

# 转 *Bt* 基因欧洲黑杨转化 *TA29-Barnase* 基因的研究

朱伟康,贾小明\*,李周岐

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

**摘 要:**为了获得雄性不育转 *Bt* 基因欧洲黑杨,在以叶片为外植体建立转 *Bt* 基因欧洲黑杨叶片组培再生体系的基础上,利用农杆菌介导叶盘法将 *TA29-Barnase* 基因转化到转 *Bt* 基因欧洲黑杨中。结果表明,转 *Bt* 基因欧洲黑杨叶片不定芽分化最适培养基为:MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.01 mg·L<sup>-1</sup> TDZ+30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖+6 g·L<sup>-1</sup> 琼脂;不定芽生根最适培养基为:1/2MS+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> IBA+20 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖+6 g·L<sup>-1</sup> 琼脂;经过在叶片不定芽诱导及生根诱导培养基添加除草剂 PPT 连续筛选,共获得 9 株抗性植株。对抗性植株进行基因特异性 PCR 检测,其中有 5 株呈阳性,转化阳性率达 55.6%。初步表明获得了转 *Barnase* 基因的转 *Bt* 基因欧洲黑杨植株。

**关键词:**转 *Bt* 基因欧洲黑杨;*Barnase* 基因;转化

**中图分类号:**S792.119      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2017)01-0121-05

## Transformation of *T29-Barnase* Gene of *Bt* Transgenic *Populus nigra*

ZHU Wei-kang, JIA Xiao-ming\*, LI Zhou-qi

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** In order to obtain male sterility *Bt* transgenic *Populus nigra*, we established the leaf regeneration system, and transformed *TA29-Barnase* gene into *Bt* transgenic *P. nigra* with *Agrobacterium*-mediated leaf disc. The results showed that the best differentiation medium of *Bt* transgenic *P. nigra* was MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.01 mg·L<sup>-1</sup> TDZ+30 g·L<sup>-1</sup> sucrose+6 g·L<sup>-1</sup> agar, and the optimal rooting medium was 1/2MS+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> IBA+20 g·L<sup>-1</sup> sucrose+6 g·L<sup>-1</sup> agar. Through successive selection in the stages of shooting and root induction with the addition of PPT (phosphinothricin), 9 phosphinothricin-resistant plants were obtained. According to the *TA29-Barnase* sequence designing specific primers, 5 positive plants were detected through PCR analysis with a conversion rate of 55.6%. Preliminary result showed that the *Barnase* gene had been Successfully transformed into *Bt* transgenic *P. nigra*.

**Key words:** *Bt* transgenic *Populus nigra*; *Barnase* gene; transform

自 20 世纪 70 年代以来,生物技术迅猛发展,相关研究进展和突破大大加速了作物更新换代的速度,转基因技术也被称为第三次技术革命<sup>[1]</sup>。相对于作物基因工程育种,林木基因工程育种起步晚,但发展迅速,尤其在杨树基因工程育种方面取得显著成绩。不仅获得了抗虫<sup>[2-3]</sup>、抗病<sup>[4]</sup>、抗盐碱<sup>[5]</sup>、耐除

草剂<sup>[6]</sup>等转基因杨树新品种,并且田颖川<sup>[2]</sup>等获得的转 *Bt* 基因欧洲黑杨(*Populus nigra*)于 2002 年商品化栽培,成为世界上第 1 个商品化栽培的转基因林木树种。随着越来越多的转基因植物进入田间试验或商品化栽培,转基因生物的安全性问题相伴而生<sup>[7]</sup>。林木生长周期长,管理粗放,对环境生态潜

收稿日期:2016-03-22 修回日期:2016-06-12

基金项目:国家林业局 948 项目“转基因林木生物安全控制及早期评价技术引进”(2013-4-38)。

作者简介:朱伟康,男,硕士研究生,研究方向:林木生物技术。E-mail:578094061@qq.com

\* 通信作者:贾小明,男,讲师,研究方向:林木生物技术。E-mail: jxm0601@163.com

在的影响更大,生物安全性问题已成为转基因林木研究成果推广的“瓶颈”。

*Barnase* 基因的产物是由解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)分泌的胞外 RNA 酶,能够降解细胞 RNA,具有很强的毒性,它在特异细胞中的表达将造成细胞的死亡,通过它的表达可实现植物的雄性不育<sup>[8]</sup>。我国已成功利用绒毡层特异启动子 TA29 在烟草、油菜、小麦等通过特异地驱动 *Barnase* 基因表达,获得雄性不育植株<sup>[9-11]</sup>。雄性不育基因工程技术最早应用于制备杂交种,后来逐渐被人们利用到限控转基因生物安全的领域中来。雄性不育技术使转基因植物不能产生花粉,降低了基因飘移的风险,可以应用到不需要收获种子的植物,比如林木和花卉中,在无性繁殖的树木中也已有应用<sup>[12-14]</sup>。李玲<sup>[15]</sup>等通过基因枪法进行了致雄性不育转 Bt 基因欧洲黑杨转化研究,但转化率较低。本研究拟对转 Bt 基因欧洲黑杨叶片再生体系进行优化,采用稳定、成熟的叶盘法将人工构建雄性不育表达载体 TA29-*Barnase* 转入转 Bt 基因欧洲黑杨中,使转 Bt 基因欧洲黑杨更加安全地应用于林业生产中。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 转 Bt 基因欧洲黑杨无菌叶片 于渭河试验站采集转 Bt 基因欧洲黑杨苗干若干段,水培至茎段上新生嫩枝长至 5~10 cm 时,剪取嫩枝,使用 0.1% 的升汞灭菌 8 min 后,转入 MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖+6 g·L<sup>-1</sup> 琼脂的培养基中培养。取嫩茎新长出的无菌苗叶片作为再生系统优化以及遗传转化的材料。

1.1.2 质粒和菌株 试验所用农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)为 EHA105 菌株,含有双元表达载体 pBI-TBSBAR 质粒,该质粒携带由烟草花药特异启动子 TA29 驱动的核糖核酸酶 *Barnase* 基因,35S 和 nos 驱动的选择标记基因 *bar* 和 *npt II* (图 1)。



图 1 质粒 pBI-TBSBAR 的 T-DNA 区域结构简图  
Fig. 1 Structure of T-DNA region of plasmid pBI-TBSBAR

### 1.2 转化受体系统的建立

1.2.1 叶片离体再生系统的优化 以 MS 为基本培养基,以 6-BA、NAA、TDZ 3 种生长调节剂设计 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验,共 9 个处理(表 1),附加 30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖和 6 g·L<sup>-1</sup> 琼脂。每个处理接种 1 个培养

皿,每皿放入 20 个 1.5 cm×1.5 cm 大小叶片,重复 3 次。培养 60 d 后,统计叶片诱导芽数量及生长状况,筛选最佳芽诱导培养基。

1.2.2 不定芽诱导生根培养基的优化 以 1/2MS 为基本培养基,附加 20 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖和 6 g·L<sup>-1</sup> 琼脂,设计不同浓度 NAA 和 IBA 组合共 12 个处理(表 3)。每种培养基接种 20 个芽,重复 3 次。培养 30 d,根据最早生根时间、生根率、根的生长状态等,筛选最适不定芽生根培养基。

### 1.3 转化及筛选

1.3.1 叶片不定芽诱导除草剂敏感性试验 将无菌欧洲黑杨叶片沿主脉横切,放入含有 0、1、2、4、8、10 mg·L<sup>-1</sup> 除草剂 PPT 的不定芽诱导培养基中培养,每处理接种 1 培养皿,每皿接种 20 个 1.5 cm×1.5 cm 大小叶片,重复 3 次。30 d 后,根据叶片不定芽分化及生长状况,筛选叶片外植体除草剂临界耐受质量浓度。

1.3.2 不定芽生根除草剂敏感性试验 将长度约 1 cm 的不定芽放入含有 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg·L<sup>-1</sup> 生根培养基中培养,每处理接种 10 个不定芽,每瓶接种 1~2 个,重复 3 次。培养 30 d 后,根据生根及生长状态,筛选适宜不定芽生根诱导的除草剂临界耐受质量浓度。

1.3.3 转化与抗性植株的初选 取长势健壮无菌苗叶片,用手术刀将叶片横切后放置菌液浓度 OD<sub>600</sub>=0.3 中浸染 10 min,28℃ 黑暗条件下共培养 2 d,一部分接种至含 400 mg·L<sup>-1</sup> 羧苄青霉素(Carb)最佳叶片分化培养基中恢复培养 20 d,然后转入含 400 mg·L<sup>-1</sup> Carb 和 2.0 mg·L<sup>-1</sup> PPT 的最佳叶片分化培养基上,之后每隔 10~15 d 转接 1 次筛选培养基;另一部分共培养后直接接种到含 2.0 mg·L<sup>-1</sup> PPT 和 400 mg·L<sup>-1</sup> Carb 的最佳叶片分化培养基中。另设一组对照,接种至不含抗生素和除草剂的最佳叶片分化培养基中,每处理接种 60 个叶片。待新生不定芽高度达 1 cm 左右,转入含 1.0 mg·L<sup>-1</sup> PPT 最佳生根培养基中继续培养。30 d 后,选择生长正常的作为初选转化植株。

### 1.4 抗性植株基因特异性 PCR 检测

1.4.1 转基因植株 DNA 的提取 取初选的抗性植株嫩叶,根据 Edwards<sup>[16]</sup> 等一种用于 PCR 检测的简单快速提取植物组 DNA 的方法,提取抗性植株植物组 DNA。

1.4.2 PCR 法检测转基因植株 根据 TA29-*Barnase* (870 bp) 基因序列设计特异性 PCR 扩增引物。

上游引物: 5'-CCAGA-TCTCAGGTTAT-CAACACGTT-3'

下游引物:5'-GGCTAGCCATATTCATCTC-  
CCATT-3'

PCR 扩增体系(总体积为 25  $\mu\text{L}$ ):2.0  $\mu\text{L}$  10 $\times$  PCR buffer 反应缓冲液,0.5  $\mu\text{L}$  10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP,1.0  $\mu\text{L}$  上游引物,1.0  $\mu\text{L}$  下游引物,1.2  $\mu\text{L}$  25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,1.0  $\mu\text{L}$  2 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$  Taq 酶,1  $\mu\text{L}$  模板,ddH<sub>2</sub>O 补充至总体积 25  $\mu\text{L}$ 。

PCR 的扩增程序为:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 2 min,共 30 个循环,72℃ 延伸 5 min,4℃ 保存。反应结束后取 5  $\mu\text{L}$  的扩增产物,放在 1% 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。

## 2 结果与分析

### 2.1 转化受体系统的建立

2.1.1 叶片再生系统的建立 将转 *Bt* 基因欧洲黑杨无菌苗叶片接种到叶片分化培养基上,15 d 叶片开始卷曲,20 d 在伤口处开始分化产生少量愈伤组织,35 d 在叶片叶脉处诱导出绿色芽点,每个芽点分化出 1~3 个不定芽。接种 60 d 后,不定芽可伸长到 0.5~1.0 cm。

不同浓度的 6-BA 对叶片分化差异显著,NAA 对叶片分化差异不显著,TDZ 对叶片分化差异极显著(表 2);6-BA 对转 *Bt* 基因欧洲黑杨叶片不定芽分化的影响最大,其次为 TDZ,NAA 对叶片分化影响较小(表 1)。当 6-BA 浓度为 0.5 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  时,叶片平均不定芽分化数 12.3 个;在 NAA 浓度为 0.05 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  时,叶片平均分化不定芽数 11.0 个;当 TDZ 浓度为 0.01 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ ,叶片平均不定芽分化数量 11.3 个。因此,根据方差和极差分析结果可知,培养基 MS+0.5 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA +0.05 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  NAA +0.01 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ+30 g $\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖+6 g $\cdot\text{L}^{-1}$  琼脂为转基因欧洲黑杨叶片不定芽诱导的最适培养基。

2.1.2 不同激素处理对不定芽的生根影响 随着 NAA 或者 IBA 浓度的增加,生根率呈先上升后下降趋势,NAA 诱导不定芽生根时,根系较粗短,NAA 浓度为 0.05 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  时,诱导率最高为 81.7%;IBA 诱导不定芽诱导生根时,根系细长,IBA 浓度为 0.2 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  时,诱导率最高为 76.7% (表 3)。NAA 或者 IBA 浓度过低,不定芽生根数少;浓度过高,诱导出大量根系的同时又有大量的愈伤组织,不利于后期的移栽。不定芽在 NAA 和 IBA 不同组合生根培养基中,较单独使用 NAA 或者 IBA 最早生根时间明显提前,生根率也大大提

高。在 0.05 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  的 NAA 和 0.2 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  IBA 生根培养基中,生根时间最短,生根率高达 100%,并且基部愈伤少。因此,以 1/2MS+0.05 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  NAA +0.2 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  IBA+20 g $\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖+6 g $\cdot\text{L}^{-1}$  琼脂为转 *Bt* 基因欧洲黑杨适宜的 不定芽生根培养基。

表 1 不同激素浓度及对比对叶片再生不定芽的影响

Table 1 The influence of difference phytohormone concentrations and combinations on leaf differentiation (mg $\cdot\text{L}^{-1}$ )					
试验编号	6-BA	NAA	TDZ	接种数	平均不定芽数
1	0.30	0.02	0.01	20	8.0c
2	0.30	0.05	0.02	20	8.0c
3	0.30	0.10	0.05	20	6.0cd
4	0.50	0.02	0.05	20	7.0d
5	0.50	0.05	0.01	20	18.0a
6	0.50	0.10	0.02	20	12.0b
7	1.00	0.02	0.02	20	9.0bc
8	1.00	0.05	0.05	20	7.0cd
9	1.00	0.10	0.01	20	8.0c
$K_1$	22	24	34	$T=83$	
$K_2$	37	33	29		
$K_3$	24	26	20		
$k_1$	7.3	8.0	11.3		
$k_2$	12.3	11.0	9.7		
$k_3$	8.0	8.7	6.7		
极差 R	5.0	3.0	4.6		

注: $K_i$  指其中一个因素水平为  $i$  时的不定芽数之和; $k_i=K_i/s$ ,其中  $s$  为任一列上各水平出现的次数;数字后面不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ),下同。

表 2 方差分析

Table 2 Variance analysis				
方差来源	自由度	均方值	$F$ 值	$P$
6-BA	2	0.081	5.601	0.012
NAA	2	0.005	0.334	0.720
TDZ	2	0.178	12.373	0.000
误差	20	0.014		
总变异	27			

表 3 不同激素对转 *Bt* 基因欧洲黑杨生根的影响

Table 3 The effect of difference concentrations of IBA and NAA on rooting induction (mg $\cdot\text{L}^{-1}$ )					
试验编号	NAA	IBA	最早生根时间/d	生根率/%	根的生长状态
1	0.01	0.0	15	58.3d	根短,数量少
2	0.02	0.0	13	61.7d	根短,数量较多
3	0.05	0.0	14	81.7bc	根粗短,数量较多
4	0.10	0.0	20	50.0de	根粗短,数量较多
5	0.00	0.1	17	73.3cd	根细长,数量较少
6	0.00	0.2	14	76.7cd	根细长,数量较多
7	0.00	0.5	13	76.7cd	根粗短,数量多
8	0.00	1.0	20	51.7e	根粗短,数量多
9	0.02	0.1	13	83.3bc	根细长,数量多
10	0.02	0.2	13	86.7bc	根细长,数量多
11	0.05	0.1	10	90.0b	根健壮,数量较
12	0.05	0.2	9	100.0a	根健壮,数量多

## 2.2 除草剂敏感性试验

2.2.1 叶片不定芽诱导除草剂敏感性试验 除草剂 PPT 对叶片不定芽分化具有明显抑制作用(表 4)。未添加 PPT 的叶片分化培养基,叶片分化率在 90%,叶片诱导不定芽 35 d 出现芽点;而添加 1 mg · L<sup>-1</sup> PPT 时,分化率由 90%降低到 25%,出芽时间延后,但叶片还可以分化出少量不定芽;当 PPT 浓度达到 2 mg · L<sup>-1</sup>时,仅有 10%叶片分化存活,但已经不能正常分化不定芽。因此,叶片诱导不定芽除草剂 PPT 的临界耐受浓度为 2 mg · L<sup>-1</sup>。

表 4 叶片诱导不定芽 PPT 耐受性试验的结果  
Table 4 The result of PPT resistance test on leaf explant

PPT /(mg · L <sup>-1</sup> )	接种 叶盘数 /个	分化 叶盘数 /个	最早 出芽时间 /d	分化率 /%	叶片及 不定芽 生长状态
0	20	18	25	90	叶片绿色,不定芽 数多,健壮
1	20	5	35	25	叶片大部分失绿, 不定芽少,弱小
2	20	2	45	10	叶片几乎全部失 绿,无不定芽
4	20	0	—	0	叶片全部死亡
8	20	0	—	0	叶片全部死亡
10	20	0	—	0	叶片全部死亡

2.2.2 不定芽生根除草剂敏感性试验 PPT 对植株生根及生长也具有明显的抑制作用(表 5)。不定芽在未添加 PPT 的生根培养基中,生根率达到 90%,植株叶色浓绿,根系发达,数量多,植株生长健壮;在含有 0.5 mg · L<sup>-1</sup> PPT 的生根培养基,只有 20%的组培苗生根,不定根的数目也少,植株生长弱小,叶片发黄,说明 PPT 抑制了植株的生根及生长;在含有 1.0 mg · L<sup>-1</sup> PPT 培养基中,植株叶片渐渐失绿,继续培养,萎蔫,最后死亡,死亡率达到 100%,因此,以 1.0 mg · L<sup>-1</sup>为转 *Bt* 基因欧洲黑杨不定芽生根 PPT 临界耐受浓度。

表 5 不定芽诱导生根 PPT 耐受性试验的结果  
Table 5 The result of PPT resistance test on rooting

除草剂 PPT /(mg · L <sup>-1</sup> )	不定芽数 /个	生根率 /%	不定芽生长状态
0.0	10	90	植株生长健壮,根系发 达,数量多
0.5	10	20	植株生长弱小,叶片发 黄,根系少
1.0	10	0	植株全部死亡
1.5	10	0	植株全部死亡
2.0	10	0	植株全部死亡

## 2.3 转化及筛选

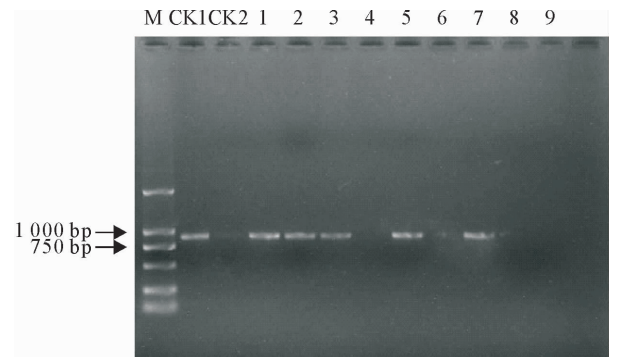
2.3.1 抗性植株的获得 对照组转 *Bt* 基因黑杨叶片放在不含除草剂 PPT 培养基上,叶片分化率及不定芽生根率达 93%和 90%,平均不定芽数 13 个(表

6)。叶片在含 2.0 mg · L<sup>-1</sup> PPT 的选择培养基中,叶片分化率及不定芽生根率分别为 42%和 18%,平均不定芽分化数仅 2 个,PPT 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。此外,在研究中还发现,加入筛选剂 PPT 的时间对转化也有重要影响。过早加入筛选剂 PPT,叶片很难在含有高浓度的 PPT 培养基上存活并诱导成芽,造成转化失败。共培养 2 d 后先回复培养 20 d,待叶切口出现愈伤及芽点后,再加入 PPT 进行选择培养。虽然可能会增加假转化植株,但同时也获得了一定数量的 PPT 抗性不定芽,为后续的生根筛选及获得转化植株提供了可能。

表 6 转 *Bt* 基因欧洲黑杨转化试验结果  
Table 6 The result of transformation experiment for  
*Bt* transgenic *P. nigra*

处理	CK	1	2
接种叶盘数/个	60	60	60
加 PPT 时间/d	—	共培养后 立即添加	恢复培养 20 d 天后添加
分化叶片数/个	56	0	25
分化率/%	93	0	12
平均不定芽数/个	13	0	2
生根数/个	45	0	9
生根率/%	90	0	18

2.3.2 抗性植株的 PCR 检测 为验证外源基因是否转入植物,以携带目的基因的质粒 DNA 作为阳性对照,以未转化的转 *Bt* 基因欧洲黑杨植株组 DNA 为阴性对照进行,对获得的 9 株抗性植株进行 PCR 检测,电泳结果如图 2 所示,在转化的 9 株抗性植株中,1、2、3、5、7 号抗性植株均扩增出 1 条 870 bp 左右的特异条带,与阳性对照扩增出来的条带位置相同(*TA29-Barnase* 基因,大小为 870 bp),而阴性对照区无任何条带,初步表明外源 *Barnase* 基因已转入 1、2、3、5、7 号转 *Bt* 基因欧洲黑杨中。



注: M 为 2 000 bp Marker; CK1: 阳性对照(870 bp); CK2: 转 *Bt* 基因黑杨阴性对照; 1~9: PPT 抗性植株。

图 2 9 株除草剂抗性植株 PCR 扩增产物电泳结果  
Fig. 2 PCR analysis of 9 phosphinothricin-resistant rooted shoots

### 3 结论与讨论

高效的组培再生体系是植物基因工程成功的先决条件。能否建立高效而稳定的组培再生体系,就成为遗传转化成功关键。本试验研究了不同激素配比对叶片分化及不定芽诱导生根影响,并通过农杆菌介导叶盘法,开展了转 *Bt* 基因欧洲黑杨致雄性不育 TA29-*Barnase* 基因转化研究,筛选出转 *Bt* 基因欧洲黑杨叶片分化不定芽最适培养基为:MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.01 mg·L<sup>-1</sup> TDZ+30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖+6 g·L<sup>-1</sup> 琼脂,平均分化芽数 18 个;最适不定芽生根培养基为:1/2MS+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> IBA+20 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖+6 g·L<sup>-1</sup> 琼脂,生根率达 100%;通过连续筛选共获得 9 株抗性植株,经 PCR 检测有 5 株呈阳性,阳性转化率 55.6%。

培养基中激素的种类及配比是影响外植体分化和不定芽诱导生根的关键因素。杨树组织培养研究中,大多通过调节 6-BA 和 NAA 浓度进行不定芽的诱导。TDZ 是一种新型的植物生长调节剂,具有很强的分裂活性,可以促进愈伤组织的生长与促进不定芽的发生。本试验在 6-BA 和 NAA 2 种激素基础上搭配 TDZ,优化的不定芽再生体系每个外植体平均可产生 18 个不定芽,相对李玲<sup>[15]</sup>等研究中每叶片平均分化 7 个不定芽,大大提高了叶片不定芽分化数量,与李永丽<sup>[17]</sup>等在 2001 杨和贾小明<sup>[18]</sup>等在河北杨和新疆杨组培研究中使用 TDZ 均提高不定芽的诱导数量出现相似的结果。

不同种类的生长素类生长调节剂对生根的影响不同,外源的 NAA 进入植物体内迅速转变 IAA,促进基因表达和有关蛋白质的合成,促进植株生根;IBA 可以使植株内某些酶的活性增加,淀粉和蛋白质水解产物增加,细胞渗透吸水能力增强,从而有利于根原始体诱导和形成<sup>[19]</sup>。本研究中发现,NAA 诱导的根系短粗,而 IBA 诱导的根系细长,NAA 和 IBA 配合使用时,生根时间短,根系粗壮数量多,根系发达较长,弥补单独使用的不足,可能是由于不同类的生长素生物学效应互补,从而更有利于生根。与樊军锋<sup>[20]</sup>等在 84K 杨树组培中通过使用不同生长素组合更有利于外植体生根研究结果相一致。

花粉的发育是一个极其复杂的过程,许多基因都与花粉的发育相关。曹必好<sup>[21]</sup>等利用 TA29-*Barnase* 嵌合基因转化菜心,转基因植株开花后,均表现雌性不育,自交不能结实,用未转换的植株正常花粉对雄性不育植株进行授粉,可以正常结实。因此从理论上来说,通过转 *Barnase* 基因的转基因林

木产生的花粉是不育的,可不必担心由花粉传播导致的外源基因的扩散,从而消除人们对转基因林木因花粉传播而造成的潜在威胁的担忧。本研究采用农杆菌介导叶盘转化法,通过除草剂 PPT 连续筛选,共得到 9 株抗性植株,经过 PCR 检测其中有 5 株为阳性植株,检测阳性率 55.6%,初步证明 *Barnase* 基因转化成功,但因可能存在假阳性问题,尚需要进一步做 Northern、Southern、Western 检测。同时,转 *Barnase* 基因能否在转 *Bt* 基因欧洲黑杨基因组上稳定遗传,以及稳定遗传的转 *Barnase* 基因的转 *Bt* 基因欧洲黑杨雄性可育性等诸多问题都需要做进一步研究。

### 参考文献:

[1] ABELSON P H. A third technological revolution[J]. Science, 1998,279(5359):2019-2109.

[2] 田颖川,李太元,莽克强,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.

[3] TIAN Y C,ZHENG J B,YU H M,*et al.* Studies of transgenic hybrid Poplar 741 carrying two insect-resistant genes[J]. Acta Botanica Sinica,2000,42(3):263-268.

[4] MENTAG R,LUCKEVICH M,MORENCY M J,*et al.* Bacterial disease resistance of transgenic hybrid poplar expressing the synthetic antimicrobial peptide D4E1[J]. Tree Physiology, 2003,23 (6):405-411.

[5] 樊军锋,韩一凡,李玲,等. 84K 杨树耐盐基因转化研究[J]. 西北林学院学报,2002,17(4):33-37.

FAN J F,HAN Y F,LI L,*et al.* Salt-resistant gene transformation to poplar 84K[J]. Journal of Northwest Forestry University,2002,17(4):33-37. (in Chinese)

[6] CONFALONIERI M,BELEGHI B,BALESTRAZZI A,*et al.* Transformation of elite white poplar (*Populus alba*) cv. ‘Villafranca’ and evaluation of herbicide resistance[J]. Plant Cell Reports,2000,19(10):978-982.

[7] WARWICK S I,BECKIE H J,HALL L M,*et al.* Gene flow invasiveness and ecological impact of genetically modified crops [J]. Annals of the New York Academy of Sciences,2009,1168 (1):72-99.

[8] HARTLEY R W. Barnase and barstar:two small proteins to fold and fit together[J]. Trends in Biochemical Sciences,1989, 14(11):450-454.

[9] 宋洪元,任雪松,司军,等. 利用 Cre/lox 重组系统获得烟草 TA29-*Barnase* 基因工程雄性不育恢复系[J]. 农业生物技术学报,2010,18(3):468-475.

SONG H Y,REN X S,SI J,*et al.* Construct the restoring line of tobacco engineered male sterile line induced by TA29-*Barnase* gene using Cre/lox site-specific recombination system[J]. Journal of Agricultural Biotechnology,2010,18(3):468-475. (in Chinese)

[6] 张艳红,周广柱,孙学东. 丹东杜鹃花园艺品种及市场调查[J]. 北方园艺,2005(6):10-11.  
ZHANG Y H,ZHOU G Z,SUN X D. Market survey and investigation of Dandong azalea cultivars [J]. Northern Horticulture,2005(6):10-11. (in Chinese)

[7] 王丽芸. 丹东杜鹃花的品种分类与栽培[J]. 北京林学院学报,1983,1(1):71-80.  
WANG L Y. On classification of cultivars of azaleas in Dandong,Liaoning Province,and some experience in their cultivation [J]. Journal of Beijing Forestry College,1983,1(1):71-80. (in Chinese)

[8] 侯伯鑫,陈明皋,余格非,等. 长沙市地栽杜鹃花品种资源[J]. 中国城市林业,2006(5):54-57.

[9] 赵冰,雒新艳,张启翔. 蜡梅品种的数量分类研究[J]. 园艺学报,2007,34(4):947-954.

[10] 洪艳,白新祥,孙卫,等. 菊花品种花色表型数量分类研究[J]. 园艺学报,2012,39(7):1330-1340.

[11] 楚爱香,杨英军,汤庚国,等. 河南垂丝海棠品种数量分类研究[J]. 园艺学报,2009,36(3):377-384.

[12] 张永增,孙文光,蒋鑫,等. 瑞香属和堇花属的数量分类研究[J]. 广西植物,2016,36(1):61-72.

[13] 刘毅,唐德瑞,何佳林,等. 陕西银杏主要栽培品种的数量分类研究[J]. 西北林学院学报,2006,21(6):100-104.  
LIU Y,TANG D R,HE J L,*et al.* Studies on numeric taxonomy of main cultivars of *Ginkgo biloba* in Shaanxi Province [J]. Journal of Northwest Forestry University,2006,21(6):100-104. (in Chinese)

[14] 杨秀平,周玮,李煜,等. 杜仲无性系叶片解剖结构及抗旱性评价[J]. 西北林学院学报,2016,31(1):119-125.  
YANG X P,ZHOU W,LI Y,*et al.* Drought resistance and leaf anatomical structure of *Eucommia ulmoides* clones [J]. Journal of Northwest Forestry University,2016,31(1):119-125. (in Chinese)

[15] 张春影,王艳,李美善,等. 长白山不同海拔牛皮杜鹃叶片解剖结构的比较分析[J]. 延边大学农学报,2014,36(1):39-43.

[16] 韩雪源,张延龙,牛立新. 39 个牡丹品种的形态学分类研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2014,42(9):128-136.  
HAN X Y,ZHANG Y L,NIU L X. Morphological traits based taxonomy of 39 tree peony cultivars [J]. Journal of Northwest A&F University:Nat. Sci. Ed.,2014,42(9):128-136. (in Chinese)

[17] 容丽,陈训,汪小春. 百里杜鹃杜鹃属 13 种植物叶片解剖结构的生态适应性[J]. 安徽农业科学,2009,(37)3:1084-1088.

[18] 赵冰,司国臣,顾欣,等. 秦岭秀雅杜鹃 7 个野生群体形态性状的变异分析[J]. 植物研究,2012,32(5):561-566.  
ZHAO B,SIG G C,GU X,*et al.* Population variation analysis of seven *Rhododendron concinnum* wild populations in Qinling Mountains [J]. Bulletin of Botanical Research,2012,32(5):561-566. (in Chinese)

(上接第 125 页)

[10] 何业华,熊兴华,官春云,等. 根癌农杆菌介导 TA29-Barnase 基因转化甘蓝型油菜的研究[J]. 作物学报,2003,29(4):615-620.  
HE Y H,XIONG X H,GUAN C Y,*et al.* The pTA29-Barnase chimeric gene transformation of Brassica napus mediated by *Agrobacterium*[J]. Acta Agronomica Sinica,2003,29(4):615-620. (in Chinese)

[11] 傅荣昭,曹光诚,马江生,等. 用基因枪法将人工雄性不育基因导入小麦的研究初报[J]. 遗传学报,1997,24(4):358-361.

[12] 于来,安新民,曹冠琳,等. PtAP3 不育结构转化毛白杨的研究[J]. 北京林业大学学报,2010,32(5):15-20.  
YU L,AN X M,CAO G L,*et al.* Genetic transformation of *Populus tomentosa* Carr. with sterility construct of PtAP3 [J]. Journal of Beijing Forestry University,2010,32(5):15-20. (in Chinese)

[13] LUO H,KAUSCH A P,HU Q,*et al.* Controlling transgene escape in GM creeping bentgrass [J]. Molecular Breeding,2005,16(2):185-188.

[14] RUIZ O N,DANIEL L H. Engineering cytoplasmic male sterility via the chloroplast genome by expression of  $\beta$ -ketothiolase[J]. Plant Physiology,2005,138(3):1232-1246.

[15] 李玲,齐力旺,韩一凡,等. TA29-Barnase 基因导致抗 Bt 转基因欧洲黑杨雄性不育的研究[J]. 林业科学,2000,36(1):28-36.  
LI L,QI L W,HAN Y F,*et al.* A study on the introduction of male sterility of anti-insect transgenic *Populus nigra* by TA29-Barnase gene[J]. Scientia Silvae Sinicae,2000,36(1):28-36. (in Chinese)

[16] 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):134.

[17] 李永丽,周洲,范晶超,等. 2001 杨组培再生体系建立[J]. 西北林学院学报,2012,27(6):83-87.  
LI Y L,ZHOU Z,FAN J C,*et al.* Establishment of regeneration system for *Populus×euramericana* cv. “2001”[J]. Journal of Northwest Forestry University,2012,27(6):83-87. (in Chinese)

[18] 贾小明,樊军锋,王娟娟. 河北杨和新疆杨离体叶片诱导不定芽研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(12):110-114,120.

[19] 张颖. 秤锤树扦插繁殖技术及生根机理的研究[D]. 南京:南京林业大学,2009.

[20] 樊军锋,李玲. 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):33-36.  
FAN J F,LI L. Establishment of leaf-explant regeneration system of poplar 84K[J]. Journal of Northwest Forestry University,2002,17(2):33-36. (in Chinese)

[21] 曹必好,孟成民,雷建军,等. TA29-barnase 基因转化菜心[J]. 生物工程学报,2008,24(5):881-886.  
CAO B H,MENG C M,LEI J J,*et al.* The pTA29-barnase chimieric gene transformation of *Brassica campestris* L. subsp. *chinensis* Makino var. *parachinensis* mediated by *Agrobacterium*[J]. Chinses Journal of Biotechnology,2008,24(5):881-886. (in Chinese)