

普通小麦基因枪转化高效受体系统的建立

权军利,何玉科,陈耀锋,李春莲,郭东伟,韩德俊,余 玲

(西北农林科技大学 农学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 以小麦幼胚愈伤组织为转化受体,以植物表达载体质粒 pROK2 为外源 DNA,以蔗糖和甘露醇为渗透剂,研究了愈伤组织生长状态、渗透剂种类及其处理时间和浓度对基因枪转化效率的影响。结果表明,在采用基因枪轰击法对小麦幼胚愈伤组织进行转化的体系中,受体愈伤的最佳发育阶段为胚性启动前期;高渗处理可以使基因枪转化频率得到明显提高,但处理时间过长对愈伤组织的增殖和分化又有明显的抑制作用,用蔗糖进行高渗处理对愈伤组织生长及再生的抑制作用较用甘露醇弱;用 0.6 mol/L 蔗糖和 0.5 mol/L 甘露醇分别在轰击前 6 h 和轰击后 18 h 进行高渗处理转化效果均最佳。文章建立了高效蔗糖高渗基因枪转化受体系统。

[关键词] 小麦;愈伤组织;受体系统;基因转化;基因枪;高渗处理

[中图分类号] S512.103.53

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)07-0117-06

Establishment of efficient acceptor system for gene transformation by micro-projectile bombardment in wheat

QUAN Jun-li, HE Yu-ke, CHEN Yao-feng, LI Chun-lian, GUO Dong-wei,

HAN De-jun, YU Ling

(College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract : An efficient acceptor system for gene transformation was established in callus of wheat immature embryos by improving the condition of osmotic treatment before bombardment. In this experiment, the acceptors were from 3 wheat cultivars including Qianjinzaio, Xiaoyan 22 and 9848. Particle bombardment was carried out by using pROK2 containing the *Npt* gene and *HAL1* gene. The factors affecting the Biolistic transformation efficiency like physiological state and time of osmotic treatment with different osmosis concentration were studied. The result showed that osmotic treatment could enhance the differentiation frequency of bombarded calli. The callus before embryo switching on was optional. Sucrose as osmosis had less inactive effect on the growth and regeneration of callus than mannitol before bombardment. The callus treated with 0.6 mol/L sucrose and 0.5 mol/L mannitol for 6 hours before bombardment or 18 hours after bombardment could significantly achieve the optional transformation efficiency.

Key words : wheat; callus; acceptor system; gene transformation; particle bombardment; osmotic treatment

成功的基因转化首先依赖于良好的植物受体系统的建立。自从 Vasil 等^[1]首先应用基因枪法将

Gus/Bar 基因导入小麦愈伤组织并获得世界上第 1 株转基因小麦以来,小麦转基因研究有了很大的发

* [收稿日期] 2006-05-22

[基金项目] 国家转基因专项(J Y03-B-23-02);陕西省科技攻关项目(2003K03-G1-04)

[作者简介] 权军利(1977-),女,陕西澄城人,博士,主要从事植物生物技术研究。

[通讯作者] 陈耀锋(1956-),男,陕西岐山人,教授,博士生导师,主要从事植物生物技术研究。

展。目前,基因枪法已成为小麦最为成熟且应用最多的外源基因转化方法。但转化过程所涉及的因素较多,如外植体的选择、植物表达载体的构建、制备轰击用微弹的方法、轰击条件等,都会影响到基因枪转化系统的转化效率,其中基因枪轰击时受体细胞所处的生理状态,是决定植物细胞接受外源基因难易程度和轰击后“转化”细胞再生频率的重要因素。为了减少微弹轰击细胞后细胞质溶液由伤口外渗,通常在轰击前将待轰击的外植体放在含有高浓度渗透剂的培养基上,进行高渗透压预培养,使外植体细胞处于适度的质壁分离状态,以提高转化效率^[2-4]。为了探索植物细胞的这一最佳“感受态”,本研究以大田农艺性状优良且组培特性较好的小麦品种为材料,通过耐盐基因 *HAL1* 的转化,从轰击前受体的外观生长状态和高渗处理所用的渗透剂种类、浓度及其高渗处理时间等方面,对轰击后愈伤组织的再生频率和转化效率进行了比较,旨在建立一个高效

5 引物 5'-GGTCTAGAATGGATTTCAAA-GATTTAGGATTGCATG-3';

Bam H I

3 引物 5'-CGGGATCCTTTTTCAACTATTCTGTGTTGATTG-3'.

Kpn I

轰击用基因枪为 BIO-RAD 公司生产的 Biolistic PDS-1000/ He 型基因枪。

幼胚愈伤组织诱导培养基:MS + 2,4-D 2.0 mg/L + KT 0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L + Ag 6.0 g/L (pH 5.8);高渗培养基:MS + 2,4-D 2.0 mg/L + KT 0.5 mg/L + 蔗糖/甘露醇 + Ag 9.0 g/L (pH 5.8);恢复培养基:MS + 2,4-D 2.0 mg/L + KT 0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L + Ag 6.0 g/L (pH 5.8), MS + 2,4-D 2.0 mg/L + KT 0.5 mg/L + 蔗糖 60 g/L + Ag 6.0 g/L (pH 5.8);筛选培养基:MS + 2,4-D 1.0 mg/L + KT 0.5 mg/L + NAA 0.01 mg/L + 蔗糖 30 g/L + Ag 6.0 g/L (pH 5.8)。所有培养基均采用高温高压灭菌,选择剂采用过滤灭菌,培养基冷却至 60℃ 左右时加入。

1.2 方 法

1.2.1 愈伤组织诱导 幼嫩种子于超净工作台内用体积分数 75% 的酒精表面消毒 30 s,再用 1 g/L 的升汞灭菌 8~10 min,无菌水冲洗 3 次,轻轻剥取幼胚,平面向上接种到幼胚愈伤组织诱导培养基上,20℃ 下黑暗培养,观察愈伤组织形成速度及愈伤组织质量。

1.2.2 高渗处理对小麦愈伤组织生长的影响 于小麦愈伤组织胚性启动前期,取一批约 5.0 mm 大

的、不依赖供体植株基因型的普通小麦基因枪转化受体系统。

1 材料与方法

1.1 材 料

以小麦幼胚愈伤组织为基因枪轰击的受体材料。小麦材料为西北农林科技大学细胞工程实验室试验田种植的黄淮麦区 3 个优良小麦品种(系)小偃 22、千斤早和 9848。于小麦开花授粉后 2 周左右,选取约 1.0 mm 大小、半透明状未成熟胚作为起始外植体。

携带 *HAL1* 基因的植物表达载体质粒为 pROK2,标记基因为磷酸新霉素转移酶(*Npt*)基因,由中科院上海植物生理生化研究所何玉科老师提供。

所用引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,序列如下:

小、质地均匀的愈伤组织,分别在含 0.4 mol/L 蔗糖和甘露醇的高渗培养基上进行高渗处理,以不经处理的愈伤组织为对照,处理前称其鲜重,然后每隔 2 d 称量一次愈伤组织鲜重,计算愈伤组织鲜重增长率。愈伤组织鲜重增长率/% = 增加的愈伤组织的鲜重(g)/高渗处理前愈伤组织的鲜重(g) × 100%。

1.2.3 轰击受体材料的准备 在直径 9 cm 的培养皿上铺一薄层高渗培养基,将幼胚愈伤组织按顺序紧密摆放于培养皿中央直径 3 cm 范围之内。

1.2.4 基因枪转化 参照朱建楚等^[5]介绍的方法进行。轰击压力为 1 100 psi,真空度为 3 733 Pa,金粉直径为 1.0 μm,轰击距离为 9 cm,每枪用量为 250 μg 金粉 + 0.5 μg 质粒 DNA。

1.2.5 高渗预处理前愈伤组织的生长状态对基因枪轰击后转化细胞再生频率的影响 分别用 0.4 mol/L 的甘露醇和蔗糖在轰击前 6 h 和轰击后 18 h 对千斤早的幼胚愈伤组织进行高渗处理,并分别在含 30 和 60 g/L 蔗糖的小麦幼胚愈伤组织诱导培养基上进行 14 d 的光恢复培养。

1.2.6 高渗处理时控制渗透压的不同试剂及其浓度对筛选分化频率及转化效率的影响 渗透剂浓度梯度分别设为 0.0,0.4,0.5,0.6,0.7 和 0.8 mol/L,共计转化幼胚愈伤组织 2 240 块,其中每种

渗透剂在每个浓度上共轰击 3 枪,即千斤早、小偃 22 和 9848 各轰击 1 枪,不经渗透处理的对照轰击 1 枪。于轰击前 6 h 和轰击后 18 h 在含不同浓度渗透剂的高渗培养基上处理,轰击后随机各取一半,分别置于恢复培养基和 上进行恢复培养,对恢复 14 d 后的愈伤组织用筛选培养基附加 100 mg/L 卡那霉素或 50 mg/L G418 进行再生筛选,统计抗性植株数,并提取获得的抗性植株叶片 DNA 进行 PCR 检测,计算转化效率。

1.2.7 转化植株的 PCR 检测 对筛选得到的抗性再生植株,用 CTAB 法提取叶片基因组 DNA 进行 PCR 检测,以携带目的基因的质粒为阳性对照,以灭菌双蒸水为阴性对照,扩增条件为:94 5 min; 94 45 s,55 45 s,72 90 s,35 个循环;72 延伸 10 min。经 PCR 扩增后,将扩增产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳检测并照相。

2 结果与分析

2.1 高渗处理对小麦愈伤组织生长的影响

图 1 表明,高渗处理的愈伤组织鲜重增长率明显低于对照,说明高渗处理对小麦愈伤组织的生长有明显的抑制作用;蔗糖对愈伤组织生长的抑制作用较甘露醇弱,这可能是因为蔗糖除了为外植体提供渗透压外,作为代谢的碳源还可以有效地促进细胞分裂与生长,使细胞处于相对活跃的生理生化状态。从图 1 还可以看出,未经处理的对照愈伤组织鲜重增长速度很快,蔗糖高渗处理次之,而甘露醇处理的愈伤组织增长速度则很平缓,至第 18 天时,愈伤组织的生长速度达到最高,18 d 以后增长速度减慢,这可能是由于培养基中的营养成分被消耗殆尽并积累了一定有害成分的缘故。

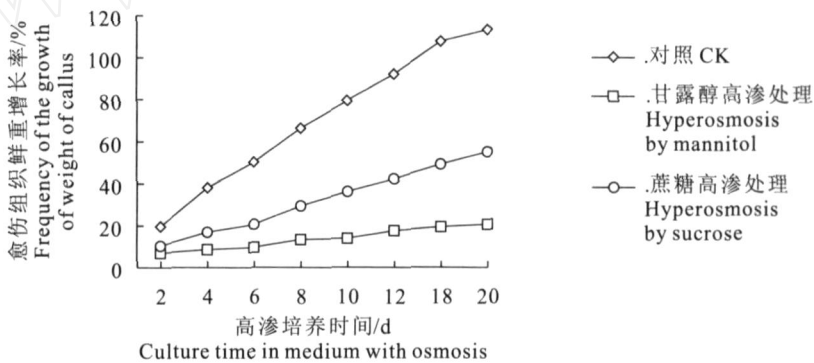


图 1 渗透剂及其处理时间对小麦愈伤组织生长量的影响

Fig. 1 Effects of hyperosmosis treatment on the growth of wheat callus

研究中还发现,随着高渗培养时间的延长,愈伤组织的分化能力也明显下降,甚至逐渐丧失了分化能力,这些愈伤组织变得松软有韧性,呈水浸状,与不能启动胚性的愈伤组织相似。

2.2 小麦愈伤组织生长状态对轰击后转化细胞再生频率的影响

高渗处理前,小麦愈伤组织的生长状态直接影响着基因枪转化效率的高低,不能启动再分化的愈伤组织不宜作为基因枪转化的受体。本研究表明,最佳基因导入的小麦愈伤组织状态为绿豆大小、刚露绿点、结构致密的淡黄色愈伤(图 2A, 2D),此时的愈伤组织生长繁殖快,活力高,容易接受外源基因,细胞的耐受性强,由于基因枪轰击的部位主要是表层和亚表层细胞,因此,这种细胞是抵抗基因枪轰击损伤的最佳受体。同时,这类愈伤组织受轰击后恢复能力强,大部分都能再生并分化植株(图 2B,

2C, 2E, 2F)。而呈白色或青白色、透明水浸状且质地松软的愈伤组织(图 2B, 2C, 2E, 2F 中箭头所指),由于其本身分化能力较差,在接受基因枪轰击后,细胞受损更加严重,难以恢复,生长增殖也受到抑制,目的基因很难整合并通过植株再生得以表达。

在基因枪轰击转化试验中,从经渗透处理和恢复培养后得到的绿色芽点的分化频率(表 1)还可以看出,用同样浓度的渗透剂处理,蔗糖高渗后再在含较低蔗糖浓度的恢复培养基上培养 14 d,其胚性芽点的分化频率明显高于用甘露醇渗透,说明甘露醇渗透(图 2B, 2C)对小麦愈伤组织生长及体胚发生的抑制作用强于蔗糖渗透(图 2E, 2F)。而且不论用甘露醇还是用蔗糖进行高渗处理,恢复培养时在含 30 g/L 蔗糖的培养基上(图 2C, 2F)所获得的再生频率远远高于 60 g/L 蔗糖培养基(图 2B, 2E)。

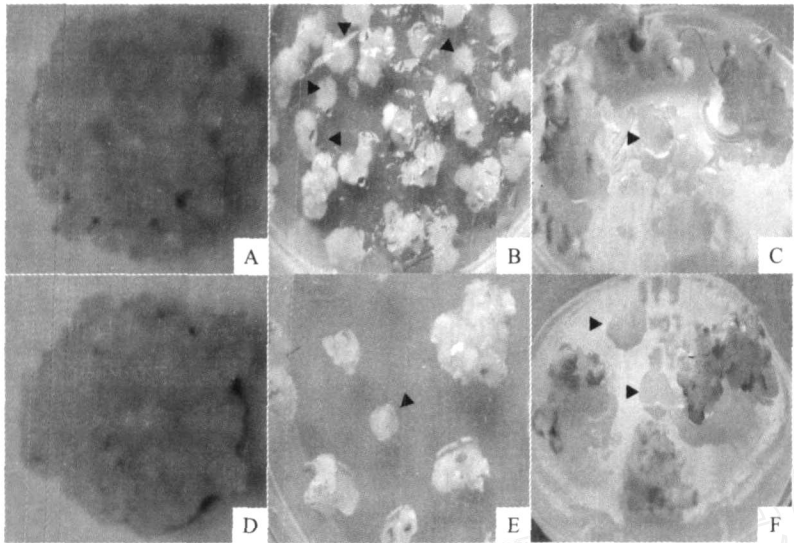


图 2 高渗预处理前愈伤组织的生长状态对基因枪轰击后转化细胞再生频率的影响

A. 0.4 mol/L 甘露醇高渗处理的小麦幼胚愈伤组织;B. 0.4 mol/L 甘露醇高渗处理、60 g/L 蔗糖恢复培养 14 d 的愈伤组织;
C. 0.4 mol/L 甘露醇高渗处理、30 g/L 蔗糖恢复培养 14 d 的愈伤组织;D. 0.4 mol/L 蔗糖高渗处理的小麦幼胚愈伤组织;
E. 0.4 mol/L 蔗糖高渗处理、60 g/L 蔗糖恢复培养 14 d 的愈伤组织;F. 0.4 mol/L 蔗糖高渗处理、30 g/L 蔗糖恢复
培养 14 d 的愈伤组织;箭头所指为未分化愈伤组织

Fig. 2 Effect of the growth appearance of immature embryo calli before osmotic treatment on regeneration frequency of transformed cells by microprojectile bombardment

A. Growth appearance of immature embryo callus treated with 0.4 mol/L mannitol;B. Callus cultured in medium with 60 g/L sugar after treated with mannitol;C. Callus cultured in medium with 30 g/L sugar after treated with mannitol;D. Growth appearance of immature embryo callus after treated with 0.4 mol/L sugar;E. Callus cultured in medium with 60 g/L sugar after treated with sugar; F. Callus cultured in medium with 30 g/L sugar after treated with sugar;pointed by arrows are undifferentiated callus

表 1 渗透剂及恢复培养基种类对小麦轰击愈伤再生频率的影响

Table 1 Effect of different osmosis and recovering medium on regenerated frequency of bombarded calli

渗透剂种类 Osmosis	恢复培养基种类 Recovering medium	处理愈伤组织数 No. of treatment calli	分化芽点数 No. of regenerated buds	平均每个愈伤组织 上产生的绿芽数 No. of regenerated buds per callus
蔗糖 Sucrose		112	1 075	9.60
甘露 Mannitol		104	338	3.25
		90	648	7.20
		115	130	1.13

2.3 渗透剂浓度对愈伤组织转化效率的影响

由表 2 可以看出,用蔗糖作为渗透剂,在蔗糖浓度为 0.6 mol/L 时小麦筛选分化频率达到最高;而用甘露醇作为渗透剂,在浓度为 0.5 mol/L 时小麦筛选分化频率达到最高;而且二者的筛选分化频率均明显高于未经渗透处理的对照,说明高渗处理能够明显地提高抗性愈伤组织及抗性植株的获得率。在一定浓度范围内,随着渗透剂浓度的增加,筛选分化频率也随之提高,说明用较高浓度的渗透剂对受体细胞进行短时间渗透处理,有利于外源基因在低损伤情况下进入受体细胞内部,从而提高基因枪轰击后小麦愈伤组织的增殖和分化能力,增加抗性愈伤和抗性植株的分化比例。

由表 2 还可以看出,蔗糖浓度为 0.7 mol/L 时的筛选分化频率明显高于 0.5 mol/L,蔗糖浓度为 0.8 mol/L 时的筛选分化频率则与 0.4 和 0.5 mol/L 时无明显差别;甘露醇在浓度超过 0.5 mol/L 时,筛选分化频率也会缓慢降低,说明选择合适的渗透剂浓度对于提高基因枪转化效率很有必要。

表 2 还表明,以蔗糖代替甘露醇来提供渗透压进行基因枪转化,有利于分化频率的提高。尤其是在浓度为 0.4 mol/L 时,二者筛选分化频率相差明显,蔗糖为 6.02%,而甘露醇只有 3.41%。这有可能是因为在蔗糖浓度偏低的情况下,蔗糖除为外植体提供渗透压以维持其生存与分化外,还可作为碳源促进细胞的分裂与生长,增强转化细胞的分化能

力。而 0.5 mol/L 恰恰是在轰击前 6 h 和轰击后 18 h 甘露醇发挥其最佳作用的浓度范围,所以蔗糖在此浓度上的筛选分化频率要低一些。

表 2 渗透剂种类及其浓度对基因枪轰击后小麦愈伤组织分化频率与转化效率的影响

渗透剂 Osmosis		轰击愈伤数 Total number of bombarded calli	筛选分化数 Number of differentiation lants after selection	分化频率/ % Frequency of differentiation	阳性株数 Number of positive plants	转化效率/ % Transformation efficiency
种类 Types	浓度/ (mol · L ⁻¹) Concentration of osmosis					
蔗糖 Sucrose	0.0	103	4	3.88	0	0.00
	0.4	216	13	6.02	1	0.46
	0.5	219	16	7.31	1	0.46
	0.6	241	23	9.54	4	1.66
	0.7	206	17	8.25	2	0.97
	0.8	214	13	6.07	1	0.47
甘露醇 Mannitol	0.0	103	4	3.88	0	0.00
	0.4	205	7	3.41	1	0.49
	0.5	203	19	9.36	2	0.99
	0.6	214	19	8.88	2	0.93
	0.7	206	17	8.25	1	0.49
	0.8	213	16	7.51	1	0.47

2.4 转化植株的 PCR 检测

对 4 株经移栽成活且长势良好的再生苗的 PCR 检测结果(图 3)表明,4 株苗均在 879 bp 处有 1 条与质粒 DNA 扩增产物一致的特异带,而对照植株未能扩增出基因片段。初步表明目的基因已经整合到小麦基因组中。

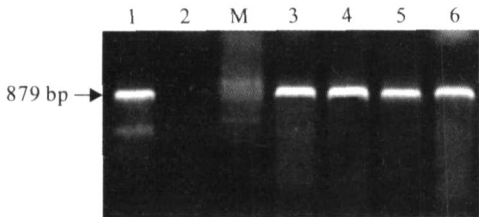


图 3 转化植株的 PCR 检测结果

1. 阳性对照;2. 阴性对照;3~6. 转化植株;M. 分子量

Fig.3 PCR amplification pattern of transformed plants

1. Positive control;2. Negative control;
3- 6. Transformation plants;M. Marker

3 讨 论

受体的生理因素主要是指受体细胞或组织的生理状态。一般认为,生理活性高的组织或细胞,其 DNA 活跃,有利于外源 DNA 的摄入与整合,而受体细胞 DNA 的活跃程度与渗透压的提供来源及其浓度有关。选用再生能力强的外植体为转化受体,在轰击前将受体预培养一段时间,使其处于高度的生理活性状态,可明显提高转化效率。在基因枪转化小麦的研究中,一般都是用扬花来确定幼胚接种时间,以幼胚预培养时间来衡量并决定基因导入时间^[1-4,6]。而作者的经验证明,用小麦幼胚诱导愈伤组织时,幼胚的发育阶段及培养条件至关重要,幼胚

的最佳取材时期为大小约 1.0 mm、盾片组织刚开始积累淀粉且呈半透明状态时,这是诱导出高质量愈伤组织进而完成体细胞胚胎发生和植株再生的最关键因素。基因枪法导入基因的最佳小麦幼胚预培养时间,因品种的培养特性不同而异,愈伤组织接受外源基因的最佳状态为绿豆大小、刚露绿点、结构致密且呈淡黄色,这是幼胚组织完全完成脱分化启动再分化前细胞分裂最活跃的时期,是提高转化效率的重要前提。

植物细胞壁是大分子物质胞间运输的主要屏障,但近年来的研究表明,植物胚细胞的部分胞间连丝束所在的区域形成,可让细胞器或大分子(50 kb 以上)通过的胞间壁通道,其形成是生物体特定发育时期的生理现象^[7]。因此,诱导出高质量的胚细胞并在胚性时期进行基因导入,可以得到较高的转化效率。向完整植物细胞直接转移基因存在的主要问题是,细胞壁与质膜之间的紧密接触限制了 DNA 分子的通过,所以,为提高基因枪法转化效率,研究者常对受体材料进行一定的高渗预处理和后处理。渗透压的预处理能使细胞发生质壁分离,当金属微粒穿入细胞时,发生质壁分离的原生质被挤出的可能性减小,从而使细胞免受损伤^[8];而后处理可能是给受损细胞提供一个有利的细胞质膜修复环境。而且在高渗处理的整个过程当中,由于渗透压的存在,在轰击时没能直接进入细胞内的外源 DNA 分子,就可能会通过质壁分离后所形成的胞间壁通道进入更多细胞。但是,如果对各种渗透剂及其浓度和处理时间把握不当,就不能使渗透剂充分发挥其有效作用,甚至有可能使被轰击细胞发生不可逆的质壁分离,从而不能恢复到正常的生长和分裂状态。

渗透处理可以增强瞬间表达和稳定转化频率,这在许多报道中已经得到证实^[9-11],但所用的渗透剂种类、浓度及处理时间各有差异。有人提出 DNA 稳定的整合似乎发生在大部分含微弹并存活 48 h 的细胞中^[12],因此,转化细胞的成活率就成为转化成功与否的限制因素。本研究进一步表明,高渗处理有利于转化细胞的修复和转化效率的提高,同时在恢复培养阶段,较低蔗糖浓度更有利于渗透压完全解除后细胞膨压的恢复和胚性细胞的分化。Uze 等^[13]用 20 %的麦芽糖对小麦愈伤组织进行 4~6 h 高渗处理,并未观察到 *Gus* 基因瞬时表达频率的提高,说明处理条件不合适。本试验比较了蔗糖和甘露醇作为渗透剂在基因枪转化中的效果,初步确定了 2 种渗透剂的最佳使用浓度和最佳处理时间,为提高基因枪转化效率奠定了基础。

本研究建立了小麦基因枪转化高效受体系统,并结合后续筛选程序获得了耐盐调控基因 *HAL1* 的转基因小麦植株,相关研究结果将另文报道。

[参考文献]

- [1] Vasil V, Castillo A M, Fromm M E, et al. Herbicide resistance fertile transgenic wheat plants obtained by micro-projectile bombardment of regenerable embryo-genic callus[J]. *Biotechnology*, 1992, 10(7): 667-674.
- [2] 尹 钧,任江萍,宋 丽. 小麦不同转基因受体材料的植株再生培养研究[J]. *麦类作物学报*, 2004, 24(2): 1-4.
- [3] 赵 虹,李名扬,裴 炎. 影响基因枪转化小麦的几个因素[J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2001, 38(4): 570-574.
- [4] 孙红正,陈新建,吕德彬. 基因枪轰击几个重要参数对小麦基因转化的影响[J]. *河南农业大学学报*, 2004, 38(2): 123-126.
- [5] 朱建楚,布都会,于新智,等. Biolistic PDS-1000/ He 基因枪的使用方法[J]. *陕西农业科学*, 2003(6): 81-82.
- [6] Takumi S, Shimada T. Production of transgenic wheat through particle bombardment of scutellar tissue frequency is influenced by culture duration[J]. *Plant Via Media Physiol*, 1996, 149: 418-423.
- [7] 张伟成,王文梅,单双健. 小麦原胚对外源大分子与不透膜物质的摄入[J]. *植物学报*, 1992, 34(5): 325-328.
- [8] Vain P, Keen N, Murillo J, et al. Development of the particle in-flow gus[J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1993, 33: 237-246.
- [9] Vain P, Michael D M, Finner J J. Treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize[J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 12(2): 84-88.
- [10] Alpeter Fredy, Vimla Vasil, Vibha Srivastara, et al. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L) plants[J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 16: 12-17.
- [11] 王芋华. 水稻高效转化系统的建立[J]. *应用与环境生物学报*, 2004, 10(2): 139-142.
- [12] Rochange F, Serrano L, Marque C, et al. DNA delivery into *Eucalyptus zygotic* embryos through biolistics: optimization of the biological and physical parameters of bombardment for two different particle guns[J]. *Plant Cell Reports*, 1995, 14: 674-678.
- [13] Uze M, Pot R I, Soutler C. Factors influencing T-DNA transfer from *Agrobacterium* to pre-cultured immature wheat embryos[J]. *Cereal Res Com*, 2000, 28(1): 17-23.