

GUS 基因在梨转化植株中的稳定表达

孙清荣^{1,*}, 孙洪雁¹, 赵衍², HAMMOND Rosemarie², DAVIS Robert²

¹山东省果树研究所, 山东泰安 271000; ²美国农业部百思维尔农业研究中心植物分子病理实验室, 马里兰 20705, 美国

摘要: 以获得的梨转 *GUS* 基因植株的试管苗为试材, 转基因植株的叶片在含卡那霉素的再生培养基上可成功再生不定梢, 这些不定梢在含卡那霉素的生根培养基上可诱导生根。再生不定梢经组织化学检测仍表现出 *GUS* 基因的表达。而非转基因植株的叶片在含卡那霉素的再生培养基上不能产生不定梢, 显示外源基因在转基因植株中的表达在无性繁殖后代中是稳定遗传的。

关键词: 梨; 转基因植株; *GUS* 基因; 稳定表达

Stable Expression of an Introduced Exogenous *GUS* Gene in Transgenic Plantlets of Pear (*Pyrus communis* L.)

SUN Qing-Rong^{1,*}, SUN Hong-Yan¹, ZHAO Yan², HAMMOND Rosemarie², DAVIS Robert²

¹Shandong Institute of Pomology, Taian, Shandong 271000, China; ²Molecular Plant Pathology Laboratory, USDA-Agriculture Research Service, Beltsville, MD 20705, U. S. A.

Abstract: Pear (*Pyrus communis*) transgenic plantlets which were introduced exogenous *GUS* gene were selected as materials. Adventitious shoots were obtained from leaves of transgenic plantlets under kanamycin selection and transgenic shoots were rooted. Histochemical assay showed the expression of *GUS* gene in regenerated shoots of transgenic plants and no *GUS* gene expression in regenerated shoots from non-transgenic control. The results confirm that the expression of foreign gene into transgenic pear plants is stable during the clonal propagation.

Key words: pear; transgenic plant; *GUS* gene; stable expression

外源基因在转基因植株中不能稳定表达, 甚至完全不表达是一个较为普遍的现象(李旭刚等 1998)。因此, 外源基因在转基因植株中的表达问题越来越受到重视。尤其是作物转基因的研究进展较快, 如转 *Bt* 杀虫蛋白基因油菜(林良斌等 2002)、转 *Cecropin B* 基因水稻(华志华等 1999)、转 *Bt* 基因玉米(刘宗华等 2003)等都证明转入基因可在后代中稳定表达。但在果树转基因研究中, 大多仍停留在转基因植株的获得。基于外源基因在转基因梨的无性繁殖后代中的稳定表达尚未见报道, 本文探讨外源基因 *GUS* 转入梨染色体组后在转基因梨的无性繁殖后代中是否能稳定表达。

材料与方法

以 *AtSUC2* 韧皮部特异表达启动子驱动 *GUS* 基因的转基因梨 ‘Old Home’ (*Pyrus communis* L.) (孙清荣等 2008) 的无菌苗为试材, 于 MM (MS+1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ IBA)+50 mg·L⁻¹ 卡那霉素

(Km) 的培养基上保存和增殖。

分别从转基因植株和非转基因植株摘取刚展开幼嫩叶片, 接种在含 10 和 25 mg·L⁻¹ Km 的不定梢诱导培养基上, 评价在 Km 筛选条件下转基因植株叶片的再生能力。

参照 Jefferson (1987) 的 *GUS* 染色法对转基因株系叶片再生的不定梢进行 *GUS* 基因稳定表达分析。

在附加 0、5、10、25 mg·L⁻¹ Km 的生根培养基上观察 Km 对转基因植株生根的影响, 培养 30 d 后计算生根率。

实验结果

1 Km 存在下转基因植株叶片的不定梢再生潜力

为了证明转基因植株在无性繁殖后代中其转

收稿 2008-02-29 修定 2008-05-07

资助 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(01DS48)。

* E-mail: qingrongsun@hotmail.com; Tel: 0538-8282059

入的外源基因是否能稳定表达, 调查转基因植株叶片在含Km的不定梢诱导培养基上的不定梢再生潜力的结果表明: 转基因植株的叶片比非转基因的表现对 Km 有较高的抗性。接种在含 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Km 的不定梢诱导培养基上, 转基因植株的叶片仍保持绿色, 在切伤处产生大量愈伤组织, 并产生较高的不定梢再生率(图 1-a), 达 52.8%; 当附加 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Km 时, 转基因植株的叶片仍有部分是绿色, 切伤处产生少量愈伤组织(图 1-b), 但

没有不定梢再生。而非转基因植株的叶片, 不抗 Km, 在附加 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Km 的诱导培养基上, 叶片变浅绿或白化, 没有愈伤组织和不定芽的形成, 最后死亡(图 1-c); 而在不加 Km 的诱导培养基上叶片不定梢再生率达 100% (图 1-d)。

2 转基因植株叶片再生不定梢的组织化学分析

GUS 染色的结果表明: 转入的外源 GUS 基因在转基因植株的叶片再生不定梢的无性繁殖后代中能稳定表达(图 2-a、b), 而非转基因植株叶片

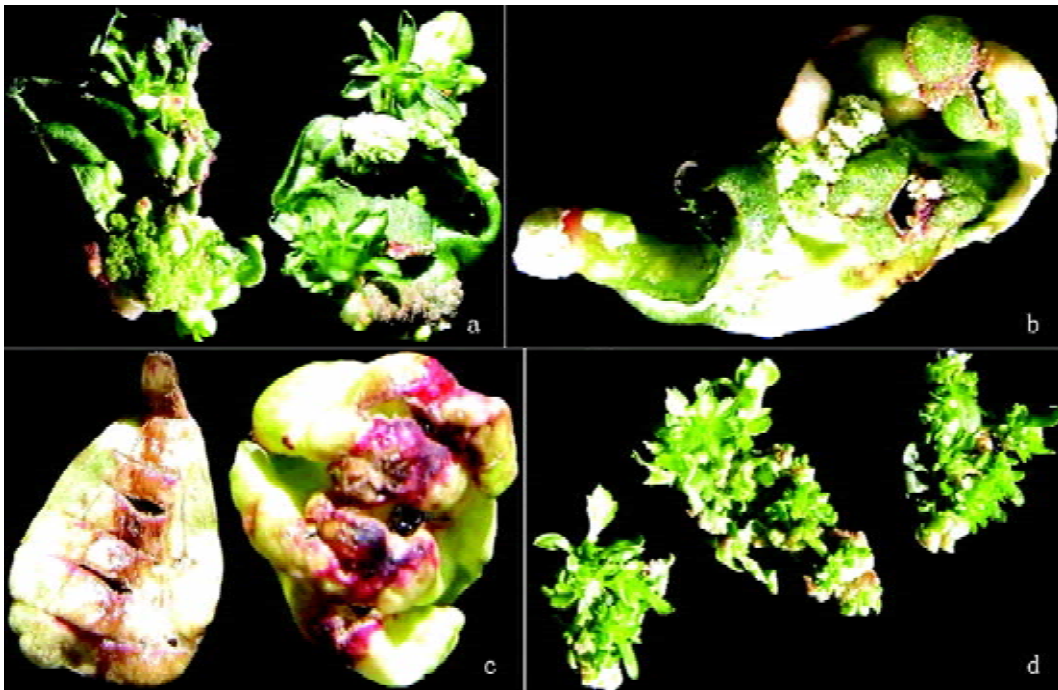


图1 转基因植株和非转基因植株叶片在含 Km 诱导培养基上的不定梢再生

Fig.1 Shoot regeneration from leaf explants of transgenic plants and non-transgenic plants on induction medium containing Km
a 和 b: 转基因植株叶片。a: Km 为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; b: Km 为 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。c 和 d: 非转基因植株叶片。c: Km 为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; d: Km 为 $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

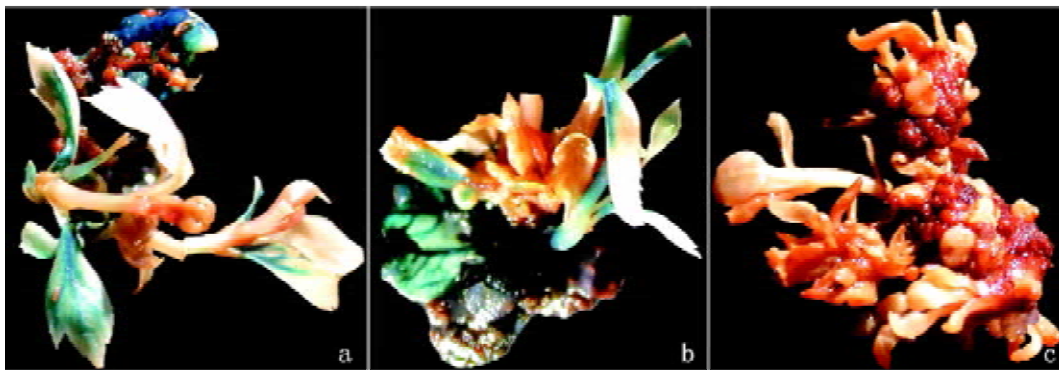


图2 转基因植株和非转基因植株叶片再生不定梢 GUS 稳定表达的组织化学分析

Fig.2 Histochemical analysis of GUS expression in adventitious shoots from leaves of transgenic and non-transgenic plants
a 和 b: 转基因植株叶片再生不定梢; c: 非转基因植株叶片再生不定梢。

再生不定梢没有GUS活性(图2-c)。这表明AtSUC2启动下的外源基因结合到梨转基因植株的基因组中,通过无性繁殖保存并传递给后代。

3 Km存在下转基因株系的生根能力

Km选择压存在下,转基因植株的生根能力比非转基因的植株明显提高(表1)。在生根培养基上附加5或10 mg·L⁻¹ Km不影响转基因植株的生根率,其生根率和在不加Km生根培养基上的生根率几乎相同。但Km却影响根的伸长,在不加Km的生根培养基上转基因植株可形成很长的根(图3-a),而在低浓度的5 mg·L⁻¹ Km下,根较粗、较短,延长培养时间也不能促使根伸长(图3-b)。当附加25 mg·L⁻¹ Km时,转基因植株的生根率大大下降,仅为42.6%,且根更短(图3-c),但根短并不影响移栽成活率(资料未列出)。而非转基因

表1 不同Km水平对转基因植株生根率的影响
Table 1 Effect of Km on rooting of pear transgenic lines

株系	Km 浓度 /mg·L ⁻¹				%
	0	5	10	25	
非转基因植株	95.8	0	0	0	
转GUS基因植株	95.6	95.6	95.1	42.6	

植株在含5 mg·L⁻¹ Km的生根培养基上不能生根(图3-d)。这说明Km选择压对转基因植株生根生长的影响大于对转基因植株增殖生长的影响,因为转基因株系在附加25 mg·L⁻¹ Km的MM上增殖与非转基因株系在MM上的增殖生长相似(资料未列出)。

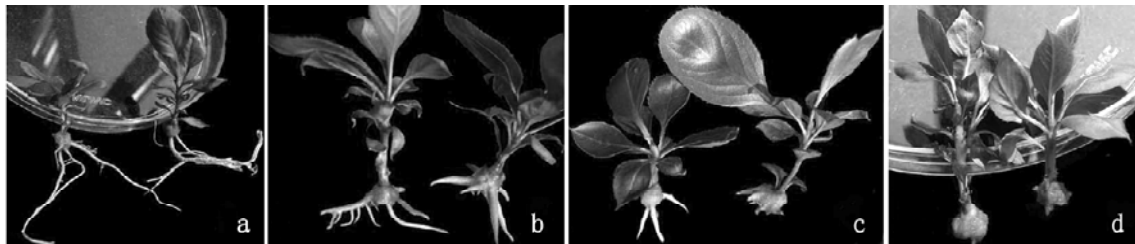


图3 Km对转基因植株和非转基因植株生根的影响

Fig.3 Effects of Km on rooting of transgenic and non-transgenic plants

a~c: 转基因植株。a: 0 mg·L⁻¹ Km; b: 5 mg·L⁻¹ Km; c: 25 mg·L⁻¹ Km。d: 非转基因植株(5 mg·L⁻¹ Km)。

讨 论

梨转基因植株叶片在Km选择压下,不定梢再生成功,获得的外源GUS基因在再生的不定梢中稳定表达,说明外源基因在转基因植株的无性繁殖后代中是遗传的,这和已有报道中的转基因油菜种子后代中分离出Km抗性植株并在这些抗性植株中检测到了Bt杀虫蛋白基因表达的结果(林良斌等2002)相类似。在Km选择压下,转基因植株的生根能力及其叶片不定梢再生能力都明显提高,但不定梢再生率低于未转基因植株在不加Km的培养基上的再生率(Sun等2005)。生根培养基中附加5或10 mg·L⁻¹ Km不影响转基因植株的生根率,但影响根的发育,抑制根的伸长。这表明转基因植株获得的外源基因的卡那霉素抗性水平有一定程度的抗性,而超过一定浓度即不再表

现出抗性。植物的不同组织类型对抗生素的敏感性不同,Bornhoff等(2005)报道葡萄胚性组织对Km非常敏感,10 mg·L⁻¹就可使其致死,而胚和发芽胚能耐受50~100 mg·L⁻¹ Km。本文中,转基因的梨植株的不同组织对Km的敏感性也不同,根比叶更敏感。

转基因植株的叶片再生不定梢不是所有芽梢都表现出GUS染色,其可能的原因有二:一是因为AtSUC2是拟南芥蔗糖-H⁺协同运输蛋白基因启动子,在源叶中高度表达,而在库中不表达(张凌云和张大鹏2003),即本文中表现的充分成长的芽梢组织中检测到较强的GUS活性(光合作用制造糖并运输到活跃生长部位),而在幼嫩芽梢组织中检测不到GUS活性(幼嫩组织需要糖的输入来支持其活跃的生长),这与已报道的转基因草莓中获得

的结果(Zhao等2004)一致;二是转基因的植株是嵌合体。

参考文献

- 华志华, 汪晓玲, 薛锐, 高振宇, 黄大年(1999). *Cecropin B* 转基因水稻及其后代抗白叶枯病研究初报. 中国水稻科学, 13 (2): 114~116
- 李旭刚, 谢迎秋, 朱祯(1998). 外源基因在转基因植物中的失活. 生物技术通报, (3): 1~8
- 林良斌, 官春云, 周小云, 何业华, 杨志新(2002). 转基因抗虫油菜中 *Bt* 杀虫蛋白基因稳定遗传和高效表达及抗性研究. 作物学报, 28 (2): 175~178
- 刘宗华, 汤继华, 李宝健, 范云六, 李桂玲, 季良越, 陈伟程(2003). 玉米转 *Bt* 基因自交系的抗玉米螟特性鉴定初报. 作物学报, 29 (4): 621~625
- 孙清荣, 孙洪雁, 赵衍, Hammond R, Davis R (2008). 梨韧皮部特异表达启动子 *AtSUC2* 驱动下的 *GUS* 基因的转化和表达. 园艺学报, (4): 487~492
- 张凌云, 张大鹏(2003). 光合同化物韧皮部卸载途径和机制. 植物生理学通讯, 39 (4): 399~403
- Bornhoff BA, Harst M, Zyprian E, Topfer R (2005). Transgenic plants of *Vitis vinifera* cv. Seyval blanc. Plant Cell Rep, 24: 433~438
- Jefferson RA (1987). Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. Plant Mol Biol Rep, 5: 387~405
- Sun Q, Davis RE, Zhao Y (2005). High frequency regeneration of plantlets from leaf explants of commercial pear (*Pyrus communis* L.) cultivars 'Onward' and 'Old Home'. In Vitro, 41: P-2058
- Zhao Y, Liu Q, Davis RE (2004). Transgene expression in strawberries driven by a heterologous phloem-specific promoter. Plant Cell Rep, 23: 224~230