

巨霸杨组培再生体系的建立及潮霉素抗性试验

王桂英^{1,2}, 刘晓杰¹, 李珊珊², 孙超¹, 杨金库¹, 杨敏生²

(1. 廊坊市农林科学院, 河北 廊坊 065000; 2. 河北农业大学 林木种植资源与森林保护重点实验室, 河北 保定 071001)

摘 要:以巨霸杨为试材, 采用不同植物激素组合及潮霉素不同浓度梯度筛选法, 研究了巨霸杨组培再生体系建立及潮霉素对叶片和茎尖苗生长分化的影响。结果表明: 诱导叶片芽分化的最佳培养基为 MS+6-BA 0.25 mg/L+IBA 0.1 mg/L, 再生芽在 1/2MS+IBA 0.3 mg/L 上生根形成完整植株。通过对无菌苗叶片和茎尖材料不同浓度梯度潮霉素抗性筛选试验, 发现潮霉素(Hygromycin)对巨霸杨产生了较为敏感的选择压力, 随着培养天数的增加潮霉素的抑制作用越来越明显。同茎尖苗比, 叶片对潮霉素更为敏感。叶片培养 2 d 后即有明显受损表现, 茎尖苗在培养 4 d 后才出现损伤。14 d 后, 在 4 mg/L 潮霉素条件下只有个别叶片在叶柄基部有少量芽分化; 6 mg/L 以上潮霉素条件下叶片及茎尖苗则全部失绿死亡。经过对比, 确定巨霸杨的潮霉素筛选临界浓度范围为 4~6 mg/L。该研究为巨霸杨的基因转化奠定了技术基础。

关键词:巨霸杨; 再生体系; 潮霉素; 临界浓度

中图分类号:S 792.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)13-0098-05

转基因技术的应用极大地推动了植物遗传改良的进程。植物外植体经过农杆菌介导法或其它的转化法获得再生植株后, 为了筛选鉴别出阳性转化体, 需要用到诸多的筛选方法, 其中抗生素筛选法是较为常用筛选方法之一。潮霉素(Hygromycin, Hyg)是一种常用的抗性筛选药物, 其抗性基因(潮霉素磷酸转移酶基因 *hpt*)表达产物是一个蛋白激酶, 通过磷酸化潮霉素 B 使其丧失活性^[1-3]。在载体构建及基因转化研究中所用到的许多双元载体中都有 *hpt* 基因, 如 pCambia 1301~1305 等系列质粒载体基本都含有潮霉素抗性基因 *hpt*^[4]。在真核和原核生物中潮霉素 B 筛选假阳性率低, 重复性好, 通过潮霉素 B 对转基因生物进行筛选已经在实验室被广泛选用^[5]。

有关潮霉素的敏感性试验研究在烟草^[6]、棉花^[7]、小麦^[8]、菊花^[9]等植物中已有报道, 随植物种类的不同及所培养外植体的不同, 确定出的潮霉素筛选浓度变化也较大, 从 2.5~125 mg/L 不等。杨树是研究木本植物分子生物学和基因工程的模式植物, 以杨树为外植体进行

的遗传转化中, 以卡那霉素作为筛选标记的研究多见报道^[10-11], 而对潮霉素的使用浓度研究较少。王丹等^[12]通过对山新杨(*Populus davidiana* × *P. bollena*)、小黑杨(*Populus simonii* × *P. nigra*) 和欧美杨(*Populus euramericana*) 的潮霉素试验确定了叶片的敏感性是 3 mg/L, 茎段的敏感性为 6 mg/L。该试验以杨树品种巨霸杨(*Populus deltoides* 50 × *P. deltoides* 36)为研究对象, 在获得巨霸杨组培无菌组培苗的基础上, 探索了诱导叶片芽分化的适宜培养基, 建立巨霸杨组培再生体系。并对叶片和茎尖材料进行了潮霉素不同浓度梯度抗性试验, 以期在潮霉素在杨树遗传转化中的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 植物材料为巨霸杨(*Populus deltoides* 50 × *P. deltoides* 36)。杨树品种巨霸杨属于美洲黑杨(*Populus deltoides*)南方型, 是中国林科院和焦作林科院于 20 世纪 90 年代初以“美洲黑杨 50 号”杨为母本, “美洲黑杨 36 号”杨为父本, 通过人工控制授粉所获得, 2003 年通过国家认定。

1.1.2 培养基 以 MS 为基本培养基, 每升添加琼脂粉 5.5~6.0 g, 白糖 30 g, pH 5.8~6.0。诱导巨霸杨消毒后茎段叶腋芽萌发的培养基, 以 NAA 和 6-BA 组合, 保持 NAA 浓度为 0.1 mg/L, 6-BA 设 4 个浓度梯度分别为 0.15、0.25、0.50、1.00 mg/L, 培养基对应编号为①、②、③、④; 诱导叶片芽分化的培养基, 以 IBA 和 6-BA 组合,

第一作者简介:王桂英(1969-), 女, 博士, 高级林业工程师, 现主要从事植物分子生物学等研究工作。E-mail: moonlight0808@163.com

责任作者:杨敏生(1962-), 男, 博士, 教授, 现主要从事林木遗传育种等研究工作。E-mail: yangms100@126.com

基金项目:国家高技术研究发展计划(“863”计划)资助项目(2011AA100201); 国家自然科学基金资助项目(31370663)。

收稿日期:2015-02-05

保持 IBA 浓度为 0.1 mg/L, 6-BA 设 4 个浓度梯度分别为 0.10、0.15、0.20、0.25 mg/L, 培养基对应编号为⑤、⑥、⑦、⑧。生根培养基: 1/2MS+IBA 0.3 mg/L。

1.1.3 抗生素 试验用抗生素为潮霉素 B, 是由吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)产生的氨基糖苷类抗生素。潮霉素 B 的工作浓度根据细胞类型、生长条件等而变化, 一般选择在 10~14 d 能够杀死所有细胞的最小浓度为最佳筛选浓度。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌试管苗的获得 于 12 月中旬采回巨霸杨休眠枝条, 将枝条修剪成 20 cm 左右的段, 枝条顶部细嫩部分水插放置光照培养箱, 温度 25℃; 中下部粗壮部分扦插到花盆中, 上部切口用蜡封住。放置于阳光充足的窗台上。以上 2 种方法均用来促进新芽新枝的萌发, 以备外植体消毒用。

1.2.2 接种材料的灭菌 剪取新发枝条, 剪成长 2~3 cm 的小段, 叶片单独剪下。将材料用自来水冲洗之后拿到超净台上, 操作流程如下: 先用 75% 酒精灭菌 30s→无菌水冲洗 1 次→再将茎段用 0.1% HgCl₂ 消毒 10~12min, 叶片消毒 8~10min→无菌水冲洗 3~5 次→无菌滤纸吸干水分→在无菌培养皿中切去茎段上下老的切口→放置于①~④培养基上, 诱导叶腋芽萌发和新芽分化。之后放置于温度(25±2)℃、光照强度 1 500~2 000 lx、光/暗周期为 14 h/10 h 的培养室培养, 并调查茎段在不同培养基上的分化生长情况。

1.2.3 叶片再生体系确立 以⑤~⑧为诱导叶片芽分化试验培养基, 选取生长良好、健壮的无菌试管苗, 剪取大小、色泽基本一致的叶片, 垂直主脉剪 2~3 个切口, 切口深达主脉, 然后将其接种于各培养基中, 培养条件同前。每种培养基设 3 次重复, 每个重复 6 个叶片, 观察叶片分化新芽情况。30 d 后, 选取各培养基上分化最多的 5 个叶片做分化芽数调查并拍照, 计算出平均每叶分化芽数。将高度在 1.0 cm 左右的再生芽取下, 放置到生根培养基中诱导生根, 形成完整植株。

1.2.4 潮霉素对叶片分化及茎尖生长的影响 潮霉素抗性可作为转基因的抗性标记来使用。在培养基中加入潮霉素(Hyg), 可以筛选出重组子。不同植物外植体的不同器官对 Hyg 耐受能力不同, 为确定巨霸杨对 Hyg 的本底抗性, 在培养基添加不同浓度的 Hyg: 选取生长健壮的 1.5 cm 长茎尖、幼嫩的叶片(用手术刀切口 3~5 刀过中脉), 接种于含不同浓度 Hyg 的培养基上。Hyg 浓度分别设为 0、2、4、6、8、10、15 mg/L, 每个梯度设 3 次重复, 每个重复 6 个叶片和 6 个茎尖苗, 叶片和茎尖在同一瓶中。接种外植体后, 置于组培室中, 培养条件同前。于接种后的第 2、4、6、14 天时统计芽发生情况和颜色变化。25 d 时拍照。

2 结果与分析

2.1 无菌组培苗获得及芽萌发诱导

巨霸杨休眠枝条在室内水插和花盆中扦插后, 到 12 月底已经发芽展叶。于 12 月 28 日及 1 月 12 日分 2 次剪下幼嫩茎段及叶片进行消毒处理。到 3 月 1 日, 放置在①、②、③、④培养基上的茎段及叶腋芽萌发, 个别茎段基部也有芽分化。培养基①上, 所有叶腋芽都萌发, 茎基分化芽多且幼嫩, 可见 6-BA 0.15 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的组合对芽萌发和芽分化生长有较好的促进效果, 其次为②。③培养基上只有一个茎段在基部分化较多芽, ④培养基上的叶腋芽萌发晚且少, 茎基只形成了愈伤组织, 无芽分化。

2.2 叶片再生体系的确立

巨霸杨为黑杨派树种, 6-BA 诱导分化使用以低浓度为宜, 但太低也不利于叶片芽分化。不同培养基对叶片芽分化的影响如图 1。

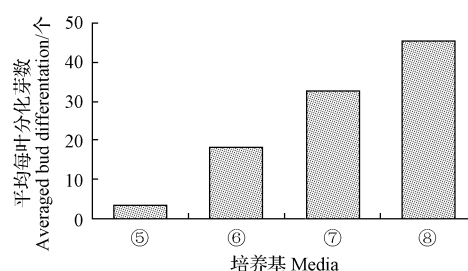


图 1 不同分化培养基对叶片芽分化的影响

Fig. 1 Effects of different media on bud differentiation

⑤~⑧培养中 IBA 浓度均为 0.1 mg/L, 6-BA 的浓度由 0.10 mg/L 渐变到 0.25 mg/L。由图 1 可以看出, 培养基⑧(MS+6-BA 0.25 mg/L+IBA 0.1 mg/L)分化芽量最多, 平均每片叶子分化芽 45.2 个(5 片叶子共分化 226 个新芽)。其次为⑦, 平均每叶分化芽 32.6 个(5 叶共分化 163 个新芽)。6-BA 浓度为 0.15 mg/L 和 0.10 mg/L 时分化芽量则大大降低, 平均每叶分化芽分别为 18 个和 3.4 个。由图 2 可以看出, ⑧和⑦叶片上有较多分化芽, 而⑥的芽则较少, ⑤上的芽最少, 且有的叶片失绿死亡。以 4 种不同培养基为处理, 对不同培养基上分化的芽数做方差分析。结果表明, 4 种培养基之间均存在极显著差异($\alpha=0.01$), 所以选择可诱导叶片分化芽量最多的⑧培养基为最佳巨霸杨诱导叶片分化培养基。

经过 30 d 的芽分化诱导培养, 从分化芽高度来看, 各培养基高度在 0.5 cm 以下的苗居多, 高度在 0.5 cm 以上的苗只有 1~3 个。将分化芽丛放到不加任何激素的空白 MS 培养基中, 芽苗可进一步伸长生长。将高度在 1.0 cm 左右的新分化芽苗转到生根培养基中, 7 d 即可诱导出根长在 0.5 cm 左右的根 5~8 条, 成为完整再生植株。

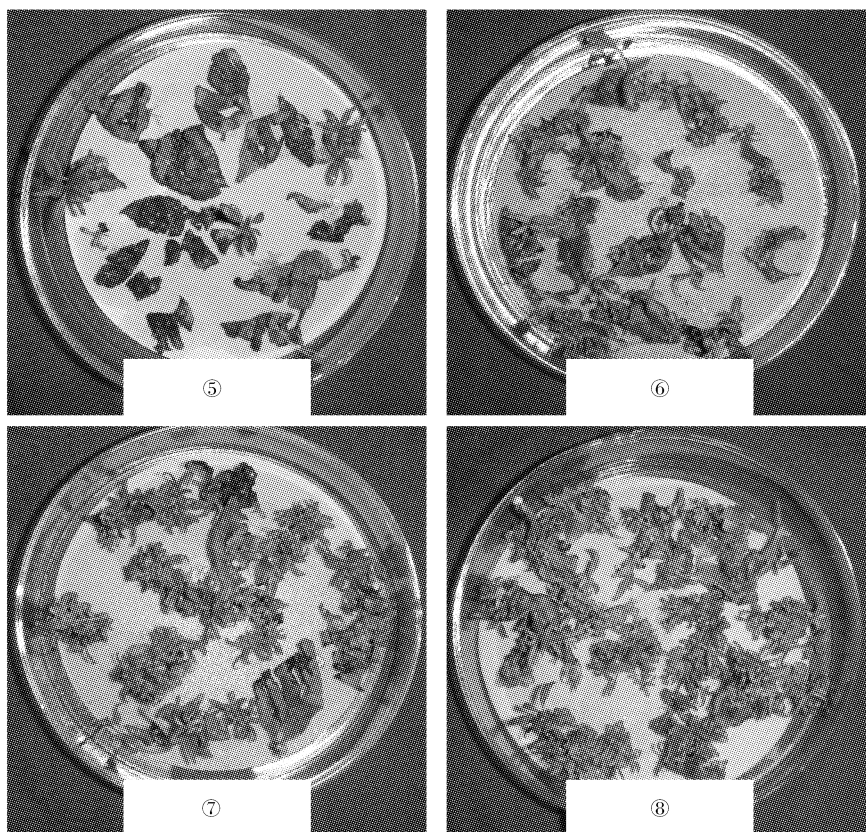


图 2 不同培养基诱导叶片芽分化情况

Fig. 2 Bud differentiated from leaves in different media

2.3 潮霉素对叶片和茎尖生长分化的影响

在附加 Hyg 的培养基上, 苗芽分化生长受到了明显抑制, 叶片较茎段来说, 对 Hyg 比较敏感(表 1)。Hyg

表 1 不同浓度潮霉素对叶片和茎尖苗分化生长的影响

Table 1 Effect of different Hyg concentrations on leaves and shoot tips' differentiation

接种天数 Inoculation days/d	外植体 Plantlet	叶片和茎尖变化 Changes of leaves and shoots
2	叶片	≤6 mg/L: 叶片未变色 ≥8 mg/L: 叶片切口出现失绿坏死现象, 个别叶片整叶失绿
	茎尖	2~15 mg/L: 均未出现明显变化
4	叶片	≤2 mg/L: 未失绿 ≥4 mg/L: 切口失绿, 浓度越高失绿越重
	茎尖	≤10 mg/L: 茎尖苗基部失绿尚不明显 15 mg/L: 苗茎基部失绿, 部分自茎尖变黑 2 mg/L: 只在叶缘和划痕处微见变黄现象
6	叶片	4~6 mg/L: 紧贴培养基的叶片在叶缘和切口划痕处开始失绿 8~15 mg/L: 叶片全部失绿死亡
	茎尖	4~6 mg/L: 茎尖苗基部叶片也开始变黄 8~15 mg/L: 茎基部失绿, 基部叶片变黄, 部分自茎尖变黄 0 mg/L: 叶片分化新芽, 茎尖苗色绿, 生长正常
14	叶片	2 mg/L: 叶片切口及茎段基部可有绿色新芽分化
	茎尖	4 mg/L: 个别叶片在叶柄基部有芽分化, 但茎段基部无芽分化 ≥6 mg/L: 无论茎段和叶片均无芽分化, 苗渐渐全部失绿死亡

对叶片及茎段苗的危害随着培养天数的增加日渐加重: 接种 2 d 后, 添加 Hyg 8 mg/L 以上的培养基中叶片切口即出现失绿坏死现象, 个别叶片整叶失绿。4 d 后, 叶片在 Hyg 浓度 4 mg/L 以上切口失绿, 浓度越高失绿越重。茎尖苗在 Hyg 15 mg/L 的培养基中苗茎基部失绿, 部分自茎尖变黑。6 d 后, 叶片在 2 mg/L 培养基上叶缘和划痕处微见变黄现象; 4 mg/L 和 6 mg/L 的紧贴培养基的叶片在叶片边缘和切口划痕处开始失绿, 茎尖苗基部叶片也开始变黄; 8~15 mg/L 的叶片全部失绿死亡; 茎尖苗茎基部失绿, 基部叶片变黄, 部分自茎尖变黄。14 d 后, 4 mg/L 只有个别叶片在叶柄基部有少量芽分化, 多数叶片已经失绿死亡; 而茎尖苗无生长也无芽分化。6 mg/L 以上叶片全部失绿成暗黑色, 茎尖苗全部黄死。

25 d 时观察, 巨霸杨在不含 Hyg 的对照培养基上(图 3-a), 叶片分化和茎尖生长正常, 且茎基部和叶片上可分化大量不定芽, 不定芽浓绿、健壮。添加 Hyg 2 mg/L 的培养基上(图 3-b), 叶片切口及茎段基部可见绿色新芽分化; 添加 Hyg 4 mg/L 的培养基上(图 3-c), 也有个别叶片在叶柄基部有芽分化。而当 Hyg 浓度达到 6 mg/L 以上(图 3-d、e、f)时, 无论茎段和叶片均无芽分化, 且苗已经全部失绿死亡。

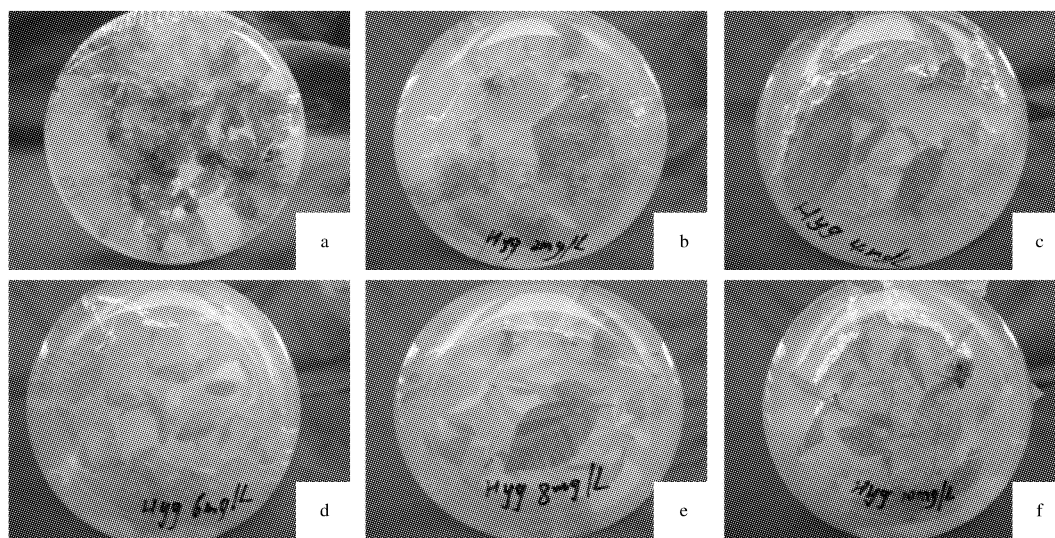


图3 25 d后潮霉素对叶片和茎尖分化和生长的影响

Fig. 3 Effect of different Hyg concentrations on leaves and shoot tips after 25 days

3 讨论与结论

pCAMBIA 1301~1305 等系列质粒载体多含有潮霉素磷酸转移酶基因 *hpt*, 以潮霉素为筛选标记。经过多次转化试验, 发现以潮霉素作筛选抗生素进行遗传转化不易得到转化植株, 转化成功率低。分析原因是潮霉素对植物材料的杀伤力极强, 6 mg/L 以上的用量可使杨树叶片 7 d 内失绿死亡, 导致试验时一旦浓度偏高, 浸菌后的植物材料未等到芽分化就被高浓度的潮霉素杀死。同潮霉素相比, 卡那霉素作为筛选抗生素对植物的作用要柔和很多。以卡那霉素做筛选标记, 使用浓度一般为 50 mg/L^[13], 转化成功的苗叶色正常, 未转化成功的苗茎叶渐渐变黄白, 但可以在含有卡那霉素的培养基中连续继代培养月余而不死。所以使用潮霉素的关键是确立其最佳临界使用浓度。在遗传转化时还要掌握宁低勿高的原则, 筛选初期用临界浓度的低值, 等得到再生植株出现再加高浓度进行筛选。

该研究在获得巨霸杨无菌组培苗的基础上, 以叶片为外植体, 对巨霸杨进行了组培再生体系建立及潮霉素抗性筛选研究。确立了诱导巨霸杨叶片芽分化的适宜培养基, 再生芽在生根培养基上形成完整植株。通过在 0~15 mg/L 范围不同浓度潮霉素筛选试验, 明确了巨霸杨潮霉素临界浓度范围在 4~6 mg/L, 转化操作时先以 4 mg/L 为筛选浓度。为避免假阳性苗的产生和存在, 同时筛选出阳性重组子, 得到再生苗后, 加高浓度到 6 mg/L 以上进行进一步的筛选。该研究不仅为潮霉素在巨霸杨中的应用提供了依据, 同时也为其它杨树品种遗传转化提供了参考。

(该文作者还有刘美玲, 单位同第二作者。)

参考文献

- [1] Blochlinger K, Diggelmann H. Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells[J]. Mol Cell Biol, 1984, 4(12): 2929-2931.
- [2] van Den Elzen P J M, Townsed J, Lee K Y, et al. A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells[J]. Plant Mol Biol, 1985, 5: 299-302.
- [3] 侯爱菊, 朱延明, 张晶, 等. 转基因植物中筛选标记基因的利用及消除[J]. 遗传, 2003, 25(4): 466-470.
- [4] 王桂英, 杨敏生, 霍雪梅, 等. 741 杨双 *Bt* 基因的遗传转化及转基因株系的抗虫性[J]. 林业科学, 2012, 48(9): 42-49.
- [5] 许文涛, 芦云, 罗云波, 等. 潮霉素磷酸转移酶的致敏性评价研究[J]. 食品科学, 2009, 30(1): 261-264.
- [6] 王哲, 孙敬克, 王世翔, 等. 烟草潮霉素抗性浓度的筛选与研究[J]. 河南城建学院学报, 2009, 18(4): 65-67.
- [7] 岳建雄, 张慧军, 张炼辉. 以对潮霉素抗性为筛选标记的棉花遗传转化[J]. 棉花学报, 2002, 14(4): 195-199.
- [8] 梁水美, 高洁, 孟鹏, 等. 不同小麦品种的潮霉素耐受性研究[J]. 山东农业科学, 2011(2): 15-17.
- [9] 王晓春, 刘尚前, 王罡, 等. 菊花对潮霉素敏感性的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(10): 3948-3949.
- [10] Génissel A, Leplé J C, Millet N, et al. High tolerance against *Chrysomela tremulae* of transgenic poplar plants expressing a synthetic cry3Aa gene from *Bacillus thuringiensis* ssp *tenebrionis*[J]. Mol Breeding, 2003, 11(2): 103-110.
- [11] 杨敏生, 李志兰, 王颖, 等. 双抗虫基因对三倍体毛白杨的转化和抗虫性表达[J]. 林业科学, 2006, 42(9): 61-68.
- [12] 王丹, 邹莉, 王义, 等. 杨树对潮霉素的敏感性研究[J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(1): 47-50.
- [13] Leplé J C, Bonadé-Bottino M, Augustin S, et al. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor[J]. Molecular Breeding, 1995, 1(4): 319-328.

DOI:10.11937/bfyy.201513030

枣甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的克隆及表达分析

卜娇迪¹, 陈莹莹², 刘孟军², 赵锦¹

(1. 河北农业大学 生命学院, 河北 保定 071000; 2. 河北农业大学 中国枣研究中心, 河北 保定 071000)

摘要:以‘金丝小枣’为试材,根据 GAPDH 基因保守序列设计引物,采用同源克隆和 RT-PCR 法,克隆枣 GAPDH 基因并进行生物信息学及转录表达分析。结果表明:该基因包含完整的开放阅读框为 1 020 bp,编码 339 个氨基酸残基,预测分子量为 36.904 kDa,理论等电点为 8.53,命名为 ZjGAPDH(KP147910);该蛋白包含 2 个保守结构域,即 Gp_dh_N superfamily 和 Gp_dh_C superfamily;系统进化树分析表明,ZjGAPDH 与其它物种 GAPDH 蛋白的同源性相对较小,但均属于存在细胞质中参与糖酵解过程的蛋白;实时荧光定量分析表明,ZjGAPDH 基因在枣果实不同发育时期中表达有显著差异,在幼果期和全红期果实中的表达丰度较高。

关键词:枣;甘油醛-3-磷酸脱氢酶;克隆;表达分析

中图分类号:Q 786;S 665 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)13-0102-05

甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)是糖代谢和能量代谢过程中的

第一作者简介:卜娇迪(1990-),女,辽宁铁岭人,硕士研究生,研究方向为细胞工程。E-mail:bujiaodi713138@163.com.

责任作者:赵锦(1977-),女,河北安平人,博士,教授,研究方向为植物资源评价。E-mail:zhaojinbd@126.com.

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2013BAD14B03);河北省科技支撑计划资助项目(11230606D-6)。

收稿日期:2015-02-03

关键酶。有研究表明高等植物中存在 2 种不同类型的 GAPDH,一类是依赖于 NAD⁺,存在于细胞质中,另一类以 NADPH 或 NAD⁺ 为辅酶,存在于叶绿体中,分别在糖酵解和植物光合作用中起着重要作用^[1-2]。植物中的 GAPDH 还对逆境胁迫有一定作用,该基因通过翻译调控和多重翻译后修饰以适应胁迫^[3];刘志华等^[4] 研究证明 GAPDH 基因具有抗盐、碱和高温胁迫功能,是一种重要的抗逆境胁迫基因。此外,由于 GAPDH 基因具有高度种属保守序列^[5-6],在一些研究中认为该基因还

Establishment of *Populus deltoides* cv. JuBa Regeneration System and Its Resistance to Hygromycin

WANG Guiying^{1,2}, LIU Xiaojie¹, LI Shanshan², SUN Chao¹, YANG Jinku¹, YANG Minsheng², LIU Meiling¹

(1. Langfang Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Langfang, Hebei 065000; 2. Keylab of Genetic Resources of Forest and Forest Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001)

Abstract: Taking a hybrid poplar variety *Populus deltoides* cv. JuBa (*Populus deltoides* 50 × *P. deltoides* 36) as experiment material, the effect of different phytohormone combination and hygromycin concentration gradient on leaves and shoot tips were studied. The results showed that the optimal medium for bud induction was MS+6-BA 0.25 mg/L+IBA 0.1 mg/L, the optimal regeneration and rooting media was 1/2MS+IBA 0.3 mg/L. Through screening different hygromycin concentrations for leaves and shoot tips, hygromycin could affect the growth of JuBa poplar. The hygromycin inhibitory effects increased with growth time. Leaves were more sensitive comparing to shoot tips. After 2 days of cultivation, leaves were obviously damaged. The damage of shoot tips began to show only after 4 days. After 2 weeks, only a few buds appeared on petiole on 4 mg/L hygromycin; all leaves and shoot tips were dead under above 6 mg/L of hygromycin. The results demonstrated that the range of hygromycin critical concentration was from 4 mg/L to 6 mg/L. This research laid a technological foundation for the genetic transformation of this poplar variety.

Keywords: *Populus deltoides* cv. JuBa; regeneration system; hygromycin; critical concentration