

乙酰丁香酮及共培养 pH 对黄瓜遗传转化效率的影响

宁宇¹, 李蕾¹, 苗永美^{1,2}, 李季¹, 陈劲枫¹

(1. 作物遗传与种质创新国家重点实验室·南京农业大学园艺学院 南京 210095;

2. 安徽科技学院生命科学学院 安徽凤阳 233100)

摘要: 以黄瓜品种长春密刺子叶节为外植体,研究了乙酰丁香酮(AS)的添加方式、浓度及共培养 pH 对黄瓜遗传转化的影响。结果表明:在侵染菌液和共培养基中加入 AS 均可显著提高黄瓜抗性芽诱导率,浓度以 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为最佳。共培养基的 pH 对黄瓜抗性芽诱导率也有影响,其中在 pH 5.2 的共培养基上黄瓜转化率最高。研究结果优化了黄瓜遗传转化体系,提高了黄瓜转化效率,为推动黄瓜转基因工作奠定了坚实的基础。

关键词: 黄瓜; 遗传转化; 乙酰丁香酮; pH

Influence of Acetosyringone Concentration and pH of Co-culture Medium on Efficiency of Cucumber Genetic Transformation

NING Yu¹, LI Lei¹, MIAO Yong-mei^{1,2}, LI Ji¹, CHEN Jin-feng¹

(1. State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095 China; 2. College of Life Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang, Anhui 233100 China)

Abstract: Cucumber genetic transformation affected by acetosyringone (AS) concentration applied, adding mode and co-culture pH was studied with cotyledonary node of cucumber "Changchun mici". The results indicated that both AS added in infection bacteria liquid and co-culture medium could significantly improve the rate of resistance bud induction. The optimum AS concentration was 100 $\mu\text{mol/L}$. Cucumber resistance bud induction rate was also affected by different pH of co-culture medium and the optimum pH for cucumber genetic transformation was 5.2. These research results were helpful to optimize system of cucumber genetic transformation and transgenic research of cucumber.

Key words: Cucumber; Genetic transformation; Acetosyringone; pH

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 是一种重要的经济作物,在全世界范围内有较大的种植面积。黄瓜遗传基础狭窄,种质资源较少,很多重要的遗传性状无法通过有性杂交的手段来改良。因此,基因工程技术就成为对常规育种的有效补充手段。农杆菌介导的子叶节法是黄瓜转基因中最为常用的方法^[1],目前已通过这种方法将 *iaaM*^[2]、*BnCS*^[3] 及 *opd*^[4] 等基因转入到黄瓜当中。但目前这种方法应用的最大瓶颈是黄瓜的再生困难、转化效率低,因此如何提高黄瓜的转化率,建立稳定、高效的转化体系是黄瓜遗传转化过程中急需解决的问题。

乙酰丁香酮(AS)是宿主细胞分泌出的一种酚类化合物,它可以通过增强农杆菌的侵染效果来提高基因的转化效率。目前在水稻^[5]、辣椒^[6]及杨树^[7]等

多种作物的基因转化过程中都会添加一定浓度的 AS 来提高转化效率。AS 的作用效果受多种因素的影响,如植物种类、AS 的添加方式和浓度、菌株和载体类型、共培养 pH 及对 AS 产生协同作用的物质等^[8]。其中 AS 的添加方式和浓度及共培养 pH 是较为重要的 3 个因素,探讨这三者对黄瓜转化率的影响对于优化黄瓜遗传转化体系具有十分重要的意义,而目前这方面的研究还未见报道。

本文以黄瓜品种长春密刺为试材,就 AS 的添加方式、浓度及共培养 pH 对黄瓜遗传转化效率的影响进行了探讨,以明确 AS 在黄瓜遗传转化过程中的使用条件和方法及最佳共培养 pH,建立稳定、高效的黄瓜遗传转化体系,为提高黄瓜转化效率、推动黄瓜转基因工作的前进奠定坚实的基础。

收稿日期: 2013-06-27; 修回日期: 2013-07-30

作者简介: 宁宇,男,在读硕士研究生,研究方向为蔬菜遗传育种与生物技术。电子信箱: ningyu7044558@163.com

通讯作者: 陈劲枫,男,教授,博导,研究方向为蔬菜遗传育种与生物技术。电话: 025-84396279; 电子信箱: jfchen@njau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 南京农业大学葫芦科作物遗传与种质创新实验室保存的华北型黄瓜长春密刺的高代自交系。

1.1.2 菌株和质粒 所用农杆菌菌株为 EHA105 (Rif^R, Kan^R), 由本实验室保存和提供。植物表达载体 pCAMBIA1304-*CsCBF3* 由本实验室构建, 载体上携带标记基因 HYG (潮霉素)、目的基因 *CsCBF3*^[9]、*GUS* 基因、*GFP* 基因, *CaMV35S* 启动子及 *NOS* 终止子, 图谱如图 1 所示。

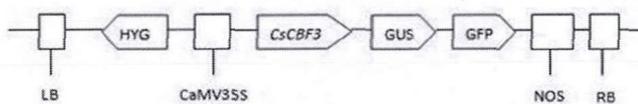


图 1 植物表达载体 pCAMBIA1304-*CsCBF3* 的 T-DNA 区图谱

1.2 方法

1.2.1 农杆菌-子叶节法转化黄瓜 试验于 2012 年 3 月在南京农业大学进行。选取饱满的长春密刺种子, 在 0.1% 的升汞溶液中消毒灭菌 8 min, 无菌水冲洗 4~6 次后用滤纸吸干表面水分, 然后接种在 MS 培养基上。(25±2)°C 条件下暗培养 2 d 后转至光下继续培养, 4~5 d 后切取子叶节, 接种在预培养基上黑暗中预培养 2 d。

挑取携带表达载体 pCAMBIA1304-*CsCBF3* 的农杆菌 EHA105 单菌落, 接种于 YEB+50 mg·L⁻¹ Kan+50 mg·L⁻¹ Rif 液体培养基中, 28 °C 条件下震荡培养 16 h。离心后弃去上清液, 加入 MS0 液体培养基重悬至 OD₆₀₀ 为 0.6 作为侵染液。将经过预培养的黄瓜子叶节置于 MS0 农杆菌菌液中侵染 10 min, 吸干菌液后接种在共培养基上, 暗培养 3 d 后转接至选择培养基上, 每 2 周继代培养 1 次。

1.2.2 乙酰丁香酮处理 1) 侵染菌液中加入乙酰丁香酮: 在 MS0 农杆菌菌液中加入乙酰丁香酮, 使终浓度分别为 0、50、100、150、200 μmol·L⁻¹, 低速震荡培养 1 h 以活化农杆菌, 然后将其作为侵染液用于侵染, 每处理 3 次重复。2) 共培养基中加入乙酰丁香酮: 试验采取两因素正交设计, 将共培养基 pH 分别设为 4.9、5.2、5.5、5.8, 在每个 pH 水平上分别添加乙酰丁香酮至终浓度分别为 0、50、100、150、200 μmol·L⁻¹, 以未添加 AS 的 MS0 农杆菌菌液为侵染液, 每处理 3 次重复。

1.2.3 数据统计及分析 抗性芽在选择培养基上进

行继代培养, 继代 2~3 次 (选择培养 30 d) 后统计长芽外植体数与总外植体数。将抗性芽诱导率 (用产生抗性芽的外植体数与总外植体数的比值的百分率表示) 作为评价黄瓜转化率的指标。利用 SPSS 20.0 软件对数据进行均值、标准差计算及显著性方差分析。

2 结果与分析

2.1 侵染菌液中添加 AS 对黄瓜转化效率的影响

将预培养 2 d 的黄瓜子叶节浸至于添加了不同浓度乙酰丁香酮的菌液当中侵染, 侵染后先在共培养基上暗培养 3 d, 然后接种在选择培养基上筛选, 30 d 后统计抗性芽诱导率。结果表明 (表 1), 与对照相比, 侵染菌液中添加 AS 可显著的提高黄瓜抗性芽诱导率。随着其浓度的增加, 抗性芽诱导率也随之升高, 浓度为 100 μmol·L⁻¹ 时达到最高。若 AS 浓度继续增加, 诱导率反而下降。说明在侵染菌液中加入 AS 可有效提高黄瓜的转化率, 但浓度不宜过高, 以 100 μmol·L⁻¹ 为最佳。

表 1 菌液中添加乙酰丁香酮对抗性芽诱导率的影响

乙酰丁香酮浓度 / (μmol·L ⁻¹)	接种外植体数量	长芽外植体数量	抗性芽诱导率/%
0	24	1	4.17 cB
50	24	4	16.67 bcAB
100	24	7	29.17 aA
150	24	5	20.83 abAB
200	24	3	12.50 bcAB

[注] 大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$), 小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

2.2 共培养基中不同 AS 浓度与 pH 组合对黄瓜转化效率的影响

将预培养 2 d 的黄瓜子叶节浸至于未添加乙酰丁香酮的菌液中侵染, 侵染后接种在不同浓度 AS 和 pH 组合的培养基上共培养 3 d, 然后转至选择培养基上进行筛选培养, 30 d 后统计总外植体数和长芽外植体数, 计算抗性芽诱导率 (表 2)。结果表明, 不同浓度的 AS 和不同共培养基 pH 的配合使用对黄瓜抗性芽诱导率有显著影响。在不同的组合当中, 在不添加 AS 的 pH 为 4.9 或 5.8 的共培养基上获得的抗性芽诱导率最低, 均为 13.33%。而在 pH 为 5.2 的共培养基上添加 100 μmol·L⁻¹ 的 AS 时获得的黄瓜抗性芽诱导率最高, 达到 44%, 因此, 该组合可作作为黄瓜转化过程中最适的共培养条件。

2.3 共培养基中 AS 浓度对黄瓜转化效率的影响

从表 3 可以看出, 乙酰丁香酮浓度单因素的 F 值达到了极显著的水平, 说明共培养阶段 AS 浓度

表 2 共培养基中不同乙酰丁香酮浓度与 pH 组合对抗性芽诱导率的影响

pH	乙酰丁香酮浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)				
	0	50	100	150	200
4.9	13.33±1.15	33.33±1.15	35.29±0.22	28.57±1.92	22.22±0.96
5.2	20.63±0.88	30.00±1.00	44.00±1.15	37.03±0.67	23.30±0.57
5.5	23.33±0.57	28.00±1.00	40.00±0.70	30.00±1.00	28.33±1.04
5.8	13.33±0.57	23.33±0.57	30.40±1.37	26.67±0.57	20.69±1.00

表 3 共培养基中乙酰丁香酮浓度和 pH 对黄瓜抗性芽诱导率影响的方差分析

变异来源	自由度 df	平方和 SS	均方 MS	F 值	Sig
乙酰丁香酮浓度	4	2 741.40	685.35	6.836**	0.003
pH	3	796.83	265.61	2.649	0.058
误差	52	5 213.34	100.26		

对黄瓜抗性芽诱导率有极大的影响,因此本研究将其作为主效应因子就其对黄瓜转化率的影响规律进行了分析。结果表明(表 4),与不添加 AS 的对照相比,共培养基中添加 AS 可显著提高黄瓜抗性芽诱导率。在本研究所设的 AS 浓度范围内,随着浓度的增加,黄瓜抗性芽诱导率也不断升高,并且在浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大,为 38.05%。但随着 AS 浓度继续升高,诱导率反而降低,原因可能是 AS 配制时一般使用二甲基亚砷(DMSO)溶解,而二甲基亚砷有剧毒,浓度过高抑制了农杆菌的生长。

表 4 共培养基中乙酰丁香酮浓度对抗性芽诱导的影响

乙酰丁香酮浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	接种外植体数量	长芽外植体数量	抗性芽诱导率/%
0	110	19	17.66 cB
50	110	32	29.17 bAB
100	112	42	38.05 aA
150	110	33	29.12 bAB
200	118	27	23.66 bcB

2.4 共培养 pH 对黄瓜转化效率的影响

共培养 pH 的高低也会影响农杆菌的侵染效果,为探索黄瓜转化过程中最适的共培养 pH,将其作为主效应因子对其进行分析。统计结果显示(表 5),不同共培养 pH 条件得到的黄瓜抗性芽诱导率不同。当 pH 为 5.8 时,黄瓜抗性芽诱导率最低,仅为 22.59%。而 pH 为 5.2 时黄瓜抗性芽诱导率最高,为 31.65%,但与共培养 pH 为 5.5 时的诱导率差异并不显著。

表 5 共培养基 pH 对抗性芽诱导的影响

pH	接种外植体数量	长芽外植体数量	抗性芽诱导率/%
4.9	158	42	25.59 abA
5.2	137	42	31.65 aA
5.5	133	39	30.33 aA
5.8	132	30	22.59 bA

不显著。因此可得出结论,pH 为 5.2~5.5 的共培养基较适宜黄瓜转化。

3 讨论

乙酰丁香酮是一种酚类化合物,其主要作用机理是通过诱导农杆菌 Vir 区基因的活化和表达,将 T-DNA 区从 T 两侧 25 bp 边缘序列中切割下来,促进了 DNA 的转移,使农杆菌 T-DNA 更易进入植物基因组并与其整合^[10]。根据乙酰丁香酮的作用机理在使用过程中一般分为菌液中添加、共培养基中添加以及在菌液和共培养基中共同添加 3 种方法,如在蓝猪耳遗传转化时在根癌农杆菌菌液中加入 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮,可使转化芽诱导率从 5.76% 提高到 12.1%^[11];在研究杉木转基因时,在共培养基中加入 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮,Kan 抗性芽的产生频率比对照有了明显提高^[12]。当然,还有一些其他有效利用乙酰丁香酮的方法,如在甘薯外植体伤口处滴加乙酰丁香酮也可显著提高抗性芽获得率^[13]。本研究分别在侵染菌液和共培养基中添加了一定浓度的乙酰丁香酮,结果表明,与对照相比,这 2 种方法均可显著提高黄瓜抗性芽的诱导率。

在遗传转化过程中,不同物种的最适乙酰丁香酮浓度也不尽相同。在黄柏遗传转化时加入 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮转化率最高^[14],向日葵遗传转化共培养基中加入 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮最有利于提高转化率^[15],而丹参遗传转化共培养基中乙酰丁香酮的最适浓度为 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[16]。本文对黄瓜最适的乙酰丁香酮浓度进行了探索,发现加入 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙酰丁香酮可大幅提高黄瓜抗性芽的诱导率。

pH 值的高低对乙酰丁香酮的诱导效果也有着明显的影响,从理论上讲,含乙酰丁香酮的培养基 pH 为 5.0~5.5 时,乙酰丁香酮的诱导效果较好。前人研究表明^[17],乙酰丁香酮在 pH 值 5.2 的条件下转化效果最好。本文研究了 pH 值对黄瓜遗传转化的影响,试验结果表明共培养 pH 5.2 时黄瓜的抗性芽诱导率最高,但其对于黄瓜抗性芽诱导率影响并不显著。

本文对黄瓜遗传转化过程中乙酰丁香酮的使用进行了较为系统的研究,进一步优化了黄瓜的遗传转化体系,为推动黄瓜转基因工作的前进奠定了坚实的基础。

参考文献

[1] 侯爱菊,朱延明,杨爱霞,等. 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.
- [2] 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.
- [3] 刘文萍, 卢淑雯, 刘建新, 等. 农杆菌介导的 BnCS 基因对黄瓜遗传转化研究[J]. 北方园艺, 2009(1): 20-22.
- [4] 赵杰宏, 韩洁, 赵德刚. 转基因表达有机磷水解酶(OPH)提高黄瓜降解蝇毒磷能力的初步研究[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(1): 182-186.
- [5] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of T-DNA[J]. The Plant Journal, 1994, 6(2): 271-282.
- [6] Kim S, Kim S R, An C S, et al. Constitutive expression of rice MADS box gene using seed explants in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Molecules and Cells, 2001, 12(2): 221-226.
- [7] 石超, 何秀霞, 李彦航. 三倍体毛白杨茎段遗传转化系统的建立[J]. 内蒙古民族大学学报, 2003, 18(3): 232-234.
- [8] 邓艺, 曾炳山, 赵思东, 等. 乙酰丁香酮在农杆菌介导的遗传转化中的作用机制及应用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(5): 2229-2232.
- [9] 宁宇, 苗永美, 李季, 等. 黄瓜转录因子 CsCBF3 的克隆及表达分析[J]. 中国蔬菜, 2013(6): 30-36.
- [10] Stachel S E, Nerster E W, Zambryski P C. A plant cell factor induce *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83: 379-383.
- [11] 陈丙春, 齐一伯, 唐宇, 等. 根癌农杆菌介导的蓝猪耳遗传转化[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(3): 299-303.
- [12] 席梦利. 杉木转基因受体系统的建立及遗传转化研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2004.
- [13] 杨秀荣, 陈永文, 方平, 等. 乙酰丁香酮对根癌农杆菌介导的甘薯遗传转化的影响[J]. 西南师范大学学报, 2002, 27(5): 751-754.
- [14] 王跃华. 川黄柏高效遗传转化系统建立和植株再生研究[J]. 中药材, 2006, 29(7): 641-644.
- [15] 郝彦玲, 朱本忠, 朱鸿亮, 等. 根癌农杆菌介导的向日葵遗传转化体系的建立[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(6): 713-717.
- [16] 周伟, 姚倩雯, 钱忠英, 等. 丹参毛状根诱导条件的优化[J]. 上海师范大学学报, 2007, 36(2): 93-98.
- [17] Holford P, Hernandez N, Newbury H J. Factors influencing the efficiency of T-DNA transfer during co-cultivation of *Antirrhinum majus* with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Reports, 1992, 11(4): 196-199.

欢迎订阅 2014 年《中国瓜菜》

《中国瓜菜》是由农业部主管、中国农业科学院郑州果树研究所主办的全国性瓜菜一体的科技期刊。2014 年《中国瓜菜》将继续全面、系统地反映我国在瓜类及蔬菜领域的最新研究成果, 报道新选育的优良品种, 刊登瓜菜产业科技动态、实用技术和信息, 以及各大瓜菜种子彩版广告。设有试验研究、品种选育、研究简报、专题综述、栽培与植保、产业发展、典型报道等栏目。适合瓜菜科技人员、农业院校师生、瓜菜种植者、种子及产品经销商等瓜菜从业者参阅。双月刊, 单月 5 日出版, 每期 80 页码, 定价 5 元, 全年 6 期共 30 元。邮发代号: 36-143; 国外代号: BM2654。也可汇款至本刊发行部订阅。地址: 郑州市航海东路南·中国农业科学院郑州果树研究所; 邮编: 450009; 电子信箱: zggc@163.com; 电话: 0371-65330927(编辑部), 65330926(广告部), 65330982(发行部), 65330949(传真)

《中国瓜菜》2014 年有奖订阅活动:

1. 寄回邮局订单复印件(可传真、邮寄, 截止时间为 2013 年 12 月 31 日, 以当地邮戳为准) 者可获得编辑部赠送礼包 1 份, 限前 100 名。如订户有机会凭订单到杂志社将有更多惊喜!
2. 欢迎打包从编辑部直接订阅《中国瓜菜》, 10 份以上免邮费, 有更多礼品等您拿哟!

欢迎订阅 2014 年《果树学报》

《果树学报》是中国农业科学院郑州果树研究所主办的国家级学术期刊, 中国农林水产类权威学术期刊, 中文园艺学核心期刊, 中国科技核心期刊, 已被美国化学文摘、俄罗斯文摘杂志、英国 CABI 等 20 余种国内外重要数据库收录。据中国知网发布的统计数据, 《果树学报》的复合影响因子为 1.234, 综合影响因子 0.893, 已成为国内外有影响的学术期刊之一。《果树学报》着重选发密切结合我国果树科研、教学、生产实际, 反映学科学术水平和发展动向的优秀稿件, 及时报道重大科研成果、阶段性成果和科研进展情况。栏目设置有种质资源·遗传育种·分子生物学·栽培·生理·生态·植物保护·果品质量与安全·贮藏·加工·专论与综述·技术与方法·新品种选育报告等。读者对象为果树学科的科研人员、高等农业院校师生及基层果树管理技术人员。

本刊为双月刊, 2014 年每期 160 页码, 定价 20 元, 全年 6 期共 120 元。邮发代号: 36-93, 国际代号 BM/1107。欢迎投稿, 欢迎订阅。

编辑部地址: 中国农业科学院郑州果树研究所 邮编: 450009

电 话: 0371-63387308 传 真: 0371-63387308 E-mail: chinagsxb@163.com