

# 冷诱导基因转录因子 *CBF1* 转入黄瓜的研究

谭克<sup>1</sup>, 赵福顺<sup>1</sup>, 吴慧杰<sup>1</sup>, 宋述尧<sup>2</sup>

(1. 吉林省蔬菜花卉科学研究院, 吉林 长春 130033; 2. 吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118)

**摘要:**以抗冷性强的黄瓜“山东 5 号”为试材,研究冷诱导转录因子 *CBF1* 基因对黄瓜抗冷性的影响。从“山东 5 号”黄瓜基因组 DNA 中扩增并克隆了冷诱导转录因子 *CBF1* 基因,将其与 CaMV 35S 启动子和 Nos 终止子融合后构建成植物表达载体 pROK<sub>2</sub>-*CBF1*。通过花粉管通道法转化黄瓜植株,获得了具有卡那霉素抗性的黄瓜再生植株。结果表明:*CBF1* 基因已整合到黄瓜基因组中,转基因植株胁迫期间可溶性糖含量、幼苗含水量显著高于对照;MDA 含量、叶片电解质渗透率显著低于对照,黄瓜已具备了较强抗冷性。

**关键词:***CBF1* 转录因子;抗冷;遗传转化;黄瓜

**中图分类号:**S 642.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)09-0079-04

低温引起的冷害会引起农作物严重减产甚至绝收,传统的杂交育种方法已经培育出许多抗寒作物,但都需要较长的周期,而植物基因工程的发展为培育抗寒作物提供了一条崭新的途径。近年来,已克隆了一系列与抗寒有关的基因,将其转入植物中,可获得抗寒力较高的植物<sup>[1-2]</sup>。

在拟南芥中发现的以 CRT/DRE 为主要元件介导的低温和脱水响应信息途径,为植物的抗寒性研究提供了新思路<sup>[3-4]</sup>。COR 是冷应答蛋白,在冰冻、ABA 及干旱条件下诱导产生。Jaglo-Ottosen 等<sup>[5]</sup>在拟南芥中利用共隔离分子标记法发现, *COR* 基因包括 *COR616*、*COR15a*、*COR47* 及 *COR78* 4 种。在这些 *COR* 基因的启动子中均发现了 CRT/DRE 基序<sup>[6]</sup>。CRT/DRE

(C-repeat/Dehydration Responsive Element)是一段 DNA 顺式作用因子,它含有一段中心保守序列 CCGAG,在许多冷诱导的植物基因启动子中,以一个或多个拷贝形式存在。如拟南芥基因 *COR15a* 和 *COR78/RD29a* 及油菜基因 *BNI15* 都存在 CRT/DRE<sup>[7-8]</sup>。CRT/DRE 作为一个冷诱导的顺式作用因子,最早是由 Shinozaki 发现的。通过试验,他们发现在拟南芥 *COR78/RD29a* 基因的启动子中,有 2 段 9 bp 的 C-repeat DNA 片段,当把这 2 个片段与报告基因相连时,能诱导冷调控基因的表达。其具体途径是 CBF 转录因子→CRT/DRE 基序→*COR* 基因表达→植物抗寒性增加,即转录活性因子 CBF 结合到 CRT/DRE 基序上,诱导了 *COR* 基因表达,从而提高了植物的抗寒性<sup>[9-14]</sup>。

该研究构建了由光合启动子 CaMV 35S 调控下的 *CBF1* 融合基因植物表达载体 pROK<sub>2</sub>-*CBF1*,并通过花粉管通道法导入黄瓜<sup>[15]</sup>,对得到的黄瓜植株进行了 PCR 鉴定和抗冷性检测,以期植物抗寒新种质资源的快速获得提供一种新途径。

**第一作者简介:**谭克(1982-),男,吉林长春人,硕士研究生,助理研究员,研究方向为蔬菜育种。E-mail:foolish1982321@sina.com.

**责任作者:**宋述尧(1957-),男,吉林长春人,教授,博士生导师,研究方向为蔬菜生理。E-mail:syongjilau@126.com.

**收稿日期:**2015-02-11

**Abstract:** Taking Korlas frant pear (*Pyrus sinkiangensis* Yü) young expanded leaves extracted as explants, the effect of element composition of basic medium, the concentration of plant growth regulators, AgNO<sub>3</sub> concentration and leaf direction on the medium on shoot regeneration were studied. The results showed that the element composition of basic media was the major factor affecting the shoot regeneration. NN69 medium was the optimal basic medium for the adventitious shoot regeneration from leaves of the *Pyrus sinkiangensis* Yü and the optimum medium was NN69 medium with 1.0 mg/L thidiazuron and 0.3 mg/L indole-3-butyric acid. AgNO<sub>3</sub> enhanced the regeneration efficiency while its concentration was 0.5 mg/L. Adventitious buds was easier induced with the leaf abaxial side touching the medium than with the other side. After 21 days dark culture, the maximum regeneration frequency was 64.3% and the maximum bud number per explant was 2.59.

**Keywords:** Korlas frant pear (*Pyrus sinkiangensis* Yü); regeneration from leaves; adventitious buds

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试黄瓜(*Cucumis sativus* L.)品种为山东省农业科学院蔬菜所提供的“山东5号”。受体为优良自交系黄瓜“S95-5”,由吉林蔬菜花卉研究所提供。播种于灭菌的细沙壤土中,在相对湿度55%~60%的日光温室中培养。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 CBF1基因的克隆及表达载体的构建** 根据GenBank中已发表的拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)转录因子CBF1基因的cDNA序列(NM118681.3)设计PCR特异性引物:P1(5'-taggtacccttagagggaatagtc-3'),P2(5'-taggtacccttagagggaatagtc-3'),从“山东5号”黄瓜叶片中利用TRIzol方法提取新鲜叶片RNA,再利用RT-PCR技术扩增出CBF1编码区基因片段,进行PGEM-T easy载体连接,转化和测序鉴定,使用Blast等分析软件进行同源性比对分析。CBF1基因片段与CaMV 35S启动子和Nos终止子连接,再补平,连接后,插入到pROK<sub>2</sub>载体中,构建成植物表达载体pROK<sub>2</sub>-CBF1。利用花粉管通道法将pROK<sub>2</sub>-CBF1质粒转化到黄瓜中,得到转基因植株。

**1.2.2 黄瓜遗传转化方法** 以优良自交系黄瓜为受体,采用子房注射法进行导入。选取处于喇叭口期的花蕾,于前1天将入选的花蕾隔离套袋,次日进行人工授粉,于授粉后24 h导入含CBF1基因的质粒DNA。外源DNA导入时,首先用刀片平行截取2/3花柱,然后用100 μL微量注射器吸取10 μL(浓度为0.615~0.799 μg/μL)供体DNA,沿花柱慢慢插入子房,深及子房的1/2处,小心注入供体DNA。

**1.2.3 卡那霉素筛选** 由携带目的基因的黄瓜植株自交,得到的种子发育成T<sub>0</sub>代植株。由于pROK<sub>2</sub>-CBF1基因携带卡那霉素选择标记基因,遂在苗期两叶一心时,用3 000 mg/L的卡那霉素溶液均匀涂抹在刚展平的幼苗叶片上,初步筛选出具有卡那抗性的转基因植株。

**1.2.4 转基因黄瓜(T<sub>1</sub>代)抗冷性鉴定** 试验采用的黄瓜品种为转CBF1基因黄瓜、对照黄瓜为受体S95-5。2种黄瓜均采用常规方法催芽,播种在营养钵内,基质为营养土。在三叶一心时,将转基因植株和S95-5植株幼苗(转基因受体)置于5℃进行低温处理,另设一组相同的幼苗置于25℃条件下作为对照,处理与对照同时遮光。试验重复3次,每个处理4~5株混合采样,平行取3份测定各项生理指标。

### 1.3 项目测定

冷害指数参照Semeniuk(1986)的标准对每一幼苗冷害症状进行分级。冷害指数=(1×S<sub>1</sub>+2×S<sub>2</sub>+3×S<sub>3</sub>+4×S<sub>4</sub>+5×S<sub>5</sub>+0×S<sub>0</sub>)/低温胁迫的总株数。式中,S为每一冷害级的苗数。

可溶性糖含量测定采用蒽酮比色法。丙二醛含量

测定采用硫代巴比妥酸法。叶片电导率测定采用电导仪法。每个处理4~5株混合采样,以ORION TDS电导仪测定叶片电导率。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物表达载体pROK<sub>2</sub>-CBF1的鉴定

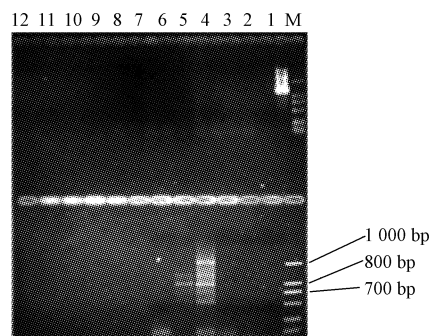
自拟南芥基因组DNA中扩增出641 bp片段,测序结果显示与拟克隆区段的CBF1基因序列(NM118681.3)完全一致。构建的双元载体pROK<sub>2</sub>-CBF1大小与期望一致;经PCR扩增,得到730 bp的片段;经XbaI与SacI酶切,得到800 bp的片段,表明该表达载体构建正确。

### 2.2 黄瓜转基因抗性植株的获得

经过卡那霉素筛选,T<sub>0</sub>代共得到3株转基因幼苗。采用花粉管通道法的转化率为3.75%,其中一株长势良好,最终获得55粒种子。其余2株长势偏弱,生长受到抑制,叶片出现褪绿白化现象,没有结实。

### 2.3 转基因黄瓜植株及其后代的PCR鉴定

以转基因黄瓜再生植株叶片为材料,提取基因组DNA;以CaMV 35S启动子的引物P<sub>35S</sub>和CBF1基因3'端引物P<sub>1</sub>为引物对DNA进行PCR扩增检测。结果显示,2443号(图1中4、5号样品)转基因植株基因组DNA与阳性对照pROK<sub>2</sub>-CBF1质粒均扩出1条730 bp的特异性条带,而未转化植株没有扩出任何带(图1)。初步证明目的基因已整合到黄瓜基因组中。通过对T<sub>1</sub>代转基因植株提取总DNA进行PCR分析,表明该株系呈现典型的孟德尔单基因传递规律即3:1分离规律,这表明CBF1基因在这些转基因植株中是以单位点插入方式遗传传递的,说明了转化体通过T<sub>0</sub>代自交,到T<sub>1</sub>代能趋于正常的遗传方式,并稳定传递。



注:M;DNA marker;1;pROK<sub>2</sub>-CBF1质粒对照;2,3,6~12:非转基因植株;4,5:PCR阳性转基因植株2443号。

Note:M; DNA marker; 1; positive control of PCR amplification with pROK<sub>2</sub>-CBF1; 2,3,6-12; Non transgenic plants; 4,5; PCR amplification of a transgenic plant 2443.

图1 转CBF1基因植株的PCR鉴定

Fig. 1 PCR detection of transgenic CBF1 gene plants

### 2.4 黄瓜转CBF1基因植株的抗冷性检测

**2.4.1 2种黄瓜在低温处理条件下冷害指数的差异** 叶片冷害指数能反映低温胁迫对幼苗叶片的伤害程度。

表 1 表明,随着 5℃ 低温持续时间的延长,转基因黄瓜与 S95-5 黄瓜逐渐表现出不同的冷害症状,转基因黄瓜的冷害指数始终低于对照,达到了 1% 差异显著性水平。

表 1 低温处理(5℃)对黄瓜叶片冷害指数的影响

Table 1 Effect of 5℃ chilling stress on chilling injury index of cucumber seedling

品种	平均冷害指数					
	低温处理 2 d	低温处理 3 d	低温处理 4 d	低温处理 5 d	低温处理 6 d	低温处理 7 d
S95-5	1.8	3.0	3.3	4.6	5.0	5.0
转基因	1.1**	2.1**	2.8**	4.2**	4.7**	4.8**

注:\*\*与对照植株差异达到 1% 极显著水平。下同。

Note: Difference with control plants at 1% significant level. The same below.

表 2 低温处理(5℃)对黄瓜叶片可溶性糖含量的影响

Table 2 Effect of 5℃ chilling stress on content of soluble sugar of cucumber seedling

品种	胁迫 48 h			胁迫 72 h			胁迫 96 h		
	对照/(mg·g <sup>-1</sup> )	处理/(mg·g <sup>-1</sup> )	增长率/%	对照/(mg·g <sup>-1</sup> )	处理/(mg·g <sup>-1</sup> )	增长率/%	对照/(mg·g <sup>-1</sup> )	处理/(mg·g <sup>-1</sup> )	增长率/%
S95-5	62.6	76.2	21.7	74.7	85.5	14.5	69.3	91.1	31.5
转基因	78.4	102.1	30.1	80.1	116.0	44.8	82.5	121.6	47.4

2.4.3 2 种黄瓜在胁迫期间 MDA 含量的差异 图 2 表明,在胁迫前,S95-5 与转基因黄瓜叶片的 MDA 含量差异不明显,没有达到显著水平。而在低温胁迫 24 h 后,2 种黄瓜叶片的 MDA 含量均明显上升,但转基因植株的 MDA 含量比 S95-5 植株低 33.8%。而随着胁迫时间延长,二者的 MDA 含量均继续增加,但转基因黄瓜始终显著低于后者。这说明,低温胁迫导致 S95-5 植株中 MDA 的大量积累,膜脂过氧化和蛋白质破坏程度较重,而对转基因植株的影响相对较小。

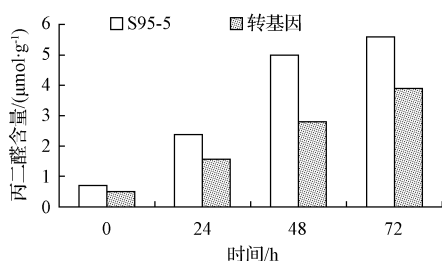


图 2 低温处理(5℃)对黄瓜叶片 MDA 含量的影响

Fig. 2 Effect of 5℃ chilling stress on the MDA content of cucumber leaves

2.4.4 2 种黄瓜在胁迫期间叶片电解质渗透率的差异

表 3 表明,低温处理使 S95-5 和转基因植株叶片的相对电导率均有不同程度的增加。胁迫 48 h 后,S95-5 植株叶片相对电导率比转基因植株高 51.0%,达到了 1% 差异显著性水平。胁迫 72 h 后,2 种黄瓜的相对电导率进一步增大,但转基因黄瓜始终显著低于 S95-5。在恢复期,2 种黄瓜的相对电导率均有一定程度的减小,其结果表明,转基因植株叶片在低温胁迫期间的细胞膜受损程度比 S95-5 低,而且转基因植株在恢复期的相对电导率也显著低于后者。

说明转基因黄瓜对持续低温的忍受能力显著强于对照黄瓜。

2.4.2 2 种黄瓜叶片可溶性糖含量的差异 在多种抗寒植物中也证实了抗寒性与可溶性糖含量呈正相关。表 2 表明,胁迫前转基因黄瓜叶片的可溶性糖含量比 S95-5 黄瓜高 25.2%,胁迫 48 h 和 72 h 后可溶性糖含量分别比 S95-5 高 34.0% 与 35.7%,达到了 1% 差异显著性水平。并且,在胁迫期间,转基因黄瓜叶片的可溶性糖的增加量始终高于 S95-5。这说明,转基因黄瓜叶片中的抗寒保护性物质大量积累,抗寒力增强,而 S95-5 黄瓜抗寒力增长则较弱。

表 3 低温处理(5℃)对黄瓜叶片电解质外渗的影响

Table 3 Effect of 5℃ chilling stress on the relative electrolyte leakage of cucumber leaves

品种	胁迫 48 h			胁迫 72 h			胁迫 96 h		
	对照 / %	处理 / %	增长率 / %	对照 / %	处理 / %	增长率 / %	对照 / %	处理 / %	增长率 / %
S95-5	34.3	45.6	32.9	38.5	53.6	39.2	41	63.8	55.6
转基因	24.1	30.2	25.3	27.2	36	32.4	32.3	45.2	39.9

2.4.5 胁迫期间 2 种黄瓜幼苗含水量的变化 低温胁迫期间,2 种黄瓜幼苗的含水量都呈下降趋势。表 4 表明,胁迫 48 h 后,S95-5 的含水量比对照减少了 28.7%;而转基因黄瓜在同一时期比对照减少了 25.4%,幼苗含水量的下降幅度低于 S95-5。胁迫 72 h 后,S95-5 的含水量比对照减少了 48.2%;而转基因黄瓜在同一时期比对照减少了 42.1%,幼苗含水量的下降幅度低于 S95-5。转基因黄瓜的自然含水量略高于 S95-5,经低温处理后,其含水量的下降率仍然显著低于 S95-5,这就使 2 种黄瓜之间的差异更加明显。

表 4 低温处理(5℃)对黄瓜幼苗含水量的影响

Table 4 Effect of 5℃ chilling stress on the water content of cucumber seedling

品种	胁迫 48 h			胁迫 72 h		
	对照 / %	处理 / %	比对照减少 / %	对照 / %	处理 / %	比对照减少 / %
S95-5	80.9	57.7	28.7	75.7	39.2	48.2
转基因	81.8	61.0	25.4	76.5	44.3	42.1

### 3 讨论

过去人们一直试图通过转入单个抗寒基因来提高植物抗寒性,但效果往往不显著<sup>[16]</sup>。原因在于抗寒性是受微效多基因调控的<sup>[5]</sup>。该试验中,将作为冷调控基因转录因子的 CBF1 基因转入黄瓜,使转基因黄瓜忍受低温的能力得到了一定程度的提高;具体表现为低温下的



可溶性糖、叶绿素含量显著高于受体黄瓜;而电解质渗透率和膜脂过氧化程度却低于后者,该结果表明过量表达 *CBF1* 基因可通过稳定细胞膜来提高冷敏感植物黄瓜抗冷力。

花粉管通道法是我国科学家首创,近年来其理论基础进一步明确。该试验证明了其具有简便、直接、易于整合的特点,而这是其它经典转化方法所不具备的。其次,卡那筛选时卡那霉素的浓度和施用方法会对黄瓜幼苗的生长发育产生一定影响,主要表现为浓度过大会使植株长势弱,叶片白化,结实率低等。因此,在筛选前要根据品种的差异,适量适当地确定卡那霉素筛选的浓度和施用方式,避免对植株生长不利的非目的性状的产生。

该研究克隆的 *CBF1* 基因能诱导抗寒基因的表达,增强黄瓜的耐寒能力,对于提高作物的抗冷能力具有很好的综合效果。同时,为利用基因工程获得抗寒新种质资源建立了一条快速便捷的途径。

#### 参考文献

- [1] 韦善君,孙振元,巨关升,等.冷诱导基因转录因子 *CBF1* 的组成型表达对植物的抗寒性及生长发育的影响[J].核农学报,2005,19(6):465-468.
- [2] 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,2004,10(26):5.
- [3] Haake V, Cook D, Riechmann J L, et al. Transcription factor *CBF4* is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2002, 130(2):639-648.
- [4] 钟克亚,叶妙水,胡新文,等.转录因子 *CBF* 在植物抗寒中的重要作用[J].遗传,2006,28(2):249-254.
- [5] Jaglo-Ottosen K R, Gilmour S J, Zarka D G, et al. *Arabidopsis* *CBF1* over expression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance[J]. Science, 1998, 280:104-106.
- [6] Zhang J Z, Creelman R A, Zhu J K. From Laboratory to Field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crop[J]. Plant Physiology, 2004, 135:615-621.
- [7] 曹琴,孔维府,温鹏飞.植物抗寒及其基因表达研究进展[J].生态学报,2004,4(24):806-810.
- [8] Guo Y, Xiang L M, Ishitani M, et al. An *Arabidopsis* mutation in translation elongation factor 2 causes super induction of *CBF/DREB1* transcription factor genes but blocks the induction of their downstream targets and low temperatures[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 11(99):7786-7791.
- [9] Gilmour S J, Zarka D G, Stockinger E J, et al. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* *CBF* family of AP2 transcriptional activator as an early step in cold-induced *COR* gene expression[J]. Plant J, 1998, 16(4):433-442.
- [10] Jaglo K R, Kleff S, Amundsen K L, et al. Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species[J]. Plant Physiology, 2001, 127:910-917.
- [11] Gilmour S J, Sebolt A M, Salazar M P, et al. Over expression of the *Arabidopsis* *CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation[J]. Plant Physiology, 2000, 124:1854-1865.
- [12] Kasuga M, Liu Q, Miura S, et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress inducible transcription factor[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17:287-291.
- [13] Novillo F, Alonso J M, Ecker J R, et al. *CBF2/DREB1C* is a negative regulator of *CBF1/DREB1B* and *CBF3/DREB1A* expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(11):3985-3990.
- [14] Jaglo-Ottosen K R, Gilmour S J, Zarka D G, et al. *Arabidopsis* *CBF1* over expression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance[J]. Science, 1998, 280:104-106.
- [15] 常利芳,王立新.花粉管通道转基因技术研究进展[J].河北农业科学,2003,3(7):1.
- [16] 甄伟,陈溪,孙思洋,等.冷诱导基因的转录因子 *CBF1* 转化油菜和烟草及抗寒性鉴定[J].自然科学进展,2000,12(10):12.

## Transformation of Cold-induced Transcription Activator *CBF1* into Cucumber (*Cucumis satives* L.)

TAN Ke<sup>1</sup>, ZHAO Fu-shun<sup>1</sup>, WU Hui-jie<sup>1</sup>, SONG Shu-yao<sup>2</sup>

(1. Jilin Vegetable and Bloom Research Institute, Changchun, Jilin 130033; 2. Department of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

**Abstract:** Taking the strong cold resistance cucumber 'Shandong No. 5' as material, cold induced effect of transcription factor *CBF1* gene on cold resistance of cucumber was studied. Cold-induced transcription activator *CBF1* (*CRT/DRE* binding factor) was amplified and cloned by PCR from the genomic DNA of cucumber 'Shandong No. 5' and fused with CaMV 35S promoter and Nos terminator to construct plasmid pROK<sub>2</sub>-*CBF1*. *CBF1* gene was introduced into cucumber by pollen tube pathway method. The transgenic nature of the regenerants was demonstrated by plant growth on medium containing kanamycin. The results showed that, PCR analysis confirmed that *CBF1* gene was incorporated into the genome of cucumber, seedlings of transgenic plant soluble sugar content, water content was significantly higher than that of the control; the MDA content and the relative electrolyte leakage of cucumber leaves was significantly lower than that of the control, transgenic cucumber has a strong cold resistance.

**Keywords:** transcription activator *CBF1*; genetic transformation; cold resistance; cucumber