

黄瓜疏松愈伤组织瞬时表达系统的建立

徐 冉, 汤雪燕, 缪旻珉, 曹 磊生

(扬州大学 园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009)

摘 要: 在 NH_4NO_3 浓度为 2.0 g/L、6-BA 浓度为 1.0 mg/L、NAA 浓度为 0.1 mg/L 的 MS 培养基中添加酵母提取物 5 g/L 有利于产生质地疏松的愈伤组织, 适合作为外源基因瞬时表达的受体。

关键词: 黄瓜; 疏松愈伤组织; 瞬时表达

中图分类号: S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)13-0127-02

将外源基因在植物组织或细胞中进行瞬时表达, 可以获得关于该基因功能或表达模式的很多信息, 这种方式与获得完整转基因植株相比, 在数小时至数天之内即可完成对目的基因的表达分析, 具有简单快捷的优点, 是目前进行功能基因组学研究的常用手段。现建立适合瞬时转化和表达的黄瓜愈伤组织受体系统, 为进一步进行黄瓜相关基因的瞬时表达研究做准备。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 以华北型黄瓜品种“津春 4 号”(购于天津科润农业科技股份有限公司黄瓜研究所)为试验材料。将种子浸泡 4~6 h, 剥去种皮, 在 70% 的乙醇中浸泡 30 s, 冲洗后再用 0.1% 的升汞浸泡种子 7~10 min, 用灭菌水冲洗 5~6 次。把预先消毒好的黄瓜种子接种于 MS 基本培养基中进行无菌苗的培养, 培养温度 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光周期 16 h/d。取生长 7 d 左右的黄瓜苗, 当子叶变绿但尚未平展前, 将子叶的上半部分以及生长点切除, 保留下半部分作为外植体进行培养。

1.1.2 生长调节剂、培养基及其配制 6-BA 用少量 1 mol/L 的 HCl 溶解后, 加双蒸水配成 1 mg/mL 的母液; NAA 用适量的 95% 乙醇溶解后, 加双蒸水配成 0.1 mg/mL 的母液; 以上母液经 $0.22 \mu\text{m}$ 的混合纤维素酯微孔滤膜过滤灭菌后分装, -4°C 保存备用。MS 基本

培养基的配制, 参照 1962 年 Murashige 和 Skoog 的配方进行^[1], 在无特殊说明的情况下均为固体培养基, 蔗糖浓度为 30 g/L, 琼脂浓度为 7 g/L, pH 5.8。

1.2 疏松愈伤组织的形成

1.2.1 不同浓度 6-BA 和 NAA 对愈伤组织产量的影响

在 MS 基本培养基中, 6-BA 浓度梯度设为 0、1.0、2.0 mg/L, NAA 浓度梯度设为 0.0、1.0、2.0 mg/L。将子叶外植体接种于上述培养基中, 于 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 黑暗条件下培养, 20 d 后将愈伤组织从外植体上切下称重, 观察不同浓度 6-BA 和 NAA 对愈伤组织产量的影响。

1.2.2 N 素浓度和酵母提取物对愈伤组织质地的影响

在试验 1.2.1 各种植物生长调节剂配比的 MS 基本培养基中生长的愈伤组织质地均较坚硬, 不适合进一步分离成小细胞团进行外源基因的转化和瞬时表达。为此, 在含试验 1.2.1 探明的最佳 6-BA 和 NAA 浓度的 MS 培养基的基础上, NH_4NO_3 浓度设置为 1.65 g/L (MS 培养基中的正常浓度, 作为对照), 2.00 g/L 和 2.50 g/L; 酵母提取物添加浓度为 0.5、10 g/L, 观察培养 20 d 后疏松愈伤组织所占比例, 以镊子轻轻磨擦即有小细胞团分离作为疏松愈伤组织的判断标准。上述试验每处理均接种 30 瓶, 每瓶接种 4 个外植体, 重复 3 次, 所得数据用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 6-BA 和 NAA 对愈伤组织产量的影响

由表 1 可知, 当 NAA 浓度为 0 时, 各种浓度的 6-BA 均不能引起黄瓜愈伤组织的产生, 实地观察表明, 此时 6-BA 只能引起外植体长大或直接生芽。但在培养基中有 NAA 存在时, 1.0 mg/L 的 6-BA 有利于愈伤组织的产生。NAA 浓度为 0.1 mg/L 时最有利于愈伤组织的产生, 浓度升高至 2.0 mg/L 时愈伤组织产量反而下降。多重比较结果表明, 9 种植物生长调节剂浓度组合中, 以

第一作者简介: 徐冉(1969-), 女, 河北文安人, 博士, 现主要从事蔬菜生理研究工作。E-mail: haxuran @yahoo.com.cn。

通讯作者: 缪旻珉(1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向为蔬菜生物技术。E-mail: mmmiao @yzu.edu.cn。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目(2009CB119000); 国家自然科学基金资助项目(30871721)。

收稿日期: 2010-03-10

6-BA浓度 1.0 mg/L、NAA 浓度 0.1 mg/L 组合和6-BA 浓度 1.0 mg/L、NAA 浓度 0.2 mg/L 组合产生愈伤组织最多,适合作为进一步分离小细胞团的材料。考虑到成本因素,在后续试验中选择6-BA浓度 1.0 mg/L、NAA 浓度 0.1 mg/L 的组合。

表 1 6-BA 和 NAA 对愈伤组织产量的影响

| 培养基编号 | 6 BA | NAA | 愈伤组织生长量 |
|-------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| | /mg · L ⁻¹ | /mg · L ⁻¹ | /g · 瓶 ⁻¹ |
| 1 | 0.0 | 0.0 | 0.000 a(CK) |
| 2 | 0.0 | 0.1 | 2.437 b |
| 3 | 0.0 | 0.2 | 2.712 b |
| 4 | 1.0 | 0.0 | 0.000 a |
| 5 | 1.0 | 0.1 | 5.213 e |
| 6 | 1.0 | 0.2 | 5.061 e |
| 7 | 2.0 | 0.0 | 0.000 a |
| 8 | 2.0 | 0.1 | 4.224 d |
| 9 | 2.0 | 0.2 | 3.713 c |

注:不同的字母表示差异显著,下同。

表 2 N 素和酵母提取物对愈伤组织质地影响

| 培养基编号 | NH ₄ NO ₃ | 酵母提取物 | 疏松愈伤组织 |
|-------|---------------------------------|----------------------|------------|
| | /g · L ⁻¹ | /g · L ⁻¹ | 百分率/% |
| 1 | 1.65 | 0.0 | 0.00 a(CK) |
| 2 | 1.65 | 5.0 | 0.32 d |
| 3 | 1.65 | 10.0 | 0.41 e |
| 4 | 2.00 | 0.0 | 0.24 c |
| 5 | 2.00 | 5.0 | 0.61 f |
| 6 | 2.00 | 10.0 | 0.64 f |
| 7 | 2.50 | 0.0 | 0.11 b |
| 8 | 2.50 | 5.0 | 0.15 b |
| 9 | 2.50 | 10.0 | 0.23 c |

2.2 N 素和酵母提取物对愈伤组织质地的影响

表 2 表明,在培养基中增加 NH₄NO₃ 的浓度和添加酵母提取物均有利于增加产生疏松愈伤组织的概率。但在将 NH₄NO₃ 浓度提高至 2.00 g/L 后继续升高至 2.50 g/L,反而不利于疏松愈伤组织的产生。酵母提取物浓度提高至 10.0 g/L 时对提高疏松愈伤组织产出率

仍有帮助,但试验中发现过高的酵母提取物浓度会增加污染的概率。多重比较结果表明 NH₄NO₃ 浓度 2.00 g/L、酵母提取物浓度 5.0 g/L 组合和 NH₄NO₃ 浓度2.00 g/L、酵母提取物浓度 10.0 g/L 组合最有利于疏松愈伤组织的形成,考虑到污染和成本的因素,选择 NH₄NO₃ 浓度 2.00 g/L、酵母提取物浓度 5.0 g/L 组合。

3 讨论

目前关于黄瓜通过愈伤组织、胚状体或其它途径再生植株的报道较多^[2],但关于如何培养出疏松愈伤组织用于外源基因瞬时表达的报道极少,该试验在首先保证愈伤组织产量的基础上,进一步研究了培养基中 N 素水平的添加酵母提取物对愈伤组织质地的影响,取得了较满意的结果,所得的疏松愈伤组织经简单处理后,可方便地作为基因枪轰击的受体。在培养基中增加 NH₄NO₃ 的浓度一方面增加了 N 素水平,另一方面也提高了培养基中的离子强度,这二方面的因素可能均会对愈伤组织的产量和质地产生影响。酵母提取物是组织培养过程经常添加的有机物,不同植物愈伤组织的形成对其反应不一,目前尚未见其用于黄瓜愈伤组织诱导的报道^[3]。该试验结果表明,在 10 g/L 浓度范围内,该物质对提高黄瓜愈伤组织疏松度效果明显。

参考文献

[1] 刘敬梅,陈大明,陈杭.甜蛋白基因对莴苣的遗传转化[J].园艺学报 2001,28(3):246-250.
[2] 李晓丹,司龙亨,刘志勇等.黄瓜组织培养中外植体的选择及播种方式[J].蔬菜 2004(7):30-31.
[3] 方强,乔勇进.黄芩愈伤组织诱导和细胞培养研究进展[J].天然产物研究与开发,2008,20:187-192.

Establishment of Suitable Material for Transient Expression Technology of Cucumber

XU Ran, TANG Xue-yan, MIAO Min-min, CAO Bei-sheng

(College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009)

Abstract: To obtain the suitable material for transient expression of heterogenous genes, friable calli were produced on the medium with 6-BA 1.0 mg/L, NAA 0.1 mg/L, NH₄NO₃ 2.0 g/L and yeast extrat 5 g/L.

Key words: cucumber; suitable material; transient expression