

文章编号: 1000-5692(2007)02-0140-05

利用农杆菌介导法获得 RNAi 转基因枫香的研究

乔桂荣, 栾维江, 潘红伟, 卓仁英

(中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要: 随着我国林业生态工程和退耕还林的开展, 木材生产与需求之间的矛盾愈加严重, 培育速生优质大径材的研究更加重要。基于 *LEAFY* 基因在植物生长发育中的特性, 利用 PCR 和 Gateway 技术构建了含有 *LEAFY* 基因保守序列的 RNA 干涉植物表达载体 *LFY-RI*, 利用根瘤农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导法获得转基因植株, 利用 RNA 干涉技术抑制转基因植株中 *LEAFY* 基因的表达, 从而获得枫香 *Liquidambar formosana* 不育转基因植株。并利用聚合酶链式反应(PCR)技术和 PCR-Southern 杂交技术检测了转基因植株中外源基因整合情况。共获得了 5 株枫香转基因植株, 分子检测表明, 其中 4 株为转基因阳性植株。由于转基因植株还比较幼嫩, 对它们生长发育以及木材品质的变化尚处于在观察中。图 5 参 12

关键词: 林木育种学; RNA 干涉; 枫香; *LEAFY* RNA 干涉转基因

中图分类号: S722.3 **文献标志码:** A

中国人均森林面积仅为世界平均值的 12%, 建设用材缺口近年一直保持在 4 000 万 $m^3 \cdot a^{-1}$ 左右。随着生态林业工程建设的迅速发展, 商品林基地逐渐缩小, 木材供给矛盾将更加突出, 因此, 开展高效商品林林木新品种选育具有十分重要的意义。*LEAFY* 基因是控制植物体从营养生长向生殖生长转化的一个关键性基因, 抑制 *LEAFY* 基因表达, 理论上可以抑制植物从营养生长向生殖生长转化^[1]。此研究利用 *LEAFY* 基因的核心保守序列构建 RNA 干涉载体, 利用根瘤农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导法导入枫香 *Liquidambar formosana*, 目的是通过 RNA 干涉技术抑制 *LEAFY* 基因表达, 抑制枫香的生殖生长, 培育不育品种, 提高枫香的生长速度和木材材质, 为珍贵木材的生产和利用探索一条新途径^[2,3]。

1 材料与方 法

1.1 材 料

Dh5 α , EHA105 菌株由中国林业科学研究院亚热带林业研究所实验室保存; *LEAFY* 基因由 Weigle 博士赠送; 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶购自 TAKARA 公司; 枫香种子采自浙江省遂昌县, 储藏于 -10℃冰箱中; Gateway 干涉载体试剂盒购自 INVITROGEN 公司。

1.2 植物材料培养

枫香种子用体积分数为 75% 乙醇消毒 1 min, 30 g \cdot L⁻¹ 次氯酸钠溶液(含 1.0 g \cdot L⁻¹ Tween-20) 消毒

收稿日期: 2006-05-29; 修回日期: 2006-10-27

基金项目: 浙江省科学技术攻关项目(2004C32002); 国家林业局“948”项目(2005-4-58)

作者简介: 乔桂荣, 硕士研究生, 从事林业生物技术研究。E-mail: gr_q1982@yahoo.com.cn。通信作者: 卓仁英, 副研究员, 从事林木基因工程等研究。E-mail: zhuory@gmail.com

15 min, 用无菌水洗涤 3~4 遍, 接种于含有 20 mL MS 基本培养基(Murashige and Skoog, 1962)中进行发芽。培养条件为 25 °C, 16 h 光照。待幼苗长出 2~3 片叶片时, 取叶片用于转化。

供培养的培养基为木本植物培养基(WPM) + 3.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D; 不定芽诱导培养基为 WPM + 3.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D + 300 mg·L⁻¹ Cef; 生根诱导培养基为 WPM + 2.0 mg·L⁻¹ IBA + 15 mg·L⁻¹ Kan。

1.3 载体构建

根据 Genbank 公布的 *LEAFY* 基因序列及文献中其他植物的同源序列, 分析枫香保守序列结构, 并设计引物。以枫香基因组 DNA 为模板利用 PCR 扩增出 800 bp 的片段, 测序结果发现该片段与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* *LEAFY* 基因同源性高达 87.4%, 利用 PCR 和 Gateway 技术和限制性内切酶, 构建 pBin *LFY*-RI RNA 干涉载体。其序列结构如图 1 所示。采用冰冻法将 *LFY*-RI 质粒 DNA 转入根瘤农杆菌, 28 °C 培养 3 d 后挑单克隆于含 20 mg·L⁻¹ Km 和 50 mg·L⁻¹ 利福平的 YM 培养基上, 28 °C 培养 3 d 后, 用一金属匙收集根瘤农杆菌菌体, 将它们悬浮于 WPM 液体培养基中用来转化。

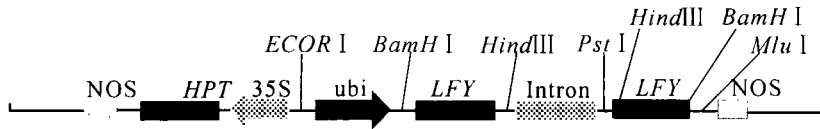


图 1 *LFY*-RI 载体结构图

Figure 1 *LFY*-RI vector

1.4 基因转化

将枫香叶片外植体转移到无菌三角瓶中, 将适量农杆菌悬浮液倒入(至少浸没叶片), 室温下放置 8~10 min, 并不时晃动。取出叶片, 在无菌滤纸上吸去多余菌液, 随即转移到铺有一层无菌滤纸的固体共培养培养基上, 于 25 °C 暗培养 3 d。

将共培养后的叶片转入含 100 mg·L⁻¹ 头孢霉素的选择培养基上, 26 °C 培养。30 d 后转到另一新鲜选择培养基上, 继续筛选 30 d。选择生长旺盛的不定芽转移到生根培养基上, 26 °C, 12 h 光照; 12 h 黑暗条件下培养约 2~3 周。将小苗移入温室。移栽方法参照王洪云等^[4] 和 Merkle 等^[5-7] 方法。

1.5 分子鉴定

枫香基因组 DNA 提取方法参照 CTAB^[6] 的方法。

1.5.1 PCR 检测 聚合酶链式反应(PCR)反应体系为反应缓冲液 2.5 μL, dNTP 混合液 2.5 μL, 引物各 2.0 μL, 模板 3.0 μL, *Taq* 酶 1.0 μL, 加水补足 25 μL。反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 30 s, 共进行 30 个循环; 72 °C 继续反应 10 min 后于 4 °C 保存。取 10 μL 反应液进行电泳检测。

1.5.2 PCR-Southern 杂交 按单株取叶片提取 DNA, 进行潮霉素基因的 PCR 扩增, 方法同 1.4.1。以质粒 *LEAFY*-RI 为模板的 PCR 扩增产物回收、纯化后, 用作探针。DNA 探针用电化学发光(ECL)直接核酸标记和检测系统(英国 Amersham 公司生产)进行标记。取所需标记的 DNA 探针 100 ng, 沸水中变性 5 min, 冰浴 5 min, 然后加入与探针等体积的 DNA 标记试剂, 缓慢混匀, 再加入等体积的化学交联剂戊二醛溶液, 缓慢混匀, 37 °C 保温 10 min, 放于冰上待用。

杂交和洗膜: 把经 Southern 转移的膜置于含有 0.5 mol·L⁻¹ NaCl 和封闭试剂(5%)的杂交液中预热, 42 °C 预杂交 1 h。加入已标记好的探针, 混匀, 42 °C 杂交过夜。杂交膜用洗液于 42 °C 洗涤 2 次, 每次 10 min, 再用 2×SSC (氯化钠/柠檬酸钠溶液)室温下洗涤 2 次, 每次 5 min。

杂交信号的检测: 将等体积检测试剂 1 (H₂O₂) 和检测试剂 2 (鲁米诺及增强剂)混合, 倒于膜上, 反应 1 min。X 光片上曝光 0.5~2.0 h, 常规方法冲片。

2 结果

2.1 载体构建

采用 Gateway 技术, 利用 DNA 重组技术进行 RNA 干扰载体构建, 仅需 1 次 PCR 引入 CACC 4 个碱基 (Invitrogen, USA)。设计特定 5' -CACCTCAGAGAGAGAAAAATAGATTATGGATCC-3' 和 5' -GTCGACAGTTCGGGGGGGAAATATAAT-3', 扩增出含有 CACC 片段的产物(图 2-A), 回收后与 pENTER/D-TOP 载体进行混合反应, 利用热激法进行转化, 涂含有卡那霉素的 LB 平板, 挑单克隆培养, PCR 检测(图 2-B), 将正确的 pENTER/D-LFY 载体与 PANDA35HK 载体进行混合(反应缓冲液含有 2 μ L LR 反应缓冲液, 100 mg pENTER/D-LFY, 300 ng PANDA35HK 载体, 用 TE 补足 8 μ L), 25 $^{\circ}$ C 过夜, 加蛋白酶 K 1 μ L 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 热激法转化 Dh5 α , 涂含有卡那霉素和潮霉素的 LB 平板, 利用 PCR 挑选正确的载体 pBin LEAFY-RI, 采用电激法转化 EHA105。

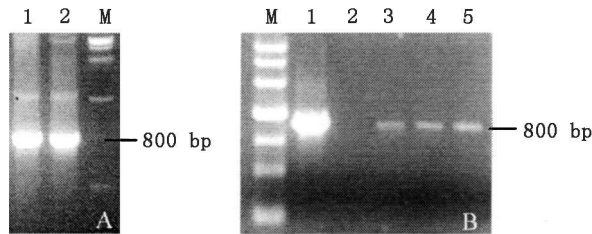


图 2 pBin LEAFY-RI 载体构建流程

A. 含 CACC 的 LEAFY 保守序列 PCR; B. pENTER/D-LFY 单克隆 PCR 检测。1. 载体; 2. 对照; 3~5. 单克隆

Figure 2 pBin LEAFY-RI vector constructed

A. Cloned LEAFY conservation sequence contain CACC by PCR; B. PCR analysis pENTER/D-LFY single clone. 1. vector; 2. ck; 3-5. single clone

2.2 基因转化

枫香嫩叶在不定芽诱导培养基上培养 15 d 后, 叶片边缘受伤部位即可长出色泽淡黄, 结构致密的愈合组织, 继续培养 15 d 以后就可以长出不定芽。枫香叶片经过根瘤农杆菌悬浮液感染后接种于 WPM 不定芽诱导培养基中进行暗培养, 3 d 后把经过共培养的叶片转接到筛选培养基上, 6 d 以后可见叶片开始上卷, 15 d 以后可见淡黄色的愈合组织自叶片边缘长出。愈合组织经过 20 d 的培养, 边缘即可分化出不定芽, 每个叶片可以分化出 6~10 个的不定芽。在转化过程中发现, 如果直接将叶片置于含有卡那霉素的选择培养基上愈合组织生长缓慢, 并且不能分化出不定芽。因此必须改变筛选方法, 将诱导后形成的不定芽接种于含有 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素的生根培养基中进行筛选, 凡能生根的植株多数是转基因阳性植株, 而假阳性再生芽由于没有卡那霉素抗性而全部死亡。这种方法仅仅将抗生素筛选时间推移到生根阶段, 对其他方面没有影响, 仅使再生不定芽生根速度减慢, 生根时间延长 30 d 以上^[8]。共获得再生苗 16 株, 移栽到土壤中以后, 共有 5 株成活。图 3 展示了枫香转化出苗的过程。

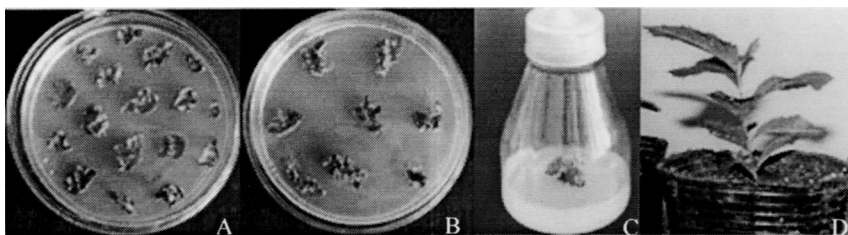


图 3 枫香转基因过程

A. 外植体; B. 不定芽; C. 生根; D. 移栽植株

Figure 3 Regeneration of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Chinese sweetgum

A. leaves segments explants; B. regenerated shoots; C. rooted buds; D. plantlet

2.3 分子检测

对 5 株枫香转基因苗进行微量 DNA 提取及 PCR 扩增。结果显示, 4 株苗用草莓素基因的特异引物 H1 和 H2 扩增出了 600 bp 左右的条带, 而对照植株和另一株转基因植株则没有(图 4), 说明植株的基因组中含有 *lfy* RNA 干涉序列; 初步观测发现转基因植株表型与非转基因对照没有差异, 但高生长明显下降。PCR-Southern 杂交结果显示, 所有 PCR 阳性植株都有杂交信号, 而未转基因植株和转基因阴性植株都无条带出现(图 5)。

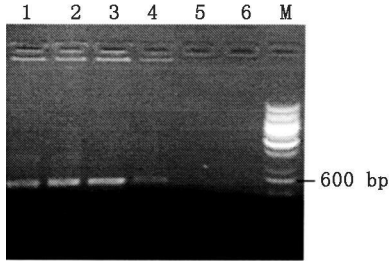


图 4 PCR 检测转基因植物中草莓素抗性基因

1~4. 转基因阳性植株 5. 转基因阴性;
6. 非转基因对照; M. 分子量标记

Figure 4 Electrophoresis of PCR products of transgenic plant

1-4. transgenic plantlet; 5. positive control; 6. ck;
M. molecular marker

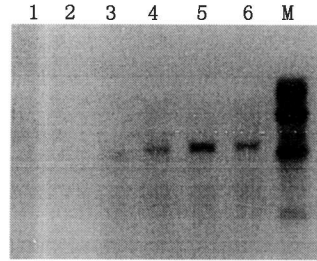


图 5 转基因植株 PCR-Southern 杂交检测

1. 非转基因对照; 2. 转基因阴性;
3~6. 转基因阳性植株; M. 分子量标记

Figure 5 PCR-Southern blot analysis of sweetgum transgenic plant

1. positive control; 2. ck; 3~6. Transgenic plantlet;
M. molecular marker

3 讨论

对转基因植株的分子检测的实验结果表明, *LEAFY* 基因的干涉序列已经导入到枫香植株中。

研究发现枫香对卡那霉素极为敏感, 抗生素筛选浓度可以进一步降低。不定芽分化培养基中添加抗生素将严重阻碍不定芽的分化, 表现为不定芽分化时间从 2 周延长到 4 周以上, 不定芽分化数量大幅度减少。因此, 应去除再分化诱导培养基中的抗生素, 而在生根培养基中添加 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素, 将转基因阴性不定芽杀死, 转基因阳性不定芽因具有抗性而能够正常生根。

多数林木遗传改良研究还不够深入^[9-12], 利用 RNAi 技术培育林木不育新品种目前尚处于起始阶段, 这是由于林木生长周期长, 基因杂合度很高, RNA 干涉的效果有待于进一步评估。此外由于 *LEAFY* 基因参与多个代谢途径, 利用 RNA 干涉可能会对转基因植株生长发育造成较大影响。转基因枫香小苗的生长发育目前与对照没有差异, 但转基因植株还很幼嫩, 木材品质等性状无法检测。因此干涉基因的选择等都需要进一步考虑。此外由于正常植株中 *LEAFY* 基因仅在花芽分化时期表达, 但目前转基因植株距成熟开花还有一段时间, 因此无法通过 RT-PCR 技术检测 *LEAFY* 基因表达情况的变化。下一步将对转基因枫香中 *LEAFY* 基因表达情况进行检测, 并观察对植株生长的影响。

目前, 阻碍林木基因研究的最主要因子是林木高效培养体系, 由于多数林木遗传改良研究还不够深入, 遗传学基础研究较为薄弱, 培养体系尚未建立或仅有微繁体系, 繁殖效率较低, 因此, 林木遗传基因研究多年来还主要集中于杨树、松树等几个主要树种^[11, 12]。林木规模化转基因体系的建立对林木育种具有重要意义。只有建立高通量转基因体系, 转基因株系数量达到一定规模后, 才能进行转基因优良株系的筛选和培育。

参考文献:

[1] 武小金, 唐俐, 邓晓湘, 等. 转反义 *wp1* 基因培育水稻抗穗雄性不育系的设想[J]. 分子植物育种, 2004, 2(1): 151-152.

[2] MEYER S, NOWAK K, SHARMA V K, et al. Vectors for RNAi technology in poplar[J]. *Plant Biol*, 2004, 6(1): 100-

103.

- [3] 施季森, 成铁龙, 王洪云, 等. 中国枫香育种研究现状[J]. 林业科技开发, 2002, 16 (3): 17—19.
- [4] 王洪云, 诸葛强, 何祯祥, 等. 枫香下胚轴的离体培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37 (2): 136—137.
- [5] DOYLE J J, DICKSON J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 19: 11.
- [6] MERKLE S A, BATTLE P J. Enhancement of embryogenic culture initiation from tissues of mature sweetgum trees [J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 268—273.
- [7] MERKLE S A, BAILEY R L, PAULPY B A, *et al.* Somatic embryogenesis from tissue of mature sweetgum trees [J]. *Can J For Res*, 1997, 27 (6): 959—964.
- [8] MERKLE S A, KIMBERLY A N, PATRICIA J B, *et al.* Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature and mature tissue of sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) [J]. *Plant Sci*, 1998, 132: 169—178.
- [9] 杨泽良, 党选民, 曹振木, 等. 利用基因工程创造植物雄性不育的策略[J]. 中国农学通报, 2005, 21 (10): 25—29.
- [10] 胡滨, 陈观平, 施农农, 等. 植物细胞质雄性不育及其在育种中的应用[J]. 浙江林学院学报, 2006, 23 (6): 689—693.
- [11] 王敏杰, 卢孟柱. 林木基因工程育种现状与发展趋势[J]. 世界林业研究, 2002, 15 (3): 7—13.
- [12] 王瑶, 林木兰, 沈锡辉, 等. 农杆菌介导的木本植物遗传转化[J]. 生物技术通报, 1999 (6): 23—27.

The *LEAFY* gene in RNA interference (RNAi) transgenic *Liquidambar formosana* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

QIAO Gui-rong, LUAN Wei-jiang, PAN Hong-wei, ZHUO Ren-ying

(The Research Institute of Subtropical Forestry, the Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang China)

Abstract: It is incompatible between production and need of timber, the aim of the test is breeding fast-growing super-quality and large-diameter tree cultivar. The *LEAFY* gene affects plant flowering. Using polymerase chain reaction (PCR) with the primers 5'-CACCTCAGAGAGAGAAAAATAGATTATGGATCC-3' and 5'-GTCGACAGTTCGGGGGGGAAATATAAT-3', a conservation sequence of the *LEAFY* gene for *Liquidambar formosana* (Chinese sweetgum) was cloned. An RNA interference (RNAi) pBIN vector of the *LEAFY* gene was constructed by Gateway technology, and then agrobacterium mediation was used to transfer the aim gene into the first two to three leaves of Chinese sweetgum seedlings. Then the transgenic leaves were cultured to plants in vitro. These plants' leaves were analyzed with PCR and Southern blotting. It is sure that the foreign gene was integrated into the genome, resulting in four transgenic plants. However, the transgenic four plants' development and timber quality has not been analyzed as they are so young. The study is carried on. [Ch, 5 fig. 12 ref.]

Key words: forest tree breeding; RNA interference (RNAi); *Liquidambar formosana* (Chinese sweetgum); *LEAFY* RNAi transgenic plants