

研究报告 Original Papers

油菜素内酯合成酶(Steroid 5 α -Reductase)基因的超量表达对毛白杨生长的影响邓伟^{1,2,*}, 吕立堂^{2,4}, 罗克明³, 李义²¹重庆大学生物工程学院基因工程中心, 重庆市高校功能基因及调控技术重点实验室, 重庆 400044; ²美国康涅狄格大学植物科学系, 美国 06269; ³西南大学生命科学学院, 重庆 400716; ⁴贵州大学农业生物工程重点实验室, 贵阳 550025

摘要: 将棉花 Steroid 5 α -reductase 基因(*DET2*)超量表达载体导入毛白杨中, 观察其对毛白杨生长和芽休眠的影响。结果表明, 超量表达 *DET2* 基因的毛白杨茎高度、直径生长和不定根的生长增强, 芽的休眠破除提前。

关键词: 杨树; 超量表达; 油菜素内酯合成酶基因(*DET2*)

Effect of Overexpression of Steroid 5 α -Reductase Gene on Growth of *Populus tomentosa* Carr.DENG Wei^{1,2,*}, LÜ Li-Tang^{2,4}, LUO Ke-Ming³, LI Yi²

¹Key Laboratory of Functional Gene and Regulation Technologies under Chongqing Municipal Education Commission, Genetic Engineering Research Center, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China; ²Department of Plant Science, University of Connecticut, CT 06269, USA; ³School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400716, China; ⁴Key Laboratory of Agricultural Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: Plant expression vector containing cotton steroid 5 α -reductase gene (*DET2*) was transferred to *Populus tomentosa* and the growth of transgenic plants were measured. Overexpression of *DET2* gene improve the growth of stems and roots in *Populus tomentosa*. *DET2* gene also promote the dormancy break of transgenic plants.

Key words: *Populus tomentosa*; overexpression; steroid 5 α -reductase gene (*DET2*)

油菜素内酯(brassinosteroid, BR)在植物茎秆伸长、花粉管生长、叶伸展、维管细胞的分化、细胞伸长、细胞分裂以及逆境胁迫适应能力都具有重要调节作用(Yamamoto等1997)。近年来,人们通过甲基磺酸乙酯(EMS)和T-DNA插入以及转座子插入等方法获得了一系列与油菜素内酯生物合成有关的突变体,基本上弄清了植物体内油菜素内酯的生物合成途径。同时依据这些人工突变体鉴定了多个油菜素内酯生物合成酶基因,如*DET2*(Li等1996;Noguchi等1999)、*DIM1*(Choe等1999)、*CPD*(Szekeres等1996)、*DWF4*(Choe等1998)、*DWF5*(Choe等2000)和*DWF7*(Choe等1999)。油菜素内酯生物合成途径研究的结果表明,拟南芥*DET2*基因能催化(24R)-24-甲基-胆甾基-4-烯-3-酮到(24R)-24-甲基-5 α -胆甾烷-3-酮的5 α 还原反应,是BR生物合成途径的重要限速酶(Li等1996;Noguchi等1999)。Chory和Li

(1997)报道,将*DET2*基因在拟南芥中超量表达后其转基因植株的生长量显著提高。

杨树生长迅速,适应性强,是严格的异交树种和植物纤维的重要来源。杨树基因组小,仅为拟南芥基因组的4倍,比松属植物小40倍,与水稻类似。杨树再生能力强,易于无性繁殖和遗传转化,已经构建了较饱和的遗传连锁图谱,并获得了大量的与目标性状相关的分子标记(张勇等2006)。目前,以毛果杨为材料的杨树基因组计划已经完成。杨树因这些特性已成为研究多年生植物生长和基因功能研究的模式植物(Brunner等2004)。为了研究*DET2*基因在杨树生长中的功能,本文将棉花*DET2*基因超量表达载体导入毛白杨,研究其转基因植株根和茎的生长以及休眠

收稿 2007-12-17 修定 2008-05-06

* E-mail: denwei0718@163.com; Tel: 023-65120485

的破除。

材料与方法

杨树(*Populus tomentosa* Carr.)品种为‘741毛白杨’。根癌农杆菌菌株LBA4404(SM_r)由本实验室保存。棉花*DET2*基因超量表达载体pSH-DET2由西南大学罗明先生提供(图1)。

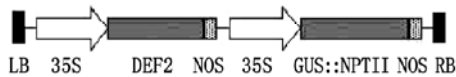


图1 植物表达载体 pSH-DET2

Fig.1 Construct for plant transformation of pSH-DET2

超量表达载体 pSH-DET2 的 T-DNA 区域。35S：来源于花椰菜花叶病毒的植物组成性启动子；NOS：冠瘿碱合成酶基因终止子；GUS::NPTII：新霉素磷酸转移酶基因和葡萄糖苷酶基因的融合基因。

将 -80℃ 下保存的含 pSH-DET2 质粒的农杆菌菌株 LBA4404 接种到附加 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素 (kanamycin, Km) 和 125 mg·L⁻¹ 链霉素 (streptomycin, SM) 的 YEB 培养基平板上, 于 28℃ 条件下培养 2 d 后挑取农杆菌单菌落, 接种于含相应浓度抗生素的 5 mL YEB 液体培养基中, 28℃ 下振荡培养过夜。次日取培养过夜的农杆菌菌液按 1:50 的比例转接到 50 mL 不含抗生素但添加乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS) 的液体 YEB 培养基中, 继续培养 3~5 h, OD₆₀₀ 值达到 0.8 时取出备用。

取温室中生长的毛白杨枝条顶端叶片, 先用去离子水冲洗干净, 放入 2% 次氯酸钠溶液浸泡消毒 10 min, 无菌水清洗 3 次。转化按照 Dai 等 (2003) 方法进行。选取根系生长良好, 长约 6 cm 的小苗, 幼苗根部培养基清洗干净后, 移栽到温室土壤中培养。所有植物培养均在 24~26℃, 16 h 光照/8 h 黑暗光周期, 光照强度为 200~300 μmol·m⁻²·s⁻¹ 中进行。

转基因植物基因组 DNA 提取根据改良 CTAB 法进行 (Stewart 和 Via 1993)。Southern 杂交分析按照 Sambrook 等 (1989) 方法进行。将提取的基因组 DNA 用 *Hind*III 酶切, 酶切产物经 1% 琼脂糖电泳分离后转移至尼龙膜上, 用探针制备试剂盒标记 *DET2* 基因 cDNA 为探针, 进行杂交。杂交用尼龙膜和探针制备试剂盒购自 Amersham

Pharmacia Biotech 公司。

总 RNA 提取用 TRIzol 试剂 (Promega USA) 按说明操作进行。以反转录产物为模板进行 RT-PCR, 以杨树肌动蛋白 *Actin* 基因为内标, 扩增 *DET2* 基因。引物序列分别为 *Actin*: A1, 5' GAACTACGAGCTTCCTGATG 3'; A2, 5' ATAGTGGAACCACCACTGAG 3'。 *DET2*: D1, 5' GGTTTTCCAGTGAGTGTAGC 3'; D2, 5' CAGTCCCACCAACACTTTAT 3'。

反应条件为 94℃, 5 min, 1 个循环; 94℃, 30 min, 60℃, 30 s, 72℃, 30 min, 40 个循环; 72℃, 10 min。

将扦插苗移栽到温室土壤中, 第 70 天时测量杨树茎高度、节间数量和茎的直径, 茎的直径以 1/2 高度处的节间直径为依据进行测量。同时测定转基因植株的生物量, 先测定转基因植株的根、茎 (包括叶) 的鲜重, 然后将植物的根、茎 (包括叶) 放置于 80℃ 干燥箱中干燥 48~72 h, 当恒重时, 测定根和茎的干重。观察转基因植株休眠的情况, 先于 2005 年 9 月将生长在温室中的转基因杨树植入大田 (美国康涅狄格大学试验田), 每个转基因株系均取 4~5 个植株, 越冬后于 2006 年 4 月观察, 照相。

结果与讨论

1 转基因杨树的获得

用含有 pSH-DET2 质粒的农杆菌菌液浸染毛白杨叶盘, 通过卡那霉素筛选获得卡那抗性植株 49 株, 移栽到温室土壤中, 经过 30 d 的生长, 一些抗卡那霉素的植株表现出了比非转基因对照更良好的生长趋势, 选取有代表性的 4 株植物, 进行分子表达分析, 以确定是否为转基因株系。我们进行了基因组 Southern 杂交, 结果表明 4 株转化植株都有杂交条带, 而非转化植株没有杂交条带, 表明 *DET2* 基因已经整合到杨树基因组上 (图 2-a)。转基因植株 D-4 和 D-15 有 1 条杂交条带, D-5 和 D-10 株系有 3 条杂交带, 因为 *DET2* 基因序列没有 *Hind*III 酶切位点, 所以初步证明植株 D-4 和 D-15 为单拷贝, D-5 和 D-10 株系为 3 个拷贝。为了进一步验证外源基因 *DET2* 的表达情况, 我们又进行了 RT-PCR, 结果 *DET2* 基因在转基因植物中都有不同程度的表达, 而非转基因植物则否 (图 2-b)。这些表明外源基因 *DET2* 已整合到植物

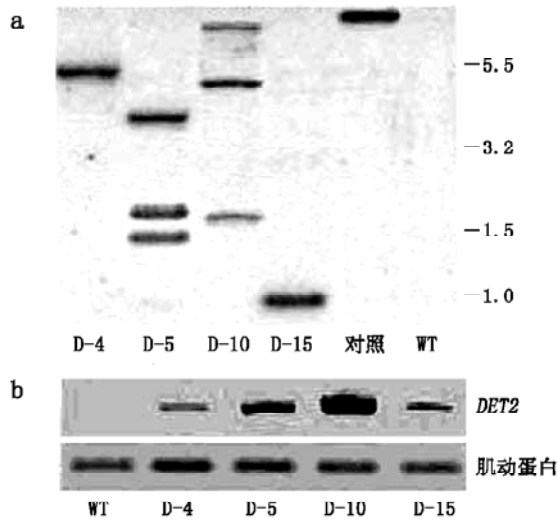


图2 转基因植株的分子验证

Fig.2 Molecular analysis of transgenic plants

a: 转基因植株的 Southern blotting 检测。D-4、D-5、D-10 和 D-15 分别表示转基因株系 D-4、D-5、D-10 和 D-15; 阳性对照为 pSH-DET2 质粒; WT 表示非转基因植株。b: RT-PCR 检测 *DET2* 基因表达情况。杨树肌动蛋白 *Actin* 基因作为 RT-PCR 反应的内标。

基因组中并能表达, 显示筛选的 4 株植物是过量表达 *DET2* 的转基因株系。

从图 2-a 可以看出, 4 个转基因株系 *DET2* 表达水平有明显的差别。前人的研究表明, 外源基因在受体植物的基因组内的插入位点不同会造成转录活性的差异(Gelvin 1998)。此外, 外源基因在受体植物基因组中的拷贝数也会对基因表达水平产生影响。如图 2-b 所示, D-10 和 D-5 有 3 个拷贝数, D-15 和 D-4 有 1 个拷贝数。株系 D-10 和 D-5 外源基因的表达水平比 D-15 和 D-4 高。

2 表达 *DET2* 基因对杨树生长的影响

从表达 *35S::DET2* 的转基因植株中选取株系 D-4、D-5、D-10 和 D-15, 扦插扩繁, 扦插苗生根以后, 移入温室土壤中培养, 70 d 后测定转基因植株茎高度、节间数量和直径的结果表明, 转基因株系的高度和直径生长明显优于非转基因植株(图 3、表 1)。转基因植物节间数量明显增多(表 1), 表明植株高度的增长主要是由于节间数量增加造成。此外, 转基因植株的不定根系也表现出较强的生长能力, 根系发达, 数量多, 说明表



图3 转基因和非转基因毛白杨生长的比较

Fig.3 Comparison on growth of transgenic and nontransgenic *P. tomentosa*

表1 转基因和非转基因毛白杨生长和干鲜重的比较

Table 1 Comparisons on growth and fresh and dry weights of transgenic and nontransgenic *P. tomentosa*

株系	茎高度/cm	茎直径/mm	节间数量	鲜重/g		干重/g	
				茎	根	茎	根
WT	64±3.2	4.6±0.1	23±3	23.5±2.3	20.7±1.4	4.1±0.3	3.5±0.4
D-4	68±2.3	4.8±0.3	26±3	28.1±3.2	24.2±2.0	4.4±0.2	3.9±0.3
D-5	75±3.5**	5.5±0.2**	35±4**	33.7±3.6**	31.6±0.5**	5.7±0.6*	5.2±0.5**
D-10	72±4.0*	5.1±0.3	33±2**	31.1±4.1*	29.1±1.9**	5.2±0.9*	4.8±0.4**
D-15	67±1.9	4.9±0.2	27±3	27.4±2.6	25.0±1.7	4.6±0.5	4.0±0.4

数据为 3 个转基因植株的平均值 ±SD。* 代表转基因与非转基因杨树之间的 *t* 检验差异显著($P < 0.05$) ; ** 代表差异极显著($P < 0.01$)。

达 *DET2* 基因可促进不定根的生长。RT-PCR 检测发现 4 株转基因植株中 D-10 和 D-5 外源 *DET2* 基因的表达水平较高, D-4 和 D-15 较低。如表 1 所示, 株系 D-10 和 D-5 在茎高度、直径以及根系生长上都优于株系 D-4 和 D-15, 表明外源 *DET2* 基因表达水平与转基因植株生长具有一定正相关性。在以后的实验中需要分析更多转基因株系表型变化和 *DET2* 基因表达水平, 以验证这一结论。

前人的研究表明, 外施 BR 可以促进幼苗的茎、豌豆和绿豆的上胚轴、黄瓜下胚轴、单子叶植物的胚芽鞘和中胚轴等的伸长(Mandava1988)。在拟南芥中超量表达 BR 生物合成的一个关键酶 *DWARF4* 基因, 促进了植株的生长(Choe 等 2001)。Chory 和 Li (1997)在拟南芥中超量表达 *DET2* 基因, 显著提高了转基因植株茎生长。BR 不仅可以促进植株节间的伸长, 也可以促进茎节间的分裂, 提高节间数量(Grove 等 1979)。我们的结果也表明内源表达 *DET2* 基因促进了转基因植株的节间数量的增加。

BR 对植株根系的影响与剂量有关。0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 表油菜素内酯(eBL)抑制了拟南芥和番茄幼苗根系的生长(Clouse 等 1993)。更低浓度 eBL 的应用却促进了根系的生长(Müssig 等 2003)。在植物根系的起始和生长中, 生长素发挥了重要的作用(Laskowski 等 1995)。IAA 通过极性运输从植物的茎转移到根部, 促进了根原基的发生和侧根的形成(Bhalerao 等 2002)。BR 可以调控负责生长素

极性运输相关基因的表达(Li 等 2005)。Bao 等 (2004)研究发现, 在根中 BR 促进了生长素向根尖运输, BR 和生长素协同促进了拟南芥侧根的形成。我们的研究发现表达 *DET2* 基因促进毛白杨不定根的生长。表明内源表达 *DET2* 基因可能提高了植物体内 BR 的浓度, BR 和生长素协同作用促进了根系的生长。

进一步测定转基因植株根和茎干鲜重的结果(表 1)表明, 超量表达 *DET2* 基因的转基因植株茎和根的干鲜重均比非转基因植株的有明显提高。这些说明 *DET2* 基因表达可以促进转基因杨树茎和不定根系的生长。

3 *DET2* 基因表达对破除芽休眠的影响

转基因毛白杨植株上的芽在大田中经过 1 个冬天的休眠后, 于 2006 年 4 月 3 日开始萌发第 1 个腋芽。而非转基因植株在 4 月 9 日才开始萌发第 1 个腋芽。非转基因植株茎基部萌发出 5~6 个腋芽, 每个芽大约形成 2~4 片刚展开的幼叶时, 转基因植株的全株的芽均已萌发, 且芽的叶片已经充分展开, 比非转基因植株明显增大(图 4)。

植物在冷、热、干、湿季节变化很大的气候条件下, 种子或芽会进入休眠状态。脱落酸(ABA)普遍认为是主要的植物休眠促进物和发芽抑制物(Piola 等 1998)。Steber 和 McCourt (2001)报道外源施加 BR 可以解除拟南芥种子休眠, 促进种子萌发, BR 还可以缓解脱落酸对种子萌发的抑制作用。我们的研究表明, 超量表达 BR 合成基因 *DET2* 可促进毛白杨芽休眠的打破, 其原

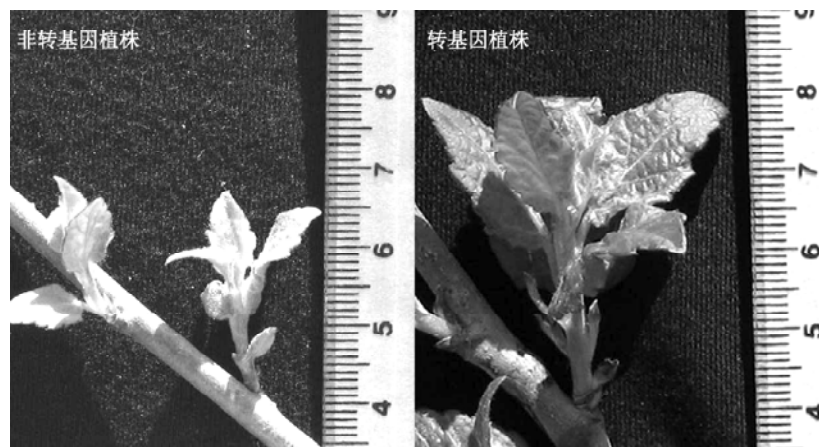


图 4 转基因与非转基因植株上腋芽萌发的比较

Fig.4 Comparison on germination of axillary buds in transgenic and nontransgenic plants

因可能与超量表达 *DET2* 基因可缓解脱落酸对芽萌发的抑制作用有关。对此, 今后尚须进一步对转基因植株芽中脱落酸和 BR 的含量进行测定和研究。

参考文献

- 张勇, 张守攻, 齐力旺, 陈小强, 陈瑞阳, 宋文芹(2006). 杨树——林木基因组学研究的模式物种. *植物学通报*, 23: 286~293
- Bao F, Shen J, Brady SR, Muday GK, Asami T, Yang Z (2004). Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root signaling and lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 134: 1624~1631
- Bhalerao RP, Eklöf J, Ljung K, Marchant A, Bennett M, Sandberg G (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J*, 29: 325~332
- Brunner AM, Busov VB, Strauss SH (2004). Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species. *Trends Plant Sci*, 9: 49~56
- Choe S, Dilkes BP, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Feldmann KA (1998). The *DWF4* gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 alpha-hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*, 10: 231~243
- Choe S, Fujioka S, Noguchi T, Takatsuto S, Yoshida S, Feldmann KA (2001). Overexpression of DWARF4 in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in *Arabidopsis*. *Plant J*, 26: 573~582
- Choe S, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Tissier CP, Gregory BD, Ross AS, Tanaka A, Yoshida S, Tax FE et al (1999). The *Arabidopsis dwf7/ste1* mutant is defective in the Δ^7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*, 11: 207~221
- Choe S, Tanaka A, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Ross AS, Tax FE, Yoshida S, Feldmann KA (2000). Lesions in the sterol Δ^7 reductase gene of *Arabidopsis* cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis. *Plant J*, 21: 431~443
- Chory J, Li J (1997). Plant steroid 5 alpha-reductase, det2. United States Patent 6352846
- Clouse SD, Hall AF, Langford M, McMorris TC, Baker ME (1993). Physiological and molecular effects of brassinosteroids on *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Growth Regul*, 12: 61~66
- Dai WH, Cheng ZM, Sargent W (2003). Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of two elite aspen hybrid clones from *in vitro* leaf tissues. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 39: 6~11
- Gelvin SB (1998). The introduction and expression of transgenes in plants. *Curr Opin Biotechnol*, 9: 227~232
- Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, Mandava NB, Worley JF, Warthen JD, Steffens GL, Flippen-Anderson JL, Jr Cook JC (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*, 281: 216~217
- Laskowski MJ, Williams ME, Nusbaum HC, Sussex IM (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development*, 121: 3303~3310
- Li J, Nagpal P, Vatart V, McMorris TC, Chory J (1996). A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science*, 272: 398~401
- Li L, Xu J, Xu ZH, Xue HW (2005). Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in *Brassica* and *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17: 2738~2753
- Mandava NB (1988). Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 39: 23~52
- Müssig C, Shin GH, Altmann T (2003). Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 133: 1261~1271
- Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Yoshida S, Li J, Chory J (1999). *Arabidopsis det2* is defective in the conversion of (24R)-24 methylcholest-4-en-3-one to (24R)-24-methyl-5 α -cholestan-3-one in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol*, 120: 833~840
- Piola F, Label P, Vergne P, von Aderkas P, Rohr R (1998). Effects of endogenous ABA levels and temperature on cedar (*Cedrus libani* Loudon) bud dormancy *in vitro*. *Plant Cell Rep*, 18: 279~283
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Steber CM, McCourt P (2001). A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 125: 763~769
- Stewart CN Jr, Via LE (1993). A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques*, 14: 748~750
- Szekeres M, Németh K, Koncz-Kálmán Z, Mathur J, Kan-chmann A, Altmann J, Rédei GP, Nagy F, Schell J, Koncz C (1996). Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450 controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell*, 85: 171~182
- Yamamoto R, Demura T, Fukuda H (1997). Brassinosteroids induce entry into the final stage of tracheary element differentiation in cultured *Zinnia* cells. *Plant Cell Physiol*, 38: 980~983