

基因枪法获得 *GAI* 转基因橡胶树植株的研究

洪磊^{1,2}, 王颖¹, 陈雄庭^{1*}, 张秀娟¹

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海口 571101; 2. 庐江中学, 安徽 庐江 231500)

摘要: 将含有 Camv35S 启动子、卡那霉素抗性基因和 *GUS* 报告基因, 目的基因为 *GAI* 基因的转化载体质粒 pBI121, 通过基因枪轰击巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell.-Arg.)花药愈伤组织, 50 mg L⁻¹卡那霉素的继代培养基进行抗性筛选。获得了抗性再生植株, 经过 PCR、Southern 检测结果表明: *GAI* 基因已经成功转入橡胶树基因组中。

关键词: 巴西橡胶树; 基因枪; *GAI* 基因

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)02-0165-05

Studies on *GAI* Transgenic Plants of *Hevea brasiliensis* by Particle Bombardment

HONG Lei^{1,2}, WANG Ying¹, CHEN Xiong-ting^{1*}, ZHANG Xiu-juan¹

(1. Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 2. Lujiang High School, Lujiang 231500, China)

Abstract: The vector pBI121 particle, which contains Camv35S promoter, kanamycin resistance gene, *GUS* reporter gene and *GAI* gene, was transferred into the *Hevea brasiliensis* anther callus by particle bombardment. The regenerated plantlets were obtained in the subculture media supplemented with kanamycin of 50 mg L⁻¹. PCR and Southern Blotting demonstrated that the *GAI* gene was transferred into the *H. brasiliensis* genome successfully.

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

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell.-Arg.)是天然橡胶的主要来源, 由于我国橡胶产区受台风影响较大, 风害严重制约着我国天然橡胶的发展。对巴西橡胶树的转基因研究已有报道^[1], Arokiaraj 等^[2-3]应用基因枪法和农杆菌介导法, 成功地将 β -葡萄糖苷酸酶(*GUS*)和新霉素磷酸转移酶基因转入橡胶树中; Montoro 等^[4-5]用继代的易碎内珠被脱分化愈伤组织为受体进行转化, 研究了钙在农杆菌转化橡胶树中的作用, 并成功获得转基因植株; 李维国等^[6]以花药脱分化愈伤组织为受体, 将木薯(*Manihot esculenta*)*SOD* 基因导入橡胶树, 获得转基因胚状体和小植株; 王颖等^[7]用基因枪轰击橡胶树花药脱分化愈伤组织, 将 *GAI* 矮化基因导入巴西橡胶树,

并初步确定 *GAI* 基因已经整合到橡胶基因组中。Jayashree 等^[8]以花药脱分化愈伤组织为受体, 用农杆菌介导法将 *GUS* 基因和 *SOD* 基因成功转入橡胶树中, 在转基因后代中能稳定表达。

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* 不敏感而导致的, 因此, 降低植物体内 *GA* 浓度和对 *GA* 的敏感性都可能获得矮化植株。*GAI* 是拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中 *GA* 应答的负调控因子, 过量表达引起植株对 *GA* 的不敏感, 使植株矮化。目前已有通过转入 *GAI* 基因获得转基因矮化植株的报道^[9]。本研究以 *GUS* 基因为报告基因, *NPT II* (新霉素磷酸转移酶)基因为筛选标记基因, 用基因枪轰击橡胶愈伤组织进行转

收稿日期: 2009-03-27 接受日期: 2009-08-02

基金项目: 国家自然科学基金(30660098); 中国热带农业科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ITBBZD200711)资助

* 通讯作者 Corresponding author, email: cxt66988063@163.com

化,将 *GAI* 矮化基因导入巴西橡胶树,为巴西橡胶树的基因转化提供科学参考。

1 材料和方法

1.1 材料

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)品种海垦 2 号,花采自中国热带农业科学院实验农场。转化载体质粒 PBI121 由本研究所彭世清博士提供,其中含有 35S 启动子、卡那霉素(Kanamycin)抗性基因和 *GUS* 报告基因,目的基因为 *GAI* 基因。质粒 DNA 提取用大肠杆菌碱裂解抽提法^[10]。

1.2 愈伤组织诱导

选取单核晚期的巴西橡胶树雄花,用纱布包好,70%酒精表面消毒 30 s,0.2% HgCl_2 浸泡消毒 10 min,用无菌水冲洗 4~5 次,剥出花药,接种于愈伤组织诱导培养基上,培养基为改良的 MS 培养基,含 $1600 \text{ mg L}^{-1} \text{KNO}_3$ 、 $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{NH}_4 \text{NO}_3$ 、 $250 \text{ mg L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 、 0.5 mg L^{-1} 叶酸、 0.5 mg L^{-1} D-生物素、 150 mg L^{-1} 谷氨酸、5% (v/v) 椰汁、7% (w/v) 蔗糖,附加 1.5 mg L^{-1} 2,4-D + 1 mg L^{-1} Kt + 0.5 mg L^{-1} NAA,0.25% (w/v) 琼脂粉。培养室白天 26~27℃,晚上 24~25℃,暗培养 35~40 d 后用于转化。

1.3 基因枪转化

微弹的制备程序参照 Becker 等^[11]的方法,将 $5 \mu\text{g}$ 含有 *GAI* 基因的质粒 DNA 包裹于 5 mg 金粉表面,重新悬浮到 $50 \sim 60 \mu\text{L}$ 冷的 100% 乙醇中(用超声波处理 5 s)。将暗培养 30~40 d 后的橡胶树花药愈伤组织,转入培养皿中预培养 3 d,用基因枪轰击把含有 *GAI* 基因的质粒 DNA 包裹的金粉打入已经预培养好的橡胶树花药愈伤组织,轰击时氮气压力为 1100 psi,射程为 6 cm、9 cm,每次轰击金粉的用量为 0.5 mg。

1.4 转化材料的培养及筛选

转轰击后的愈伤组织培养 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 后转入不加选择压力的胚状体诱导培养基上培养 2 周,再转入加有 50 mg L^{-1} 的卡那霉素的胚状体诱导培养基,每 20 d 继代一次,以上阶段均为暗培养。待胚状体发生并成熟后,转移胚状体到植株诱导培养基上诱导出苗。胚诱导培养基为改良的 MS 培养基,其中大量元素减半,微量元素加 1 倍,附加 200 mg L^{-1} 水解酪氨酸、 0.1 mg L^{-1} ABA、 1 mg L^{-1}

6-BA 、 1 mg L^{-1} Kt、 0.3 mg L^{-1} NAA、 0.5 mg L^{-1} GA_3 、 0.1 mg L^{-1} ABA、 1 g L^{-1} 活性炭、4% (w/v) 麦芽糖、3% (w/v) 蔗糖、0.5% (w/v) 琼脂粉, pH 5.6。

当从胚状体诱导出的小植株长到 3~5 cm 时,将其叶子全部切除,并切成带腋芽或顶芽的 1~2 cm 的茎段接种到增殖培养基上,当新芽长到 3~5 cm 时,再用同样的方法切取带腋芽或顶芽的 1~2 cm 的茎段接种到相同的培养基上进行增殖。切取 3 cm 左右的增殖芽作为插条,在试管内扦插生根成苗,余下老材料的基部仍可用于增殖新芽^[12]。试管扦插苗生根后即可移植到沙床中。

1.5 抗性筛选培养获得植株的 PCR 检测

转基因植株的 DNA 提取 称取 0.2 g 叶片于 1.5 mL 的离心管中,加入液氮充分研磨后,加入 $500 \mu\text{L}$ CTAB 提取液,于 65℃ 温浴 60 min,中间颠倒离心管数次,再加入酚、氯仿各 $250 \mu\text{L}$, $13200 \times g$ 离心 10 min,取上清液,重复抽提 2 次。在上清液加入 0.7 倍体积的异丙醇,轻轻混匀, -20℃ 放置 2 h, $8200 \times g$ 离心 15 min,取沉淀,加入 $500 \mu\text{L}$ 70% 的乙醇, $8200 \times g$ 离心 10 min,弃上清,将沉淀干燥,溶于 TE 缓冲液,经 RNA 酶消化后,再经沉淀纯化。制备的 DNA 样品用于 PCR 分析。

PCR 扩增 根据 *GAI* 基因序列设计引物(由上海生物工程技术有限公司合成)P1: 5'-ATGAAGAGAGATCATCATCATCAT-3', P2: 5'-CATATTGGTGGAGAGTTTCCAAGC-3'。以抗性筛选培养获得植株的 DNA 为模板,94℃ 预变性 3 min,反应条件:94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 90 s,30 个循环后在 72℃ 中继续延伸 10 min,反应产物于 1.0% 琼脂糖电泳检查,Marker 为 DL2000。

1.6 转基因植株的 Southern 检测

参照 Sambrook 等^[10]的方法。取 $30 \mu\text{g}$ 橡胶树组培苗叶片总 DNA 用 2 种限制性内切酶(*Bam*HI、*Xba*I)分别过夜,完全消化后回收,经 1% 琼脂糖胶电泳分离后转移至尼龙膜(Hybnd N+)上(Amersham Pharmacia, UK)。采用 Roche 公司产的地高辛标记检测试剂盒进行 Southern 杂交。目的基因 *GAI* 的探针标记、尼龙膜预杂交和杂交显影等具体步骤参见试剂盒使用说明书。

2 结果和分析

2.1 抗性植株的获得

本研究从 2007 年 7 月至 2008 年 11 月共采用基因枪法转化橡胶树花药愈伤组织 8 次,轰击射程

分别为 6 cm 和 9 cm, 共转化愈伤组织 8771 块, 在去除污染材料情况下, 得到胚状体 149 个, 平均出胚率 1.70%。绝大多数胚状体没有能正常分化成苗最终只得到抗性苗 8 株。分别提取抗性苗的叶片 DNA 进行 PCR 检测。

2.2 PCR 扩增结果

将经过卡那霉素筛选的抗性植株, 提取抗性植株 DNA 作为模板, 以质粒 DNA 为阳性对照, 以蒸馏水代替 DNA 作为空白对照, 未转基因海星 2 号试管植株 DNA 为阴性对照, 根据 *GAI* 基因序列设计引物, 进行 PCR 检测。最终检测到 1 株苗有目的基因信号, 如图 1 所示, 转化植株可以扩增出一条与阳性对照大小一致, 长为 1500 bp 的片段, 而未转基因植株没有扩增出任何条带。从 PCR 检测

结果可以初步证明 *GAI* 基因已整合到橡胶树基因组中。

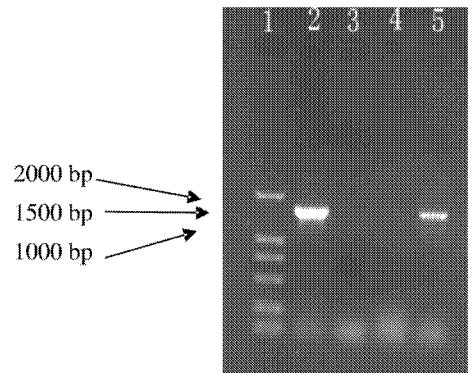


图 1 抗性植株的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR result of anti-kanamycin plantlet

1. Marker DL2000; 2. 阳性对照 Positive control; 3. 空白对照 Blank control; 4. 阴性对照 Negative control; 5. 抗性植株 Anti-kanamycin plantlet.

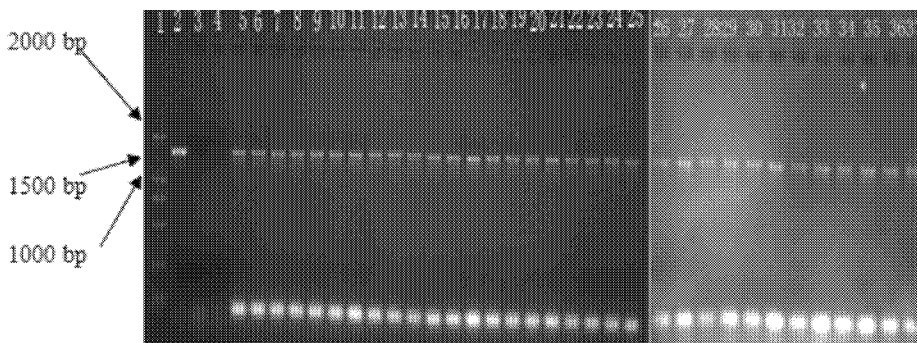


图 2 第 4 代抗性植株的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR result of anti-kanamycin plantlets subcultured for 4th generation

1. Marker: DL2000; 2. 阳性对照 Positive control; 3. 空白对照 Blank control; 4. 阴性对照 Negative control; 5~37. 33 株抗性植株 33 anti-kanamycin plantlets.

将阳性试管植株切成带腋芽或顶芽的茎段在试管中扩繁 4 代后, 共得到 33 株苗, 在再次进行分株扩繁时, 分别提取每株苗叶片的 DNA。进行 PCR 检测后发现, 每个样品都可以扩增出与阳性对照大小一致, 长为 1500 bp 左右的片段。图 2 表明在试管中扩繁 4 代后的植株 *GAI* 基因没有丢失。

2.3 Southern 检测结果

用 *GAI* 基因的 PCR 产物合成探针, 以 PCR 产物为阳性对照进行 Southern 杂交, 分别用 *Bam*HI 和 *Xba*I 酶切转基因植株的 DNA, 上样量均为 30 μ g。从图 3 可见, 经 *Bam*HI/*Xba*I 双酶切的转基因植株的 DNA 杂交结果与阳性对照表现一致, 证明转基因植株基因组中含有 *GAI* 基因。*Bam*HI 和 *Xba*I 单酶切转基因植株的 DNA, 也都可以看到一条杂交带, 说明目的基因是以单拷贝的形式存在。

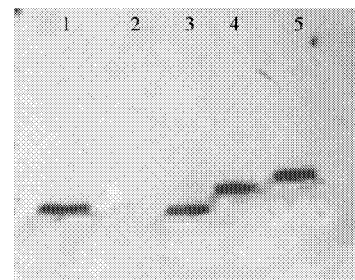


图 3 Southern 检测结果

Fig. 3 Southern analysis results

1. 阳性对照 (PCR 产物) Positive control (PCR production); 2. 非转基因植株 DNA *Bam*HI/*Xba*I 双酶切 Non-transgenic plantlet DNA digested by *Bam*HI/*Xba*I; 3. 转基因植株 DNA *Bam*HI/*Xba*I 双酶切 Transgenic plantlet DNA digested by *Bam*HI/*Xba*I; 4. 转基因植株 *Xba*I 酶切 DNA Transgenic plantlet DNA digested by *Xba*I; 5. 转基因植株 *Bam*HI 酶切 DNA Transgenic plantlet DNA digested by *Bam*HI.

3 讨论

受地理环境的限制,我国适宜种植天然橡胶的面积已经很少,而目前我国天然橡胶的产量还达不到消费量的三分之一,需求缺口逐年加大。一个橡胶育种周期一般为 30 a,而且橡胶树遗传背景复杂,因此应用常规的育种方法进行品种改良很困难。风害是我国最大植胶区(海南植胶区)的主要灾害,是影响橡胶单位面积产量的主要原因。海南省台风出现频繁,危害覆盖全省,每年都造成严重损失。据统计,登陆海南的台风平均每年 1.6 次。在强台风经常侵袭的地区,开割树累计断倒率一般达 20%~40%,局部严重的地区达 80% 以上。由于橡胶树的割胶时间可达 20~30 a,因此,断倒风害的影响是长期的和累计性的,抗风育种是海南植胶区育种的主要目标。实践证明,降低树冠高度是解决风害的根本所在,在 1973 年 13 号台风中,经过修枝矮化的 GT1 品系断倒率只有 3.13%,而未作处理的对照 GT1 品系断倒率达 23.2%^[13]。但是,修枝整型存在许多问题:修剪劳动强度大,操作工人危险性大(成龄橡胶树高达 15~20 m),修剪后严重影响产胶量等。因此培育橡胶树矮化新品种才是解决问题的关键。矮化植物的一种类型是对 GA 不敏感,即 GA 的受体蛋白发生变异,拟南芥的一个 *GAI* 变异株即是此类型^[14]。

近二十多年来,基因工程等生物技术的迅速发展为橡胶树品种改良创造了条件,转基因技术的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。基因枪法和农杆菌介导法是巴西橡胶树转化技术应用最普遍的方法,并且都有转化成功的报道^[2-8]。本研究通过基因枪法将 *GAI* 基因成功转入巴西橡胶树海星 2 号获得了转基因植株,使利用转基因方法将目的基因导入橡胶树,培育高产矮生的橡胶树品种成为可能。下一步将深入研究转入 *GAI* 基因后橡胶树的生长速度、外观形态及产胶等方面的影响。

参考文献

- [1] Zhao H(赵辉), Chen X T(陈雄庭), Wang X(王旭). Advances on genetic transformation of *Hevea brasiliensis* Muell.-Arg. [J]. Chin J Trop Crops(热带作物学报), 2008, 29(1): 122-125.(in Chinese)
- [2] Arokiaraj P, Jones H, Cheong K F, et al. Gene insertion into *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Cell Rep, 1994, 13: 425-431.
- [3] Arokiaraj P, Jones H, Hafisah J, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Hevea* anther calli and their regeneration into

plantlets [J]. J Nat Rub Res, 1996, 11(2): 77-87.

- [4] Montoro P, Teinseree 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.
- [5] Blanc G, Baptiste C, Oliver G, et al. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic calli and regeneration of *Hevea brasiliensis* Muell.-Arg. plants [J]. Plant Cell Rep, 2006, 24: 724-733.
- [6] Li W G(李维国). Study on *SOD* gene cloning, construction of its expression vector and transformation to *Hevea brasiliensis* Muell.-Arg. [D]. Danzhou: South China Tropical Agriculture University, 2000: 15-37.(in Chinese)
- [7] Wang Y(王颖), Chen X T(陈雄庭), Zhang X J(张秀娟), et al. Transfer of *GAI* gene to *Hevea brasiliensis* by particle bombardment [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2006, 14(3): 179-182.(in Chinese)
- [8] Jayashree R, Pekha K, Venkatachalam P, et al. Genetic transformation and regeneration of rubber tree *Hevea brasiliensis* Muell.-Arg.) transgenic plants with a constitutive version of an anti-oxidative stress uperoxide dismutase gene [J]. Plant Cell Rep, 2003, 22: 201-209.
- [9] Peng S Q(彭世清), Chen S C(陈守才). Obtaining of dwarf plants by expression of an *Arabidopsis GAI* gene in tobacco [J]. J Agri Biotechn(农业生物技术学报), 2005, 13(3): 388-389.(in Chinese)
- [10] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002: 27-30.
- [11] Becker D, Brettschneider R, Lorz H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue [J]. Plant J, 1994, 5(2): 299-307.
- [12] Chen X T(陈雄庭), Wang Z Y(王泽云), Wu H D(吴胡蝶). Tube micro-propagation of *Hevea brasiliensis* self-rooting juvenile-type clone [J]. Chin J Trop Crops(热带作物学报), 1998, 24(2): 225-230.(in Chinese)
- [13] South China College of Tropical Crops (华南热带作物学院). Rubber Tree Cultivation [M]. Beijing: Agriculture Publishing House, 1978: 185-295.(in Chinese)
- [14] Peng J, Richards D E, Hartley N M, et al. Green revolution genes encode mutant gibberellin response modulator [J]. Nature, 1999, 400: 256-261.

图版说明

图版 I

1. 准备进行基因枪转化的橡胶树愈伤组织;
2. 转化后橡胶树愈伤组织的胚诱导培养;
3. 胚状体的发育;
4. 胚状体诱导出苗;
5. 抗性植株的快繁;
6. 抗性植株的大田试种。

Explanation of plate

Plate I

1. *Hevea brasiliensis* anther callus prepared for transformation by particle bombardment;

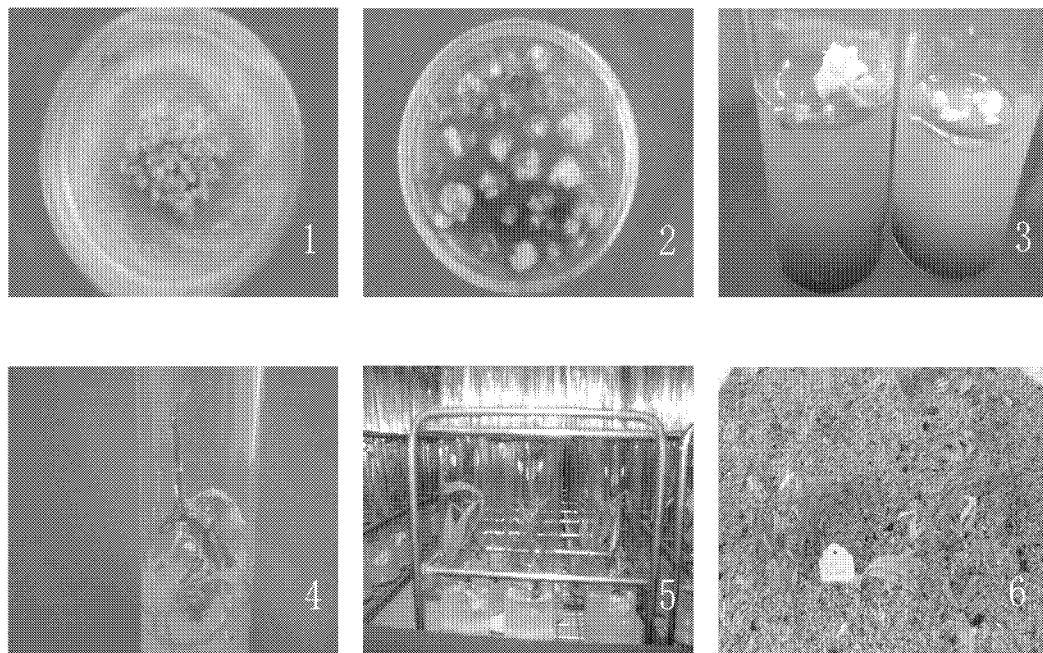
2. Embryo induced from callus after transformation;

3. Development of embryoid;

4. Plantlet induced from embryoid;

5. Plantlets with kanamycin resistance propagated in tube;

6. Plantlets with kanamycin resistance were transplanted in field.



洪磊等:图版 I

HONG Lei, et al.: Plate I