

黄瓜再生体系和遗传转化的建立

叶永亮, 杜波

(哈尔滨市农业科学院, 黑龙江哈尔滨 150070)

摘要:以黄瓜(*Cucumis sativus* L.)哈研3号为试验材料,采用组织培养技术系统探讨以子叶或子叶节为外植体时不定芽的诱导效率,最终确定以子叶节作为再生体系及遗传转化体系的试验材料,并系统探讨了不同PGRs浓度对不定芽诱导、不定芽伸长及生根阶段的影响;建立了哈研3号黄瓜的高频再生体系;并在子叶节根端膨大阶段进行了抗生素(Km)浓度的摸索,建立了较为适宜的遗传转化体系,为转基因工作打下坚实的基础。

关键词: 黄瓜; 子叶节; 不定芽; 再生体系; 遗传转化体系; PGRs

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)05-0005-02

Construction of Cucumber Regeneration System and Genetic Transformation System

YE Yong-liang DU Bo

(Harbin Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150070)

Abstract: Taking cucumber (*Cucumis sativus* L.) "Hayan No. 3" as the test material using tissue culture technology system to explore induction efficiency of adventitious shoot for cotyledon or cotyledon node as explants. Then, the cotyledon node as a regeneration system and genetic transformation system was determined as test materials. And systems of different PGRs concentration on adventitious bud induction, adventitious shoot elongation and rooting stages of impact were discussed. Finally, the "Hayan No. 3" the high-frequency regeneration system of cucumber was set up. Cotyledon node at the root end-stage expansion of the antibiotic (Km) concentration was explored, and a more appropriate genetic transformation system was constructed for genetically modified job thus laying a solid foundation.

Key words: cucumber; cotyledon node; adventitious shoot; regeneration system; genetic transformation system; PGRs

多年来黄瓜(*Cucumis sativus* L.)以其独特的营养价值和食用价值深受人们喜爱,但培育抗病、抗逆且商品性较好的育种新品系却成为育种家亟待解决的问题。哈研3号抗逆性强,强雌性系,商品性较好,但抗病性一般。基因工程和分子生物学飞速发展为我们提供了新型、快速的育种平台^[1-3]。我们可以利用转基因手段将同一物种或其它物种的优良基因导入受体材料^[3-5],使其具有我们所需要的特性。本研究以哈研3号为试验材料,系统探讨了不同PGRs浓度对不定芽诱导、不定芽伸长及生根阶段的影响;建立了哈研3号黄瓜的高频再生体系和遗传转化体系,为后续的遗传转化打下一个坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)品种哈研3号由哈尔滨市农业科学院黄瓜育种实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的获得 将黄瓜种子去壳后,流水冲洗1 h,先用75%酒精消毒1 min,再用0.1%的升汞消毒15 min,无菌水冲洗3~5次,接种在1/2 MS培养基上,培养条件为(26±1)℃,1500 lx,16 h·d⁻¹光照。

1.2.2 不定芽的诱导 取3~5日龄的子叶和子叶节,将其接种在不定芽诱导培养基上(见表1)。其中,不同外植体种类对分化效率也有一定影响;另外,培养基中不同种类和不同浓度的PGRs配比对不定芽分化有一定的影响。

不定芽分化率/%=不定芽分化的外植体数/接种的外植体数

1.2.3 不定芽的伸长 待不定芽长到3 cm左右时,将不定芽转移到不定芽伸长培养基上。培养基中PGR

收稿日期: 2009-03-16

第一作者简介: 叶永亮(1981-),男,河北省南皮县人,学士,中级农艺师,从事黄瓜分子育种研究, E-mail: yy18998@126.com.

只添加减半的 6-BA。培养条件为 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$, 1 500 lx, $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 光照。

表 1 不定芽诱导培养基中不同 PGRs 配比

序号	PGRs	
	6-BA	IAA
1	0.2	0.1
2	0.2	0.2
3	0.5	0.1
4	0.5	0.2
5	1.0	0.1
6	1.00	0.2

注: 基本培养基为 MS。

1.2.4 再生植株生根 待不定芽长到接近瓶口时, 从基部剪下接种到生根培养基上。其中, 培养基中不同浓度 MS 和 PGR 对不定芽生根有一定影响(见表 2)。培养条件为 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$, 1 500 lx, $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 光照。

表 2 生根培养基中不同 PGRs 配比

序号	培养基
1	MS+0.1 mg \cdot L $^{-1}$ IAA
2	MS+0.5 mg \cdot L $^{-1}$ IAA
3	MS+1.0 mg \cdot L $^{-1}$ IAA
4	1/2MS+0.1 mg \cdot L $^{-1}$ IAA
5	1/2MS+0.5 mg \cdot L $^{-1}$ IAA
6	1/2MS+1.0 mg \cdot L $^{-1}$ IAA

1.2.5 再生植株驯化、移栽 待再生植株根系发达后进行驯化、移栽。首先将瓶口打开, 在培养室中驯化 3 d。然后, 将植株取出在流水下慢慢冲洗, 彻底清除根部培养基, 否则容易烂根, 并且注意不要伤到根部。培养植株的土壤选择草炭:沙土=2:1。培养条件为室温 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 光照, 75%~90%湿度。

1.2.6 Km 浓度的确定 现用于遗传转化的质粒以 Km 抗性居多。选用子叶节端部处于膨大阶段时期进行 Km 浓度确定。Km 初步确定为 0、20、50、80、100 mg \cdot L $^{-1}$; 再次确定为 0、10、20、30、40 mg \cdot L $^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 不定芽的诱导

分别将 3~5 日龄的子叶和子叶节接种在诱导培养基上。结果表明, 子叶节在适宜的培养基上有不定芽产生, 且诱导率能够达到 76%; 子叶在以上的不同的不定芽诱导培养基上也有部分不定芽产生, 但效率低下, 最高只有 3.2%(见表 3)。

表 3 不同外植体类型对诱导率的影响

培养基种类	不同外植体诱导率/%	
	子叶	子叶节
1	0	14
2	0	12
3	0	27
4	0.4	31
5	3.2	76
6	3.1	71

注: 基本培养基为 MS。

从表 3 中的数据可知, 子叶节的不定芽诱导率要明显高于子叶, 因此可选择子叶节作为遗传转化的受体材料; 另外, 5 号培养基为较为理想的不定芽诱导培养基。

2.2 再生植株生根

待再生植株长到接近瓶口且较为粗壮时进行生根培养。生根培养基中不同浓度 MS 和 PGR 对于再生植株生根有一定影响。经过试验发现, 再生植株在 4 号培养基上生根状况明显好于其它培养基。待根系粗壮后便可进行驯化、移栽。

2.3 Km 浓度确定

从试验结果可以看出, 当 Km 浓度为 40 mg \cdot L $^{-1}$ 时, 外植体的分化率为 0。但是 Km 浓度过高对外植体的分化也会造成一定的伤害, 因此, 最终确定 Km 的筛选浓度为 30 mg \cdot L $^{-1}$ 。

表 4 Km 浓度确定

Km 浓度/mg \cdot L $^{-1}$	接种外植体数	分化外植体数	分化率/%
0	60	46	76
10	60	30	50
20	60	19	32
30	60	3	5
40	60	0	0

注: 培养基为 5 号诱导培养基

3 讨论

3.1 外植体类型及基因型

外植体类型的选择对于后续试验至关重要^[9]。一般我们可选择子叶、子叶节和叶盘作为遗传转化的受体材料^[7-8]。但对于叶形较小的双子叶作物来说选择子叶和子叶节作为外植体优势较强^[9-10]。基因型对于黄瓜再生体系的建立影响较大; 华南型和华北型差异较大, 欧洲温室型与腌渍型差异也较为明显, 所以在进行遗传转化前要重新建立再生体系。

3.2 不定芽诱导培养基中 PGRs 的选择

在确定不定芽诱导培养基时, 外源添加剂的种类和浓度都至关重要^[11]。其中, 促进不定芽伸长的 PGR 和促进细胞分裂的 PGR 的比值需要一定的范围。当比值接近 1 时, 促进生长类的 PGR 和促进细胞分裂的 PGR 具有相互拮抗的作用, 在配制不同比例时应考虑到这一点^[12]。另外, 当促进不定芽伸长的 PGR 的浓度过高时, 会有大量愈伤组织形成。虽然, 愈伤组织会诱导不定芽的分化, 但在后期的侵染过程中会造成污染, 因此, 应考虑由子叶节直接分化不定芽途径。

3.3 生根培养和移栽

比起诱导不定芽产生来说, 生根培养较为容易。基本培养基应选择 1/2MS, 蔗糖浓度也应相对减半。这样培养出来的根系发达、粗壮。移栽时要洗净根部培养基, 也可将植株在 1/8MS 液体培养基中浸泡 1 d 后再移栽到土壤中。

CBF 转录因子及其在植物抗寒性中的作用

卢艳敏, 苏长青, 刘海鹏

(衡水学院生命科学系, 河北衡水 053000)

摘要: CBF 转录因子在抗寒性方面起重要作用, 低温可诱导 CBF 转录因子的表达。CBF 转录因子能够特异结合启动子中的 CRT/ DRE 元件, 激活 COR 等基因的表达, 从而增强植株抗寒能力。目前已有许多成功将 CBF 基因导入植株的报道, 为植物抗寒育种提供了一条新途径。

关键词: CBF 转录因子; CRT/ DRE 元件; 抗寒性

中图分类号: S94 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)05-0007-03

Role of the Transcription Factor CBF in Plant Cold Resistance

LU Yan-min, SU Chang-qing, LIU Hai-peng

(Life Science Department of Hengshui University, Hengshui, Hebei 053000)

Abstract: CBF transcription factor played an important role in the process of cold resistance. Low temperature could induce the expression of CBF transcription factor, which specifically bound to the promoters containing CRT/ DRE cis-acting elements, and then activated the expression of COR gene. As a result the resistance to cold was enhanced. At present, there were so many reports on the success introduction of CBF gene into plants, and it would provide a new method to the stress resistance breeding of plant.

Key words: CBF transcription factor; CRT/ DRE element; cold resistance

CBF (CRT/DRE Binding Factor) 转录因子是一类受低温诱导的, 最初在拟南芥中发现的反式作用因子, 它可以与 CRT/DRE 顺式作用元件特异性结合, 激活启动子中具有这一调控元件的冷诱导和脱水诱导基因的表达, 从而提高植物的抗逆性。CBF 转录因子的发现为植物的抗寒性研究提供了新的思路。近年来通过

导入 CBF 基因来改良作物的抗寒性, 已经在油菜、烟草、番茄和小麦等作物上获得了成功。

1 CBF 转录因子的发现

1997 年 Stockinger 在研究拟南芥低温驯化期间如何调节 COR 基因表达的分子机理时, 利用酵母单杂交的方法, 从拟南芥 cDNA 文库中克隆出一段 cDNA 序列, 其编码一种转录因子, 编码产物能识别 COR 基因启动子区的 CRT/DRE 元件并与其结合, 命名为 CBF1 (CRT/DRE binding factor 1)^[1]。1998 年 Gilmour 等又从冷处理后的拟南芥 cDNA 文库中鉴定出 CBF2 和

收稿日期: 2009-01-20

基金项目: 衡水学院 2006 年院级课题(2006017)

第一作者简介: 卢艳敏(1977-), 女, 硕士, 讲师, 从事分子生物学研究。E-mail: luyanmin_2001@sina.com.

参考文献:

- [1] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 228-229.
- [2] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, et al. Two transcription factors DREB1 and DREB2 with an EREBP/AP2 DNA-binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low-temperature-responsive gene expression in Arabidopsis[J]. Plant Cell, 1998, 10: 1391-1406.
- [3] 刘强, 赵南明, Yamaguchi-Shinozaki K, 等. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用[J]. 科学通报, 2000, 45(1): 11-15.
- [4] 黄荣峰, 杨宇红, 王学臣. 植物对低温胁迫响应的分子机理[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(1): 92-96.
- [5] 张正斌, 山仑. 转抗旱基因作物的研究进展[J]. 世界科技研究与发展, 1999, 21(2): 31-33.
- [6] 朱其杰, 许勇, 宋腾飞. 黄瓜的组织培养与植株再生[J]. 北京农业大学学报, 1990, 16(2): 142.
- [7] 朝军良, 马蓉丽, 李吕华. 黄瓜子叶组织培养再生植株[J]. 山西农业科学, 1996, 24(10): 39-41.
- [8] 赵秀娟, 吴定华. 黄瓜的组织培养[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(4): 125-126.
- [9] 周菊花, 马月珍, 罗紫娟, 等. 离体黄瓜子叶直接开花的研究[J]. 科学通报, 1992, 20: 1905-1908.
- [10] 李晓丹, 司龙亭, 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.
- [11] 佟新萍. 黄瓜子叶下胚轴愈伤组织诱导及植株再生试验[J]. 石河子科技, 1996(4): 11-12.
- [12] 侯爱菊, 朱延明, 杨爱馥. 高频率诱导黄瓜直接器官发生主要影响因素的研究[J]. 园艺学报, 2003, 30(1): 101-103.