

基因枪法将 *GAI* 基因导入巴西橡胶的研究

王颖, 陈雄庭*, 张秀娟, 彭明

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所 热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101)

摘要: 为了探讨利用基因工程技术进行橡胶树品质改良的可行性, 用基因枪轰击巴西橡胶(*Hevea brasiliensis*)愈伤组织, 将 *GAI* 矮化基因导入橡胶受体中, 通过 50 mg L⁻¹ 卡那霉素筛选鉴定, 优化了基因枪法转化橡胶的各种参数。结果表明, DNA 金弹与靶细胞的距离为 9 cm, 每皿轰击一次时, 胚状体诱导率可以达到 1.87%。经过 *GUS* 组织染色和 PCR 扩增鉴定, 初步确定 *GAI* 基因已经整合到橡胶基因组中。

关键词: 巴西橡胶; 基因枪; *GAI* 基因; 遗传转化

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)03-0179-04

Transfer of *GAI* Gene into *Hevea brasiliensis* by Particle Bombardment

WANG Ying, CHEN Xiong-ting*, ZHANG Xiu-juan, PENG Ming

(State Key Laboratory for Tropical Crops Biotechnology, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: *GAI* gene was transferred to calli from anther culture of *Hevea brasiliensis* by particle bombardment to develop dwarf rubber trees. Plant material was bombarded with plasmid PBI121 containing kanamycin resistant, *GUS* and *GAI* genes. Kanamycin concentration at 50 mg L⁻¹ was used as selection pressure after concentration gradient experiments. The experiments showed that each plate of *Hevea* calli, which was bombarded once by gold particles coated with the plasmid and the distance between particles and target cells at 9 cm, had good results, the embryoid induction rate reaching to 1.87%. It was confirmed that *GAI* gene had been inserted into *Hevea* genome as detected by histochemical staining using X-gluc and PCR analysis.

Key words: *Hevea brasiliensis*; Particle bombardment; *GAI* gene; Genetic transformation

全世界大约有 2 000 多种植物可以合成天然橡胶, 巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)因胶乳产量高、质量好、易于获取而具有商业开发价值, 成为世界上天然橡胶的主要来源。由于巴西橡胶树是多年生乔木, 常规育种周期长, 选育种受到很大的限制。不断发展的基因工程技术解决了传统育种中不能突破的问题, 其优点在于可有目的地改变植物的某一

性状而不影响其他性状, 并缩短育种周期。随着转基因技术的日臻完善, 目前已经获得了许多转基因植物, 但是橡胶树的基因转化仍存在很大困难。1994 年 Arokiaraj 等利用基因枪法获得了第一株转基因橡胶植株^[1]。1998 年他们又尝试用农杆菌介导法转化橡胶愈伤组织, 但是转化效率很低^[2]。2000 年 Montoro 等人研究了钙在橡胶的农杆菌转化中的

收稿日期: 2005-11-28 接受日期: 2006-03-16

基金项目: 国家自然科学基金(30460114); 热带作物生物技术国家重点实验室开放基金项目(KL200401); 中国热带农业科学院重点科技项目(Rykj0201)资助

致谢: 彭世清、李维国、吴坤鑫、崔百明、徐碧玉等同志参加部分工作。

* 通讯作者 Corresponding author

作用,但并没有得到转基因植株^[1]。一些植物的矮化突变体是由于体内赤霉素(GA)含量低,或对 GA 不敏感^[2],从而引起植株矮化,因此,降低植物体内 GA 的浓度和减少植物对 GA 的敏感性都可能改变植物的高度,获得矮化植株。*GAI* 是一个在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中发现的 GA 应答的负调控因子,过量表达会引起植株矮化^[3]。本研究以 *GUS* 基因为报告基因, NPT II (新霉素磷酸转移酶, Neomycin phosphotransferase) 基因为筛选标记基因,用基因枪轰击橡胶愈伤组织进行转化实验,将 *GAI* 矮化基因导入巴西橡胶,对基因枪转化橡胶愈伤组织的方法进行了初步探索,旨在建立巴西橡胶的基因枪转化体系,为利用基因工程技术培育矮生橡胶品种奠定基础。

1 材料和方法

植物材料 为巴西橡胶 (*Hevea brasiliensis*) 品种海垦 2, 橡胶花采自中国热带农业科学院实验农场。

转化载体 转化载体质粒 PBI121, 由本研究所彭世清博士提供, 其中含有卡那霉素 (kanamycin) 抗性基因和 *GUS* 报告基因, 目的基因为 *GAI* 基因^[4]。

质粒 DNA 提取 参照《分子克隆实验指南》^[5] 大肠杆菌碱裂解抽提法制备质粒 DNA。

愈伤组织诱导 橡胶花选取发育阶段处于单核晚期的雄花, 用纱布包好, 70% 酒精表面消毒 30 s, 0.2% HgCl₂ 消毒 10 min, 再用无菌水冲洗 4-5 次, 然后剥出花药, 接种于愈伤组织诱导培养基上^[6], 培养室保持白天 26-27℃, 晚上 24-25℃, 暗培养 35-40 d 后即可用于转化。

基因枪转化 微弹的制备程序参照 Becker 等^[7]的方法。将橡胶愈伤组织暗培养 35-40 d 后, 转入培养皿中预培养 2 d, 将含有 *GAI* 基因的质粒 DNA 包裹于金粉表面, 用基因枪轰击转化已经预培养好的橡胶愈伤组织, 轰击时氦气压力为 1 100 psi, 射程为 6 cm、9 cm, 每枪金粉用量为 0.5 mg, 轰击一次。轰击后愈伤组织暗培养 2-5 d 后转入加有 50 mg L⁻¹ 卡那霉素的愈伤组织诱导培养基中。15 d 左右转入胚状体诱导培养基中, 每 20 d 继代一次。

卡那霉素选择压的确定 将培养了 40 d 的

橡胶愈伤组织置于含有卡那霉素浓度分别为 0 mg L⁻¹、20 mg L⁻¹、50 mg L⁻¹、100 mg L⁻¹、150 mg L⁻¹ 的愈伤组织诱导培养基上, 经过 15 d 的暗培养后, 观察愈伤组织生长情况。

***GUS* 基因的表达检测** 基因枪轰击后, 取经过一段时间培养的橡胶愈伤组织和胚状体浸泡在 X-Gluc 染色液中染色^[8], 于 37℃ 保温培养 20-24 h, 取出材料后, 用 75% 的乙醇漂洗, 再先后用 20% 乙醇, 50% 乙醇各浸泡 20 min 以上, 分别用肉眼和显微镜观察染色情况, 染色材料在 80% 乙醇的 FAA 固定液中保存。

PCR 检测 橡胶 DNA 提取参照《植物基因工程》^[10]的方法。根据 *GAI* 基因序列设计引物: P1: 5'-ATGAAGAGAGATCATCATCATCAT-3'; P2: 5'-CTAATTGGTGGAGAGAGTTTCCAAGC-3'。以橡胶 DNA 为模板, 94℃ 预变性 3 min, 反应条件: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 35 个循环后在 72℃ 中继续延伸 10 min, 于 4℃ 保存。

2 结果和分析

2.1 微弹射程对基因转化的影响

取 282 块生长良好的橡胶愈伤组织预培养 2 d, 然后进行基因枪转化。其中 107 块愈伤组织用 9 cm 的射程, 75 块愈伤组织用 6 cm 的射程, 各轰击 1 次。恢复培养 2-5 d 以后, 转入加有 50 mg L⁻¹ 卡那霉素的胚诱导培养基中, 20 d 后, 观察到在本实验中 9 cm 射程的效果比较好, 胚状体诱导率为 1.87% (图版 I: 1), 而以 6 cm 的射程轰击几乎很难诱导出胚状体(图版 I: 2)。

2.2 卡那霉素浓度对橡胶愈伤组织的筛选

为了确定转化植株的筛选浓度, 本研究采用不同的卡那霉素浓度梯度对正常的橡胶愈伤组织进行了抑制实验, 将橡胶愈伤组织分别置于含有卡那霉素 0 mg L⁻¹、20 mg L⁻¹、50 mg L⁻¹、100 mg L⁻¹、150 mg L⁻¹ 的培养基上, 15 d 后观察愈伤组织的生长情况, 结果表明, 经 50 mg L⁻¹ 以上卡那霉素处理后, 愈伤组织不再生长, 因此, 选择 50 mg L⁻¹ 作为转化愈伤组织的选择压。

2.3 *GUS* 基因的表达检测

基因枪轰击后, 经过一段时间的恢复培养, 取生长良好的橡胶愈伤组织, 以未转基因愈伤组织作

对照, 进行 X-Gluc 染色, 同时将轰击后的愈伤组织压片在显微镜下观察。基因枪轰击的愈伤组织经 X-Gluc 染色后溶液出现明显的蓝色, 而未转基因的愈伤组织 X-Gluc 染色后溶液没有出现蓝色(图版 1: 3)。从图版 1: 4 中也可以看出, 转化的愈伤组织在白色背景下出现了蓝色斑点。说明经过基因枪轰击后, *GUS* 基因已经在橡胶愈伤组织中有瞬时表达。

经过几次继代培养, 取生长出的胚状体和未转基因胚状体作对照进行 X-Gluc 染色, 同时作组织切片在显微镜下观察。从图版 1: 5 可以看出, 转化的胚状体 X-Gluc 染色后溶液出现明显的蓝色, 而未转基因的胚状体没有出现蓝色。从图版 1: 6 中也可以看出, 转化的胚状体出现了蓝色斑点。说明经过几次继代培养后, *GUS* 基因在橡胶组织中已经稳定表达。

2.4 胚状体成熟和 PCR 检测

将转化的愈伤组织转到胚状体的分化培养基上暗培养 50-60 d 后, 将诱导出的胚状体转移到胚萌培养基中, 15 d 后胚状体开始出现绿色芽点, 然后芽点伸长, 有的胚状体会长出幼根(图版 1: 7)。

提取 *GUS* 基因稳定表达的橡胶胚状体 DNA 作模板, 以质粒为阳性对照, 未转基因胚状体为阴性对照, 根据 *GAI* 基因序列设计引物, 进行 PCR 检测。如图 1 所示, 橡胶转化胚状体可以扩增出一条与阳性对照大小一致, 长为 1 500 bp 的片段, 而未转基因胚状体没有扩增出任何条带。从 PCR 检测结果可以初步证明 *GAI* 基因已整合到橡胶基因组中。

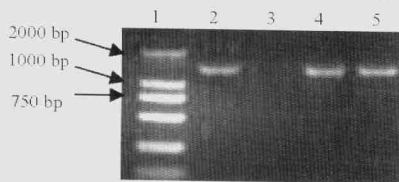


图 1 PCR 检测结果

Fig. 1 PCR analysis results

1: Marker; 2: 阳性对照 Positive control; 3: 阴性对照 Negative control; 4: 5: 转基因胚状体 Transgenic embryo

3 讨论

使用基因枪的基因转化效率的高低受许多因

素的影响, 受体的生长状态、微弹射程、轰击次数以及筛选程序都是影响转化效率的重要限制因子^[4]。一个高效的转化系统既要使受体有较高的转化效率, 同时也要使受体受到尽量小的伤害, 以免影响受体的生理活力, 从而导致受体再生能力的下降。曲同宝等研究表明, 转化效率与微弹射程相关, 认为氦气压力为 1 100 psi 时, 9 cm 射程轰击一次的效果较好^[4]。在本研究中, 基因枪微弹射程为 6 cm 时, 轰击后橡胶受体细胞受损严重, 褐化较多, 影响其正常的生理代谢能力, 几乎很难诱导出胚状体。而射程为 9 cm 时, 橡胶愈伤组织褐化明显减少, 且胚状体诱导率明显提高, 所以认为 9 cm 射程效果较好。但在实验中发现橡胶愈伤组织经过基因枪轰击后, 褐化程度比较严重, 胚状体再生率和出苗率都较低, 如何减小愈伤组织的褐化程度, 有效提高转化率, 需要进一步的探讨。

通过对转化的愈伤组织和胚状体进行 *GUS* 检测, 从橡胶的不同发育阶段证明了 *GUS* 基因已经在橡胶基因组中稳定表达。并经 PCR 检测表明, *GAI* 基因已经整合到基因组中, 为橡胶的成功转化提供了最直接的证据, 但外源基因能否稳定遗传以及在染色体上的整合机制如何, 还有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] Arokiraj P, Jones H, Cheong K F, et al. Gene insertion into *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Cell Rep, 1994, 13:425-431.
- [2] Arokiraj P, Yeang H Y, Cheong K F, et al. CaMV 35S promoter directs β -glucuronidase expression in the laticiferous system of transgenic *Hevea brasiliensis* (rubber tree) [J]. Plant Cell Rep, 1998, 17:621-625.
- [3] Montoro P, Teinsree N, Rattana W, et al. Effect of exogenous calcium on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) friable calli [J]. Plant Cell Rep, 2000, 19:851-855.
- [4] Ross J J, Murfet I C, Reid J B. Gibberellin mutants [J]. Physiol Plant, 1997, 100:550-560.
- [5] Peng J, Carol P, Richards D E, et al. The *Arabidopsis GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses [J]. Genes Dev, 1997, 11:3194-3205.
- [6] Peng S Q(彭世清), Chen S C(陈守才). Obtaining dwarf plants by expression of an *Arabidopsis GAI* gene in tobacco [J]. Agri Biotech (农业生物技术学报), 2005, 13(3):388-389 (in Chinese)
- [7] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002, 27-30.
- [8] Wang Z Y(王泽云), Zeng X S(曾宪松), Cheng C Q(陈传琴), et al. Induction of rubber plantlets from anther of *Hevea brasiliensis*

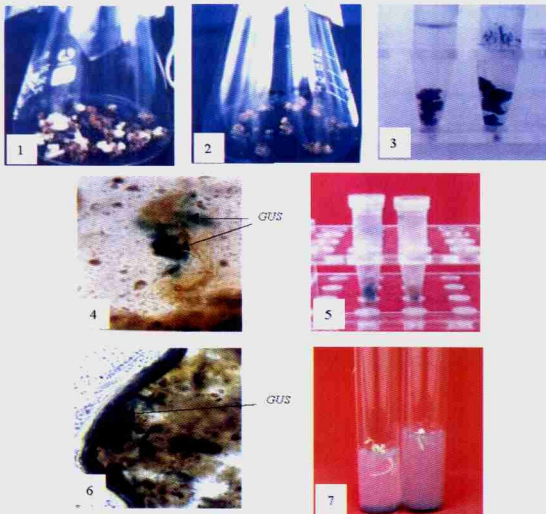
- Muell. Arg. *in vitro* [J]. Chin J Trop Cropst(热带作物学报), 1980, 1(1):16-25. (in Chinese)
- [9] Becker D, Brettschneider R, Lorz H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue [J]. Plant J, 1994, 5(2):299-307.
- [10] Wang G L (王关林), Fang H J (方宏筠). Plant Genetic Engineering [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2002. 742-744. (in Chinese)
- [11] Ren J P (任江萍), Li L (李磊), Wang X G (王新国), et al. Establishment of a microprojectile bombardment mediated transformation system for barley [J]. J Mout Agri Biol(山地农业生物学报), 2005, 24(3):189-193. (in Chinese)
- [12] Qu T B (曲同宝), Wang P W (王平武). Studies on transformation of *BADH* gene into *Leymus chinensis*. [J]. Grassland China (中国草地), 2005, 27(2):27-30. (in Chinese)

图版说明

图版 I:

1. 射程为 9 cm 诱导的橡胶胚状体;

2. 射程为 6 cm 诱导的橡胶胚状体;
3. 愈伤组织的 *GUS* 表达, 左为对照, 右为转化的愈伤组织;
4. 转化的愈伤组织切片, 示 *GUS* 基因表达(蓝色斑点);
5. 胚状体的 *GUS* 表达, 左为转化的胚状体, 右为对照
6. 转化的胚状体切片, 示 *GUS* 基因表达(蓝色);
7. 转化的胚状体进行分化培养。



王颖等: 图版 I

WANG Y, et al.: Plate I

Explanation of plate

Plate I:

1. Induced embryos of *Hevea* by bombardment at a distance of 9 cm;
2. Induced embryos of *Hevea* by bombardment at a distance of 6 cm;
3. *GUS* expression in *Hevea* calli. left: control, right: transgenic calli;
4. Slide of transgenic calli showing *GUS* expression (blue spots);
5. *GUS* expression in *Hevea* embryos. Transgenic embryos (left) and the control (right);
6. Slide of transgenic embryo showing *GUS* expression (blue);
7. Differentiation culture of transgenic embryos.