

简报

高度耐盐双价转基因烟草的研究

刘俊君 黄绍兴¹ 彭学贤² 柳维波³ 王海云

(中国科学院微生物研究所植物生物技术开放实验室 北京 100080)

随着全球性人口的增长和土地退化的加剧,开发利用广阔盐碱地和干旱土地的需要日益迫切。植物生物技术的日臻完善,为培育高效耐盐植物迎来了一丝曙光。在高渗条件下,耐盐的微生物或植物细胞通过增加胞内一些相溶性溶质的浓度来维持渗透压的平衡。这些可溶性溶质包括无机离子、糖类、多元醇、氨基酸和生物碱等。通过基因工程手段,使细胞内积累脯氨酸⁽¹⁾、甜菜碱⁽²⁾、甘露醇⁽³⁾、海藻糖⁽⁴⁾,能够不同程度地提高转基因烟草的耐盐性。多元醇含有多个羟基,亲水性能强,能有效维持细胞内水活度。山梨醇、甘露醇等己糖分子结构、理化性质和生理功能相近。故此,我们认为:不同糖醇在转基因烟草中的积累,可能具有协同(或累加)效应,有希望更大地提高植物耐盐性。我们在获得大肠杆菌 *mtlD* 基因(编码 1-磷酸甘露醇脱氢酶)和 *gutD* 基因(编码 6-磷酸山梨醇脱氢酶)克隆⁽⁵⁾的基础上,获得了分别表达 *mtlD* 和 *gutD* 基因的单价转基因烟草,并首次证实了 *gutD* 基因的表达,能显著地提高转基因烟草的耐盐性⁽⁶⁾。本文工作进一步报道同时表达大肠杆菌 *mtlD* 和 *gutD* 基因双价转基因烟草的高效高度耐盐性。

1 材料和方法

1.1 材料

各种核酸工具酶购自 Promega 公司, α -³²P-dCTP 为 NEN 公司提供,植物转化各种化学试剂为国内不同产商提供。大肠杆菌、农杆菌菌株、各种质粒以及烟草品种由本实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 二元表达载体的构建:第一步,将 *mtlD*、*gutD* 基因通过 *Bam*HI/*Sal*I 分别从质粒 pMTD 和 pGUD⁽⁵⁾中切出,插入到同样酶解的二元载体 pBin438⁽⁷⁾中,得到此两个基因的单价二元载体 pBIMTL 和 pBIGUT。第二步,通过 *Hind* III/*Eco*R I 分别从 pBIMTL 和 pBIGUT 中切出这两个基因的表达框架,插入 pBluescript SK 的相同位点中,得到对应两个质粒 pSBIM 和 pSBIG。第三步, *Hind* III 酶解 pSBIM 后,补平切口,然后用 *Not*I 酶解之,获得 *mtlD* 基因的表达框架片段。同时 *Eco*R I 酶解 pSBIG 后,补

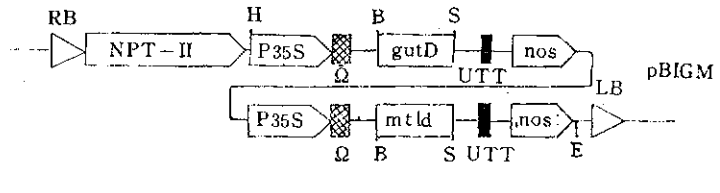


图1 二元表达载体质粒 pBIGM 的结构图

H, *Hind* III; B, *Bam*HI; S, *Sal*I; E, *Eco*R I

本文系中国科学院院长特别基金支持项目,并得到国际科学文化中心世界实验室(WL, ICSC, 日内瓦, 洛桑)的部分资助。

1. 黄绍兴,北京农业大学生物学院,北京 100094。

2. 本文联系人。

3. 柳维波:北京林业大学森林生物实验中心,北京 100083。

本文于 1995 年 2 月 20 日收到。

平切口, 然后用 Not I 酶解。再将 mt1D 基因表达框架插入上述处理的 pSBIG 中, 实现两个基因表达框架的拼接, 得到质粒 pSBIGM。第四步, 通过 Hind III/EcoR I 从 pSBIGM 中切下双表达框架, 插入到 pBin438 的对应位点, 最终得到 gutD 和 mt1D 基因的双价二元表达载体 pBIGM (图 1)。

1.2.2 烟草的转化和再生植株的筛选: 取烟草品种黄苗榆 (*Nicotiana tabacum* cv. Huangmiaoyu) 叶盘按文献[8]方法略加修改, 进行植物的农杆菌转化, 从含卡那霉素 300 μ g/ml 的分化培养基上, 得到卡那霉素抗性芽。将它们直接转移到含 100 μ g/ml 卡那霉素和 1.5%~2.5%NaCl 的无激素 MS 培养基上, 进行生根和耐盐植株的筛选。

1.2.3 转基因植株的鉴定: 取 20 μ g 所提取的植物染色体 DNA 进行 Hind III/EcoR I 双酶解后, 将在 0.8%琼脂糖凝胶电泳分离的 DNA 转移到 Z-probe 膜上与³²P 标记的 mt1D 和 gutD 的基因片段杂交。

1.2.4 糖醇测定: 取上部第三片烟叶, 用甲醇: 氯仿: 水 (12: 5: 3) 混合液抽提出可溶性碳水化合物。经过盐酸羟胺肟化和醋酐乙酰化后, 将氯仿淬取的衍生物经 BP-20 柱分离, 在 GC-9A 气相色谱仪 (Shimadzu) 上进行色谱分析^[9]。用核糖醇、葡萄糖、甘露醇和山梨醇的标准样品制作色谱标准曲线。

2 结果和讨论

2.1 耐盐再生植株的筛选

将约 2cm 大小的卡那霉素抗性芽转移到补充有 1.5%~2.5% NaCl 的无激素 MS 培养基中。2~3 周之内, 在 1.5%~2.5%NaCl 条件下, 均有一部分卡那霉素抗性芽开始根的分化, 生长成小植株。在这个盐浓度范围内, 再生植株的根系没有明显区别 (图 2)。随着筛选浓度的增加, 从卡那霉素抗性芽获得完整正常植株的再生率下降。本文成功地在 2.00%NaCl 条件下, 得到 14 棵烟草的转化植株 (表 1), 而空载的 pBin438 转化芽, 在 1.5%NaCl 的生根培养基中的根分化则受到完全抑制。

2.2 转化植株的 Southern 杂交分析

利用 pBIGM 的 Hind III/EcoR I 片段为探针, 对转化的耐盐性植株进行基因整合鉴定。Southern 杂交结果显示: 在所测的 10 棵植株中,

在 4kb 的预期位置, 均有杂交信号出现 (图 3)。杂交信号在不同转化植株中, 强弱差别悬殊, 这可能反映了不同转基因植株中, 外源基因的整合拷贝数目相差很大。其中一个转化株 (样品孔 d) 除 4.0kb 的信号带, 还有一条分子量更小的信号带。这说明, 该转基因植株内外源基因拷贝有的可能发生了重组。分子杂交 100% 的阳性率表明: 本文所设计的耐盐性转基因植株的筛选系统高度有效。

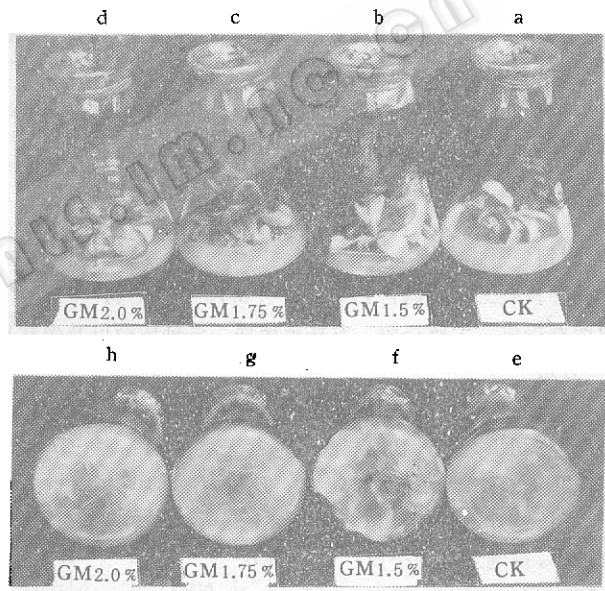


图 2 转基因烟草在含盐无激素 MS 培养基中的生根、生长情况
Containing NaCl/%;

a, e: Controls. (1.5), b, f: Transformants. (1.5),
c, g: Transformants. (1.75), d, h: Transformants. (2.0)

表 1 卡那霉素抗性芽在含 NaCl 的无激素 MS 培养基中的植株再生率

NaCl/%	Number of Knresistant shoots	Number of regenerated plants	Regeneration rate/%
1.50	58	21	36.21
1.75	269	27	10.04
2.00	232	14	6.03
2.50	84	0	0.00
1.50	50 (Control)	0	0.00

2.3 转基因植株叶内糖醇的含量

对叶片碳水化合物提取物的气相色谱分析表明：转基因植株和对照的色谱图有明显差别（图 4）。转基因植株具有对照所没有的甘露醇特征峰（柱保留时间 22min）；与对照比较，葡萄糖峰（柱保留时间 20min）和山梨醇峰（柱保留时间 24min）的相对面积发生了变化。定量计算结果显示，在所测定的转基因植株中，均有甘露醇的产生和不同程度的积累（0.71~2.41 $\mu\text{mol/g}$ fwt）；同时，山梨醇/葡萄糖的摩尔比值大于对照数倍，甚至上百倍（表 2）。

我们曾研究过 *mtlD* 和 *gutD* 基因的单价转基因烟草^[6]，Northern 杂交分析表明，这两类单价转基因烟草均能转录产生对应的 mRNA 分子。*mtlD* 基因单价转化烟草叶内能积累 0.33~0.36 $\mu\text{mol/g}$ 鲜重的甘露醇。*gutD* 基因单价转化烟草叶内山梨醇/葡萄糖的摩尔比值为 0.96~2.24。与它们相比，双价转基因烟草中，*mtlD* 基因的表达所导致的甘露醇积累量仍处于相近的水平；但 *gutD* 基因所导致的山梨醇/葡萄糖摩尔比值变化更大。在双价转基因烟草的糖醇代谢中，新产生了两个代谢分支点，可能更大地影响了转化植株内碳水化合物的物质代谢，促进了糖类向醇类的转化，因此更大程度地降低了葡萄糖的相对含量。

在含 NaCl 的无激素 MS 培养基上筛选耐盐的 *gutD* 和 *mtlD* 单价转基因烟草时，只有在 1.75% NaCl 或更低盐浓度下，我们才获得了正常的再生植株^[6]；而本文对双价转基因植株的再生筛选浓度可以达到 2.0% NaCl。同时，在转基因植株的进一步耐盐性测试中，我们观察到：在 Hoagland's 营养液中水培一周之后，转移到补加有 1.75% NaCl 的 Hoagland's 营养液中时，*mtlD* 或 *gutD* 的单价转基因植株均

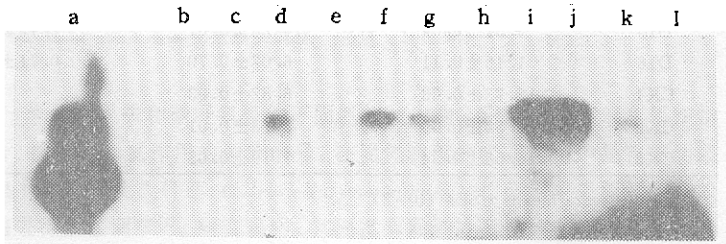


图 3 转基因烟草的 Southern blot 分析

a. Plasmids pBIGM (positive control), b. Non-transgenic plants (negative control), c. O. F. Different transformants

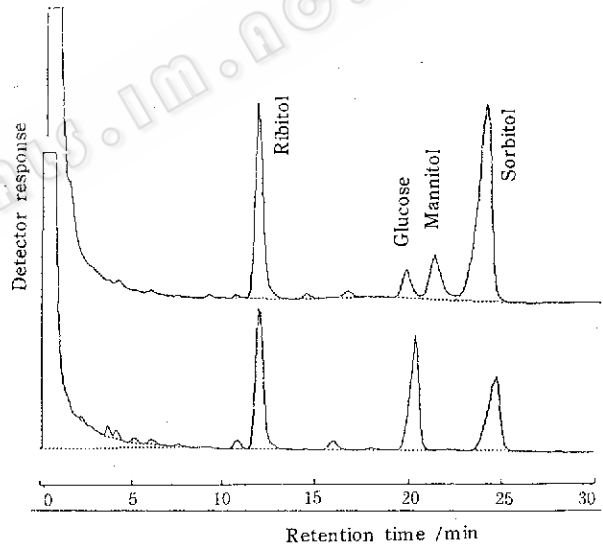


图 4 转基因烟草糖醇测定的气相色谱图

1mg/g (fwt) ribitol was added as internal standard, Below. non-transgenic plant (CK), Above. transgenic plant

发生萎蔫现象,待 3~4d 后才能恢复正常。在此条件下,双价转基因植株没有发生萎蔫现象。这些结果初步表明:双价转基因烟草中不同糖醇的积累,有可能导致更高层次的耐盐性。

表 2 *gutD/mtlD* 双价转基因烟草叶内糖醇含量 ($\mu\text{mol/g}$ 鲜重)

Plants	Glucose	Sorbitol	Mannitol	Sorbitol/Glucose
D2	1.70 \pm 0.07	6.84 \pm 0.31	1.23 \pm 0.07	4.02 \pm 0.02
D4	1.40 \pm 0.02	3.41 \pm 0.06	0.78 \pm 0.03	2.43 \pm 0.01
D8	1.65 \pm 0.13	3.87 \pm 0.08	1.28 \pm 0.02	2.34 \pm 0.14
D14	4.50 \pm 0.07	13.98 \pm 0.39	2.42 \pm 0.11	3.10 \pm 0.13
D15	4.31 \pm 0.04	14.23 \pm 0.01	2.40 \pm 0.02	3.30 \pm 0.03
D16	1.16 \pm 0.11	6.02 \pm 0.70	0.71 \pm 0.03	5.20 \pm 0.11
CK1	12.73 \pm 0.03	6.82 \pm 0.03	0.00	0.54 \pm 0.01
CK2	6.52 \pm 0.05	3.73 \pm 0.01	0.00	0.48 \pm 0.01
CK3	14.58 \pm 0.34	7.19 \pm 0.05	0.00	0.49 \pm 0.01

Values were means \pm SEs (n=2)

参 考 文 献

- [1] Yuan C X, Bai Y Y, Kuang D R. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1993, 19: 306~312.
- [2] Nakamura T, Ishitani M, Takabe T. *Abst 4th Intl Cong Plant Mol Biol*, Amsterdam, 1994, Abst No 1983.
- [3] Tarczynski M C, Jensen R G, Bohnert H. *J Sci*, 1993, 259: 508~510.
- [4] Fillati J, Daly M. *Abst 4th Intl Cong Plant Mol Biol*, Amsterdam, 1994, Abst No 1941.
- [5] 刘俊君, 彭学贤, 王海云等. *生物工程学报*, 1995, 11 (2): 157~161.
- [6] Liu J, Huang S X, Peng X X *et al.* *Abst 4th Intl Cong Plant Mol Biol*, Amsterdam, 1994, Abst No 1984.
- [7] 李太源, 田颖川, 秦晓峰等. *中国科学 (B辑)*, 1994, 24 (3): 276~282.
- [8] Horsh R B, Fry J E, Hoffmann N L *et al.* *Sci*, 1985, 227: 1229~1231.
- [9] Chen C C, McGinnis G D, *Carbohydr. Res.* 1981, 90: 127~131.

Studies on High Salt Tolerance of Transgenic Tobacco

Liu Junjun Huang Shaoxing Peng Xuexian Liu Weibo Wang Haiyun

(*Laboratory of Plant Biotechnology, Institute of Microbiology,
Academia sinica, Beijing 100080*)

Abstract With *E. coli* *mtlD* gene (encoding mannitol-1-phosphate dehydrogenase) and *gutD* gene (encoding glucitol-6-phosphate dehydrogenase) cloned, plant expression vector pBIGM had been obtained by inserted *mtlD* and *gutD* genes into binary vector pBin438. Tobacco was transformed with *A. tumefaciens* LBA4404 containing pBIGM. Results of molecular hybridization of transformed plants indicated that *mtlD* and *gutD* genes had integrated into the genomic DNA of tobacco plants. Experiments of salt tolerance and analysis of sugar alcohols showed that accumulation of different sugar alcohols in transgenic tobacco plants had increased salt tolerance of tobacco.

Key words *E. coli* *gutD* gene, *mtlD* gene, transgenic tobacco, high salt tolerance