

## 研究简报

# *Mn-SOD*基因导入黄瓜的遗传转化体系

范爱丽<sup>1,2</sup> 孙艳<sup>1\*</sup> 管清美<sup>1</sup> 梁东<sup>1</sup><sup>1</sup>西北农林科技大学园艺学院, 杨凌 712100; <sup>2</sup>广西农业科学院蔬菜研究所, 南宁 530007关键词 黄瓜; *Mn-SOD*基因; 遗传转化

黄瓜是我国栽培面积最大的喜温蔬菜之一。在生产上, 高温干旱等环境胁迫因子严重危害黄瓜的产量和品质, 甚至导致绝收。任安芝等<sup>[1]</sup>综述了SOD与水分、盐分、低温和大气污染等逆境胁迫之间的关系, 认为: 各种逆境胁迫引起的活性氧代谢平衡失调、生物膜结构破坏是导致植物遭受逆境伤害的机理之一。通过基因工程提高植物体内抗氧化酶活性及增加抗氧化代谢的水平是增强植物抗逆性的有效途径之一。关于SOD基因已在烟草<sup>[2-3]</sup>、小麦<sup>[4]</sup>、玉米<sup>[5]</sup>、苜蓿<sup>[6-8]</sup>、马铃薯<sup>[9-10]</sup>、百合<sup>[11]</sup>和仙客来<sup>[12]</sup>等植物中进行了遗传转化并开展了抗逆的相关研究。Lee等<sup>[13]</sup>利用黄瓜作为生物反应器生产SOD化妆品, 得到3株转基因黄瓜株系, 且SOD的活性比非转基因植株提高了3倍, 未报道SOD与黄瓜逆境的相关性。然而, 目前黄瓜的遗传转化体系并不完善, 转化效率较低, 转基因性状遗传稳定性差<sup>[14-15]</sup>。因此, 本研究在优化黄瓜再生体系的基础上<sup>[16]</sup>, 利用根癌农杆菌将*Mn-SOD*基因导入黄瓜, 研究卡那霉素等因素对黄瓜遗传转化的影响, 建立了高频稳定的转基因体系, 将为黄瓜种质资源创新和加速抗逆育种奠定基础。

植物材料: 两片子叶将要脱离种壳且子叶露出部分为绿色的农城3号黄瓜无菌幼苗; 农杆菌菌株: EHA-105; 质粒(pDU96.2144): 由美国康奈尔大学L. Fuchigami教授惠赠, 质粒T-DNA区含CaMV35S启动子所驱动的*npt II*基因、*GUS*基因和*Mn-SOD*基因。

无菌苗获得培养基: MS基本培养基中添加蔗糖30 g/L; 琼脂7 g/L, pH5.8; 预培养基: MS+0.005 mg/L TDZ+0.05 mg/L IBA; 共培养基: MS+0.005 mg/L TDZ+0.05 mg/L IBA+100 mg/L Kan (卡那霉素); 芽筛选培养基: MS+0.005 mg/L TDZ+0.05 mg/L IBA+100 mg/L Kan+500 mg/L Cef(头孢霉素); LB液体培养基: 10 g/L Tryptone, 5 g/L Yeast extract, 10 g/L NaCl, pH7.0 (固体培养基加5%的琼脂); 农杆菌液体培养基:

LB+50 mg/L Str (链霉素)+50 mg/L Kan, pH7.2 (固体培养基加12.0 g/L的琼脂)。

外植体子叶节的获得: 无菌条件下, 对两片子叶将要脱离种壳且子叶露出部分为绿色的黄瓜幼苗, 纵切下胚轴, 去除顶芽, 保留1/3单片子叶。

农杆菌菌液的制备: 从-80 °C超低温冰箱中取出携带质粒 pDU96.2144的EHA-105菌液, 在冰上缓慢融化, 在无菌超净工作台用接种环沾取少量菌液, 在添加Kan 50 mg/L, Str 50 mg/L抗生素的LB固体培养基上划线, 在28 °C倒置培养36~48 h有菌斑出现后, 从LB平板上挑取单菌落, 接种到含Kan 50 mg/L, Str 50 mg/L的LB液体培养基中(pH7.2), 于28 °C、200 r/min振荡培养过夜; 取对数生长期菌液, 4 °C、5 000 r/min离心5 min, 弃上清液, 取沉淀重新悬浮于10倍MS液体培养基中(pH5.3), 振荡后稀释不同浓度作为浸染液。

## 黄瓜遗传转化的影响因素

Kan选择压的确定: 将无菌子叶节和幼苗分别接种于含不同Kan浓度(0 mg/L、50 mg/L、70 mg/L、90 mg/L和110 mg/L)的培养基中, 观察外植体对Kan的敏感性。每隔2周换一次培养基, 观察统计分化芽数和幼苗生根状况。

Cef浓度对抑菌和芽分化的影响: 将无菌子叶节经农杆菌菌液浸染5 min后接种于含不同Cef浓度(0 mg/L、300 mg/L、400 mg/L、500 mg/L和600 mg/L)的培养基中。每隔2周换一次培养基, 观察抑菌情况和芽分化情况, 筛选最适抑菌Cef浓度。

预培养时间: 无菌子叶节分别进行0 d、1 d、3 d、5 d和7 d的预培养后放入农杆菌菌液中侵染5 min后, 竖直插入共培养基上2 d后, 再转接到芽诱导培养基

收稿日期: 2010-11-09 接受日期: 2011-05-03

国家自然科学基金(No.40971179)资助项目

\*通讯作者。E-mail: sunyanma64@sina.com

上分化。每隔2周换一次培养基, 据抗性芽数以确定预培养时间对遗传转化的影响。

**农杆菌浓度:** 制备好的菌液用MS液稀释至 $D_{600}$ 值为0、0.1、0.3、0.4、0.5和0.6 ( $D_{600}$ 约为 $8 \times 10^8$  cell/mL), 将子叶节置于菌液中浸染5 min, 不时振荡使菌液与外植体充分接触, 然后取出用无菌滤纸吸干表面的菌液, 竖直插入共培养基上2 d后, 再转接到芽诱导培养基上分化, 每隔2周换一次培养基, 统计抗性芽数探讨农杆菌浓度对遗传转化的影响。

**侵染时间:** 无菌条件下将子叶节放到农杆菌菌液中, 侵染时间分别为1 min、5 min、10 min、15 min、20 min、25 min和30 min, 其间不停摇动。将侵染后的外植体取出, 用无菌滤纸吸干表面的菌液, 竖直插入共培养基上2 d后, 再转接到芽诱导培养基上分化, 每隔2周换一次培养基, 据抗性芽数探讨侵染时间对遗传转化的影响。

**共培养时间:** 无菌条件下将子叶节投入农杆菌菌液中侵染5 min后, 用无菌滤纸吸干表面的菌液, 竖直插入光下共培养分别为0 d、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d和7 d, 然后再转接到芽诱导培养基上分化, 每隔2周换一次培养基, 根据抗性芽数探讨共培养时间对遗传转化的影响。

**乙酰丁香酮(AS):** 无菌条件下将子叶节放进含添加AS(0 mg/100mL、6 mg/100mL、10 mg/100mL、12 mg/100mL 和15 mg/100mL)的共浸染菌液5 min后, 用无菌滤纸吸干表面的菌液, 竖直插入共培养基上2 d后, 转接到芽诱导培养基中, 统计抗性芽数得出AS对遗传转化的影响。

**GUS染色:** 采用组织化学染色法, 参照植物基因工程与技术的方法<sup>[17]</sup>。

**PCR检测:** 黄瓜基因组DNA提取采用CTAB

法<sup>[17]</sup>。农杆菌质粒DNA的提取和纯度检测<sup>[17]</sup>。PCR反应体系: 以农杆菌质粒DNA为阳性对照(CK+), 未转化植株为阴性对照(CK-); PCR反应体积25  $\mu$ L, 其中包括引物1: 5'-GAC CCG AAA GAA CCT ACC CTC AGC-3', 引物2: 5'-TTG GCA TAC ACT TCA CTT GCA TAC TTC C-3'(引物根据NCBI中已登录的*Mn-SOD*基因序列设计, 引物均由上海生工生物工程有限公司合成)各1.0  $\mu$ L、dNTP 3.0  $\mu$ L、10倍Taq DNA聚合酶(购自大连宝生物工程有限公司)1U 0.3  $\mu$ L、缓冲液2.5  $\mu$ L、 $Mg^{2+}$  2.4  $\mu$ L、DNA模板1.0  $\mu$ L、 $ddH_2O$  13.8  $\mu$ L, 扩增产物约为658 bp。PCR扩增程序为: 94  $^{\circ}C$ 下预变性5 min, 94  $^{\circ}C$ 变性1 min, 50  $^{\circ}C$ 退火1 min, 72  $^{\circ}C$ 延伸1.5 min, 34个循环, 72  $^{\circ}C$ 延伸10 min。扩增反应完成后, 取样品反应液各10  $\mu$ L, 用1.0%琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外灯下观察结果并照相。

### Kan对黄瓜子叶节不定芽再生的影响

适宜的不定芽选择压是转基因成功的因素之一。从表1可以看出, 当筛选压浓度为90 mg/L时, 黄瓜子叶节绿芽分化率为10%, 当筛选压浓度大于110 mg/L时, 外植体无芽分化, 并且在缓慢的膨大中逐渐黄化死亡。总之, Kan浓度越大, 不定芽的生长状况越差, 芽分化所需时间越长。因此, 拟定再生芽分化Kan临界浓度点在90~110 mg/L之间。

在90~110 mg/L之间, 对Kan的浓度进行二次选择, 从表2可以看出, Kan的浓度为100 mg/L时有不定芽的分化, 而浓度为105 mg/L无不定芽分化。故选择100 mg/L为Kan对子叶节不定芽诱导的临界点。

### 抑制生根的Kan浓度

从表3可看出, Kan可明显抑制根系的生成和生

表1 Kan对黄瓜子叶节不定芽再生的影响

Table 1 Effect of Kan concentrations on regeneration of cotyledonary nodes

Kan浓度(mg/L)	外植体数	再生芽率(%)	芽分化及生长状况
Concentrations of Kan (mg/L)	No. of the explants	Regeneration frequency(%)	Regeneration and growth condition of buds
0	90	90.0	Differentiation of adventitious buds formation 7 days later. The buds grow fast and healthily
50	90	43.3	Differentiation of adventitious buds formation 15 days later. The buds grow slowly
70	90	36.7	Differentiation of adventitious buds formation 15 days later. The buds grow very slowly
90	90	10.0	Differentiation of adventitious buds formation 20 days later. The buds grow quite slowly
110	90	0	No adventitious buds formation, cotyledonary nodes gradually turn yellow, stopped growing, thus died finally

长且浓度越大抑制作用越强。当Kan浓度为100 mg/L, 根系生长及植株生长均受到明显抑制。故认定此浓度为Kan抑止植株根系生长的临界浓度。

### Cef抑菌剂浓度对抑菌效果和芽分化的影响

利用农杆菌进行植物遗传转化时, 抑菌素可以有效抑制农杆菌的生长。从表4看到: 在300~600 mg/L浓度范围内, Cef浓度越大, 抑菌效果越显著, 再生芽数在18~25个之间, 而浓度为400 mg/L和500 mg/L均有1个抗性芽。综合抑菌效果、污染率、每块外植体再生芽数和抗性芽数这些结果认为, 保持较好的抑菌效

果和较高芽分化率Cef最佳浓度为500 mg/L。

### 预培养时间对黄瓜子叶节遗传转化的影响

由表5可看出, 预培养7 d再生芽分化较多, 预培养3 d~7 d均有1个抗性芽。预培养时间长再生较多的不定芽数增加了嵌合体数量和抗性芽筛选的难度。比较0 d~7 d预培养的再生芽数和抗性芽数后, 发现采用3 d的预培养时间为最佳。

### 农杆菌浓度对黄瓜子叶节遗传转化的影响

表6显示, 在 $D_{600}$ 值为0.1~0.5时子叶节均能分化

表2 Kan对黄瓜子叶节不定芽再生的影响

Table 2 Effect of Kan concentrations on regeneration of cotyledonary nodes

Kan浓度(mg/L) Concentrations of Kan (mg/L)	外植体数 No. of the explants	再生芽率(%) Regeneration frequency(%)	芽分化及生长状况 Regeneration and growth condition of buds
90	120	13.0	Differentiation of adventitious buds formation 20 days later. The buds grow quite slowly
95	120	10.0	Differentiation of adventitious buds formation 20 days later. The buds grow extremely slowly
100	120	2.5	Differentiation of adventitious buds formation 20 days later. The buds grow extremely slowly
105	120	0	No adventitious buds formation, cotyledonary nodes gradually turn yellow, stopped growing, thus died finally
110	120	0	No adventitious buds formation, cotyledonary nodes gradually turn yellow, stopped growing, thus died finally

表3 抑制生根的Kan浓度

Table 3 Effect of Kan concentrations on transformation of Cucurbit root

Kan浓度(mg/L) Concentrations of Kan (mg/L)	幼苗数 No. of the seedlings	生根率(%) Root frequency(%)	根系生成及生长情况 Sending out and growth conditions of roots
0	120	100	A large number of length and dense root, fibrous roots developed. The plants grow well
25	120	100	A little of short root, more fibrous roots, plant grows slowly
50	120	100	Sporadic short root, fibrous roots, plants turn yellow
75	100	86.7	Many fibrous roots, plants turn yellow, inhibited growth
100	100	50.0	A small amount of fibrous roots, the plant turn yellow, stopped growing, thus died finally
125	100	33.3	Few fibrous roots, plants soon turn yellow, stopped growing, thus died finally

表4 不同Cef浓度对抑菌效果和芽分化的影响

Table 4 Effect of Cef concentrations on transformation of restraint of bacteria and resistant buds of cucumber

Cef 浓度(mg/L) Concentrations of Cef (mg/L)	外植体数 No. of the explants	抑菌效果 Effect on restraint of bacteria	污染率(%) Pollution rate(%)	再生芽数 No. of the buds	抗性芽数 No. of explants producing Kan' buds
0	100	A <sup>-</sup>	100	0	0
300	90	A <sup>-</sup>	86.7	18	0
400	90	A	30	25	1
500	90	A	10	23	1
600	90	A <sup>+</sup>	0	20	0

不定芽, 而 $D_{600}$ 值高于0.7时没有再生芽和抗性芽的生成, 外植体污染, 伤口褐化, 软腐增多。当 $D_{600}$ 值为0.3时农杆菌对外植体毒害程度最小, 同时外植体不污染, 故选最适的 $D_{600}$ 值为0.3。

### 感菌时间对黄瓜子叶节遗传转化的影响

在遗传转化中, 若农杆菌未接触外植体伤口, 基因不能进行转化; 若浸染时间太长, 常因农杆菌毒害而导致外植体污染缺氧而软腐。从表7可以看出, 在无污染情况下, 浸染时间1~5 min都有再生芽和抗性芽生成, 尤以5 min的浸染效果最佳。

### 共培养时间对黄瓜子叶节遗传转化的影响

农杆菌附着在外植体表面后不能立即转化, 它有一段“细胞调节期”, 只有在创伤部位生存16 h之后才能诱发肿瘤。表8可看出, 光下共培养1 d~3 d可获得较多的再生芽和1~2个抗性芽, 但在无污染的情况下共培养时间为2 d再生芽和抗性芽最多。试验中观察到暗培养只是子叶节不断的生长增大和变厚, 不定芽的分化却很少。随着共培养时间的延长, 农杆菌过度生长, 外植体受严重感染, 褐化严重, 再生困难且继代培养中抑菌困难。故共培养的最佳时间为2 d。

表5 预培养时间对黄瓜子叶节遗传转化的影响

Table 5 Effect of time of pre-culture on transformation of Cucumber

预培养时间(天) Time of pre-culture (d)	外植体数 No. of the explants	再生芽数 No. of buds	抗性芽数 No. of explants producing Kan' buds
0	120	5	0
1	120	9	0
2	120	48	0
3	120	35	1
4	120	15	1
5	120	50	1
6	120	55	1
7	120	59	1

表6 农杆菌浓度对黄瓜遗传转化的影响

Table 6 Effect of *Agrobacterium* concentration on transformation of Cucumber

D600值 <i>Agrobacterium</i> concentrations	外植体数 No. of the explants	污染率(%) Pollution rate(%)	再生芽数 No. of buds	抗性芽数 No. of explants producing Kan' buds
0	100	0	38	0
0.1	100	0	32	1
0.3	100	0	24	1
0.5	100	50	27	1
0.7	100	73	0	0
1.0	100	95	0	0

表7 感菌时间对黄瓜遗传转化的影响

Table 7 Effect of time of *Agrobacterium* infection on transformation of Cucumber

感菌时间(分) Time of <i>Agrobacterium</i> infection (min)	外植体数 No. of the explants	污染率(%) Pollution rate(%)	再生芽数 No. of buds	抗性芽数 No. of explants producing Kan' buds
0	120	0	0	0
1	120	0	40	1
5	120	0	58	2
10	90	80	39	1
15	90	87.5	35	0
20	90	95	2	0
25	90	100	0	0
30	90	100	0	0

## 乙酰丁香酮(AS)

小分子的酚类化合物对农杆菌Ti质粒Vir区基因的活化具有重要作用,其中效果最佳的是AS。从表9中可以看出,当AS浓度在0 mg/100 mL~12 mg/100 mL均可获得抗性芽,浓度为15 mg/100 mL时无抗性芽形成。浓度10 mg/100 mL时再生芽数和抗性芽数最多,所以在黄瓜遗传转化中添加AS的最适浓度为10 mg/100 mL。

## GUS检测结果

试验中依次用95%、70%的乙醇对黄瓜叶片进行脱色处理,脱色过程中叶绿素逐渐溶于乙醇,退色

后试验材料呈黄白色。经乙醇退色后的叶片材料在显微镜下观察照相,黄瓜未转化材料无蓝色,说明此黄瓜材料的植物细胞中无GUS本底,而转化材料呈现蓝色。根系可以用肉眼直接观察到蓝色,显微镜下观察照相,见图1。

## PCR检测结果

首先提取农杆菌质粒DNA,优化PCR反应体系,PCR后用0.1%琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下观察得到658 bp特征带。然后以农城3号转基因黄瓜再生叶片DNA为模板,农杆菌质粒DNA为阳性对照(CK+),未转化植株为阴性对照(CK-) PCR扩增结果

表8 共培养时间对黄瓜遗传转化的影响

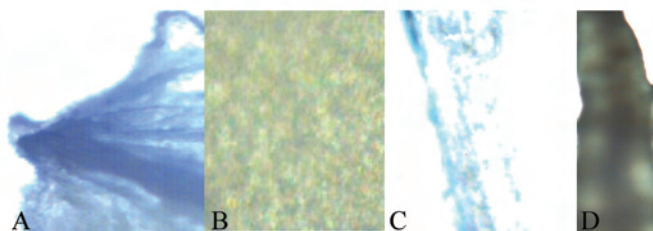
Table 8 Effect of time of co-culture on transformation of Cucumber

共培养时间(天)	外植体数	污染率(%)	再生芽数	抗性芽数
Time of co-culture (d)	No. of the explants	Pollution rate(%)	No. of buds	No. of explants producing Kan' buds
0	120	0	35	0
1	120	0	48	1
2	120	0	50	2
3	100	26.7	27	1
4	100	35	16	0
5	100	80	6	0
6	90	83.3	5	0
7	90	100	0	0

表9 乙酰丁香酮(AS)对黄瓜遗传转化的影响

Table 9 Effects of Concentration of AS on transformation of Cucumber

AS浓度(mg/100 mL)	外植体数	再生芽数	抗性芽数
Concentration of AS (mg/100 mL)	No. of the explants	No. of buds	No. of explants producing Kan' buds
0	120	34	1
6	120	30	1
10	120	51	2
12	120	28	1
15	120	22	0



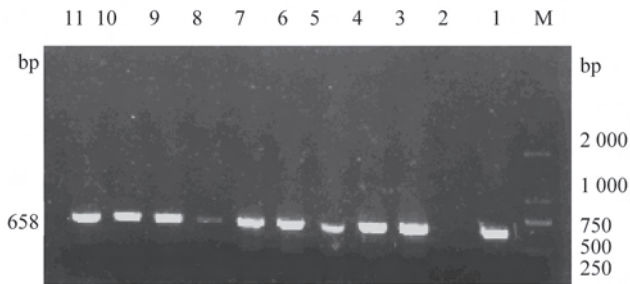
A: 转基因叶片; B: 未转基因叶片; C: 转基因根; D: 未转基因根。

A: transgenic leaf; B: non-transgenic leaf; C: transgenic root; D: non-transgenic root.

图1 GUS检测

Fig.1 GUS testing

显示, 16株转基因株系中有9个转基因株系基因组DNA和阳性对照质粒都扩出一条约658 bp的特异带, 该条带与目标基因引物所界定的DNA片段(658 bp)大小相吻合, 而在非转化对照植株中未出现目标条带, 见图2, 初步判断该目的基因导入到黄瓜基因组中。



M: DNA marker DL2 000; 1: 阳性对照; 2: 非转化植株; 3-11: 转化植株。

M: DNA marker DL2 000; 1: positive control; 2: non-transgenic plant; 3-11: transgenic plant.

图2 *Mn-SOD*基因导入黄瓜的PCR检测结果

Fig.2 PCR analysis of cucumber transgenic plant with *Mn-SOD*

合适的选择压既能有效抑制非转化细胞的生长, 又不影响转化细胞的正常生长, 是转化成功的关键之一。Kan浓度过高对转化体的细胞分化产生较大影响, 导致转化体和非转化体一起死亡, 使真正的转化体丢失。本实验Kan浓度达到100 mg/L时, 观察到外植体无不定芽分化, 对转化外植体的选择也较为安全。前人曾采用Kan 30 mg/L<sup>[18]</sup>、50 mg/L<sup>[19]</sup>和140 mg/L<sup>[20]</sup>, 出现此差异可能与黄瓜的基因型和农杆菌菌株有关。此外在黄瓜遗传转化中, 还有人选用抗除草剂bar<sup>[21-23]</sup>进行植株的筛选。

在基因转化过程中, 抗菌素的选择以能抑制农杆菌的生长和对外植体的毒害作用较小为目的。本实验中Cef浓度为500 mg/L时能达到较好的抑菌效果, 同时抗性芽生长良好。刘文萍等<sup>[19]</sup>也用500 mg/L Cef抑菌。王艳蓉等<sup>[20]</sup>认为Garb明显抑制出芽, 选择400 mg/L Cef抑菌。试验结果的这些差异可能与农杆菌类型及黄瓜基因型有关。

预培养使植物组织代谢活跃, 可促进细胞分裂, 分裂状态的细胞更易整合外源DNA, 因而提高外源基因的瞬时表达和转化<sup>[24]</sup>。本实验采用3 d的预培养, 农杆菌的控制相对比较容易, 没有见到外植体因缺

氧而软腐的现象, 提高了转化效率。王艳蓉等<sup>[20]</sup>研究表明, S06预培养1 d有利于外植体与培养基平整接触, 抗性芽率由未经预培养的11.1%上升到27.3%。

外植体和农杆菌的共培养在整个植物遗传转化过程中是非常重要的环节, 因为农杆菌附着T-DNA的转移及整合都是在此时间内完成的。农杆菌附着后不能立即转化, 它有一段“细胞调节期”, 只有在创伤部位生存16 h之后的菌株才能诱发肿瘤。物种不同, 外植体和农杆菌的最佳共培养时间差异很大。王艳蓉等<sup>[20]</sup>认为侵染时间为20 min时抗性芽率最高, 但是侵染时间为30 min时, 也未出现外植体的软腐现象。陈峥等<sup>[23]</sup>研究得出, 将共浸染时间适当延长至40 min时能提高外植体的再生效率。本实验中侵染时间为5 min, 出现这么大的时间差异可能与选用的黄瓜材料、农杆菌种类和 $D_{600}$ 有关。浸染的农杆菌菌液浓度偏高, 随着共培养时间的增长, 导致细菌对外植体的毒害加剧。实验中子叶节经共培养后, 用无菌水冲洗(不冲洗为对照)子叶节外植体, 结果发现: 在农杆菌菌丝形成初期不冲洗效果比冲洗效果好, 由于无菌水冲洗后, 灭菌的滤纸不能彻底吸干菌液, 残留过多的菌液很容易污染外植体和培养基, 导致转化率降低。

研究证实小分子的酚类化合物对农杆菌Ti质粒Vir区基因的活化具有重要作用。如在农杆菌侵染液加入AS, 一方面使农杆菌对新的pH有所适应, 另一方面使其既处于对数生长期, 又处于Vir基因的高度活化状态, 从而提高侵染能力。共培养过程是T-DNA转移与整合的时期, 文献报道一般农杆菌附着16 h后才能进行转化, 这时Vir基因需高度活化, 故多赞成在农杆菌与外植体共培养的培养基中加入AS。陈峥等<sup>[23]</sup>添加0.5 mg/L~1.0 mg/L AS和魏爱民等<sup>[25]</sup>添加20 mol/LAS都可以明显提高抗性芽的诱导率。本实验添加AS10 mg/100 mL对黄瓜转化也有显著的促进作用。

本研究通过农杆菌介导法, 经GUS和PCR检测初步判断获得了转基因黄瓜植株, 后继试验将对初步检测的转基因植株进行Southern杂交和Northern杂交检测, 进一步判断该目的基因是否整合到黄瓜基因组中; 再通过转基因植株的抗逆生理生化分析和遗传学分析, 验证*Mn-SOD*基因在黄瓜抗逆中的作用, 为进一步研究*Mn-SOD*基因在黄瓜中的抗逆作用创造了一定的条件, 也为黄瓜的基因工程及抗性品

种改良奠定了基础。

### 参考文献 (References)

- 1 任安芝, 刘爽. 植物中的超氧化物歧化酶(SOD)对逆境反应. 河南科学 1999; 17(6): 151-2.
- 2 Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, De Rycke R, Botterman J, Sybesma C, *et al.* Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J* 1991; 10(7): 1723-32.
- 3 van Camp W, Capiua K, Van Montagu M, Inze D, Slooten L. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol* 1996; 112(4): 1703-14.
- 4 张海娜, 谷俊涛, 路文静, 李存东, 肖凯. 超表达小麦基因 *TaSOD1.1*和*TaSOD1.2*对烟草耐低温能力的影响. 中国农业科学 2009; 42(1): 10-6.
- 5 Juan D, Zhen Z, Wan CL. Over-expression of exotic superoxide dismutase gene *MnSOD* and increase in stress resistance in maize. *J Plant Physiol Mol Biol* 2006; 32(1): 57-63.
- 6 McKersie BD, Chen Y, De Beus M. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* 1993; 103(4): 1155-63.
- 7 韩利芳, 张玉发. 烟草*Mn-SOD*基因在保定苜蓿中的转化. 生物技术通报 2004; 1: 39-42, 46.
- 8 McKersie BD, Murnaghan J, Jones KS, Bowley SR. Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiology* 2000; 122: 1427-37.
- 9 Perl A, Perl TR, Galili S, Aviv D, Shalgi E, Malkin S, *et al.* Enhanced oxidative stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutases. *Theor Appl Genet* 1991; 85(5): 568-76.
- 10 刘晓鹏, 姜宁, 田阵茂, 吕胜安, 袁勤生. 转入*Cu, Zn-SOD*基因马铃薯的研究. 华东理工大学学报(自然科学版) 2004; 29(3): 255-8.
- 11 陈莉, 马颖, 马锋旺, 梁东, 华智锐. 根癌农杆菌介导麝香百合遗传转化体系的建立. 西北植物学报 2007; 27(7): 1335-40.
- 12 陈莉, 周连霞, 马锋旺, 梁东, 华智锐. 转*Mn-SOD*基因仙客来植株的获得及其对高温胁迫的抗性. 西北农林科技大学学报(自然科学版) 2008; 36(3): 155-60.
- 13 Lee HS, Kwon EJ, Kwon SY, Jeong YJ, Lee EM, Jo MH, *et al.* Transgenic cucumber fruits that produce elevated level of an anti-aging superoxide dismutase. *Mol Breed* 2003; 11: 213-20.
- 14 许娜, 储俊. 黄瓜遗传转化研究进展. 中国蔬菜 2008; 12: 38-42.
- 15 邹金美, 张国广, 陈亮. 黄瓜转基因研究进展. 厦门大学学报(自然科学版) 2008; 47(增2): 236-41.
- 16 范爱丽, 孙艳, 徐凌飞, 梁东, 邹志荣. 黄瓜子叶节再生体系优化研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版) 2006; 34(9): 69-73.
- 17 王关林, 方宏绮. 植物基因工程与技术. 北京: 科学出版社, 2002: 738, 742-4, 831-2.
- 18 叶永亮, 杜波. 黄瓜再生体系和遗传转化的建立. 黑龙江农业科学 2009; (5): 5-6.
- 19 刘文萍, 卢淑雯, 刘建新, 南相日, 柳景兰, 李柱刚. 农杆菌介导的*BnCS*基因对黄瓜遗传转化研究. 北方园艺 2009; (1): 20-2.
- 20 王艳蓉, 陈丽梅, 潘俊松, 何欢乐, 蔡润. 黄瓜子叶高效再生体系的建立与遗传转化. 上海交通大学学报(农业科学版) 2006; 24(2): 152-6, 164.
- 21 李冷, 潘俊松, 何欢乐, 吴爱忠, 蔡润. 黄瓜离体培养再生技术及农杆菌介导的*ACSI*转化. 上海交通大学学报(农业科学版) 2007; 25(1): 17-29.
- 22 金红, 杜胜利, 陈峥, 魏爱民. 抗除草剂转基因黄瓜的获得及T1植株抗性鉴定. 华北农学报 2003; 18(1): 44-6.
- 23 陈峥, 金红, 程奕, 杜胜利, 魏爱民. 提高黄瓜农杆菌遗传转化体系再生频率的研究. 天津农业科学 2001; 7(4): 47-9.
- 24 王关林, 方宏绮. 植物基因工程. 北京: 科学出版社, 2002: 392.
- 25 魏爱民, 张文珠, 杜胜利, 韩毅科, 张桂华, 张历. 影响农杆菌介导的黄瓜抗虫基因遗传转化体系的因素研究. 天津农业科学 2006; 12(3): 1-3.

## Establishment of Genetic Transformation System for Cucumber with *Mn-SOD* Gene

Fan Aili<sup>1,2</sup>, Sun Yan<sup>1\*</sup>, Guan Qingmei<sup>1</sup>, Liang Dong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; <sup>2</sup>Vegetable Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

**Abstract** In this study, several factors affecting transformation rate were studied by *Agrobacterium*-mediated in Nong cheng No.3 cucumber. These factors included sensitivity of cotyledonary nodes to antibiotics (Kan and Cef), days of pre-culture, concentrations of *Agrobacterium tumefaciens*, days of co-culture and time of being infected on the optimum culture medium and so on. The high frequency transgenic regeneration system of cucumber was established as follows: cotyledons nodes of Nong cheng No.3 cucumber were pre-cultured for 3 days, inoculated with EHA-105 ( $D_{600}0.3$ , AS 10 mg/100 mL) for 5 minutes, then co-cultured for 2 days, transformed to screening-culture medium (50 mg/L Kan, 500 mg/L Cef), resistant buds grew well in light. 9 resistant plants were obtained and the same positive bands of 658 bp were detected by examining GUS report gene and PCR amplification of *Mn-SOD* gene. So the integration of the gene into cucumber genome DNA was confirmed in some degree.

**Key words** Cucumber (*Cucumis Sativus* L.); *Mn-SOD* gene; genetic transformation

---

Received: November 9, 2010 Accepted: May 3, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.40971179)

\*Corresponding author. E-mail: sunyanma64@sina.com