into maize inbred lines by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Acta Laser Biol Sin(激光生物学报), 2006, 15(4): 399–404.(in Chinese)
- [12] 李洪清, 李美茹. 影响农杆菌介导植物基因转化的因素问题 [J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(2): 145–151.
- [13] James D J, Uratsu S, Cheng J S, et al. Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or praline synergistically enhance *Agrobacterium* mediated transformation of apple [J]. Plant Cell Rep, 1993, 12: 559–563.
- [14] Wang J Z(王节之), Sun Y(孙毅), Hao X F(郝晓芬), et al. The effection of antibiotic substances to millet explant [J]. Biol Techn (生物技术), 2000, 10(2): 6–9.(in Chinese)
- [15] Wang K(王凯), Che D D(车代弟), Wang J G(王金刚), et al. Establishment of genetic transformation system of lily [J]. J NE Agri Univ(东北农业大学学报), 2008, 39(5): 39–43.(in Chinese)