

文章编号: 1001-1498(2010)04-0617-05

农杆菌介导的 *SeNHX1* 基因转化月季愈伤组织的研究

刘会超¹, 刘孟刚¹, 郭丽娟², 贾文庆¹

(1. 河南科技学院园林学院, 河南 新乡 453003; 2. 河南科技学院新科学院, 河南 新乡 453003)

关键词: 月季; 遗传转化; 农杆菌介导; *SeNHX1* 基因

中图分类号: S722.3

文献标识码: A

Studies on *Agrobacterium*-mediated Transformation of Rose Callus with *SeNHX1* Gene

LIU Hui-chao¹, LIU Meng-gang¹, GUO Li-juan², JIA Wen-qing¹

(1. School of Horticulture Landscape Architecture, He 'nan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, He 'nan, China;

2. Xinke College of He 'nan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, He 'nan, China)

Abstract: 'Pink Peace' rose was used to study the optimum conditions for transferring the *SeNHX1* gene into the callus. The results showed that the optimal medium was MS + 2, 4-D 5.0 mg · L⁻¹ + TDZ 0.5 mg · L⁻¹. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation was able to take the target gene into callus and the blue spots were found. The optimum conditions for the transient expression of *gusA* gene are as following: bacterium density of OD was 0.5, infection time was 20 min, culture time was 3 days. Adding 100 μmol · L⁻¹ AS, the frequency of transient expression of GUS gene was the highest, which reached about 85% in present study.

Key words: *Rosa chinensis*; genetic transformation; *Agrobacterium*-mediated; *SeNHX1* gene

月季(*Rosa chinensis* Jacq.)原产于我国,是我国十大名花之一^[1]。月季的种植种类和数量居观赏花卉之首^[2-3]。目前我国有大量的盐碱地和次生盐渍化土壤,急需培育抗盐植物新品种,以开发利用盐碱地。现在利用基因工程技术,已经对小麦(*Triticum aestivum* Linn.)^[4]、水稻(*Oryza sativa* L.)^[5]、烟草(*Nicotiana tabacum* L.)^[6]、丹参(*Salvia miltiorrhiza* B.)^[7]、火炬松(*Pinus taeda* Linn.)^[8]等植物开展了耐盐转基因的研究,而关于月季耐盐基因遗传转化研究则报道较少。*SeNHX1*基因是从盐角草(*Salicornia europaea* Linn.)中克隆获得的,通过氨基酸序列和同源性分析表明,*SeNHX1*基因是液泡型Na⁺/H⁺反向运输蛋白基因^[9]。Na⁺/H⁺反向运输蛋白

是一个跨膜蛋白,具有12个跨膜区域,利用质膜H⁺-ATPase或液泡膜H⁺-ATPase及PPIase泵H⁺-ATPase产生的驱动力,把细胞质中过多的Na⁺阻隔于液泡中,以减少胞质中Na⁺对细胞代谢产生的毒性,同时起到调节细胞渗透胁迫的作用^[10-11]。本研究通过农杆菌介导法将抗盐*SeNHX1*基因导入月季,希望得到耐盐的月季植株,并为开展月季抗盐分子育种提供技术上的支持。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验试材为‘粉和平’月季的幼嫩叶片,取自河南科技学院园林植物资源与生物技术实验室月季品

收稿日期: 2009-09-10

基金项目: 河南省基础与前沿研究项目(082300430030); 创新人才工程项目(2005126-49); 河南科技学院博士基金资助项目(HK05-1226)

作者简介: 刘会超(1964—),男,博士,副教授,主要从事观赏植物生物技术研究. 通讯作者: E-mail: liuhc918@yahoo.com.cn

种资源圃。

1.2 菌株和质粒

根癌农杆菌菌株 EHA105 由国家小麦中心提供。转化所用载体 pBI121-Se(图1)由中国科学院

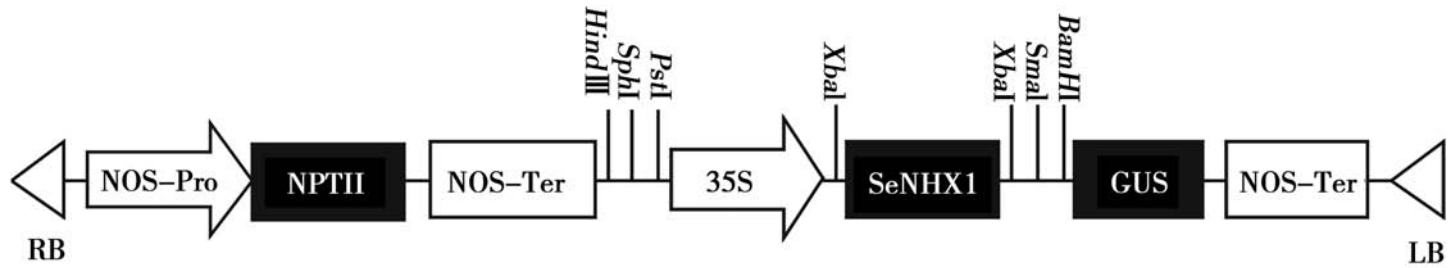


图1 植物表达载体 pBI121-Se 的结构示意图

1.3 方法

1.3.1 愈伤组织的获得 5月10日,在河南科技学院园林植物资源与生物技术实验室月季品种资源圃,取月季顶生第3片嫩叶(叶片边缘和背面均呈红色),先用自来水冲洗10 min,然后经0.1%多菌灵和40万单位的青霉素混合溶液浸泡10 min,再用蒸馏水冲洗3次,无菌滤纸吸干表面水分后置于超净工作台上用75%酒精消毒30 s,再用5%次氯酸钠(安替富民)溶液浸泡8 min,无菌水冲洗5次。叶片切成0.5 cm × 0.5 cm小块用于接种。月季叶片愈伤组织诱导以MS为基本培养基,添加不同浓度(1、3、5 mg · L⁻¹)的2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)、TDZ(苄隆)(0.5、1.0、2.0 mg · L⁻¹)等生长调节剂,以上培养基均加蔗糖30 g · L⁻¹,琼脂5.2 g · L⁻¹,pH值5.8。接种后每5 d观察1次,愈伤组织的生长量以测量愈伤直径的大小表示。

培养条件:温度为(22 ± 1) °C,黑暗条件下培养8 d。

1.3.2 农杆菌液的活化与工程菌液的制备 参照王关林^[12]的方法略有修改。将带有目的基因的中间载体质粒DNA导入农杆菌,并保存菌液。菌种在加有50 mg · L⁻¹卡那霉素(Kan)、50 mg · L⁻¹利福平(Rif)的LB固体培养基上划线培养。转化实验前挑取单菌落接种于加有50 mg · L⁻¹卡那霉素和50 mg · L⁻¹利福平的LB液体培养基中,28 °C、180 r · min⁻¹恒温摇床振荡培养过夜,使菌液OD值调节到合适值(一般OD₆₀₀ = 0.2 ~ 0.8),备用。

1.3.3 农杆菌介导遗传转化 将诱导20 d的新鲜愈伤组织置于农杆菌菌液中浸泡5 d 50 min后,取出并用无菌滤纸吸去表面多余菌液,接入加有AS(乙酰丁香酮)(50 d 200 μmol · L⁻¹)的培养基中共培养,在(25 ± 1) °C、黑暗条件培养2 d 5 d,以未侵染的外植体作为对照。每处理接8个板,每板5

植物研究所提供。pBI121-Se含CaMV35S启动子调控的β-葡糖苷酸酶(GUS)报告基因和抗卡那霉素(Kan)筛选的新霉素磷酸转移酶(NPTII)基因及抗盐SeNHX1基因。(Genbank登录号:AY131235)。

个外植体。共培养后,用无菌滤纸将外植体周围菌液吸干,转接到分化培养基上:MS + 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA(6-苄氨基嘌呤) + 0.01 mg · L⁻¹ NAA(萘乙酸) + 0.1 mg · L⁻¹ GA₃(赤霉素)上并添加200 mg · L⁻¹(Cef)头孢霉素,观察叶片外植体再生情况。

1.3.4 GUS基因瞬间表达的检测 共培养2 d 5 d后,对愈伤组织进行GUS检测,检测方法按Rueb^[13]的方法稍作修改。组织化学染色液的组成为:0.5 mg · mL⁻¹ X-gluc(5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-葡萄糖苷)、50 μL · mL⁻¹ Triton X-100、200 μL · mL⁻¹ 甲醇、500 μL · mL⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 7.0)^[14]。分别共培养2、3、4、5 d后,取不同处理的外植体,无菌水冲洗3次,无菌滤纸吸干,放入1.5 mL的离心管中,并加入GUS反应液,37 °C水浴保温过夜,反应后70%的酒精脱色,GUS基因表达呈阳性者可在肉眼观察到蓝色反应,然后统计GUS基因瞬间表达率。

GUS 基因瞬间表达率 = (有蓝色反应的外植体数 / 总外植体数) × 100%

1.3.5 转化条件的优化 本试验设置4个因素来研究外界因子对遗传转化的影响:A、侵染时间(5、20、35、50 min);B、共培养培养基中AS浓度(0、50、100、150、200 μmol · L⁻¹);C、菌液浓度(OD₆₀₀ = 0.2、0.5、0.8);D、共培养时间(2、3、4、5 d)。试验设3次重复。

1.3.6 数据分析 采用Microsoft Excel软件处理数据和作图,采用DPS统计软件中的Duncan新复极差法对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同激素对愈伤组织诱导的影响

月季叶片的愈伤组织最早是在叶脉处产生的,叶片接入诱导培养基后(图2 a),经6 d培养叶片开

始向近轴面方向卷曲(图2b), 约10 d后大部分叶片边缘开始出现膨大, 第14天左右叶缘有米粒大乳

白色愈伤组织, 之后在叶片边缘产生带状或块状的愈伤组织(图2c)。

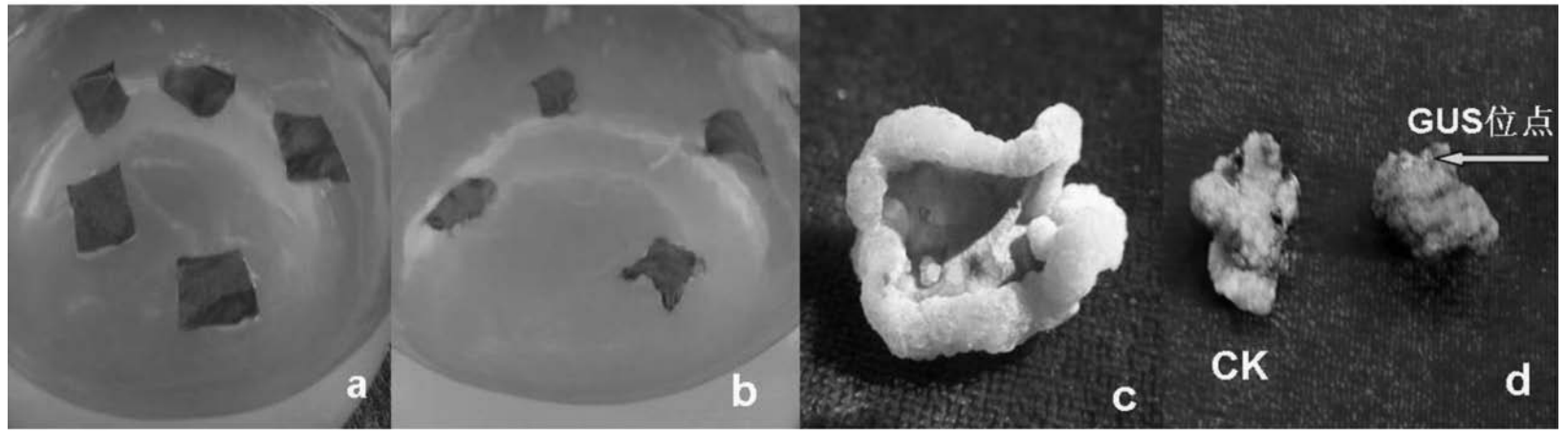


图2 月季叶片愈伤组织生长过程及根癌农杆菌侵染后 *GUS* 基因瞬时表达情况

从表1可以看出: 2, 4-D $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 2, 4-D $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基的月季叶片愈伤组织诱导率最高, 分别为 99.25、98.30%, 极显著高于其他培养基的诱导率; 单独添加 2, 4-D 的培养基能够诱导出叶片愈伤组织, 颜色呈乳白色, 且长势比 2, 4-D 与 TDZ 共同作

用的效果好, 生长量达到了‘+++’, 但是其诱导率较低($<75\%$), 而仅添加细胞分裂素(如 TDZ) 的培养基则很难诱导出愈伤组织; 从试验结果看, 2, 4-D 与 TDZ 共同作用的情况下, 则易形成愈伤组织, 颜色为浅黄色, 较为致密, 且诱导率均比较高。

表1 不同培养条件对月季叶片愈伤组织诱导的影响

激素配比	诱导率/%	愈伤组织颜色	生长量
2, 4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	46.90 \pm 4.38Ef	乳白	+
2, 4-D $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	69.50 \pm 1.56CDd	乳白	+++
2, 4-D $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	74.25 \pm 1.65BCc	乳白	+++
TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.00 \pm 0.00Fg	-	-
TDZ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	4.20 \pm 1.98Fg	乳白	+
TDZ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.00 \pm 0.00Fg	-	-
2, 4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	80.60 \pm 0.42Bb	浅黄	++
2, 4-D $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	99.25 \pm 1.06Aa	浅黄	++
2, 4-D $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	98.30 \pm 1.53Aa	浅黄	++
2, 4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + TDZ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	64.01 \pm 0.42De	浅黄	++
2, 4-D $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + TDZ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	95.40 \pm 1.13Ab	浅黄	++
2, 4-D $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + TDZ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	42.95 \pm 0.35Ef	浅黄	++

注: 表中“-”表示未生长, “+”表示生长一般, “++”表示生长较好, “+++”表示生长最好; 不同大写字母表示差异极显著, 不同小写字母表示差异显著, 相同大、小写字母表示差异不显著。

2.2 根癌农杆菌菌液浓度及感染时间对 *GUS* 基因瞬时表达的影响

根癌农杆菌浓度及感染时间是影响遗传转化频率的重要因子。本试验设置农杆菌菌液 OD_{600} 值为 0.2、0.5、0.8; 感染时间为 5、20、35、50 min 4 个梯度, 共培养后检测 *GUS* 基因的瞬时表达率。感染后 *GUS* 的瞬时表达如图3及图2d所示, 感染时间为 20 min, 农杆菌 OD 值为 0.5, *GUS* 瞬时表达率最高, 达到 85.7%; 当感染时间过长($>35 \text{ min}$), 外植体容易因农杆菌的毒害作用缺氧而导致变黑褐化, 甚至死亡; 感染时间过短(5 min), 则在其共培养时愈伤组织并没有完全与农杆菌接触, 致使 DNA 转移不充

分, *GUS* 瞬时表达率较低。

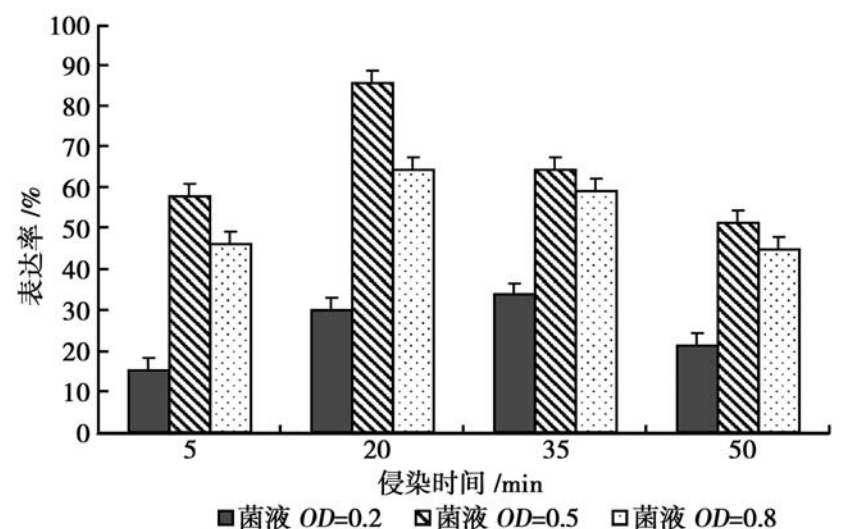


图3 农杆菌菌液浓度、感染时间对 *GUS* 瞬时表达率的影响

2.3 共培养对 *GUS* 基因瞬时表达的影响

共培养时间设置 0、1、2、3、4、5 d 6 个梯度, 培养后检测 *GUS* 基因的瞬时表达率。共培养后进行染色瞬间表达。由表 2 可知: 第 2 天瞬时表达率为 48.39%, 第 3 天达到最大值(76.67%)。综合研究结果可知, 愈伤组织最佳共培养的天数为 3 d。

表 2 不同共培养天数对 *GUS* 瞬时表达率的影响

共培养天数 /d	<i>GUS</i> 染色数 /个	有蓝点的外植体数 /个	表达率 /%	染色状态
0	30	0	0.00	- -
1	31	7	22.58	+
2	31	15	48.39	++
3	30	23	76.67	+++
4	33	18	54.55	++
5	32	13	40.63	++

注: 表中“- -”表示没有蓝点, “+”表示蓝点大小一般, “++”表示蓝点大小较好, “+++”表示蓝点大小最好。

2.4 添加乙酰丁香酮(AS)对转化的影响

AS 能够激活 *vir* 区基因和诱导该基因高效表达, 提高根癌农杆菌对宿主的表达率和敏感性, 促进 Ti 质粒向宿主细胞核中转移。图 4 表明: 共培养的培养基中添加 AS 对保证 T-DNA 的转移非常必要, 没添加 AS 的表达率仅为 3.13%; 当加入 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS 时, *GUS* 瞬间表达率达到 35.48%; 浓度达到 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, *GUS* 瞬间表达率显著提高, 达到 83.87%。

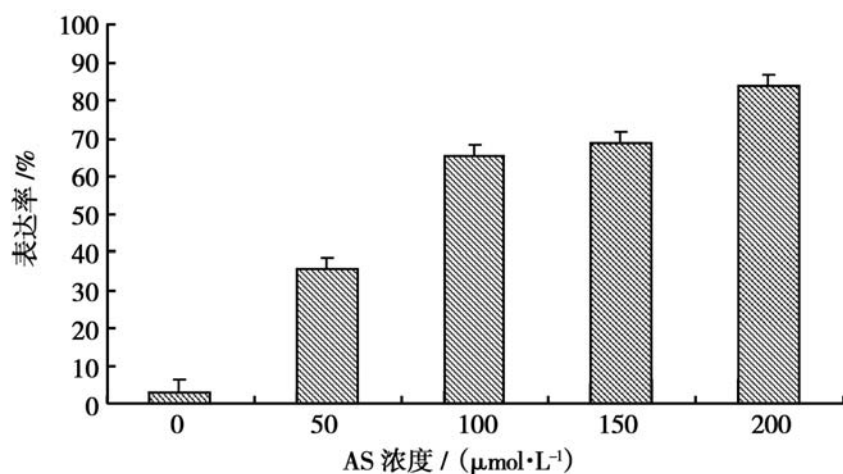


图 4 添加不同浓度的 AS 对 *GUS* 瞬时表达率的影响

3 结论与讨论

在诱导月季叶片愈伤组织时, 添加不同植物生长调节剂组合对愈伤组织诱导率有明显提高, 生长素(2, 4-D) 能够很好的促进愈伤组织的产生和生长, 而细胞分裂素(TDZ) 则对愈伤的诱导效果影响较小, 仅添加 TDZ 的培养基中很难长出愈伤组织, 在生长素和细胞分裂素共同作用下则能够长出愈伤组织, 且效果较好。愈伤组织先从叶脉处产生, 且产

生的时间比叶缘处要早, 这与朱登云^[15] 的结论相同, 这可能是由于叶脉比较粗大, 在运输营养物质时, 能得到更多的营养, 易于愈伤组织的形成。本实验得到的诱导愈伤组织最佳培养基为: MS + 2, 4-D $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

在优化月季遗传转化试验中, 有诸多因素(农杆菌菌液浓度、侵染时间、共培养时间、添加 AS 量等) 影响表达率的高低, 这些因素主要通过影响农杆菌对植物细胞的附着、植物细胞释放的信号分子诱导 *Vir* 区基因的表达, T-DNA 的转移和在植物核基因组上的整合、表达等方面, 其中共培养的时间控制则更为关键, 主要是由于农杆菌附着、T-DNA 的转移及整合都在共培养时期内完成^[12], 直接影响着目的基因整合及转化细胞的数量, 从而影响转化效率^[16-17]。本试验结果表明, 共培养 3 d 的效果最好, 这与 Aswath^[18] 和王关林等^[19] 的研究结果相同。

乙酰丁香酮可以激活 *vir* 区基因和诱导该基因高效表达, 提高根癌农杆菌对宿主的表达率和敏感性, 促进 Ti 质粒向宿主细胞核中转移, 达到提高遗传表达率的目的。试验结果显示: AS 是遗传转化所必须的, 这与 James 等^[20] 对苹果 (*Malus pumila* Mill.) 愈伤组织研究的结果相似, 但是 AS 浓度的提高会导致农杆菌过量生长影响愈伤组织的正常生长。本试验中 AS 浓度在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对表达率的影响并不明显。因此, 添加 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS 能获得较好的转化效果和愈伤组织生长情况。

本研究结果表明: 农杆菌侵染法可以使目的基因转入受体, *GUS* 染色呈阳性, 得到蓝色斑点, 但是斑点颜色的深浅不一, 可能是目的基因受体细胞的表达量存在差异。由于月季愈伤组织中的酚类物质比较多, 很容易被氧化成醌类物质, 导致愈伤组织发生褐化, 掩盖 *GUS* 染色的蓝色斑点, 添加一些抗氧化剂(如活性炭、PVP 等) 是否对愈伤组织生长、芽分化以及表达率有影响, 如何既能防止褐化、又有效的提高表达率以解决月季遗传转化研究的关键问题, 还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 陈有明. 园林树木学[M], 北京: 中国林业出版社, 1990
- [2] Schneider J H M, Jacob J J S, van Pol P A, et al. *Rosa multiflora* 'Ludiek a rootstock with resistant features to the root lesion nematode *Pratylenchus vulnus*[J]. *Scientia Horticulturae*, 1995, 63: 37 - 45
- [3] 刘会超, 郭丽娟, 贾文庆. 月季组织培养研究进展[J]. 河南科技

- 学院学报:自然科学版,2007,35(3):45-48
- [4] 郭北海,张艳敏,李洪杰,等.甜菜碱醛脱氢酶(*BADH*)基因转化小麦及其表达[J].植物学报,2000,42(3):279-283
- [5] 李南羿,郭泽建.转录因子 *OPBP1* 和 *OsiWRKY* 基因的超表达提高水稻的耐盐及抗病能力[J].中国水稻科学,2006,20(1):13-18
- [6] Tarczynski M C, Jensen R G, Bohnert H J. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol[J]. Science, 1993, 259: 508 - 510
- [7] HAN Li-Min, YU Jia-Ning, JU Wen-Feng. Salt and drought tolerance of transgenic *Salvia miltiorhiza* Bunge with the *TaLEA1* gene[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2007, 33(2): 109 - 114
- [8] TANG Wei. Regeneration of transgenic loblolly pine expressing genes for salt tolerance[J]. Journal of Forestry Research, 2002, 13(1): 1 - 6
- [9] 吕慧颖.盐生植物盐角草、番杏 N_a^+ / H^+ 逆向转运蛋白基因克隆及特性研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2003
- [10] 王劲,杜世章,刘君蓉.植物耐盐机制中的 N_a^+ / H^+ 逆向转运蛋白[J].绵阳师范学院学报,2006,25(2):47-50
- [11] 杨小玲,季静,王罡,等. *SeNHX1* 与 *GFP* 融合基因在酵母中表达及其耐盐性表现[J].华北农学报,2008,23(4):60-64
- [12] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].北京:科学出版社,2002
- [13] Rueb S, Hensgens L A M. Improved histochemical staining for β -D-glucuronidase activity in monocotyledonous plants[J]. Rice Genetics Newslette, 1989, 6: 168 - 169
- [14] 李永春.利用 *Cry1Ac* 和 *CpTI* 双价基因及组织特异启动子增强转基因水稻对螟虫的抗性[D].杭州:浙江大学,2002
- [15] 朱登云,田慧琴,李浚明.杜仲叶片和叶柄愈伤组织的诱导和植株再生[J].植物研究,2001,21(2):206-209
- [16] 郝贵霞,朱祯,朱之悌.毛白杨遗传转化系统优化的研究[J].植物学报,1999,41(9):936-940
- [17] Lin Y J, Zhang Q. Optimizing the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice[J]. Plant Cell Rep, 2005, 23: 540 - 547
- [18] Aswath C R, Mo S Y, Kim S H, et al. IbMADS4 regulates the vegetative shoot development in transgenic chrysanthemum (*Den-drathema grandiflora* (Ramat.) Kitamura) [J]. Plant Science, 2004, 166(4): 847 - 854
- [19] 王关林,刘彦乱,郭韶华,等.雪花莲凝集素基因转化菊花及转基因植株的抗蚜性研究[J].遗传学报,2004,31(12):1434-1438
- [20] James D J, Uratsu S, Cheng J S, et al. Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of apple [J]. Plant Cell Rep, 1993, 12(10): 559 - 563