

草木樨 *PUTNHX* 基因的转化及转基因苗的耐盐性

刘太林¹, 杨静慧¹, 刘艳军¹, 张伟玉²

(1. 天津农学院 园艺系 天津 300384 2. 天津农学院 机电工程系 天津 300384)

摘 要:以草木樨破坏生长点的茎尖作为外植体,在含有不同浓度激素的分化培养基上诱导新生芽。获得最佳分化培养基配方 MS+4 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA。利用农杆菌侵染的方法进行 *PUTNHX* 基因的转化,获得大量转基因苗。在含盐量分别为 0.4%、0.8%、1.2% 的培养基中测定转化苗的耐盐性。结果表明:在 0.8% 浓度下,转化苗生长时间明显高于野生苗。野生苗第 3 周已全部死亡,而转化苗仅有个别叶片变黄,说明转基因苗可以耐 0.8% 的盐。*PUTNHX* 基因的转化确实提高了草木樨的耐盐性。

关键词:草木樨;分化;农杆菌;转基因;耐盐性

中图分类号:S 551⁺.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)11-0044-04

盐胁迫逆境是影响农业生产和生态环境的重要因素之一。盐碱地中过多的 Na^+ 在胞质中积累会造成对植物的毒害,植物在长期的进化中形成一些适应和耐受盐胁迫的机制。其中一种就是植物通过外排 Na^+ 和液泡区隔化 Na^+ 来减少 Na^+ 的毒害,这一过程由 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白来完成。该蛋白的功能与植物的耐盐性

的关系及其分子生物学研究是近年来人们研究的热点问题^[1]。此外在当今果品生产中果农大多采取果粮间作形式,由于长期果粮间作大量施用化肥,轻视有机肥施用,造成果园土壤板结,肥力低下,与当前保护生态环境、发展可持续农业相矛盾。果园土壤退化日渐加快,腐殖质和全氮含量明显下降,严重影响果品质量^[2]。利用绿肥改良果园土壤,提高果实品质是切实可行的。

随着分子生物学的发展,植物耐盐基因工程已成为当前研究的热点,植物基因工程为耐盐新品种的选育提供新的途径^[3]。拟南芥 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 (*AtNHX1*) 是最早被克隆的植物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因,是第 1 个用于改善植物耐盐性的基因。将 *AtNHX1* 基因转入荞麦后,植株仍可在高盐碱土上正常生长,荞麦的重要营养成分不受影响。过表达 *AtNHX1* 使高羊茅 (*Festuca arundinacea*) 具有耐盐性。

该研究所用的基因 *PUTNHX* 是从耐盐性很强的

第一作者简介:刘太林(1983-),男,在读硕士,研究方向为果树生物技术。E-mail: liliu1983913@163.com。

通讯作者:杨静慧(1961-),女,教授,硕士生导师,现主要从事园艺植物栽培育种与生物技术研究工作。E-mail: Jinghuiyang2@yahoo.com.cn。

基金项目:天津市科委科技支撑计划资助项目(07ZCKFNC01100、08ZCKFNC01200);天津市农业科技成果转化与推广资助项目(0504018)。

收稿日期:2009-05-20

Abstract: Based on aggregation index method, Iwao's regressive model analysis method and Taylor's power law method, this article analyzed the spatial distribution pattern of gall in chestnut plantation in the area of Huairou in Beijing. The results indicated that the distribution of gall of chestnut gall wasp was the aggregated distribution pattern and the pattern was aggregate in any density of the population of chestnut gall wasp in a chestnut plantation. The higher the population density of chestnut gall wasp, the higher its aggregated degree in the chestnut plantation was. In the whole crown, the number of gall of chestnut gall wasp was different significantly in the orientation of eastern, western, southern and northern crown of the trees. The population density was significantly different in top, middle and low crown layers. The Iwao's method was applied to analyze the spatial distribution pattern in different orientations of crown and different crown layers. The result showed that the distribution of gall was aggregate in most of orientations and crown layers. Based on Iwao's new sequential sampling method, the sequential sampling analysis table was listed, which provided a basis for the sampling survey number and a threshold for control.

Key words: *Dryocomus kuriphilus* Yasumatsu; Gall; Chestnut plantation; Spatial distribution pattern

盐生植物碱茅(*Puccinellia chinampoensis*)中提取的。碱茅又名铺茅、朝鲜碱茅,是禾本科碱茅属多年生草本植物。根系发达,须根多而稠密,抗旱能力强。耐盐碱,在土壤 pH 达 8.8 的盐碱土上仍能良好生长,能够抗御低温的侵袭,在海拔 3 300 ~ 3 700 m 的高寒地区,当冬季绝对低温达 - 38℃,且没有积雪覆盖时,越冬率可达 95% 以上。日本东京大学教授 Takano T 正是利用碱茅的生长习性,从中国黑龙江其它植物很少生存的重盐碱地上采集获得材料,提取出 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *PUTNHX*。

草木樨,豆科草木樨属,1 a 生或 2 a 生草本植物^[4]。适应性很广,既能作牧草、绿肥,又能防风挡沙,保持水土^[5-6]。它可以改造土壤,培肥地力,具有较高的经济价值。它是干旱半干旱地区改良退化土壤的优良牧草。草木樨还是优良的蜜源植物。开花期长达 2 个多月,所产的蜜白而甜。据查,种草木樨养蜂,蜜的产量可提高 1 倍多,可开发为放蜂基地^[7]。鉴于草木樨的优良品性,国内外学者对有关牧草的耐盐性作了大量研究^[8-10]。Yamada T^[11] 利用 24 个不同品种白花草木樨做再生试验,获得 2 种基因型再生根比较容易,选出 1 个品种适合于转基因改造。草木樨组织培养的研究多使用草木樨的子叶和下胚轴作为外植体,获得高效再生体系^[12-13]。但是利用破除茎尖生长点的顶芽作为试材进行基因转化研究很少。该研究通过农杆菌侵染法研究 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *PUTNHX* 的转化,提高了转化苗的耐盐性。为基因转化提高植物抗性提供依据,也有利于促进盐碱土壤的改良。

1 材料与方法

1.1 试验材料

宁夏草木樨由宁夏银川林业局提供,为当年种子。*PUTNHX* 基因由日本东京大学教授 Takano T 提供。供试盐为分析纯 NaCl。

1.2 试验方法

1.2.1 再生体系的确立 把草木樨种子播种在 1/2MS 的培养基上,从获得的实生苗剪去顶端茎尖部分,取剩余的上胚轴(破坏生长点的茎尖)作为外植体,接种在不同激素的分化培养基上。分别接种 5 瓶,每瓶 8 株,培养条件为 28℃、24 h 光照(光强 2 000 lx)。从接种后每 7 d 观察 1 次,主要观察外植体及其伤口部位颜色变化和再生芽的生长情况。

1.2.2 卡那霉素浓度的筛选 以草木樨无菌苗上胚轴为外植体,放在含有 0、25、50、75、100 mg/L 卡那霉素的分化培养基(MS+4 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA)上进

行再生芽的诱导。外植体在不同卡那霉素浓度培养基上分别接种 3 瓶,每瓶 5 株,培养条件为 28℃、24 h 光照(光强 2 000 lx)。从接种后每 7 d 观察 1 次,主要观察外植体及其伤口部位颜色变化和再生芽的生长情况。经 14 d 培养后,对每种处理的分化进行统计。

1.2.3 *PUTNHX* 基因的转化 *PUTNHX* 基因被构建到载体 pBI 121 上,利用农杆菌介导的转化方法转化草木樨,具体操作是:取农杆菌 LBA4404 的一个单菌落,接种到 LB 液体培养基中过夜振荡培养,待其 OD 值为 0.4 时,取出侵染实生苗上胚轴切成 1.0 cm 的小段 10 min,用无菌滤纸吸干多余的菌液,然后将其放在表面铺有滤纸的分化培养基上,每个培养皿中接 30 株,在避光的条件下 28℃共培养 2 d 后,经无菌 MS 液体培养基冲洗后接种于附加卡那霉素(50 mg/L)的分化培养基上 MS+BA 4 mg/L+IAA 0.2 mg/L,诱导转化芽。培养条件为 28℃、24 h 光照(光强 2 000 lx)。从接种后每 7 d 观察 1 次,主要观察外植体及其伤口部位颜色变化和愈伤、再生芽的生长情况。经 2 周培养后,切取再生抗性幼芽转接到新的分化培养基中,连续经过 3 次转接后,存活下来的视为转化苗。

1.2.4 转基因芽的伸长培养和生根 将转化苗接到附加卡那霉素 50 mg/L 的伸长培养基 MS+1 mg/L BA+0.2 mg/L IAA 中长大后,再移入附加卡那霉素 50 mg/L 生根培养基 1/2 MS+0.2 mg/L NAA 生根培养 28 d。

1.2.5 转基因苗的耐盐性测定 选取生长 1 个月的长势相近的转化苗接在含 NaCl 分别为 0.4%、0.8%、1.2%的 1/8 MS 培养基中。对照组选取长势与转化苗相近的野生苗分别接种到盐浓度 0.4%、0.8%、1.2%的 1/8 MS 培养基上。每瓶中接入幼苗数目 3~5 株,设 3 次重复。每天观察生长状况,每 7 d 记录 1 次生长状况,共观察 35 d。

1.2.6 转 *PUTNHX* 植株的移栽 将生根的转化苗从培养箱中移到室温 25℃下进行练苗 2 d,然后将转化苗分别栽入灭菌的营养土中,在室温下保湿培养,浇蒸馏水。

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度对草木樨茎尖再生的影响

由表 1 可以看出,不同浓度的 BA 对草木樨再生的影响不同,随着 BA 激素浓度的增加,草木樨再生率增高,平均每个外植体产芽数也增多,但从外植体产芽的质量来看,当 BA 浓度增大到 5 mg/L 时,外植体产芽的形态也出现异常,其中畸形芽的数量开始增多,出现不同程度的玻璃化现象。所以,比较理想的草木樨茎尖再生培养基配方:MS+4 mg/L BA+0.2 mg/L IAA。

表 1 不同激素浓度对草木樨再生的影响

培养基激素浓度 Homone concentration of culture medium	接种外植体数 Num of explants	分化外植体数 Num of explant differentiation	不定芽分化率 The rate of differentiation/ %	平均每个外植体 产芽数 Num of Bud
MS+5 mg/ L BA+0.2 mg/L IAA	40	40	100. 0	5.3
MS+4 mg/ L BA+0.2 mg/L IAA	40	40	100. 0	4.8
MS+3 mg/ L BA+0.2 mg/L IAA	40	31	77.5	2.7
MS+2 mg/ L BA+0.2 mg/L IAA	40	12	30.0	1.9

2.2 不同浓度卡那霉素对外植体的筛选效果

由表 2 可以看出,卡那霉素 25 mg/ L 时,再生率已显著下降。浓度为 50 mg/ L 以上,没有新芽的再生。14 d 时,在卡那霉素为 75 mg/ L 的培养基上,外植体已经发黄;在 100 mg/ L 的培养基上,外植体已全部死亡。确定转化筛选压力以接入外植体后植株不生长但短时间内不死亡作为临界浓度。故确定 50 mg/ L 作为筛选的压力,可以很好的筛选出转化苗。

2.3 转基因苗的耐盐性测定(见表 3)

表 2 培养 14 d 后不同卡那霉素的浓度对外植体的筛选效果

Table 2 Effects of different Kanamycin concentration on explant screens of <i>M. Suavenas</i>	
不同卡那霉素的浓度 Different concentration of Kanamycin/ mg * L ⁻¹	再生率 Rate of regeneration/ %
0	100
25	68.3
50	0
75	0
100	0

表 3 不同盐浓度下野生苗和转基因苗的生长状况

Table 3 The growth conditions of wild and transgenic plants under different salt concentrations				
	0(CK)	0.4%	0.8%	1.2%
第 1 周 The first week	野生苗和转化苗生长正常	野生苗和转化苗生长正常	野生苗和转化苗生长正常	野生苗和转化苗生长正常
第 2 周 The second week	野生苗和转化苗生长正常	野生苗和转化苗生长正常	野生苗和转化苗生长正常	野生苗叶片开始变黄, 转化苗正常
第 3 周 The third week	野生苗和转化苗生长正常	野生苗开始变黄, 转化苗正常	野生苗叶片失绿, 死亡; 转化苗个别叶片变黄	野生苗叶失绿, 死亡; 转化苗变黄, 叶失绿
第 4 周 The fourth week	野生苗和转化苗均开始变黄	野生苗全部死亡, 叶失绿 白色 转化苗正常	野生苗全部死亡, 叶失绿, 白色; 转化苗开始变黄	野生苗全部死亡, 叶失绿, 白色; 转化苗死亡, 失绿

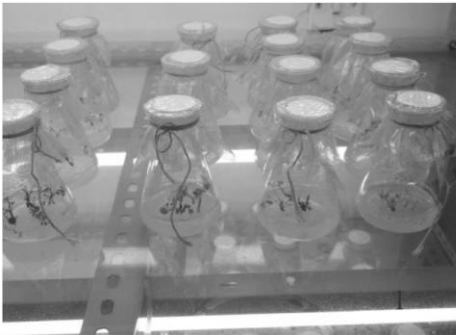


图 1 转化苗第 4 周的生长状况

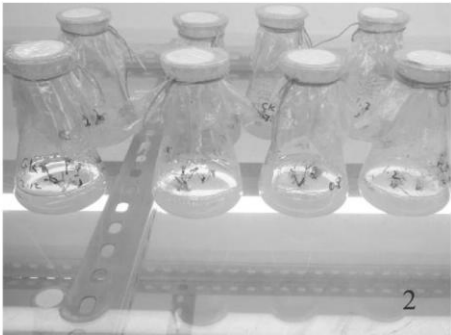


图 2 野生苗第 4 周的生长状况

Fig. 1 The growth conditions of transgenic plants in the fourth week

Fig. 2 The growth conditions of wild plants in the fourth week

3 结论与讨论

3.1 优良的组织快繁体系

植物的再生是转化的关键步骤,对草木樨茎尖而言最佳的再生培养基为 MS+4 mg/ L BA+0.2 mg/ L IAA,伸长培养基 MS+1 mg/ L BA+0.2 mg/ L IAA,生根培养基 1/2 MS+0.2 mg/ L NAA。

3.2 转基因苗的耐盐性

通过组织培养获得的转基因苗在整个观察期内,在

第 3 周时 0.8%盐浓度下野生苗已经死亡,而转化苗仍然存活可见 *PUTNHX* 基因可以显著提高植物的抗盐性,可以耐 0.8%的 NaCl。

3.3 组培苗的转接

组织培养的草木樨应该每 4 周转接 1 次,在空白对照组第 4 周出现叶片变黄就是因为组织培养的幼苗产生过量乙烯,导致衰老。这也是转基因组在 0.8%盐浓度下第 4 周叶片变黄的原因。组织培养苗和土壤中生

长的苗的生长环境有所差异, 所以转基因苗在土壤中的耐盐性需要进一步鉴定, 还需要进一步将移栽的转化苗进行研究, 来确定其耐盐性。

3.4 植物耐盐基因工程展望

利用外源基因的导入能打破物种之间的生殖隔离障碍, 丰富基因资源; 转基因技术直接在基因水平上改造植物的遗传物质, 定向改造植物的遗传性状或特性, 从而有效地提高植物的耐盐性, 弥补常规育种方法的不足^[14]。但是植物的耐盐性属于多基因性状, 涉及多种生理和生化机制以及多个基因。虽然单基因的转入也能在一定程度上提高植物的耐盐性, 但多基因表达策略对耐盐性获得更大的提高无疑更具潜力^[15]。目前正在研究转录因子的表达基因, 因其对多个基因表达都起到决定性作用, 它的优势正在进一步显现。随着分子生物学的进一步发展, 植物基因工程必将培育出优良的新品种, 对植物的抗逆性提高做出更大贡献。

参考文献

[1] 张俊莲, 张金文, 陈正华, 等. 植物 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白与植物耐盐性的研究进展[J]. 草原与草坪, 2005(4): 3-8.
[2] 李月芬, 汤杰, 林年丰, 等. 黄花草木樨改良盐碱土的试验研究[J]. 水土保持通报, 2004, 24(1): 8-11.
[3] 张恒, 付畅, 崔继哲. 植物耐盐基因工程研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2008(2): 11-14.

[4] 刘家宜. 天津植物志[M]. 天津: 天津科技出版社, 2004: 53.
[5] 何冬梅. 白花草木樨的栽培技术[M]. 呼和浩特: 内蒙古畜牧业杂志社, 2004: 76.
[6] 马丽. 浅谈草木樨的综合利用[J]. 新疆畜牧业, 2005(4): 56-57.
[7] 王海光, 李自超. 植物干旱胁迫应答基因及其产物研究进展[C]. 2003 年全国作物遗传育种学术研讨会论文集, 2003.
[8] 黄俊轩, 田瑞娟, 李双跃, 等. 盐胁迫下苜蓿品种的生理特性变化[J]. 北方园艺, 2007(6): 143-146.
[9] 汤洁, 李月芬, 林年丰, 等. 应用生物技术改良退化土壤的效果—以黄花草木樨改良盐碱化土壤为例[J]. 生态环境, 2004(1): 51-53, 60.
[10] Tobe K, Li X, Omasa K. Effects of sodium chloride on seed germination and growth of two Chinese desert shrubs: *Haloxylon ammodendron* and *H. persicum* (Chenopodiaceae)[J]. Australian Journal of Botany, 2000, 48: 55-460.
[11] Yamada T. Selection of a highly-regenerative genotype of white clover (*Trifolium repens* L.) and plant regeneration from protoplasts derived from this genotype[J]. Euphytica, 1989, 44: 181-186.
[12] Beattie L D, Garrett R G. Adventitious shoot production from immature embryos of white clover[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1995, 42: 67-72.
[13] White D W R, Voisey C. Prolific direct plant regeneration from cotyledons of white clover[J]. Plant Cell Reports, 1994, 13: 303-308.
[14] 孙建昌, 王兴盛, 杨生龙. 植物耐盐性研究进展[J]. 干旱地区农业研究, 2008, 26(1): 226-229.
[15] 王镭, 徐德昌, 朱延明, 等. 离子平衡调节基因及其在植物耐盐基因工程中的应用[J]. 东北农业大学学报, 2008, 36(6): 80-83.

The *PUTNHX* Gene Transformation and The Salt-tolerance Characteristic of Transgenic Plants in *Melilotus suavena*

LIU Tai-lin¹, YANG Jing-hui¹, LIU Yan-jun¹, ZHANG Wei-yu²

(1. Department of Horticulture, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China; 2. Department of Mechanical and Electrical Engineering, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China)

Abstract: The broken terminal buds were obtained as explants, and were inoculated on the differentiation medium with different hormones. The best differentiation medium MS+4 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA was acquired. The *PUTNHX* gene was transformed into *Melilotus suavena* by *Agrobacterium*-mediated transformation method. A large number of transgenic seedlings were obtained. The salt-tolerance characteristic of transgenic plants was determined on the medium which respectively contained NaCl 0.4%, 0.8%, 1.2%. The results showed that under the salt concentration 0.8%, the living time of the transgenic plants was obviously longer than that of wild plants. In the third week, the wild plants were totally dead, while the transgenic leaves were separate yellow. This can be accounted for that the salt tolerance of transgenic plants was 0.8% NaCl. The salt tolerance of sweet clover was actually improved by *PUTNHX* gene transformation.

Key words: *Melilotus suavena*; Differentiation; *Agrobacterium*; Gene transformation; Salt tolerance