

八棱海棠转 *PuNHA* 基因的遗传转化研究

朱文碧¹, 刘海学¹, 黄俊轩², 李建科², 武春霞², 杨静慧²

(1. 天津农学院教务处, 天津 300384; 2. 天津农学院 园艺系, 天津 300384)

摘 要:以八棱海棠茎尖分生组织为外植体, 经农杆菌介导将 *PuNHA* 基因导入八棱海棠, 在 MS+BA 4 mg/L+NAA 0.2 mg/L+除草剂 4 mg/L+羧苄青霉素 500 mg/L 的培养基中筛选培养, 转化率 8.7%。结果表明:经 PCR、Southern Blot 和 Northern Blot 分析得出, *PuNHA* 基因已经整合到八棱海棠基因组内, 并且可以转录为 mRNA, 获得了转基因植株; 同时将转基因植株进行盐胁迫处理, 耐盐能力有显著提高, 由原来的耐盐量 2% 提高到了 3%, 其耐盐能力提高了 50%。

关键词:八棱海棠; 再生体系; 盐胁迫; 耐盐能力
中图分类号:S 661.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)04-0121-04

苹果的耐盐性在落叶果树中属于中等^[1], 因此它的耐盐能力主要取决于砧木^[2], 生产上常用砧木的耐盐能力一般在 2.0%~2.5% 之间^[3]。苹果的耐盐碱问题实质是砧木的耐盐碱问题^[4], 选择高耐盐能力砧木是提高苹果耐盐力的关键。

八棱海棠(*Malus robusta* Rehd.)是目前我国生产上广泛使用的苹果砧木品种, 具有适应性强、与苹果品种亲和力好等诸多优点。以八棱海棠为砧木的苹果树, 根系发达, 生长势强, 乔化。由于八棱海棠抗缺铁胁迫的能力较差, 特别是在石灰性土壤中种植极易出现缺铁黄化现象。为此刘玉东^[5]、渠慎春^[6]、王红霞^[7]分别将铁蛋白基因 *FRO2*、*LeIRT2*、*IRT1* 导入八棱海棠中, 提高其耐缺铁胁迫的能力, 可以基本上解决目前我国大部分苹果栽培区域因缺铁而黄化严重的问题。此外丛郁利用超声波辅助农杆菌介导法和超声波直接转导法将 *rolC* 基因成功转入八棱海棠^[8]。王三红将 *DREB*、*IRT1*、*rolC* 融合三价基因 *Rir1* 通过农杆菌介导法转化八棱海棠, 验证了进行多基因转化八棱海棠的可行性^[9]。

PuNHA 基因是由东京大学的高野哲夫先生从盐生植物星星草(*Puccinellia tenuiflora* (Turcz.) Scribn.

& Merr.) 中克隆出来的编码 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的基因。该试验利用农杆菌介导法将 *PuNHA* 基因转入八棱海棠植株, 希望能使 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白得到超量表达, 以进一步提高八棱海棠的耐盐性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

转 *PuNHA* 基因的八棱海棠组培苗由天津农学院园艺园林实验室提供。八棱海棠的高效遗传转化再生体系, 是按刘玉东等的方法获得^[5]。*PuNHA* 基因和工程菌种由天津农学院杨静慧教授提供。

1.2 培养基和培养条件

试验所用的基本培养基为 MS 培养基各种成分均参照参考文献记述的方法配制^[10]。所有培养基中均含琼脂 0.7%, 蔗糖 3%。

增殖培养基: MS+BA 1.5 mg/L+IAA 0.3 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂粉 7 g/L。

分化培养基: MS+BA 4.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂粉 7 g/L。

伸长培养基: MS+6-BA 1.0 mg/L+ IAA 0.3 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂粉 7 g/L。

生根培养基: 1/2MS+IBA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂粉 7 g/L。

所有培养基灭菌前用 0.1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 将培养基 pH 值调至 5.8, 在 121 ℃(1.2 kg/cm²) 高压、湿热灭菌 18 min。

外植体培养条件: 培养温度为 28 ℃, 光照强度 2 000 lx, 光照 24 h。

1.3 *PuNHA* 基因在八棱海棠中的转化

1.3.1 除草剂浓度的筛选 取长出 5~8 片叶子生长健壮的八棱海棠试管苗, 分别以叶片、节间茎段、破坏生长

第一作者简介:朱文碧(1982-), 女, 江苏常州人, 硕士, 研究实习员, 现主要从事实践教学管理工作和生物技术研究。E-mail: zhuwenbi@tjac.edu.cn。

通讯作者:杨静慧(1961-), 女, 甘肃兰州人, 博士, 教授, 现主要从事园艺和生物技术方面的教学与研究工作。E-mail: jinghuiang2@yahoo.com.cn。

基金项目:天津市科委科技支撑计划资助项目(08ZCKFNC01200)、(07ZCKFNC01100)。

收稿日期:2009-10-26

点的组织为外植体, 放在含有除草剂 4 mg/L 的分化培养基上进行再生芽的诱导。其中叶片为剪掉叶缘及叶柄 节间茎段为 5 mm 大小, 茎尖长度为 2~3 mm, 并将其生长点用解剖针破坏。每种外植体在不同除草剂浓度培养基上分别接种 10 块, 培养条件为 28℃ 光强 2 000 lx, 光照 24 h, 从接种后每 2 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 20 d 培养后, 对每种处理的结果进行统计。

1.3.2 *PuNHA* 基因的转化 挑取 1 个生长在 LB 平板上的 C58C1 单菌落, 接种在含有 50 mg/L 的卡那霉素和 40 mg/L 的庆大霉素的 LB 液体培养基中, 28℃ 在摇床上过夜培养, 待其浓度为 0.4 (OD₅₅₀ 值), 取出并浸染八棱海棠试管苗茎尖外植体后破坏生长点, 然后在 28℃ 的黑暗条件下共培养 2 d 将外植体接种到含有 4 mg/L 除草剂、500 mg/L 的羧苄青霉素的分化培养基上诱导转化芽。培养条件为 28℃, 光强 2 000 lx, 24 h 光照。培养 28 d 后统计转化率。

1.3.3 转 *PuNHA* 基因八棱海棠芽的伸长培养和生根 将除草剂筛选过的转化八棱海棠芽转入添加除草剂 4 mg/L 的伸长培养基中, 使植株长大、长高 (培养约 40 d 左右)。当植株长到 2~3 cm 高时, 转入添加除草剂 4 mg/L 的生根培养基中进行生根培养。培养 30 d 后调查生根情况。结果表明, 转基因植株能够在添加除草剂 4 mg/L 的生根培养基上正常生根, 且生根率和每个新梢的生根数量与对照 A (非转化新梢在不含除草剂的生根培养基上) 无明显的差异。对照 B (非转化新梢在添加除草剂的生根培养基上) 则无不定根分化, 外植体随培养时间的延长逐渐变褐而死亡。因此得到的抗性植株初步鉴定为转基因植株。

1.3.4 转 *PuNHA* 基因八棱海棠植株的耐盐试验 将转基因苗和非转基因苗分别接入 1/2MS+不同盐浓度的培养基上。在预备试验中, 经观察得出八棱海棠的耐盐能力为 2‰ 左右。该试验选用的 NaCl 浓度分别为: 0‰、2‰、3‰、4‰、5‰ 共 5 个浓度, 每个处理 3 瓶, 每瓶接种 3 个外植体, 每 7 d 观察 1 次, 培养 30 d 后观察记录。

2 结果与分析

2.1 不同浓度除草剂的筛选效果

用于 *PuNHA* 基因转化的表达载体中的筛选标记基因是除草剂。因此, 除草剂浓度的选择是转化成功的关键。

外植体在不同浓度的除草剂培养基上培养 20 d 后, 统计再生率。从表 1 可以看出, 在无除草剂时, 不同外植体的再生率有显著差别, 其中破坏生长点的组织再生率最高, 叶片最低。从培养过程来看, 在诱导再生的初

期, 外植体的伤口部位都先被诱导出愈伤组织, 但从愈伤的颜色上来看, 叶片、节间茎段多为白色, 而破坏生长点的组织为绿色, 并随培养时间的增加, 再生芽很快从愈伤上分化长出。

表 1 不同浓度除草剂对八棱海棠不同外植体的筛选效果

不同除草剂浓度 / mg · L ⁻¹	再生率/ %		
	叶片	节间茎段	破坏生长点组织
0	10.3	26.1	100.0
1	8.6	25.6	100.0
2	6.7	18.2	83.4
4	0	0	0
6	0	0	0
8	0	0	0

当除草剂浓度为 2 mg/L 时, 基本不影响外植体的再生率, 而浓度达到 4 mg/L 时, 所有外植体都无再生芽。在诱导再生初期 (大约 7 d) 除草剂浓度 1~4 mg/L 的处理中外植体伤口部位都无变化; 除草剂浓度为 8 mg/L 的处理, 外植体开始出现变黄。15~20 d 后, 除草剂浓度为 4 mg/L 的处理上的外植体开始变黄, 伤口部位也出现萎缩, 而除草剂浓度为 1 mg/L 和 2 mg/L 处理中外植体一直较绿, 除伤口部位有再生芽分化外, 外植体的大小和颜色基本无变化。在 20 d 后, 除草剂浓度为 4~8 mg/L 处理中外植体开始枯萎, 最后死亡。因此, 最后确定 4 mg/L 的除草剂作为筛选浓度, 进行基因转化。

2.2 八棱海棠 *PuNHA* 基因的转化

从表 2 中可以看出, 以八棱海棠试管苗不同部位为外植体对 *PuNHA* 基因转化效率有明显差异。转化率最高的是以破坏生长点的组织为外植体的处理, 叶片、节间茎段的转化芽很少。培养 2 周左右, 外植体之间开始出现较明显的不同, 培养 28 d 后, 大部分接种的叶片组织, 伤口部位有白色愈伤组织长出; 节间茎段多从两端长出白色愈伤, 无转化芽出现; 破坏生长点的组织, 转化芽分化率最多, 为 8.7 %。

表 2 不同外植体基因转化率

外植体类型	块数	再生芽数	转化率/ %
叶片	107	2	1.8
节间茎段	116	4	3.4
破坏生长点的组织	92	8	8.7

2.3 转 *PuNHA* 基因八棱海棠植株的 PCR 及 Southern Blot 检测

图 1 可以看出, 在检测的 8 株突变株中, 其中 5 株转化苗在 PCR 扩增时, 均扩增出 1 条特异谱带 (195 bp), 该片段为 35S 启动子的保守序列, 由此表明外源基因已经整合到八棱海棠基因组中。图 2 可以看出, 35S 启动子基因片段 DNA 和转化植株 DNA 均有杂交信号, 而未转化植株的 DNA 无杂交信号。

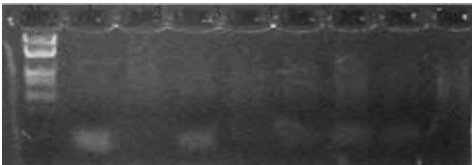


图1 转化苗的35S启动子PCR扩增检测(195bp)
注: 1, 3, 5, 6, 7 为转基因苗, 2, 4, 8 为非转基因苗 CK 为非转基因植株。

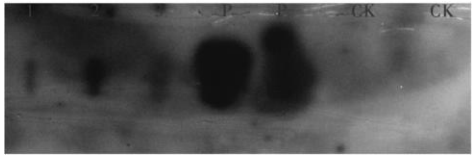


图2 转化苗的Southern blot 检测
注: 1, 2, 3 为转基因苗 P 为 35S 启动子基因片段。

2.4 转 *PuNHA* 基因八棱海棠植株的 Northern Blot 检测

如图3 Northern Blot 检测显示, 转 *PuNHA* 基因八棱海棠 mRNA 的表达量增加, 比野生型即非转基因植株的表达量大。

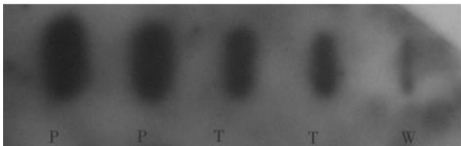


图3 八棱海棠植株 Northern Blot 检测
注: P: pCB302-2/ *PuNHA* 质粒阳性对照 W: 野生型-非转化株, T: 转化株。

表3 *PuNHA* 基因八棱海棠植株的耐盐性比较

植株类型	NaCl 盐浓度				
	0 ‰	2 ‰	3 ‰	4 ‰	5 ‰
对照 (非转化苗)	植株生长良好, 叶色正常绿色	植株生长不良, 植株矮小, 部分叶片变黄, 植株生长量与转化株相比较少	植株生长不良, 植株矮小, 大量叶片变黄, 植株生长量与转化株相比较少	植株生长不良, 植株矮小, 叶片变黄, 基本无生长量, 部分出现死亡	植株生长不良, 植株矮小, 叶片变黄, 大部分死亡
转化株	植株生长良好, 叶色正常绿色	植株生长良好, 叶色正常绿色, 植株生长量与非转化株相比比较大	植株生长良好, 大多数叶色正常绿色, 极少部分叶片变黄, 植株生长量与非转化株相比较大	植株生长不良, 植株矮小, 叶片变黄, 植株生长量较少	植株生长不良, 植株矮小, 叶片变黄, 出现小部分死亡

注: 经盐胁迫 30 d 后统计分析。

植株在进行了 30 d 的盐胁迫处理后, 在盐浓度为 2‰ 的培养基中, 由于盐分的长时间积累, 非转化八棱海棠植株生长也受到抑制, 与盐浓度为 0‰ 的培养基中的非转化植株相比, 生长量明显减少。在盐浓度为 3‰ 的培养基中, 非转化八棱海棠植株生长不良, 植株矮小, 叶片变黄, 表现出明显盐害症状; 而转耐盐基因八棱海棠植株在盐浓度为 2‰、3‰ 的培养基中都能正常生长, 叶色为正常绿色, 且生长量与盐浓度为 0‰ 的培养基中的转化植株相比并没有减少。

由图 4.5 可以看出, 在 3 ‰ 盐胁迫下非转化植株不能在培养基中正常生长, 植株生长缓慢, 叶片黄化。图 4 中转化株在 3 ‰ 盐胁迫下, 植株仍生长正常。这充分证明 *PuNHA* 基因转入了八棱海棠, 得到了表达 (合成了 mRNA), 提高了耐盐性, 满足在盐胁迫环境下植株的正

2.5 转 *PuNHA* 基因八棱海棠植株的耐盐性比较

从表 3 可以看出, 在每周对进行耐盐胁迫的八棱海棠观察过程中发现, 在胁迫的最初的 7 d 非转化八棱海棠植株与转化八棱海棠植株并没有明显的区别。但是在胁迫 15 d 后观察发现, 在盐浓度为 2‰ 的培养基中, 非转化植株和转化植株均能正常生长。在盐浓度为 3‰ 的培养基中, 非转化八棱海棠植株正常生长受到抑制, 表现出轻度的盐害症状; 而转化八棱海棠植株能正常生长。在盐浓度为 4‰ 的培养基中, 非转化八棱海棠植株生长不良, 植株矮小, 叶片变黄, 表现出明显盐害症状; 而转化八棱海棠植株生长良好, 叶色正常绿色。在 5‰ 盐胁迫下非转化株已不能在培养基中正常生长, 植株基本不生长, 叶片黄化, 转化株在 5‰ 盐胁迫下, 植株生长也受抑制, 且表现出一定程度的盐害症状。

常生长。
翟衡^[11] 等研究人员连续 2 a 的盆栽试验调查发现, 八棱海棠其耐盐能力仅为 2.5‰, 而试验中非转化株在 4‰ 盐胁迫下已不能正常生长, 叶片黄化, 表现出明显的盐害症状。转化株在 4‰ 盐胁迫下, 植株生长也受抑制, 但是盐害症状没有非转化株明显。此外, 随着盐胁迫处理时间延长, 培养基中水分的蒸发较多, 加重了盐害的效果。八棱海棠在转耐盐基因之后, 其耐盐能力有显著提高, 至少由原来的 2‰ 提高到了 3‰, 提高了 50%。

总之, 上述结果证明 *PuNHA* 转化的八棱海棠八棱海棠在耐盐的效果上表现显著, 因而完全可以用其做砧木或中间砧, 以解决困扰全球的苹果在盐碱地上栽植的问题。这一转化的成功有非常重要的现实意义。

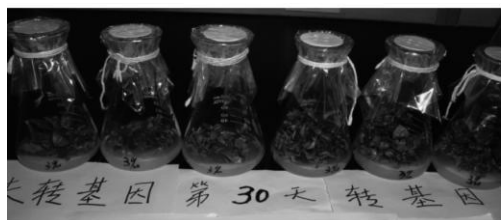


图4 3%盐胁迫下非转基因和转基因苗

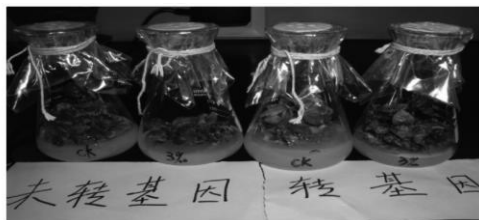


图5 3%盐胁迫下非转基因和转基因苗

3 讨论

遗传转化的最终目的是获得能稳定表达且能遗传外源目的基因的转化植株,这就需要不断观察和检测转基因植株的表达。因此,对于转化植株的筛选就比较严格。为了除去再生植株中的转化嵌合体 and “假阳性”植株,在采用分生组织较多的茎尖部位为外植体时,考虑到原生长点细胞分裂旺盛,筛选压力对生长的抑制较弱,从而容易造成假转化苗,或为嵌合体,因此在试验中已对茎尖生长点进行了破坏。同时,通过愈伤组织再生的植株,总是有一定数量的嵌合体和非转化的“假阳性”植株混在其中,这些植株主要是从远离选择培养基的愈伤组织分化而来,这些细胞逃避了除草剂的筛选。因此,在操作中尽量使分化的愈伤组织尽可能的与选择培养基接触,甚至可将愈伤组织的部分或全部插入培养基中;此外,在植物转基因试验中,常以抗性芽在生根培养基中能否形成侧芽和分支根,作为判断转化植株的形态标准。在添加除草剂的生根培养基中,不诱导生根和产生侧芽的是假转化体。转化纯合体能够在这种培养基上正常生根,而“假阳性”植株和转化嵌合体均不能生根。经过后期的分子检测也表明以上措施有效地降低了假转化株的比例,提高了检测效率。

参考文献

- [1] 查霞娟,孙岚,肖崇彬,等.苹果砧木耐盐性比较试验[J].中国果树,1986(2):5-9.
- [2] 陈瑞珊.果树植物的耐盐力[J].河北农学报,1981(2):73-76.
- [3] 杜中军,翟衡,罗新书,等.苹果砧木耐盐性鉴定及其指标判定[J].果树学报,2002,19(1):4-7.
- [4] Chevreau E, Mourgues F, Reynold J P, et al. Gene transfer for fire blight resistance in pear[J]. Acta Horticulturae, 1999(489): 297-299.
- [5] 刘玉冬,杨静慧,刘艳军,等.提高八棱海棠遗传转化植株再生率技术的研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(2):78-80.
- [6] 渠慎春.转番茄铁载体蛋白基因(LeIRT2)八棱海棠的鉴定[D].南京:南京农业大学,2005:10-11.
- [7] 王红霞.铁载体蛋白基因(IRT1)转化八棱海棠的研究[D].南京:南京农业大学,2006.
- [8] 丛郁.转 rolC 基因八棱海棠的获得及其表达研究[D].南京:南京农业大学,2006.
- [9] 王三红,杨梦悦,顾敏,等.农杆菌介导三价融合基因 Rirol 转化八棱海棠的研究[J].果树学报,2007,24(6):731-736.
- [10] Murashige J, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture[J]. Physiol Plant, 1962, 16: 473-479.
- [11] 翟衡,杜中军,罗新书.苹果砧木耐盐性鉴定[J].山东农业大学学报,1999,30(3):296.

(本文作者还有梁国鲁,单位:西南大学园艺园林学院 400716)

Transform Gene *PuNHA* into *Malus robusta* Rehd.

ZHU Wen-bi¹, LIU Hai-xue¹, HUANG Jun-xuan², LI Jian-ke², WU Chun-xia², YANG Jing-hui², Liang Guo-lu³

(1. Department of Education Administration of Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384; 2. Department of Horticulture of Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384; 3. College of Horticulture and Landscape Southwest University, Chongqing 400716)

Abstract: By using the growing point destroyed of *Malus robusta* Rehd. as explants, the *PuNHA* gene was introduced into *M. robusta* Rehd. Through Agrobacterium mediated transformation. The high quality system was that: the regenerated media (MS+4.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA+4 mg/L herbicides+500 mg/L Carbenicillin). The buds regeneration rate was 7.8%. The transgenic plants were confirmed by PCR, Southern blot and Northern Blot analysis that the *PuNHA* gene was transferred and integrated into the genome of *M. robusta* Rehd. Treated *M. robusta* Rehd. under the concentration of salt, the advantage was obviously higher than non-transformed plants that proved the salt-resistant ability of transgenic plants apparently rose up from 2‰ to 3‰.

Key words: *malus robusta* Rehd.; regeneration system; salty stress; salt-resistant ability;