

84K 杨树耐盐基因转化研究*

樊军锋¹, 韩一凡², 李 玲², 彭学贤³, 李嘉瑞⁴

(1. 西北农林科技大学 林科院, 陕西 杨陵 712100; 2. 中国林业科学研究院, 北京 100091; 3. 中国科学院 微生物研究所, 北京 100080; 4. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:在已建立了 84K 杨叶片外植体再生系统的基础上, 利用叶盘法首次开展了 84K 杨双价耐盐基因 mtlD/gutD 的转化研究, 经诱导不定芽及诱导生根阶段卡那霉素(选择性抗生素)连续筛选, 获得了 16 株卡那霉素抗性转化植株。抗性植株经 PCR 检测, 有 4 株呈阳性。耐盐实验表明, 3 株阳性植株抗 NaCl 能力比对照有不同程度提高。PCR 及耐盐实验初步证明双价耐盐基因转化获得成功。

关键词:84K 杨; 耐盐基因; 转化研究; 耐盐测定

中图分类号:S792.110.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-7461(2002)04-0033-05

Salt-resistant Gene Transformation to Poplar 84K

FAN Jun-feng¹, HAN Yi-fan², LI Ling², PENG Xue-xian³, LI Jia-rui¹

万方数据 Institute of Forestry and Science, NW Sci-Tech Univ. of Agr. and For., Yangling, Shaanxi 712100, China;
2. Chinese Academy of Forestry, Beijing 100096, China; 3. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080;
4. College of Horticulture, NW Sci-Tech Univ. of Agr. and For., Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract:On the basis of establishment of leaf explant regeneration system of poplar 84K, transformation of mtlD/gutD gene to poplar 84k by means of leaf disc was for the first time undertaken. Through successive selection in the period of shoot and root induction under high lever kanamycin pressure, 16 kanamycin-resistant regenerated plants was obtained, of which 4 was positive through PCR analysis. The salt resistant test of these 4 positive plants showed that 3 of them were enhanced in salt tolerance ability to some extent. PCR analysis and salt resistance test preliminarily indicated that the successful transformation had been made.

Key words:poplar 84K; mtlD/gutD gene; transformation; salt resistance test

84K 杨以其较快的生长速度、较高的扦插成活率及较好的木材材质倍受欢迎, 在陕西及西北地区栽培数量较多。为提高该品种抗盐性, 充分利用西北广大地区干旱盐碱地, 2001 年, 我们采用叶盘法首次开展了 84K 杨双价耐盐基因转化研究, 并获得部分卡那霉素(选择性抗生素)抗性植株。

1 材料与方法

1.1 抗盐碱基因、植物表达载体及农杆菌菌株

1.1.1 抗盐碱基因 本实验所用抗盐碱基因为 mtlD/gutD 双价基因^[1]。mtlD 为 1-磷酸甘露醇脱氢

酶基因, gutD 为 6-磷酸山梨醇脱氢酶基因。mtlD、gutD 基因导入植物后可增加植物体内糖醇含量。糖醇上含有多个羟基, 亲水性强, 其含量的增加, 可提高植物抗盐碱能力。双价 mtlD/gutD 基因作用效果较单价 mtlD 和 gutD 基因作用效果更好^[1]。刘俊君等人将单价 mtlD、gutD 基因分别导入烟草中, 获得了抗 NaCl 浓度各为 1.75% 的转基因植株^[2]。将 mtlD/gutD 双价基因导入烟草中, 获得了抗 NaCl 浓度为 2.0% 的转基因植株^[1]。

1.1.2 植物双价双元表达载体 植物双价双元表

* 收稿日期: 2002-05-27
基金项目: 陕西省科技厅科技攻关项目(2001K01-G7)
作者简介: 樊军锋(1962-), 男, 陕西扶风人, 副研究员, 从事树木育种学的研究。

达载体 pBIGM 是在双元表达载体 pBin438 的基础上由中科院微生物所构建并提供。pBIGM 上含有双价抗盐基因 *mtlD/gutD*、双重增强的 35S 启动子和 TMV“ Ω ”片段的翻译增强子及 NPT-Ⅱ 卡那霉素抗性标记基因^[1]。NPT-Ⅱ 基因可使卡那霉素等氨基糖苷类抗生素发生磷酸化而失活。含有 NPT-Ⅱ 基因的转化植株,可在含卡那霉素选择性抗生素的培养基上正常生长。

1.1.3 农杆菌菌株 农杆菌菌株选用 LBA4404,将 pBIGM 双价双元表达载体采用直接转化法转入 LBA4404 后保存在 YEP 培养基中,贮藏在 4℃ 冰箱备用。每 1 月活化 1 次。

1.2 转化受体系统的建立

1.2.1 叶片再生系统的建立 设计 4 组 $L_9(3^4)$ 正交实验设计,共 36 个处理,用于筛选叶片外植体最佳不定芽诱导培养基及激素配比。设计 2 组实验,12 个处理,用于筛选不定芽生根培养基及激素配比^[3]。

1.2.2 卡那霉素敏感性试验 (1)叶片卡那霉素敏感性试验将叶片外植体沿主脉横切后放入含有不同卡那霉素浓度的不定芽诱导培养基 MS+6BA 1.5 mg/L+NAA0.1 mg/L^[3]中培养。每 10 d 换 1 次培养基。2 个月根据叶片上不定芽分化及生长状况筛选叶片外植体卡那霉素临界耐受浓度。(2)生根诱导卡那霉素敏感性试验将长度约 1 cm 左右的不定芽放入含有不同卡那霉素浓度的生根培养基 GMS+NAA0.01 mg/L+IBA0.25 mg/L^[3]中培养。2 个月时,根据各浓度生根状态,筛选适宜的芽生根诱导卡那霉素临界耐受浓度。

1.2.3 农杆菌敏感性试验 农杆菌 LBA4404 对杨树有较好的侵染性^[4~6],故直接选用 LBA4404 菌株作为基因载体菌侵染 84K 杨。

1.3 转化及筛选

采取 Horsch 发明的叶盘法^[7],具体步骤如下。

取 84K 叶片若干片,用手术刀在叶脉处横切划痕后放入用 30 倍 MS 稀释的 LBA4404(使用前夜活化)菌液中,浸泡 2~3 min 后取出,放入不含任何抗生素的芽诱导培养基 MS+6-BA1.5 mg/L+NAA0.1 mg/L 中。25℃±2℃ 暗室中共培养 3~5 d,待叶片与培养基接触处出现肉眼可见菌落后,一部分叶片转入含有 500 mg/L 羧苄青霉素(用于杀死过量农杆菌)及 50 mg/L 卡那霉素的芽诱导培养基中培养。另一部分叶片待 20~30 d 左右切口出现芽点后,转入以上培养基中培养。每 10 d 换 1 次培养基。转化不定芽因体内含有 NPT-Ⅱ 抗性标记基

因,能在含有卡那霉素的培养基上生长。未转化不定芽因体内不含有 NPT-Ⅱ 抗性标记基因,不能在含有卡那霉素的培养基上生长存活。2 个月后,待转化芽长度达 1 cm 左右,转入加有 60 mg/L 卡那霉素的生根培养基 GMS+NAA0.01 mg/L+IBA0.25 mg/L 中继续培养。1 月后,选择生长健壮的生根卡那霉素抗性植株作为初选转化植株,将其扩繁后用于 PCR 检测及耐盐性测定。

1.4 卡那霉素抗性植株的 PCR 检测

DNA 提取

(1)84K 杨 DNA 提取 参考文献[8]采用以下方法提取 84K 杨 DNA。取 20 mg 叶片,放入 Eppendorf 管中,加入提取缓冲液 500 mL,充分研磨后,60℃ 恒温水浴 1 h。加入 500 mL 氯仿/异戊醇混合液(24:1)充分振荡抽取后,6 000~10 000 r/min 离心 5 min。取上清液,放入另一 Eppendorf 管中,加入 0.1 倍体积 3 mol 醋酸钠及 2 倍体积 100% 冷乙醇,−20℃ 冰箱沉淀 30 min 后,12 000 r/min 离心 10 min。倒掉上清,在管壁底可见小米粒大小白色 DNA 沉淀。用 500 μ L 70% 乙醇洗涤 2 次,干燥后加 50 μ L 双蒸水溶剂,4℃ 冰箱保存备用。

提取缓冲液配方如下:

2×[1%CTAB,50 mMTris-HCl(pH8.0),0.7 mol NaCl,10 mmol EDTA,0.5%PVP,0.1%新鲜巯基乙醇(用前加入)]。

(2)阳性对照质粒 DNA 提取 含有 pMTD(其中含 *mtlD* 基因)及 pGUD(其中含有 *gutD* 基因)阳性对照质粒的大肠杆菌 DH5 α 由中科院微生物所提供,其质粒 DNA 的提取采用 Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System 试剂盒提取。

(3)PCR 扩增及检测 引物由北京鼎国生物技术有限公司合成,其序列见文献[9]。PCR 反应体系中 dNTP、tag 酶、反应缓冲液均购自北京鼎国生物技术有限公司,操作程序如下。

取 84K 杨样品及阳性对照 DNA 各 4 μ L,加入放有 2.5 μ L 反应缓冲液、0.5 μ LdNTP、0.25 μ L3'引物和 0.25 μ L 5'引物的微量离心管中。再加入 17 μ L 双蒸水及 0.5 μ L tag 酶(2U/ μ L),使反应液总体积达 25 μ L。反应条件为 94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,共 35 个循环。反应前可预变性 2 min,反应结束后延伸加时 5 min。反应结束后取反应混合液 5 μ L,放在 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳。凝胶经 EB 染色后,用自动成像系统检查 PCR 电泳结果,并拍照。

1.5 转基因植株抗盐性测定

取 PCR 检测呈阳性的 84K 杨卡那霉素抗性植株及 84K 杨未转基因植株各 10 株,放在加有 5 种不同 NaCl 浓度的生根培养基中培养。2 个月时根据各植株存活率,判别其抗盐能力。

2 结果与分析

2.1 转化系统的建立

2.1.1 再生系统的建立 通过系统正交等试验,筛选出 84K 杨叶片外植体最佳不定芽诱导培养基及激素配比为 MS+6-BA1.5 mg/L+NAA0.1 mg/L,最佳不定芽生根培养基及激素配比为 GMS+NAA0.01 mg/L+IBA0.25 mg/L^[4]。

2.1.2 卡那霉素敏感性试验

(1)叶片外植体不定芽诱导卡那霉素敏感性试

验根据参考文献[4~6]设计了 6 种卡那霉素敏感性试验浓度。实验结果由表 1 知,对照 84K(卡那霉素浓度为 0)20 d 时,叶切口出现芽点,30 d 时,不定芽长至 0.3~0.5 cm,60 d 时不定芽长度达 1.0~1.5 cm。加入卡那霉素后,不定芽诱导及生长受到一定程度抑制。卡那霉素浓度在 40 mg/L 以下,芽点出现时间虽滞后 10 d 左右,但生长基本正常,60 d 时长度约 0.8~1.2 cm。卡那霉素浓度在 50 mg/L 以上,愈伤诱导及芽分化受到完全抑制,切口不出现或出现极少量愈伤及芽点。60 d 后,叶片发褐,逐渐死亡。故 84K 杨叶片不定芽诱导卡那霉素临界耐受浓度为 50 mg/L。

(2)不定芽生根诱导卡那霉素敏感性试验 根据参考文献[5~7],设计了 4 种卡那霉素敏感性试验浓度,实验结果见表 2。

表 1 84K 杨叶片外植体卡那霉素浓度耐受性试验结果

Table 1 The result of kanamycin resistance test for leaf explant

卡那霉素浓度 /mg·L ⁻¹	叶片数	叶片及不定芽状态		
		20 d	30 d	60 d
0(对照)	10	出现愈伤及芽点	不定芽长 0.3~0.5 cm	叶色深绿,不定芽长 1.0~1.5 cm。
20	10	叶切口出现愈伤	出现芽点,芽长 0.3 cm 以下	叶色深绿,不定芽长 1.0~1.5 cm。
30	10	叶切口出现愈伤	出现芽点,芽长 0.3 cm 以下	叶色深绿,不定芽长 1.0~1.2 cm。
40	10	叶切口出现愈伤	出现芽点,芽长 0.3 cm 以下	叶色浅绿,不定芽长 0.8~1.2 cm。
50	10	—	—	叶片大部分发褐,接近死亡
60	10	—	—	叶片发褐,死亡

表 2 不定芽生根诱导卡那霉素敏感性试验结果

Table 2 The result of kanamycin resistance test for rooted shoots

卡那霉素浓度 /mg·L ⁻¹	芽苗数	生根率/%			60 d 时根长/cm	60 d 时不定芽状态
		15 d	30 d	60 d		
0(对照)	7	71	100	100	1.5~2.0	叶片深绿,生长健壮
20	7	86	100	100	1.0~1.5	叶片深绿,生长正常
40	7	71	71	71	0.5~1.0	叶片浅绿,生长基本正常
60	7	29	29	29	0.3~0.5	叶片发黄,芽苗死亡

从表 2 知,卡那霉素对 84K 杨不定芽生根诱导也有很大影响。对照 60 d 时,生根率达 100%,根长约 1.5~2.0 cm。卡那霉素浓度为 40 mg/L 时,第 60 d 生根率降至 71%,根长约 0.5~1.0 cm,但生长基本正常。卡那霉素浓度达 60 mg/L 时,生根率、根系及不定芽生长均受到严重抑制,60 d 时,生根率仅 29%,长度约 0.3~0.5 cm,大部分不定芽因不能生根而逐渐发黄死亡。故 84K 杨不定芽生根诱导卡那霉素临界耐受浓度为 60 mg/L。

2.2 转化及筛选

共设计了 3 个处理,转化叶片 70 片,其转化结果从表 3 知,对照 84K 杨叶片放在不含卡那霉素的不定芽诱导及生根培养基上,叶片分化率及不定芽

生根率分别达 80%和 92%,平均每片叶产生生根不定芽 6.5 个,说明 84K 杨叶片再生系统比较成熟完善,再生效率较高。接菌叶片在含卡那霉素的培养基上培养筛选,叶片分化率及不定芽生根率分别为 58%和 52%,平均每片叶仅产生生根抗性植株 0.3 个,说明选择抗生素卡那霉素对 84K 转化选择作用效果非常显著,抑制或杀死了大量非转化不定芽,避免了大量非转化植株的产生,减少了后继 PCR 检测工作量。从表 3 还知,卡那霉素加入时间对转化作用影响很大。共培养后,若马上加入卡那霉素,因转化细胞内 NPT-Ⅱ 基因表达量有限,细胞很难在含有高浓度的卡那霉素培养基上存活并诱导成芽,导致转化失败。共培养 20~30 d,叶切口出现愈伤及芽点

后,加入卡那霉素,虽增加了部分假转化植株出现频率,但却获得了一定数量的卡那霉素抗性不定芽,为

后继进一步筛选提供了可能。

表 3 84K 杨转化实验结果

Table 3 The result of transformation experiment for poplar 84K									
处理	叶片数	卡那霉素加入时间/d	分化叶片数	叶片分化率	不定芽数	每片叶平均产生不定芽数	生根不定芽数	生根率/%	平均每叶片产生生根不定芽数
1(对照)	10	—	8	80	70	7	65	92	6.5
2(转化)	20	共培养后马上加入	0	0	0	0	0	0	0
3(转化)	50	共培养 20~30 d 后加入	29	58	31	0.6	16	52	0.3

同时,在转化实验中发现,适宜的共培养时间也非常重要。共培养时间过短,农杆菌不能充分浸染切口细胞,转化率低;共培养时间过长,农杆菌生长过多,会导致转化叶片死亡。在实际操作中,最佳共培养时间应以培养皿中转化叶片与培养基接触处出现

肉眼可见菌落时为宜。

2.3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测

对所得 16 株卡那霉素抗性植株均作了 PCR 检测,其中 4 株呈阳性。部分植株(含 4 株阳性植株)PCR 结果见图 1。

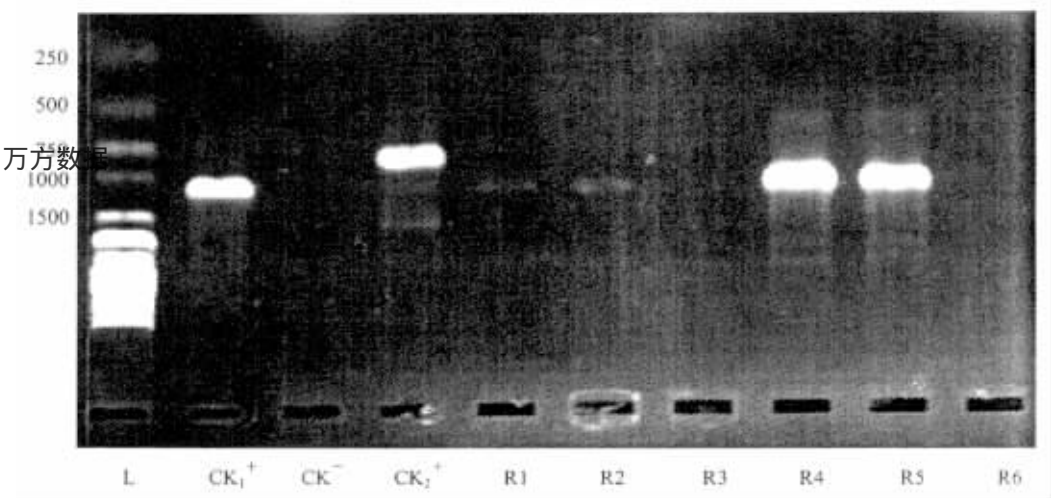


图 1 6 株卡那霉素抗性植株 PCR 扩增产物电泳结果

Fig.1 PCR analysis of kanamycin-resistant rooted shoots

L:1Kb Ladder; CK₁⁺:mtlD 阳性对照(1150b);CK₂⁺:gutD 阳性对照(880b);CK⁻:84K 阴性对照;R1~R6:卡那霉素抗性植株

从图 1 知,R1、R2、R4、R5 均出现 1 条与阳性对照 CK₁⁺(mtlD 基因,大小约 1 150b)大小一致的条带,初步说明 mtlD 基因转入到 R1、R2、R4、R5 植株中。在双价基因构建中,gutD 与 mtlD 基因连在一起,mtlD 的转化成功,说明 gutD/mtlD 双价基因转化成功。4 条阳性带中,R4、R5 条带很亮,R1、R2 条带很暗。其条带明暗不同可能是由于样品 DNA 提取浓度不同或 PCR 扩增时反应体系中各组份加样不匀造成。

由于植物基因组很复杂,其上可能含有拟转化目的基因的同源序列或相近序列,同源序列或相近序列的存在可导致 PCR 扩增出现假阳性,故 PCR 结果呈阳性并不能完全证明耐盐基因转化已获成功。为进一步证明耐盐基因已转化成功,需继续作耐

盐等测定。

2.4 阳性卡那霉素抗性植株抗盐性测定

从表 4 知,对照 84K 抗 NaCl 最高浓度为 0.2%。在 0.2%NaCl 浓度下,2 月时存活率为 80%,NaCl 浓度高于 0.2%,存活率为 0。4 株 PCR 阳性植株中 R4 抗 NaCl 能力最强,在 0.6%NaCl 浓度下,2 月时存活率为 70%。R2、R5 抗 NaCl 能力中等,在 0.4%NaCl 浓度下,2 个月时存活率分别为 70%和 80%。R1 抗 NaCl 能力最差,与对照 84K 接近。在 0.2%NaCl 浓度下,2 月时存活率为 90%,NaCl 浓度高于 0.2%,存活率为 0。R2、R4、R5 PCR 阳性植株抗 NaCl 能力高于对照的事实初步说明,耐盐碱基因转化获得成功。R2、R4、R5 之间抗 NaCl 能力的差别可能是由于 mtlD、gutD 基因插入 84K

染色体位点不同及插入拷贝数多少不一造成。R1 抗 NaCl 能力与对照一致初步说明该植株 PCR 阳性为假阳性。

表 4 阳性卡那霉素抗性植株抗盐性测定结果

Table 4 The result of salt-resistant test for PCR positive rooted shoots					
NaCl	存活率/%				
	对照	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%
84K(对照)	100	80	0	0	0
R1(PCR 阳性)	100	90	0	0	0
R2(PCR 阳性)	100	100	70	0	0
R4(PCR 阳性)	100	100	90	70	0
R5(PCR 阳性)	100	100	80	0	0

注:表中数据为 2 个月时统计结果

3 结论与讨论

在已建立了 84K 杨叶片外植体再生系统的基础上^[3],确定了 84K 杨叶片外植体不定芽诱导卡那霉素耐受浓度为 50 mg/L,不定芽生根诱导卡那霉素耐受浓度为 60 mg/L,完善了 84K 杨遗传转化受体系统的建立。

通过叶盘法,开展了 84K 杨双价耐盐基因 mtlD/gutD 的转化研究,获得卡那霉素生根抗性植株 16 株,其中 4 株经 PCR 检测呈阳性。耐盐实验证明,3 株阳性植株抗 NaCl 能力高于对照。经过 PCR 检测和耐 NaCl 试验测定初步证明双价耐盐基因转化成功。

阳性植株耐盐性虽比对照有不同程度提高,但提高幅度不大。一方面说明该基因表达不甚理想,今后应加强对该双价耐盐基因高效表达构建研究;另

一方面也说明植物耐盐机理很复杂,并非一个外来耐盐基因的导入就可大大提高其耐盐性,今后应加大植物耐盐机理研究。

经过 PCR 检测及实际抗盐测定虽已初步证明耐盐基因转化成功,但并非完全确证。要完全确证转化成功,需进一步做 Southern 杂交及 Western 杂交检测。

致谢:本实验在中国林科院林业研究所分子遗传室完成,国家林业局黄土高原林木培育实验室提供了部分资助,在此表示衷心感谢。

参考文献:

[1] 刘俊君,黄绍兴,彭学贤,等. 高度耐盐双价转基因烟草的研究[J]. 生物工程学报,1995,11(4):381-384.

[2] 刘俊君,彭学贤,王海云,等. 转基因烟草的甘露醇合成和耐盐性[J]. 生物工程学报,1996,12(2):206-210.

[3] 樊军锋,李玲,韩一凡,等. 84K 杨叶片外植体再生系统的建立[J]. 西北林学院学报,2002,17(2):333-6.

[4] 田颖川,韩一凡,李玲,等. 抗虫转基因欧洲黑杨的培育[J]. 生物工程学报,1993,9(4):291-297.

[5] 王学骋,韩一凡,戴莲韵,等. 抗虫转基因欧美杨的培育[J]. 林业科学,1997,33(1):69-74.

[6] 陈颖,韩一凡,李玲,等. 苏云金杆菌杀虫晶体蛋白基因转化美洲黑杨的研究[J]. 林业科学,1995,31(2):97-103.

[7] Horsch R B, Fry T E, Hoffmann N L, *et al.* Science[J]. 1995, 227:1227-1231.

[8] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(6):1349.

[9] 刘俊君,彭学贤,王海云,等. 大肠杆菌 mtlD 基因和 gutD 基因的克隆、全序列测定和高效表达[J]. 生物工程学报,1995,11(2):157-161.

(上接 28 页)

[50] 肖笃宁. 景观生态学理论方法及应用[M]. 北京:中国林业出版社,1991,35-43.

[51] 陈尚. 生态交错带理论及其在海洋生态学中的应用[J]. 地球科学进展,1998, 13(5): 431-437.

[52] Hardt R A. Boundary form effects on woody colonization of reclaimed surface mines[J]. Ecology, 1989, 70(5): 1252-1260.

[53] 肖笃宁. 生态空间理论与景观异质性[J]. 生态学报,1997, 17(5): 453-461.

[54] Water H. Community and ecosystems (2nd. ed.)[M], New Yourk: Macmillan Publishing Co. Inc. , 167.