

胡杨基因组片段转化拟南芥表型研究

郭飞龙¹, 卢孟柱², 徐刚标¹, 叶天文¹, 敖小平^{1*}

(1. 中南林业科技大学林学院, 湖南长沙 410004; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要: [目的] 本研究旨在探索与挖掘胡杨基因组大片的潜在功能, 发掘具有潜在育种价值的胡杨基因簇。 [方法] 利用已构建的胡杨基因组 BIBAC 文库, 采用花序浸染法, 将胡杨基因组大片段 78A2D10 导入模式植物拟南芥基因组中。采用抗性筛选、分子检测及表型观察等方法鉴定、分析转化型植株。 [结果] 共获得 15 株特异表型的转化植株。与野生型相比, 转化型植株主侧茎生长受到抑制, 莲座叶面积增大近 3 倍, 叶片数量增多, 叶边缘皱缩, 抽薹推迟约 13 周, 株高增加近 32.0 cm, 侧茎发育成次生莲座, 植株寿命延长约 7 周。 [结论] 胡杨基因组片段 78A2D10 可延长植株营养生长期及植株寿命, 据此推测该基因片段可能与营养生长有关。

关键词: 胡杨; 基因组大片段; 花序浸染; 拟南芥; 表型

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2018)04-0018-05

Phenotypic Study of *Arabidopsis thaliana* Transformed by Genome Fragment from *Populus euphratica*

GUO Fei-long¹, LU Meng-zhu², XU Gang-biao¹, YE Tian-wen¹, AO Xiao-ping¹

(1. College of Forestry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China;

2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: [Objective] The study aims at exploring and excavating the potential function of large genome fragment cloned from *Populus euphratica*, and finding out the potential gene clusters with breeding value. [Method] Based on BIBAC library, the fragment 78A2D10 from the genome of *P. euphratica*, was inserted into the genome of *Arabidopsis thaliana* by the method of floral-dip. Resistance selection, molecular identification and phenotypic observation were applied to identify and analyze the transgenic plants. [Result] Fifteen transgenic plants with specific phenotype were obtained in the research. Compared with the wild plants, the positive plants showed the characters such as inhibited growth of the stems, 3 times rosette leaf area, more leaves, crimping blade edge, delayed bolting with 13 weeks, height increasing by 32.0 cm, developing lateral stems and prolonged lifetime with 7 weeks. [Conclusion] The fragment of 78A2D10 may prolong the vegetative growth and lifetime of plants. The fragment may be related to the vegetative growth of plants.

Keywords: *Populus euphratica*; genome large fragment; floral dip; *Arabidopsis thaliana*; phenotype

胡杨 (*Populus euphratica* Oliv.) 对于干旱和盐碱具有极强的忍受能力, 属于耐盐碱而非盐生植物, 能在极端干旱、盐碱的荒漠地带中正常生长, 被视为研究、

发掘林木特异功能基因的模式生物^[1]。Chen 等发现, 大多数植物耐盐性等生物表型是由多个基因片段共同调节控制^[2], 但目前大多数研究仅局限于单基因

收稿日期: 2017-05-07

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金“胡杨功能基因组研究平台构建和功能基因发掘”(CAFYBB2011001); 中南林业科技大学大学生研究性学习和创新性实验项目

作者简介: 郭飞龙, 男, 硕士研究生, 主要从事林木遗传育种学研究。E-mail: guofeilong1117@163.com

* 通讯作者: 敖小平, 女, 博士, 主要从事林木遗传育种学方面研究。E-mail: aoxp2008@126.com

克隆,对大片段基因簇的功能研究鲜有报道^[3]。鉴于此,张瑗等^[4]、周婧等^[5]等将胡杨基因组片段导入拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh)中挖掘潜在的胡杨耐盐功能基因簇,朱晓静^[6]发现了与叶绿体发育有关的胡杨基因组大片段,王智^[7]得到赤霉素高合成转化型拟南芥植株,但有关胡杨基因组片段潜在功能的挖掘仍需进一步深入研究。本研究将继续探索胡杨基因组片段功能,为进一步开展林木基因工程育种研究发掘优异的基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥材料为拟南芥哥伦比亚野生型植株。

质粒 pCLD04541 携带有新霉素磷酸转移酶(*NPT II*)基因及四环素(*Tet*)抗性基因,全长约为27.3 kb。引物序列^[5]如下:

NPT-R:5'-TCAGAAGAACTCGTCAAGAAG-3';
NPT-F:5'-ATCTCCTgTCATCTCACCTTgCTCCT-3';
Tet R3:5'-TCAACGTTCCCTGACAACGAG-3';
Tet F3:5'-GTCTGACGACACGCAAACG-3';

PCR引物由华大基因公司合成。*NPT II*扩增片段大小约为490 bp,*Tet*扩增片段大小约为540 bp。

1.2 方法

1.2.1 农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)活化及转化 操作方法参考文献^[8]。转化前,先活化菌液,解冻摇菌、划平板,28℃扩大培养,提取的质粒DNA加入引物(*Tet*)进行PCR检测,确认农杆菌是否携带目的基因片段。离心机浓缩活化好的菌液,弃去上清液,得到的农杆菌体用质量体积比为50%的蔗糖溶液重悬,按0.5%体积加入 silwet-77,浸染野生型拟南芥花序。

1.2.2 转基因植株平板筛选 收获的拟南芥种子,5%次氯酸钠溶液消毒后接种在含50 μg·ml⁻¹的卡那霉素1/2 MS培养基上,并设对照。4℃条件下,春化2~3 d后,在温度20~23℃、湿度60%、光照16 h·d⁻¹条件的培养室中培养10 d。种子萌发形成的幼苗移于土壤中,在同样条件的培养室中继续培养。

1.2.3 转基因植株分子检测 摘取拟南芥幼苗2~3片嫩叶,CTAB法提取DNA^[9]。加入引物(*NPT II*)进行PCR扩增,扩增产物采用琼脂糖凝胶电泳检测并拍照记录^[9]。

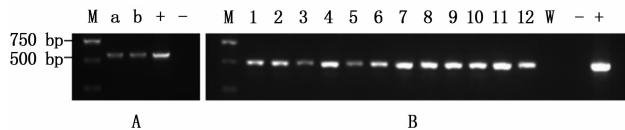
1.2.4 植株形态观测 随机抽取4株转化型和野生型拟南芥叶片,数码相机拍照,采用Photoshop软

件计算叶片面积^[10],重复3次。用SPSS statistics 19软件统计分析叶片面积。每周定期测量转化型和野生型拟南芥的株高,并拍照、记录。

2 结果与分析

2.1 DNA分子检测

培养的菌落及拟南芥 t₂ 代幼苗叶片 DNA 的 PCR 扩增结果见图1。由图1A可知:菌落于540 bp处有条带,PCR扩增出的*Tet*基因和*NPT II*基因的特异片段表明菌液携带有大片段基因78A2D10,可进行花序浸染。由图1B可知,t₂代幼苗叶片DNA于490 bp处有条带,表明t₂代抗性植株基因组中携带有外源大片段78A2D10。



注:M为2 000 bp DNA Mark,“+”为质粒阳性对照,“-”为水作阴性对照,a、b为78A2D10质粒样品,1~12为转化型拟南芥,“W”为野生型对照;A:78A2D10号农杆菌PCR检测电泳图像,B:转化型拟南芥PCR检测电泳图像。

Note: The letter M indicates the 2 000 bp DNA ladder used as DNA molecular weight marker, “+” is plasmid as a positive control, “-” is for water as a negative control, a and b are represented the Plasmids sample of 78A2D10, 1-12 are represented t₂ Arabidopsis DNA, W is for the wide-type Arabidopsis without transformation as a negative control. A: Gel electrophoresis image of 78A2D10 Agrobacterium, B: Transformation of Arabidopsis thaliana PCR detection of electrophoretic images.

图1 PCR检测图像

Fig. 1 PCR identification image

2.2 转基因植株的表型观察

2.2.1 t₁代转基因植株 t₁代转化型植株(T)与野生型植株(WT)生长表现见图2A~C。由图2A可知:与野生型植株相比,转化型植株莲座叶的叶片数量明显偏多,多些细小的叶片。抽薹后(图2B),转化型植株同时抽出2根几乎等高等粗的主茎,而野生型植株先抽出1根主茎再萌发侧茎。转化型植株的莲座叶数量多于野生型。3次重复试验,转化型与野生型植株的生长表型差异一致(图2C)。但是,植株停止生长后,转化型与野生型植株的株高差异在统计学上不显著。

2.2.2 t₂代转基因植株株高观测 转化型t₂代与野生型植株在不同生长时期的株高差异见图2D~G。野生型植株播种4周后开始抽薹,播种5周后型差异一致(图2D)主茎达到22.0 cm,播种10周后型差异一致主茎达到36.0 cm(图2E),随后停止生

长。转化型 t_2 代植株营养期较长,播种 17 周后型差异一致(图 2F)才开始抽薹,播种 27 周后型差异一致株高达 63.0 cm(图 2G)。与野生型相比,转化型植株的株高明显增高。从图 2F 可看出,播种 17 周后型差异一致,野生型植株开始枯萎,而转化型植株仍能正常生长。

2.2.3 t_2 代转基因植株莲座叶及侧茎形态特征 t_2 代转化型和野生型植株的叶片形态、数量以及侧茎形态特征见图 2H~J。由图 2H 可知:与野生型植株相比, t_2 代转化型植株的莲座叶边缘向下内卷,严重皱缩,具有明显的远轴化叶片特征^[11]。播种 12 周后型差异一致,野生型的莲座叶已经逐渐枯萎(图

2H),但 t_2 代转化型植株仍继续生长并不断从中心生出小叶,叶片数量增多。播种 22 周后型差异一致,野生型植株完全枯萎死亡;而 t_2 代转化型植株仍能继续正常生长(图 2I),直到播种 29 周后型差异一致,才枯萎。由此,笔者初步推测,胡杨基因组大片段 78A2D10 可能具有延长营养生长期及延长植株寿命的功能。同时,与野生型对比, t_2 代转化型植株侧茎分化成次生莲座(图 2I、2J),具有典型的莲座叶特征。前期实验,从卡那霉素培养基中随机挑选 12 株抗性植株幼苗,移植于土壤后,4 株出现特异表型。重复筛选,随机从卡那霉素培养基中挑选 36 株抗性植株幼苗中,获得特异表型植株 11 株。



注:T表示转化型,WT表示野生型;A: t_1 代播种3周,B: t_1 代播种5周,C: t_1 代重复筛选,D: t_2 代播种5周,E: t_2 代播种10周,F: t_2 代播种17周,G: t_2 代播种27周,H: t_2 代播种12周,I: t_2 代播种22周,J:次生莲座。

Note: T is represented transgenic plants, WT is represented wild type plants; A: t_1 seeds are planted three weeks, B: t_1 seeds are planted five weeks, C: t_1 seeds repetitively screening, D: t_1 seeds are planted five weeks, E: t_1 seeds are planted ten weeks, F: t_1 seeds are planted seventeen weeks, G: t_1 seeds are planted twenty seven weeks, H: t_1 seeds are planted twelve weeks, I: t_2 seeds are planted twenty two weeks, J: secondary rosette leaf.

图2 转化型与野生型植株对比

Fig. 2 The Comparison of transgenic and wild plants

2.2.4 t_2 代转基因植株莲座叶面积、株高及花期统计 t_2 代转化型和野生型植株莲座叶的叶面积、株高及花期统计分析结果见图3。由图3A可知:转化型植株 t_2 代莲座叶面积明显大于野生型莲座叶面积($P < 0.05$),在统计学上有显著意义。 t_2 代转化型植株莲座叶叶面积比野生型莲座叶增长近3倍。

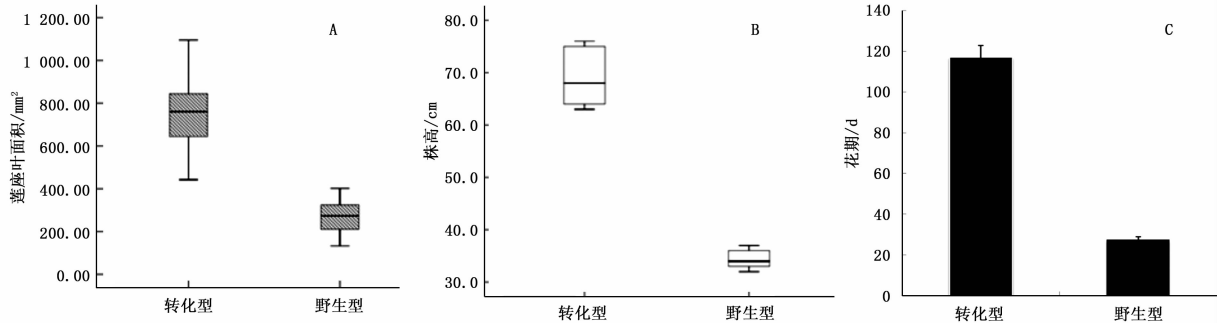


图3 2种拟南芥植株莲座叶面积(A)、株高(B)和花期(C)性状统计

Fig. 3 Analysis of leaf area (A), flowering time (B) and plant height (C) of *Arabidopsis* transgenic and wild plants

2.2.5 t_3 代转基因植株 利用收获到的 t_2 代无特异表型植株的种子进行卡那霉素平板筛选,种子萌发形成的150株 t_3 代幼苗中,绿色抗性植株118株,黄化植株32株,比例接近3:1。随机从绿色抗性植株中挑取36株移植土壤中,结果发现,11株表现为抽薹晚、植株叶量多、叶面积大等特异表型,无特异表型与特异表型比例接近2:1。利用 t_2 代特异表型植株的种子进行卡那霉素平板筛选,种子萌发形成的 t_3 代幼苗均为绿色抗性植株,无黄化苗。从中随机挑取12株,移植于土壤中,结果发现,所有植株表现为特异表型。

3 讨论

植物抽薹、开花是经过一连串的信号转导与一系列基因家族协同调控的^[12-14]。有研究认为,植物内源激素^[15-16]与小分子RNA(miR156)及其靶基因^[17-18]影响植物营养生长和花发育。胡杨大片段基因长度远远大于单个基因序列长度,随机插入拟南芥植物体内,可能会发生中断调控、破坏正常基因阅读框或高效表达等^[19]情况。本研究中,胡杨基因组大片段78A2D10转化型拟南芥表现为营养生长期长、抽薹晚等现象是否与上述机理有关,有待进一步研究。有报道指出,GRF转录因子能参与调控植物细胞体积大小^[20],油菜素甾醇(BR)、生长素(IAA)、赤霉素(GA)均能促进植物细胞伸长^[21-22],胡杨基因组大片段78A2D10转化型拟南芥株高明

由图3B可知: t_2 代转化型植株株高明显高于野生型,株高平均增长近32.0 cm。由图3C可知: t_2 代转化型植株花期与野生型花期差异极明显($P < 0.01$),野生型植株在4周即开始抽薹,而转化型植株在17周才陆续抽薹,比野生型晚抽薹13周。

显高于野生型、主茎变粗,是由上述机理决定的,还是由于转化型植株的前期营养生长积累了大量营养物质^[23]造成的,目前还不清楚。

对胡杨基因组大片段78A2D10转化型拟南芥植株的后代(t_2 至 t_3)进行反复筛选,发现转化型植株后代群体中,无特异表型植株与特异表型植株比例接近2:1,性状分离比例与孟德尔遗传定律中分离比基本吻合。这表明,胡杨基因组大片段78A2D10遗传方式符合孟德尔定律^[24],胡杨基因组大片段78A2D10为隐性遗传方式^[25],无特异表型植株为杂合体,特异表型植株为纯合体。本研究中, t_1 代转化型植株出现的抽双薹性状未在 t_2 代杂合体中出现,尚不清楚其原因。

为了进一步探讨胡杨基因组大片段78A2D10的功能,下一步计划将携带胡杨基因组大片段78A2D10的农杆菌原始菌液转入其他模式植物如烟草(*Nicotiana tabacum* L.)中,观察烟草转化型植株是否会出现延长营养生长的现象。基于基因测序方法,获取其碱基序列,通过生物信息学分析,在分子水平上进一步探讨该大片段基因的时空表达模式。

4 结论

本研究中,导入胡杨基因组大片段78A2D10的拟南芥转化型植株在莲座基叶数量、基叶面积、营养生长期、莲座叶的叶片伸展程度、株高、茎粗、茎生叶、抽薹时间、侧茎发育方式以及植株寿命等方面与

野生型存在明显差异,转化型植株的营养期明显延长、株高明显增高,这表明胡杨基因组大片段 78A2D10 可能与植物营养生长有关。如果将胡杨基因组大片段 78A2D10 转化到重要用材林树种,如杨树(*Populus L.*)中,可望提高树木的高生长量和胸径生长量,增加单位面积蓄积量,为林业新品种创制提供新的基因资源。

参考文献:

- [1] 史军辉,王新英,刘茂秀,等. NaCl 胁迫对胡杨幼苗叶主要渗透调节物质的影响[J]. 西北林学院学报, 2014, 29(6):6-11.
- [2] Chen S, Polle A. Salinity tolerance of *Populus* [J]. *Plant biology*, 2010, 12(2): 317-333.
- [3] 刘 春,曹丽敏,李玉中,等. 利用转基因途径提高植物非生物胁迫耐受性的研究进展[J]. 生物技术通报,2013(1):16-24.
- [4] 张 瑗,何丽君,黄 鹏,等. 胡杨大片段基因在拟南芥中的表达及耐盐性分析[J]. 林业科技开发, 2015, 29(4):48-53.
- [5] 周 婧. 利用 BIBAC 文库建立胡杨转化基因组学平台及鉴定胡杨耐盐基因(簇)的研究[D]. 北京:中国林业科学研究院, 2013.
- [6] 朱晓静. 胡杨基因组 DNA 大片段的拟南芥转化及突变体初步鉴定[D]. 保定:河北农业大学, 2013.
- [7] 王 智. 胡杨基因组大片段转化拟南芥及突变体生物性状分析[D]. 保定:河北农业大学, 2014.
- [8] 谭诗梦,敖小平,符泽华,等. 胡杨大片段转化拟南芥植株表型分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2016, 36(8):53-56.
- [9] 徐刚标,卢孟柱,陆 燕. *ARF* 基因导入烟草的遗传研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2007, 27(5):6-12.
- [10] 肖 强,叶文景,朱 珠,等. 利用数码相机和 Photoshop 软件非破坏性测定叶面积的简便方法[J]. 生态学杂志, 2005, 24(6):711-714.
- [11] 赵翔宇,谢洪涛,陈祥彬,等. 小麦 *TaYAB2* 基因的过量表达造成转基因拟南芥叶片近轴面特征趋向远轴面[J]. 作物学报, 2012, 38(11):2042-2051.
- [12] Rademacher E H, Möller B, Lokense A S, *et al.* A cellular expression map of the *Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family [J]. *The Plant Journal*, 2011, 68(4): 597-606.
- [13] Zhang L, Li Q, Dong H, *et al.* Three CCT domain-containing genes were identified to regulate heading date by candidate gene-based association mapping and transformation in rice [J]. *Scientific reports*, 2015, 5: 7663.
- [14] 李建波,张 进,刘伯斌. 拟南芥 *AtFBDLI* 在植物顶端生长调节中的作用[J]. 林业科学研究,2015,28(1): 1-7.
- [15] Motomitsu A, Sawa S, Ishida T. Plant peptide hormone signaling [J]. *Essays in Biochemistry*, 2015, 58(1):115.
- [16] 李运婷,宗秀虹,张华雨,等. 钝叶铃不同性别植株花期叶片内源激素含量的变化[J]. 园艺学报, 2016, 43(7):1411-1418.
- [17] Teotia S, Tang G. To bloom or not to bloom: role of microRNAs in plant flowering [J]. *Molecular plant*, 2015, 8(3): 359-377.
- [18] Spanudakis E, Jackson S. The role of microRNAs in the control of flowering time [J]. *Journal of experimental botany*, 2014, 65(2): 365-380.
- [19] Cellini F, Chesson A, Colquhoun I, *et al.* Unintended effects and their detection in genetically modified crops[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42: 1089-1125.
- [20] Liang G, He H, Li Y, *et al.* Molecular mechanism of microRNA396 mediating pistil development in *Arabidopsis*[J]. *Plant physiology*, 2014, 164(1):249-258.
- [21] Zhu J Y, Sae-Seaw J, Wang Z Y. Brassinosteroid signaling [J]. *Development*, 2013, 140(8): 1615-1620.
- [22] Depuydt S, Hardtke C S. Hormone signaling crosstalk in plant growth regulation [J]. *Current Biology*, 2011, 21(9): R365-R373.
- [23] Jakob K, Zhou F, Paterson A H. Genetic improvement of C₄ grasses as cellulosic biofuel feedstocks[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2009, 45(3): 291-305.
- [24] 王建军,杨慧珍,刘 佼. *cryIac* 基因在转基因玉米中的遗传规律及对抗虫性影响[J]. 生物技术通报, 2015, 31(1): 122-130.
- [25] 朱秋强,于曙光,柯兰兰,等. 转基因水稻叶片外卷突变体的机理[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2016,45(6): 655-661.

(责任编辑:张 研)