



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104830899 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 12

(21) 申请号 201510261591. 2

(22) 申请日 2015. 05. 21

(71) 申请人 兰州理工大学

地址 730050 甘肃省兰州市兰工坪 287 号

(72) 发明人 伍国强 冯瑞军 王锁民 刘左军

包爱科 袁惠君 李善家

(74) 专利代理机构 兰州振华专利代理有限责任
公司 62102

代理人 董斌

(51) Int. Cl.

C12N 15/84(2006. 01)

A01H 5/00(2006. 01)

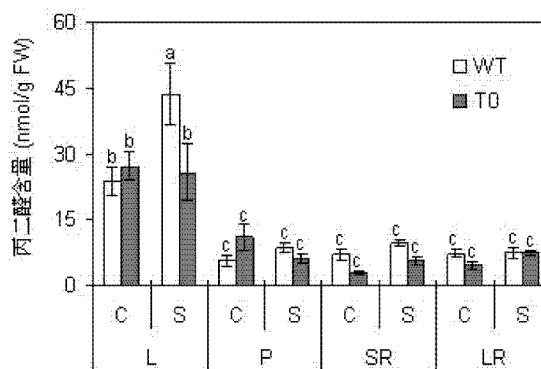
权利要求书1页 说明书9页 附图14页

(54) 发明名称

一种强耐盐抗旱甜菜的培育方法

(57) 摘要

一种强耐盐抗旱甜菜的培育方法,目的是避免传统育种的缺陷以及以往用于单基因转化的技术不足,实现将两个具有协同耐盐抗旱功能的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *ZxNHX*和液泡膜 H^+ -焦磷酸酶基因 *ZxVPI-1*聚合,通过遗传转化获得共表达 *ZxNHX*和 *ZxVPI-1*的转基因甜菜新品种(系),提供一种强耐盐抗旱、高含糖量甜菜的培育方法;其步骤包括幼苗培养、实生苗侵染、分子鉴定和抗逆性评价。该方法大大缩短了转基因幼苗培育时间,整个周期控制在5个月左右,无需通过愈伤组织,且遗传转化效率高达10%,培育的甜菜含糖量明显增加、耐盐抗旱性显著增强。



1. 一种强耐盐抗旱甜菜的培育方法,其特征在于,其步骤为:

(1) 幼苗培养:挑选籽粒饱满、均匀一致的甜菜种子播到预先浇透水的蛭石中,置于暗光下萌发,待至少两片子叶完全露出蛭石后,移至光照下、并浇灌 1/2 Hoagland 营养液培养;

(2) 实生苗侵染:出苗后第 15 d,用无菌手术刀轻轻切除顶芽,留下 2 片子叶,伤口处用浸泡过携带 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 基因的根癌农杆菌菌液的脱脂棉包裹,菌液的 $OD_{600}=0.6-0.8$,每隔 0.5 h 用注射器将农杆菌菌液注射至脱脂棉上,以维持脱脂棉湿润,将侵染的甜菜幼苗置于暗光下,使伤口与根癌农杆菌充分接触 3 h 后去除脱脂棉,将侵染幼苗置于正常光照下培养;侵染后第 5 d 伤口处重新长出幼芽,15 d 长出第 2 层真叶;

(3) 分子鉴定:步骤(2)所述甜菜侵染幼苗,经 PCR 和 RT-PCR 鉴定, *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 基因已整合到甜菜基因组,转化效率高达 10%,获得 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 基因共表达的甜菜植株;

(4) 耐盐抗旱性评价:步骤(3)所述转基因植株分别用 400 mmol/L NaCl、-1.0 MPa 渗透胁迫处理 8d、5 d 后取样,采用火焰分光光度法、比色法和茚三酮法分别测定 Na^+ 、可溶性糖和脯氨酸含量,鉴定其耐盐抗旱性;与野生型相比,盐胁迫下转基因植株叶和叶柄的 Na^+ 增加了 28% 和 15%,脯氨酸浓度增加了 70% 和 55%,块根中蔗糖、果糖和葡萄糖含量分别增加了 25%、29% 和 26%;渗透胁迫下转基因植株叶和叶柄中 Na^+ 浓度分别提高了 17% 和 51%,脯氨酸分别增加了 40% 和 58%,块根中蔗糖含量增加了 15%,叶柄中葡萄糖增加了 60%。

一种强耐盐抗旱甜菜的培育方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及强耐盐抗旱甜菜的培育方法。

背景技术

[0002] 干旱和土壤盐碱化是限制农作物生长和产量的两个最主要的环境因子 (Zhu JK. 2001. *Plant Sci.* 6: 66-71)。据统计,我国是世界上干旱最为严重的国家之一,尤其西北干旱和半干旱地区约占我国国土总面积的 50.8% (山仑. 2005. *求是杂志*. 22: 42-43)。而且,随着温室 CO₂ 的排放,全球气温逐年递增,致使一些半湿润土地也演化为干旱地区,甚至导致在一些原本适应干旱地区的植物绝产。此外,由于高温干燥,土壤水分蒸发强烈,因不适当的耕作方式和管理方法,大面积灌溉导致很多可耕种土地普遍积盐,导致每年约有 1000 万公顷的土地由于土壤的次生盐渍化而丢弃 (Hu Y and Schmidhalter U. 2005. *J Plant Nutr Soil Sci.* 168: 541-549)。然而,随着每年世界人口的迅速增长,粮食需求和水资源短缺日益严重。因此,在可耕种土地逐年退化的背景下,对干旱半干旱地区以及盐碱地的开发利用显得愈加紧迫。

[0003] 目前,对干旱、盐碱化可耕种土地的开发利用主要是种植一些主根明显,根系发达的较耐盐、抗旱农作物,如紫花苜蓿、红豆草等,但这不能从根本上利用干旱和盐渍化土地。而且,全球 99% 的植物种类,尤其是农作物对干旱和盐渍环境的耐受性都不强 (Flowers T J and Colmer T D. 2008. *New Phytol.* 179(4): 945-963),这在很大程度上限制了农作物的大面积种植。因此,增强农作物的耐盐抗旱性是解决粮食危机的重要手段和大量开发利用干旱盐渍土地资源的重要途径之一,也是目前生物技术发展所迫切解决的关键问题。然而,目前农作物抗逆性的改良主要依赖于传统育种,但由于育种周期长、成功几率小的缺陷,而且亲本遗传物质的杂合性以及优良性状的限制,给育种工作者造成很大的困难。庆幸的是,利用基因工程技术可以克服传统育种的缺陷,能将极端植物(能适应极其干旱或盐碱的植物,如旱生植物、盐生植物等)体内独特抗逆性基因整合到农作物基因组中,突破不同种属间优良抗逆基因转移的障碍,能培育出传统育种方法不能培育的新品种(系)。因此,虽然大多数农作物的种植受到干旱和盐渍环境的限制,但可以利用从适应干旱盐渍生境的植物中挖掘抗逆基因,利用现代基因工程技术改良农作物的抗逆性,使其在干旱以及盐渍化土壤中正常生长,以达到提高农作物产量的目的。

[0004] 大量研究表明,植物在干旱盐渍环境中,植物组织会大量失水,尤其是叶细胞,这将抑制植物的生长和发育,主要表现为抑制光合作用和减少蒸腾速率 (Tahi H, Wahbi S, Wakrim R, Aganchich B, Serraj R, Centritto M. 2007. *Plant Biosyst.* 141: 265-274)。植物为了在逆境中生存,合成大量“兼性”有机溶质,如可溶性糖、脯氨酸、甜菜碱等进行渗透调节,使植物细胞维持较低的渗透势以确保在干旱条件下根系能从土壤中吸收水分 (Szabados L and Savouré A. 2009. *Cell.* 15: 89-97)。然而,合成“兼性”有机溶质,不仅消耗了大量的 C 源和 N 源,增加了细胞内的负荷,而且在合成过程中还需要耗费大量的能量。因此,通过合成有机渗透调节物质增强植物的耐盐抗旱性并不是一种理想的方式。

[0005] Na^+ 是土壤中最丰富的阳离子,其浓度仅次于 Ca^{2+} 。植物在干旱盐渍环境中,能将体内大量 Na^+ 转运至地上部,然而, Na^+ 会危害细胞质内各种代谢酶的活性(Blumwald E. 2000. Curr Opin Cell Biol. 12(4): 431-434)。即便如此,植物在长期进化中,形成了一套能将胞质内过多 Na^+ 区域化至液泡中的载体通道,这样一方面可以减轻过多 Na^+ 对各种代谢酶活性的影响,另一方面,积累在液泡内的 Na^+ 可作为一种廉价的渗透调节剂调节细胞的渗透势,从而使植物更好的适应干旱和盐渍环境。因此,在干旱盐渍化土壤中,将细胞质内 Na^+ 区域化在液泡内是维持植物正常生长最理想的方式。

[0006] 植物细胞内 Na^+ 区域化至液泡主要依赖液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 (vacuolar Na^+/H^+ antiporter, NHX),它利用液泡膜质子转运无机焦磷酸酶 (H^+ -pyrophosphatase, H^+ -PPase) 建立的跨膜质子梯度将细胞质内过多 Na^+ 区域化至液泡中。也有研究表明,超表达拟南芥液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因和 H^+ -焦磷酸酶基因均可以显著增强转基因植物的耐盐性。1999年, Apse等(Apse M P, Aharon G S, Snedden W A. 1999. Science. 285: 1256-1258)将拟南芥液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *AtNHX1*重新导入拟南芥并发生超表达,在 200 mM NaCl 处理下,发现转基因植株积累更多的 Na^+ ,而且仍能正常生长发育,而野生植株型则出现萎蔫。Zhang等(Zhang H, Liu Y X, Xu Y, Chapman S, Xia T. 2012. Plant Cell Tiss Organ Cult. 110: 189-200)将菊花 *DmNHX1*转入拟南芥,发现在盐胁迫下,转基因拟南芥的生长以及根长显著高于野生型植株。Bao等(Bao A K, Wang S M, Wu G Q, Xi J J, Zhang J L, Wang C M. 2009. Plant Sci. 176: 232-240)将拟南芥 *AtVPI*转入紫花苜蓿,发现转基因紫花苜蓿的叶和根中积累了更多的 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} ,维持叶片较低的渗透势,其耐盐性和抗旱性也显著增强。这些结果表明,超表达液泡膜 NHX 或 H^+ -PPase 基因,可以促进转基因植株吸收大量的无机离子,尤其是细胞溶质内具有毒害效应的 Na^+ ,从而使植物在干旱或盐胁迫下,表现出更强的抗旱性和耐盐性。

[0007] 甜菜 (*Beta vulgaris* L.) 为藜科 (*Chenopodiaceae*) 甜菜属 (*Beta*) 二年生草本植物(郑毅, 张景楼, 宁彦东, 张宇航. 2007. 中国甜菜糖业. 4: 20-21),广泛分布于我国西北、华北、东北等干旱半干旱地区(李承业, 王燕飞, 黄润, 董心久. 2010. 中国糖料. 1: 56-58),是我国重要的第二大糖料作物,也是新兴的可再生能源作物,与甘蔗、玉米和甜高粱相比,其在开发燃料乙醇产业方面有着更广阔的应用前景(金明亮和贾海龙. 2011. 中国糖料. 1: 58-66)。但其生理耐盐以及抗旱能力不强,耗水量大,且大多数栽培品种在苗期对干旱和盐较为敏感。因此,培育具有较强耐盐抗旱能力,含糖量高的甜菜新品系已迫在眉睫。这对提高我国糖量作物产量,缓解当地水资源危机,改良和利用大面积盐荒地,促进干旱半干旱地区甜菜产业可持续发展都具有重大的现实意义。

[0008] 长期以来培育抗逆性强、含糖量高等优良性状兼具的甜菜新品(种)系是每一个从事甜菜育种工作者的共同愿望。目前传统甜菜育种主要是选择适应性好、配合力高的自交系作为杂交亲本,连续强制自交的方法选育自交系,然而,由于亲本狭窄的遗传基础增加了甜菜杂交种遭受病虫害侵害的危险性,品种间相近的血缘关系使其基因利用潜力受到很大限制,由此成为提高含糖量以及增强抗逆性的主要障碍。

发明内容

[0009] 本发明的目的是避免传统育种的缺陷以及以往用于单基因转化的技术不足,实现

将两个具有协同耐盐抗旱功能的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *ZxNHX* 和液泡膜 H^+ - 焦磷酸酶基因 *ZxVPI-1* 聚合, 通过遗传转化获得共表达 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 的转基因甜菜新品种 (系), 提供一种强耐盐抗旱、高含糖量甜菜的培育方法。

[0010] 本发明采取的技术方案为: 一种强耐盐抗旱甜菜的培育方法, 其步骤为:

(1) 幼苗培养: 挑选籽粒饱满、均匀一致的甜菜种子播到预先浇透水的蛭石中, 置于暗光下萌发, 待至少两片子叶完全露出蛭石后, 移至光照下、并浇灌 1/2 Hoagland 营养液培养;

(2) 实生苗侵染: 出苗后第 15 d, 用无菌手术刀轻轻切除顶芽, 留下 2 片子叶, 伤口处用浸泡过携带 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 基因的根癌农杆菌菌液的脱脂棉包裹, 菌液的 $\text{OD}_{600}=0.6-0.8$, 每隔 0.5 h 用注射器将农杆菌菌液注射至脱脂棉上, 以维持脱脂棉湿润, 将侵染的甜菜幼苗置于暗光下, 使伤口与根癌农杆菌充分接触 3 h 后去除脱脂棉, 将侵染幼苗置于正常光照下培养; 侵染后第 5 d 伤口处重新长出幼芽, 15 d 长出第 2 层真叶;

(3) 分子鉴定: 步骤(2)所述甜菜侵染幼苗, 经 PCR 和 RT-PCR 鉴定, *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 基因已整合到甜菜基因组, 转化效率高达 10%, 获得 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 基因共表达的甜菜株系;

(4) 耐盐抗旱性评价: 步骤(3)所述转基因植株分别用 400 mmol/L NaCl、-1.0 MPa 渗透胁迫处理 8d、5 d 后取样, 采用火焰分光光度法、比色法和茚三酮法分别测定 Na^+ 、可溶性糖和脯氨酸含量, 鉴定其耐盐抗旱性。与野生型相比, 盐胁迫下转基因植株叶和叶柄的 Na^+ 增加了 28% 和 15%, 脯氨酸浓度增加了 70% 和 55%, 块根中蔗糖、果糖和葡萄糖含量分别增加了 25%、29% 和 26%; 渗透胁迫下转基因植株叶和叶柄中 Na^+ 浓度分别提高了 17% 和 51%, 脯氨酸分别增加了 40% 和 58%, 块根中蔗糖含量增加了 15%, 叶柄中葡萄糖增加了 60%。

[0011] 本发明在对干旱盐渍生境具有强抗性的物种中挖掘独特的抗性基因资源、利用现代分子技术用于对农作物抗逆性遗传改良的认识下, 利用生长在极度干旱和盐碱化地区的荒漠旱生植物霸王液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *ZxNHX* 以及 *ZxVPI-1* 同时导入到甜菜基因组中, 并发生超表达, 获得具有耐盐抗旱性强, 含糖量高的甜菜新品系。本发明提供的方法所培育的甜菜具有极强的耐盐抗旱性, 较高的含糖量。

附图说明

[0012] 图 1、图 2、图 3、图 4、图 5、图 6 为根癌农杆菌介导 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 基因的甜菜幼苗遗传转化流程; 图 7 为转基因甜菜 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 基因整合基因组的 PCR 检测, “M” 代表 DNA marker, “+” 代表阳性对照 (根癌农杆菌 GV3101 菌体), “-” 代表阴性对照 (未转化植株); 1-15 泳道均为 *ZxNHX-ZxVPI-1* 共转化株系; 图 8 为 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 基因在转基因甜菜株系中的表达图谱, “+” 代表阳性对照 (根癌农杆菌 GV3101 菌体), “-” 代表阴性对照 (未转化植株); 1-15 泳道均为 *ZxNHX-ZxVPI-1* 共转化株系, *ACT1M* 作为内参基因; 图 9 为盐胁迫 8 d 对甜菜转基因株系 (T_0) 和野生型株系 (WT) 生长形态示意图; 图 10 为盐胁迫 8 d 对甜菜转基因株系 (T_0) 和野生型株系 (WT) 鲜重, 图 11 为干重, 图 12 为组织含水量的影响; 数值为平均值 $\pm SE$ ($n=6$); 柱子上不同字母代表在 $P<0.05$ 水平上差异显著 (Duncan 检验)。图中 C 和 S 分别代表“对照组”和“400 mmol/L 处理”; L、P、SR 和 LR 分别代表叶、叶柄、贮藏根和侧根。图 13 为盐胁迫 8 d 对甜菜转基因株系 (T_0) 和野生型株系 (WT) 丙二

醛含量的影响;数值为平均值 $\pm SE(n=6)$ 。柱子上不同字母代表在 $P<0.05$ 水平上差异显著 (Duncan 检验);图中 C 和 S 分别代表“对照组”和“400 mmol/L 处理”;L、P、SR 和 LR 分别代表叶、叶柄、贮藏根和侧根。图 14 为盐胁迫 8 d 对甜菜转基因株系 (T_0) 和野生型株系 (WT) Na^+ 、图 15 的 K^+ (b) 和图 16 的 Ca^{2+} 浓度的影响;数值为平均值 $\pm SE(n=6)$ 。柱子上不同字母代表在 $P<0.05$ 水平上差异显著 (Duncan 检验)。图中 C 和 S 分别代表“对照组”和“400 mmol/L 处理”;L、P、SR 和 LR 分别代表叶、叶柄、贮藏根和侧根。图 17 为盐胁迫 8 d 对甜菜转基因株系 (T_0) 和野生型株系 (WT) 渗透势影响。数值为平均值 $\pm SE(n=6)$ 。柱子上不同字母代表在 $P<0.05$ 水平上差异显著 (Duncan 检验);图中 C 和 S 分别代表“对照组”和“400 mmol/L 处理”;L、P、SR 和 LR 分别代表叶、叶柄、贮藏根和侧根。图 18 为盐胁迫 8 d 对甜菜转基因株系 (T_0) 和野生型株系 (WT) 蔗糖、图 19 的果糖和图 20 的葡萄糖积累的影响;数值为平均值 $\pm SE(n=6)$ 。柱子上不同字母代表在 $P<0.05$ 水平上差异显著 (Duncan 检验)。图中 C 和 S 分别代表“对照组”和“400 mmol/L 处理”;L、P、SR 和 LR 分别代表叶、叶柄、贮藏根和侧根。图 21 为盐胁迫 8 d 对甜菜转基因株系 (T_0) 和野生型株系 (WT) 脯氨酸积累的影响;数值为平均值 $\pm SE(n=6)$ 。柱子上不同字母代表在 $P<0.05$ 水平上差异显著 (Duncan 检验)。图中 C 和 S 分别代表“对照组”和“400 mmol/L 处理”;L、P、SR 和 LR 分别代表叶、叶柄、贮藏根和侧根。图 22 为渗透胁迫 5 d 对甜菜转基因株系 (T_0) 和野生型株系 (WT) 生长,图 23 的鲜重和图 24 的组织含水量的影响;数值为平均值 $\pm SE(n=6)$ 。柱子上不同字母代表在 $P<0.05$ 水平上差异显著 (Duncan 检验)。图中 C 和 O 分别代表“对照组”和“渗透胁迫”;L、P、SR 和 LR 分别代表叶、叶柄、贮藏根和侧根。图 25 为渗透胁迫 5 d 对甜菜转基因株系 (T_0) 和野生型株系 (WT) Na^+ 、图 26 的 K^+ 和图 27 的 Ca^{2+} 的影响;数值为平均值 $\pm SE(n=6)$ 。柱子上不同字母代表在 $P<0.05$ 水平上差异显著 (Duncan 检验)。图中 C 和 O 分别代表“对照组”和“渗透胁迫”;L、P、SR 和 LR 分别代表叶、叶柄、贮藏根和侧根。图 28 为渗透胁迫 5 d 对甜菜转基因株系 (T_0) 和野生型株系 (WT) 蔗糖、图 29 的果糖和图 30 的葡萄糖积累的影响;数值为平均值 $\pm SE(n=6)$ 。柱子上不同字母代表在 $P<0.05$ 水平上差异显著 (Duncan 检验)。图中 C 和 O 分别代表“对照组”和“渗透胁迫”;L、P、SR 和 LR 分别代表叶、叶柄、贮藏根和侧根。图 31 为渗透胁迫 5 d 对甜菜转基因株系 (T_0) 和野生型株系 (WT) 脯氨酸积累的影响。数值为平均值 $\pm SE(n=6)$ 。柱子上不同字母代表在 $P<0.05$ 水平上差异显著 (Duncan 检验)。图中 C 和 O 分别代表“对照组”和“渗透胁迫”;L、P、SR 和 LR 分别代表叶、叶柄、贮藏根和侧根。

具体实施方式

[0013] 本发明是一种强耐盐抗旱甜菜的培育方法,其步骤为:

(1) 幼苗培养:挑选籽粒饱满、均匀一致的甜菜种子播到预先浇透水的蛭石中,置于暗光下萌发,待至少两片子叶完全露出蛭石后,移至光照下、并浇灌 1/2 Hoagland 营养液培养;

(2) 实生苗侵染:出苗后第 15 d,用无菌手术刀轻轻切除顶芽,留下 2 片子叶,伤口处用浸泡过携带 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 基因的根癌农杆菌菌液的脱脂棉包裹,菌液的 $OD_{600}=0.6-0.8$,每隔 0.5 h 用注射器将农杆菌菌液注射至脱脂棉上,以维持脱脂棉湿润,将侵染的甜菜幼苗置于暗光下,使伤口与根癌农杆菌充分接触 3 h 后去除脱脂棉,将侵染幼苗置于正常光照下

培养;侵染后第 5 d 伤口处重新长出幼芽,15 d 长出第 2 层真叶;

(3) 分子鉴定:步骤(2)所述甜菜侵染幼苗,经 PCR 和 RT-PCR 鉴定, *ZxNHX*和 *ZxVPI-1* 基因已整合到甜菜基因组,转化效率高达 10%,获得 *ZxNHX*和 *ZxVPI-1*基因共表达的甜菜株系;

(4)耐盐抗旱性评价:步骤(3)所述转基因植株分别用 400 mmol/L NaCl、-1.0 MPa 渗透胁迫处理 8d、5 d 后取样,采用火焰分光光度法、比色法和茚三酮法分别测定 Na^+ 、可溶性糖和脯氨酸含量,鉴定其耐盐抗旱性。与野生型相比,盐胁迫下转基因植株叶和叶柄的 Na^+ 增加了 28% 和 15%,脯氨酸浓度增加了 70% 和 55%,块根中蔗糖、果糖和葡萄糖含量分别增加了 25%、29% 和 26%;渗透胁迫下转基因植株叶和叶柄中 Na^+ 浓度分别提高了 17% 和 51%,脯氨酸分别增加了 40% 和 58%,块根中蔗糖含量增加了 15%,叶柄中葡萄糖增加了 60%。

[0014] 在以上所述的培育方法中,步骤(2)所述的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *ZxNHX* 和液泡膜 H^+ - 焦磷酸酶基因 *ZxVPI-1* 均来自对荒漠极端环境具有很强适应性的中国特有种属植物霸王。

[0015] 在以上所述的培育方法中,步骤(2)所述的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *ZxNHX* 和液泡膜 H^+ - 焦磷酸酶基因 *ZxVPI-1* 由同一载体携带,通过一次转化到甜菜增殖细胞中。

[0016] 在以上所述的培育方法中,步骤(3)所述的响应盐和干旱胁迫的具体生理适应机制,主要包括 Na^+ 、 K^+ 、脯氨酸和可溶性糖,它们是目前公认的评价植物耐盐抗旱性的主要生理指标。

[0017] 以下对本发明的方法和原理进行描述,所列步骤只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。

[0018] 实施例 1:农杆菌介导 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 基因遗传转化甜菜,见图 1~ 图 6:

根癌农杆菌介导的基因遗传转化是目前最常用、研究最多、也是技术最成熟的方法。早在 1974 年,Zeanen 等发现根瘤农杆菌在侵染植物时,可将其质粒上的一段 DNA 插入到植物基因组中,进而引起植物遗传特性的变化,这一发现为农杆菌介导将外源基因转化到植物基因组中提供了依据。此后,人们利用根瘤农杆菌的天然载体系统,通过侵染特定的植物细胞,将目的基因导入基因组中,并借助细胞培养技术获得转基因株系,实现外源基因遗传转化的目的(Hood 等,1993)。目前,根癌农杆菌介导外源基因对大多数双子叶植物的遗传转化以获得成功,如烟草、马铃薯、番茄、茄子、大豆和拟南芥等,而且其介导单子叶植物的遗传转化也取得了一定的进展,如水稻、玉米、小麦等(徐春晖等,2002)。然而,对于异花授粉以及杂交不亲和特性的甜菜而言、很多重要的甜菜品种都受到基因遗传转化的限制,而且高效的遗传转化强烈依赖于不同的甜菜基因型。本发明所供试的甜菜品种“甘糖 7 号”是我国西北干旱半干旱地区广泛种植的品种,但其抗旱耐盐能力有限,而且在育种以及基因转化方面有很大的技术空缺。因此,针对其在幼苗生长阶段的特性,以实生苗为受体,建立了一套高效基因遗传转化的体系,不仅为基因转化较顽固的甜菜品种提供了技术支持,而且为利用独特抗逆基因资源增强甜菜抗逆性以及糖产量提供了理论依据。

[0019] 具体的遗传转化过程如下:

(1) 挑选籽粒饱满,均匀一致的甜菜种子播种到预先浇灌湿润的蛭石中,放置在黑暗条件下,直到种子萌发并两片子叶完全露出土壤表面时,移放到光照条件下培养,并浇灌 1/2 Hogland 营养液(2 mmol/L KNO_3 , 0.5 mmol/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.25 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1

mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mmol/L Fe-citrate, 92 mmol/L H_3BO_3 , 18 $\mu\text{mol/L}$ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.6 $\mu\text{mol/L}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.6 $\mu\text{mol/L}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.7 $\mu\text{mol/L}$ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。培养室昼夜温度为 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$ / $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 光强约 $600 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 空气相对湿度为 60%-80%。

[0020] (2) 在 (1) 条件下培养的甜菜幼苗, 直到 15 d 时 (图 1), 用无菌蒸馏水冲洗叶片表面, 以去除叶片表面的灰尘。然后用无菌手术刀轻轻切除顶芽, 只留下 2 片子叶 (图 2), 伤口用浸泡过农杆菌的无菌脱脂棉包裹 (图 3), 并定期用注射器将携带 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 载体的农杆菌菌液 ($\text{OD}_{600}=0.6-0.8$) 注射至脱脂棉上, 以维持脱脂棉湿润, 野生对照组用无菌水代替农杆菌菌液侵染。将侵染的甜菜幼苗置于黑暗条件下, 使伤口与根癌农杆菌充分接触 3 h 后去除脱脂棉, 并将植物材料放置于正常光照条件下培养。5 d 后切口处重新长出新的顶芽 (图 4), 15 d 长出第 2 层真叶 (图 5), 此时将开始保留的 2 片子叶切除, 并将其转移到装有蛭石的塑料盆 (高度 11 cm × 直径 10 cm) 中培养, 直到 30 d, 侵染幼苗长出了第 3 层真叶 (图 6), 共侵染 400 株甜菜幼苗。

[0021] 实施例 2: 转基因甜菜株系目的基因的 PCR 检测, 见图 7- 图 8:

农杆菌介导外源基因对植物的遗传转化, 主要是通过带有目的基因的农杆菌菌液与植物生殖细胞接触, 利用农杆菌的天然侵染特性, 把外源目的基因转入植物外植体。然而, 农杆菌介导的外源基因能否成功的转化到植物体内, 需要转基因植株提供分子水平上的证据, 是基因转化不可缺少的一个步骤, 也是确定目的基因是否发生转化的最有效手段 (王关林等, 2002)。

[0022] 由于细胞壁以及植物细胞内特有物质的干扰, 从植物中分离高产量和高质量的 DNA 和 RNA 并不是很容易的事。因此, 在选取材料时, 应尽可能的选择处于生长旺盛期的幼嫩组织, 如新鲜的叶片就是十分理想的材料, 此时组织中蛋白质、多糖及酚类化合物都较少, 并且由于多数细胞处于正在分裂期, 提取的 DNA 产量也会有所提高。其具体的检测步骤如下:

(1) 转基因甜菜株系目的基因 PCR 检测:

为获得高质量和纯度较高的 DNA, 以新鲜的幼嫩叶片为材料, 采用上海生工“Ezup 柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒”提取 DNA。分别用目的基因 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 的两对特异性引物:

P1 (5' -GGATCCTGAGGATTGACTCGGAAAGG-3') 和

P2 (5' -CGATTGTCGACCAGGCACGAAGATCTG-3');

P3 (5' -CCATGGTTGTGAAGATGGGTCAGGTGAAAGATAGCC-3') 和

P4 (5' -TTACCGTGTATGTGTAGACTGTAGAGCAATGGC-3'), 以叶基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 反应, 扩增目的基因。

[0023] 结果表明, 在侵染 400 株甜菜幼苗中, 在 40 个株系中扩增到了长度分别为 504 bp (*ZxNHX*) 和 471 bp (*ZxVPI-1*) 的特异性条带, 图 7 中仅显示在 80 个株系中, 随机 15 个株系的 PCR 扩增电泳图谱。表明 *ZxNHX* 及 *ZxVPI-1* 基因已经被整合到这些株系的基因组中, 转化效率为 10%。

[0024] (2) 转基因甜菜株系半定量表达图谱:

外源基因能否在转基因植物中发挥其生理学功能, 关键在于其能否在植物体内正确表

达。因此,为检测 *ZxVPI-1* 及 *ZxNHX* 在转基因株系中的表达,以新鲜叶片为材料,采用上海生工“Trizol 总 RNA 提取试剂盒”提取总 RNA,用随机引物反转录成 cDNA 为模板,分别用 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 特异性引物进行 PCR 反应,扩增目的基因。结果表明,在所有 40 个转基因株系中,目的基因 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 均能稳定表达(图 8)。

[0025] 实施例 3:耐盐含糖量高的转基因甜菜新品系的生理学分析,见图 9~图 21:

高浓度盐可对植物造成离子胁迫和渗透胁迫,严重影响植物正常的生理生化反应,导致植物生长缓慢甚至死亡。在步骤 2 中尽管检测到目的基因 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 已整合到甜菜基因组中,并发生超表达,然而能否提高盐渍环境下甜菜的产量、表型性状以及耐盐性是最为关注的焦点,也是本发明最终要实现的目标。因此,本发明通过挑选长势相同、目的基因 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 表达一致的转基因(T0)和野生型(WT)甜菜株系,用含 400 mmol/L NaCl 的 1/2 Hogland 营养液分别处理转基因和野生型甜菜株系,未加 NaCl 的营养液处理作为对照组,处理液每隔 2 d 更换一次,每个处理 6 个重复,处理 8 d 后取样测定相关的生理指标。其主要的结果如下:

(1) 转基因株系增强甜菜的耐盐性:

如图 9 所示,在未加盐处理下,转基因和野生型甜菜均生长良好,但转基因甜菜生长似乎优于野生型;然而,在 400 mmol/L NaCl 处理下,野生型甜菜株系叶片出现萎蔫、甚至死亡症状,严重抑制甜菜的生长,而转基因甜菜株系仍能维持正常的生长。

[0026] 进一步结果显示,在未加盐处理下,与野生型株系(WT)相比,转基因甜菜株系(T0)均增加了叶、叶柄的鲜重和干重(图 10、图 11),然而与野生型株系(WT)相比,在盐处理下转基因甜菜除增加叶鲜重,降低细胞膜受损程度(图 13)外,还能维持叶和叶柄较高的组织含水量(图 12)。由此可见,无论在正常还是盐处理下,转基因甜菜除增加叶和叶柄的产量之外,还增强了甜菜的耐盐性。

[0027] (2) 转基因甜菜积累了更多的 Na^+ :

由图 14~图 16 可见,与对照(未加盐)相比,400 mmol/L NaCl 处理使甜菜叶、叶柄、贮藏根和侧根中的 Na^+ 浓度分别增加了 4.3、5.7、7.2 和 2.9 倍(图 14); Ca^{2+} 浓度分别增加了 2.0、2.1、1.5 和 1.6 倍(图 16);相反,叶、侧根中的 K^+ 浓度却分别下降了 29.8% 和 37%,但在叶柄和侧根中的 K^+ 浓度却没有显著性差异(图 15)。然而,在 400 mmol/L NaCl 处理下,与野生型(WT)相比,转基因甜菜株系(T0)叶、叶柄中 Na^+ 浓度分别增加 28.3% 和 15.4% (图 14);更为关注的是,叶中 K^+ 浓度显著增加了 45.4% (图 15)。

[0028] 以上结果表明,在盐处理下,与野生型甜菜(WT)相比,转基因甜菜叶和叶柄中积累更多的 Na^+ ,这很可能是 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 基因的超表达增强了转基因甜菜 Na^+ 的区域化能力,使其在盐胁迫下积累了更多的 Na^+ ,进而维持叶细胞中 K^+ 的稳态平衡。

[0029] (3) 转基因甜菜降低了叶和叶柄的渗透势:

由图 17 可知,在盐处理下,甜菜叶、叶柄、贮藏根和侧根中渗透势分别降低了 59.9%、47.4%、23.7% 和 38.4%。然而,在 400 mmol/L NaCl 处理下,与野生型(WT)相比,转基因甜菜株系(T0)叶、叶柄中渗透势分别降低了 42.9% 和 29.6%,但贮藏根和侧根却没有显著性差异。

[0030] (4) 转基因甜菜积累更多的蔗糖、果糖和葡萄糖含量:

由图 18~图 20 可见,无论在正常条件还是盐处理下,甜菜体内 50~60% 的蔗糖、果糖以

及葡萄糖均积累在贮藏根中。与对照(未加盐)相比,400 mmol/L NaCl 处理 7 d,除侧根中的蔗糖小幅度的降低之外,在叶、叶柄、贮藏根和侧根中的蔗糖、果糖、葡萄糖均没有显著性差异。与野生型(WT)相比,在未加盐还是在盐处理下,转基因甜菜株系(T0)贮藏根中均积累了更多的蔗糖、果糖和葡萄糖含量。这很可能是 *ZxNHX*和 *ZxVPI-1*基因超表达将叶细胞质内更多的 Na^+ 区域化在液泡内,降低了胞质内 Na^+ 的毒害,减少了蔗糖、果糖和葡萄糖从叶向贮藏根转运的有害影响,从而使贮藏根积累更多的糖。

[0031] (4) 转基因甜菜积累了更多的脯氨酸

与对照(未加盐)相比,400 mmol/L NaCl 处理显著增加了甜菜叶、叶柄和贮藏根的脯氨酸浓度。与野生型(WT)相比,在盐处理下,转基因甜菜株系叶、叶柄中的脯氨酸浓度分别增加了 69.7% 和 55.1%,而贮藏根和侧根却没有显著性差异(图 21)。由此可见,转基因甜菜通过积累大量的游离脯氨酸,一方面用于调节细胞内的渗透势,另一方面可能用于清除由盐胁迫诱导的活性氧自由基。

[0032] 实施例 4:转基因甜菜新品系抗寒性的分析,见图 22-图 31。

[0033] (1) 转基因株系增强了甜菜的抗旱性

由图 22 可见,在对照条件下,转基因(T0)和野生型(WT)甜菜株系均生长良好,但转基因甜菜的长势明显优于野生型。然而-1.0 MPa 干旱胁迫 5 d 后,转基因甜菜比野生型植株表现出更强的抗旱性:转基因甜菜仍能维持正常的生长,但野生型植株的生长却严重受抑,大部分叶片出现萎蔫,甚至死亡的症状)。

[0034] 进一步的结果表明,在渗透胁迫下,转基因和野生型甜菜的鲜重均呈现下降的趋势,但野生型甜菜植株的下降速率更快,分别为 41.1% 和 53.3% (图 23);同样,干旱也导致转基因和野生型甜菜植株的组织含水量显著降低,而转基因甜菜的组织含水量显著高于野生型,其水分含量是野生型的 1.4 倍(图 24)。由此可见,在干旱胁迫下,转基因甜菜能维持体内更高的水分含量,具有较强的渗透调节能力,在逆境胁迫下具有较强的保水力,从而表现出更强的抗旱性。

[0035] (2) 转基因甜菜株系积累更多的 Na^+

由图 25~图 27 可以看出,在正常条件下,甜菜叶、叶柄中均积累了大量的 Na^+ ,分别占总 Na^+ 的 53.9% 和 26.4%;相比之下,叶和叶柄中 K^+ 分别占总 K^+ 的 31.5% 和 40.1%。然而,渗透胁迫导致叶、叶柄和侧根中 K^+ 显著下降了 26.5%、17.6% 和 29.3%,但所有组织的 Na^+ 和 Ca^{2+} 均没有显著差异。

[0036] 与野生型相比,在渗透胁迫下,转基因甜菜叶和叶柄中 Na^+ 分别增加了 16.9% 和 50.7%;叶中 Ca^{2+} 增加了 60%,然而 K^+ 在所有组织均没有显著性差异(图 26)。以上结果表明,*ZxNHX*和 *ZxVPI-1*基因超表达使转基因甜菜叶和叶柄细胞质内更多 Na^+ 区域至液泡中,在干旱胁迫下诱导了更多 Ca^{2+} 的积累。

[0037] (3) 转基因甜菜株系积累更多的蔗糖、果糖和葡萄糖含量

由图 28~图 30 可见,在正常条件或干旱胁迫下,甜菜贮藏根中均积累了大量的蔗糖、果糖和葡萄糖,但在叶柄中的葡萄糖含量似乎与贮藏根的等同。在渗透胁迫下,除贮藏根的蔗糖含量有小幅增加之外,其他所有组织的糖含量均没有显著性差异;然而,与野生型相比,转基因甜菜贮藏根中的蔗糖含量显著增加了 15%,叶柄中葡萄糖含量增加了 60%。

[0038] 这些结果表明,短期干旱胁迫对甜菜蔗糖、果糖和葡萄糖的含量没有影响,而

*ZxNHX*和 *ZxVPI-1*基因的超表达能促进转基因甜菜积累更多的蔗糖、葡萄糖。

[0039] (4) 转基因甜菜株系积累了更多的脯氨酸

由图 31 可见,与对照相比,在渗透胁迫下,甜菜叶、叶柄中的脯氨酸浓度分别增加了 2.8 和 3.9 倍,贮藏根和侧根却没有显著性差异。然而,与野生型植株相比,渗透胁迫下转基因甜菜叶和叶柄中的脯氨酸浓度分别增加了 39.6% 和 57.8%。由此可见,脯氨酸作为关键的胞内渗透调节物质,在甜菜叶和叶柄在适应干旱的调节机制中起着至关重要的作用;转基因甜菜叶和叶柄通过积累更多的脯氨酸,主要用于调节细胞内渗透势,使其在干旱条件下吸收更多的水分,以维持植物正常的新陈代谢。



图 1

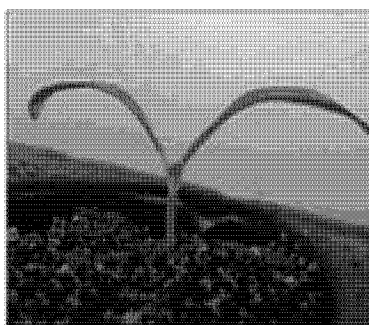


图 2

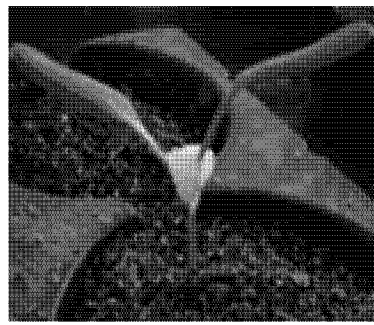


图 3

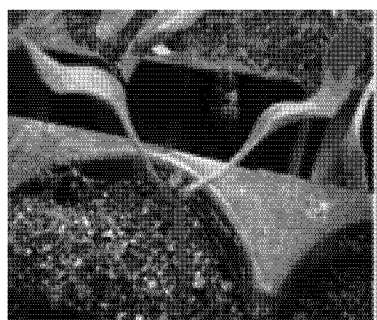


图 4

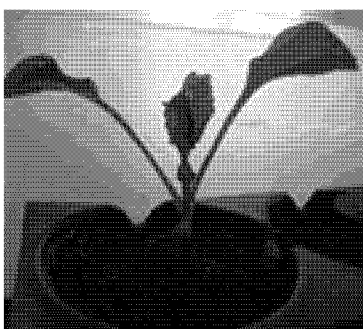


图 5

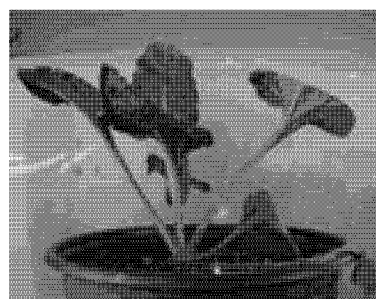


图 6

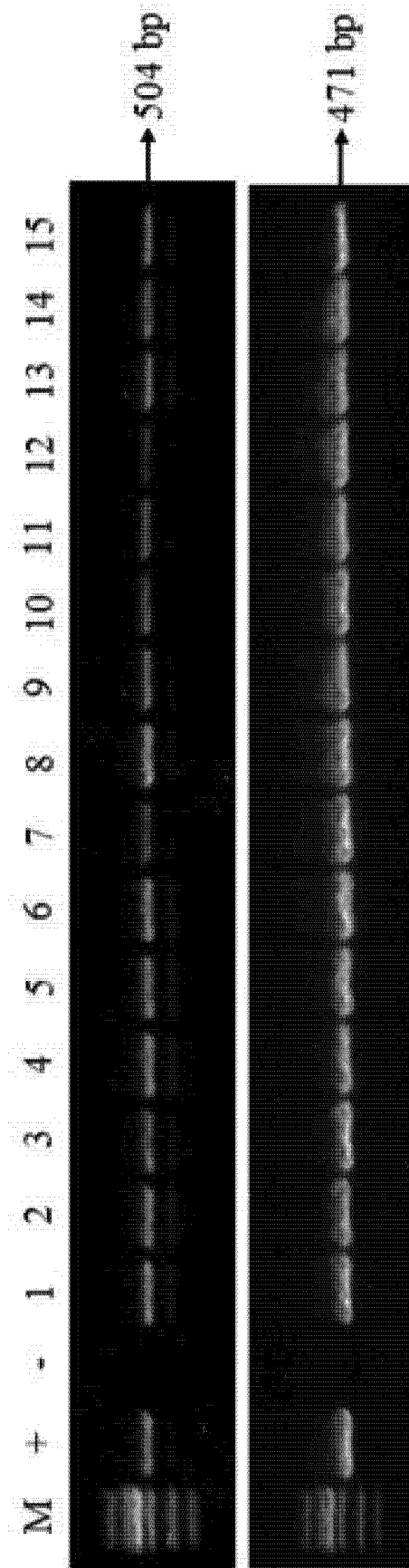


图 7

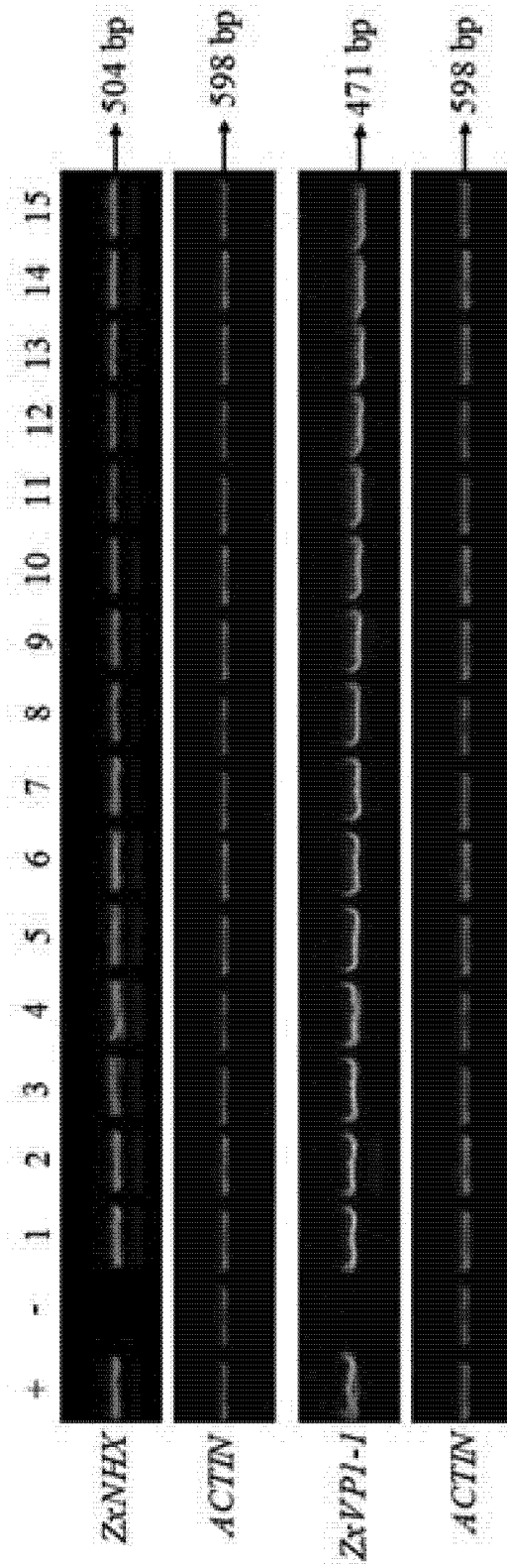


图 8

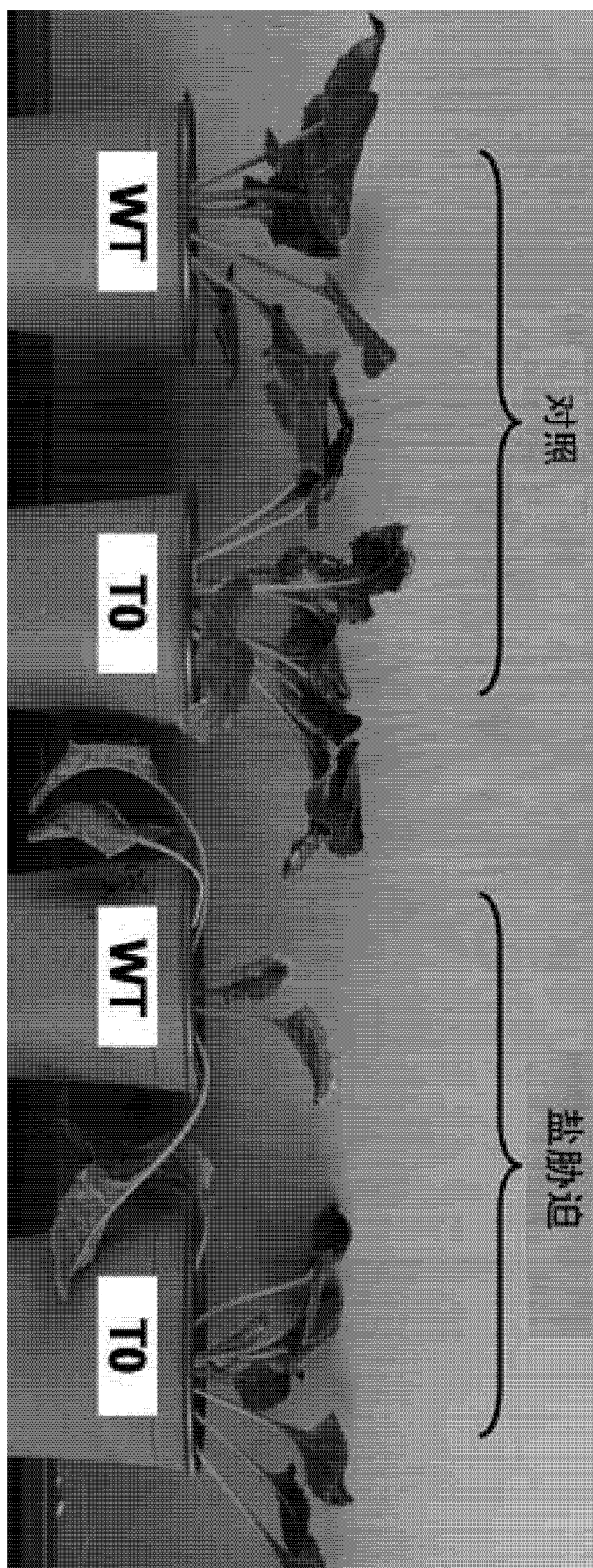


图 9

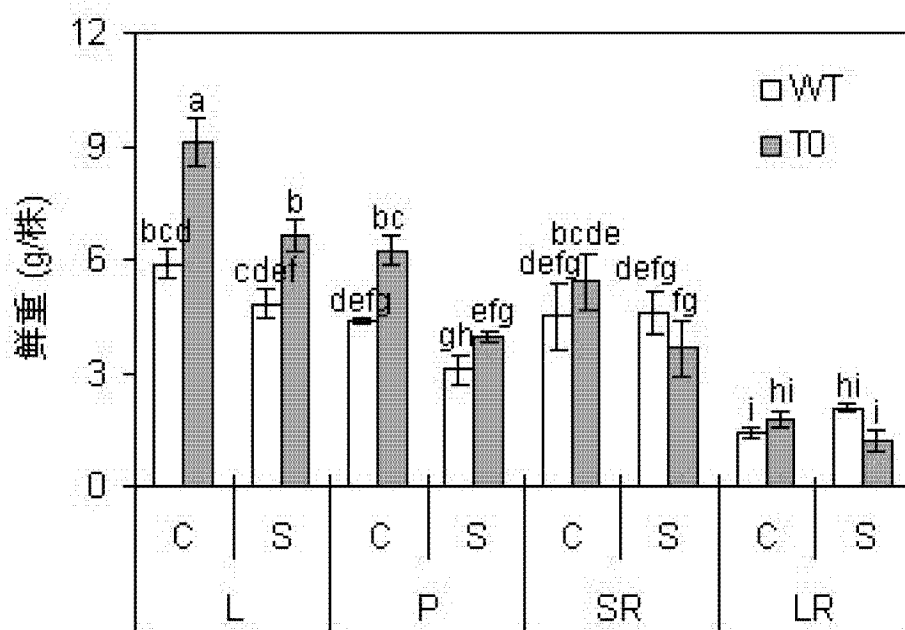


图 10

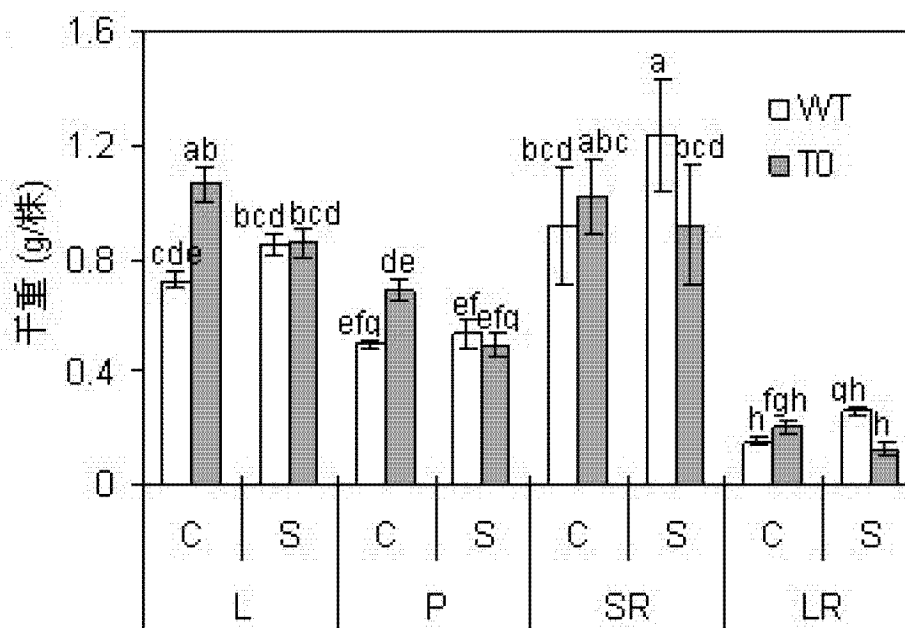


图 11

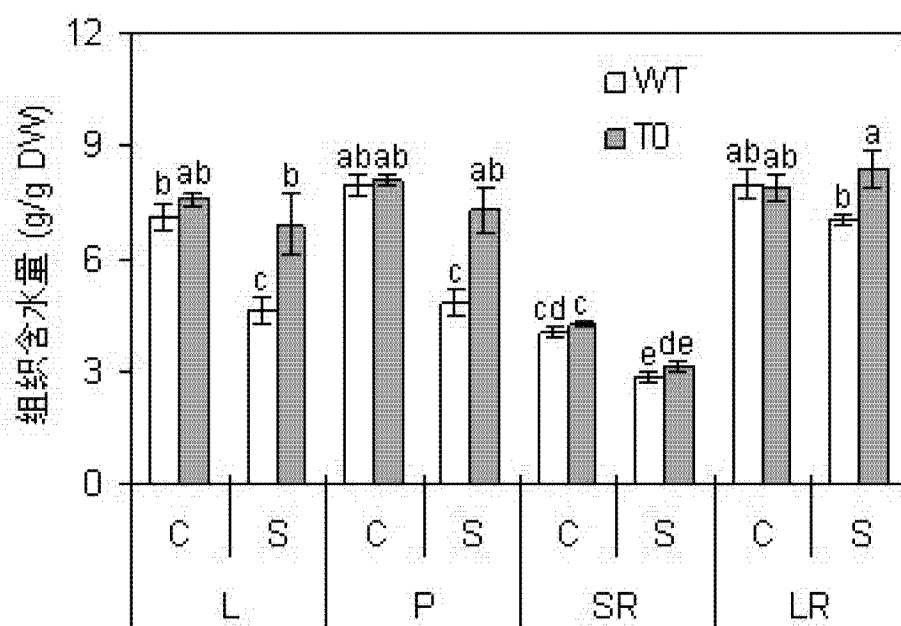


图 12

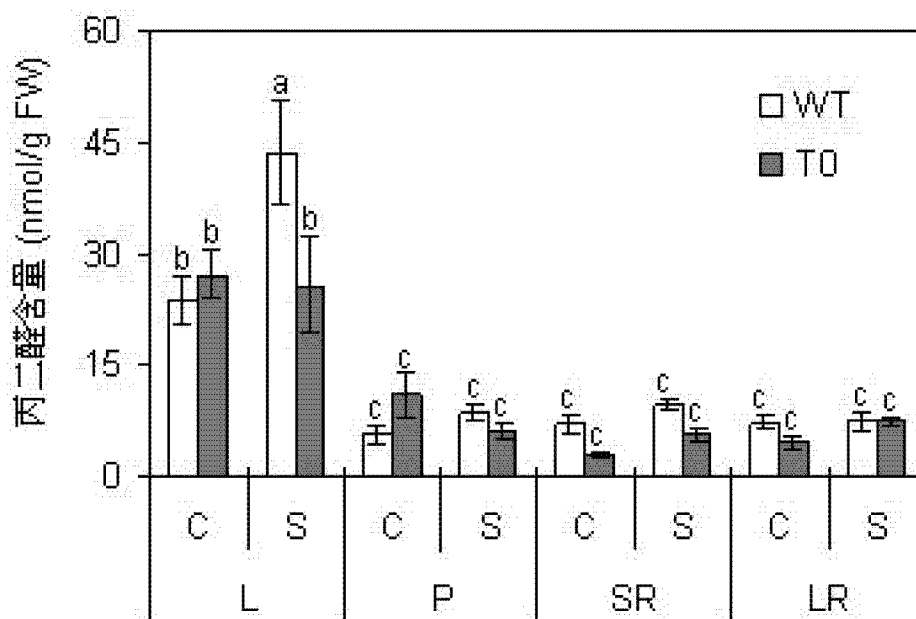


图 13

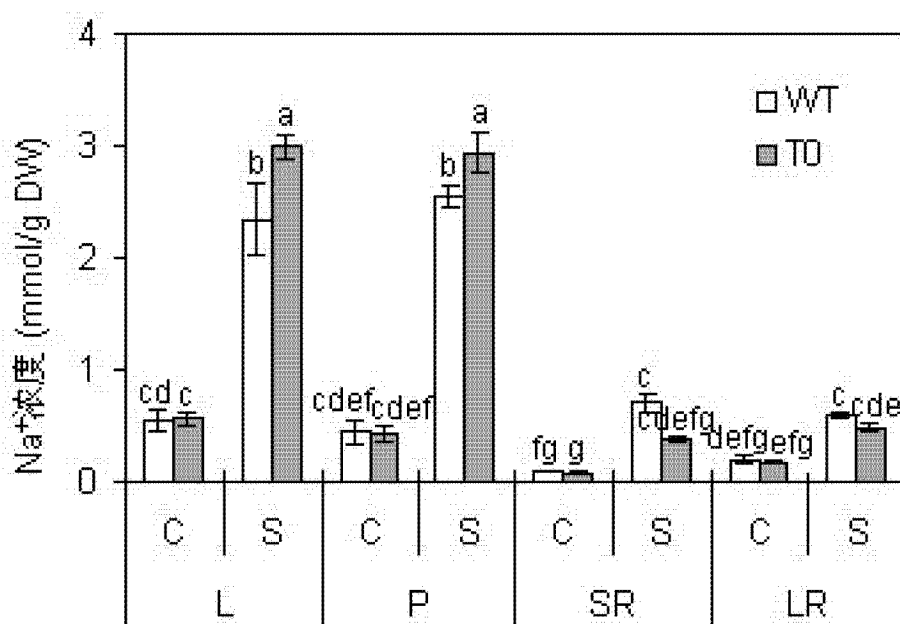


图 14

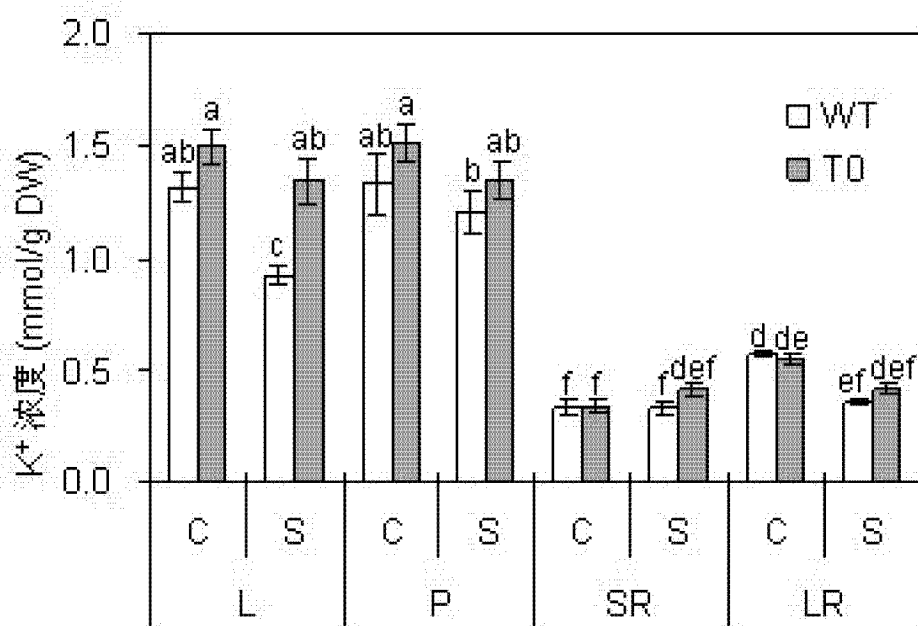


图 15

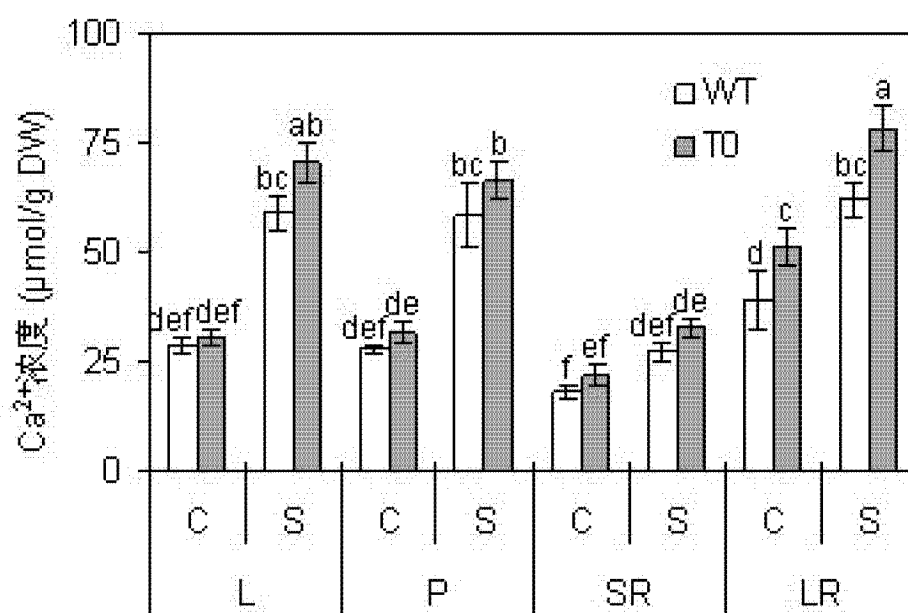


图 16

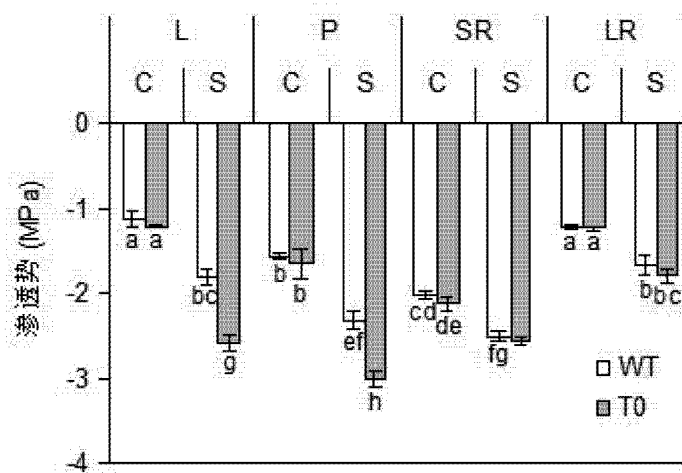


图 17

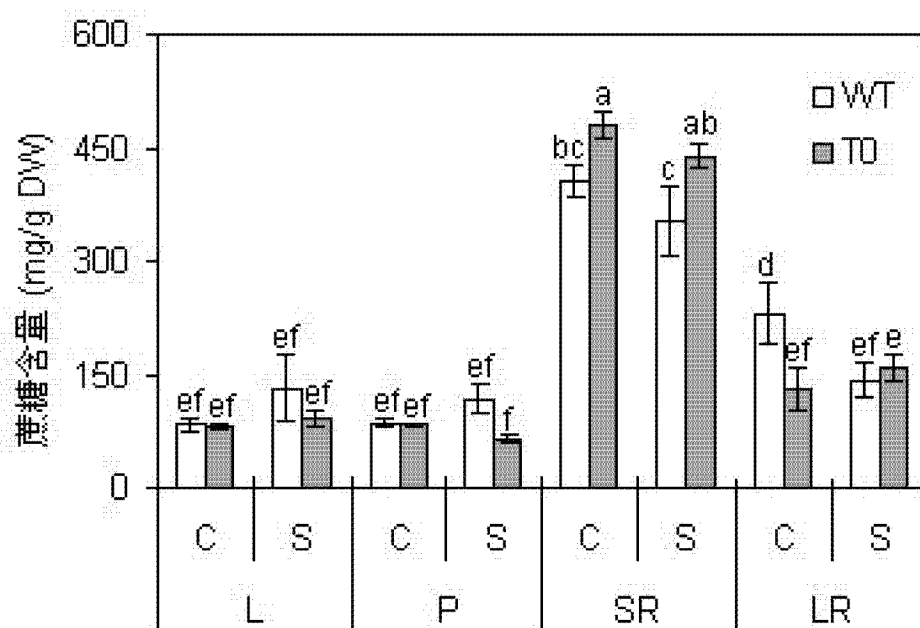


图 18

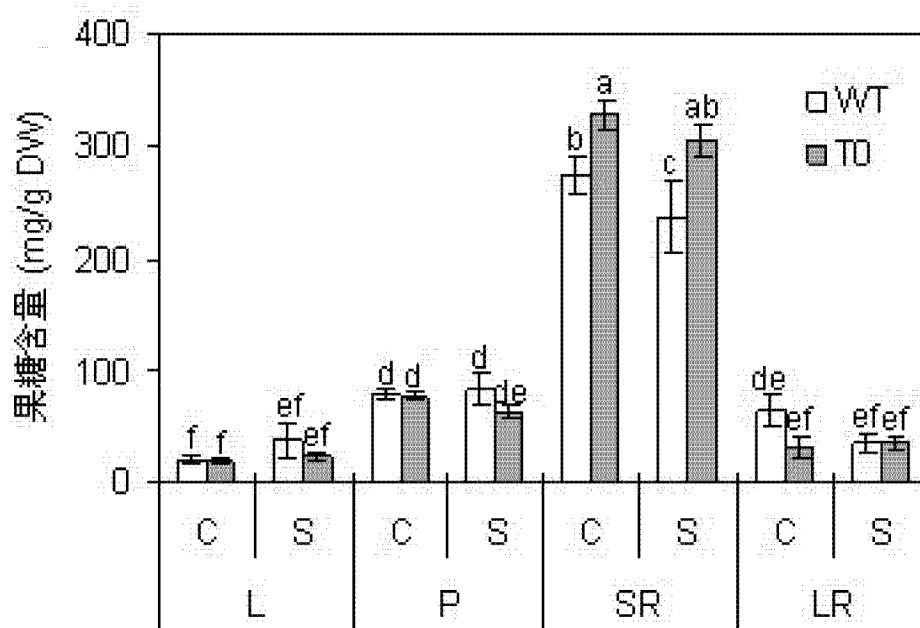


图 19

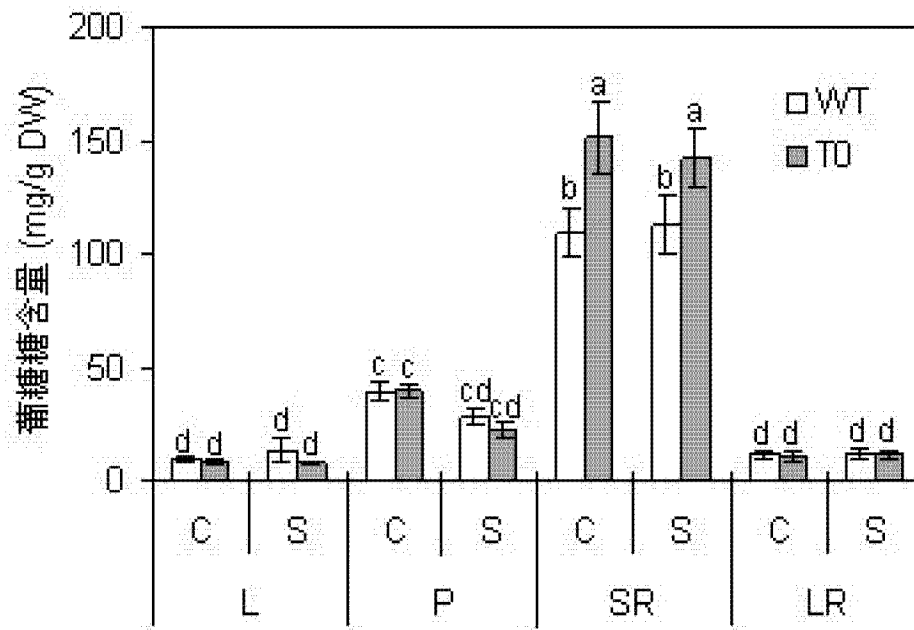


图 20

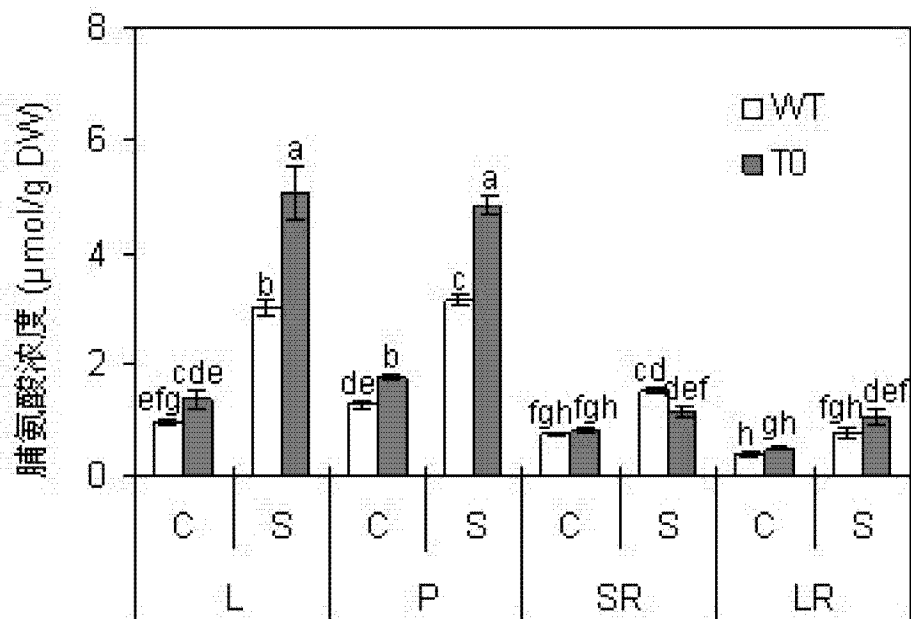


图 21

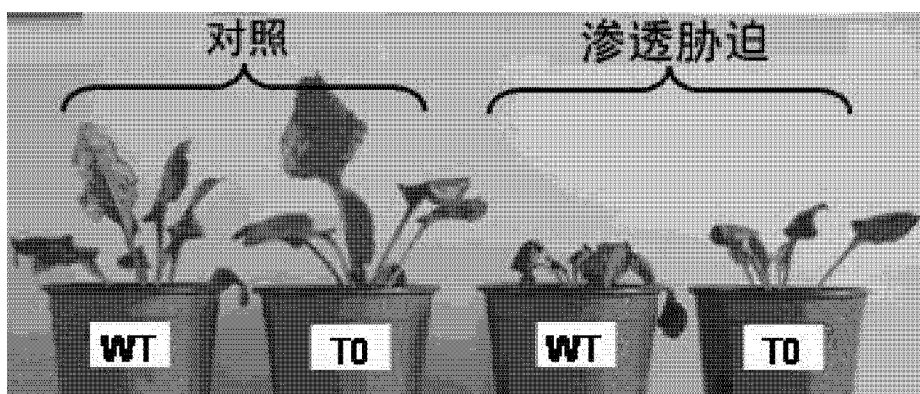


图 22

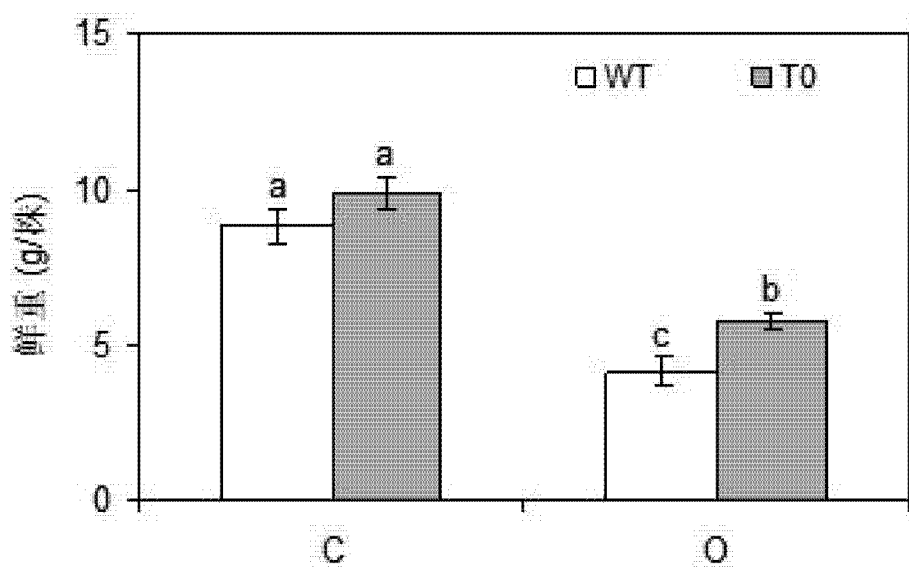


图 23

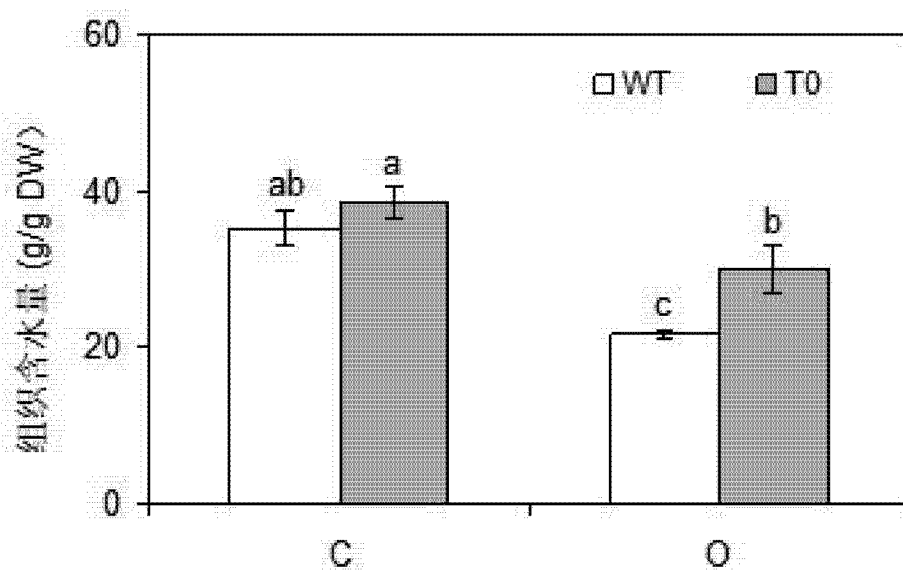


图 24

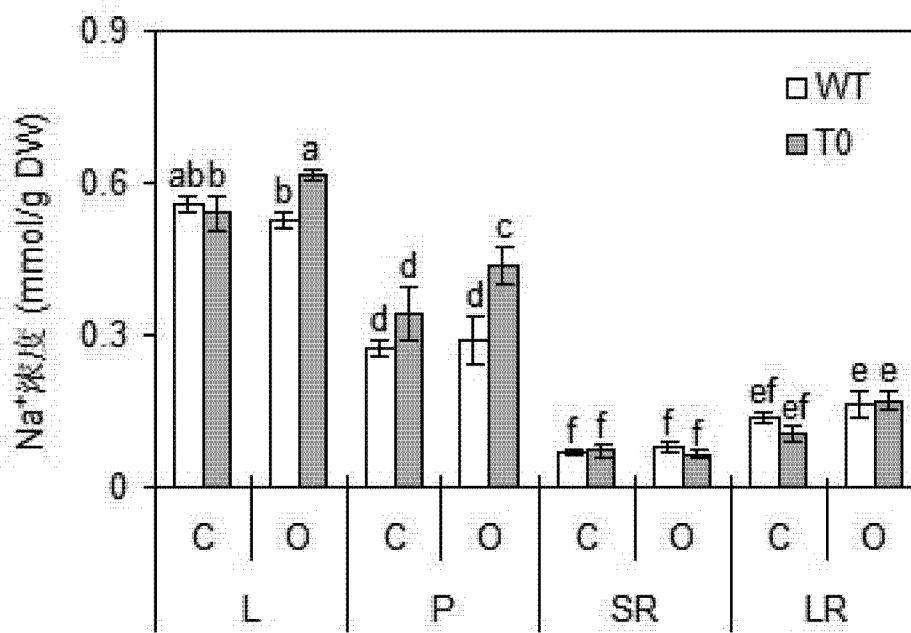


图 25

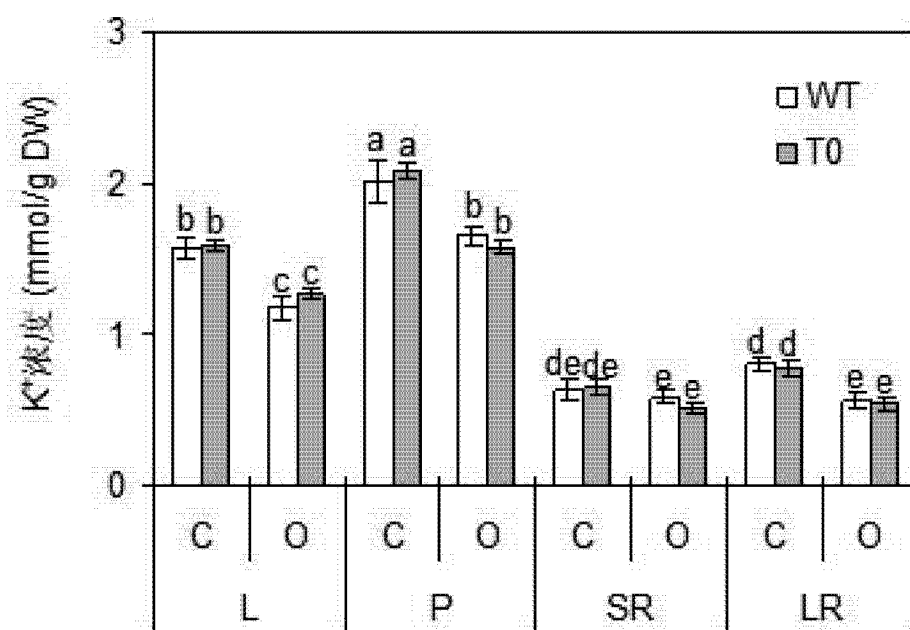


图 26

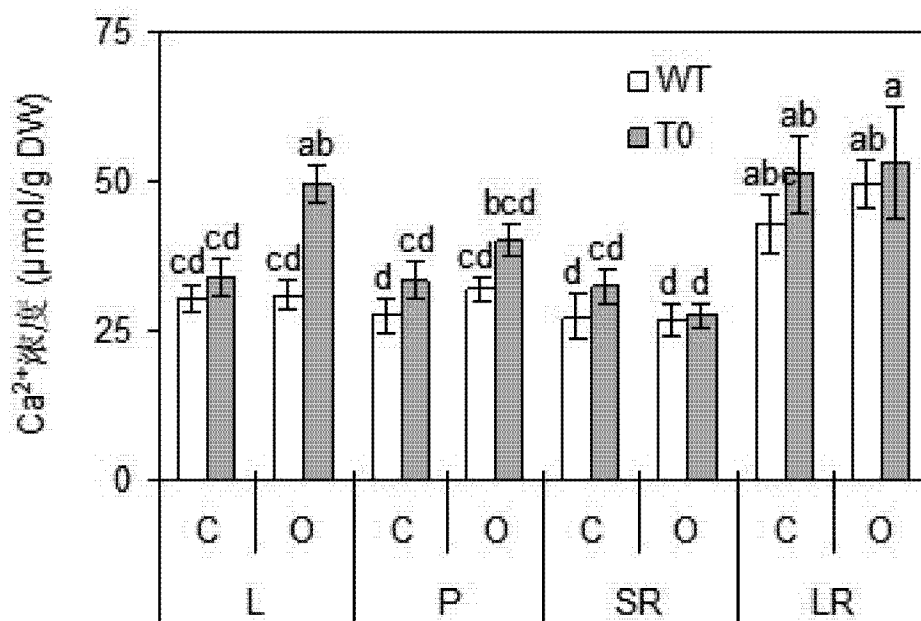


图 27

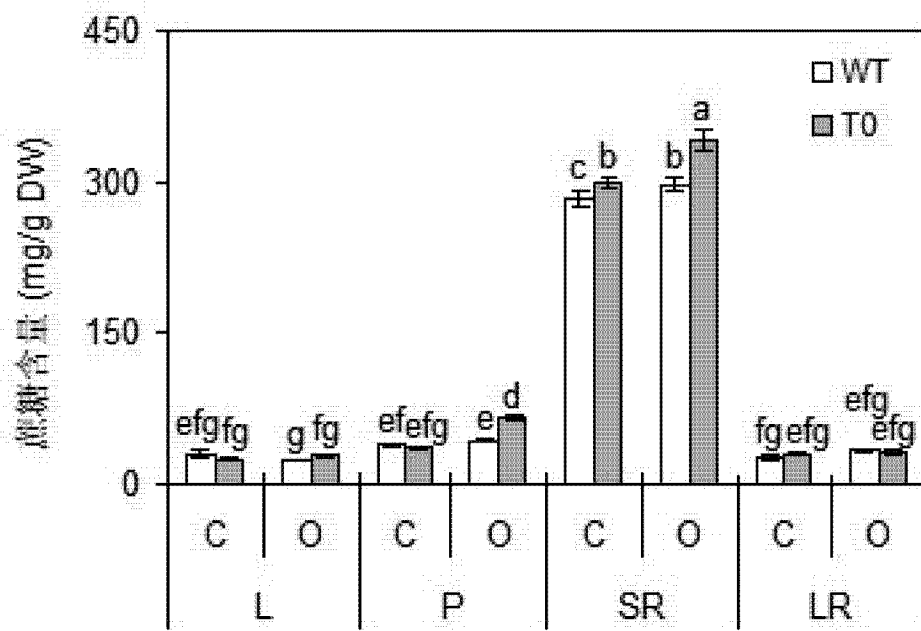


图 28

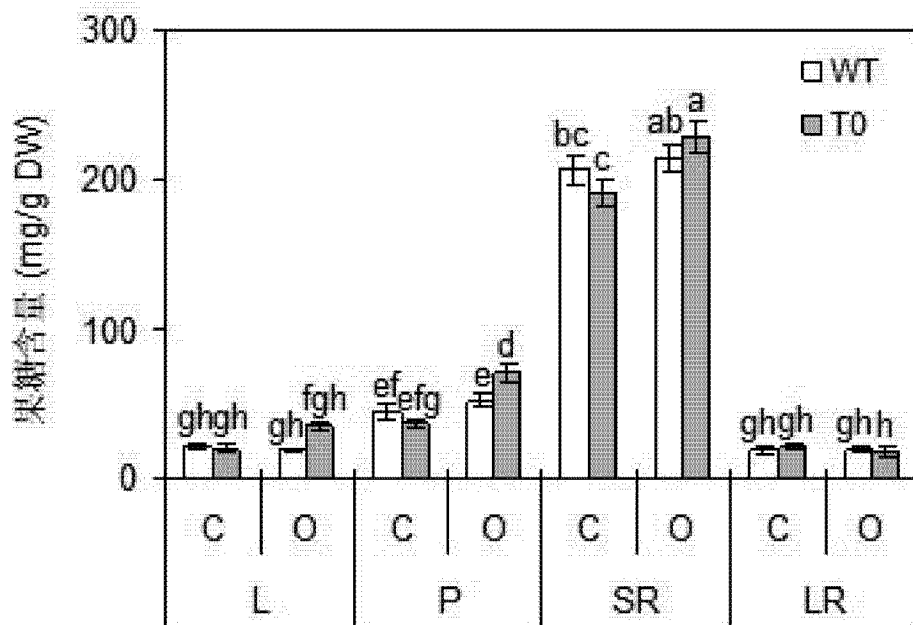


图 29

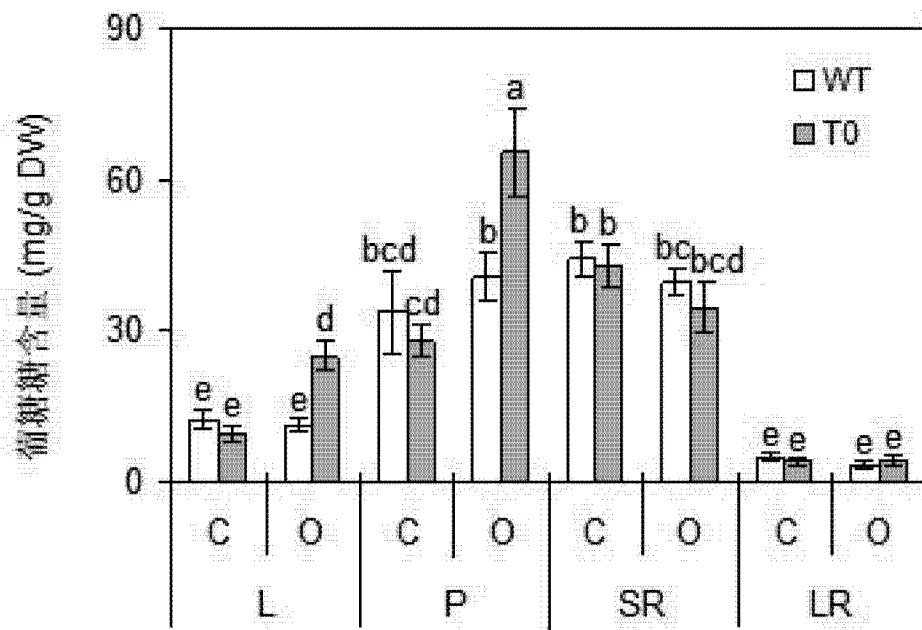


图 30

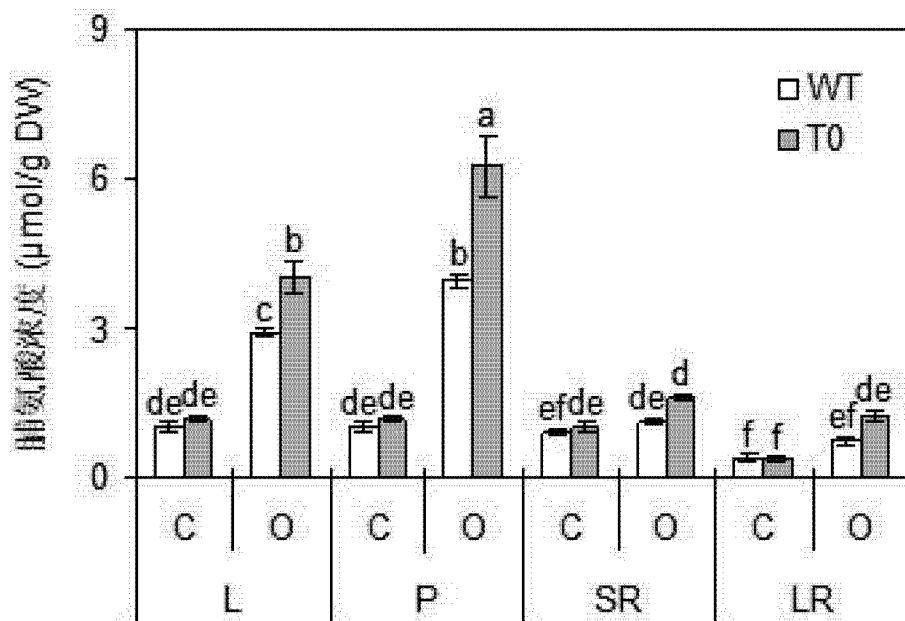


图 31