

84K 杨基因转化受体系统的建立^{*}

张 岗, 康振生, 孙燕飞, 韩青梅, 芦晓飞

(西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 以 84K 杨为研究对象, 通过建立叶片再生系统及卡那霉素敏感性试验, 确立了稳定高效的基因转化受体系统。结果表明, 以 MS 培养基为基本培养基, 0.5~1.0 mg/L 6-BA + 0.01~0.1 mg/L NAA 组合时, 叶片出芽率不到 50%, 每叶平均生芽数 5~6 个; 1.0~1.5 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L 2, 4-D 组合时, 叶片出芽率达 90%~100%, 每叶平均生芽数约 20 个。用后者附加不同质量浓度梯度卡那霉素, 确定叶片外植体芽诱导卡那霉素临界筛选质量浓度为 20 mg/L。利用对 84K 杨芽生根效果较好的培养基 GM S + 0.01 mg/L NAA + 0.25 mg/L BA, 附加不同质量浓度梯度卡那霉素, 筛选出芽生根卡那霉素临界质量浓度亦为 20 mg/L。

[关键词] 84K 杨; 基因转化; 受体系统; 不定芽诱导; 外植体

[中图分类号] S792.119.05

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)04-0087-04

杨树(*Populus* spp.) 是重要的速生树种, 用途极为广泛, 在造林、绿化、工业用材等方面起到了其他树种无法替代的作用^[1,2]。作为林木分子生物学研究的模式植物, 杨树基因工程发展迅速, 在生物抗性和非生物抗性基因工程两个方面取得巨大成就^[3,4]。但是由于植物转基因技术体系易受多种因素影响, 且各因素之间又可能相互作用, 所以存在转化频率较低、重复性差等缺点。

1985 年 Horsch 等^[5]发明叶盘法后, 基因工程的下游工作相对简化。成功的基因转化系统首先依赖于良好的植物受体系统的建立, 即用于转化的外植体能高效、稳定地再生无性系, 并且能接受外源 DNA 整合, 同时对所选用的用于筛选转化的细胞或植株的抗生素有一定敏感性^[6]。目前, 较为普遍的选择标记基因是新霉素磷酸转移酶基因, 简称 *np t II*, 其编码蛋白可以抑制新霉素族的氨基糖苷类菌素(抗生素)的活性, 如卡那霉素(kan, kanamycin)、新霉素(neo, neomycin)等。

根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 载体转化是目前最成功的转化系统^[6]。LBA 4404 菌株对杨树侵染性较好, 已广泛应用于杨树遗传转化中^[1,2,7~10]。樊军锋等^[9]于 2002 年采用根癌土壤杆菌介导的叶盘法进行了 84K 杨耐盐基因的转化研究, 获得了部分转基因植株。但是有关 84K 杨抗病

基因的遗传转化尚未见报道, 而本实验室在利用报道的受体系统^[9,11]进行抗病基因遗传转化时, 发现其并不适用。为此, 本试验进行了 84K 杨叶片外植体高效受体系统的研究, 为进一步利用根癌土壤杆菌介导的叶盘法进行抗病基因遗传转化奠定物质基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及准备

84K 杨无菌苗由西北农林科技大学林学院樊军锋副研究员惠赠, 并以 84K 杨叶片作为受体。植物激素、卡那霉素均购自北京鼎国生物技术有限责任公司。6-BA (6-苄氨基嘌呤, Sigma 分装) 用 1.0 mol/L HCl 助溶, 配成质量浓度为 1.0 mg/mL 的母液; 2, 4-D (2, 4-二氯苯氧乙酸, 上海) 和 NAA (α -萘乙酸, 国产) 用 1.0 mol/L NaOH 助溶, 母液质量浓度分别为 0.02 mg/mL 及 0.01 mg/mL, 均置 4℃ 冷藏备用。卡那霉素(kanamycin sulfate, Japan 分装) 用无菌双蒸水配成质量浓度为 10 mg/mL 的母液, -20℃ 冷冻保存备用。

1.2 叶片的再生

1.2.1 叶片外植体不定芽诱导培养基的筛选 以 MS 培养基为基本培养基, 附加质量浓度为 0.5, 1.0 mg/L 6-BA, 分别与 0.01, 0.10 mg/L NAA 和

^{*} [收稿日期] 2004-10-25

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(2004C101)

[作者简介] 张 岗(1981-), 男, 陕西兴平人, 在读硕士, 主要从事植物病理学研究。

[通讯作者] 康振生(1957-), 男, 四川安岳人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事病原物与寄主植物互作关系中生物学和分子生物学研究。E-mail: kangzs@nw.suaf.edu.cn

0.02, 0.10 mg/L 2, 4-D 配比, 组合成 8 种处理的初筛不定芽诱导培养基; 附加质量浓度为 0.5, 1.0, 1.2, 1.5, 1.8 mg/L 6-BA, 和 0.02 mg/L 2, 4-D 配比组合成 5 种处理的优化培养基。所有培养基蔗糖均为 30 g/L, 琼脂 6.0 g/L, pH 5.8。将培养 30 d 左右的无菌苗叶片去叶柄, 沿主脉均匀划伤数道后放入不同培养基中。每个培养皿放入 4 片叶作为 1 个处理, 重复 4 次。叶片背景(大小、颜色)尽量保持一致。置(25±2) °C, 光照强度 1 500~2 000 lx, 16 h/8 h 光暗周期条件下培养。每 2 周换一次新鲜培养基, 50 d 后统计各处理叶片切口产生的不定芽数量(芽长度≥0.5 cm), 计算出芽率、每叶平均生芽数。根据出芽率、每叶平均生芽数及不定芽生长状况筛选最佳不定芽诱导培养基。出芽率= 分化不定芽的叶片数/接种叶片数×100%。出愈率= 产生愈伤组织叶片数/接种叶片数×100%。生根率= 分化不定根的小芽数/接种小芽数×100%。

1.2.2 再生植株的获得 当再生芽生长至 1~2 cm, 形成 2~4 个叶片时, 将其顺茎基部切下, 接种到 GM S+ 0.01 mg/L NAA+ 0.25 mg/L BA^[11] 上诱导生根。培养条件同 1.2.1。

1.3 卡那霉素敏感性试验

1.3.1 芽诱导卡那霉素敏感性试验 将背景基本一致的 84K 杨叶片去叶柄, 并沿主脉均匀划伤数道后, 分别接种到含有质量浓度为 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 mg/L 卡那霉素的最佳不定芽诱导培养基上。每个质量浓度设置 1 个培养皿, 每个培养皿接种 4 片叶, 重复 4 次。培养条件同 1.2.1。不定期观察芽诱导及叶片生长状况, 确定合适的芽诱导选择压力。

1.3.2 芽生根卡那霉素敏感性试验 将背景基本一致的 84K 杨小芽(3~5 片叶, 主茎 1.5 cm 左右)分别接种到含有质量浓度为 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 mg/L 卡那霉素的生根培养基上。每个质量浓度设置 1 个三角瓶, 每个三角瓶接种 4 株芽, 重复 4 次。培养条件同 1.2.1。不定期观察小芽生长及生根状况, 确定合适的芽生根选择压力。

2 结果与分析

2.1 叶片再生系统的建立

以 MS 培养基为基本培养基, 附加 6-BA, NAA 及 2, 4-D 组成 8 种培养基, 不同组合的培养基对 84K 杨叶片再生过程不定芽诱导效果见表 1。由表 1 可知, M1~M4 组合的诱导效果相似, 出愈天数相近, 愈伤组织较小, 除少数不定芽不经愈伤阶段直接分化产生外, 大部分不定芽从愈伤组织上分化, 各组合出芽率及每叶平均生芽数差异不显著。M5~M8 组合的诱导效果存在明显差异, 当 2, 4-D 质量浓度为 0.1 mg/L 时, 叶片切口愈伤化比较严重, 愈伤组织块大而疏松, 随培养时间延长, 愈伤组织体积增大, 没有不定芽分化, 说明 2, 4-D 启动细胞脱分化、诱导细胞分裂的活性较强。当 2, 4-D 质量浓度降至 0.02 mg/L 时, 叶片切口愈伤组织小而致密, 18 d 时开始有芽从愈伤组织上分化, 分化时间可延长至 50 d/以上。同时, 较高质量浓度的 6-BA 与 0.02 mg/L 2, 4-D 搭配, 对于出芽天数的提前, 出芽率的提升以及每叶平均生芽数的增加都是有利的。因此, M8 对 84K 杨叶片的诱导分化, 在出芽率及每叶平均生芽数上均优于 M1~M7, 是较为合适的不定芽诱导培养基。

表 1 不同培养基对 84K 杨叶片外植体不定芽诱导的影响

Table 1 Effect of different media on adventitious bud induction for poplar 84K leaf explants

培养基 Media	激素/(mg · L ⁻¹) Hormone			叶片数 No. of leaves	出愈天数/d Days of inducing calli	出芽天数/d Days of budding	出芽率/% Percentage of budding	每叶平均生芽数 Average adventitious buds per leaf
	6-BA	NAA	2, 4-D					
M1	0.5	0.01	0	4	15	25	37.5	6.5
M2	1.0	0.1	0	4	14	27	43.8	4.4
M3	0.5	0.1	0	4	14	31	18.8	4.6
M4	1.0	0.01	0	4	16	29	31.2	5.2
M5	0.5	0	0.1	4	7	0	0	0
M6	1.0	0	0.1	4	8	0	0	0
M7	0.5	0	0.02	4	11	19	75.0	2.6
M8	1.0	0	0.02	4	10	18	93.8	14.0

注: 表中数据为 50 d 时统计 4 次重复的平均值(下表同)。

Note: Each statistic value in the table was the average of four replications after 50 d (the same as below).

对 6-BA 和 2, 4-D 组合优化的试验结果见表 2。 由表 2 可知, 随 6-BA 质量浓度的增加, 出芽率和每

叶平均生芽数均显著提高。当 6-BA 质量浓度为 1.2 mg/L 时, 所有叶片都可分化, 出芽率达到阈值, 每叶平均生芽数高达 20 个。6-BA 质量浓度继续增加, 出芽率均为 100%, 每叶平均生芽数虽有所增加, 但增幅不大, 且不定芽出现叶片畸形, 茎扭曲等

不良症状。这可能是由于添加过高质量浓度的外源激素导致不定芽畸形生长。因此, 在保证诱导正常不定芽的前提下, 具备高的诱导率, 比较理想的不定芽诱导培养基组成为MS+ 1.0~1.5 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L 2, 4-D。

表 2 6-BA 与 2, 4-D 组合对 84K 杨叶片外植体不定芽诱导的影响

Table 2 Effect of combination of 6-BA and 2, 4-D on adventitious bud induction for poplar 84K leaf explants

培养基 Media	激素/(mg · L ⁻¹) Hormone		叶片数 No. of leaves	出芽率/% Percentage of budding	每叶平均生芽数 Average adventitious buds per leaf disc
	6-BA	2, 4-D			
M 7	0.5	0.02	4	72.7	2.4
M 8	1.0	0.02	4	95.2	15
M 9	1.2	0.02	4	100	20
M 10	1.5	0.02	4	100	17
M 11	1.8	0.02	4	100	23

将再生芽接种到MS+ 0.01 mg/L NAA + 0.25 mg/L BA 上, 约 7 d 即可全部诱导生根, 根系发育良好, 小苗生长健壮, 说明此生根培养基比较适合, 后续试验继续使用。

2.2 卡那霉素敏感性试验结果

2.2.1 芽诱导卡那霉素敏感性试验 84K 杨叶片芽诱导卡那霉素敏感性试验结果见表 3。表 3 结果表明, 较低质量浓度的卡那霉素即抑制芽的诱导分化。在不添加卡那霉素的对照培养基上, 所有叶片从伤口产生大量的丛生芽, 单位叶片产芽量几乎没有变化。在含卡那霉素 5 mg/L 的培养基上, 出愈时间

比对照推迟 2 d, 出芽时间比对照推迟 1 d, 43.8% 的叶片分化产生少量量的丛生芽, 单位叶片产生的芽量仅有 3~5 个。在含卡那霉素 10 和 15 mg/L 培养基上, 愈伤组织产生很少, 个别叶片产生极少量的不定芽, 50 d 左右, 叶片变黄。当卡那霉素质量浓度≥20 mg/L 时, 叶片不产生愈伤组织, 也不出芽, 随卡那霉素质量浓度的增加, 叶片褪绿、黄化逐渐加重, 卡那霉素质量浓度为 50 mg/L 时, 叶片已大面积坏死。故卡那霉素 20 mg/L 即可作为后续遗传转化时不定芽诱导阶段的临界筛选质量浓度。

表 3 84K 杨叶片芽诱导卡那霉素敏感性试验结果

Table 3 The results of kanamycin sensitivity test for adventitious bud induction of poplar 84K leaf explants

卡那霉素/ (mg · L ⁻¹) kan	叶片数 No. of leaves	出愈率/% Percentage of calli induction	出芽率/% Percentage of budding	叶片生长情况 Growth status of leaves
0	4	100	100	叶片正常, 分化出大量芽 Normal, many adventitious buds
5	4	81.3	43.8	叶片基本正常, 分化出少量芽 Nearly normal, a few buds
10	4	18.8	6.25	叶片淡绿色, 分化出个别芽 Light green, very few buds
15	4	18.8	6.25	叶片黄绿色, 分化出个别芽 Yellow green, very few buds
20	4	0	0	叶片淡黄色 Light yellow
30	4	0	0	叶片局部黄化 Partially etiolation
40	4	0	0	叶片部分黄化 Partially etiolations
50	4	0	0	叶片部分坏死 Partially necrosis
60	4	0	0	叶片大部分坏死 Greater part necrosis

2.2.2 芽生根卡那霉素敏感性试验 84K 杨小芽生根卡那霉素敏感性试验结果见表 4。表 4 结果表明, 较低质量浓度的卡那霉素即抑制小芽的生根。在不添加卡那霉素的对照培养基上, 所有芽均在 7 d 左右生根, 根系发达, 生长健壮。当卡那霉素为 5~15 mg/L 时, 生根天数均有不同程度推迟, 根的状况

随卡那霉素质量浓度增加表现愈差, 芽的生长受到抑制, 生长不正常。当卡那霉素质量浓度≥20 mg/L 时, 芽均未生根, 生长受到严重抑制, 甚至死亡, 故卡那霉素 20 mg/L 即可作为后续遗传转化时再生芽生根阶段的临界筛选质量浓度。

表 4 84K 杨芽生根卡那霉素敏感性试验结果

Table 4 The results of kanamycin sensitivity test of root induction for poplar 84K shoots

卡那霉素/ (mg · L ⁻¹) kan	小芽数 No. of shoots	生根率/% Rooting percentage	根生长情况 Growth status of roots	芽生长情况 Growth status of shoots
0	4	100	主根 3~5 个, 长 3~6 cm 不等, 粗壮, 着生较多 ≤1 cm 的侧根 3- 5 taproots, length varied 3- 6 cm or so, thick and strong, several side roots ≤1 cm	抽茎 2 0~4 0 cm, 生新叶 4~5 片, 生长健壮 Stems developed 2 0- 4 0 cm, 4- 5 pieces of new leaves, strong
5	4	37.5	主根 2~3 个, 长 0.3~3 cm 不等, 根细, 少量侧根 2- 3 taproots, length varied 0.3- 3 cm or so, fine, a few side roots	个别抽茎 ≤1.5 cm, 生新叶 1~2 片, 底部叶片发黄枯死, 生长基本正常 Few stems developed ≤1.5 cm, 1- 2 pieces of new leaves, the base leaves yellow, basically normal
10	4	18.8	主根 1~2 个, 长 ≤0.5 cm, 根细, 无侧根 1- 2 taproots, length ≤0.5 cm or so, fine, no side root	不抽茎, 无新叶, 叶部分失绿, 生长不正常 Stem undeveloped, no new leaves, part leaves yellow, abnormal growth
15	4	6.25	仅 1 个根, ≤0.5 cm, 极细 Only 1 root, ≤0.5 cm, extremely fine	不抽茎, 无新叶, 叶部分黄化, 生长不正常 Stem undeveloped, no new leaves, partial leaves yellow, abnormal growth
20	4	0	不生根 No root	停止生长, 芽黄化 Growth ceased, bud etiolation
30	4	0	不生根 No root	停止生长, 芽黄化 Growth ceased, bud etiolation
40	4	0	不生根 No root	停止生长, 芽黄化 Growth ceased, bud etiolation
50	4	0	不生根 No root	枯死 Withered
60	4	0	不生根 No root	枯死 Withered

3 结论与讨论

2, 4-D 主要用于杨树组织培养中愈伤组织的诱导^[12, 13], 并有对器官分化不利的报道^[14]。本研究首次将 2, 4-D 同时用于杨树组织培养中的愈伤组织诱导和芽分化, 证明微量 2, 4-D 可诱导杨树叶片产生愈伤组织, 但未对芽的分化产生抑制作用。本研究结果表明, MS+0.02 mg/L 2, 4-D+1.0~1.5 mg/L 6-BA 能高效诱导 84K 杨叶片外植体产生大量不定芽, 与前人的报道^[11]相比, 诱导率高达 90%~100%, 单位叶片诱导不定芽数量也明显增

多, 从而为高频率转化提供了良好条件。

本试验筛选的 84K 杨叶片外植体芽诱导及芽生根卡那霉素临界质量浓度均为 20 mg/L, 与前人报道^[9](分别为 50 mg/L 和 60 mg/L 卡那霉素)差别较大。这可能是由于植物组织培养过程中受多种因素影响。同时本研究结果还表明, 卡那霉素对 84K 杨小苗的生根存在“极性效应”, 即随着卡那霉素质量浓度的逐渐上升, 根的生长位置沿主茎缓慢向上移动, 有的甚至脱离培养基, 但这种现象并未影响卡那霉素敏感性试验效果。至于“极性效应”产生的内在机理还有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 刘 斌, 李红双, 王其会, 等 反义磷脂酶D₃基因转化毛白杨的研究[J]. 遗传, 2002, 24(1): 40- 44
- [2] 郝贵霞, 朱 祯, 朱之悝 豇豆蛋白酶抑制剂基因转化毛白杨的研究[J]. 植物学报, 1999, 41(12): 1276- 1282
- [3] 林善枝, 肖基洪, 张志毅 杨树抗性基因工程研究进展[J]. 北京林业大学学报, 2000, (6): 85- 88
- [4] 苏晓华, 张冰玉, 黄烈健, 等 转基因林木研究进展[J]. 林业科学研究, 2003, 16(1): 95- 103
- [5] Horsch R B, Fry J E, Hoffman N L, et al A simple and general method for transferring genes into plant[J]. Science, 1985, 227(7): 1229- 1231
- [6] 王关林, 方宏筠 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002 344- 358
- [7] 陈 颖, 韩一凡, 李 玲, 等 苏云金杆菌杀虫晶体蛋白基因转化美洲黑杨的研究[J]. 林业科学, 1995, 31(2): 97- 103
- [8] 赵世民, 祖国诚, 刘根齐, 等 通过农杆菌介导法将兔防御素N P-1 基因导入毛白杨(P. tomentosa) [J]. 遗传学报, 1999, 26(6): 711- 714
- [9] 樊军锋, 李 玲, 韩一凡, 等 84K 杨树耐盐基因转化研究[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(4): 33- 37
- [10] Fernando Gallardo, Jianming Fu, Francisco R, et al Expression of a conifer glutamine synthetase gene in transgenic poplar[J]. Planta, 1999, 210: 19- 26
- [11] 樊军锋, 李 玲, 韩一凡, 等 84K 杨叶片外植体再生系统的建立[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(2): 33- 36
- [12] 杜克久, 郑均宝, 徐振华, 等 741 杨器官、体细胞胚胎发生的细胞组织学及生理学的研究[J]. 林业科学, 1998, 34(6): 99- 104
- [13] 胡景江, 文建雷, 景 耀, 等 杨树体内苯丙烷代谢与其杨树溃疡病抗性的关系[J]. 植物病理学报, 1992, 22(2): 185- 188
- [14] 赵华燕, 卢善发, 晁瑞堂 杨树的组织培养及其基因工程研究[J]. 植物学通报, 2001, 18(2): 169- 176

(下转第 96 页)

Study on the effect of cropland evaporation on soil water environment and the preventive measures in the Loess Plateau hilly and gullied area of North Shaanxi

YANG Kai-bao¹, LIU Guo-bin¹, LI Jing-lin¹, GAO Li²

(1 College of Source and Environment, Northwest A & F University, Yangling 712100, China;

2 Water Business Bureau of Yulin City Shaanxi Province, Shaanxi, Yulin 719000, China)

Abstract: In order to explore the evaporation and transpiration law of soil moisture in cropland in Loess Plateau of North Shaanxi, and to improve the efficiency of soil moisture use, by using TDR sensor to measure water content, the soil moisture of bare land, crop land and covered cropland in the drought terrace were watched systematically, then integrating the data of field automatic weather station, we analyzed the water evaporation law of farmland of the Loess Plateau hilly and gullied area: there are two intense evaporation periods in one year, vaporized volume in one year is 74.4% of annual precipitation. The period when there is no crop contributes more to water storage. Partially covered soil (film cover, covering ratio is 60%) is in favor of the conservation of soil water, and fully covered soil (combined cover and straw cover, covering ratio is 100%) is in favor of highly efficient use of soil water. Based on these studies, an efficient technological way of increasing soil water use is put forward: the utility of soil water can be enhanced by the cover technology of ditch and ridge covered with two materials, rotating crops between grass and grain avoiding the desolation of tillable field.

Key words: Loess Plateau of north Shaanxi; hilly and gully area; evaporation and transpiration of cropland; soil water environment; control measure

(上接第 90 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)04-0087-EA

Establishment of gene transformation receptor system for poplar 84K

ZHANG Gang, KANG Zhen-sheng, SUN Yan-fei, HAN Qing-mei, LU Xiao-fei

(College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Through the establishment of high frequency regeneration system for leaf and kanamycin sensitivity tests, a stable and efficient gene transformation receptor system for poplar 84K was set up, which laid a sound foundation for *Agrobacterium* mediated transformation of disease resistance gene by means of leaf disc method. The results indicated that budding percentage was less than 50% and average adventitious buds per leaf was 5-6 when basal MS medium supplemented with 0.5-1.0 mg/L 6-BA + 0.01-0.1 mg/L NAA. While 1.0-1.5 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L 2,4-D were added to MS medium, 90%-100% budding percentage and 20 average adventitious buds per leaf were obtained. Utilizing the latter medium, adding different concentrations of kanamycin, the optimal selecting pressure 20 mg/L of kanamycin for adventitious bud was confirmed. GM S+ 0.01 mg/L NAA + 0.25 mg/L BA was better to induce root, by which the optimal selecting pressure for root induction was also 20 mg/L of kanamycin for poplar 84K when adding kanamycin different concentrations.

Key words: poplar 84K; gene transformation; receptor system; adventitious bud induction; explant