

农杆菌介导的 *BnCS* 基因对黄瓜遗传转化研究

刘文萍¹, 卢淑雯¹, 刘建新¹, 南相日¹, 柳景兰², 李柱刚¹

(1. 黑龙江省农业科学院 生物技术研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086 2. 黑龙江省农业科学院 园艺分院, 黑龙江 哈尔滨 150069)

摘要:以黄瓜为受体,用农杆菌介导的方法,将同源克隆的抗冷基因 *BnCS* 转入黄瓜,建立农杆菌介导的遗传转化体系,获得转化的抗性植株;对抗性植株和后代进行 PCR 鉴定,证明 *BnCS* 基因已经转入黄瓜。对 T₀ 种子和 T₁ 植株进行耐冷性鉴定。结果表明:后代耐冷性有所增强;试验获得的耐冷材料已应用于育种中。

关键词:农杆菌介导; *BnCS* 基因; 黄瓜; 遗传转化

中图分类号:S 603.6; S 642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)01-0020-03

黄瓜属于冷敏植物,冷害可以发生在黄瓜生长发育的任何时期^[1-3]。一般情况下,黄瓜的生育界限温度为 10~30℃,10℃以下生理活动失调,温度骤降到 5~10℃,就会出现低温冷害,对北方冬、春季保护地的早熟丰产栽培影响极大^[1]。用基因工程的方法,将抗冷基因导入黄瓜,获得特异表达的遗传转化后代,创造抗冷种质新类型,是目前黄瓜耐低温育种研究的重要方向之一^[2-3]。

农杆菌介导的遗传转化是黄瓜基因工程研究中的重要方法,1986 年 Trulson^[4] 等用含双元载体的发根农杆菌感染黄瓜下胚轴,将 *npd1* 基因转入黄瓜,开辟了黄瓜转基因的先例。在此基础上,对黄瓜有价值的转基因研究逐渐发展起来,如抗病、抗除草剂、单性结实等有益基因的导入,丰富了黄瓜的遗传背景。同时,耐冷和冷诱导基因的遗传转化研究不断取得新进展,邓小燕^[5] 等用转录因子 CBF3 转化黄瓜,获得转基因植株,纪巍^[6] 等将不同启动子调控的 DREB1A 基因导入黄瓜,获得 PCR 阳性植株。为使转基因成果更快的应用于育种,试验将同源克隆获得的抗冷基因 *BnCS* 导入黄瓜。通过对 T₀ 和 T₁ 两代植株的 PCR 鉴定,初步证明该基因已经整合到黄瓜基因组中,经田间鉴定后代耐冷性有所增强。转基因后代已经应用于育种中。

1 材料与方法

1.1 试验时间及地点

试验于 2006~2008 年在黑龙江农科院生物技术研究所重点实验室进行,田间鉴定在黑龙江省农科院园艺

分院黄瓜育种室实验温室进行。

1.2 试验材料

黄瓜品种为园艺分院黄瓜育种室的 816 品系和 *yd30*、*yd36* 等亲本材料。*BnCS* 基因和质粒 *pBI121-BnCS* 由黑龙江省农科院生物技术研究所实验室克隆和构建,质粒携带卡那霉素(*Kan*)抗性筛选基因,农杆菌为 *EHA105*,具有利福平(*RFP*)和链霉素(*STR*)抗性。

1.3 试验方法

1.3.1 黄瓜无菌苗的培养 黄瓜种子用自来水漂洗、浸泡 30 min,剥去外壳,先用 70%乙醇浸泡 30 s,再用 0.1% HgCl₂ 溶液灭菌 10 min,无菌条件下接种。接种培养基为 MS,培养温度 (26±1)℃,黑暗 48 h 后转光下培养 3~4 d 获得黄瓜无菌苗。

1.3.2 外植体及预培养 取培养 3~4 d 直立未张开的子叶,切去生长点和上部 2/3 的子叶,留取下部的 1/3 子叶节为外植体进行预培养。预培养的培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L,预培养时间为 1 d。

1.3.3 农杆菌菌液的制备^[7] 先进行菌株活化,然后取过夜培养的活化菌 1 mL,加入到 50 mL 加有 *Kan*、*RFP* 和 *STR* 的 *YEP* 中,28℃、200 rpm 振荡培养 7~8 h,测 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 h,取出菌液离心,弃上清,用 MS 液体培养基(pH 5.2)悬浮、清洗菌体,再离心,菌体重新悬浮,用于侵染。

1.3.4 微伤口处理及侵染 用刀片在子叶节的正表面轻划,制造微伤口,然后将子叶节投入悬浮好的菌液中侵染,侵染时间为 20 min,期间轻摇几次。

1.3.5 共培养及脱菌处理 用滤纸吸去子叶节上多余菌液,转接到共培养培养基上,共培养培养基 MS+6-BA 1.0 mg/L, pH 5.2, 26℃暗培养 3 d。取出用无菌水冲洗 2 次,然后用脱菌抗生素 *cef* (注射用头孢噻污钠 1 000 mg/L)水溶液清洗 3 次,捞出后吹干,转接到含有 *Kan* 50 mg/L 的选择培养基上。

第一作者简介:刘文萍(1963-),女,黑龙江哈尔滨人,本科,研究员,现主要从事植物组织培养和转基因等生物技术研究工作。
E-mail: liuwenping63@163.com.

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(C200502)。

收稿日期:2008-09-10

1.3.6 选择培养与植株再生 选择培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L, Kan 50 mg/L, cef 500 mg/L。每 7 d 继代培养 1 次, 有丛生芽生出后, 将其切下, 转入 1/2 MS 生根培养基, 再生成完整植株。

1.3.7 总 DNA 的提取和 PCR 鉴定 抗性植株总 DNA 提取用 CTAB 法。PCR 反应条件为 94℃ 5 min (94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min) (35 cycle), 72℃ 10 min, 4℃ 保存, 反应体系 30 μL。

1.3.8 转基因 T₁ 代的抗冷性鉴定 选择饱满、色泽正常的 T₀ 种子 60 粒, 分成 3 份, 每份 20 粒。55℃ 烫种 10 min, 洗净后播于垫有滤纸的培养皿中, 放入 HPG-280 型光照培养箱, 在黑暗条件下发芽。温度分别为 13、15、28℃, 以胚根露出种皮为标准, 逐日统计发芽粒数, 按国际标准, 统计发芽势、发芽率, 测定胚根长度。计算不同温度下, 各份材料的平均发芽势、发芽率以及胚根长度。将 T₀ 代种子浸种、催芽于次日播种于营养钵内, 7 d 后子叶完全伸展, 真叶刚刚露头时开始处理。白天放室温 9~10 h, 夜间放入 10℃ 培养箱中低温处理 14~15 h, 处理 15 d 后测定丙二醛含量。

2 结果与分析

2.1 黄瓜转化植株的获得

黄瓜子叶节经农杆菌侵染后, 培养在选择培养基上, 2~3 周后, 部分子叶节基部长出抗性芽, 而大部分子

叶节未分化芽或长白芽。将绿色抗性芽转移到 1/2 MS 培养基上, 抗性芽逐渐伸长, 大约 2 周后, 有根生成, 发育成完整植株。以品系 816 为例, 侵染子叶节 456 块, 有芽分化的子叶节为 211 块, 占被侵染子叶节的 46.2%, 最终成苗数 91 株, 成苗率 19.9%。将成活的抗性植株移栽到营养钵中, 缓苗后再定植到田间。

2.2 T₀ 和 T₁ 植株的 PCR 鉴定

取定植后的抗性植株叶片做 PCR 鉴定, 检测不同品系的再生植株 159 株, 其中 61 株经特异性引物扩增出 BnCS 基因片段, 该片段大小与质粒 DNA 片段扩增出的片段大小一致, 其阳性检出率 38.4%。非转基因的对照植株未扩增出 BnCS 基因片段。对 T₁ 植株的幼苗进行 PCR 鉴定, 随机选择 5 个株系的 34 株幼苗进行检测, 结果 16 株表现阳性, 阳性率 47%。

2.3 转基因 T₁ 植株的抗冷性鉴定

对 T₀ 代 6 个转化株系的种子进行低温发芽能力的鉴定, 温度分别为 13、15、28℃ (见图 1~3)。试验结果表明, 转基因植株后代种子的低温发芽能力明显增强, 在 28℃ 正常温度下, T₀ 种子的发芽势、发芽率及胚根长度都低于对照, 但在 13℃ 下, 转基因植株后代的各项指标均高于对照, 可能是转入的抗冷基因在低温诱导下得到表达, 表现出对低温的耐受性。

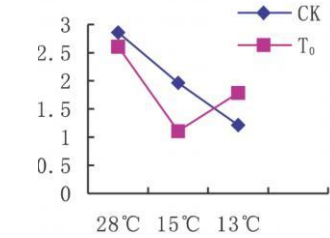


图1 T₀ 种子的平均胚根长度

Fig.1 Average radicle length of T₀ seeds

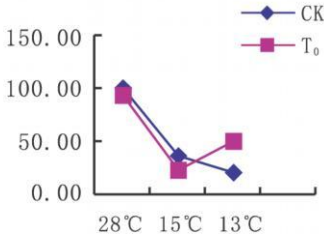


图2 T₀ 种子的平均发芽势

Fig. 2 Average germination energy of T₀ seeds

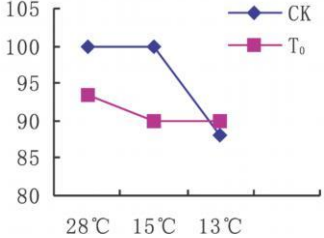


图3 T₀ 种子的平均发芽率

Fig. 3 Average germination rate of T₀ seeds

表 1 转基因植株后代幼苗低温下丙二醛含量		
Table 1 MDA content of transgenic plants in low temperature		
试验材料 Material	平均MDA 含量 Average MDA Contents/ nM · g ⁻¹	
19-21-1	11.9	
19-23-1	13.8	
19-23-2	9.8	
19-27-1	12.5	
19-27-2	7.4	
CK	14.7	

取低温胁迫下的黄瓜幼苗叶片。提取 MDA, 测定 MDA 含量, 结果见表 1。植物组织在逆境下遭受伤害, 往往发生膜脂过氧化作用, 丙二醛是膜脂过氧化的最终分解产物, 其含量可以反映植物遭受逆境伤害的程度。由表 1 可见, 不同株系后代幼苗在低温下释放的丙二醛

含量不同, 对照的丙二醛含量最高, 说明对照遭受低温的伤害重于试验的转基因株系, 可能转入基因提高了植株对低温的耐受性。

3 结论与讨论

研究利用农杆菌介导法将抗冷基因 BnCS 转入黄瓜亲本材料, 后代鉴定抗冷性有所增强, 为育种提供了新的种质材料。

农杆菌介导的黄瓜遗传转化中, 经过农杆菌侵染、抗生素脱菌及筛选, 植株再生能力受到很大影响, 转化率较低。试验以 BnCS 为目的基因, 在初步建立的转化系统上, 抗性植株阳性率达到 38.4%, 与报道的转化效率一般 35% 左右基本吻合^[8,10]。在对转化系统的进一

步研究中, 提高植株的再生能力, 抗性植株的阳性率也明显提高。

转化植株的 T_1 代幼苗的阳性率为 47%, 说明转化植株的外源基因没有完全遗传到 T_1 代, 原因一种可能基因丢失, 另一种是出现分离^[7]。因为外源基因在转化植株中的遗传传递是非常复杂的, 其遗传分离特点受转化方法、载体、环境条件的影响, 所以对该结果的解释还有待于进一步深入的研究。

在对转基因植株的 T_0 代种子和 T_1 代幼苗的抗冷性鉴定中, 所用试验材料为转基因植株的后代, 未考虑基因丢失或分离现象的存在, 因此试验结果可能不够准确, 但试验结果的总趋势说明, 与受体对照相比, 转化后代的抗冷性有明显的改变。

参考文献

[1] 侯锋, 李淑菊. 我国黄瓜育种研究进展与展望[J]. 中国农业科学, 2000, 33(3): 100-102.

- [2] 透明辉, 姜群峰, 陈劲枫. 黄瓜的冷害及耐冷性[J]. 植物学通报, 2004, 21(5): 578-586.
- [3] 黄文功, 殷奎德, 高中超. 植物抗冻基因工程研究进展[J]. 生物技术通报, 2006(2): 1-4.
- [4] Trulson A J, Simpson R B, Shahin E A. Transformation of cucumber (*Cucumis sativa* L.) Plants with *Agrobacterium rhizogenes*[J]. Theor Appl Genet, 1986, 73: 11-15.
- [5] 邓小燕, 张兴国, 井鑫. 等. 冷诱导转录因子基因 CBF3 转化黄瓜的研究[J]. 西南农业大学学报, 2004, 26(5): 603-605.
- [6] 纪巍, 李杰, 朱延明, 等. 不同启动子调控的 DREB1A 基因对黄瓜的遗传转化[J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(4): 442-447.
- [7] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] 王艳蓉, 陈丽梅, 潘俊松, 等. 黄瓜子叶高效再生体系的建立与遗传转化[J]. 上海交通大学学报, 2006, 24(2): 152-156.
- [9] 苏绍坤, 刘宏宇, 秦智伟. 农杆菌介导 *iaaM* 基因黄瓜遗传转化体系的建立[J]. 东北农业大学学报, 2006, 37(3): 289-293.
- [10] 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.

Agrobacterium-mediated Transformation of Cucumber for *BnCS* Gene

LIU Wen-ping¹, LU Shu-wen¹, LIU Jian-xin¹, NAN Xiang-ni¹, LIU Jing-lan², LI Zhur-gang¹

(1. Biotechnological Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China; 2. Horticultural Sub-academy, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069, China)

Abstract: The cold-tolerance gene *BnCS* which was cloned through homologous cloning method was transferred into cucumbers by the way of *Agrobacterium*-mediated. Some resistant plants obtained and their progenies were proved that the *BnCS* was integrated the cucumber genome by PCR analysis. Cold tolerance appraisal for T_0 seeds and T_1 generation transgenic plants suggested that the cold tolerance of transgenic progenies was better than CK to a certain extent.

Key words: *Agrobacterium*-mediated; *BnCS* gene; Cucumber; Transformation

养花不开的原因

1 水肥过量或不足

花卉生长期间, 若水肥过量, 易引起枝叶徒长, 营养物质多用于营养器官的根、茎、叶上去了, 而花、果实或种子缺乏养分, 影响花芽形成, 导致不开花或开花很少。孕蕾期施肥过浓, 浇水忽多忽少, 易造成落花落蕾。花卉生育期, 若缺肥少水, 植株生长不良, 也易造成开花少、花质差。

2 光、温不适宜

由于花卉原产地不同, 所以生态习

性各异。有的喜光热。有的喜半阴; 有的喜温暖, 有的喜凉爽。如果各自所需的生活条件得不到满足时, 也易引起落花落蕾, 需事先了解。

3 土壤含盐碱量高

大多数花卉喜微酸和中性土壤, 怕盐碱。较耐盐碱的花卉, 如天竺葵、月季等, 在土壤含盐量超过 0.1%, 酸碱度超过 pH 值 7.5 时, 也影响生育和开花。

4 生长期不整形修剪

花木生长期不修枝整形, 既影响美

观, 又消耗大量养分, 影响花芽形成, 造成不开花或开花少。

5 冬季室温过高

若室温过高, 影响花木休眠或使之过早发芽抽叶, 消耗养分, 翌年会生长衰弱, 不开花或花朵小或凋落。

6 受病虫害侵袭

花卉生育期, 易遭病虫危害, 影响养分积累, 生长受阻, 造成落花落蕾。

针对以上原因, 合理浇水施肥, 调节好盆花生长环境, 合理进行修剪, 并防治好病虫害, 便可以解决养花不开花和落花、落蕾的问题。