

基因枪法将 LEAFY 基因导入甘蔗的研究

李克贵 潘大仁* 许莉萍*

(福建农林大学农业部甘蔗遗传育种重点开放实验室, 福建福州 350002)

摘要 利用基因枪介导的方法,以 *LEAFY* 基因为目的基因, *NPT* 为选择/标记基因进行共转化。对影响基因枪法转化甘蔗的影响因素进行了探讨,结果表明转化前预培养 2 d 获得的转化效率最高,转化前后进行高渗处理可以提高转化效率。大量转化后,将 *LEAFY* 基因导入到 3 个甘蔗品种 Badila、ROC22 和 ROC16 中去,获得了转 *LEAFY* 基因的甘蔗植株。其中抗性愈伤组织的获得频率最高达 11.2%,抗性植株的获得频率最高达 1.22%。转基因植株的 PCR 及 PCR-Southern 杂交检测结果表明,外源基因 *LEAFY* 已整合进了转基因植株基因组中。

关键词 *LEAFY* 基因;甘蔗;开花;基因枪

中图分类号: Q943, S566 文献标识码: A

The Study on Transformation of *LEAFY* Gene into Sugarcane by Particle Bombardment

LI Ke-Gui PAN Da-Ren* XU Li-Ping

(Key Laboratory of Sugarcane Genetics & Breeding, Ministry of Agriculture, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract *LEAFY* and *NPT* genes were co-transferred into sugarcane in this study. Sugarcane calli as target tissues were bombarded by Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (BIO-RAD) with the plasmid DNA coated to GOLD Particle. The result demonstrated that pre-culture or mannitol treatment before bombardment could improved the regeneration ability significantly. The highest transformation efficiency was 11.2% according to the estimation of the resistant calli produced on the medium with kan. The highest regeneration frequency from resistant cultures was 1.22%. The transformed plants were confirmed by PCR analysis and PCR-Southern blotting.

Key words *LEAFY* gene; Sugarcane; Transformation

开花是植物生长过程的重要质变历程^[1],近年来开花调控研究成为植物生殖发育研究的新热点^[2]。人们通过突变体在拟南芥菜 (*Arabidopsis thaliana*) 中克隆到一系列控制开花过程的基因。1992 年,Weigel^[3] 等从野生拟南芥中克隆了一个与调控花分生组织启动相关的基因双链-*LEAFY* 基因。该突变体表现为花序分生组织转变为花分生组织受阻。单双基因突变、基因序列分析及表达模式和转基因的研究表明, *LEAFY* 基因在控制和启动开花过程中起着重要作用,并且是在开花起始的早期起作用^[4]。为了进一步鉴定它的功能,人们进行了一系

列的转化工作,35S *LEAFY* 转化野生拟南芥、烟草和杂种杨后均使这些植物提早开花,说明通过导入 *LEAFY* 基因,有可能调控开花的时间^[5]。

甘蔗只在低纬度地区开花,在包括海南省在内的我国大部分蔗区都很难开花,这使得甘蔗有性杂交育种难以进行^[6]。本研究用基因枪方法介导,选择甘蔗胚性愈伤组织作为转化的受体材料,进行了拟南芥 *LEAFY* 基因的转化。以研究 *LEAFY* 基因在不同植物中的表达,并且为今后进一步开展应用基因工程手段,诱导甘蔗开花打下良好的基础。

*基金项目:农业部“948”项目资助(971043, 981016)。

作者简介:李克贵(1976-)男,山东昌乐人,硕士,研究方向:植物基因工程。

*通讯作者:潘大仁(1949-)男,福建福州人,教授,研究方向:基因工程。

Received(收稿日期):2002-07-02,Accepted(接受日期):2002-10-12.

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料:3个甘蔗品种 Badila、ROC16 和 ROC22,均取材于福建农林大学农业部甘蔗遗传育

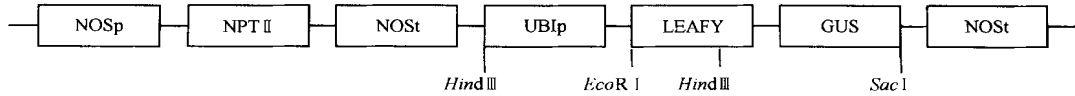


图1 pBL 植物表达载体示意图

Fig. 1 The structure of pBL plasmid

试剂:质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒和 PCR 引物购自上海生工生物工程公司,限制性内切酶购自华美生物工程公司,杂交试剂盒购自 Roche 公司。

1.2 质粒的酶切鉴定及 PCR 分析

采用柱式质粒大量提取试剂盒提取质粒,然后进行 *Hind* 单酶切和 *EcoR* + *Hind* 双酶切鉴定^[7]。根据 *LEAFY* 基因两端序列设计并合成一对引物进行 PCR 扩增。

引物 1:5'-CGGTGGAACCCAACGAG

引物 2:3'-TGTAACAAGCCTGACGCCATGAG

1.3 受体材料的预处理

轰击前,将受体材料甘蔗胚性愈伤组织转至分化培养基(MS + 2 mg/L BA)预培养 2 d,然后转入含甘露醇和山梨醇各 0.2 mol/L 的高渗培养基进行高渗处理 8 h。

1.4 转化

将质粒 pBL 与金粉充分混合后,制备微弹载体,然后以基因枪(Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System)为介导,将含有 *LEAFY* 基因的重组质粒射入靶材料的细胞内。

1.5 转化细胞筛选

以卡那霉素为筛选剂进行筛选。作为靶材料的胚性愈伤组织在轰击后,转入含甘露醇和山梨醇各 0.2 mol/L 的高渗培养基进行高渗处理 16 h,再转入不加任何筛选剂的培养基过渡培养 1 周,然后转入含卡那霉素的选择继代培养基(MS + 2 mg/L 2,4-D + 280 mg/L kan⁺)上筛选抗性愈伤组织。连续筛选 3 代(2 周/代)。

1.6 抗性愈伤组织分化与植株再生

将生长旺盛的抗性愈伤组织转至含卡那霉素的选择分化培养基(MS + 2 mg/L BA + 280 mg/L kan⁺)

种重点开放室农场。

质粒及菌种:含有 CaMV35S 启动子的全结构 *LEAFY* 基因的重组质粒 pBL(如图 1)由海南热带作物生物技术国家重点实验室邵寒霜博士^[5]惠赠。*E. coli*DH5 由本实验室保存。

上分化成苗。在相同培养基上连续筛选 2 代(2 周/代)。获得生长健壮的抗性苗,然后转入促根培养基(MS + 3 mg/L NAA + 0.1 mg/L BA)促根壮苗,获得再生植株。

1.7 转化植株总 DNA 的 PCR 与 PCR-Southern 杂交分析

从 kan⁺ 抗性植株及未进行转化的植株上剪取少量叶片,经液氮速冻后,CTAB 法微量提取总 DNA^[8],用 RNase 消化样品中所含的 RNA。然后以质粒 pBL 为阳性对照,以未转化植株总 DNA 为阴性对照,进行 PCR 扩增。植株总 DNA 经 PCR 扩增获得阳性条带后,将凝胶上的 DNA 转移到硝酸纤维素膜上^[9],制备 *LEAFY* 基因的 *EcoR* + *Hind* 双酶切片段作为杂交探针,进行 PCR-Southern 杂交。

2 结果与分析

2.1 质粒酶切鉴定与 PCR 分析

质粒经 *Hind* 单酶切和 *EcoR* + *Hind* 双酶切后,获得了预期大小的片段。质粒经 PCR 扩增后,获得了预期的 960 bp 大小的条带。

2.2 预培养对基因枪法转化甘蔗效率的影响

在对愈伤组织进行轰击前,先将其转入分化培养基预培养,表 1 列出了不同的预培养天数对基因枪法转化甘蔗效率的影响。可以看出,转化前预培养 2 d 可以获得相对较高的转化效率。

2.3 高渗处理对基因枪法转化甘蔗效率的影响

在轰击前 6 h,轰击后 18 h 进行甘露醇和山梨醇的高渗处理。甘露醇与山梨醇的浓度均为 0.2 mmol/L。从表 2 中可以看出,受体组织转化前后,进行高渗处理,可以提高基因枪转化甘蔗的效率。

表 1 预培养对基因枪法转化甘蔗效率的影响

品种 Cultivar	预培养时间 Days of preculture (d)	GUS ⁺ 表达块数 Tissues with GUS ⁺ (A)	总组织块数 Total tissues (B)	A/B (%)
ROC22	0	1	30	3.3
	1	1	30	3.3
	2	3	30	10
	3	2	30	6.7
ROC16	0	2	30	6.7
	1	1	30	3.3
	2	4	30	13.3
	3	1	30	3.3
Badila	0	0	30	0
	1	1	30	3.3
	2	1	30	3.3
	3	1	30	3.3

表 2 高渗处理对基因枪法转化甘蔗效率的影响

品种 Cultivar	高渗处理 Mannitol treatment	抗性愈伤组织 Resistant calli (A)	总愈伤组织 Total calli (B)	A/B (%)
ROC22	+	5	50	10
	-	4	50	8
ROC16	+	4	51	8
	-	3	50	6
Badila	+	2	50	4
	-	0	50	0

2.4 不同甘蔗品种对基因枪法转化甘蔗效率的影响

在建立了包含预培养与高渗处理等因素优化的转化体系后,我们进行了大量转化。表 3 列出了不同甘蔗品种对基因枪法转化甘蔗效率的影响。

从表 3 中可以看出,在 3 个参试品种中 ROC22 转化效率最高 (1.22%), Badila 次之 (1.21%), ROC16 最低 (0.625%)。

表 3 基因枪转化 *LEAFY* 基因的效率

品种 Cultivar	轰击的组织 块数 Calli bombarded (A)	卡那霉素抗 性组织块数 Calli with <i>kar</i> resistance (B)	卡那霉素抗 性植株 Plants with <i>kar</i> resistance (C)	B/A (%)	C/A (%)
ROC22	820	92	10	11.2	1.22
ROC16	320	28	2	8.75	0.625
Badila	164	12	2	9.75	1.21

2.5 转基因植株的 PCR 及 PCR-Southern 杂交分析

提取 14 棵推定的转基因植株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,其中 4 棵获得 960 bp 大小的阳性条带,片段大小和阳性对照的条带一致(见图 2)。PCR 结果转移到硝酸纤维素膜上同探针杂交,获得了阳性条带(见图 3)。初步证明 *LEAFY* 基因已整合到这些转化植株的基因组中。由于甘蔗植株生长缓慢,目前我们只进行了分子生物学鉴定,后续的大田实验有待进一步研究。

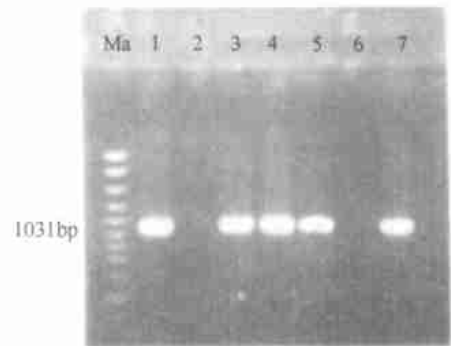


图 2 转基因植株的 PCR 分析

Fig. 2 PCR analysis of the kanamycin-resistant plant

Ma: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder 1 为阳性对照:质粒:pBL; 2 为阴性对照:未转化植株总 DNA; 3~7 为转化植株总 DNA
1. Positive control: plasmid pBL; 2. Negative control: total DNA from normal plant; 3-7. Total DNA from transformed plants



图 3 PCR-Southern 杂交分析

Fig. 3 PCR-Southern blotting analysis

2 为阴性对照:未转化植株总 DNA; 1, 3 为转化植株总 DNA
2: Negative control: total DNA from normal plant;
1, 3: Total DNA from transformed plants

3 讨论

基因枪法介导的基因转化,在禾谷类作物上应用比较广泛^[10]。影响基因枪法转化甘蔗的影响因

素有多种,在实验中,我们采取了促进基因枪法转化甘蔗的必要措施。

转化前,将甘蔗胚性愈伤组织转入分化培养基预培养 2 d,可使愈伤组织的分生能力增强,细胞分裂旺盛,DNA 大量合成。处于接受外源基因的最佳时期,有利于外源 DNA 的摄入与整合。从而提高转化效率。

应用甘露醇和山梨醇进行高渗处理,也可以提高基因枪的转化效率^[11]。高渗处理影响转化效率的可能机制是,细胞在高渗条件下发生了质壁分离,从而减少了在微弹穿孔时细胞质泄漏,而提高了细胞的生存力。不过,高渗处理必须掌握合适的浓度和时间,低浓度短时间的处理不能很好地发挥作用,而高浓度长时间的处理,会造成质壁分离的不可恢复^[12]。对于不同植物来说,合适的处理时间和浓度不尽相同。我们经研究认为,在轰击前 8 h 至轰击后 16 h,将愈伤组织置于含渗透剂 0.2 mol/L 甘露醇和 0.2 mol/L 山梨醇的 MS 培养基中进行高渗处理,能提高外源基因的瞬间表达量并增加愈伤组织的分化频率。

References

- [1] Rebecca Chasm. Flowering research ——Molecular genetic research of plant flowering. *Cell Biol J* (细胞生物学杂志), 1992, 14 (4): 168—169
- [2] Chen Y-N(陈永宁). The limited understanding of studies on plant flowering in the future. *Plant Physiology Communication* (植物生理学通讯), 1995, 31 (5): 375—384
- [3] Weigel D, Smyth D R, Yanofsky M F, Meyerowitz E M. *LEAFY* controls floral meristem identify in *Arabidopsis* *Cell*, 1992, 69: 843—859
- [4] Yong W-D(雍伟东), Zhong K(种康), Xu Z-H(许智宏), *et al.* The regulation study of floral meristem identify genes in higher plant. *Science Bulletin* (科学通报), 2000, 45 (5): 455—466
- [5] Shao H-S(邵寒霜), Li J-H(李继红), Zheng X-Q(郑学勤), *et al.* Cloning of the *LFY* cDNA from *Arabidopsis thaliana* and its transformation to *Chrysanthemum morifolium*. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1999, 41 (3): 268—271
- [6] Li Q-W(李奇伟), Chen X-W(陈西文), Hu H-X(胡后祥). Further studies on induction of sugarcane flowering. *Sugarcane* (甘蔗), 1994, 1 (3): 17—24
- [7] Li D-B(李德葆), Zhou X-P(周雪平). *Genetic Engineering Operation Technique* (基因工程调控技术). Shanghai: Shanghai Science Publishing House, 1996
- [8] Sun J-S(孙敬三). *Plant Cell Engineering Manual* (植物细胞工程手册). Beijing: Science Press, 1992. 297—298
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Harbor Laboratory Press, 1989, 322—323; 26—28
- [10] Liang H(梁辉), Zhao T-H(赵铁汉), Li L-C(李良材), *et al.* Studies on some factors affecting transformation of wheat immature embryos by biolistic bombardment. *Acta Gen Sin* (遗传学报), 1998, 25 (5): 443—448
- [11] Ling D-H(凌定厚), Tao L-Z(陶利珍), Ma Z-R(马镇荣), *et al.* Sterile transgenic plants of rice (*Oryza sativa* L.) with *ps1-barnaes* gene transformation by particle bombardment. *Acta Gen Sin* (遗传学报), 1998, 25 (3): 433—442
- [12] Mu Q-H(母秋华), Yuan Y-P(原亚萍), Jia Y-F(贾玉峰), *et al.* Regenerated plants resistant to Basta were obtained through introduction of Bar genes into [(Sorghum × Sugarcane) × Millet Sorghum] using particle bombardment. *Hereditas* (遗传), 1998, 20 (3): 23—26