

简报

转基因烟草的甘露醇合成和耐盐性

刘俊君 彭学贤* 王海云

(中国科学院微生物研究所植物生物工程实验室 北京 100080)

黄绍兴

(北京农业大学生物学院 北京 100094)

柳维波

(北京林业大学森林生物实验中心 北京 100083)

土壤的盐碱性是世界许多地区限制植物生长和作物产量的主要制约因素。长期的研究发现:在高盐或干旱环境下,大多数植物在细胞质中开始积累一些低分子量的代谢物,如脯氨酸、甜菜碱、糖醇等。这些物质通过维持高的细胞质渗透压,有利于植物在高盐或干旱条件下的水分吸收。通过基因工程手段,影响或改变植物体内的生理代谢途径,使得植物细胞产生和积累不同的低分子量有机化合物,能够有效提高转基因植物的耐盐性^[1-4]。我们在克隆了大肠杆菌糖醇代谢的关键酶——1-磷酸甘露醇脱氢酶基因(mtlD)的基础上^[5],进一步研究了 mtlD 的烟草转化以及转基因烟草的耐盐性。本文报道转基因烟草的甘露醇合成及其高度耐盐性结果。

1 材料与方 法

1.1 材 料

农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404、高等植物表达载体 pBin438^[6]以及烟草品种黄苗榆 (*Nicotiana tabacum* cv. Huangmiaoyu) 由本实验室提供。限制酶及其它核酸修饰酶购自 Promega 公司。寡聚核苷酸引物由本所技术室合成。

1.2 植物表达载体的构建和农杆菌的转化

双元表达载体 pBin438 含有双重增强的 35S 启动子和 TMV 的“ Ω ”片段的翻译增强子^[6]。用 BamH I 和 Sal I 将 mtlD 基因从 pMTD 质粒^[5]中切出后,插到同样酶解的 pBin438 中,得到 mtlD 基因的植物表达载体 pBIMTL (图 1)。双元载体质粒向农杆菌 LBA4404 的直接转化如文献 [7] 所述。

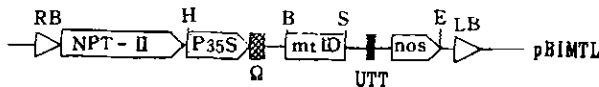


图 1 双元载体 pBIMTL 结构图

1.3 烟草的转化及再生

温室培养的烟草品种黄苗榆植株长到 4~5 叶期时,取叶片按文献 [8] 进行烟草的农杆菌转化。在含卡那霉素 (Kn) 300 μ g/ml 的分化培养基上筛选卡那霉素抗性芽,再将它们转移到含 NaCl 1.0%~2.0% 的无生长调节物质的 MS 培养基中进行进一步的筛选和生根。

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。

* 本文通信联系人。

本文于 1994 年 11 月 30 日收到。

1.4 植物 DNA 分析

植物 DNA 用苯酚/氯仿抽提法提取。以植物总 DNA 为模板,用 35S 启动子序列合成的引物 (5'-CG-TAAGGGATGACGCACA3') 以及 mtID 基因 3' 端的引物 (5'-TGTCGACATTATTGCATTGCTTT-ATAAGC3') 进行 PCR 反应。PCR 产物在 0.8% 琼脂糖胶上电泳检查之后,将胶中 DNA 片段转移至 Z-Probe 膜上,按 Bio-Rad 公司推荐的条件与 ³²P 标记的 mtID 基因片段探针进行杂交。

1.5 转基因植物的 Northern blot 分析

用热酚法^[9]提取植物叶片总 RNA,甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分离 RNA 后,将其转移到尼龙膜上,参照文献 [10],进行 Northern blot 分析,探针同上。

1.6 糖醇测定

从栽培于土壤中的非盐胁迫的转基因烟草上,取第三片叶,加入核糖醇 (1mg/g 鲜重) 作为内标,用甲醇:氯仿:水 (12:5:3) 混合液提取可溶性碳水化合物,并抽真空浓缩体积^[9]。提取液经过盐酸羟胺肟化,再经酷酐衍生化之后,用氯仿萃取。用 BP-20 柱分离,在气相色谱仪 GC-9A (Shimadzu) 上进行色谱分析^[11]。同时,定量称取核糖醇、葡萄糖、甘露醇、山梨醇,制作标准曲线。

2 结果

2.1 烟草的转化、筛选和再生

烟草叶盘与含双元表达载体 pBIMTL 的农杆菌 (*A. tumefaciens*) LBA4404 菌株共培养之后,转化细胞在 Kn 300μg/ml 的分化培养基上筛选。分化产生的 Kn 抗性芽长到 1.5~3.0cm 高时,转移到补充有 1.0%~2.0% NaCl 的生根培养基上,直接进行耐盐性植株筛选。实验发现有的 Kn 抗性芽在含盐生根培养基上继续长高,在两周左右开始生根。而其他的 Kn 抗性芽如同对照一样,虽然个别的芽能稍微伸长一点,但不能生根而停止生长,逐渐发黄,变褐而死亡 (图 2)。在含不同 NaCl 浓度的生根培养基上,Kn 抗性芽生根产生正常植株的再生率不同。随 NaCl 的筛选浓度的提高,正常植株的再生率下降 (表 1)。而且在不同 NaCl 浓度下,虽然再生植株根系的根数无明显差别,但根的生长速度明显不同。在补充有 2.00% NaCl 的生根培养基中,我们没有筛选到生根的正常转化植株。

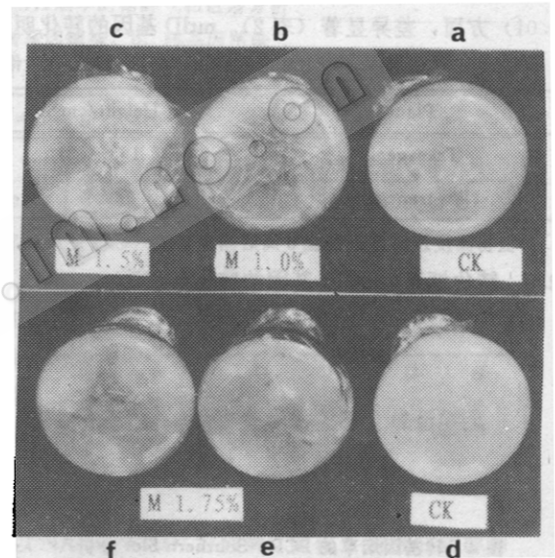


图 2 Kn 抗性芽在含盐生根培养基上的生根培养基中含 NaCl (%) :

a, d. 非转基因 (对照, 1.5), c. 转基因 (1.5);
b. 转基因 (1.0); e, f. 转基因 (1.75)

表 1 Kn 抗性芽在含 NaCl 生根培养基上的再生率

NaCl/%	Number of rooting shoots			Number of non-rooting shoots	Regeneration rate/%
	N	I	IS		
1.00	16	5	2	9	71.88
1.50	0	16	11	28	49.09
1.75	0	2	16	26	40.91
2.00	0	0	0	50	0.00

当 Kn 抗性芽转种到不含生长调节素但含有不同浓度 NaCl 的 MS 培养基中 35±5 天后,观察到的根的生长情况。N: 根的生长正常,根长约 3cm; I: 受抑制根,长约 1~3cm; IS: 严重受抑根,长 1cm。



图3 转基因烟草和对照在加NaCl水培6周后的形态比较

左: 转基因烟草; 右: 对照 (CK)

在水培液液面部位长出少数几条新根之外, 其它对照均无新根产生, 其中两株已经死亡。而转基因植株在补加NaCl一周之后, 根根系仅出现一些褐点, 在老根褐化的同时, 能在水溶液中生长出新根。茎叶继续生长。加盐水培6周之后, 各转基因株系的生长状态均明显好于对照 (图3)。对各个植株进行鲜重、株高测量, 并对数据进行统计学分析发现: 转基因株系和对照在株高 ($P < 0.001$) 和鲜重 ($P < 0.01$) 方面, 差异显著 (表2)。mtlD基因的转化明显地提高了烟草的耐盐性。

表2 1.75%NaCl存在条件下烟草植株的生长比较

Plant	Height/cm	Fresh weight/g	n
Transgenic	7.19±1.21	8.23±2.35	20
Non-transgenic	3.98±2.1	4.11±2.37	8

植物高度及鲜重于加盐6周后测定。表内数值是±SES平均值。

2.3 转化烟草中 mtlD 基因的整合和表达



图4 转基因烟草的PCR—Southern blot分析
a. 质粒 pBIMTL, b. 非转基因烟草,
c~f. 不同转基因烟草

2.2 mtlD 基因的转化提高了转基因烟草的耐盐性

从含盐生根培养基上获得完整的耐盐性烟草植株。从其中挑选20个正常植株, 置于Hoagland's溶液中进行水培。同时, 挑选8个长势良好, 大小接近的非转化植株作为对照。一周之后, 在Hoagland's溶液中补充1.75%NaCl。此后, 每天补充蒸发掉的水分, 每周换水培液一次。试验观察发现: 补充NaCl一周之后, 对照植株的根系就已经变褐, 并停止生长, 从根尖部分开始死亡。同时茎叶生长停滞, 从下部开始叶片黄化、死亡。6周之后, 除一个对照植株

2.3.1 mtlD 基因的 DNA 分析: 在从1.75%NaCl条件下所得到的正常再生植株中, 我们挑选了4个植株, 进行染色体DNA的PCR测试, 然后对PCR产物进行Southern blot分析。结果表明: 在PCR反应中, 4个植株均能产生1.25kb预期大小的, 能与mtlD基因探针进行特异杂交的DNA片段, 而阴性对照植株中没有杂交带产生 (图4)。这说明, 在这些耐盐性植株的染色体DNA中, mtlD基因得到了整合。

2.3.2 mtlD 基因的 RNA 分析: 从转基因植株中提取总RNA, 进行Northern blot杂交分析 (图5)。在所测试的四个转基因植株中, 在1.5kb位置能看到杂交信号, 而对照植株中没有发现能与mtlD基因杂交的mRNA分子。在四个转基因植株中, 其中两株植物转录产生的特异mRNA比另外两株植物要多。由此表明: 不同转基因烟草中, mtlD基因表达产物有量的差异, 这种差异也许反应了基因在染色体上整合位置或整合拷贝数的不同。



图5 转基因烟草的Northern blot分析
点样为: a. 未转基因植株, b. 不同转基因植株

2.3.3 转基因烟草中甘露醇的合成: 从转基因烟草取顶部第三片叶为材料, 通过气相色谱仪, 进行可溶性碳水化合物测定。图6比较了转基因烟草和对照植株可溶性碳水化合物的色谱图。从中可以发现转基因烟草在甘露醇的保留时间 (约22min) 显示出一个特异的峰, 而对照植株在甘露醇的保留时间没有对

应的峰产生。我们对 8 个对照植株进行测定, 均未发现甘露醇的存在, 而不同的转基因株系含有不同量的甘露醇。其中株系 M4 高达 $3.36 \pm 0.07 \mu\text{mol/g}$ (fwt), 大于各个峰面积总和的 10% (不算内标核糖醇的量)。不同的转基因株系, 甘露醇的含量, 相差达十余倍 (表 3)。

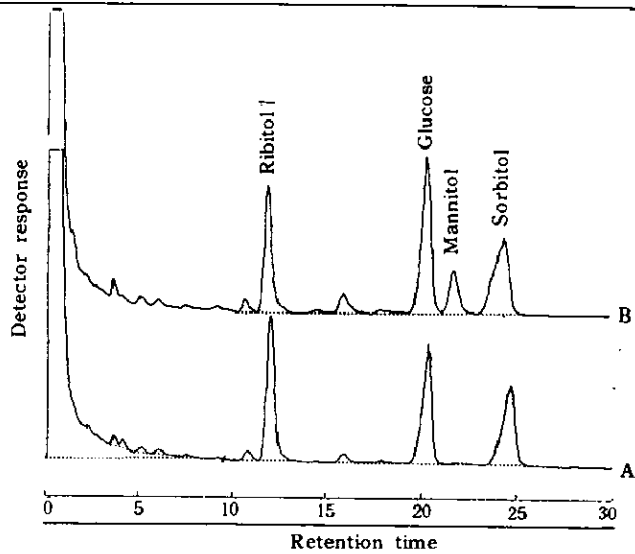


图 6 转基因烟草的糖醇气相色谱分析

a. 非转基因植株, b. 转基因植株

表 3 pBIMTL 转化植株叶片内甘露醇含量

Plant lines	Conc. / $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (fwt)		
	Mannitol	Glucose	Sorbitol
M3	0.69 ± 0.06	10.67 ± 0.75	7.13 ± 0.03
M4	3.36 ± 0.07	12.69 ± 0.18	10.31 ± 0.16
M13	0.43 ± 0.04	8.81 ± 0.09	4.89 ± 0.17
M14	0.33 ± 0.02	9.13 ± 0.11	8.01 ± 0.19

数值是 \pm SES 平均值 ($n=2$)。

这说明, mtID 基因转化烟草之后, 导致了转基因烟草中甘露醇的合成。至于甘露醇合成量的大小与转基因烟草耐盐性的关系, 尚不清楚。

3 讨 论

在大肠杆菌的甘露醇代谢中, 1-磷酸甘露醇脱氢酶以 NADH/NAD⁺ 为辅酶, 催化 1-磷酸甘露醇和 6-磷酸果糖的相互转化。从 PCR-Southern blot 分析和 Northern blot 分析可知: 烟草中原来并不存在编码此酶的 mltD 基因和 mtID 基因的转录产物。同时, 糖醇气相色谱测定也没有发现甘露醇的存在。作为呼吸作用的中间产物 6-磷酸果糖和 NADH 广泛存在于植物细胞中, 在转化了 mltD 基因的烟草中, 该基因编码的 1-磷酸甘露醇脱氢酶可以利用这两种物质, 生成 1-磷酸甘露醇, 最终导致甘露醇的合成。

从糖醇含量测定可以看出, 转基因烟草中新合成的甘露醇含量有限, 它并非调节细胞渗透压的唯一物质。因此, 我们认为甘露醇不完全是作为渗透压调节物质而发挥耐盐性的生理作用。从本文耐盐性试验的观察来看, 在加盐的水培条件下, 转基因烟草根系的损伤明显低于对照, 在高盐 (1.75%) 条件下, 转基因植物能再生新的根系, 而对照几乎不可能。这说明, 甘露醇的存在, 能明显缓解 Na⁺ 对根系的毒害作用; 同时能解除 NaCl 对根分化的抑制作用。因此, 转基因烟草中甘露醇的合成和耐盐性增加之间的关系, 并非一个简单的问题。这有待于从生理代谢、细胞结构、根的形态发生等层次进行深入的研究。

致谢 北京农业大学生物学院阎隆飞教授, 中国科学院微生物研究所莽克强教授对本工作给予极大关怀与支持, 在此深表感谢。

参 考 文 献

- [1] Tarczynski M C, Jensen R C, Bohnert H T *et al.* *Science*, 1993, **259**: 508~510.
- [2] Yuan C X, Bai Y Y. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1993, **19** (30): 306~312.
- [3] Liu J J, Huang S X, Peng X X *et al.* *Abst. The 4th International Congress of Plant molecular Biology, Amsterdam, Abst. No. 1984, 1994.*
- [4] Naakamura T, Ishitani M, Takabe T *et al.* *Abst The 4th International Congress of Plant Molecular Biology, Amsterdam, Abst. No. 1983, 1994.*
- [5] 刘俊君, 彭学贤, 王海云等. *生物工程学报*, 1995, **11** (2): 157~161.
- [6] 李大元, 田颖川, 秦晓峰等. *中国科学 (B辑)*, 1994, **24** (3): 276~282.
- [7] 田颖川, 秦晓峰, 许丙寅等. *生物工程学报*, 1991, **7** (1): 1~10.
- [8] Horsch R B, Fry T E, Hoffmann N L *et al.* *Science*, 1985, **227**: 1229~1231.
- [9] Stanton B G, Robert A S. *Plant Molecular Biology Manual Kluwer Academic Publisher, Dordrecht*, 1988.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Martiasis T *et al.* *Molecular Cloning, A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Lab*, 1989.
- [11] Chen C C., McGinnis G D. *Carbohydr Res*, 1981. **90**: 127.

Mannitol Synthesis and Salt Tolerance of Transgenic Tobacco

Liu Junjun Peng Xuexian Wang Haiyun

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

Huang Shaoxing

(College of Biological Sciences, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

Liu Weibo

(Experimental Center of Forest Biology, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract With *E. coli* mtlD gene (encoding mannitol-1-phosphate dehydrogenase) cloned, sequenced and expressed on high level in bacterium, mtlD gene was inserted into a binary vector containing kanamycin resistant gene. Leaf discs of tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Huangmiaoyu) were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 carrying the chimaeric gene. The resulting Kn-resistant shoots were directly selected and rooted on MS medium lacking growth regulators but containing 1.0%~2.0% NaCl. Twenty transformants were subjected to salt tolerance test in Hegland's solution adding 1.75% NaCl. Statistical analysis documented significant differences between transformants and control in mean height and fresh weight at six weeks after the NaCl addition. Gene integration and expression, verified by analysis of PCR-Southern blot and Northern blot, resulted in mannitol synthesis, on different levels in the detected transgenic plants.

Key words MtlD gene, transgenic tobacco, mannitol synthesis, salt tolerance