

# AtNHX1 基因对荞麦的遗传转化及抗盐再生植株的获得 Genetic Transformation of Buckwheat ( *Fagopyrum esculentum* Moench ) with *AtNHX1* Gene and Regeneration of Salt-tolerant Transgenic Plants

陈利红, 张 波, 徐子勤\*

CHENG Li-Hong, ZHANG Bo and XU Zi-Qin\*

西北大学陕西省生物技术重点实验室, 西安 710069

Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology, Northwest University, Xi'an 710069, China

**摘 要** 通过农杆菌介导法将拟南芥液泡膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向转运蛋白基因 *AtNHX1* 转入荞麦中, 在 2.0mg/L 6-BA、0.1mg/L IAA、1mg/L KT、50mg/L 卡那霉素和 500mg/L 头孢霉素的 MS 培养基上进行选择培养, 从来源于 864 块外植体的 36 块抗性愈伤组织中共获得 426 棵再生植株(转化频率为 4.17%)。经 PCR、Southern 印迹分析、RT-PCR 和 Northern 检测, 初步证实 *AtNHX1* 基因已整合至荞麦基因组中。用 200mmol/L 的盐水对转基因植株和对照植株进行胁迫处理 6 周, 转基因植株能够生存, 而对照植株死亡。用不同浓度的 NaCl 溶液处理转基因植株和对照植株, 发现  $\text{Na}^+$  及脯氨酸含量在转基因植株中的积累水平显著高于对照植株, 而  $\text{K}^+$  的含量在转基因植株中的积累水平低于对照植株。次生代谢产物黄酮类化合物芦丁在转基因植株根、茎和叶片中的含量也比对照植株明显要高。这些结果表明利用基因工程手段提高作物的耐盐性是可行的。

**关键词** 荞麦,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向转运蛋白, 耐盐性, 芦丁, 高效液相色谱

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0051-10

**Abstract** The *Arabidopsis thaliana* tonoplast  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene, *AtNHX1*, was transferred into buckwheat by *Agrobacterium*-mediated method. Transgenic buckwheat plants were regenerated and selected on MS basal medium supplemented with 2.0mg/L 6-BA, 1.0mg/L KT, 0.1mg/L IAA, 50mg/L kanamycin and 500mg/L carbenicillin. 426 seedlings from 36 resistant calli originated from 864 explants (transformed about at 4.17 percentage) exhibited resistance to kanamycin. The transformants were confirmed by PCR, Southern blotting, RT-PCR and Northern blotting analysis. After stress treatment for 6 weeks with 200mmol/L NaCl, transgenic plants survived, while wild-type plants did not. After 3 days of stress treatment through different concentrations of NaCl, transgenic plants accumulated higher concentration of  $\text{Na}^+$  and proline than the control plants. However, the  $\text{K}^+$  concentration of transgenic plants declined in comparison with the control plants. Moreover, the rutin content of the roots, stems and leaves of transgenic buckwheat increased than those of the control plants. These results showed that it could be possible to improve the salt-tolerance of crops with genetic technology.

**Key words** *Fagopyrum esculentum* Moench,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter, salt tolerance, rutin, HPLC

土壤盐分是制约作物产量的主要因素, 它可使作物尤其是灌溉农业的作物减产。土壤盐分过高还

可造成盐碱地, 限制土壤的利用。目前, 世界上大约 20% 的耕种土地和接近一半的灌溉土地都遭到了盐

Received: August 15, 2006; Accepted: October 26, 2006.

This work was supported by grant from National Science Foundation of Shaanxi Province (No. 04JS07) and Research Project of Provincial Key Laboratory (No. 05JK304).

\* Corresponding author. Tel: +86-29-88303484; E-mail: ziqinxu@nwu.edu.cn

陕西省自然科学基金项目( No. 04JS07 )和省重点实验室重点项目( No. 05JK304 ) 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

胁迫的危害<sup>[1]</sup>。我国有近  $2.7 \times 10^7 \text{ hm}^2$  的盐碱化土地,主要分布在新疆、甘肃等西北干旱、半干旱地区。随着分子遗传学和植物转基因技术的快速发展,采用生物技术提高作物的耐盐性,使作物在盐胁迫环境中能够正常生长并提高产量,正受到越来越多的关注并取得了一定的成果。提高作物耐盐性的方法有很多,如改造生物合成途径,在作物体内表达耐盐相关基因或改变基因对胁迫的反应特性等<sup>[2,3]</sup>。

$\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向转运蛋白普遍存在于盐生植物和耐盐甜土植物的质膜及液泡膜上,它利用质膜上的 P 型  $\text{H}^+$ -ATPase 或液泡膜上的 V 型  $\text{H}^+$ -ATPase 和 V 型  $\text{H}^+$ -PPase 建立的跨膜质子梯度作为驱动力,驱动  $\text{Na}^+$  运出细胞或转移进液泡。植物不同器官的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向转运蛋白对盐胁迫的响应具有不同的特征,而且其活性的变化与各器官液泡膜质子泵活性的变化及  $\text{Na}^+$  离子积累相一致<sup>[4,5]</sup>。从拟南芥中分离出的 *AtNHX1* 基因编码一种液泡膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向转运蛋白,在转基因拟南芥和转基因番茄中过量表达 *AtNHX1*,大量的运输蛋白即在液泡膜中积累,能够极大地提高这两种植物的耐盐性<sup>[6-9]</sup>。将钠离子区隔化至液泡中以后,不仅可减小其细胞毒性<sup>[10,11]</sup>,还可作为有效的渗透调节剂。植物细胞生长主要由液泡体积的膨胀进行调控,钠离子和氯离子的区隔化不仅有利于渗透调节,对细胞发育也是必需的。

荞麦是蓼科 (*Polygonaceae*) 荞麦属 (*Fagopyrum*) 的双子叶植物,主要栽培种有甜荞 (*F. esculentum* Moench, 也叫普通荞麦) 和苦荞 (*F. tartaricum* (L.) Gaerth, 也叫鞑靼荞麦) 两种。荞麦是一种营养丰富的杂粮,同时具有药用和食用价值。其籽粒富含高生物效价蛋白质、维生素、矿质元素等,更重要的是含有极为丰富的生物活性成分——黄酮类化合物,是膳食黄酮的主要来源,这是其它谷类粮食所不具有的。荞麦中黄酮的主要成分是芦丁,约占其总黄酮的 80%。药理和化学成分研究表明荞麦中的类黄酮物质芦丁可以预防和治理高血压、风湿性关节炎、糖尿病等,尤其对高血压等心血管疾病具有良好的治疗效果<sup>[12]</sup>。

荞麦在我国的分布较广,但种植区相对集中,华北、西北、东北地区以种植甜荞为主,西南地区的四川、云南、贵州等省以种植苦荞为主<sup>[13]</sup>。这些地区都比较干旱,而荞麦又不是一种盐生植物,因此通过基因工程手段提高荞麦的耐盐能力具有明显的应用价值。目前国内外由根癌农杆菌介导的荞麦遗传转

化体系至今未见报道,本文试图通过根癌农杆菌介导法将 *AtNHX1* 基因转入荞麦中,以建立有效的荞麦转化体系和增强荞麦的抗逆性;同时研究了外源基因的转化对荞麦芦丁含量的影响,为进一步的遗传操作打下了坚实的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

所用普通荞麦品种为平荞 2 号,由甘肃省平凉市农科所提供。选取籽粒饱满的成熟种子,剥去种皮,在 75% 乙醇溶液中浸 45s,用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  溶液表面消毒 12min,再用无菌蒸馏水洗涤 4~5 次,每次 5min 左右。将灭菌后的种子接种到附加 30% 蔗糖、0.75% 琼脂粉的无激素 MS 固体培养基上,每日光照 16h,光照强度 2000lx,培养温度  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

### 1.2 菌株、质粒

大肠杆菌 JM109、农杆菌 LBA4404 为本实验室保存,其中农杆菌 LBA4404 携带一 Ti 辅助质粒,具有链霉素和利福平抗性。质粒 pHZX1 由中科院上海植物生理研究所张红霞博士提供,包含有 *AtNHX1* 基因和选择标记基因 *npt II*,该质粒经 pBI121 改造而成。*AtNHX1* 基因上游为 35S 启动子,下游为 NOS 终止子。用  $\text{CaCl}_2$  法将 *AtNHX1* 基因转化至大肠杆菌菌株 JM109 中,经限制性酶切、PCR 扩增和 DNA 测序鉴定后,再经冻融法将双元表达载体 pHZX1 导入农杆菌 LBA4404 中,酶切和 PCR 鉴定后将阳性重组子用 15% 的甘油保存在  $-70^\circ\text{C}$  冰箱中。DNA 测序由大连宝生物公司完成。

### 1.3 植株再生与转化

分别取生长 5~15d 的荞麦无菌苗,将其子叶和下胚轴切成 5~10mm 的小段,放在 2.0mg/L 2,4-D 和 1.0mg/L 6-BA 的 MS 培养基上预培养 0、1、2、3 或 4d。MS 培养基含有 3% (W/V) 蔗糖、600mg/L 水解酪蛋白、300mg/L 酵母提取物、0.75% 琼脂, pH 值 5.8~6.2,培养温度  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,光照强度 2500lx。挑取抗性农杆菌单菌落接种到附加 100mg/L 链霉素、50mg/L 卡那霉素的 5mL YEB (蛋白胨 5g/L,酵母浸膏 1g/L,蔗糖 5g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.493g/L,琼脂 1.5%, pH7.0) 液体培养基中,  $28^\circ\text{C}$  条件下、250r/min 振荡培养 (过夜) 至对数生长期  $OD_{600\text{nm}} \approx 0.5$ , 然后取 1mL ~ 2mL 菌液转到 100mL 含有 200 $\mu\text{mol/L}$  乙酰丁香酮 (AS) 的 YEB 液体培养基中继续培养 7~8h,直到  $OD_{600\text{nm}} \approx 0.8$ , 2000r/min 离心 1min 后,用 AAM

(MS + 3%蔗糖 + 200 $\mu$ mol/L AS, pH 5.2) 液体培养基悬浮细菌, 并把  $OD_{600nm}$  值调到 0.5 ~ 1.0。将经过预培养的子叶和下胚轴两种外植体浸在制备好的菌液中, 黑暗条件下侵染 8 ~ 30min。用无菌滤纸吸取多余的菌液, 转到原来的培养基(与预培养基相同)上共培养 1、2、3 或 4d。再用无菌水冲洗 4 ~ 5 次以洗去外植体上残余的菌液, 然后转到 MS 选择培养基上(附加有 500mg/L Cef, 50mg/L 筛选剂 Kam, 2.0mg/L 6-BA, 1.0mg/L KT, 0.1mg/L IAA), 每 2 周转接 1 次, 7 周后产生不定芽。将不定芽转接到附加 1.0mg/L IBA 和 0.5mg/L NAA 的 1/2MS 培养基上生根。

#### 1.4 AS 对荞麦转化的影响

在研究 AS 对荞麦转化影响的过程中, 参照 Wu 等的研究方法<sup>[14]</sup>设计了三种方案: A. 整个转化过程中都不加 AS; B. 细菌培养时加 AS; C. 预培养、细菌培养和共培养时都加入 AS。采用的 AS 浓度为 200 $\mu$ mol/L。转化过程同 1.3。7 周后统计 3 种情况下不定芽的数目。

#### 1.5 PCR 分析

参照《分子生物学实验指导》植物总 DNA 的提取方法<sup>[15]</sup>提取荞麦叶片的总 DNA。用 Primer5.0 根据 NCBI GenBank AF106324 序列设计一对 *AtNHX I* 基因引物, 由大连 TaKaRa 公司合成。上游引物 *AtNHX I* 序列为 ACTCACCTAAACCACGAAGC。下游引物 *AtNHX II* 序列为 CAGACCACCAAATCACAACC, 两引物之间的距离为 559 bp( *AtNHX1* 基因序列的 601-1159bp)。用这对引物对 70 株转化植株的 DNA 进行 PCR 扩增。

PCR 的反应体积为 20 $\mu$ L, 含荞麦基因组 DNA 100ng, dNTP 100 $\mu$ mol/L, 上游、下游引物浓度 1 $\mu$ mol/L, Taq DNA 聚合酶 2.5u。反应参数为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 95 $^{\circ}$ C 变性 40s, 53 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。Taq 酶、dNTP, 10 $\times$  PCR buffer 均购自大连 TaKaRa 公司。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像系统照相。

#### 1.6 Southern 印迹检测

**1.6.1 探针的制备:** 以质粒 pHZX1 为模板扩增 *AtNHX1* 基因片段, 反应体系和反应条件同上。使用 DNA 纯化试剂盒中的标准程序回收目的基因片段作为探针。回收的 PCR 产物采用地高辛进行标记, 探针制备过程参照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II( 购自德国 Roche 公司) 的标准程序进行。

**1.6.2 再生植株的 Southern 杂交检测:** 分别用限制

性内切酶 *EcoR I*、*EcoR I* 和 *Pst I* 双酶切转基因植株 DNA( *Pst I* 在该基因内部 484bp 处有一酶切位点, 用这两种酶酶切是为了确定杂交条带的大小), 并用 *EcoR I* 单酶切对照植株基因组 DNA, 经 1% 琼脂糖凝胶 30V 电泳 12 ~ 14h, 碱变性并中和后将 DNA 转移至带正电荷的尼龙膜上。杂交温度 42 $^{\circ}$ C, 杂交、洗膜和检测程序全部按地高辛标记试剂盒的说明进行。

#### 1.7 RT-PCR 检测及 Northern 印迹分析

**1.7.1 RT-PCR:** 为了检测转化到荞麦中的 *AtNHX1* 基因是否表达, 本实验进行了 RT-PCR 检测。由于荞麦这种植物比较特殊, 用 Trizol 试剂盒或植物总 RNA 提取试剂盒提取的效果并不是很好, RNA 几乎全部降解。本实验采用的是李玉英等的 SDS - 异丙醇方法<sup>[16]</sup>, 并稍作修改。RNA 提取过程中所用的所有溶液除含 Tris 外, 均用 0.1% DEPC 水溶液处理并高压灭菌, 含 Tris 的溶液用经高压灭菌的 DEPC 水配制并灭菌。由于荞麦中淀粉含量较高, 提取之前最好先进行黑暗处理。

反转录试剂盒购自 Fermentas 公司。第一链的反转录过程参照试剂盒说明书进行。再以反转录得到的 cDNA 作为模板, 利用 PCR 时所设计的 *AtNHX1* 引物进行 RT-PCR, 反应条件相同。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶成像系统照相。

**1.7.2 Northern 印迹分析:** 取适量的样品 RNA( 以保证各种样品的 RNA 含量相同为宜), 并与 2 倍体积的加样缓冲液混合, 65 $^{\circ}$ C 水浴 15min, 立即冰浴 2min, 上样, 在 1.2% 甲醛变性胶中电泳至溴酚蓝染料泳动至凝胶长度的 2/3。用 DEPC 处理水淋洗凝胶数次, 以除去甲醛。以下同 Southern 杂交。

#### 1.8 不同再生植株中 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 及脯氨酸含量的测定

将转基因植株( 非同一转基因植株系) 未转基因植株分别用 0mmol/L、50mmol/L、100mmol/L、200mmol/L 的 NaCl 溶液胁迫。经过 3 天的盐胁迫处理, 再参照 Aps<sup>[6]</sup>建立的方法, 用原子吸收光谱仪( SOLAAR M6 型号: IRIS Advantage ICP, 美国热电公司生产) 测定钠离子和钾离子含量。脯氨酸含量的测定参照 Bates( 1973 )<sup>[17]</sup>的方法。脯氨酸含量(  $\mu$ mol/gFW ) = [ ( 标准曲线上查得脯氨酸的微克数  $\times$  样品提取液总体积 ) / ( 测定时所吸取的体积  $\times$  脯氨酸的分子量  $\times$  样品鲜重克数 ) ]  $\times$  100。

**1.9 不同再生植株中次生代谢物质芦丁( rutin ) 含量的变化**

**1.9.1 仪器、材料与试剂:** Waters 2695-2996 型高效液

相色谱仪, 色谱柱 (Symmetry C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m 3.9  $\times$  150 mm) 均为美国 Waters 公司产品。芦丁标准品为本实验室保存 (06 年 3 月 5 号制备), 经 HPLC 测定含量大于 98%。甲醇为 HPLC 专用, 水为石英亚沸蒸馏水并用 Milli-Q50 超纯水仪处理, 其它试剂均为分析纯。

**1.9.2 样品的处理** 取不同再生植株的根、茎和叶, 在 50 $^{\circ}$ C 烘箱中放置过夜, 以使其充分干燥。用研钵将样品研磨成细粉状, 称取 0.5g 待测样品溶解在 10mL 甲醇中, 然后用超声波 (功率 250W, 频率 25kHz) 在 50 $^{\circ}$ C 超声处理 1h, 冷却后再称其重量, 并用甲醇补足减少的重量。在 13000g 高速离心 10min, 用 0.5 $\mu$ m 的微孔膜过滤上清, 吸取 1mL 放在

Eppendorf 管中, 然后进行 HPLC 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 质粒酶切和 PCR 检测

将经测序的 *AtNHX1* 基因序列与 NCBI GenBank 中的拟南芥 *AtNHX1* 序列进行比对, 发现核苷酸序列完全相同, 证实该基因确实是 *AtNHX1* 基因。然后再分别从克隆有 pHZX1 质粒的大肠杆菌和农杆菌单菌落扩增的菌体中提取质粒 DNA, 根据 pHZX1 图谱上的限制性内切酶的酶切位点进行酶切分析 (见图 1)。本实验用 *Bam*H I 进行单酶切 (见图 2), 并对所提质粒进行了 PCR 鉴定 (见图 3)。

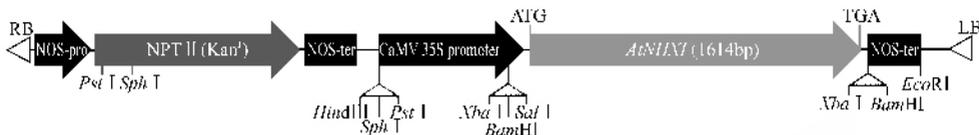


图 1 表达质粒 pHZX1 的示意图

Fig. 1 Expression plasmid pHZX1

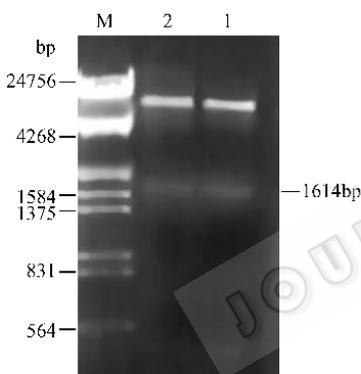


图 2 质粒 pHZX1 *Bam*H I 酶切鉴定

Fig. 2 *Bam*H I digestion of pHZX1

M: DNA marker; 1: pHZX1 from *Agrobacterium tumefaciens*; 2: pHZX1 in *E. coli*.

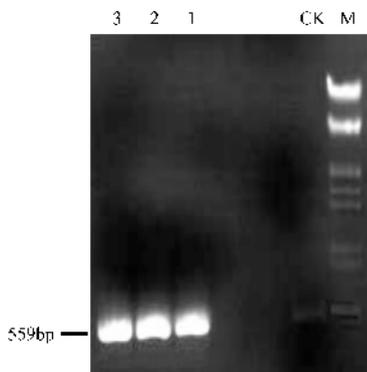


图 3 质粒 pHZX1 的 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of pHZX1

M: marker; CK: control; 1: pHZX1 in *E. coli*; 2 ~ 3: pHZX1 in *Agrobacterium tumefaciens*.

### 2.2 预培养时间、外植体类型对转化频率的影响

预培养时间不同、外植体类型不同, 转化效率也存在差异 (见图 4)。外植体经一定时间的预培养, 在适当生长素和细胞分裂素的作用下调整细胞处于良好的感受状态, 使 DNA 的合成处于高峰期, 有利于根癌农杆菌 T-DNA 的成功整合。本工作根据激素对荞麦下胚轴外植体启动细胞分裂的效果, 选择附加 2.0mg/L 2,4-D 和 1.0mg/L 6-BA 的 MS 固体培养基对外植体进行预培养。实验表明, 经 1 ~ 2d 预培养的子叶和下胚轴外植体比对照的转化率高, 且预培养 2d 转化频率最高, 分别为 6.1% 和 23.3%。但随着预培养时间的延长, 两种外植体的转化频率反而降低, 可能是由于预培养时间过长, 外植体伤口逐渐变得坚硬, 不利于农杆菌浸染, 而不经预培养, 外植体生活力低, 容易被农杆菌浸染致死, 只有经过合适的预培养, 才能使农杆菌转化率达到最高。但并不是所有的植物都这样, Kim 等<sup>[18]</sup>用农杆菌浸染 *Perilla frutescens* 时, 外植体不经过预培养要比经过预培养转化率高得多。图 4 结果还表明, 无论是否进行预培养, 农杆菌对荞麦下胚轴的转化频率明显高于对子叶的转化频率。来源于同种植株的不同外植体, 可能由于不同部位组织细胞发育年龄和生理状态的不同, 导致对农杆菌侵染的敏感性存在差异。

### 2.3 农杆菌侵染及共培养时间对荞麦转化的影响

除了预培养外, 农杆菌浸染的另一个重要条件

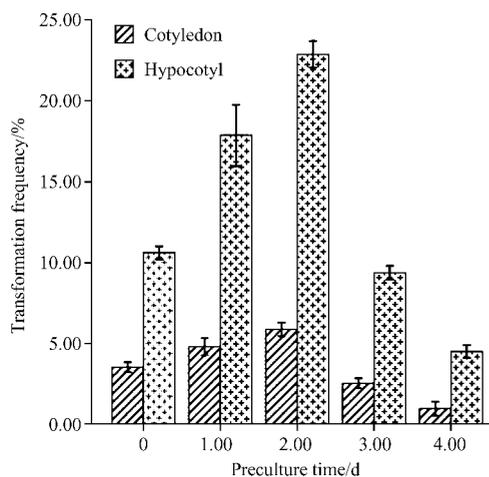


图4 预培养时间对荞麦转化频率的影响

Fig.4 The influence of preculture time on transformation frequency of buckwheat

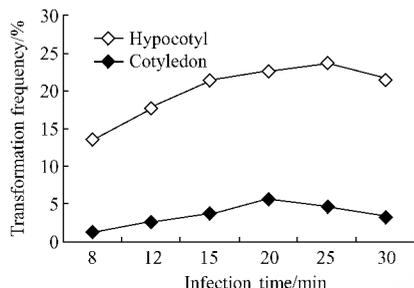


图5 农杆菌浸染时间对荞麦转化频率的影响

Fig.5 Effects of infection time with *Agrobacterium* on transformation frequency

是浸染和共培养时间。从图5中可以看到,农杆菌浸染20~25min时,外植体的转化频率较高,其中子叶浸染20min时转化频率最高,而下胚轴浸染25min转化频率才达到最高。感染时间只有8min时,两种外植体愈伤组织的转化频率都明显要低一些,而将感染时间延长到25min以后,可能因为对受体细胞产生了较严重的伤害,导致这两种外植体的转化频率逐渐降低。因此农杆菌介导荞麦胚性愈伤组织转化时,感染时间以20~25min较为适宜。

共培养时间对于农杆菌感染也至关重要,不经过共培养直接转到选择培养基上时,农杆菌没有经过增殖就会被头孢霉素杀死,因农杆菌细胞数量或浸染量不足而使转化效率降低,而共培养时间过长,则由于对植物细胞造成严重伤害,也会导致转化效率降低。在实验过程中发现当共培养超过2天时,农杆菌数量急剧增加,对后面的除菌带来了较大的麻烦(如头孢霉素用量加大,大多数植物材料被农杆菌污染掉,造成愈伤组织的转化频率大大降低)。因此共培养时间的长短也是制约农杆菌浸染效率的一

个重要因素。本实验结果显示(见图6),采用农杆菌对荞麦转化过程中以共培养1~2d较好。

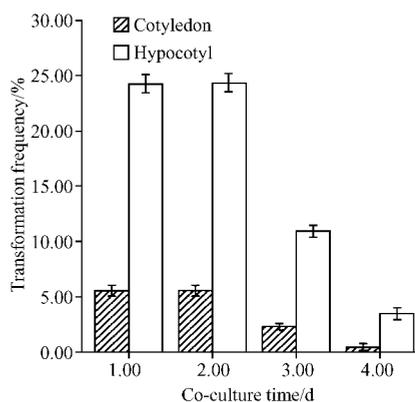


图6 共培养时间对荞麦转化频率的影响

Fig.6 Effects of co-culture time on transformation frequency

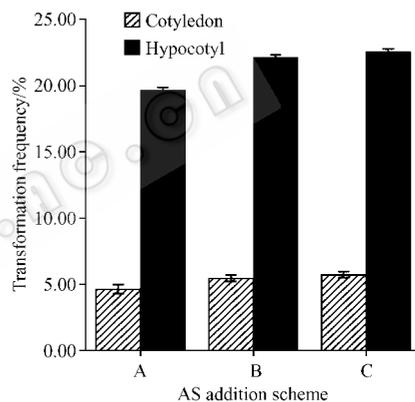


图7 AS加入方式对荞麦转化频率的影响

Fig.7 Effects of AS addition scheme on transformation frequency A: Without AS in transformation process; B: Addition of AS in the incubation stage of bacteria; C: AS addition in preculture, incubation with bacteria and the co-culture process. Values are the mean  $\pm$  S. D. (n = 3).

## 2.4 AS对荞麦转化的影响

AS不但在对单子叶植物进行农杆菌转化过程中起着重要的作用<sup>[19]</sup>,而且在很多双子叶植物的转化过程中发现,加入200 $\mu$ mol/L的乙酰丁香酮也可以显著提高农杆菌的转化率<sup>[20,21,22]</sup>。本实验以200 $\mu$ mol/L为基础,对AS的效果作了研究,结果(见图7)显示B方式(细菌培养基中加入AS)或C方式(预培养、细菌培养和共培养过程中均加入AS)确实对农杆菌的转化频率有促进作用,但相对于A方式(整个转化过程中都不加AS)提高效率并不显著。而AS又比较昂贵,因此对荞麦进行农杆菌转化时,没有必要加入AS。

## 2.5 PCR和Southern印迹分析

为了防止分子检测过程中假阳性苗太多,外植体预培养1~2d并经农杆菌浸染和共培养后,直接

用卡那霉素和头孢霉素进行筛选,分化出的绿色苗再转到没有卡那霉素选择压的生根培养基上生根。从预培养到再生植株的获得共需 65d 左右的时间。本实验共转化了 864 块外植体,其中有 36 块抗性愈伤组织产生了绿色不定芽,从不定芽共获得 426 棵再生植株,经 PCR 检测(共检测了 70 株,这 70 株分别来自于产生绿色不定芽的 36 块外植体),其中有 89% 的再生植株可以扩增出 559bp 的条带(见图 8),与实验预期的片段及阳性质粒对照吻合,而非转化的阴性对照植株没有出现相应的扩增条带。再选择经 PCR 检测呈阳性的转基因植株(B1-B5),进一步作 Southern 印迹分析,结果见图 9。泳道 1 为 pHZX1 质粒经 *EcoR* I 单酶切的杂交条带(大约 14kb),泳道 5~7(B3-B5)均是经过 *EcoR* I 和 *Pst* I 两种酶双酶切的杂交条带,由于 pHZX1 质粒 T-DNA 左边界(LB)处有一单酶切位点 *EcoR* I,而 *AtNHX1* 基因内部 484bp 处又有一 *Pst* I 酶切位点,因此用这两种酶进行酶切不但可以确定 *AtNHX1* 基因在再生植株中的转化情况,而且可以确定杂交条带的大小,弥补了本实验没有标记的 Marker 的缺陷。

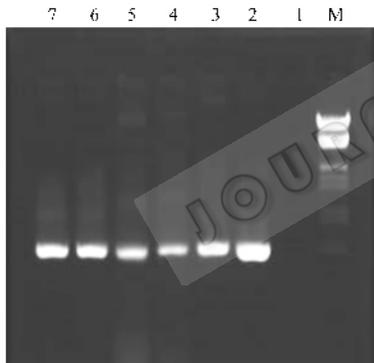


图 8 *AtNHX1* 的 PCR 鉴定

Fig.8 PCR analysis of *AtNHX1*

M: marker; 1: wild type buckwheat as negative control; 2: plasmid control; 3~7: independent transgenic buckwheat lines.

## 2.6 RT-PCR 及 Northern 印迹分析

提取经 Southern 印迹检测为阳性的再生植株(B1-B6)及阴性对照植株的 RNA,进一步作 RT-PCR 分析,结果见图 10。图 10 中 2~7 均为经 Southern blotting 检测为阳性的再生植株样品,然而从植株 B6 中提取的 RNA 并没有扩增出条带;又分别从该植株的根、茎和叶中提取 RNA,重复 3 次 RT-PCR,也没有扩增出目的条带,说明转到该植株中的 *AtNHX1* 基因并没有转录,具体原因不清楚。提取经 RT-PCR 为阳性的再生植株(B1-B5)再进行 Northern 印迹分析,结果如图 11 所示,转基因植株系(B4)也没有出现杂

交条带,由于没有重复,可能是实验中操作的问题,也可能是该植株确实没有转录,有待于进一步验证。

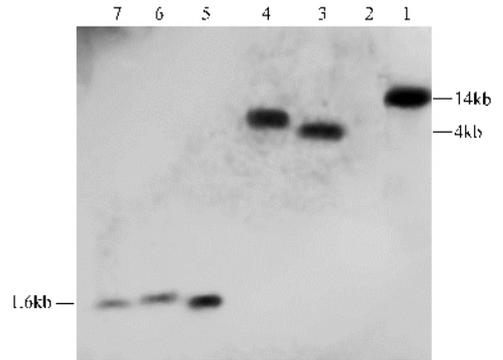


图 9 荞麦转基因植株的 Southern 印迹分析

Fig.9 Southern blotting analysis of transgenic buckwheat lines 1: plasmid pHZX1 digested with *EcoR* I as positive control; 2: wild type buckwheat digested with *EcoR* I; 3~4(B1-B2): independent transgenic buckwheat lines digested with *EcoR* I; 5~7(B3-B5): independent transgenic buckwheat lines digested with *EcoR* I and *Pst* I.

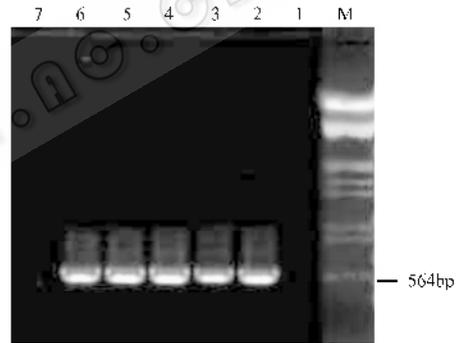


图 10 荞麦转基因植株的 RT-PCR 扩增

Fig.10 RT-PCR analysis of transgenic buckwheat lines. M: marker; 1: wild type buckwheat; 2~7(B1-B6): independent transgenic buckwheat lines.

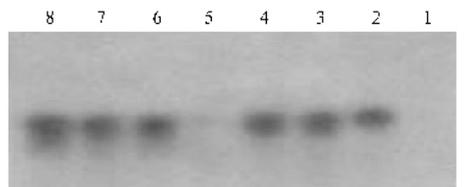


图 11 荞麦转基因植株的 Northern 印迹分析

Fig.11 Northern blot analysis of transgenic buckwheat lines 1: wild type buckwheat; 2~8(B1-B5, B2, B3): independent transgenic buckwheat lines.

## 2.7 不同转基因植株中 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 及脯氨酸含量的分析

2.7.1  $\text{Na}^+$  含量的分析:用原子吸收光谱仪测定不同浓度下盐胁迫植株中的钠离子含量,结果见图 12。由图中可知,同一植株根和叶中的  $\text{Na}^+$  含量差别很大,根中  $\text{Na}^+$  含量很低,而叶中  $\text{Na}^+$  含量相对较

高,说明  $\text{Na}^+$  主要在叶中积累。对比转基因植株 (Tr) 和未转基因植株 (CK) 在盐胁迫条件下各对应组织中  $\text{Na}^+$  的含量,发现在 200mmol/L NaCl 的胁迫处理下,转基因植株中  $\text{Na}^+$  含量明显高于未转基因植株,尤其是在根中,转基因植株是未转基因植株的 2.22 倍,说明 *AtNHX1* 基因已转入到荞麦中,并得到大量表达。在 50mmol/L 和 100mmol/L 的 NaCl 胁迫处理下,转基因植株叶片中的  $\text{Na}^+$  含量均比未转基因植株中的含量高,而根中增加不明显,可能是由于荞麦中  $\text{Na}^+$  主要积累在叶中的缘故。

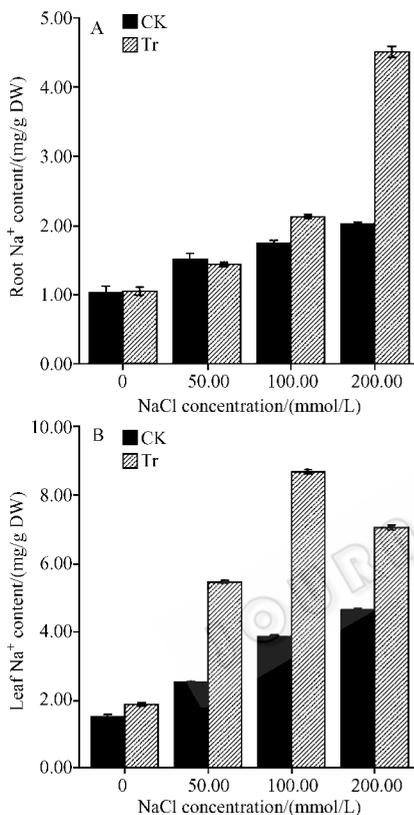


图 12 不同盐浓度胁迫下转基因植株与对照植株根 (A) 和叶 (B) 中的  $\text{Na}^+$  含量

Fig. 12  $\text{Na}^+$  concentrations in roots (A) and leaves (B) of transgenic and wild-type buckwheat under different NaCl concentrations

**2.7.2  $\text{K}^+$  含量及  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  比率的分析** :用原子吸收光谱仪测定不同浓度下盐胁迫植株中的钾离子含量,结果如图 13,从图中可以看出, $\text{K}^+$  也是主要积累在叶中。随着 NaCl 胁迫的加剧,各株系叶片中  $\text{K}^+$  含量均下降,而转基因植株中的下降趋势较明显,特别是在 50mmol/L 的 NaCl 胁迫下, $\text{K}^+$  含量下降最明显,未转基因植株  $\text{K}^+$  含量是转基因植株中的 3.22 倍,可能是由于在高盐浓度下, $\text{Na}^+$  取代  $\text{K}^+$  与  $\text{K}^+$  载体的结合位点发生了结合,这种竞争性结合不仅损

害了植物细胞对  $\text{K}^+$  的选择性吸收并降低了  $\text{K}^+$  在胞质中的含量。但根中  $\text{K}^+$  含量先升后降,各株系根中的  $\text{K}^+$  含量都在 100mmol/L NaCl 浓度达到最高峰。未转基因植株系中  $\text{K}^+$  含量略高于转基因植株,差异不显著。这与 Zhang<sup>[23]</sup> 的实验结果相同,但这种高盐浓度并没有显著影响到转基因植株系的生长。图 14 是不同 NaCl 浓度下的  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  比,由图中可以看出,各株系  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  比随着 NaCl 胁迫浓度的升高而降低;当 NaCl 浓度增加到 200 mmol/L 时, $\text{K}^+/\text{Na}^+$  比降到最低,但未转基因植株相对于转基因植株降低较显著,尤其是叶中的含量比值。这与很多文献报道<sup>[14, 23]</sup> 的结果相反,具体原因不清楚,还有待于进一步研究。

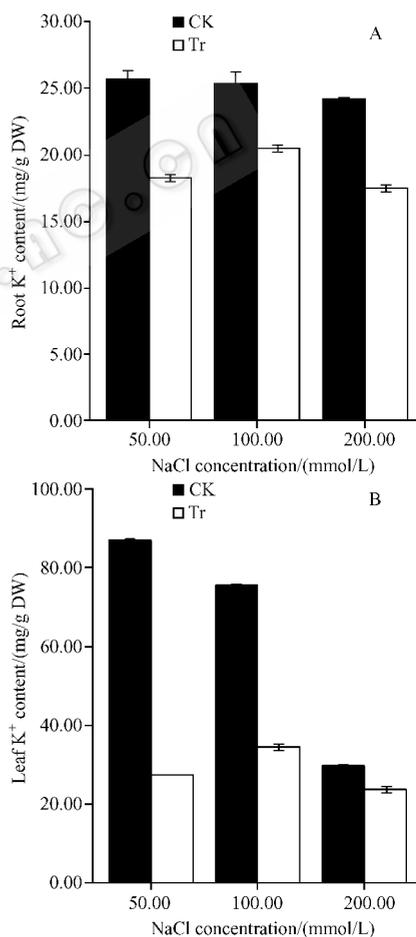


图 13 不同盐浓度胁迫下转基因植株与对照植株根 (A) 和叶 (B) 中的  $\text{K}^+$  含量

Fig. 13  $\text{K}^+$  concentrations in roots (A) and leaves (B) of transgenic and wild-type buckwheat under different NaCl concentrations

**2.7.3 脯氨酸含量的分析** :将转基因植株 (抗性系) 和未转基因植株 (对照系) 经不同梯度的 NaCl 胁迫处理 3d 后,测定细胞内的游离脯氨酸含量,结果如

表 1 所示。盐胁迫下,抗性系和对照系根与叶中的脯氨酸含量均比非胁迫条件下有所提高,但游离脯氨酸的累积程度却有很大的差异。对照系根和叶中的游离脯氨酸累积相差不明显,而抗性系中尤其是在 50mmol/L 的盐胁迫浓度下差异较显著。同等条件下,抗性系无论是叶片还是根中的脯氨酸含量均高于对照系,说明抗性系植株在盐分胁迫条件下具有明显的高脯氨酸累积特性。

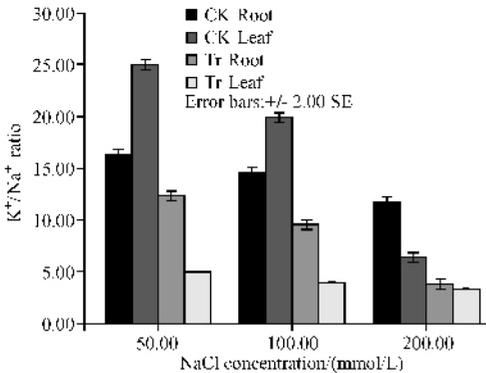


图 14 不同盐浓度胁迫下转基因植株与对照植株根和叶中的 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 比值

Fig. 14 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratio in roots and leaves of transgenic and wild-type buckwheat under different NaCl concentrations

表 1 不同盐浓度胁迫下转基因植株与对照植株根和叶中的脯氨酸含量

Table 1 Proline contents in roots and leaves of transgenic and wild-buckwheat under different NaCl concentrations

NaCl concentration (mmol/L)	Mean of proline content in CK root (μmol/gFW)	Mean of proline content in Tr root (μmol/gFW)	Mean of proline content in CK leaf (μmol/gFW)	Mean of proline content in Tr leaf (μmol/gFW)
0	5.29 ± 0.3 b	5.39 ± 0.7 b	4.86 ± 0.4 a	5.18 ± 0.5 b
50	7.39 ± 0.6 d	13.12 ± 0.2 g	7.34 ± 0.3 d	9.31 ± 0.7 e
100	6.42 ± 0.1 c	10.27 ± 0.5 e	5.86 ± 0.6 b	10.14 ± 0.3 e
200	6.8 ± 0.3 c	11.19 ± 0.1 f	6.48 ± 0.4 c	11.03 ± 0.2 f

Note 1: The data in the table represent mean ± S.E. of four replicates.

2: Values followed by different letters are significantly different (P < 0.01). The letters have the same meaning in the following table (table 2)

表 2 荞麦各组织中的芦丁含量

Table 2 Rutin content of different tissues in buckwheat

Materials	Peak area/mv <sup>2</sup> ·sec	Retention time/min	Content (mg/g)
Root	72830a	7.9d	0.002719d
Stem	2270849c	7.3c	0.00825a
Leaf	2876894f	7.9d	0.009775e
Transgenic root	3657570b	7.2b	0.01174b
Transgenic stem	6812629d	7.5e	0.01968c
Transgenic leaf	24011620e	7.2b	0.062962f

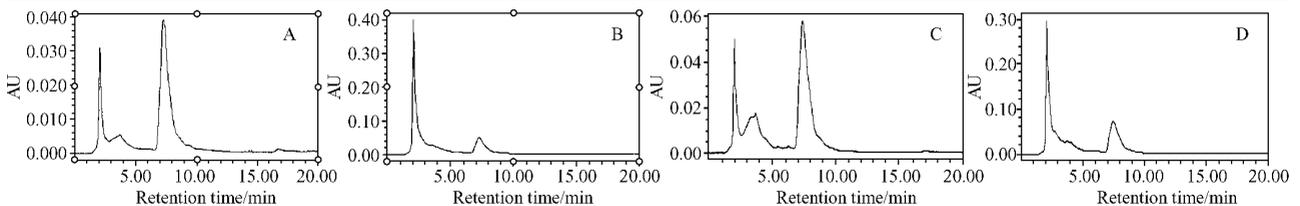


图 15 茎(A, B)转基因茎(C, D)提取样品的 HPLC 色谱图

Fig. 15 The HPLC chromatogram of stem extract sample (A, B) and transgenic stem extract sample (C, D)

## 2.8 芦丁含量的分析

2.8.1 检测波长的选择 选择高灵敏度的检测波长可以提高分析的精密性,同时也可以降低最小检测量。在波长 200 ~ 400nm 下对 0.1mg/mL 的芦丁进行 HPLC 分析,可以观测到在 255.9nm 和 355.7nm 处都有较大的吸收峰,均无干扰峰,因此选择这两个波长作为其检测波长。

2.8.2 样品含量测定:在以上选定的色谱条件下对芦丁进行测定,芦丁标准品的保留时间为 7.0 ~ 7.9min。同样色谱条件下对荞麦再生植株和转基因植株进行测定(图 15 为茎的 HPLC 色谱图),每次 7.0 ~ 8.0min 内完成。根据所测样品的峰面积及由标准品所得的回归方程计算荞麦各组织中芦丁的含量。结果见表 2。由表 2 可知在转基因荞麦中,根的芦丁含量是未转基因植株根的 4.3 倍,茎中是未转基因茎中的 2.4 倍,叶中是未转基因植株叶中的 6.4 倍,说明农杆菌将 *AtNHX1* 基因转入荞麦中后,荞麦中芦丁的含量不但没有减少反而有所增加,这可能是由于 *AtNHX1* 基因的导入改变了芦丁合成过程中的内环境(如细胞中的 pH 值)造成的。因此本实验利用农杆菌介导法将 *AtNHX1* 基因导入荞麦中后,并没有影响到荞麦的药用价值。

### 3 讨论

土壤盐渍化是一个世界性问题,是影响农业生产和生态环境的一个重要的非生物胁迫因素,严重制约着我国农业的生产和发展。因此,在耕地有限、人口不断增长的今天如何开发和利用盐碱地进行农业生产及提高盐胁迫土地的作物产量已成为一个日益紧迫而且意义重大的研究课题。利用基因工程手段将耐盐基因(如 *AtNHX1*, *Tagsk1*<sup>[24]</sup>)转入重要的经济作物中有可能培养出有益的抗盐农作物。Blumwald<sup>[9,23]</sup>等在番茄(*Lycopersicon esculentum*)和油菜(*Brassica napus*)中过量表达 *AtNHX1* 基因,已经得到了一批真正意义上的耐盐作物。

本实验利用根癌农杆菌将 *AtNHX1* 转到具有很高药用和食用价值的荞麦中,并且得到了一定数量的转基因植株(见图 16)。实验过程中研究了愈伤组织预培养、农杆菌浸染、共培养时间以及 AS 加入方式几方面对荞麦转化频率的影响,结果表明外植体预培养 2 d、浸染 20~25 min、共培养 1~2 d 比较适宜;而 AS 加入与否及加入方式对荞麦转化频率影响不大。

本工作同时分析了荞麦不同转基因植株中  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、脯氨酸以及次生代谢物质芦丁等含量的变化,结果表明无论是对照植株还是转基因植株,  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  主要积累在叶中,这与 Zhe<sup>[25]</sup>的结论相同。转基因植株根和叶中的  $\text{Na}^+$  都比对照植株中的高,而且随着盐胁迫浓度的增加,转基因植株根和叶中的  $\text{Na}^+$  也逐渐增加,且叶中增加幅度相对较大,而且转基因植株在 200mmol/L 的盐胁迫浓度下并没有表现出异常情况,这与超表达拟南芥液泡膜  $\text{Na}^+$ /  $\text{H}^+$  反向转运蛋白基因 *AtNHX1* 的拟南芥(Apse<sup>[6]</sup>)、番茄(Blumwald<sup>[9]</sup>)及油菜植物(Zhang<sup>[23]</sup>)的  $\text{Na}^+$  含量测定结果一致。说明 *AtNHX1* 基因已转入到荞麦中,并得到了大量表达,有可能确实将部分  $\text{Na}^+$  隔离到液泡中,避免了过多  $\text{Na}^+$  对细胞的伤害。

同等条件下,转基因植株根和叶中的  $\text{K}^+$  含量与  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  比值比对照植株低,而脯氨酸在转基因植株中比对照植株中含量高,过量表达拟南芥  $\text{Na}^+$ /  $\text{H}^+$  反向转运蛋白基因 *AtNHX1* 的西红柿、油菜植物在 200mmol/L 盐胁迫下脯氨酸含量也高于野生型(Blumwald<sup>[23]</sup>),说明液泡膜  $\text{Na}^+$ /  $\text{H}^+$  反向转运蛋白基因的超表达可能使  $\text{K}^+$ 、脯氨酸代谢平衡发生了变化,在一定程度上保持了  $\text{K}^+$  与脯氨酸含量。逆境条件下,细胞内保持一定的  $\text{K}^+$  及脯氨酸含量对正



图 16 荞麦的植株再生

Fig. 16 Plant regeneration of buckwheat

A. The yellowish or slight red loosen calli induced after 12 d from hypocotyl explants on MS supplemented with 2.0mg/L 2,4-D and 1.0mg/L 6-BA; B. Green adventitious shoots regenerated after 45 d on differentiation MS medium supplemented with 2mg/L 6-BA, 0.1mg/L IAA and 1mg/L KT; C. The roots formed after 10d from adventitious shoots on 1/2MS with 1.0mg/L IBA and 0.5mg/L NAA; D. The wild-type plants were grown in the presence of 200mmol/L NaCl; E. The transgenic plants were grown in the presence of 200mmol/L NaCl.

常的生命活动至关重要。同时发现 *AtNHX1* 基因的导入不但没有使荞麦的次生代谢物质芦丁的含量降低,反而增加了其含量。这些结果表明通过基因工程手段提高作物的耐盐性是可行的。

### REFERENCES (参考文献)

- [1] Rhoades JD, Loveday J. Salinity in irrigated agriculture. In: Steward BA, Niesen DR (eds). American Society of Civil Engineers, Irrigation of Agricultural Crops. American Society of Agronomist, 1990, pp. 1089 - 1142.
- [2] Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, **51**: 486 - 488.
- [3] Zhu JK. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci*, 2001, **6**: 66 - 71.
- [4] Wang BS (王宝山), Zou Q (邹琦). Effects of NaCl stress on the tonoplast ATPase and PPase activity in roots, sheaths and blades of

- 2000, **26**(3):181-188.
- [ 5 ] Wang BS, Lttge U, Ratajczak R. Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. *J Exp Bot*, 2001, **52**:1-11.
- [ 6 ] Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, **285**:1256-1258.
- [ 7 ] Gaxiola RA, Rao R, Sherman A. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNHX1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**:1480-1485.
- [ 8 ] Quintero FJ, Blatt MR, Pardo JM. Functional conservation between yeast and plant endosomal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *FEBS Lett*, 2000, **471**:224-228.
- [ 9 ] Zhang HX, Blumwald E. Transgenic salt tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**:765-768.
- [ 10 ] Blumwald E, Aharon GS, Apse MP. Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1465**:140-151.
- [ 11 ] Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol*, 1995, **109**:735-742.
- [ 12 ] Sun T, Ho CT. Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*, 2005, **90**:743-749.
- [ 13 ] Wang HY(王红育), Li Y(李颖). Research status and applied prospect of buckwheat. *Food Science*(食品科学), 2004, **25**:388-391.
- [ 14 ] Wang YY, Chen QJ, Chen M et al. Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene. *Plant Science*, 2005, **169**:65-73.
- [ 15 ] Wei Q. The experimental guide of molecular biology. Bei Jing: Bei Jing High Education Publication, Springer-Verlag, 1999.
- [ 16 ] Li YY(李玉英), Wang ZH(王转花), Zhang Z(张政). An optimum method of extracting buckwheat genomic RNA. *Biotechnology*(生物技术), 2004, **14**(3):23-24.
- [ 17 ] Bates LS, Waldren RP, Teare ID. Rapid determination of proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 1973, **39**:205-207.
- [ 18 ] Kim KH, Lee YH, Kim D, Park YH, Lee JY, Hwang YS, Kim YH. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. *Plant Cell Rep*, 2004, **23**:386-390.
- [ 19 ] Wu GI(吴关庭), Hu ZH(胡张华), Lang CX(郎春秀), et al. Establishment of *Agrobacterium*-mediated transformation system for tall fescue. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*(核农学报), 2005, **19**(5):340-346.
- [ 20 ] Wang Y(王艳), Zeng YL(曾幼玲), He B(贺宾), et al. Research of NHX gene transformation in *Brassica napus* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2006, **32**(2):278-282.
- [ 21 ] Hu FR(胡繁荣). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Molecular Plant Breeding*(分子植物育种), 2005, **3**(3):375-380.
- [ 22 ] Han XL(韩晓玲), Bu HY(步怀宇), Hao JG(郝建国), Zhao YW(赵宇玮), Jia JF(贾敬芬). Hairy root induction and plant regeneration of crownvetch (*Coronilla varia* L.) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2006, **22**(1):107-113.
- [ 23 ] Zhang HX, Hodson JN, Williams JP, Blumwald E. Engineering salt-tolerant Brassica plant: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *PNAS*, 2001, **98**(22):12832-12836.
- [ 24 ] Xu T(徐涛), Zhao BC(赵宝存), Ge RC(葛荣朝), et al. Introduce *Tagsk1* into salt-sensitive callus to improve the capacity of salt-tolerance by microparticle bombardment. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2006, **22**(2):211-214.
- [ 25 ] Zhe YX, Da YZ, Gang PX et al. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na<sup>+</sup>. *Plant Science*, 2004, **167**:849-859.