

# 草莓外源 $LEA_3$ 基因的导入

王俊丽<sup>1,2</sup> 葛会波<sup>3</sup> 彭士琪<sup>3</sup> 张红梅<sup>1</sup> 续九如<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>河北大学生命科学学院, 保定 071002; <sup>2</sup>北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; <sup>3</sup>河北农业大学园艺学院, 保定 071001)

**摘要:** 以草莓 (*Fragaria ananassa* Duch.) 品种 'Darslect' 的花药为试材, 以 MS 培养基为基本培养基, 进行愈伤组织的诱导。通过基因枪法将来源于大麦的胚胎发生晚期丰富蛋白基因  $LEA_3$  导入愈伤组织细胞, 经过除草剂 PPT 的 4 次筛选培养, 获得了抗性愈伤组织及再生植株。通过地高辛标记的探针进行 Southern 杂交分析, 检测到了杂交带, 表明  $LEA_3$  基因整合到草莓染色体基因组中。

**关键词:** 草莓; 花药; 愈伤组织;  $LEA_3$  蛋白基因; 转化

**中图分类号:** Q 785; S 668.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 03-0322-03

## 1 目的、材料与方法

利用农杆菌介导法、电击法、基因枪法研究草莓基因转化已经有成功的报道<sup>[1~4]</sup>。本研究以草莓花药为材料, 通过愈伤组织的诱导, 获得受体组织。利用基因枪法将来源于大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 的胚胎发生晚期丰富蛋白基因  $LEA_3$  导入草莓细胞, 获得转基因草莓植株, 提高草莓的抗旱耐盐碱能力, 为草莓抗旱耐盐新品种的培育开辟一条新途径。

试材来自河北大学实验园内种植的草莓 (*Fragaria ananassa* Duch.) 法国栽培品种 'Darslect'。取萼片尚未裂开的花蕾, 用 70% 的乙醇消毒 30 s, 用 0.1%  $HgCl_2$  消毒 10 min。取出花药, 接种到培养基上进行愈伤组织诱导培养。转化所用质粒 pBY520 图谱如图 1 所示。 $LEA_3$  基因以 Act I 为启动子, Pin2 为终止子。*Bar* 基因为选择基因, 由 CaMV 35S 和 nos 调控。借助 PDS-1000 型基因枪, 将外源 DNA 导入愈伤组织细胞中。轰击后的愈伤组织培养 1 周后, 转入含有除草剂 PPT (phosphinothricin) 的选择培养基上进行筛选。之后转入再生培养基上进行再生培养。通过基因枪将由 CaMV 35S 和 nos 调控的 *Gus* 基因导入愈伤组织后, 采用组织化学染色法检测 *Gus* 的瞬时表达。DNA 的提取按 CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) 方法进行, 用地高辛试剂盒 (德国, RMB) 标记的 1.0 kb DNA 和标记的 Marker 作探针进行 Southern blot 分析。

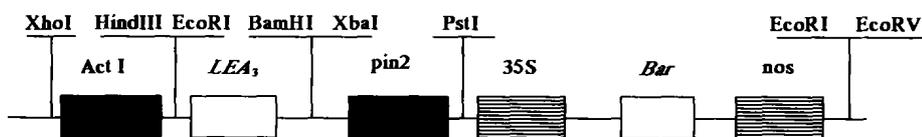


图 1 质粒 pBY520 图谱

Fig. 1 Structure of plasmid pBY520

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织的诱导

观察发现, 花药接种到 MS + 2,4-D 1.0~4.0 mg/L 和 MS + 2,4-D 1.0~4.0 mg/L + 6-BA 0.20 mg/L 培养基上时, 虽然也能诱导出愈伤组织, 但愈伤组织为乳白色, 水浸状, 并随着时间的延长, 部分开

收稿日期: 2002-06-17; 修回日期: 2002-11-04

本研究所用质粒由美国康奈尔大学分子生物学及遗传学系吴瑞教授提供, 特此致谢。

始褐化, 部分变成白色“海绵状”组织。MS + 6-BA 1.0 ~ 2.0 mg/L + 2,4-D 0.1 ~ 0.5 mg/L 和 MS + 6-BA 1.0 ~ 2.0 mg/L + NAA 0.1 ~ 0.5 mg/L 培养基均能诱导出黄色愈伤组织, 诱导率在 70% 以上, 并且 6-BA 2.0 mg/L 和 NAA 0.2 mg/L 配合使用时, 诱导率几乎达到 100%。

## 2.2 *LEA<sub>3</sub>* 蛋白基因导入及抗性愈伤组织的筛选

经过轰击后的愈伤组织和对照 (未轰击的愈伤组织) 培养 1 周后转到 LS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + PPT 10.0 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 9 g/L 培养基中进行选择培养, 观察发现, 抗性组织 (转化组织) 色泽鲜亮, 分裂增生快, 经 4 次选择后, 逐步形成较大的愈伤组织块。而非抗性组织 (非转化组织) 及对照逐步褐化、死亡。

## 2.3 植株再生培养

将经过 4 次筛选培养的抗性愈伤组织转入 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + CH 500 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 9 g/L 培养基中进行再生培养, 约 3 周后出现绿色芽点, 5 周后即可形成高 2 ~ 3 cm 的小植株 (图 2, 表 1)。

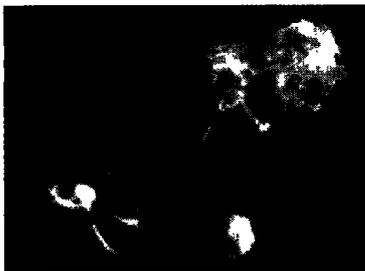


图 2 草莓转化再生植株

Fig. 2 Regenerated plants of transgenic strawberry

表 1 转化结果统计表

Table 1 Summary of transformation

转化批次 Transformation experiment No.	轰击皿数 No. of plates of calli bombarded	抗性愈伤组织块数 No. of resistant calli selected	再生株系 No. of lines regenerated
1	10	65	8
2	20	108	15
3	15	84	12
合计 Total	45	257	35

将 20 个再生芽和 20 个对照芽转入含有 PPT 5 mg/L 的 LS 培养基中再次进行选择时, 8 个芽死亡, 12 个再生芽能够正常生长发育。从理论上讲, 转化细胞经过多次筛选 (培养基中附加 PPT) 得到抗性愈伤组织, 由抗性愈伤组织再生所得的植株理应为抗性植株, 但实际上并非如此。产生这种现象的原因是多方面的。首先, 在转化细胞的选择过程中, 个别细胞“逃逸”选择, 出现假阳性愈伤组织, 这些假阳性愈伤组织再生的植株, 肯定是对 PPT 无抗性的阴性植株。其次, 尽管外源 DNA 在起初确实整合到宿主染色体上, 但在再生的过程中发生了基因丢失, 从而使再生植株失去对 PPT 的抗性。再次, 外源 DNA 的随机插入 (位点效应) 和基因的拷贝数对基因表达具有一定的影响。不适的整合位点和拷贝数往往对基因表达产生负影响, 即导致基因沉默 (gene silence) 或失活。

## 2.4 *Gus* 基因的瞬时表达和 Southern 杂交结果

分别将 *Gus* 基因转化的愈伤组织和对照 (未转化) 放入染液中进行染色, 观察发现, 转化的愈伤组织呈蓝褐色, 而对照仍为黄色。这表明 *Gus* 基因已被导入愈伤组织中, 并且能够进行瞬时表达, 同时也表明本研究所用的基因枪系统是有效的。

将染色后的材料放到 75% 的乳酸水溶液中, 在 1 磅的压力下加热 15 min, 转化材料溶液变成蓝色, 而对照的溶液为浅绿色。在不同波长下分别测定其 OD 值, 结果如图 3。

以地高辛标记的探针进行杂交, 转化株检测到了杂交带, 表明 *LEA<sub>3</sub>* 基因确实整合到了草莓染色体 DNA 中 (图 4)。

转化后的愈伤组织经过 PPT 的 4 次筛选和再生芽的 1 次选择, 再加上 *Gus* 基因能够进行瞬时表达, Southern 杂交结果表明 *LEA<sub>3</sub>* 蛋白基因整合到草莓染色体 DNA 中, 但外源基因能否转录和表达, 尚需进一步的分子生物学检测和胁迫处理试验加以印证, 如 Northern 杂交、Western 杂交和一系列的水分、盐分胁迫等, 这是今后要进行研究的几个主要问题。

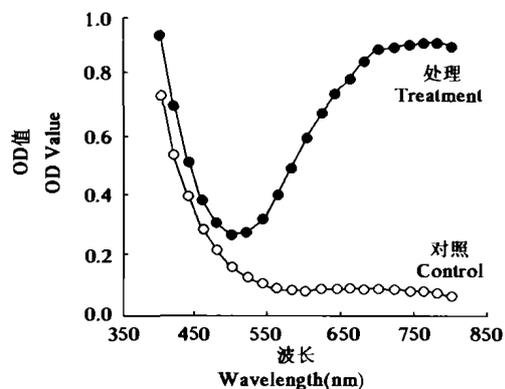


图3 反应液吸收光谱

Fig. 3 Light spectra of the reaction media

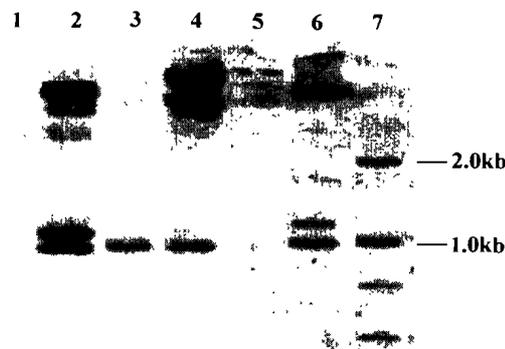


图4 Southern blot 分析结果

1. 阴性对照, 2~6. 转基因植株, 7. Marker.

Fig. 4 The result of southern blot

1. Negative control, 2-6. Transgenic plants, 7. Marker.

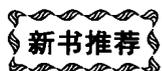
## 参考文献:

- 1 邓馨, 胡文玉. 草莓叶片再生芽及遗传转化体系的建立. 植物学通报, 2000, 17 (2): 174~178
- 2 陈永芳, 弓成林, 罗安才. 果树基因转移研究进展. 四川农业大学学报, 2000, 18 (2): 186~192
- 3 Serres R, Stang E. Gene transfer using electric discharge particle bombardment and recovery of transformed cranberry plants. J. Am. Soc. Hort. Sci., 1992, 117: 174~180
- 4 Jimenez-Bermudez S, Redondo-Navado J, Munoz-Blanco J, et al. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. Plant Physiol., 2002, 128: 751~759

**LEA<sub>3</sub> Gene Transferred into Strawberry**Wang Junli<sup>1,2</sup>, Ge Huibo<sup>3</sup>, Peng Shiqi<sup>3</sup>, Zhang Hongmei<sup>1</sup>, and Xu Jiuru<sup>2</sup>(<sup>1</sup>College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China; <sup>2</sup>College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; <sup>3</sup>College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

**Abstract:** Callus of anther from strawberry (*Fragaria ananassa* Duch. Darslect) was induced on MS medium. Late embryogenesis abundant protein gene, *LEA<sub>3</sub>*, from barley (*Hordeum vulgare* L.) was introduced into strawberry callus by the aid of biolistic-mediated transformation method. After 4 times of PPT selected culture, resistant calli and regenerated plants were obtained. The hybridization bands were determined in different transgenic plants by southern blot, and this showed that *LEA<sub>3</sub>* gene was integrated into strawberry genome.

**Key words:** Strawberry; Anther; Callus; *LEA<sub>3</sub>* gene; Transformation



新书推荐

## 《生物信息学：序列与基因组分析》(影印版)

本书全面系统地介绍了生物信息学方面的理论与应用, 深入浅出, 图文并茂, 资料丰富, 内容新颖。本书专门为有生物学背景的读者精心设计; 对内容的讲解极为清晰, 并配有大量图示; 用自然的语言讲解算法与理论, 避免了大量使用复杂的公式与符号; 用生物学问题及其解决方案来作为理论支撑; 充分利用表格, 一目了然地提供各种最新的生物信息学资源, 是从事和即将从事生物信息学研究的科研人员、技术人员、研究生的重要参考书和入门书。

定价: 82元(含邮费)

购书者请汇款至北京中关村南大街12号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编100081。

