中国科学 (C 辑)
第 27 卷 第 2 期 SCIENCE IN CHINA (Series C) 1997 年 4 月

甜菜碱醛脱氢酶基因在水稻中的表达及转基因植株的耐盐性研究*

郭 岩 张 莉 肖 岗 曹守云 谷冬梅 田文忠 陈受宜**
(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要 甜菜碱醛脱氢酶(BADH)是渗透调节剂甜菜碱生物合成中涉及的第 2 个酶,我们将含盐生植物山菠菜 BADH 基因的植物双元表达载体经基因枪法导入水稻,经盐胁迫筛选得到转化植株,经 RAPD 检测全部阳性,在随机选择的 10 株转化植株中全部测出 BADH 活性,而对照未见. Northern 杂交表明,其中 7 株为阳性. 在含 0.5% 氯化钠的盐池中大多数转基因植株生长基本正常,结实率约为 10%,而对照受盐害现象显著,几乎全部枯萎.

关键词 甜菜碱醛脱氢酶基因 转基因水稻 分子检测 高耐盐性

土壤盐碱化是农作物减产的主要原因之一. 在盐碱或干旱胁迫下,细胞为维持正常的膨压往往积累一些小分子有机化合物,例如甜菜碱. 甜菜碱及其衍生物是一类渗透调节剂[1]. 然而在许多重要农作物,如马铃薯、番茄或水稻中都未能发现甜菜碱的积累[2],因此,这些作物有可能通过甜菜碱生物合成有关酶的基因工程提高其耐逆性.

高等植物中,由胆碱经 2 步氧化得到甜菜碱,这一过程涉及的第 1 个酶是胆碱单氧化物酶(CMO),第 2 个酶是甜菜碱醛脱氢酶(BADH),CMO 已部分纯化并定位于叶绿体基质中,BADH 的主要活性也位于叶绿体基质,但细胞质中也存在少量同工酶[1]. BADH 基因位于染色体上,已从菠菜、甜菜和山菠菜中克隆了其 cDNA[3~5].

山菠菜属藜科植物,有很强的耐盐性. 我们已克隆了山菠菜 BADH 结构基因,并在 *E. coli* 中得到表达[5]. 本文报道了运用基因枪将含 BADH cDNA 的植物双元表达载体转到水稻中,得到的转基因水稻有较高的耐盐性,并已在盐田中结实,这在国际上首次报道.

1 材料和方法

1.1 材料

粳稻(*Oryza sativa*)中花 8 号、10 号、中远 1 号由中国农业科学院作物育种栽培研究所李梅芳教授提供. 各种限制性内切酶, T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司. ^{32}P 标记的 dNTP 购自 NEN. PCR 引物由本组合成, Taq DNA 聚合酶由本组自制. 双元载体 pBin 438 由方荣祥教授惠赐.

1996-04-22 收稿, 1996-06-06 收修改稿
* 国家"八六三"高技术计划资助项目
** 联系人

1.2 方法

1.2.1 DNA提取 质粒DNA提取和纯化按Sambrook方法[6],植物总DNA提取按早先报道的方法进行[7].

1.2.2 植物表达载体的构建 双元表达载体pBin 438含有35 S启动子和TMV的"Ω"片段翻译增强子,将BADH cDNA片段插入pBin 438的BamH Ⅰ和Kpn Ⅰ位点(图1).

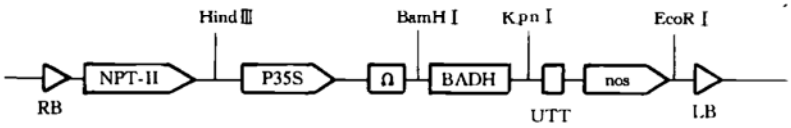

图1 双元载体构建图

1.2.3 外源DNA转化 (1)材料消毒与接种. 将授粉后10～15 d的未成熟种子除去种皮,在无菌条件下,用70%酒精浸泡2 min,0.1%升汞浸泡10 min,10%次氯酸钠浸泡20 min,无菌水冲洗4次,剥出幼胚,接种在附加2,4-D 2 mg/L的NB培养基上,培养2～3 d. (2)高渗培养基预处理. 打枪前4～5 h将幼胚放在附加0.5～0.7 mol/L甘露醇的NB高渗培养基上,每平皿约50个幼胚,集中于平皿中央直径约2.5 cm范围内. (3)基因枪转化和筛选. 用PDS-1000/He基因枪(Bio-Rad),氦气压力为77.337 kg/cm^2(1 100 psi). 每批材料轰击2次. 打枪后仍在高渗培养基上放置过夜(约12～16 h),将材料转入附加2,4-D 2 mg/L的NB培养基上,分散培养1周后转入筛选培养基.

1.2.4 植株培养 先在100 mg/L G418上筛选1个月,再用150 mg/L G418筛选约1个月,然后转入预分化培养基(NB+ABA 5 mg/L+BAP 2 mg/L+G418 150 mg/L),约1个月后转入分化培养基(NB+BAP 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L+G418 100 mg/L),长出小苗后转入壮苗培养基(1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+G418 100 mg/L或NaCl 0.5%),小苗长大后移入盐池.

1.2.5 BADH活性分析[5] 2 g植物组织在液氮中研磨后,室温下加入蛋白提取液(50 mmol/L Hepes/KOH pH 8.0, 1 mmol/L MEDTA, 5 mmol/L DTT)抽提,4℃下14 000 r/min离心10 min,蛋白浓度经紫外分光光度计280 nm比色测定.酶活性测定反应体系为:50 mmol/L Hepes/KOH(pH 8.0), 5 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA,1 mmol/L甜菜碱醛,1 mmol/L NAD及酶提取液1.0 mg蛋白,总体积1.0 mL,37℃反应10 min,紫外分光光度计340 nm比色测定. 上述反应体系下每分钟消耗1 nmol的NAD定义为1个酶活力单位(U).

1.2.6 转基因植株的分子检测 转基因植株PCR检测、Northern杂交均按常规方法进行[6].

1.2.7 植物叶片相对电导率的测定[8] 等分称取0.5 g新鲜叶片,加5 mL超纯水,分成两等份,一份于25℃,40 r/min振荡4 h,另一份于沸水浴中加热5 min,分别用DDB-6 200型数字电导仪测定溶液电导率,前者为R_c',后者为R_c,相对电导率为$R_c/R_c'\times 100\%$.

植物叶片大分子渗漏值根据Leopeld方法略加修改进行[9].

2 结果

2.1 耐盐转基因水稻的筛选

抗性愈伤组织在含0.5 mg/L NAA,3 mg/L BAP,100 mg/L G418的NB培养基中分化成

苗，G 418 抗性稳定后，试管苗在含 0.5%～0.8% NaCl 的培养基中进行初步的耐盐性鉴定．试验结果表明转化植株的耐盐性明显高于其对照．对照植株在含 0.5% NaCl 培养基中不能成活，而大多数的转化植株能正常生长或受较轻盐害，直至 NaCl 浓度为 0.8% 时，转基因植株才表现出明显的盐伤害(图 2)，其中有 12 株仍存活但移栽均未成活．

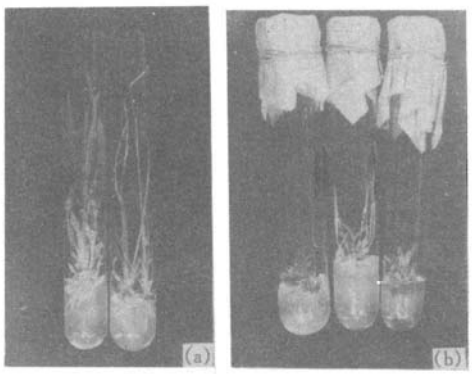

图 2　转基因水稻(中远 1 号)在含 0.5% 和 0.8% NaCl 培养基中的生长状况
(a)0.5% NaCl，右为对照，左为转基因植株；(b)0.8% NaCl，左右为对照，中间为转基因植株

2.2　转基因水稻的植株再生和耐盐性鉴定

3 个品种转化实验中共获得 192 株 G 418 抗性植株．其中，中花 8 号 106 株，中花 10 号 37 株，中远 1 号 49 株．将 13 株中花 8 号、6 株中花 10 号、4 株中远 1 号抗性植株接种在含0.5% NaCl 培养基中；中花 8 号 31 株，中花 10 号 8 株，中远 1 号 22 株接种在含 NaCl 0.8% 培养基中；20 d 后，对照在含 0.5% NaCl 培养基中全部死亡，大多数转化植株能正常生长或受轻度盐害．但当 NaCl 浓度为 0.8% 时转基因植株受害明显，胁迫 25 d 后大多数植株叶片几乎全部枯死．剩余的全部 G 418 抗性植株均进行 0.5% NaCl耐盐性筛选．

抗性小植株经长根、壮苗后，99 株移栽在温室盐池中，三叶后灌 0.5% 盐水．约 20 d 3 个品种各 15 株对照全部枯萎死亡．转基因植株有 72 株成活，其中，中花 8 号为 34 株，中花 10 号为 17 株，中远 1 号为 21 株，它们的生长状况有较显著差异(图 3)，其中 19 株能抽穗结实，包括中花 8 号 16 株，中花 10 号 2 株，中远 1 号 1 株．总体上结实率不高于 10%，共得到 488 粒种子(图 4)，其中有 232 粒出苗．19 株结实植株经 PCR 及 BADH 酶活性检测为阳性．



图 3　转基因水稻(中花 8 号)在含 0.5% NaCl 土壤中的生长情况
图上显示出不同植株耐盐性的差异



图 4　转基因水稻(中花 8 号)在含 0.5% NaCl 盐田中的结实情况

2.3 转基因水稻的 PCR 检测

随机取经耐盐鉴定的 10 株转化植株，其中 5 株中花 8 号、3 株中花 10 号、2 株中远 1 号．进行 PCR 检测，证明这些耐盐植株的基因组中都插入了 BADH 基因(图 5)．

2.4 转基因水稻 BADH 酶活性测定

为了检测 BADH 基因的表达水平，我们分析了已经 PCR 测试的 10 株转基因水稻的甜菜碱醛脱氢酶的活性，定义在反应体系中每分钟消耗 1 nmol 的 NAD^+ 为 1 U(结果示于图 6)，对照植株中未测到 BADH 酶活性．转化植株酶活性在 80U 以上．

2.5 盐胁迫下转基因水稻相对电导率和大分子渗漏率测定

0.5%NaCl 胁迫 3 d，10 株转化水稻的相对电导率及大分子渗漏率的测定见表 1．由表 1 可见，绝大多数转基因植株在盐胁迫下生理表现优于对照，细胞膜所受损伤小于对照．

表 1 10 株转化水稻在盐胁迫下的相对电导率和大分子泄漏值[a)]

	CK	株号									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
电导率	0.37	0.17	0.22	0.50	0.27	0.31	0.19	0.15	0.17	0.23	0.31
大分子	2.63	2.02	2.28	2.84	2.27	2.86	0.30	2.36	2.61	2.34	2.52

a)1～5 为中花 8 号，6～8 为中花 10 号，9，10 为中远 1 号

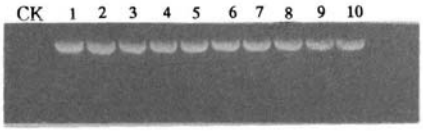

图 5 转基因水稻的 PCR 检测
1～5 为中花 8 号；6～8 为中花 10 号；9，10 为中远 1 号

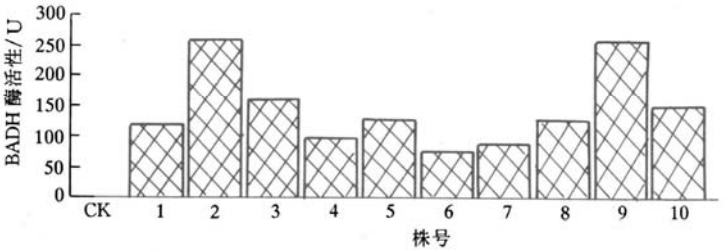

图 6 转基因水稻 BADH 活性
1～5 为中花 8 号；6～8 为中花 10 号；9，10 为中远 1 号

2.6 Northern 杂交分析[6]

对 10 株转基因水稻的 Northern 杂交测定表明有 7 株呈阳性，分别为中花 8 号 4 株、中花 10 号 2 株和中远 1 号 1 株．而对照和另 3 株呈阴性(图 7)．看来 BADH 基因不仅整合于水稻染色体上并有转录活性．

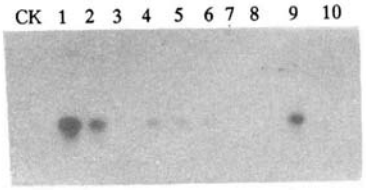

图 7 转基因水稻的 Northern 检测
1～5 为中花 8 号；6～8 为中花 10 号；9，10 为中远 1 号

3 讨论

许多实验证明，在细菌或植物培养基中添加甜菜碱或其衍生物有助于提高其耐旱耐盐能力，Mika 等人将大肠杆菌甜菜碱合成有关基因导入氯细菌中使其能在 400 mmol/L NaCl 中正常生长，而对照不能[10]．1994 年，Holmstrom 等人将大肠杆菌 BetB 基因导入烟草，转基因植株的耐盐性也得到很大提高[11]．本文将山菠菜 BADH cDNA 经基因枪法导入水稻栽培品种中花 8 号、10 号和中远 1 号，共得到 192 株转化植株，在 0.5%NaCl 胁迫下，多数转化植株虽受轻度盐害但仍能成活，在

0.8%NaCl 胁迫下盐害严重，但移栽未能成活，相应 15 株对照在0.5%盐胁迫下全部死亡，说明转基因植株的耐盐性普遍高于对照，这一结果与 Holmstrom 等人在烟草中的结果相似. 这是将植物来源的 BADH 基因导入单子叶植物提高其耐盐性的首次尝试. 有人认为，植物中甜菜碱的积累与 CMO 活性的相关性大于 BADH，因此，植物耐逆性更多地取决于 CMO 活性[12]. 然而，本论文结果显示 BADH 活性增加同样也能提高转基因植株的耐盐性.

从经耐盐性鉴定的转化植株中随机选取 10 株，进行叶片 BADH 活性测定表明对照中未能测得 BADH 活性，而转基因植株中的活性不小于 80 U，然而，该 10 株转基因水稻叶片的 Northern 杂交却仅有 7 株呈阳性，其中 2 号和 9 号与 BADH 活性呈正相关性，其他未见明显相关，其原因可能是操作误差，但仍需进一步查明.

转基因植株的 BADH 活性测定和 Northern 杂交结果均说明外源基因已嵌入水稻染色体并得到表达，然而从表 1 中可见个体间的表达水平相距甚远，其原因可能与外源基因的嵌入位点有关.

在温室盐池中移栽的 99 株转基因植株，其中 19 株结实，但总体上结实率很低，仅为 10%. 一般认为组织培养后代有不育现象[13]，推测转基因植株的不育现象更甚，如何增加转基因植株的可育性，还有待进一步研究.

致谢　作者对李梅芳教授和方荣祥教授的慷慨惠赠深表谢忱.

参　考　文　献

1 Hanson A, D Grumet R. Betaine accumulation: metabolic pathways and genetics. In: Key J L, Kosuge T, eds. Celluler and Molecular Biology of Plant Stress, NY: Liss, 1985.71～92

2 Weretilnyk E A, Sebastian B. Comparative biochemical and immunological studies of the glycine betaine synthesis pathway in diverse families of dicotyledons. Planta, 1989, 178:342－352

3 Weretilmyk E A, Hanson A D. Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicafed in adaptation to salinity and drought. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87:2 745～2 749

4 McCue K F, Hanson A D. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. Plant Mol Biol, 1992, 18:1～11

5 肖　岗，张耕耘，刘凤华，等. 山菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因研究. 科学通报，1995, 40(8):741～745

6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

7 陈受宜，朱立煌，洪　建. 水稻抗盐突变体的分子生物学鉴定. 植物学报，1991, 33:569～573

8 谭　常，杨惠东，余叔文. 植物生理学实验手册. 上海：上海科学技术出版社，1985, 67～72

9 Iturriaga G, Schneider K, Salamini F, et al. Expression of disiccation-relaled proteins from the resurretion plant creterostigma plantagineum in transgenic tobacco. Plant Mol Biol, 1992, 20:555～558

10 Mika N, Manabu I, Teruhiro T, et al. Synechococcus sp. PCC 7942 transfarmed with *E. coli* bet genes produces glycine betaine from choline and acquines resistance to salt stress. Plant Physiol, 1995, 107:703～708

11 Holmstrom K, Welin B, Manda A, et al. Production of the *E. coli* betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine, in transgenic plants. Plant J, 1994, 6(5):749～758

12 Renaud B, Weijgle P. Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach choroplast stroma. Plant Physiol, 1988, 90:322～329

13 Datta S K, Peterhans A, Datta K, et al. Genetially engineered fertile indica-rice recovered from protoplasts. Biotechnology, 1990, 8, 736～740