

DOI:10.11937/bfyy.201618023

农杆菌介导的 *CBF* 基因转化哈密大枣

高启明^{1,2}, 王 斌², 赛买提·吐尔逊², 徐 明³, 罗淑萍³

(1. 中国农业科学院 郑州果树研究所, 河南 郑州 450009; 2. 哈密地区林果业技术推广中心, 新疆 哈密 839000;

3. 新疆农业大学 农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘 要:以哈密大枣无菌苗叶片为试材,以根癌农杆菌 LBA4404 为媒介将抗寒基因转录因子 *CBF* 基因导入哈密大枣,利用 PCR、RT-PCR 对转化植株进行鉴定,建立了哈密大枣的遗传转化体系。结果表明:在对哈密大枣无菌苗叶片进行遗传转化时,预培养 2 d,农杆菌菌液 OD₆₀₀ 为 0.5,浸染 20 min,共培养 3 d 的转化效率为最高。试验共获得 7 个抗性再生转化系。经 PCR 鉴定,*CBF* 基因在 7 个抗性再生转化系中均为阳性;经 RT-PCR 分析,*CBF* 基因在 7 个抗性再生转化系中均得到表达。

关键词:哈密大枣;*CBF* 基因;农杆菌介导

中图分类号:S 665.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)18-0094-05

哈密大枣是我国枣家族中一个相对独立的果中珍品。枣果个大、皮薄、核小、肉厚、干而不皱,含糖量高,富含多种营养成分。除维生素、氨基酸、铁、锌、钙外,还含有较多的生物碱、有机酸,以及具有生理活性的特殊功能成分,因此深受消费者喜爱。近年来,随着枣树收益逐年增加,果农种枣积极性得到极大激发,哈密枣树栽培面积不断扩大,截至 2014 年底,全地区已达 21 894 hm²,枣产业已成为哈密农民收入的主要来源之一。

近年来全球气候变化加剧,哈密地区 1、2 月的持续低温对枣树造成了很大的伤害,轻者全树枝条冻死,重者树干冻裂直至整株枯死,严重影响枣果品质和产量的提高,枣农收入极不稳定。低温冻害已成为制约哈密乃至新疆林果业发展的重要因素。因此,研究并提高枣树抗寒性具有重要的理论和现实意义。

长期以来,果树抗寒育种主要采用芽变选种、实生选种、杂交育种、诱变育种等传统育种途径。近年来,随着生物技术的发展,人们利用转基因技术改良作物的抗寒性,已成为一种新的育种手段。自拟南芥 *CBF*(*CRT/DRE Binding Factor*)家族转录因子发现以来,植物的抗寒机理研究进入了新的阶段。*CBF* 转录因子是一种低温响应因子,是近年来植物抗逆性研究中具有突破性的发现,在低温胁迫下能够特异地结合到冷诱导(cold

regulated, *COR*)基因的启动子元件上,启动并激活一系列抗逆功能基因的表达,进而增强植物对低温的抗性,因此,*CBF* 转录因子被看作是低温时激活一些冷诱导基因的“开关”^[1]。利用 *CBF* 转录因子改良植物抗逆性的研究,已在饲草玉米^[2]、番茄^[3]、茄子^[4]、黄瓜^[5]、草莓^[6]、马铃薯^[7]等多种植物上开展并取得了较理想的结果,所获得的转基因植株抗寒性均得到了明显提高。研究还发现,过量表达的 *CBF* 基因除了能够提高植株抗寒性外,其抗旱和抗盐碱能力也能得到提高。李新玲等^[8]将 *CBF2* 基因转入番茄,发现转基因番茄的耐 NaCl 能力显著提高。李新玲等^[9]将 *CBF2* 基因转入烟草,发现转基因烟草的抗旱能力明显增强。枣树转基因研究方面,已有专家开展了一些工作,如罗在荣等^[10]成功将虎杖芪合酶基因转入壶瓶枣,获得了壶瓶枣遗传转化新材料;冯晓东等^[11]以骏枣愈伤组织为外植体,建立了骏枣遗传转化体系;郝征^[12]以冬枣无菌苗叶片为材料把双抗虫基因即 *Bt* 和 *API 2* 个基因转入到冬枣中,获得了 8 个转基因株系。但迄今为止尚鲜见 *CBF* 基因转化枣的报道,该研究以哈密大枣试管苗叶片为试材,以根癌农杆菌 LBA4404 为媒介将 *CBF* 基因导入哈密大枣,以期为进一步获得抗寒性强的哈密大枣品种奠定实践基础及参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料与质粒:以哈密大枣无菌苗从上往下数第 2~4 节位充分展开的叶片为受体材料。转化所用根癌农杆菌菌株为 LBA4404,含有 pCAMBIA1301 质粒,该质粒含 CaMv35s 启动子调控的 *CBF* 转录因子基因、*GUS*

第一作者简介:高启明(1971-),男,博士,副研究员,现主要从事果树栽培生理等研究工作。E-mail:gqmh@163.com

责任作者:罗淑萍(1962-),女,硕士,教授,现主要从事分子生物学等研究工作。E-mail:luoshuping2008@163.com

基金项目:新疆维吾尔自治区高技术研究发展资助项目(201211108)。

收稿日期:2016-05-04

报告基因和新霉素磷酸转移酶 *NPTII* 基因,该菌株由新疆农业大学农学院分子生物学实验室构建并保存。

培养基:预培养培养基 $\text{NN}_{69} + \text{TDZ } 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IBA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{AgNO}_3 \text{ } 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;共培养培养基与预培养培养基成分相同;选择培养基 $\text{NN}_{69} + \text{TDZ } 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IBA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{AgNO}_3 \text{ } 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{Kan } 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{Cef } 400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;分化培养基 $\text{MS} + 6\text{-BA } 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IBA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{Kan } 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{Cef } 400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;生根培养基 $1/2\text{MS} + \text{IBA } 0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{葡萄糖 } 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{Kan } 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。上述5种培养基均添加琼脂 $6.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8, 121 °C 高压灭菌 20 min。之后冷却至 60 °C 左右加入过滤灭菌的头孢霉素(Cef)和卡那霉素(Kan),混匀、分装备用。

1.2 试验方法

1.2.1 卡那霉素浓度的筛选 用手术刀将哈密大枣无菌苗叶片切成 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 的小方块,近轴面向下接种于含有不同浓度(0.5、10、15、20、30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Kan 的再生培养基中,每处理 8 个培养皿,每培养皿接种 7~9 个外植体,重复 3 次。30 d 继代 1 次。4 次继代后,统计叶片不定芽诱导率。不定芽诱导率(%) = 不定芽萌发的叶片数/接种的总叶片数 $\times 100$ 。

1.2.2 农杆菌的活化与培养 将冷冻保存的农杆菌 LBA4404 在固体培养基(添加 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Rif)上划线,28 °C 条件下倒置培养 1~2 d。挑取单菌落接种于装有 YEB 液体培养基(添加有 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Rif)试管中,于 28 °C, $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下振荡培养,OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8 时取出试管,于 4 °C、 $4\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min,收集菌体,并用液体再生培养基重悬,稀释成不同浓度备用。

1.2.3 预培养时间对转化率的影响 将 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 的哈密大枣无菌苗叶块,于预培养培养基上进行暗培养,设置暗培养时间分别为 0、2、4、6、8 d。暗培养后,置于 OD₆₀₀ 为 0.5 的农杆菌菌液浸染 20 min,避光共培养 3 d 后进行选择培养。等有芽点出现后,转到继代培养基继续培养,直至分化出 Kan 抗性芽。每处理 120 个外植体,重复 3 次。30 d 继代 1 次,4 次继代后统计转化率。转化率(%) = 伸长芽点外植体数/接种外植体数 $\times 100$ 。

1.2.4 农杆菌菌液浓度对转化率的影响 将经过预培养 2 d 的无菌苗叶块置于不同浓度(OD₆₀₀ 分别为 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9)的农杆菌菌液中浸染 20 min,避光共培养 3 d 后进行选择培养。等有芽点出现后,转到继代培养基继续培养,直至分化出 Kan 抗性芽。每处理 120 个外植体,重复 3 次。30 d 继代 1 次,4 次继代后统计转化率。

1.2.5 浸染时间对转化率的影响 将经过预培养 2 d 的无菌苗叶块置于 OD₆₀₀ 为 0.5 的农杆菌菌液中浸染,

浸染时间设为 5、10、20、30、40 min,避光共培养 3 d 后进行选择培养。等有芽点出现后,转到继代培养基继续培养,直至分化出 Kan 抗性芽。每处理 120 个外植体,重复 3 次。30 d 继代 1 次,4 次继代后统计转化率。

1.2.6 共培养时间对转化率的影响 将经过预培养 2 d 的无菌苗叶块置于 OD₆₀₀ 为 0.5 的农杆菌菌液中浸染 20 min,避光共培养 1、2、3、4、5 d 后进行选择培养。等有芽点出现后,转到继代培养基继续培养,直至分化出 Kan 抗性芽。每处理 120 个外植体,重复 3 次。30 d 继代 1 次,4 次继代后统计转化率。

1.2.7 抑菌抗生素浓度的选择 将农杆菌浸染过的哈密大枣叶片转入含有 200、300、400、500、600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 头孢霉素的培养基中进行培养,每处理 48 个外植体,重复 3 次。30 d 后统计 Cef 的抑菌效果。污染率(%) = 污染外植体数/接种外植体总数 $\times 100$ 。

1.2.8 转基因植株的获得 将 Kan 抗性芽转移到分化培养基上进行分化培养,培养条件((25±1)°C, 16 h 光照/8 h 黑暗,光照强度 2 500 lx),每 4 周继代 1 次。2~3 次继代后,将再生植株转移到生根培养基上进行培养。将根系生长健壮、株高约 10 cm 的植株移栽于温室中。

1.2.9 转基因植株的分子生物学鉴定 采用 CTAB 法提取再生植株基因组 DNA,PCR 反应扩增 CBF 基因片段,所用引物为 F1:5'-GCTGTGATGGCTGCTCGTG-3' 和 R1:5'-CAAACATTCCTCCTCATCC-3'。以未转化哈密大枣的 DNA 为阴性对照,表达载体质粒为阳性对照。PCR 反应体系:dNTP 0.5 μL , buffer 2.5 μL ,上下游引物各 1 μL ,模版 DNA 1 μL , Taq 0.3 μL ,灭菌 ddH₂O 18.7 μL ,总体系 25 μL 。PCR 反应程序:94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环;72 °C 延伸 7 min。取 5 μL 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测。分别提取哈密大枣转化植株和未转化植株的总 RNA,反转录合成 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行 RT-PCR(RNA 提取方法参照天根植物 RNA 小提试剂盒说明书,cDNA 合成方法按照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书操作,RT-PCR 扩增引物、反应程序和反应体系同 PCR 扩增)。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 Kan 对哈密大枣不定芽诱导的影响

由图 1 可以看出,哈密大枣叶片不定芽诱导率随 Kan 浓度的升高而迅速下降。当 Kan 浓度为 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,不定芽诱导率为 11.11%,此时叶片仍为黄绿色;当 Kan 浓度上升至 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织的形成和不定芽的分化都受到了抑制,不定芽诱导率显著降低至 0.69%;当 Kan 浓度上升至 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,叶片完全停止生长并发生白化而死亡。表明哈密大枣叶片 Kan 筛选临界浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

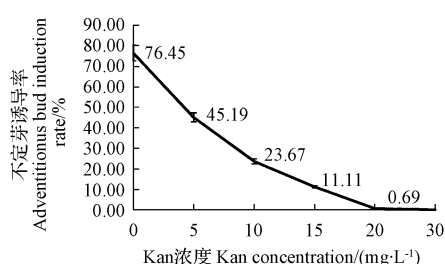


图1 Kan对哈密大枣叶片离体不定芽再生的影响

Fig.1 Effect of kanamycin on the adventitious bud regeneration of Hami *Zizyphus jujuba* leaves

2.2 不同浓度 Cef 的抑菌效果

由表1可知,不同浓度的 Cef 对农杆菌的抑制效果差异显著,其抑菌的最适浓度为 400 mg·L⁻¹。当 Cef 浓度为 200 mg·L⁻¹时,哈密大枣叶片污染率最高;随着 Cef 浓度的提高,叶片污染率逐渐下降。当 Cef 浓度上升至 400 mg·L⁻¹时,叶片污染率下降至 8.33%;Cef 浓度为 600 mg·L⁻¹时,可以完全抑制农杆菌的生长。

表1 不同浓度 Cef 的抑菌效果

Table 1 Effect of different Cef concentration on antibacterial

Cef /(mg·L ⁻¹)	外植体数 No. of explants/个	污染外植体数 No. of contamination/个	污染率 Rate of contamination/%
200	48	42	87.50a
300	48	28	58.33b
400	48	4	8.33c
500	48	1	2.08d
600	48	0	0.00e

注:数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

Note: Data followed different letters show significant difference at $P<0.05$, the same below.

2.3 预培养时间对转化效率的影响

预培养有利于扩大外植体与培养基的接触面,促进细胞分裂。由表2可知,合适的预培养时间有利于转化效率的提高,其中预培养2d的哈密大枣叶片所获得的抗性芽数最多,随着预培养时间的延长抗性芽数逐渐减少。因此,叶片预培养2d后再进行共培养对于哈密大枣遗传转化最为有利。

表2 预培养时间对抗性芽再生的影响

Table 2 Effect of the period of pre-cultivation on the regeneration of resistant bud

预培养时间 Pre-culture time /d	接种外植体数 No. of explants inoculated/个	抗性芽数 No. of resistant bud/个	转化率 Transformation frequency /%
0	120	1	0.83c
2	120	4	3.33a
4	120	2	1.67b
6	120	1	0.83d
8	120	0	0.00e

2.4 农杆菌菌液浓度对转化效率的影响

由表3可知,菌液 OD₆₀₀ 为 0.1 时,抗性愈伤组织产生较少,获得的抗性芽数少,转化效率低;当菌液 OD₆₀₀

为 0.9 时,由于农杆菌繁殖较多,选择培养时不易控制,叶片伤害较重,发黄,死亡率较高,获得的抗性芽数显著下降,转化率也随之降低;当菌液 OD₆₀₀ 为 0.3~0.5 时,抗性愈伤组织产生较多,获得的抗性芽数多,转化效率高。

表3 农杆菌菌液浓度对抗性芽再生的影响

Table 3 Effect of *Agrobacterium* concentration on the regeneration of resistant bud

菌液浓度 <i>Agrobacterium</i> concentration (OD ₆₀₀)	浸染叶片数 No. of leaves inoculated/个	抗性芽数 No. of resistant bud/个	转化率 Transformation frequency/%
0.1	120	1	0.83d
0.3	120	3	2.50b
0.5	120	5	4.17a
0.7	120	2	1.67c
0.9	120	1	0.83d

2.5 浸染时间对转化效率的影响

由表4可知,叶片抗性芽的诱导受浸染时间的影响较大,浸染时间短不利于农杆菌附着;浸染时间长,菌体繁殖过多,毒害叶片直至死亡,合适的浸染时间为 20 min,此时获得的抗性芽数多,转化效率高。

表4 浸染时间对抗性芽再生的影响

Table 4 Effect of infection time on the regeneration of resistant bud

浸染时间 Infection time /min	浸染叶片数 No. of leaves inoculated/个	抗性芽数 No. of resistant bud /个	转化率 Transformation frequency /%
5	120	0	0.00d
10	120	3	2.50b
20	120	5	4.17a
30	120	2	1.67b
40	120	2	1.67c

2.6 共培养时间对转化效率的影响

研究发现,农杆菌附着在植物伤口 16 h 之后,才能诱发肿瘤。也就是说,农杆菌和受体材料共培养时间必须大于 16 h。但共培养时间也不能太长,若时间过长,会由于农杆菌的过度繁殖而无法控制,从而造成农杆菌污染,植物细胞遭受毒害而死亡。由表5可知,共培养1d时转化率很低,共培养5d时,则由于农杆菌过度繁殖,导致叶片遭受毒害,转化率降低。因此,共培养时间以3d为最佳。

表5 共培养时间对抗性芽的影响

Table 5 Effect of co-cultivation time on the regeneration of resistant bud

共培养时间 Co-culture time /d	浸染叶片数 No. of leaves inoculated/个	抗性芽数 No. of resistant bud /个	转化率 Transformation frequency /%
1	120	0	0.00d
2	120	2	1.67c
3	120	5	4.17a
4	120	3	2.50b
5	120	2	1.67c

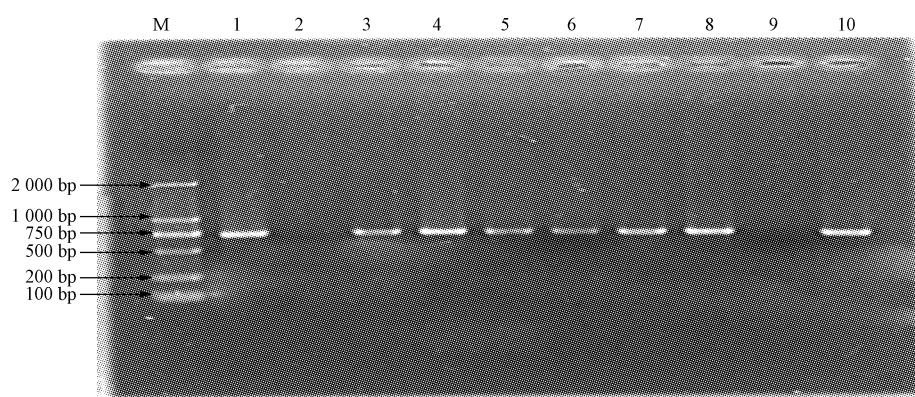
2.7 哈密大枣转化植株的获得

Kan 抗性芽分化培养大约 50 d 即有不定芽出现,不定芽经过多次转接后逐渐伸长,当不定芽生长至 3 cm 左右时从基部切下,接入生根培养基中进行诱导生根,生根后即为哈密大枣转 *CBF* 基因植株。

2.8 哈密大枣抗性植株的 PCR 检测

采用 *CBF* 基因特异性引物对哈密大枣抗性植株的

基因组 DNA 进行 PCR 检测,从图 2 可以看出,抗性植株基因组 DNA 扩增出了与阳性对照质粒一样的明亮条带,该条带碱基数约为 750 bp,而非抗性植株没有扩增出该条带。该结果初步证实 *CBF* 基因已整合到哈密大枣抗性植株基因组中。



注:M. DL 2 000 DNA Marker;1. 阳性对照;2. 阴性对照;3~10. 转化植株。

Note:M. DL 2 000 DNA Marker;1. Positive control;2. Negative control;3-10. Transformed plant.

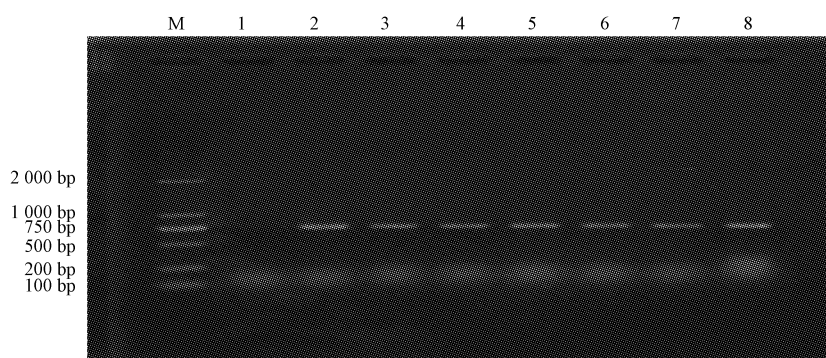
图 2 转化植株的 PCR 检测

Fig. 2 PCR detection of transformed plants

2.9 哈密大枣转基因植株的 RT-PCR 分析

为进一步证明 *CBF* 基因在哈密大枣转化植株中的表达情况,分别提取转化植株和未转化植株的叶片总 RNA,通过 mRNA 反转录出 cDNA,然后以此为模板进

行 PCR 扩增,由图 3 可知,7 个转化植株材料均扩增出了 750 bp 的目标片段,未转化植株则没有扩增出该片段,这说明导入哈密大枣基因组中的 *CBF* 基因能够正常转录并表达。



注:M. DL 2 000 DNA Marker;1. 阴性对照;2~8. 转化植株。

Note:M. DL 2 000 DNA Marker;1. Negative control;2-8. Transformed plants.

图 3 转化植株的 RT-PCR 检测

Fig. 3 RT-PCR detection of transformed plants

3 讨论

3.1 预培养时间

大量研究证实,合适的预培养时间可以提高转化效率。冯晓东等^[11]研究发现,骏枣愈伤组织经过预培养 6 d 后转化效率最高;罗在柒等^[10]以壶瓶枣茎段为材料进行遗传转化时,发现预培养 3 d 效果最好。该研究发现,以哈密大枣无菌苗叶片为外植体进行遗传转化,预培养 2 d

效果最好。

3.2 菌液浓度

转化率的高低与菌液浓度、浸染时间直接相关。较低的菌液浓度和较短的浸染时间因外植体伤口表面所接触到的菌液过少,导致转化率低;当菌液浓度过高时,由于高浓度菌液对受体材料所造成的伤害也会影响转化效率。不同的受体材料应选择不同的菌液浓度。郝

征^[12]在对冬枣进行遗传转化时,发现农杆菌 OD₆₀₀ 为 0.8 时,遗传转化效果最好。该研究以哈密大枣无菌苗叶片为受体材料,选择了 OD₆₀₀ 为 0.5 的菌液,试验结果表明,这个浓度是比较合适的。

3.3 浸染时间

农杆菌吸附到外植体表面后,能否完成转化,取决于浸染时间。如果浸染时间太短,农杆菌与伤口不能充分接触,从而导致转化效率不高。长时间浸染时,农杆菌容易对外植体造成伤害,从而影响外植体的再生率。该研究认为外植体在 OD₆₀₀ 为 0.5 的农杆菌菌液中浸泡 20 min 是比较合适的。

3.4 共培养时间

冯晓东等^[11]在研究骏枣愈伤组织遗传转化时,采用了 LBA4404 菌株,将菌液 OD₆₀₀ 调至 0.4~0.6,浸染了 10 min,发现共培养 16 d 对转化最适宜。郝征^[12]在研究冬枣的遗传转化时,发现共培养 3 d 效果最好。罗在桀等^[10]在对壶瓶枣茎段进行遗传转化时发现,共培养 3 d 即可达到最高的转化率。

该研究在对哈密大枣进行遗传转化时发现,转化效率随共培养时间的延长而提高,当达到一定峰值后,随着共培养时间延长,农杆菌大量滋生,叶片受到毒害而变黄,转化效率随之降低。研究认为,哈密大枣在进行遗传转化时,共培养 3 d 为好。

4 结论

该研究以哈密大枣离体再生叶片为受体,通过农杆菌介导,建立了适合哈密大枣叶片的遗传转化体系,即:哈密大枣叶片经过预培养 2 d 后,用 OD₆₀₀ 为 0.5 的根癌农杆菌菌液浸染 20 min,然后在共培养培养基中暗培养 3 d,之后取出叶片转入选择培养基进行暗培养 9 d,光照培养 30 d,然后转接到分化培养基继续光照培养 50 d

左右,当不定芽长至 3 cm 左右时切下接种于生根培养基中,诱导其生根,从而获得哈密大枣转化植株。经过对转化植株进行 PCR 检测和 RT-PCR 分析,共有 7 个哈密大枣转化株系扩增出了目的片段,并能进行正常转录和表达。这说明该试验所建立的哈密大枣遗传转化体系是成功的,为今后进一步获得哈密大枣转抗寒基因新品种奠定了理论基础和实践依据。

参考文献

- [1] STOCKINGER E J, GILMOUR S J, THOMASHOW M F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit[J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94(3): 1035-1040.
- [2] 向白菊, 李成君, 张健, 等. CBF1 基因转化饲草玉米 SAUMZ1 提高抗寒性的研究[J]. 草业科学, 2012, 29(9): 1374-1378.
- [3] 王沛文, 朱文哲, 刘阳, 等. 多毛番茄冷诱导转录因子 CBF1 转化番茄的研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 30-35.
- [4] 孟平红, 万发香, 王永清, 等. 冷诱导转录因子 CBF3 转化茄子的初步研究[J]. 中国蔬菜, 2013(10): 36-43.
- [5] 谭克, 赵福顺, 吴慧杰, 等. 冷诱导基因转录因子 CBF1 转入黄瓜的研究[J]. 北方园艺, 2015(9): 79-82.
- [6] 袁维凤, 钱玉梅, 徐德聪, 等. 影响草莓遗传转化率的因子及转 CBF1 基因植株的获得[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(5): 1124-1128.
- [7] 许昆朋. 转 CBF3 基因马铃薯提高抗冷性的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- [8] 李新玲, 徐香玲, 张月学. 转 CBF2 基因番茄抗 NaCl 胁迫研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(12): 160-162.
- [9] 李新玲, 徐香玲, 王全伟. 拟南芥 CBF2 基因的抗旱性研究[J]. 生物技术通报, 2010(10): 96-99, 103.
- [10] 罗在桀, 郭辉力, 杨亚东, 等. 农杆菌介导虎杖芪合酶基因遗传转化壶瓶枣的研究[J]. 林业科学, 2015, 51(10): 101-109.
- [11] 冯晓东, 陈国梁, 乔璟, 等. 根癌农杆菌介导的骏枣愈伤组织遗传转化体系的研究[J]. 延安大学学报(自然科学版), 2014, 33(1): 54-57.
- [12] 郝征. 农杆菌介导的枣树遗传转化研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2012.

Agrobacterium-mediated CBF Genetic Transformation of Hami Zizyphus jujuba

GAO Qiming^{1,2}, WANG Bin², Saimaiti • TUERXUN², XU Ming³, LUO Shuping³

(1. Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450009; 2. Technology Extension Center of Hami Prefecture Forestry and Fruit Industry, Hami, Xinjiang 839000; 3. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052)

Abstract: Hami *Zizyphus jujuba* leaves were used as test materials to study genetic transformation of Hami *Zizyphus jujuba* by using CBF transcription factor of antifreeze gene, the CBF transcription factor of antifreeze gene was induced by using *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, the transgenic plants were identified by using PCR and RT-PCR. The results showed that the highest transformation efficiency was obtained when leaf explants were cultured 3 days after pre-cultured for 2 days and infested for 20 minutes with *Agrobacterium tumefaciens* (OD₆₀₀ = 0.5). 7 resistance regenerated transformation systems were obtained in this experiment. CBF genes were positive by using PCR identify and expressed by using RT-PCR analysis in 7 resistance regenerated transformation systems.

Keywords: Hami *Zizyphus jujuba*; CBF gene; *Agrobacterium*-mediated