

转多基因库安托杨非靶目标材性性状分析

朱文旭¹, 黄秦军¹, 褚延广¹, 丁昌俊¹, 姜岳忠²,
董玉峰², 苏晓华^{1*}

(1. 林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091;
2. 山东省林业科学研究院, 山东省林木遗传改良重点实验室, 济南 山东 250014)

关键词: 杨树; 转基因; 木材材性; 非预期效应

中图分类号: S792.11

文献标识码: A

Variation of Non-target Wood Properties of Multi-gene Transgenic *Populus × euramericana* ‘Guariento’

ZHU Wen-xu¹, HUANG Qin-jun¹, CHU Yan-guang¹, DING Chang-jun¹
JIANG Yue-zhong², DONG Yu-feng², SU Xiao-hua¹

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;
2. Forestry Science Academy of Shandong, Shandong Provincial Key Lab. of Forest Tree Genetic Improvement, Ji'nan 250014, Shandong, China)

Abstract: In this study, the transgenic poplar (*Populus × euramericana* ‘Guariento’) harboring five exogenous genes (*SacB*, *Vgb*, *BtCry3A*, *OC-I* and *JERF36[#]*) and the control plants were selected, comparing the wood property variation of 5-year-old trees, and trying to understand whether the transgenic of exogenous genes produce unintended effects. The results showed that the transgenic of exogenous genes caused a wide range of variation in non-target wood properties, the variations were found not only between transgenic and wild-type lines, but also among transgenic lines. Compared with the control, the transgenic lines, the contents of holocellulose and cellulose increased, the total lignin and acid soluble lignin decreased, the fiber length, the fiber width, the microfibril angle and the acid insoluble lignin varied uncertainly. It is concluded that the introduced exogenous gene could generate unintended effects on corresponding non-target target traits.

Key words: Poplar; transgenic; wood properties; unintended effect

随着基因工程技术的发展,转基因技术在林木品种改良上得到了广泛的应用和迅速发展,已经开展了30多个树种的转基因研究,改良性状主要集中在抗除草剂、抗虫、降低木质素合成、增加纤维素合成、重金属积累以及加速生物量积累等方面^[1]。近年来研究发现将外源基因转入植物后,常引起非靶目标变异,表现出与外源基因表达似乎无关的表型和农艺性状的变异,同时还伴随遗传基础的改变。农作物方面关

于转抗性基因和品质基因对非靶目标农艺性状方面的影响做了很多研究。叶红霞等^[2]发现转 *Pea-Fer* (豌豆铁蛋白) 基因的水稻 (*Oryza sativa* Linn.) 在株高、主穗长、主穗总粒数、结实率、千粒质量和单株产量等7个性状均与CK存在显著差异;赵凌等^[3]对花粉管介导获得的4个转 *bar* (抗除草剂) 基因水稻植株稳定后代研究发现,多数转基因系的株高、穗长、粒长、千粒质量等性状有增加的趋势。Lynch等^[4]报道

收稿日期: 2014-08-01

项目基金: “863”国家高技术研究发展计划项目(2011AA100201)

作者简介: 朱文旭(1986—),男,辽宁省辽阳人,在读博士,研究方向:林木遗传育种. E-mail: zhuwenxu.315@163.com

* 通讯作者: 研究员,首席专家. 研究方向:林木遗传育种. E-mail: suxh@caf.ac.cn

转 nptII (抗卡那霉素) 基因水稻的植株变小。Goto 等^[5] 将 Soybean-Fer (大豆铁蛋白) 基因通过农杆菌介导法转入莴苣 (*Lactuca sativa* Linn.) 后, 其转基因植株的生长速度比野生型的加快。关于转抗性基因对品质性状影响的研究也很多。刘冬梅等^[6] 发现导入的外源 Bt + CpTI (双价抗虫) 基因和 SCK (抗虫) 基因棉花 (*Gossypium hirsutum* Linn.) 后代 T5 的纤维强度增大、纤维长度也显著增加。但是, 在林木方面, 针对植物非目标性状的研究工作还比较少。

本研究首次以成龄转多基因杨树为研究材料, 通过对纤维长、纤维宽、微纤丝角、纤维素含量、综纤维素含量、酸溶木素含量、酸不溶木素含量和总木素含量等材性性状的变异进行评价, 以期对转基因杨树育种理论和有效方法的建立以及转基因种质材料的利用提供科学依据。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

本研究的试验材料为转化了 5 个外源基因的库安托杨 (*P. x euramerica* 'Guariento')。所转化的外源基因分别为: (1) 编码分泌型蔗糖果聚糖酶的果聚糖蔗糖转移酶基因 (*SacB*), 果聚糖主要在植物液泡中积累, 这种积累能降低细胞液泡水势, 有助于提高植物抵御干旱、低温; (2) 编码透明颤菌血红蛋白 (VHb) 的透明颤菌血红蛋白基因 (*Vgb*), 透明颤菌血红蛋白是一种氧调节、氧结合的蛋白, 与提高植物适应贫氧环境的能力有关; (3) 编码 AP2/EREBP 类植物转录因子的 *JERF36* 基因, 与植物抗逆性有关; (4) 编码水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂的 *OC-I* 基因, 大部分的鞘翅目昆虫是利用半胱氨酸蛋白酶, 所以该基因对鞘翅目昆虫有较强的抗性; (5) 编码 Bt 杀虫晶体蛋白的 *BtCry3A* 基因, 对杨树天牛所隶属的鞘翅目具有高度专一的抗性。目的基因中 *BtCry3A* 和 *OC-I* 位于同一载体上形成双价基因。经 PCR、Southern 杂交和 BtCryA ELISA 等分子检测编号为 D5-9、D5-19、D5-20、D5-21 和 D5-24 的 5 个无性系均含有上述 5 个外源基因^[7], 以未转化库安托杨为对照, 编号为 D5-0。研究组前期对转多基因库安托杨在遗传稳定性、抗虫、抗水淹、耐盐性等方面进行过研究, 都得到较好的效果^[8-9]。试验材料取自山东省林科院寿光试验林, 该试验林建于 2006 年, 造林密度为 3 m × 3 m, 2 ~ 3 株小区, 6 次重复, 南北向单行排列, 四边设有保护行, 在整个试验阶段人为管理均一致, 林地不做任何肥水及

喷施农药管理。

1.2 测试方法

2010 年 10 月对各无性系进行树高、胸径、单株材积 (按 $V = 0.254\ 5475\ 45D^2H + 0.784\ 642\ 807D^2$ 公式估算) 等生长量调查, 每个无性系 15 次重复。同时锯取胸高处圆盘用于木材物理、化学性状测定。

木材物理性状测定: 纤维形态的检测采用 L&W 纤维分析仪测定; 微纤丝角的测定采用 X 射线衍射法 (XRD); 木材基本密度的测定方法参照国家标准 GB 1933—2009; 木材化学成分测定包括: 以去皮木材为原料分别测定各品系的木素含量和综纤维素含量, 木素含量的测定参照国家标准 GB/T 2677. 8—1994; 综纤维素含量的测定参照国家标准 GB/T 2677. 10—1995; 纤维素含量的测定为硝酸—乙醇纤维素法, 每个无性系 3 次重复。材性测定工作由东北林业大学生物质材料科学与技术教育部重点实验室完成。

1.3 数据处理和统计方法

运用 Excel 和 SPSS 软件对试验数据进行统计分析, 图中数据为平均值 ± 标准差 (SE), 并采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和最小显著差异法 (LSD) 比较不同数据组间的差异。

采用隶属函数法对转多基因杨树无性系进行综合评定^[10], 隶属函数值 $X(i_j)$ 采用模糊数学隶属数值的方法计算, $X(i_j) = (X_{ij} - X_{jmin}) / (X_{jmax} - X_{jmin})$, 当某一参数与植物材性成负相关时, 采用反隶属函数值计算公式 $X(i_j) = 1 - (X_{ij} - X_{jmin}) / (X_{jmax} - X_{jmin})$, X_{ij} 表示 i 种类 j 指标的测定值; X_{jmax} 、 X_{jmin} 分别为指标的最大值和最小值, 然后求其各隶属函数的总和, 把每一无性系各指标的隶属值进行累加, 并求其平均数。

2 结果与分析

2.1 转多基因杨树无性系生长和基本密度的差异

5 个转基因无性系株高上的变异趋势相同, 均高于对照 D5-0, 其中 D5-9 增长最多为 4.57%。胸径变异产生差异 D5-19 和 D5-24 变小, 而 D5-9、D5-20 和 D5-21 则变大。计算材积发现 D5-20 无性系的材积增长量最大, 增长 5.85% (表 1)。

2.2 转多基因杨树无性系物理性质和化学性质比较分析

从表 2 可见: 转基因无性系的密度与对照相比基本未变。国际木材解剖学规定: 中级长度纤维 (910 ~

1 600 μm),长宽比高于 40^[11]。据测定:纤维长度虽然大多低于对照,但都符合中级长度纤维标准,纤维长宽比也都高于 40。微纤丝角是木材机械性能的主

要决定因子之一。D5-19、D5-21、D5-9、D5-20 的微纤丝角比对照 D5-0 高 18.51%、13.88%、9.93% 和 0.96%,D5-24 比对照低 3.47%(表 2)。

表 1 转基因杨树无性系的生长量

系号	树高/m	树高增长/%	胸径/cm	胸径增长/%	材积/ 10^{-2}m^3	材积增长/%
D5-0	12.88 ± 0.99 aA	—	13.81 ± 0.64 aA	—	8.03 ± 1.11 aA	—
D5-9	13.47 ± 0.45 aA	4.57	14.13 ± 0.14 aA	2.33	8.42 ± 0.30 aA	4.86
D5-19	13.13 ± 0.57 aA	1.92	13.61 ± 0.57 aA	-1.43	7.80 ± 0.78 aA	-2.86
D5-20	13.12 ± 0.50 aA	1.88	14.20 ± 0.21 aA	2.82	8.41 ± 0.50 aA	5.85
D5-21	13.34 ± 0.46 aA	3.56	14.23 ± 0.47 aA	3.02	8.50 ± 0.67 aA	4.73
D5-24	13.46 ± 0.62 aA	4.49	13.34 ± 0.61 aA	-3.38	7.69 ± 0.92 aA	-4.23

注:大、小写字母分别表示 1% 和 5% 差异显著水平。下同。

表 2 转基因杨树无性系物理性质多重比较

系号	密度/($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	纤维长/ μm	纤维宽/ μm	纤维长宽比	微纤丝角/ $^{\circ}$
D5-0	0.35 ± 0.02 aA	1 236.58 ± 69.28aA	25.16 ± 1.38abA	49.39 ± 5.66aA	10.37 ± 0.37bcBC
D5-9	0.36 ± 0.01 aA	1 131.58 ± 74.84cB	26.09 ± 1.28abA	43.48 ± 3.86bB	11.40 ± 1.53abABC
D5-19	0.36 ± 0.031aA	1 195.52 ± 67.86abcAB	26.19 ± 1.48abA	45.81 ± 3.86abAB	12.29 ± 1.23aA
D5-20	0.35 ± 0.02aA	1 151.57 ± 39.62bcAB	25.46 ± 0.66abA	45.23 ± 0.53bAB	10.47 ± 0.65bcBC
D5-21	0.36 ± 0.01aA	1 205.09 ± 43.94abAB	26.24 ± 1.26aA	45.97 ± 1.78abAB	11.81 ± 0.43aAB
D5-24	0.35 ± 0.01aA	1 238.365 ± 23.914aA	24.83 ± 0.79bA	49.74 ± 1.60aA	10.01 ± 0.64cC

除 D5-21 系号,其他 4 个无性系纤维素含量均显著高于对照 D5-0,综纤维素含量也都高于对照。各转多基因杨树无性系木素含量存在较大差异,其

中 D5-9 的酸溶木素、酸不溶木素和总木素含量均处于低水平,分别比对照 D5-0 低 32%、14% 和 17%。对照 D5-0 的酸溶木素和总木素均为最高(表 3)。

表 3 转基因杨树无性系化学性质多重比较

系号	纤维素/%	综纤维素/%	酸溶木素/%	酸不溶木素/%	总木素/%
D5-0	48.92 ± 0.13eE	78.433 ± 0.055eE	4.353 ± 0.065aA	21.733 ± 0.105bB	26.087 ± 0.040aA
D5-9	51.37 ± 0.02aA	83.303 ± 0.095aA	2.950 ± 0.021eE	18.690 ± 0.240dD	21.640 ± 0.240cC
D5-19	49.69 ± 0.07dD	81.850 ± 0.050cC	3.593 ± 0.105dD	21.740 ± 0.080bB	25.333 ± 0.185cB
D5-20	50.93 ± 0.01bB	82.553 ± 0.055bB	4.113 ± 0.025bB	21.093 ± 0.195cC	25.207 ± 0.170cdB
D5-21	48.85 ± 0.09eE	78.670 ± 0.190dD	2.903 ± 0.045eE	22.870 ± 0.120aA	25.773 ± 0.165bA
D5-24	50.42 ± 0.14cC	81.990 ± 0.104cC	3.830 ± 0.040cC	21.140 ± 0.130cC	24.970 ± 0.090dB

2.3 各选择指标的隶属度及综合评价

利用模糊数学隶属函数法对 6 个无性系进行综合评定,其中木素在造纸的制浆过程要除去,微纤丝角越小则细胞的抗张强度越大,所以微纤丝角和木素

含量均判定为负相关并进行转换。由表 4 看出:5 个转多基因杨树无性系在生产力、物理性质和化学性质指标隶属值上差异明显。综合指标评价选出的优良无性系依次为:D5-20 > D5-9 > D5-24 > D5-21 > D5-19。

表 4 隶属函数值及综合评价结果

系号	材积	微纤丝角/ $^{\circ}$	纤维素/%	纤维长宽比	总木素/%	平均	排序
D5-0	0.419 8	0.389 7	0.029 0	0.944 7	0.000 0	0.356 6	5
D5-9	0.901 2	0.000 0	1.000 0	0.000 0	1.000 0	0.580 2	2
D5-19	0.135 8	0.210 4	0.334 2	0.371 7	0.169 4	0.244 3	6
D5-20	0.888 9	0.799 1	0.825 6	0.279 1	0.197 9	0.598 1	1
D5-21	1.000 0	1.000 0	0.000 0	0.397 4	0.070 5	0.493 6	4
D5-24	0.000 0	0.843 3	0.623 5	1.000 0	0.251 1	0.543 6	3

3 讨论

转基因是将有利于植物自身或满足人类需求的外源基因整合进入受体植物基因组中,并使这些外源基因在受体植物中稳定表达,发挥其功能,从而使

受体植物获得目的基因表现出来的性状,这些性状就是转基因植物的目的性状,也称为预期效应^[12]。长期以来对转基因植物非预期效应的检测和评价都是通过比较转基因植物和其对应的非转基因植物在环境适应性^[13]、农艺性状^[14]、营养及物质组成变

化^[15]等的差异,来判断是否存在非预期效应。近几年发展起来的转录组学^[16]、代谢组学^[17]、蛋白组学^[18]等,被认为是更具发展潜力的转基因植物非预期效应的检测和评价技术。

木材基本密度是判断木材物理力学性质及确定木材用途的重要指标,木材纤维长度是造纸用材的重要指标之一,也是纤维形态中最重要因子,其变异不仅关系到纸张强度,也是木材质量、基本密度和强度性质的物质基础^[19]。本试验结果中可以看出,多个性状变异具有一定的偏向性,株高和综纤维素含量均增加,酸溶木素和总木素均下降,而胸径、纤维长、纤维宽、纤丝角、纤维素含量和酸不溶木素的变异方向不定有增有减。产生这些变异可能是由于外源基因整合到植物基因组的同时打乱了植物基因组的正常组合,从而影响受体植物的代谢过程;并且外源基因导入并表达后,其表达产物并不是受体生长、发育和繁殖所需的,而表达过程必然消耗机体内一定的能量,从而打破原有的能量供给和消耗平衡,造成一些性状表达所需能量的相对不足,影响正常生理代谢,并促成受体表型的变化^[20]。不同转基因无性系之间的差异是外源基因插入位置、拷贝数等差异导致植株的生理生化及代谢特性发生变化,而非基因表达产物本身的影响。

非预期效应的发生并非是重组 DNA 技术所特有的,所有的作物育种方法,无论是常规育种中的杂交育种、突变育种(辐射育种或化学诱变),还是现代生物技术(原生质体融合、重组 DNA),都有产生非预期效应的可能。对于转基因树木,这类非目标性状的变异应该给予足够重视。因为从林木育种学角度来看,林木育种的周期长,不管怎样严格选用转基因树木受体品种,除了目标性状外,受体品种总还有缺点,逐一改变性状需要时间很长,而通过导入目的基因定向改良树木不良性状与诱发非目标性状变异有机结合起来,将可以大大丰富和拓宽林木育种选择的内容和范围,并且能够有效的缩短育种周期。在改良抗病、抗虫等目标性状的同时诱发其他性状,尤其是诱发高产和优质性状的变异,可以在增强树木抗病、抗虫、抗逆境能力的同时也使转基因树木的材积或材性得到提高。

参考文献:

[1] Walter C, Killerby S. A global study on the state of forest tree genetic modification[J]. Preliminary review of biotechnology in forestry: Including genetic modification. Forest Genetic Resources Working

Papers. Rome: Forestry Department, FAO, 2004.

- [2] 叶红霞,郭泽健,李梅,等. 豌豆铁蛋白转基因水稻纯系重要生物学特性的变异[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(2): 251-256.
- [3] 赵凌,王才林,朱镇. 花粉管介导的转 *bar* 基因水稻后代主要农艺性状的变异[J]. 江苏农业学报, 2004, 20(1): 1-6.
- [4] Lynch P T, Jones J, Blackhall N W, *et al.* The phenotypic characterisation of *R2* generation transgenic rice plants under field and glasshouse conditions[J]. *Euphytica*, 1995, 85(1-3): 395-401.
- [5] Goto F, Yoshihara T, Saiki H. Iron accumulation and enhanced growth in transgenic lettuce plants expressing the iron-binding protein ferritin[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100(5): 658-664.
- [6] 刘冬梅,武芝霞,李成伟,等. 花粉管通道法获得棉花转基因株系主要农艺性状变异分析[J]. 棉花学报, 2008, 19(6): 450-454.
- [7] Wang JG, Su X H, Ji L L, *et al.* Multiple Transgenes *Populus × euramericana* 'Guariento' plants obtained by biolistic bombardment[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(2): 224-230.
- [8] 李环,丁昌俊,苏晓华,等. 涝渍胁迫对转多基因库安托杨生长及生理性状的影响[J]. 林业科学研究, 2010(1): 44-52.
- [9] Su X, Chu Y, Li H, *et al.* Expression of multiple resistance genes enhances tolerance to environmental stressors in transgenic poplar (*Populus × euramericana* 'Guariento')[J]. *PLoS one*, 2011, 6(9): e24614.
- [10] 王臣,虞木奎,王宗星,等. 9个楸树无性系对盐胁迫的差异响应[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2011, 35(2): 20-24.
- [11] 鲍甫成,江泽慧. 中国主要人工林树种木材性质[M]. 中国林业出版社, 1998.
- [12] Kotchoni O S, Gachomo E W, Mwangi M. Commercial production of genetically modified crops: a prognosis towards global acceptance[J]. *Int J Agri Biol*, 2005, 7: 681-688.
- [13] Andow D A. Assessing unintended effects of GM plants on biological species[J]. *J. Verbrauch. Lebensm*, 2011, 6: 119-124.
- [14] Yao Y Y, Ni Z F, Zhang Y H, *et al.* Identification of differentially expressed genes in leaf and root between wheat hybrid and its parental inbreds using PCR-based cDNA subtraction[J]. *Plant Mol. Biol*, 2005, 58:367-384.
- [15] Xu W T, Guo F, Zhou X, *et al.* Unintended effects were investigated in antioxidant activity between genetically modified organisms and their nontransgenic control[J]. *Afr. J. Biotechnol*, 2011, 10:9272-9279.
- [16] Gao Q, Jin K, Ying S H, *et al.* Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*[J]. *PLoS Genet.*, 2011, 7:e1001264.
- [17] Zhou J, Ma C, Xu H, *et al.* Metabolic profiling of transgenic rice with *cry1Ac* and *scs* genes: An evaluation of unintended effects at metabolic level by using GC-FID and GC MS[J]. *J. Chromatogr. B*, 2009, 877:725-732.
- [18] Coll A, Nadal A, Rossignol M, *et al.* Proteomic analysis of MON810 and comparable non-GM maize varieties grown in agricultural fields[J]. *Transgenic Res*, 2011, 20: 939-949.
- [19] 武恒,查朝生,王传贵,等. 人工林杨树 12 个无性系木材纤维形态特征及变异[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(002): 8-10.
- [20] Filipecki M, Malepszy S. Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2006, 47(4): 277-286.