

美洲黑杨遗传转化系统优化的研究*

王玲^{1,2}, 段红平^{1**}, 田敏²

(1. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201;

2. 中国林业科学院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要: 研究了影响根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens* Conn) 介导的美洲黑杨遗传转化的若干因素, 建立了美洲黑杨简单、高效的遗传转化系统, 获得了大量转基因植株。结果表明: 外植体预培养 3 d, 菌液浓度 OD₆₀₀ 值为 0.4 ~ 0.6 的农杆菌中侵染 20 min, 共培养 3 d 为最佳遗传转化系统, 转化率最高时可达 10.0%。同时发现选择带叶柄的叶片作为转化受体, 转化频率也有明显提高且不同分化培养基的配方对美洲黑杨的转化效果也有一定影响。

关键词: 美洲黑杨; 根癌农杆菌; 转化

中图分类号: S 792.119.04 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 390X (2011) 04 - 0519 - 05

Study on Optimization of Transformation of *Populus deltoides*

WANG Ling^{1,2}, DUAN Hong-ping¹, TIAN Min²

(1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Subtropical Forestry Research Institute of China Academy of Forestry, Fuyang 311400, China)

Abstract: In this study, we studied several factors affecting transformation of *Populus deltoides*, and developed a simple and effective protocol with optimized condition for transformation of *P. deltoides*. The result showed that the transformation frequency was extremely increased with 3 days pre-culture, 20 min *Agrobacterium* infection (OD₆₀₀ value = 0.4 ~ 0.6), 3 days co-infection and the highest transformation rate of Kanr shoots reached 10.0%.

Key words: *Populus deltoides*; *Agrobacterium tumefaciens*; transformation

美洲黑杨具有较高的经济价值是世界中纬度平原地区栽培面积最大的速生用材树种之一。杨树的显著优点是生长快, 成材早, 适应性强, 木材颜色洁白易漂白, 得浆率, 强度和白度三者可以兼顾, 是一种较为适宜的制浆造纸原料^[1]。但由于其育种周期长、异化授粉等原因, 通过常规育种对其改良耗时长。因此, 通过基因工程手段对美洲黑杨进行遗传改良具有重要意义。自 1987 年 FILLATI 等^[2]首次获得抗除草剂杨树植株以来,

杨树的遗传转化研究已取得了很大发展。王善平^[3]等将 Ti 质粒的基因导入毛白杨中并得到一些芽。卜学贤等^[4]用 Ri 和 Ti 质粒转化毛白杨获得了正常的转化植株。将 Bt 毒蛋白基因导入杨树的遗传转化已在 741 杨、杂交杨、欧洲黑杨、银白杨 × 大齿杨等杨树抗虫育种中得到应用^[5-8]。在杨树上应用的遗传转化方法主要有 DNA 直接转移法和农杆菌介导法。农杆菌介导法是目前应用最广泛且结果较为理想、技术较为成熟的一种基因

收稿日期: 2009 - 11 - 02

修回日期: 2010 - 11 - 11

网络出版时间: 2011 - 07 - 11 10: 59

* 基金项目: 浙江省科技厅公关项目 (2006C22061)。

作者简介: 王玲 (1981 -), 女, 云南宜良人, 硕士研究生, 主要从事植物转基因工程研究。

E-mail: wangling198109@163.com

** 通讯作者 Corresponding author: 段红平 (1959 -), 男, 云南昆明人, 教授, 主要从事作物栽培学与耕作学的教学与科研工作。E-mail: duanhp_yn@163.com

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20110711.1059.201104.519_041.html

转化方法。但此法存在转化效率偏低的问题,故建立高效稳定的基因转化受体系统,是转基因育种的基础^[9]。本试验借鉴前人的研究,主要探讨了影响农杆菌介导遗传转化美洲黑杨的6个因素:即培养基配方、预培养时间、共培养时间、菌液浓度、侵染时间、转化受体等,旨在研究影响美洲黑杨转化效果的因素,优化其转化系统,以便进一步利用基因工程技术对美洲黑杨进行遗传改良。

1 材料与方法

1.1 材料

试验采用美洲黑杨杂交种 NL895 (*Populus deltoides*) 作为植物材料,由南京林业大学诸葛强教授馈赠。试管苗以单芽茎段方式增值继代,继代培养基为附加 0.5 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L NAA 的 MS 培养基。表达载体 pBI121 质粒为中国亚热带林业研究所实验室构建;农杆菌 EHA105 由本实验室保存。

1.2 叶盘法转化美洲黑杨

在无菌条件下,取苗龄 4~6 周的生长健壮的无菌苗叶片,叶片在大小、形状和色泽上基本一致,一般取靠近顶端的幼嫩的叶片。用刀在叶片上划线,切口过中脉,放在预培养基上预培养。然后在 OD₆₀₀ 值为 0.2~0.8 的菌液中侵染 10~40 min,在这一过程中轻轻振荡。取出叶片,用无菌滤纸吸干后,转入共培养基上于 25℃ 条件下暗培养,共培养基上附加乙酰丁香酮 200 μmol/L。然后移到筛选培养基上,包括共培养在内暗培养 10 d 左右移至光下进行选择培养。

1.3 影响根癌农杆菌转化效果的因素

本次试验选用 (1) MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA; (2) MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 0.25 mg/L ZT; (3) MS + 0.5 mg/L 6-BA +

0.1 mg/L NAA + 0.005 mg/L TDZ 3 种不同的培养基;不同的预培养时间:健壮无菌苗叶片在预培养基上分别预培养 1, 2, 3, 4 d;不同的共培养时间:感染叶片分别共培养 2, 3, 4, 5, 6 d;不同的菌液浓度:在 OD₆₀₀ = 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 的菌液中侵染 20 min;不同的侵染时间:在 OD₆₀₀ = 0.4~0.6 菌液中侵染 10, 20, 30, 40 min;以及不同的转化受体:分别取生长健壮的杨树无菌苗子叶,带叶柄的子叶,茎段作为转化受体。比较评价指标:不同处理均取 60 片剪好的叶片,培养 32~56 d 后调查抗性芽形成情况。以在选择培养基上获得卡那霉素抗性芽的数量为评价指标。经卡那霉素筛选形成的抗性不定芽,在含有卡那霉素的生根培养基上诱导生根。

1.4 转化植株的检测

对转化植株进行 PCR 检测:采用改良的 CTAB^[10] 法提取转化植株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。检测基因所用的引物为:

上游引物: 5' - CGGGATCCATGGCCAC-CAACGGAGAG - 3';

下游引物: 5' - GGTCATGATCACTGCATCCGACGGCA - 3'。

扩增 CCoAOMT 基因片段大小约为 750 bp。反应条件为: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 延伸 45 s, 65℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s 重复 30 个循环, 72℃ 延伸 7 min。

2 结果与分析

2.1 转化植株的分化、伸长和生根

侵染后的叶片放入分化培养基中 28 d 后开始逐渐分化,分化芽渐渐伸长,待芽长至 2~3 cm 时将芽切下放入生根培养基中,约 20 d 后开始生根(见图 1)。

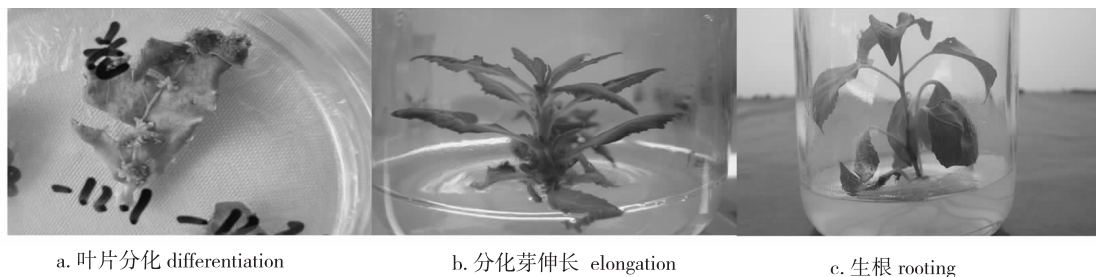


图 1 转化植株的分化、伸长和生根

Fig. 1 The differentiation, elongation and rooting of regeneration

2.2 不同培养基配方对转化芽频率的影响

试验结果表明(图2)不同培养基配方之间产生 Kan^r 芽的频率差别很大。配方(2)配方(3)获得 Kan^r 芽频率较高,分别为 4.5% 和 5.2%; 配方(1)很难获得转化芽,转化频率仅为 0.50%。6-BA, TDZ, ZT 都为细胞分裂素,它们的主要作用是促进细胞的分裂和器官的分化,延缓组织的衰老,增强蛋白质的合成,抑制顶端优势,促进侧芽的生长及显著改变其他的激素作用。作用的强弱顺序为: TDZ > ZT > 6-BA。

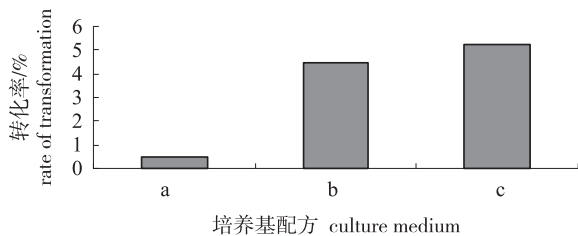


图2 不同培养基配方对卡那霉素抗性芽产生的影响

Fig. 2 Effects of different culture media on the regeneration of Kan^r shoots

2.3 不同预培养时间对转化芽频率的影响

试验结果表明(图3),不同预培养时间产生 Kan^r 芽的频率有一定差别。预培养 2 d 和 3 d 获得 Kan^r 芽频率最高,分别为 3.8% 和 5.0%。预培养 1 d 时获得的转化芽要少一些,可能是叶片还未适应体外培养条件。预培养 4 d 时转化芽出现较多,但随着筛选时间的延长,大量的芽出现黄化并逐渐死亡,原因可能是随着预培养时间的延长,叶片已处于萌发状态,叶片切口对农杆菌不敏感,故转化频率降低。从卡那抗性芽获得的频率(图3)可以看出:3 d 为最佳的预培养天数。本次实验也设计了在预培养阶段分别设置光照培养和暗培养作为对照,从结果上看,二者产生的 Kan^r 芽数量基本一致。可见在预培养阶段光

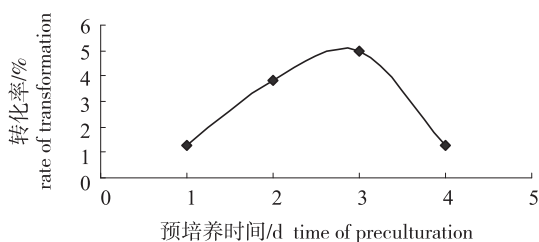


图3 不同预培养时间对转化芽频率的影响

Fig. 3 Effects of different pre-culture time on regeneration of Kan^r shoots

照培养和暗培养对 Kan^r 芽的获得并无太大影响。

2.4 共培养时间对遗传转化的影响

在共培养阶段,携带有目的基因的 T-DNA 在根瘤农杆菌内完成加工,向植物细胞转移,从而整合到植物基因组。因此,共培养时间的长短,直接影响到目的基因的整合及转移细胞的数量,从而影响转化频率。本实验结果表明:3 d 为最佳的共培养时间(图4)。

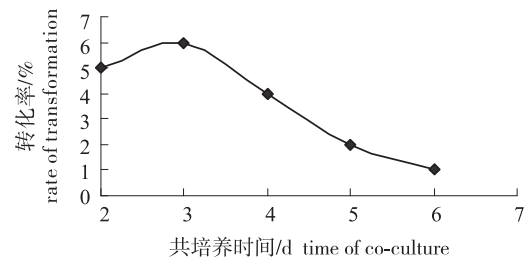


图4 不同共培养时间对遗传转化的影响

Fig. 4 Effect of co-culture duration on the regeneration of Kan^r shoots

2.5 菌液浓度和侵染时间对产生 Kan^r 芽的影响

菌液浓度和侵染时间对转化频率的影响很大。菌液浓度过高,或侵染时间过长,会使植物组织褐化,并且农杆菌污染严重,在以后的培养中难以控制;菌液浓度过低或侵染时间过短,不能让足够的农杆菌附着于植物外植体切口处,会使转化频率大大降低,有时甚至无抗性芽产生^[11]。故实验中对这两个因素对转化效果的影响进行研究。结果见图5,6。

结果表明,当菌液浓度为 OD₆₀₀ = 0.4 时, Kan^r 芽的产生频率明显提高为 5.0%。当 OD₆₀₀ = 0.5 和 0.6 时产生的 Kan^r 芽频率最高,都为 6.7%。当 OD₆₀₀ 为 0.8 时,基本上无 Kan^r 芽得产生;当菌液浓度较低时, Kan^r 芽产生的频率也明显降低。侵染时间 20 min, Kan^r 芽产生的频率较高为 10.0%。侵染 10 min 和 30 min 也有一些 Kan^r 芽出现。但当侵染时间延长至 40 min 时,几乎没有 Kan^r 芽出现。此时,叶片切块中只有少数产生芽孢,余者褐化死亡。且叶片周围有较多农杆菌生长,有的受体叶片被包埋于乳白色的菌液中。将这些叶片先用无菌水冲洗 1 遍,后用含 600 mg/L 的头孢唑林钠无菌水冲洗 2 次,再用无菌水冲洗 1 次移至含有抗生素的新鲜培养基上,仍不能将农杆菌抑制住,叶片周围长满农杆菌,直至叶片死亡。因此,转化时侵染时间切不可过

长, 以 20 min 左右为宜。

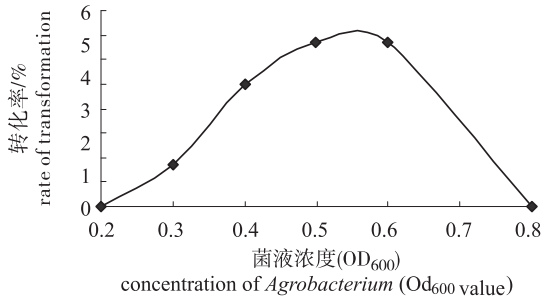


图 5 不同菌液浓度对产生Kan^r芽的影响
Fig. 5 Effect of bacterial concentrations on the regeneration of Kan^r shoots

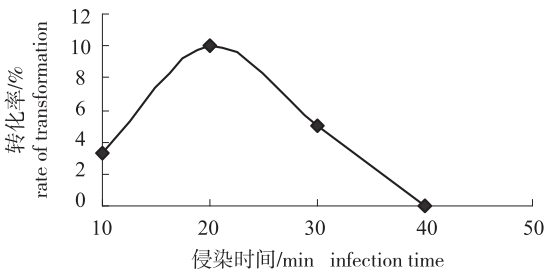


图 6 不同侵染时间对产生Kan^r芽的影响
Fig. 6 Effect of infection time on the regeneration of Kan^r shoots

2.6 转化受体对产生 Kan^r 芽的影响

转化受体也是一个重要的影响因素, 建立一个好的受体系统是基因转化的先决条件。大量的杨树转基因研究表明, 杨树叶片是最好的受体材料^[12-14]。但也有一些研究发现, 茎段的诱导率高于叶片^[15-17]。可见, 植物转化中最适的受体材料随着植物种类的不同而不同^[18]。故本试验对这个因素对转化效果的影响进行研究。

试验结果表明(表 1)不同转化受体之间产生 Kan^r 芽的频率也有明显区别。其中带叶柄的子叶产生的 Kan^r 芽最多为 8.3%, 其次是茎段为 6.7%, 子叶产生的 Kan^r 芽也为 6.7%。虽然茎段刚开始产生的 Kan^r 芽较多, 但随着筛选时间的延长, 能够继续伸长成独立植株的抗性芽相对比带叶柄的子叶要少一些。本次试验表明在对美洲黑杨进行遗传转化时, 带叶柄的子叶为最佳的转化受体。

2.7 转基因植株的检测

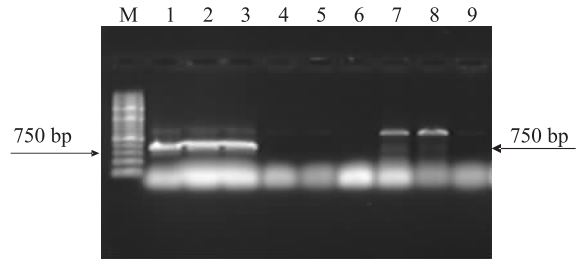
随机取转化后植株提取基因组 DNA, 以 pBI121 质粒为阳性对照, 以未转化植株为阴性对照进行 PCR 扩增, 从图 7 可以看出, 抗性植株与阳性质粒在 750bp 处扩增出相同的条带(图中非

特异性条带比抗性植株的目的条带亮), 初步说明外源基因已整合到美洲黑杨中。

表 1 不同转化受体对产生 Kan^r 芽的影响

Tab. 1 Effects of different reception on regeneration of Kan^r shoots

转化受体 transformation receptor	外植体数量 No. of explants	再生芽数量 (百分比/%) No. of regeneration (percent)	Kan ^r 芽数量 (百分比/%) No. of Kan ^r shoots (percent)
带叶柄的子叶 cotyledon with petiole	60	6 (10)	5 (8.3)
子叶 cotyledon	60	5 (8.3)	4 (6.7)
茎段 stem	60	8 (11.9)	4 (6.7)



注: M. DNA2000分子量标准; 1~3. pBI121(阳性对照); 4. 未转化植株(阴性对照); 5~9. 转化植株。
Note: M. 2000 DNA marker; 1~3. pBI121 (positive control); 4. non-transformed plant (negative control); 5~9. transgenic plants.

图 7 转化植株的PCR鉴定

Fig. 7 PCR analysis of transplants

3 讨论

影响农杆菌转化美洲黑杨的因素很多, 本试验以美洲黑杨组培苗为材料, 采用叶盘法, 对杨树遗传转化体系中 6 个因素(培养基配方、预培养时间、共培养时间、菌液浓度、侵染时间、转化受体)进行优化。结果表明: 在进行基因转化前将外植体预培养一段时间, 不仅可以减少杂菌污染, 而且可以调整外植体的生理状态, 使它们更适应体外培养条件, 以提高卡那霉素抗性芽分化频率。这与前人的研究结果相一致, 预培养有利于杨树的转化^[12,19]且最佳的预培养时间为 3 d。在共培养阶段, 共培养 2 d 时由于农杆菌生长量不足而影响转化频率。相反, 随共培养时间延长产生的芽, 大多在筛选过程中变黄, 变白, 最后死亡。这可能是由于培养时间过长引起农杆菌过度生长, 导致植物细胞溺死或者阻断细胞对营养成分的吸收, 从而抑制了植物细胞正常生长而导

致死亡^[20]。因此,最佳的共培养时间为3 d。将植株材料放在 OD₆₀₀ 值 0.4 ~ 0.6 的菌液中侵染 20 min 为最佳的侵染条件。这与郝贵霞^[11]等的研究结果稍有差异,这可能与杨树的不同株系有关。在遗传转化美洲黑杨时,最佳的转化受体是带叶柄的叶片。这可能是由于尽管细胞全能性是所有植物细胞具有的特性,但全能性的表达常局限于某些特殊的细胞—即拟分生组织细胞,致使不同组织或器官的植株再生能力差异很大。具有拟分生组织的外植体是最佳的植物快繁外植体,因其形态已基本建成,生长速度快,遗传性稳定强^[21]。本研究为基因工程手段培育杨树奠定了一定的基础,但影响农杆菌转化杨树的因素还很多。克服影响转化效率的障碍因子,建立稳定、高效的杨树转化再生体系,仍是研究的重点。

[参考文献]

- [1] 袁佳贞. 杨树制浆造纸的研究与进展 [J]. 江苏造纸, 1989 (4): 51 - 58.
- [2] FILLATTI J J, SELLMER J, MCCOWN B, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Populus* [J]. *Molecular and General Genetics*, 1987, 20 (6): 192 - 199.
- [3] 王善平, 许智宏, 卫志明. 毛白杨叶外植体的遗传转化 [J]. 植物学报, 1990, 32 (3): 172 - 177.
- [4] 卜学贤, 林忠平, 陈维伦. 农杆菌对毛白杨的转化及完整转化植株的获得 [J]. 植物学报, 1991, 33 (2): 206 - 213.
- [5] 郑均宝, 梁海永, 高宝嘉, 等. 转双抗虫基因 741 毛白杨的选择及抗虫性 [J]. 林业科学, 2000, 36 (2): 13 - 19.
- [6] TIAN Y C, ZHENG J B, YU H M, et al. Studies of transgenic hybrid poplar 741 transformed with two insects resistant genes [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42 (3): 263 - 268.
- [7] 王永芳, 高宝嘉, 郑均宝, 等. 杨树抗虫基因工程研究进展 [J]. 河北林果研究, 2001, 16 (1): 83 - 90.
- [8] 伍宁丰, 范云六. 含苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因的杨树工程植株的建立 [J]. 科学通报, 1991, 36 (9): 705 - 708.
- [9] 李小玲, 刘雅莉, 王跃进, 等. 亚洲百合遗传转化受体系统的建立 [J]. 干旱地区农业研究, 2007, 25 (1): 219 - 224.
- [10] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] 郝贵霞, 朱祯, 朱之梯. 毛白杨遗传转化系统优化的研究 [J]. 植物学报, 1999, 41 (9): 936 - 940.
- [12] CONFALONIERI M, BALESTRAZZI A, BOSOFFI S. Genetic transformation of *Populus nigra* by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell Reports*, 1994, 13: 256 - 261.
- [13] DE BLOCK M. Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones [J]. *Plant Physiology*, 1990, 93: 1110 - 1116.
- [14] FILLATTI J J, KISER J, ROSE R, et al. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector [J]. *Nature Biotechnology*, 1987, 5: 726 - 730.
- [15] CONFALONIERI M, BELENGHI B, BALESTRAZZI A, et al. Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. "Villafranca" and evaluation of herbicide resistance [J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 978 - 982.
- [16] 于志水, 尚胜军, 赵继海, 等. 杨树转化受体系统再生初步研究及卡那霉素敏感性测定 [J]. 辽宁林业科技, 2003 (5): 9 - 10, 18.
- [17] 孙宇飞, 高秀华, 赵彦修, 等. 欧美 107 杨组织培养再生系统的建立 [J]. 山东师范大学学报: 自然科学版, 2004, 19 (2): 85 - 87.
- [18] IGASAKI T, ISHIDA Y, MOHRI T, et al. Transformation of *Populus alba* and direct selection of transformation with the herbicide bialaphos [J]. *Bulletin of the Forestry and Forest Products Research Institute*, 2002, 1 (4): 235 - 240.
- [19] 赵世民, 祖国诚, 刘根齐, 等. 通过农杆菌介导法将免防御素 NP-1 基因导入毛白杨 [J]. 遗传学报, 1999, 26 (6): 711 - 714.
- [20] 蔡诚, 吴大强, 纵方, 等. 正交设计在杨树最佳遗传转化体系的建立 [J]. 核农学报, 2008, 22 (2): 136 - 140.
- [21] 王蒂. 植物组织培养 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 164.