

小麦遗传转化中潮霉素适宜筛选浓度的研究*

奚亚军^{1,2}, 范学科³, 侯文胜¹, 张启发², 路明¹

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨陵 712100; 2 华中农业大学 作物遗传改良国家重点实验室, 湖北 武汉 430070)

3 杨陵职业技术学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 研究了潮霉素不同质量浓度对西农 1376 和京花 1 号小麦愈伤组织及种子的筛选效果。结果表明, 潮霉素对小麦愈伤组织的适宜筛选质量浓度为 110 mg/L, 对转基因小麦后代种子筛选以 140 mg/L 较为适宜; 不同基因型材料对潮霉素的敏感性存在一定差异。

[关键词] 小麦; 遗传转化; 潮霉素

[中图分类号] S512.103.53

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)01-0039-04

在植物基因工程研究中, 快速、有效地从大量转化群体(包括愈伤组织和种子等)筛选到含有外源基因的转化体是成功获得转基因植株的关键。目前, 转化体的筛选包括利用抗生素筛选、除草剂筛选和 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)染色反应筛选3种方法, 其中以抗生素筛选应用较多^[1,2]。在抗生素筛选中, 通常采用卡那霉素作为筛选剂, 但由于单子叶植物特别是一些重要的禾谷类植物如小麦、水稻、玉米、大麦等对卡那霉素具有较高的天然抗性, 使其应用受到了限制^[3]。目前, 潮霉素以其选择效率高、副作用小在水稻^[4,5]、玉米^[6]等作物上得到了广泛应用。近几年, 虽已有研究者在小麦转化实践中尝试用潮霉素作为筛选剂, 但由于其对筛选剂量等缺乏系统研究, 迄今成功的报道并不多^[7]。为此, 本试验对潮霉素不同浓度筛选效果进行了研究, 以期对潮霉素在小麦遗传转化中的应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 小麦材料

供试品种为西农 1376、京花 1 号和导入了叶片衰老抑制基因 P_{SA-G12}-IPT 的 T₁ 代西农 1376, 其中 P_{SA-G12}-IPT 基因携带潮霉素选择标记基因。

1.2 小麦愈伤组织的准备

取授粉 14~16 d 的未成熟种子, 用体积分数 70% 的酒精表面消毒, 并于体积分数 0.15% 的升汞中灭菌 15~20 min 后, 无菌水冲洗 4~5 次, 在超净

工作台上剥取幼胚, 接种于诱导培养基 M_{SD} (MS + CH 500 mg/L + Proline 500 mg/L + Gln_{tan} in 500 mg/L + 2,4-D 2 mg/L + 质量分数 3% Sucrose + 质量分数 0.3% Phytigel, pH 5.9), 23℃, 暗培养 3~4 周。转接于继代培养基 M_{SDT} (MS + CH 500 mg/L + Proline 500 mg/L + Gln_{tan} in 500 mg/L + 2,4-D 1 mg/L + KT 0.5 mg/L + 质量分数 3% Sucrose + 质量分数 0.3% Phytigel, pH 5.9) 中, 暗培养 2~4 周, 继代 2~3 次。

1.3 小麦种子的准备

取成熟饱满的小麦种子, 体积分数 70% 的酒精表面消毒后, 用体积分数 0.15% 的升汞灭菌 20 min, 无菌水冲洗 4~5 次。

1.4 小麦愈伤组织对潮霉素的敏感性试验

潮霉素质量浓度设置为 50, 80, 110, 140 mg/L 4 个水平, 其培养基为继代培养基 M_{ST}, 每个处理接入 50 个长势旺盛的胚性愈伤组织, 重复 3 次, 23℃ 暗培养 2 周, 观察愈伤组织生长情况。

1.5 小麦种子对潮霉素的敏感性试验

潮霉素质量浓度为 0, 50, 80, 110, 140 mg/L 5 个水平, 重复 3 次。每处理取 50 粒小麦种子置于含不同质量浓度潮霉素的筛选液(1/2MS)中浸种 24 h 后, 发芽。定期补充含相应质量浓度潮霉素的筛选液, 28℃, 光照 16 h/d, 共培养 15 d 后调查发芽率

* [收稿日期] 2002-01-10

[基金项目] 国家重点科技(攻关)项目(96-009-01-14); 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室开放课题(2000-36)

[作者简介] 奚亚军(1969-), 男, 陕西白水人, 副研究员, 博士, 主要从事小麦杂优利用及转基因研究。

(第 3 天)、发根数、根系长度、幼苗高度、叶色变化等。

1.6 T₁ 代西农 1376 潮霉素抗性苗的 PCR 检测

1) 随机取 10 粒已导入叶片衰老抑制基因 P_{SA G12}-IPT 的 T₁ 代西农 1376 种子, 消毒后, 于适宜质量浓度的潮霉素筛选液中进行筛选, 15 d 后将抗性苗移入盆栽, 抽提 DNA 进行 PCR 检测。

2) PCR 检测。PCR 引物: 依据叶片衰老启动子 P_{SA G12} 设计引物序列。P_{SA G12}-R 的序列为: 5' TGGCTGAA GTGA TAACCGTC 3', P_{SA G12}-F 的序列为: 5' GCAAA GA GACGA GGAA GAAA 3'。扩增片段长度为 526 bp。

PCR 反应条件: 94 预变性 3 min 94 1 min, 56 1 min, 72 1.5 min, 35 个循环 72 延伸 7 min, 4 保存。

1.7 试剂

2, 4-D、KT、CH、Pro line、Glutam in、潮霉素等为

Sigma 公司产品, 其余为国产试剂。

2 结果与分析

2.1 小麦愈伤组织对潮霉素的敏感性

潮霉素的毒性机理是干扰植物细胞叶绿体和线粒体中的核糖体与延长因子 EF-2 的结合, 从而抑制肽链的延长^[8]。从表 1 可以看出, 140 mg/L 潮霉素处理造成西农 1376 和京花 1 号小麦愈伤组织迅速死亡, 而细胞在死亡过程中会分泌大量的有毒次生代谢物质, 用 140 mg/L 潮霉素筛选转化细胞, 将影响转化细胞的正常生长, 使转化效率下降。50 和 80 mg/L 潮霉素处理不能有效抑制愈伤组织的生长, 若用于抗性组织的筛选, 容易造成大量非转化体的逃逸。而 110 mg/L 潮霉素处理既能有效抑制愈伤组织的生长, 又不至于造成细胞迅速死亡, 是西农 1376 和京花 1 号小麦愈伤组织比较理想的筛选浓度。

表 1 潮霉素对小麦愈伤组织的影响

Table 1 Effects of Hygromycin on wheat calli

品种 Variety	潮霉素质量浓度/ (mg·L) Concentration	愈伤组织数 No. of calli	存活数 No. of survivors	愈伤颜色 Calli color	愈伤状态 Calli status
西农 1376 Xinong 1376	50	50	50.0	黄色 Yellow	继续生长 Continuously grow ing
	80	50	47.3	部分褐色 Part brow n	部分停止生长 Partly stop grow ing
	110	50	42.0	褐色 Brow n	停止生长 Stop grow ing
	140	50	0	黑褐色 B lack-brow n	死亡 D ied
京花 1 号 Jinghua 1	50	50	50.0	黄色 Yellow	继续生长 Continuously grow ing
	80	50	34.3	部分褐色 Part brow n	部分停止生长 Partly stop grow ing
	110	50	10.7	褐色 Brow n	停止生长 Stop grow ing
	140	50	0	黑褐色 B lack-brow n	死亡 D ied

表 1 结果同时显示, 西农 1376 和京花 1 号愈伤组织对潮霉素的反应存在一定差异。80 和 110 mg/L 潮霉素筛选, 结果均为西农 1376 愈伤组织的存活率高于京花 1 号, 表明小麦愈伤组织对潮霉素的敏感性存在基因型差异。

2.2 小麦种子对潮霉素的敏感性

由表 2 可见, 西农 1376 和京花 1 号的发芽率、发根数、根系长度、幼苗高度均与潮霉素质量浓度呈负相关, 随着潮霉素质量浓度的增高而逐渐降低, 其中京花 1 号下降更为显著。

经潮霉素处理后, 西农 1376 和京花 1 号的幼苗叶色均有变化, 随着潮霉素质量浓度的升高叶色由绿色向黄色逐渐递变。当潮霉素质量浓度达到 140 mg/L 时, 两个品种幼苗的叶片失绿, 难以进行正常的光合作用, 导致生长停止, 直至最后萎焉死亡。从潮霉素用作小麦遗传转化的筛选剂角度考虑, 140 mg/L 潮霉素能有效抑制西农 1376 和京花 1 号非转化株的生长, 是对其筛选的适宜质量浓度。同时, 表 2 结果也显示, 两个品种种子对潮霉素的反应存在基因型差异, 其中京花 1 号较西农 1376 敏感。

表 2 潮霉素对小麦种子的影响

Table 2 Effects of hygromycin on wheat seed

品种 Variety	潮霉素质量 浓度/(mg·L ⁻¹) Concentration	发芽率/% Germination rate	发根数 No. of roots	根系长度/cm Root length	幼苗高度/cm Seedling height	叶色 Leaf color	幼苗状态 Seedling status
西农 1376 Xinong 1376	0	92.3	6.0	5.9	19.3	绿色 Green	生长正常 Normal
	50	90.0	5.7	4.2	17.7	绿色 Green	生长正常 Normal
	80	84.0	5.7	3.7	15.1	绿色 Green	生长正常 Normal
	110	74.7	4.3	2.8	13.4	部分黄色 Part yellow	部分萎焉 Partly withered
	140	61.3	3.7	2.0	8.7	黄色 Yellow	萎焉 Withered
京花 1 号 Jinghua 1	0	94.0	6.0	6.7	24.7	绿色 Green	生长正常 Normal
	50	89.3	6.0	5.1	21.3	绿色 Green	生长正常 Normal
	80	80.7	4.3	3.7	14.2	个别黄色 Few yellow	个别萎焉 Few withered
	110	67.3	3.3	2.4	12.5	大部黄色 Most yellow	大部萎焉 Most withered
	140	54.3	3.0	1.3	9.1	黄色 Yellow	萎焉 Withered

2.3 T₁ 代西农 1376 潮霉素抗性苗的 PCR 检测

采用 140 mg/L 潮霉素筛选 T₁ 代西农 1376 种子, 获得 8 株抗性苗(表 3), 经 PCR 检测, 其中 7 株为携带目的基因片段的阳性单株(图 1), 潮霉素筛

选出抗性苗的 PCR 阳性率达到 87.5%。同时观察到潮霉素抗性苗的根系长度、发根数、幼苗高度等与对照均无显著差异, 表明用 140 mg/L 潮霉素对西农 1376 进行筛选是完全可行的。

表 3 潮霉素筛选结果

Table 3 Selection results with hygromycin

潮霉素 质量浓度/ (mg·L ⁻¹) Concentration	T ₁ 代种子数 No. T ₁ seeds	发芽数 No. of germination	抗性苗数 No. of resistant	PCR 阳性株数 No. of PCR positive	PCR 阳性率/% Positive rate
140	10	10	8	7	87.5

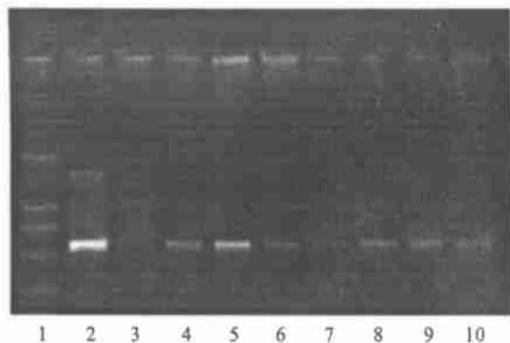


图 1 潮霉素抗性苗的 PCR 扩增结果

1 Ladder DNA; 2 阳性对照; 3 阴性对照;
4~ 10 潮霉素抗性苗

Fig 1 The PCR result of resistant seedlings to hygromycin

1 Ladder DNA; 2 Positive CK; 3 Negative CK;
4~ 10 Resistant seedlings to hygromycin

3 结论与讨论

1) 在以组织培养为基础的小麦遗传转化体系中, 对抗性愈伤组织的筛选是一个重要环节。如何确定筛选试剂的使用质量浓度, 至今尚无一个明确标准, 实践中一般使用的筛选试剂剂量能有效抑制非转化细胞的生长, 而转化细胞生长不受限制。本研究据此确定了潮霉素筛选西农 1376 和京花 1 号愈伤组织使用的质量浓度, 结果表明: 潮霉素对小麦抗性愈伤组织的适宜筛选质量浓度为 110 mg/L。

2) 转基因小麦与常规品种相似, 在有性世代也会发生基因分离。研究表明: 140 mg/L 潮霉素能有效抑制西农 1376 和京花 1 号非转化株的正常生长, 是小麦种子筛选的适宜质量浓度。PCR 检测 T₁ 代西农 1376 潮霉素抗性苗的结果证实, 用 140 mg/L 潮霉素对转基因后代进行筛选具有可行性和有效性。这一结果也可用于花粉管通道法转基因小麦的当代筛选。

3) 西农 1376 和京花 1 号愈伤组织及种子对潮霉素的敏感性存在一定程度的基因型差异, 潮霉素对其他材料是否有同样的影响, 还有待于进一步研究和试验。

[参考文献]

- [1] Vasil I K. Molecular improvement of cereal[J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 25: 725- 747.
- [2] Clark M S. 植物分子生物学实验手册[M]. 顾红雅, 翟礼嘉译. 北京: 高等教育出版社, 1998
- [3] Hauptmann R M, Vasil V, Ozias-Akins P, et al. Evaluation of selectable for obtaining stable transformants in the Gramineae[J]. *Plants Physiol*, 1988, 86: 602- 606
- [4] Datta S K, Peterhans A, Datta K, et al. Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* [J]. *Bio Technol*, 1990, 8: 736- 740
- [5] 叶松青, 储成才, 曹守云, 等. 提高水稻转化效率几个主要因素的研究[J]. *遗传学报*, 2001, 28(10): 933- 938
- [6] Wan Y, Widholm J M, Lemaux P G. High efficiency transformation of maize mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Planta*, 1995, 196: 7- 14
- [7] Ortiz J P A, Reggiardo M L, Ravizzini R A, et al. Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation [J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15(12): 877- 881
- [8] 傅荣昭. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994

Study on the optimal mass concentration of hygromycin in wheat transformation

XIYA-jun^{1,2}, FAN Xue-ke³, HOU Wen-sheng¹, ZHANG Qi-fa², LUM ing¹

(1 College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 National Key Lab for Crop Genetics and Improvement, Huazhong Agriculture University, Wuhan, Hubei 430070, China;

3 Yangling Vocational and Technical College, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The selection effects on the wheat immature embryo calli and the seed of Xinong 1376 and Jinghua 1 with different mass concentration of hygromycin were studied. The results showed that the optimal mass concentration of hygromycin was 110 mg/L to wheat immature embryo calli selection and 140 mg/L to wheat seed. There was a little difference of different wheat genotype to hygromycin.

Key words: wheat; genetic transformation; hygromycin