

利用 *PMI* 选择标记进行杨树转基因体系的研究

查琳^{1,2}, 王伟东¹, 续晨³, 诸葛强^{1*}

(1. 南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037; 2. 无锡市林木种苗管理站, 江苏 无锡 214000;
3. 南京晓庄学院生命科学系, 江苏 南京 210000)

摘要: [目的] 利用不同于抗生素的 *PMI* 为选择标记基因的遗传转化体系, 对杨树进行双抗虫基因 (*Bt* 和 *CpTI*) 的转基因研究。建立杨树以 *PMI* 为安全标记基因的转基因体系, 为安全、高效的林木转基因育种研究提供实验依据。 [方法] 选择已有的转 *CpTI* 抗虫基因 (利用 Km^r 选择标记获得) 的美洲黑杨杂种优良无性系南林 895 杨 (*Populus × euramericana* ‘Nanlin895’) 为受体材料, 对杨树叶片、叶片分化芽、茎段生根的甘露糖敏感性等筛选优化, 采用农杆菌介导的方法进行双抗虫基因的研究。 [结果] 较为适合的杨树叶片筛选培养基为: 甘露糖 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和蔗糖 $22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 叶片分化芽筛选培养基为: 甘露糖 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和蔗糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 茎段生根筛选培养基: 甘露糖 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和蔗糖 $22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在此基础上, 获得了转 *Bt* 和 *CpTI* 双抗虫基因的植株 8 株。 [结论] 初步建立了以 *PMI* 为安全标记基因的杨树转基因体系: 确定了 *PMI* 筛选的最适选择压, 成功构建了含 *PMI* 选择标记基因的植物抗虫表达载体, 通过农杆菌介导的遗传转化最终获得了转双抗虫基因植株。

关键词: *PMI*; 选择标记; 南林 895 杨; 转基因体系; 抗虫

中图分类号: S792.119

文献标识码: A

Poplar Transgenic System by Using *PMI* as Biosafety Selective Marker

ZHA Lin^{1,2}, WANG Wei-dong¹, XU Chen³, ZHUGE Qiang¹

(1. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China;
2. Wuxi Forest Seed and Seedling Administration, Wuxi 214000, Jiangsu, China;
3. Bioscience Department of Nanjing, Xiaozhuang University, Nanjing 210000, Jiangsu, China)

Abstract: [Objective] Using the *PMI* different from antibiotic marker gene as selective marker gene to study poplar transgenic system with two insect-resistant genes (*Bt* and *CpTI*) and provide experimental data for high-efficient and safe transgenic tree breeding. [Method] *Populus × euramericana* ‘Nanlin895’ genetically modified by *CpTI* obtained by using Km^r selective marker was chosen as a receipt, and the mannose sensitivity of poplar leaves, bud growth and stem rooting in a medium were tested for studying poplar transgenic system with two insect-resistant genes by way of *Agrobacterum*-mediated transformation. [Result] The suitable composition for genetic transformation of poplar leaves was: Mannose $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + Sucrose $22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; for bud growth: Mannose $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + Sucrose $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; and for stem rooting: Mannose $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + Sucrose $22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Based on the results, eight transgenic plants with *Bt* and *CpTI* genes we obtained. [Conclusion] The transgenic system of poplar was initially established by use of biosafety selective marker *PMI*. The best selection pressure was determined. The plant anti-insect expression vector containing *PMI* selective marker gene was established, and the transgenic poplar with two insect-resistant genes

收稿日期: 2014-12-15

基金项目: 国家科技部“863 计划”课题(2013AA102703)、国家国际科技合作专项(2014DFG32440)、江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)

作者简介: 查琳, 硕士研究生, 工程师。主要研究方向: 分子植物育种。E-mail: 286555337@qq.com

* 通讯作者: 诸葛强, 博士生导师, 教授。主要研究方向: 分子植物育种。电话: 025-85428701 E-mail: qzhu@njfu.edu.cn

was obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation.

Keywords: *PMI*; selective marker; *Populus × euramericana* Nanlin895; transgenic system; insect resistance

随着基因工程的不断发展,转基因物种的应用日益增加,转基因物种释放后是否会将基因转移到野生植物中,或是否会破坏自然生态环境,打破原有生物种群的动态平衡。基因工程中普遍使用的选择标记基因是否安全以及转基因物种中的选择标记是否会对环境产生潜在的负面效应。这些问题已成为当今基因工程研究的热点^[1]。

磷酸甘露糖异构酶(Phosphomannose isomerase, *PMI*)基因编码可将6-磷酸甘露糖转变为6-磷酸果糖的6-磷酸甘露糖转移酶。在加有甘露糖的选择培养基上,植物内源己糖激酶催化甘露糖磷酸化为6-磷酸甘露糖,而非转化细胞由于不具备磷酸甘露糖异构酶基因,不能利用6-磷酸甘露糖,因而植物细胞缺少提供生长的碳源,导致生长停滞。而含有 *PMI* 基因的转化细胞能催化6-磷酸甘露糖转变为6-磷酸果糖,为细胞正常生长提供碳源。因此,在加有适当量甘露糖的选择培养基上只有转化细胞(已整合 *PMI* 基因)才能正常生长,而非转化细胞因缺乏碳源,生长逐渐停滞被淘汰^[2]。据以 *PMI* 为选择标记的转基因甜菜^[3]、拟南芥^[4]、玉米^[5]、小麦^[6]中 *PMI* 基因所编码的蛋白质进行敏感性评估、毒性测试、农艺性状、组成分析等方面的安全性评价,认为 *PMI* 作为选择标记基因的遗传转化筛选体系对人体健康和环境是安全的。

杨树作为林木植物的模式树种,利用 *PMI* 为选择标记基因对其进行的遗传转化研究在国内外尚未见报导。为验证采用 *PMI* 为选择标记开展杨树转基因研究的可行性,本研究以获得的转 *CpTI* 抗虫基因的南林895杨为受体材料,采用农杆菌介导的方法,利用不同于抗生素的 *PMI* 选择标记基因的遗传转化体系,进行双抗虫基因(*Bt* 和 *CpTI*)的转基因研究,建立杨树以 *PMI* 为安全标记基因的转基因体系,为安全、高效的林木转基因育种研究提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

材料为南林895杨(*Populus × euramericana* ‘Nanlin895’)已转 *CpTI* 抗虫基因的无菌苗,该植株利用 *Km^r* 选择标记获得^[7]。农杆菌 EHA105 为实验室保

存,含 *PMI* 选择标记基因的表达载体 pNOV2819 由美国 Novartis 公司惠赠(图1)、含 *Bt* 抗虫基因的载体 pB1121-2k 由中国林科院卢孟柱研究员惠赠(图2)。

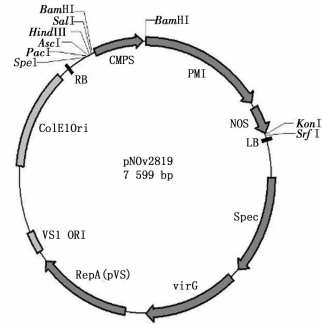


图1 质粒 pNOV2819

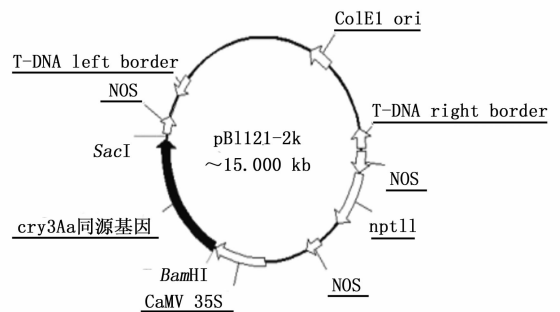


图2 质粒 pB1121-2k

甘露糖购自南京 Sunshine 有限公司。各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司,质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司,引物合成和 DNA 测序由 Invitrogen 公司完成。

1.2 甘露糖选择压的确定

1.2.1 叶片分化的甘露糖敏感性试验 选取南林895杨(已转 *CpTI*)无菌苗,取上部第3~5叶片,剪去叶边缘,去除主叶脉,剪成0.5~1.0 cm²小片,叶片的近轴面接触甘露糖分化筛选培养基,培养基的浓度各异^[1,8],设置16个浓度梯度分别为:甘露糖+蔗糖 = 0+30, 2+28, 4+26, 6+24, 8+22, 10+20, 12+18, 14+16, 16+14, 18+12, 20+10, 22+8, 24+6, 26+4, 28+2, 30+0(g·L⁻¹)。

每一浓度梯度共处理12个叶片,叶片背面朝下,在温度为(25±2)℃,12 h光/暗周期,光照度1500~2000 lax的条件下培养,4周后观察叶片的分化生长状态。

1.2.2 叶片分化芽的甘露糖敏感性试验 待叶片分化的不定芽长至1.5 cm高时,选择生长状态良好,大小一致的不定芽,置于含有不同浓度PMI的叶片分化芽培养基中进行培养,根据预筛选结果设置6种不同PMI浓度梯度分别为:甘露糖+蔗糖 = 0 + 30, 2 + 28, 4 + 26, 6 + 24, 8 + 22, 10 + 20 ($g \cdot L^{-1}$)。每处理5瓶,每瓶2个不定芽。3周后观察叶片分化芽状态,统计不定芽生长率。

1.2.3 茎段生根的甘露糖敏感性试验 选取组培苗生长一致的健壮茎段,切成3 cm长,接种在不同浓度PMI的生根培养基上,根据预筛选情况,设置6种不同PMI浓度梯度分别为甘露糖+蔗糖 = 0 + 30, 2 + 28, 4 + 26, 6 + 24, 8 + 22, 10 + 20 ($g \cdot L^{-1}$)。每处理5瓶,每瓶2个茎段。3周后观察茎段生根及生长状况,以确定生根筛选培养时PMI最适选择压浓度。

1.3 含PMI选择标记植物抗虫基因表达载体的构建

1.3.1 含*Bt*基因的DNA片段扩增及测序分析 以含有*cry3Aa*基因的克隆载体为模板,采用增加了酶切位点*Hind* III和*Sal* I的引物Bt-upper-yao3:5'-AAG CTT GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA AC-3';35S-NOS-lower:5'-CTG GTC GAC TTC GAT CTA GTA ACA TAG ATG-3',对目的片段CAMV35S-Bt-NOS进行PCR扩增。扩增出目的条带,大小在3 000 bp左右。

将PCR回收产物连接T载体PMD19上,得到载体PMD19-35S-Bt-NOS。经过转化,蓝白斑筛选,选择白斑进行摇菌,通过酶切鉴定转化子。将阳性克隆测序,再利用BLAST软件对测序结果进行相似性比较。经测序认为正确后,进行下一步的酶切。

1.3.2 酶切与连接 将PMD19-35S-Bt-NOS采用*Hind* III和*Sal* I进行双酶切,回收纯化目的片段,连接到利用相同双酶切的pNOV2819大片段中。连接产物转化大肠杆菌,进行酶切来确定载体pNOV2819-Bt是否构建成功。

1.3.3 农杆菌转化与保菌 提取pNOV2819-Bt,将其转入农杆菌EHA105,经PCR及酶切鉴定后,将菌株pNOV2819-Bt(EHA105)进行保菌。

1.4 pNOV2819-Bt植物表达载体转化南林895杨(已转*CpTI*基因)

将预培养的南林895杨外植体放入已稀释的农杆菌菌液中浸染,期间不断轻轻摇动,用干燥无

菌滤纸将叶盘表面多余菌液吸去,置于暗箱3 d后,放到分化培养基上进行共培养。共培养4 d后,先用加有头孢的无菌水($200 mg \cdot mL^{-1}$)冲洗3次,再用无菌水冲洗2次,以去除农杆菌,并转移到叶盘分化筛选培养基中。叶盘放到分化筛选培养基上后,两周更换培养基,直至分化出可见的抗性芽(转化率 = 抗性芽分化叶盘数/总叶盘数);当叶盘上长出不定芽时,将其转入芽伸长筛选培养基上;待抗性芽长至1 cm左右,须将每个抗性芽独立接入芽伸长培养基上培养;培养一段时间后将芽移入壮苗筛选培养基上培养直至长到2 cm左右,移入生根筛选培养基。在这个过程中,要及时用加有头孢的无菌水冲洗,及时更换培养基。培养过程培养条件为:温度为 $22^{\circ}C$,光照4 000 lx ,光照时间 $16 h \cdot d^{-1}$ 的温室。

1.5 转基因植株的分子检测

分别选取经PMI筛选获得的双抗虫基因南林895杨植株叶片,提取基因组DNA进行PCR检测。*Bt*基因的引物为:Upper:5'-CGC TAT TCC TCT TTT GGC AG-3';Lower:5'-GAA ATT CGC GGT ACC CAC TA-3'。*CpTI*基因的引物为:Primer 1:5'-AGA GGC TAT TCG GCT ATG ACT GG-3';Primer 2:5'-ATC GCC ATG GGT CAC GAC GAG AT-3'。以质粒DNA为阳性对照,未转化的植株DNA为阴性对照。扩增*Bt*基因的反应体系($20 \mu L$),PCR反应条件为: $94^{\circ}C$ 3 min 预变性后, $94^{\circ}C$ 30 s, $60^{\circ}C$ 30 s, $72^{\circ}C$ 45 s,共34个循环,最后 $72^{\circ}C$ 延伸10 min。扩增*CpTI*基因的反应体系($20 \mu L$),PCR反应条件为: $94^{\circ}C$ 3 min 预变性后, $94^{\circ}C$ 30 s, $55^{\circ}C$ 30 s, $72^{\circ}C$ 45 s,共34个循环,最后 $72^{\circ}C$ 延伸10 min。

2 结果与分析

2.1 PMI筛选最适选择压的确定

2.1.1 叶片分化筛选抗性芽PMI最适选择压的确定 在进行农杆菌侵染之前,对外植体进行抗生素的敏感性测定是必要的,一般认为附加一定浓度的筛选培养基中存活下来的细胞可初步认为是转化体。不同甘露糖浓度对外植体芽分化的影响不同,在续晨^[1]基础上,设置了不同的甘露糖和蔗糖浓度,来确定叶片分化PMI的临界浓度,筛选出转化芽,PMI对叶片分化的影响见表1(其中分化系数 = 总芽数/有芽叶片数)。

从表1可以看出,甘露糖对转基因杨树的叶片

表1 甘露糖浓度对杨树叶片分化的影响

甘露糖/ (g·L ⁻¹)	蔗糖/ (g·L ⁻¹)	参试叶 片数/个	有芽叶 片数/个	总芽 数/个	叶片分 化率/%	分化系 数/%
0	30	12	12	220	100	18.3
2	28	12	12	157	100	13.1
4	26	12	12	71	100	5.9
6	24	12	10	19	83	1.7
8	22	12	0	0	0	0
10	20	12	0	0	0	0
12	18	12	0	0	0	0
14	16	12	0	0	0	0
16	14	12	0	0	0	0
18	12	12	0	0	0	0
20	10	12	0	0	0	0
22	8	12	0	0	0	0
24	6	12	0	0	0	0
26	4	12	0	0	0	0
28	2	12	0	0	0	0
30	0	12	0	0	0	0

分化有显著影响。在甘露糖为6 g·L⁻¹时仍有83%的叶片能够分化,但分化系数却显著降低,总芽数明显减少。经过约半个月的观察发现,甘露糖为8 g·L⁻¹时没有芽分化,叶片呈黄绿色,而甘露糖为10 g·L⁻¹时叶片边缘已经褐化,甘露糖为16 g·L⁻¹及以上时叶片整个全部褐化死亡。随着甘露糖浓度的增加,芽的生长明显受到了抑制,可能是甘露糖对外植体产生拮抗作用。当甘露糖浓度为8 g·L⁻¹时,完全不分化,因此该浓度为南林895杨树叶片分化的本底临界浓度。结果显示采用甘露糖8 g·L⁻¹+蔗糖22 g·L⁻¹作为南林895杨筛选浓度较为理想。

2.1.2 叶片分化芽筛选时 PMI 最适选择压的确定

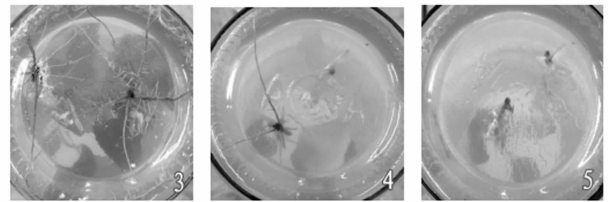
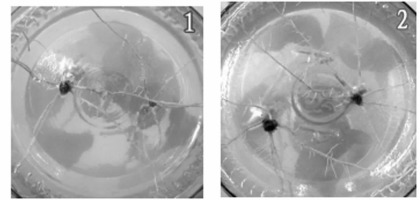
将由叶片分化的不定芽接种到含有不同甘露糖浓度的叶片分化芽培养基上,培养3周左右时,可观察到不同甘露糖浓度对不定芽的生长有一定的影响。由表2可知,在甘露糖为8 g·L⁻¹时叶片分化芽生长状态良好,其中甘露糖分别为0、2、4、6、8 g·L⁻¹浓度时几乎都发生芽生长,差异不是很明显,但甘露糖为10 g·L⁻¹开始,芽长势不好。因此,选择甘露糖10 g·L⁻¹+蔗糖20 g·L⁻¹作为筛选叶片分化芽培养基。

2.1.3 茎段生根筛选 PMI 最适选择压的确定 转化植株在生长和扩繁过程中必须加入选择筛选标记,不加或加入的量较少,可能会造成目的基因丢失,但如果过量,会抑制转化植株生长甚至造成死亡。当甘露糖为0 g·L⁻¹时,培养约一周茎段的基部就膨大,并很快产生不定根,根系特别发达。当甘露糖为2 g·L⁻¹时,茎段基部也快速膨大,根系呈星

状,生长旺盛;但随甘露糖浓度的增加,生根率明显下降,并且根的生长状况越来越差(图3)。结果显示(表3)采用甘露糖8 g·L⁻¹+蔗糖22 g·L⁻¹作为南林895杨的筛选生根浓度较为理想。

表2 甘露糖浓度对杨树叶片分化芽的影响

甘露糖/ (g·L ⁻¹)	蔗糖/ (g·L ⁻¹)	参试芽 数/个	叶片分化 芽数/个	芽生长 率/%	芽的生长 情况
0	30	10	10	100	芽生长状态良好
2	28	10	10	100	芽生长状态良好
4	26	10	10	100	芽生长状态良好
6	24	10	10	100	芽生长状态良好
8	22	10	10	80	芽生长状态良好
10	20	10	0	0	芽生长状态不好,几乎不生长
12	18	10	0	0	芽生长状态不好,几乎不生长
14	16	10	0	0	芽生长状态不好,几乎不生长



注:(1)甘露糖为0 g·L⁻¹时生根情况(2)甘露糖为2 g·L⁻¹时生根情况(3)甘露糖为4 g·L⁻¹时生根情况(4)甘露糖为6 g·L⁻¹时生根情况(5)甘露糖为8 g·L⁻¹时生根情况

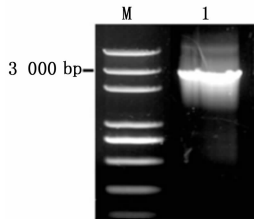
图3 不同甘露糖浓度对茎段生根的影响

表3 甘露糖浓度对杨树茎段生根的影响

甘露糖/ (g·L ⁻¹)	蔗糖/ (g·L ⁻¹)	茎段 数/个	生根 数/个	生根 率/%	茎段生根及 生长情况
0	30	10	10	100	生长旺盛,根系发达,呈星状
2	28	10	10	100	生长旺盛,根系呈星状
4	26	10	8	80	生长良好,根系一部分呈星状,一部分呈放射状
6	24	10	5	50	一部分生根,茎段基部膨大
8	22	10	0	0	生长受抑制,茎段几部不膨大

2.2 含 PMI 选择标记基因植物抗虫表达载体构建

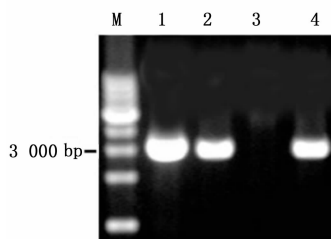
2.2.1 含 *Bt* 基因片段的扩增及序列分析 以含有 *cry3Aa* 基因的克隆载体为模板,采用增加了酶切位点 *Hind* III 和 *Sal* I 的引物 Bt-upper-yao3 和 35S-NOS-lower,对目的片段 CaMV35S-Bt-NOS 进行 PCR 扩增。扩增获得了目的条带,大小在 3 000 bp 左右,与预期一致(图 4)。



注:M: plus DL2000 ;1: *Bt* 基因表达盒
图4 *Bt* 基因表达盒的 PCR 扩增结果

将 PCR 扩增片段测序结果在 NCBI 数据库进行比对,发现它与 *Bt886Cry3Aa* 序列高度同源,同源性达 99%,表明扩增出的条带应是 *Bt* 基因表达盒。

2.2.2 酶切和连接 将获得的载体 PMD19-35S-Bt-NOS 采用 *Hind* III 和 *Sal* I 进行双酶切,回收纯化目的片段,连接到利用相同双酶切的 pNOV2819 大片段中。构建了 pNOV2819-Bt 的植物表达载体(图 5),可以用于植物遗传转化。



注:M:1 Kb DNA Ladder;1~4:pNOV2819-Bt 转化子
图5 pNOV2819-Bt 表达载体的酶切鉴定

2.3 农杆菌介导的遗传转化

2.3.1 菌液浓度对芽生长的影响 采用分光光度计测定农杆菌的浓度,设置 *OD* 值为 0.5、1.0、1.5 三个梯度来研究农杆菌侵染适宜的浓度。通过试验发现,*OD* 值达到 1.5 时,菌液中有大量的白色絮状沉淀,说明农杆菌进入生长平台期,开始有大量菌死亡,转化率也大大降低。而 *OD* 值在 0.5 时,菌液较清澈,不混浊,且后期统计的转化率非常低。*OD* 值为 1.0 时,菌液混浊,后期统计的转化率比其他两个浓度要高的多。

2.3.2 转基因杨树的获得 载体 pNOV2819-Bt 利用农杆菌 EHA105 介导,共转化法转化南林 895 杨。统计其转化叶盘在筛选培养基上分化产生的抗性芽数量。转化率评价指标为筛选培养基上培养 30 d 后产生抗性芽的外植体数。各次转化的分化情况统计结果如表 4。

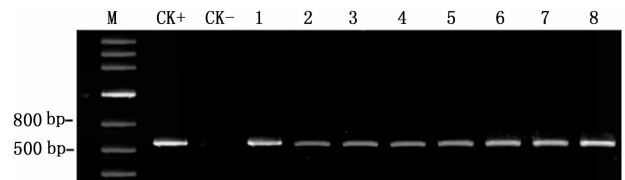
表4 转化效率

转化次数	总叶盘数/个	分化叶盘数/个	转化率/%
1	75	12	16.00
2	79	15	18.99
3	68	10	14.71
4	82	19	23.17
5	99	21	21.21
6	73	8	10.96
7	78	11	14.10
8	89	7	7.86
9	87	13	14.94
10	71	18	25.35
11	65	12	18.46
12	72	10	13.89

从表 4 可知,每次转化效率都不同,所受影响因素很多。平均转化率为 16.64%。

2.4 转基因植株的分子检测

所用的转 *CpTI* 基因植株经多次继代后,可能会导致原有基因的逃逸。在利用 PMI 作为选择标记基因进行双抗虫基因(*Bt* 和 *CpTI*)的遗传转化前需进行分析筛选(图 6)。



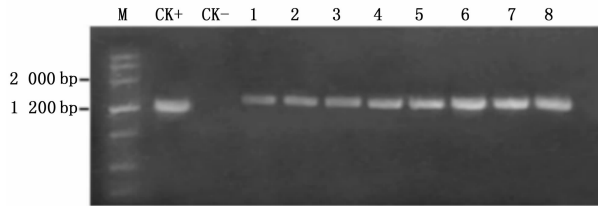
注:M:Marker III;CK+:质粒 pFZY1(阳性对照);CK-:非转化植株(阴性对照);1~8:部分转化植株

图6 部分转 *CpTI* 植株的 PCR 检测

通过 PCR 分析(图 7),初步证明 *Bt* 基因已转入杨树基因组中,并获得了一批转双抗虫基因(*Bt* 和 *CpTI*)的杨树植株。

3 讨论

含 PMI 选择标记基因的植物抗虫表达载体 pNOV2819-Bt 的构建采用了先克隆出含 *Bt* 基因的表达盒,经测序后获得了 *Bt* 基因的序列,再酶切连接的方法。采用这一构建路线的原因是如果采用直接酶切的方法,存在不精确的情况,有可能会影响到



注: M: Marker III; CK+: 质粒 pNOV2819-Bt (阳性对照); CK-: 非转化植株 (阴性对照); 1~8: 转化植株

图 7 转 *Bt* 植株的 PCR 检测

连接,因此,将启动子、终止子和基因片段一起插入 pNOV2819 载体,可以有效解决这一问题。

杨树作为木本植物,其生根时间和难度远远大于一些农作物^[9-10]、草本植物^[11]和花卉^[12]。采用传统的抗生素或除草剂等筛选方法获得的转基因芽再生根相当困难,而甘露糖筛选从原理上是促进生根,对转基因芽生根能力的抑制要减少许多,能够在相对较短的时间里得到更多数量的转基因苗。

PMI 作为一种正向筛选标记基因,它不同于大多数抗生素和除草剂等负筛选标记,对植物没有直接的毒害作用,而是作为一种额外的糖源,转化细胞可以将甘露糖转变成 6-磷酸果糖,并继续代谢为细胞提供能量,因此表现为生长方面的优势^[13]。而非转化细胞由于没有 *PMI* 基因催化后的产物 6-磷酸甘露糖,因而不能利用甘露糖作为碳源,生长受抑停止。近年来,该筛选体系已成功应用于甜菜^[3]、拟南芥^[4]、玉米^[5]、小麦^[6]等植物的遗传转化。因此甘露糖筛选体系是较理想的遗传转化选择系统,具有广阔的应用前景。但是,此系统也有一定的局限性,并不是所有的植物都可以用此系统进行筛选^[14]。如甘露糖对烟草没有筛选作用,通过试验发现烟草叶片对甘露糖不敏感。不同植物对甘露糖有不同的敏感性。可能的原因是:植物中的新陈代谢途径相当复杂,不同植物新陈代谢途径差异较大,有些植物可能缺少将甘露糖转变为 6-磷酸-甘露糖的酶。此外,甘露糖是糖蛋白和细胞壁的重要糖分子,有些植物可以利用 1-磷酸-甘露糖合成糖蛋白、细胞壁中的多糖物质、维生素 C 等。有些植物也可能有自身的酶将 6-磷酸-甘露糖转变为 6-磷酸-果糖,如 PMM。如果植物中内源的甘露糖酶活性太高,则植物可能不会对甘露糖敏感。因此,有些植物不适用甘露糖做筛选剂^[15]。

4 结 论

研究首次建立了 *PMI* 为选择标记基因的杨树

转基因筛选体系,确定了 *PMI* 筛选的最适选择压,成功构建了含 *PMI* 选择标记基因的植物抗虫表达载体,通过农杆菌介导的遗传转化,获得了转基因杨树,为安全、高效的杨树转基因育种研究提供了实验依据。

参 考 文 献:

- [1] 续 晨,磷酸甘露糖异构酶基因选择标记遗传转化系统的研究 [D],硕士学位论文,南京林业大学,导师:诸葛强,2005:1-60.
- [2] Reed J., Privallel M., Powell L. *et al.* Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation [J]. *In Vitro Cell Dev Boil Plant*, 2001, 37: 127-132.
- [3] Joersbo M., Donaldson I., Kreiberg J., *et al.* Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet [J]. *Molecular Breeding*, 1998, 4(2): 111-117.
- [4] Todd R., Tague B. W. Phosphomannose isomerase: A versatile selectable marker for *Arabidopsis thaliana* germ-line transformation, *Plant Molecular Biology Reports* [J]. 2001, 19: 307-319.
- [5] Negrotto D., Jolley M., Beer S., *et al.* The use of phosphomannose isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plant via *Agrobacterium* transformation, *Plant Cell Reports* [J]. 2000, 19(8): 798-803.
- [6] Wright M., Dawson J., Dunder E., *et al.* Efficient biolistic transformation of maize and wheat using the phosphomannose isomerase gene, *pmi* as the selectable marker, *Plant Cell Reports* [J]. 2001, 20(5): 429-436.
- [7] 诸葛强,房 丹,李秀芬,等.美洲黑杨杂种优良无性系转抗虫基因 (*Bt* 和 *CpTI*) 的研究, *分子植物育种* [J]. 2006, 4(6): 819-824.
- [8] 杨彩云,尹伟伦,夏新莉.甘露糖正向筛选体系的建立及在拟南芥遗传转化中的应用 [J]. *分子植物育种*, 2009, 7(6): 1120-1129.
- [9] 王彩芬,付永彩,朱作峰,等.水稻遗传转化甘露糖安全筛选体系的建立 [J]. *西北农业学报*, 2007, 16(2): 41-45.
- [10] 黄 皓,雷建军,曹必好,等.利用 *pmi* 作为筛选基因对辣椒进行 *Bt* 基因转化的研究 [J]. *辣椒杂志*, 2013, (2): 23-28.
- [11] 高世武,阙友雄,郭晋隆,等.甘露糖筛选体系的建立及在甘蔗转基因中的应用 [J]. *热带作物学报*, 2010, 31(5): 789-796.
- [12] 成丽娜,魏 倩, Muhammad Imtiaz, 等.转基因育种技术在菊花性状改良中的应用进展 [J]. *园艺学报*, 2013(9): 1813-1825.
- [13] Weisser P., Kramer R., Sprenger G. A. Expression of the *Escherichia coli pmi* gene, encoding phosphomannose isomerase in *Zymomonas mobilis*, leads to utilization of mannose as a novel growth substrate, which can be used as a selective marker [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(11): 4155-4161.
- [14] Kim J. Y., Jung M., Kim H. S., *et al.* A new selection system for pepper regeneration by mannose [J]. *J. Plant Biotechnology*, 2002, 4(3): 129-134.
- [15] 续 晨,王伟东,查 琳,等.转基因林木中安全标记基因的研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2008, 6(5): 954-958.

(责任编辑:张 研)