植物学通报 *Chinese Bulletin of Botany* 2008, **25** (1): 80–84, www.chinbullbotany.com

·实验简报·

小黑杨花药培养植株转化胆碱氧化酶基因提高耐盐性

姜静[1], 王雷[1], 詹立平[2], 王玉成[1], 刘桂丰[1], 杨传平[1*]

[1]东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 林木遗传育种黑龙江省重点实验室, 哈尔滨 150040

[2]辽宁中医学院职业技术学院, 沈阳 110101

摘要 以小黑杨(*Populus simonii* ×*P. nigra*)花药培养植株无菌苗叶片为外植体, 通过根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法将胆碱氧化酶基因(*codA*)导入小黑杨中, 共获得4株转化株系, PCR扩增和Southern杂交检测结果全部呈阳性, 表明*codA*基因已整合到小黑杨花药培养植株基因组中。荧光定量RT-PCR检测证明, *codA*基因在小黑杨花药培养植株中获得表达。耐盐实验结果显示, 各转基因株系在0.6%的NaCl浓度下能够生长, 而非转基因对照小黑杨受盐害严重, 说明*codA*基因的导入提高了转基因植株的耐盐性。

关键词 胆碱氧化酶基因, 小黑杨, 耐盐性

姜静, 王雷, 詹立平, 王玉成, 刘桂丰, 杨传平 (2008). **小黑杨花药培养植株转化胆碱氧化酶基因提高耐盐性**. **植物学通报 25**, 80–84.

高等植物在盐胁迫下细胞内迅速积累脯氨酸和甜菜碱等渗透保护物质, 进而增强耐盐性, 这是植物逆境生理反应的特征之一。在研究过的百余种代谢物中, 甜菜碱被认为是最好的渗透调节剂, 甜菜碱在植物细胞内的积累使许多代谢中的重要酶类在渗透胁迫下能保持活性(McCue and Hanson, 1990; 马德钦等, 1995; 陈少良等, 2001; 贾庚祥等, 2002)。因此, 通过转基因技术把有关甜菜碱合成酶基因导入非耐盐植物基因组中将增强植物的抗逆性(Nuccio et al., 1998; Sakamoto and Murata, 2000; 沈义国等, 2001; 刘振林和戴思兰, 2004; 王春明等, 2004; 刘桂丰等, 2006)

细菌乙酰胆碱氧化酶(choline oxidase, COD)不需任何辅助因子可将乙酰胆碱一步合成甜菜碱。因此, *codA*基因被认为是植物耐盐基因工程中的有效基因, 广泛用于植物的耐盐转基因研究。目前, *codA* 基因已经被成功转入烟草、水稻和拟南芥等植物中, 均获得了耐盐性提高的转基因植株(Hayashi et al., 1997; 何培民等, 2001; Mohanty et al., 2002)。

有关小黑杨 *codA* 基因的导入未见报道。为了深入了解逆境下甜菜碱对植物的保护作用, 我们采用农杆菌介导法将 *codA* 基因转入小黑杨花药培养植株, 并检测转基因植株的耐盐性。

1 材料与方法

1.1 材料

小黑杨(*Populus simonii*×*P.nigra*)花药培养植株是由本实验室经花药诱导获得的(刘桂丰等, 2002)。以 MH 附加 0.5 mg·L^{-1} 6-BA 和 0.01 mg·L^{-1} NAA 的培养基为继代培养基, 约 20 天继代 1 次; 以 MH 附加 0.5 mg·L^{-1} 6-BA 和 0.05 mg·L^{-1} NAA 培养基为诱导叶片分化的培养基; 0.2 mg·L^{-1} IBA 培养基为生根培养基。

农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株为 EHA105, 内含植物表达载体 pGAH, 携带 *codA* 基因(由上海市农业科学院张大兵博士馈赠)。

1.2 实验方法

1.2.1 农杆菌介导的遗传转化

菌种的活化和工程菌液的制备按相关文献(王关林和方宏筠, 2002)所述方法进行。小黑杨花药培养植株的遗传

收稿日期: 2006-12-30; **接受日期**: 2007-04-27
基金项目: 黑龙江省科技计划项目(No.GB06B303)
* **通讯作者**。E-mail: chpyang2006@126.com

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-004

转化采用本实验室已建立的方法(杨传平等, 2001)。

1.2.2 PCR 检测

采用 CTAB 法提取转基因及非转基因植株的总 DNA, 采用小量质粒快速抽提纯化试剂盒(购自上海华舜生物工程有限公司)提取阳性对照 pGAH 质粒。

以 *codA* 基因两端序列为引物, 上游引物为 5'-AACATCGAGAACCTGAGCGCGACAGG-3'; 下游引物为 5'-AGCATCAACAGCTTCGGCGTATC-3'。以 pGAH 质粒上的目的基因片段为阳性对照, 非转基因植株的总 DNA 为阴性对照, 对转基因植株的总 DNA 样品进行 PCR 扩增, 扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 Southern 印迹杂交检测

将转基因植株和非转基因对照植株的总 DNA 经 *Eco*RI 和 *Hin*dIII 双酶切, 在 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳分离, 按标准的 Southern 印迹法进行转移(王关林和方宏筠, 2002)。以外源基因 *codA* 为探针, 按 Boehringer 公司的 DIG DNA Labelling and Detection Kit 进行 Southern 杂交和检测。

1.2.4 外源基因转录水平的检测

用 SDS 法提取转基因及非转基因对照植株的总 RNA, 经 DNase 消化处理后进行反转录。以 cDNA 作为定量 PCR 模板, 选择杨树甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(*GAPDH*)作为内参基因, 在 NCBI 核酸数据库中检索, 获得该基因的开放阅读框序列。用 Primer5.0 软件设计内参基因引物和外源基因引物(表 1)。

实时荧光定量 PCR 检测采用 DyDAmo^{Tm} SYBR Green qPCR Kit(购自 FINNZYMES 公司)。20 μL 反应体系中加入: 2×DyNAmo Master Mix 10 μL; 去离子水 4 μL; cDNA 2 μL; 内参基因和外源基因的上游引物和下游引物各 50 pmol·L^{-1}。各反应均设 3 次重复, 分别设置水对照和总 RNA 对照。使用实时数据采集模式, 循环反应参数为 94°C 预变性 3 分钟; 94°C 变性 30 秒, 58°C 退火 30 秒, 72°C 延伸 30 秒; 循环 40 次。分别在 76°C 和 85°C 读板, 收集荧光, 绘制溶解曲线, 温度由 58°C 开始, 至 95°C 停止。利用 Opticon Monitor 2.02 软件保存和分析数据, 根据公式 $X_N=2^{-\triangle CT}$ 计算外源基因的相对定量(Kenneth and Thomas, 2001)。

1.2.5 转基因小黑杨花药培养植株的耐盐性测定

将 PCR 检测呈阳性的 4 个转化植株分别编号为 T1、T2、T3 和 T4, 经过扩大繁殖后获得 4 个转基因株系, 每个株系扩繁 100 余株。从每个株系中选出高 2 cm 左右的无根组培苗 60 株, 分成 6 组, 每组 10 株, 分别移入 NaCl 浓度为 0(CK)、0.4%、0.5%、0.6%、0.7% 和 0.8% 的生根培养基(MH+ 0.2 mg·L^{-1} IBA + 20 mg·L^{-1} Km)中进行胁迫实验。以未转基因小黑杨花药培养植株为对照, 30 天后统计各株系的生根及盐害情况, 计算盐害指数。盐害级值确定: 无盐害症状为 0 级; 轻度盐害(有少部分叶尖及叶缘变黄)为 1 级; 中度盐害(有约 1/2 的叶尖及叶缘焦枯)为 2 级; 重度盐害(大部分叶尖及叶缘焦枯或脱落)为 3 级; 极重度盐害(叶落, 最终死亡)为 4 级。盐害指数(D)=Σ(盐害级值 × 相应盐害级值株数)/(总株数 × 盐害最高级值)×100%(孙仲序等, 2002)。

2 结果与分析

2.1 外源基因已整合到小黑杨花药培养植株基因组中

小黑杨花药培养植株叶片经农杆菌 EHA105(pGAH)浸染, 在含卡那霉素 50 mg·L^{-1} 的选择培养基上培养 3 周后, 在发生转化的叶片上产生绿色的愈伤组织。30 天左右由愈伤组织分化出不定芽, 再将不定芽转至生根培养基中, 15-20 天内可生根。

表 1 转基因小黑杨定量 PCR 扩增所用引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time quantitative PCR of transgenic *Populus simonii*×*P. nigra*

Gene name	Primer sequence	Length of amplification products(bp)
GAPDH	5'-CCTGCATAAAGCACAACC-3'	
	5'-AGGGAGGAGTCTGAGAATAA-3'	190
codA	5'-AATCGGGCTACGACTGG-3'	
	5'-GCGTCCTCGTTGGTTTC-3'	229

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-004

分别对所获得的4株卡那霉素抗性植株提取叶片总DNA，用特异引物进行PCR扩增检测，阳性对照及T1、T2、T3和T4转化再生植株均扩增出820 bp的特异谱带，而非转化对照植株则未出现扩增谱带(图1)。上述结果初步表明*codA*基因已整合到所检测的4株小黑杨花药培养植株基因组中。

在PCR检测的基础上，以*codA*为探针对转基因植株进行Southern印迹杂交检测。由图2可知，4个转基因株系及阳性对照均获得了杂交谱带，表明外源基因已经整合到小黑杨花药培养植株的基因组中。

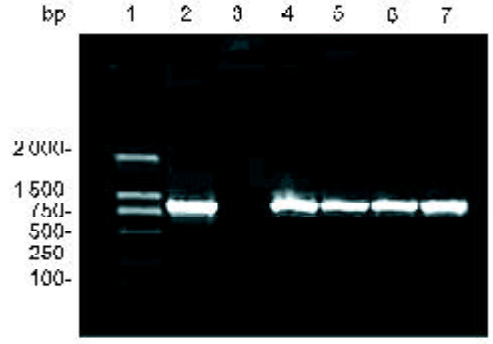

图1 转基因植株PCR扩增电泳图谱

1: DNA标准样品; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照; 4-7: 转基因植株

Figure 1 PCR products of transgenic plants

1: DNA marker DL2000; 2: positive control; 3: negative control; 4-7: transgenic plants

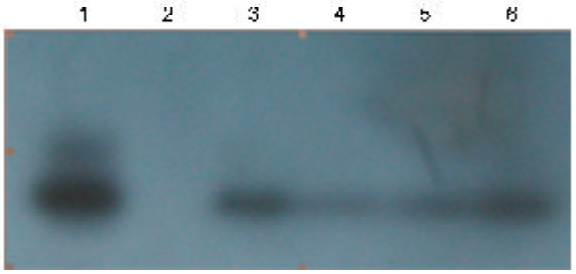

图2 转基因植株Southern印迹杂交检测图谱

1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3-6: 转基因植株

Figure 2 Southern blots of transgenic plants

1: positive control; 2: negative control; 3-6: transgenic plants

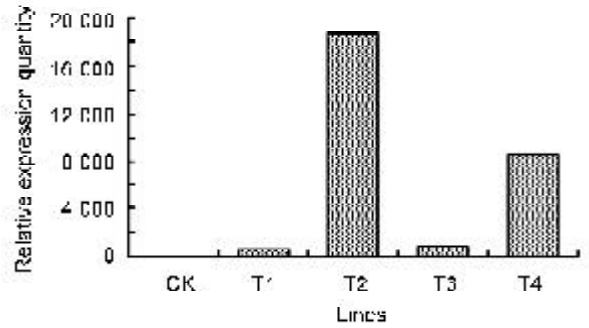

图3 各转基因株系*codA*基因mRNA表达水平的相对定量

Figure 3 Relative *codA* gene mRNA expression levels of transgenic *Populus simonii*×*P. nigra* lines

2.2 外源基因在mRNA水平的表达

采用实时荧光定量RT-PCR技术对获得的转基因株系进行了分析。结果表明，4个转基因株系在mRNA水平上均能够表达，但外源基因的表达量不同，T2表达量最高，T4次之，T1最低(图3)。

2.3 转基因小黑杨花药培养植株耐盐性的提高

将分子检测为阳性的4个转基因株系无根苗分别移栽于含不同浓度NaCl的生根培养基中培养，根据生根率和盐害指数综合评价转基因组培苗的耐盐能力。

由表2、表3和图4、图5可见，非转基因对照植株在0.6%的NaCl胁迫下，盐害严重，盐害指数高达97.5%，生根率仅为10%，表明非转基因对照植株在此NaCl浓度下不能正常生长。而转基因株系在浓度为0.6% NaCl的培养基中表现轻度盐害，4个株系的生根率均在50%以上，平均生根率为67.5%，是对照的6.75

表2 转基因小黑杨在不同浓度NaCl条件下的盐害指数

Table 2 Salt-harm index of transgenic *Populus simonii*×*P. nigra* under different concentration of NaCl

Experiment material	Salinity(%)					
	0	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80
CK	0	15.0	37.5	97.5	100.0	100.0
T1	0	0	10.0	22.5	30.0	82.5
T2	0	2.5	12.5	22.5	40.0	82.5
T3	0	0	5.0	30.0	50.0	85.0
T4	0	0	2.5	17.5	20.0	60.0

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-004

表 3 转基因小黑杨在不同浓度NaCl条件下的生根率
Table 3 Root ratio of transgenic *Populus simonii*×*P. nigra* under different concentration of NaCl

Experiment material	Salinity(%)					
	0	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80
CK	100	100	60	10	0	0
T1	100	100	70	70	30	0
T2	100	100	60	50	10	0
T3	100	100	60	50	20	0
T4	100	100	80	100	30	30



图 4 生根培养的小黑杨

(A) 生根培养的转基因小黑杨;
(B) 浓度为0.6%的NaCl培养基上生长的转基因小黑杨(左)和非转基因对照小黑杨(右)

Figure 4 *Populus simonii* × *P. nigra* cultured on medium for inducing roots

(A) transgenic *Populus simonii*×*P. nigra* for inducing roots;
(B) transgenic (left) and non-transgenic (right) *P.simonii* × *P. nigra* on culture medium containing 0.6% NaCl

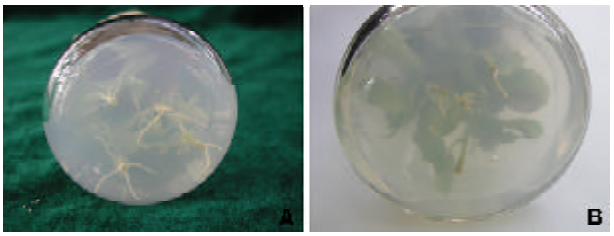

图 5 0.6% NaCl胁迫下转基因小黑杨及对照的生根状况

(A) 浓度为0.6%的NaCl生根培养基上生长的转基因小黑杨;
(B) 非转基因对照小黑杨

Figure 5 Transgenic *Populus simonii* × *P. nigra* and control cultured on medium containing 0.6% NaCl for inducing roots

(A) transgenic *Populus simonii* × *P. nigra* on medium containing 0.6% NaCl for inducing roots;
(B) non-transgenic *P.simonii* × *P. nigra* (control)

倍。胁迫实验表明，4 个转基因株系的耐盐性均有不同程度的提高，在 0.6% 的 NaCl 胁迫下能够生长。

3 讨论

自Rozwadowski等(1991)将*codA*基因导入到大肠杆菌(*E. coli*)甜菜碱合成突变体中，使其改善了耐盐性以来，至今已有许多学者对 *codA* 基因的功能进行了研究。实验证明，转*codA*基因的植物由于甜菜碱的积累，增强了植物的耐盐性和耐低温性(Hayashi et al., 1997; 何培民等, 2001; Mohanty et al., 2002)。

本研究将土壤细菌(*A. globiformis*)的 *codA* 基因通过农杆菌介导法转入小黑杨花药培养植株中，通过筛选获得了 4 个转基因株系。分子检测证明，*codA* 基因已整合到小黑杨花药培养植株基因组中，并且在mRNA水平上均得到不同程度的表达。在此基础上对组培苗进行了 NaCl 胁迫实验，结果表明，获得的 4 个转基因株系的组培苗在浓度为 0.6% 的 NaCl 胁迫下盐害较轻，平均盐害指数比非转基因对照低76.28%，平均生根率是对照的 6.75 倍，表明 *codA* 基因的导入提高了转基因小黑杨花药培养植株的耐盐性。

参考文献

陈少良, 李金克, 毕望富, 王沙生 (2001). 盐胁迫条件下杨树盐分与甜菜碱及糖类物质变化. 植物学通报 **18**, 587-596.

何培民, 张大兵, 梁婉琪, 姚全红, 张荣铣 (2001). 细菌乙酰胆碱氧化酶基因(*codA*) 在烟草的表达与抗盐能力的分析. 生物化学与生物物理学报 **33**, 519-524.

贾庚祥, 朱至清, 李银心 (2002). 甜菜碱与植物耐盐基因工程. 植物学通报 **19**, 272-279.

刘桂丰, 程贵兰, 姜静, 白爽, 于影, 蔡智军, 董京祥, 李淑娟 (2006). 以胆碱脱氢酶基因对小黑杨花药培养植株的遗传转化. 植物生理与分子生物学学报 **32**, 163-168.

刘桂丰, 杨传平, 刘春华 (2002). 小黑杨花药培养植株的诱导. 植物生理学通讯 **38**, 591-591.

刘振林, 戴思兰 (2004). 植物甜菜碱脱氢酶基因研究进展. 西北农林科技大学学报(自然科学版) **32**, 104-110.

马德钦, 汤岚, 吕文, 骆爱玲, 梁峥 (1995). 甜菜碱醛脱氢酶基因的cDNA克隆. 植物学通报 **12**, 47-48.

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-004

沈义国, 杜保兴, 张劲松, 陈受宜 (2001). **山菠菜胆碱单氧化物酶基因**(*CMO*)**的克隆与分析**. **生物工程学报 17**, 1-6.

孙仲序, 杨红花, 崔得才, 赵春芝, 赵淑萍 (2002). **转基因杨树的抗盐性分析**. **生物工程学报 18**, 481-485.

王春明, 袁金铎, 尹苗, 安立国 (2004). **甜菜碱的生物合成及其基因工程的研究进展**. **山东师范大学学报**(**自然科学版**) **19**, 88-91.

王关林, 方宏筠 (2002). **植物基因工程**(**第二版**). **北京**: **科学出版社**. pp. 614-623.

杨传平, 刘桂丰, 梁宏伟, 张慧 (2001). **耐盐基因** *Bet-A* **转化小黑杨的研究**. **林业科学 37**, 34-38.

Hayashi H, Mustardy L, Deshnium P, Ida M, Murata N(1997). Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhance tolerance to salt and cold stress. *Plant J* **12**, 133-142.

Kenneth JL, Thomas DS (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\triangle\triangle CT}$ method. *Methods* **25**, 402-408.

McCue KF, Hanson AD (1990). Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Tibteco* **8**, 358-362.

Mohanty A, Kathuria H, Ferjani A, Sakamoto A, Mohany P, Murata N, Tyagi AK (2002). Transgenics of an elite indica rice variety Pusa Basmati 1 harbouring the *codA* gene are highly tolerant to salt stress. *Theor Appl Genet* **106**, 51-57.

Nuccio ML, Russell BL, Nolte KD, Rathinasabapathi B, Gage DA, Hanson AD(1998). The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *Plant J* **16**, 487-496.

Rozwadowski KL, Khachatourians GG, Slevaraj G(1991). Choline oxidase, a catabolic enzyme in *Arthrobacter pascens*, facilitates adaptation to osmetic stress in *Escherichia coli*. *J Bact* **173**, 472-478.

Sakamoto A, Murata N (2000). Genetic engineering of glycine betaine synthesis in plants: current status implications for enhancement of stress tolerance. *J Exp Bot* **51**, 81-88.

Expression of Choline Oxidase Gene in Transformed *Populus simonii* × *P. nigra* Improves Salt Stress Tolerance

Jing Jiang[1], Lei Wang[1], Liping Zhan[2], Yucheng Wang[1], Guifeng Liu[1], Chuanping Yang [1*]

[1]*Key Laboratory of Forestry Tree Genetic Improvement, Ministry of Education & Heilongjiang Province, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China*

[2] *Professional Technological School of Liaoning Traditional College, Shenyang 110101, China*

Abstract Choline oxidase gene (*codA*) was introduced into the haploid plants of *Populus simonii* × *P. nigra* by *Agrobacterium*-mediated approach, with axenic leaves used as explants. PCR and Southern blot analysis confirmed four kanamycin-resistant transgenic plants, in which *codA* successfully integrated into the genome of *Populus simonii* × *P. nigra* haploid plants. Real-time quantitative PCR revealed that the transgene was expressed in the transgenic plants at different levels. Salt tolerance test demonstrated that the 4 transgenic plants could grow normally at 0.6% salinity, but nontransgenic plants suffered severely from the same salinity. Thus, the expression of *codA* gene improves the salt-stress tolerance of these transgenic poplar plants.

Key words choline oxidase gene, *Populus simonii* × *P. nigra*, salt tolerance

Jiang J, Wang L, Zhan LP, Wang YC, Liu GF, Yang CP (2008). Expression of choline oxidase gene in transformed *Populus simonii* × *P. nigra* improves salt stress tolerance. *Chin Bull Bot* **25**, 80–84.

* Author for correspondence. E-mail: chpyang2006@126.com

(**责任编辑**: **白羽红**)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-004