

TvNHX1 基因对矮牵牛的遗传转化

崔继哲, 乔 磊, 弭晓菊, 付寅生, 李 想, 杨 慧

(哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要:为获得耐盐碱特性的矮牵牛新种质,提高其在广大盐碱地区的适应性,以矮牵牛品种梦幻兰和利宝紫为试材,简要介绍了 *TvNHX1* 基因的植物表达载体构建及用农杆菌介导法将 *TvNHX1* 基因转化矮牵牛的初步结果,并分析了 6-BA 和 NAA 组合对矮牵牛叶片分化的影响。结果表明:对 PCR 筛选得到的阳性菌落摇菌、提取质粒后进行 *Bam*HI/*Sac*I 双酶切鉴定,在 1 640 bp 左右得到了单一条带,与预期一致。证明 pBI121-*TvNHX1* 构建成功;在不同浓度激素组合的培养基中,梦幻兰的分化率都高于利宝紫,梦幻兰品种在 6-BA 为 2.0 mg·L⁻¹、NAA 为 0.2 mg·L⁻¹ 时分化率达 90.69%;以梦幻兰品种的叶片为外植体诱导生根,得到 12 株在筛选培养基上正常生根的矮牵牛苗,以 *TvNHX1* 基因特异引物 WFF 和 JWR1 对获得的 Kan 抗性植株和非转基因对照进行 PCR 检测,12 个抗性植株中 7 株扩增出特异的条带,说明 *TvNHX1* 基因已转入矮牵牛。

关键词:矮牵牛; *TvNHX1* 基因;遗传转化

中图分类号:S681.6

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)12-0014-05

土壤盐碱化是园林绿化中极为严重的问题之一,培育耐盐碱性强的园林植物新品种,对生态脆弱、园林绿化基础薄弱地区的生态环境建设具有

重要的意义。已有的研究表明,Na⁺通过 Na⁺/H⁺逆向转运在液泡中积累是植物耐盐性的一种重要机制,转 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因能够显著提高植物的耐盐性^[1],从盐生植物碱菀中克隆得到的 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因 *TvNHX1* 在拟南芥中的表达显示了该基因对盐碱的耐性^[2],许多相关研究表明,Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因在植物耐盐碱基因工程中具有良好的应用前景^[3-5]。

收稿日期:2012-11-07

基金项目:黑龙江省教育厅科技研究资助项目(11551144)

第一作者简介:崔继哲(1962-),女,黑龙江省饶河县人,博士,教授,从事植物分子生物学与基因工程研究。E-mail:shiccl@sina.com。

[5] 娜仁,张笑宇,张之为,等. 马铃薯不同品种(系)对晚疫病抗性鉴定[J]. 作物杂志,2010(4):59-62.

[6] 姚裕琪,巩秀峰,高奇华,等. 马铃薯晚疫病抗性鉴定及评

价[J]. 内蒙古农业科技,2001(2):8-9.

[7] 韩彦卿. 马铃薯种质资源对晚疫病菌的抗性评价及致病疫霉 SSR 引物的开发[D]. 保定:河北农业大学,2010:40.

Identification and Evaluation of Germplasm for Resistance to Potato Late Blight

LOU Shu-bao, LI Qing-quan, TIAN Guo-kui, XU Hong-yan, WANG Hai-yan, WANG Li-chun, SHENG Wan-min

(Keshan Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Potato, Ministry of Agriculture, Keshan, Heilongjiang 161606)

Abstract:Forty nine cultivars of potato and thirteen wild germplasm and their progeny were evaluated the resistance to potato late blight by detached leaf assay with physiological race mixed. The results showed that in fortynine potato cultivars, seven cultivars showed resistance and eleven showed moderate resistance to *Phytophthora infestans*; in thirteen wild germplasm resource, two indicated resistance and one indicated moderate resistance to *Phytophthora infestans*. The results indicated that there were a few moderate resistant potato cultivars, and a few resistant materials in wild resource.

Key words: potato; late blight; resistance; identification; evaluation

(该文作者还有牛志敏和李凤云,单位同第一作者)

矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 是我国北方夏季主要栽培的花卉之一, 种植极为广泛, 在城市园林绿化美化中具有不可替代的作用。为获得耐盐碱特性的矮牵牛新种质, 培育出耐盐碱性的矮牵牛品种, 扩大矮牵牛的栽种范围, 提高其在广大盐碱地区的适应性, 开展了碱菀 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *TvNHX1* 转化矮牵牛的研究, 介绍了 *TvNHX1* 基因植物表达载体构建及农杆菌介导法将 *TvNHX1* 基因转化矮牵牛的初步研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pT-*TvNHX1* 为哈尔滨师范大学生物化学与分子生物学实验室克隆和构建, pBI121-X、大肠杆菌 JM109、根癌农杆菌 C58C1 (pMP90, Rif^r) 为哈尔滨师范大学生物化学与分子生物学实验室保存。矮牵牛品种梦幻兰、利宝紫的种子由哈尔滨市农业科学院提供。

1.2 方法

1.2.1 构建植物表达载体 pBI121-*TvNHX1* 和转化农杆菌 碱裂解法提取含目的基因的质粒 pT-*TvNHX1* 和载体质粒 pBI121-X, 分别用 *Bam*HI/*Sac*I 双酶切。将 pBI121-X 上的 X 切除, 从 pT-*TvNHX1* 上切下 *TvNHX1* 基因片段, 回收目的片段后用 T₄ DNA 连接酶连接, 连接产物转化 JM109, 在含卡那霉素 (Kan, 30 mg·L⁻¹) 的 YEP 培养基上涂板。用 *TvNHX1* 基因特异 PCR 检测引物 WFF (5' TTGGCCAAGATGGT-GTTCGATTC3') 和 JWR1 (5' GGTGAAAGA TATCACGGTACCAACA3') 进行目的基因的菌落 PCR 鉴定, 预期扩增片段 386 bp。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min; 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。选择 PCR 阳性菌落提取质粒后进一步用 *Bam*HI/*Sac*I 双酶切鉴定, 得到 *TvNHX1* 基因植物表达载体质粒 pBI121-*TvNHX1*。制备根癌农杆菌 C58C1 的感受态, 冻融法将 pBI121-*TvNHX1* 转入。用 *TvNHX1* 全长序列引物 WFF 和 WFR (5' GAATTCGAGCTCCGTTTAATTGGTTTC 3') 进行菌落 PCR, 预期片段 1 644 bp; 并对 PCR 产物用 *Sma*I 酶切以鉴定阳性转化子。

1.2.2 筛选适宜的分化培养基 将梦幻兰、利宝紫 2 个品种的种子清洗、经 75% 酒精浸泡 1 min、2% NaClO₃ 消毒 15 min 后, 接种到 1/2MS 培养基上培

养。选取无菌苗中部叶片, 切成 0.5 cm² 大小, 将其水平向 (近轴面向上) 接种到含有 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA 和 3 个不同浓度 NAA (0.10、0.05、0.20 mg·L⁻¹) 组合的 MS 培养基上, 诱导愈伤组织形成和芽再生。依据分化率 (分化率/% = 分化出芽的外植体/外植体总数 × 100), 选出转化时所用的分化培养基。

1.2.3 农杆菌侵染外植体及再生苗培养 从含 50 mg·L⁻¹ 利福平 (Rif)、30 mg·L⁻¹ 卡那霉素 (Kan) 的 YEB 新鲜平板上挑取 C58C1 (pBI121-*TvNHX1*) 单菌落, 接种于相同的液体培养基中, 培养至 OD 值达到 0.5, 然后扩大培养至 OD 值 0.8 左右。离心收集菌体, MS 液体培养基重悬沉淀, 使侵染液的 OD 值约为 0.5。

取梦幻兰品种的无菌苗叶片 (0.5 cm²), 浸入制备好的侵染液中 5 min, 在分化培养基 (MS + 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.2 mg·L⁻¹ NAA) 上 28℃ 黑暗共培养 2 d 后, 无菌水冲洗、200 mg·L⁻¹ 头孢曲松钠溶液浸泡 2 min, 转入筛选分化培养基 (附加 500 mg·L⁻¹ 头孢曲松钠和 10 mg·L⁻¹ Kan) 上, 25℃ 条件下光照培养, 每 14 d 更换 1 次培养基, 直至分化出芽。以未经农杆菌处理的叶片为对照, 用同样的方法进行培养。剪下长至 2~3 cm 的抗性芽, 转入含 10 mg·L⁻¹ Kan 的 1/2MS 培养基中生根。当再生苗根长 3~5 cm 时, 进行水培驯化, 10 d 后移到蛭石和草炭中, 7 d 后在温室中进行常规管理。

1.2.4 抗性再生株中目的基因 *TvNHX1* 的 PCR 检测 取 Kan 抗性植株和非转化对照株的幼嫩叶片 20~30 mg, CTAB 法^[6] 提取 DNA。用 *TvNHX1* 基因特异引物 WFF 和 JWR1 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 10 μL, 含 10×PCR 缓冲液 1.0 μL, dNTP 混合物 (为 2.5 mmol·L⁻¹) 0.8 μL、上下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 0.5 μL、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U·μL⁻¹) 0.08 μL、模板 DNA 1.0 μL、ddH₂O 6.12 μL。反应条件为 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 *TvNHX1* 基因植物表达载体的构建及根癌农杆菌阳性转化子的鉴定

分别对含目的基因的质粒 pT-*TvNHX1*、植物表达载体质粒 pBI121-X 进行 *Bam*HI 和 *Sac*I 双酶切后, 从 pT-*TvNHX1* 中获得预期 1 644 bp

的目的基因片段(见图 1A)、pBI121-X 中切下了预期 420 bp 的 X 片段(见图 1B)。将目的基因片段和载体中的大片段回收、连接,转化大肠杆菌 JM109。重组子的鉴定首先用菌落 PCR 方法进行,以 WFF 和 JWR1 为引物,扩增目的基因 *TvNHX1*

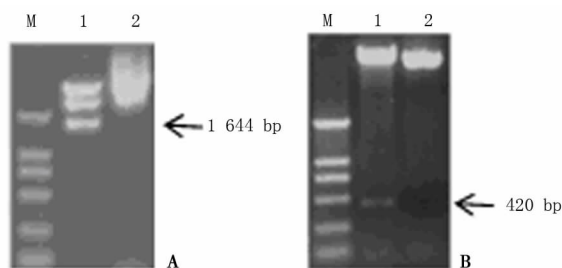


图 1 质粒的 BamHI 和 SacI 双酶切结果

Fig. 1 The plasmids digested by BamHI and SacI

M:DL2000 Marker; A: pT-*TvNHX1* 的酶切;1: pT-*TvNHX1* 酶切产物;2: pT-*TvNHX1* 质粒对照; B: pBI121-X 的酶切;1: pBI121-X 酶切产物,示切下 X 片段;2: pBI121-X 质粒对照。

M:DL2000 Marker; A: pT-*TvNHX1* digested by the restriction enzymes;1: Products of pT-*TvNHX1* digested;2: pT-*TvNHX1* plasmid control; B: pBI121-X digested by the enzymes;1: Products of pBI121-X digested;2: pBI121-X plasmid

的部分片段,得到预期结果(见图 2A)。进一步对 PCR 筛选得到的阳性菌落摇菌、提取质粒后进行 *Bam*HI/*Sac*I 双酶切鉴定,结果表明(见图 2B),在 1 640 bp 左右得到了单一条带,与预期一致。结果证明,pBI121-*TvNHX1* 构建成功,其表达框架结构见图 3。

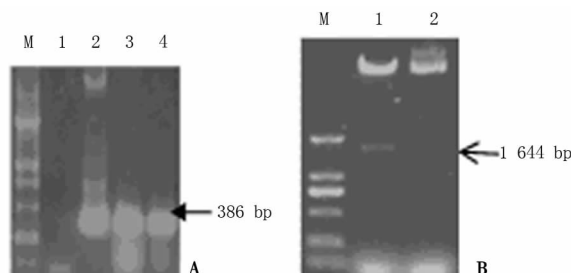


图 2 重组质粒 pBI121-*TvNHX1* 的鉴定

Fig. 2 Identification of pBI121-*TvNHX1* recombinant

M:DL2000 Marker; A: 转化菌落的 PCR;1: 水;2: 阳性对照;3~4: 菌落 PCR 产物; B: 重组质粒的 BamHI/*Sac*I 双酶切;1: 酶切结果,切下的目的片段;2: pBI121-*TvNHX1* 质粒对照

M:DL2000 Marker; A: Colony PCR;1: H₂O;2: Positive control;3~4: PCR selected of colony; B: Recombined plasmid digested by BamHI/*Sac*I;1: Digested result;2: pBI121-*TvNHX1* plasmid control

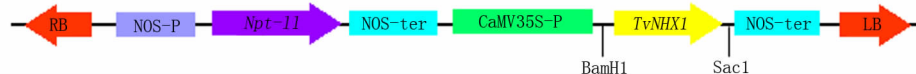


图 3 植物表达载体 pBI121-*TvNHX1*

Fig. 3 The plant expression vector pBI121-*TvNHX1*

随机挑选转化了 pBI121-*TvNHX1* 质粒的农杆菌单菌落,以此为模板,用目的基因的引物 WFF 和 WFR 进行菌落 PCR,得到了大小约为 1 640 bp 的片段(见图 4A);由于 *TvNHX1* 内部有单一的 *Sma*I 酶切位点,因此对 PCR 产物用

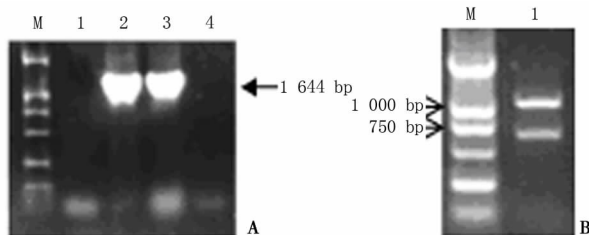


图 4 转化农杆菌 C58C1(pBI121-*TvNHX1*) 的鉴定

Fig. 4 Identification of C58C1(pBI121-*TvNHX1*)

M:DL2000 Marker; A: 菌落 PCR;1: 水;2: 阳性对照;3~4: 菌落 PCR 产物; B: 菌落 PCR 产物的 *Sma*I 酶切结果

M:DL2000 Marker; A: Colony PCR;1: H₂O;2: Positive control;3~4: PCR selected of colony; B: The product of PCR digested by *Sma*I

*Sma*I 酶切进一步鉴定,得到预期的 2 个片段(见图 4B),表明 pBI121-*TvNHX1* 质粒成功转入到农杆菌中。

2.2 激素组合对叶片外植体芽分化的影响

植物基因转化的成功依赖于高效的组织培养再生系统。愈伤组织诱导及芽再生过程中,激素的种类和浓度起着关键作用。试验选择 6-BA 和 NAA 作为诱导分化的基本要素,以 MS 为基本培养基,设置 3 个不同浓度的 NAA 与浓度为 2.0 mg·L⁻¹ 的 6-BA 进行组合,分析了 2 个基因型品种再生芽的形成。40 d 时统计分化出芽的外植体数,计算分化率(见表 1)。不同基因型分化率有明显差异,在不同浓度激素组合的培养基中,梦幻兰的分化率都高于利宝紫。梦幻兰品种对这 2 种激素的 3 个组合处理反应不同,当 6-BA 为 2.0 mg·L⁻¹、NAA 为 0.2 mg·L⁻¹ 时分化率达 90.69%,显著高于另 2 个组合处理。

表 1 矮牵牛 2 个品种叶片在不同激素培养基上的分化
Table 1 Differentiation of leaf explants from 2 varieties of *Petunia hybrida* in different hormone combination

品种 Variety	植物激素/mg·L ⁻¹ Plant hormone	外植体/个 No. of explants	分化外植体/个 No. of differentiated explants	分化率/% Differentiation frequency
梦幻兰 Menghuanlan	6-BA2.0+NAA0.10	53	32	60.37
	6-BA2.0+NAA0.15	45	26	62.22
	6-BA2.0+NAA0.20	43	39	90.69*
				P=0.039
利宝紫 Libaozi	6-BA2.0+NAA0.10	48	26	54.17
	6-BA2.0+NAA0.15	38	14	36.84
	6-BA2.0+NAA0.20	32	17	53.13
				P=0.054

2.3 转 *TvNHX1* 基因植株的分化再生

以梦幻兰品种的叶片为外植体,经 C58C1 (pBI121-*TvNHX1*)菌液侵染 5 min,共培养 2 d 后直接转移到筛选压为 10 mg·L⁻¹ Kan 的抑菌分化培养基(MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA+500 mg·L⁻¹ 头孢曲松钠)上诱导分化,14 d 后长出愈伤并伴有小芽点出现。30 d 时陆续分化出不定芽(见图 5A),待不定芽长到 2~3 cm,将其转入 10 mg·L⁻¹ Kan 的 1/2MS 培养基上诱导生根(见图 5B),得到 12 株在筛选培养基上正常生根的矮牵牛苗。

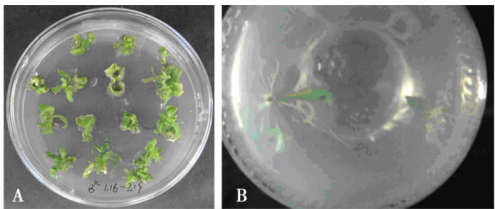


图 5 转 *TvNHX1* 基因外植体的分化(A)和抗性芽生根(B)
Fig. 5 Differentiation of explants transferred *TvNHX1* (A)and rooting of Kan^r shoots(B)

2.4 转化株的 PCR 检测

以 *TvNHX1* 基因特异引物 WFF 和 JWR1 对获得的 Kan 抗性植株和非转基因对照进行 PCR

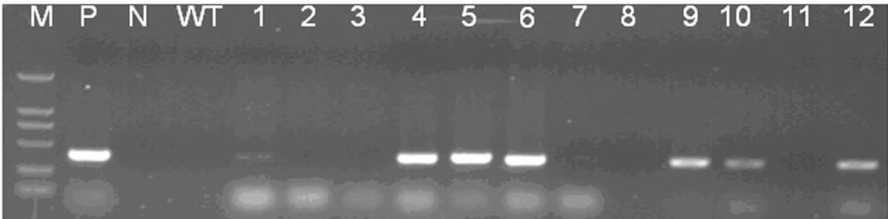


图 6 转 *TvNHX1* 基因植株的 PCR 扩增结果
M:DL2 000;P:质粒阳性对照;N:水;WT:非转基因阴性对照;1~12:转基因植株
Fig. 6 PCR amplification result of *TvNHX1* transgenic plants

M:DL2000 Marker;P:Plasmid as a positive control;N: H₂O; WT: Non-transgenic plant as a negative control;1~12: Transgenic plants

检测,12 个抗性植株中 7 株扩出特异的条带(见图 6),显示 *TvNHX1* 基因已转入矮牵牛。

3 结论与讨论

在构建 *TvNHX1* 基因的植物表达载体 pBI121-*TvNHX1* 过程中, pBI121-*TvNHX1* 重组子的鉴定先用菌落 PCR 筛选得到阳性单菌落,而后提取其质粒,再进一步酶切确定。菌落 PCR 是直接以转化菌的单个克隆为模板,通过特异性

引物或通用引物对插入载体中的目的基因进行快速扩增的技术,具有快速、经济、简便的特点,被广泛应用于转化菌、特别是大量转化子的鉴定和筛选。但有研究发现^[7],对于基于外源基因而设计的引物,转化后即使有微量未连入载体的外源基因存在于受体菌上或涂溅在抗性平板上,用菌落 PCR 鉴定时会有明显的假阳性扩增。由于酶切鉴定是一种可靠的分析重组子的方法,因此,为既

能提高筛选鉴定效率,又可避免假阳性的扩增,在菌落 PCR 的基础上,又对其质粒进行了酶切分析。

在农杆菌介导的遗传转化过程中,一般将植物外植体先在分化培养基上预培养一段时间,感染后进行一定时间的延迟培养再转入含有抗生素的培养基上分化。然而转化时是否预培养以及预培养的时间长短需要根据不同植物、不同外植体而确定。该研究在预试验过程中发现,将矮牵牛叶片进行预培养后,其切口会较快愈合,感染效率很低,可能的原因在于农杆菌主要是通过伤口感染植物细胞的,切口的较快愈合导致了感染效率降低。因此,试验中将外植体切下后直接进行感染。另外,在共培养后的分化培养基中立即加入了筛选抗生素,这种方法虽然对植物细胞会产生部分伤害,但能够相应减少后期筛选的工作量。

Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *NHX* 的表达模式因植物类型和物种差异而有所不同^[1,8],但其产物 *NHX* 蛋白普遍具有调节细胞内 pH、将胞液中 Na^+ 和(或) K^+ 区隔化到液泡中维持细胞内离子稳态等多种功能,在植物抗逆胁迫中有重要作用^[4-5],转不同来源的 *NHX1* 能够显著提高不同植物的耐盐性^[3,9]。试验中获得了转碱菟 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *TvNHX1* 的矮牵牛植株,对其耐盐碱性的评价和检测正进行中,以期选出耐盐碱性较高的矮牵牛新种质。

Transformation of *Petunia hybrida* with *TvNHX1* Gene

CUI Ji-zhe, QIAO Lei, MI Xiao-ju, FU Yin-sheng, LI Xiang, YANG Hui

(Life Science and Technology College of Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025)

Abstract: In order to obtain new germplasm of saline-alkaline tolerance *Petunia hybrida*, improve its adaptability in the saline area, taking varieties of *Petunia hybrida* Menghuanlan and Libaozi as test materials, the *TvNHX1* gene construction of plant expression vector and transformation results of *Petunia hybrida* using agrobacterium-mediated method with *TvNHX1* gene were briefly introduced, and the influence of the 6-BA and NAA combinations on *P. hybrid* leaf differentiation were analyzed. The result of *Bam*HI/*Sac*I double enzyme identification showed that there was a single band in 1 640 bp or so, which was consistent with the expected. It proved that pBI121-*TvNHX1* building success. In different concentration hormone combinations of medium, the differentiation rate of Menghuanlan was higher than that of Libaozi. The differentiation rate of Menghuanlan was 90.69% in 6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Taking leaves of Menghuanlan as explants to induced root, got 12 seedlings of normal rooted *P. hybrid* in screening medium. Kan resistant plant and the non-transgenic control were PCR detected by *TvNHX1* gene specific primer WFF and JWR1, 7 plants amplified specific bands of 12 resistance plants, which displaying that *TvNHX1* gene had turned into *P. hybrid*.

Key words: *Petunia hybrida*; *TvNHX1* gene; genetic transformation

参考文献:

- [1] Fukuda A, Nakamura A, Hara N, et al. Molecular and functional analysis of rice *NHX*-type Na^+/H^+ antiporter genes[J]. *Planta*, 2011, 233: 195-188.
- [2] 王宁宁. 不同植物来源的 *NHX1* 在拟南芥中的功能分析[D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2009: 23-31.
- [3] Liu Pei, Yang Guodong, Li Hong, et al. Overexpression of *NHX1s* in transgenic *Arabidopsis* enhances photoprotection capacity in high salinity and drought conditions[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2010, 32: 81-90.
- [4] Bassil E, Tajima H, Liang Y C, et al. The *Arabidopsis* intracellular Na^+/H^+ Antiporters *NHX1* and *NHX2* control vacuolar pH and K^+ homeostasis regulate growth[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(9): 3482-3497.
- [5] Wu Chunxia, Gao Xiuhua, Kong Xiangqiang, et al. Molecular cloning and functional analysis of a Na^+/H^+ antiporter gene *ThNHX1* from a halophytic plant *Thellungiella Halophila* [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2009, 27(1): 1-12.
- [6] 陈绍宁, 崔继哲. 快速提取番茄总 DNA 应用于规模化 PCR 检测[J]. *北方园艺*, 2004(3): 46-47.
- [7] Dallas-Yang Q, Jiang G, Sladek F M. Avoiding false positives in colony PCR [J]. *Biotechnology*, 1998, 24(44): 580-582.
- [8] Guan Bo, Hu Youzhen, Zeng Youling, et al. Molecular characterization and functional analysis of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene (*HcNHX1*) from *Halostachys caspica* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38: 1889-1899.
- [9] 陈观平, 往回中, 施农农, 等. Na^+/H^+ 逆向转运蛋白与植物耐盐性关系研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2006, 26(5): 101-106.