

文章编号: 1003-8701(2001)03-0007-05

小麦基因枪高效转化体系的建立

魏松红¹, 张领兵², 张艳贞², 王 罡², 杨家书¹

(1. 沈阳农业大学植保系, 辽宁 沈阳 110161; 2. 解放军军需大学植物基因工程研究中心, 吉林 长春 130062)

摘 要:以小麦幼胚为基因枪转化受体, 用含 GUS 和 bar 基因的质粒 pDM803 对小麦幼胚进行转化, 并对幼胚大小、轰击距离、质粒和金粉用量等参数对 GUS 瞬时表达率及表达量的影响进行了研究。幼胚以 1.0~1.5 mm 最为适宜, 6 cm 和 9 cm 各轰击一次、质粒 0.5 μg /枪及金粉 300 μg /枪, GUS 瞬时表达率及表达量最高。通过对以上参数的优化, 建立了一个高效的小麦基因枪转化体系。

关键词:小麦; 基因枪转化; 幼胚

中图分类号: S512.103.52

文献标识码: A

小麦是重要的粮食作物之一, 也是一直倍受人们关注的进行基因工程改良的重要作物。自 20 世纪 80 年代以来, 不论是在基因转化受体范围和转化方法, 还是在目的基因的选择应用以及转化效率的提高等方面, 植物基因工程的研究取得了很大发展。小麦基因转化的研究虽迟于水稻和玉米等单子叶植物, 但近年来, 已有报道将报告基因 GUS、筛选标记基因 bar、NPT II、HPT、麦谷蛋白基因、雄性不育基因和几丁质酶基因等^[1-5]分别导入小麦并获得小麦转基因植株。在基因转化方法上, 通过基因枪、农杆菌介导、花粉管通道、PEG 介导、激光微束介导和组织浸泡法等^[6-9]都已获得成功, 其中目前比较成熟、应用比较广泛的为基因枪法。Vasil 等^[10](1992)首先应用基因枪法将 GUS 和 bar 基因导入小麦愈伤组织中, 获得了世界上第一株转基因小麦, 使重要粮食作物小麦的转基因研究向前迈出了一大步。对小麦基因转化技术方面的改进以及影响因素的研究已有报道^[11, 12], 本文对小麦转化受体幼胚的最佳大小范围以及适宜轰击距离、质粒、金粉用量等参数进行了研究, 以期获得更为合理有效的小麦基因转化体系。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试品种为辽春 10、铁春 1 和丰强 3 等春小麦品种。供试质粒为以 CaMV35S 为启动子, 带有 GUS 和 bar 基因的 pDM803。

1.2 试验方法

1.2.1 小麦幼胚愈伤的诱导与分化

收稿日期: 2000-09-29

基金项目: 国家植物转基因中试及产业化基地建设专项课题资助项目(J99-B-001)

作者简介: 魏松红(1974-), 沈阳农业大学博士研究生, 研究方向为小麦基因转化。

选取不同小麦品种辽春 10、铁春 1 和丰强 3 开花后 12~18 d 未成熟子粒,经 70%酒精消毒 1 min,0.1%升汞消毒 10 min,无菌水冲洗 3 次后剥取不同大小的幼胚,按<1.0 mm、1.0~1.5 mm、1.5~2.0 mm、>2.0 mm 四个级别分别接于 MS+2.2,4-D+0.4 IAA+0.2 KT(单位 mg/L,以下同)愈伤诱导培养基上,25℃暗培养一周左右诱导愈伤组织,之后转入弱光条件下培养形成绿芽,将绿芽接入 MS+0.2 NAA+0.2 KT+0.5 6-BA 分化培养基上强光条件下培养长出小麦苗。调查不同大小幼胚愈伤出现时间及愈伤诱导率与分化率。

1.2.2 微弹包装

按以下程序进行(参照基因枪说明微弹包装程序有改进):①取 50 μL 金粉颗粒悬浮液(两种浓度,分别为 60 mg/mL、30 mg/mL);②涡旋 5 min,使金粉充分悬浮;③加入 5 μL 质粒(两种浓度,分别为 1 μg/μL、0.5 μg/μL),涡旋;④加入 50 μL 2.5M CaCl₂,涡旋;⑤加入 20 μL 0.1M 亚精胺,涡旋;⑥静置 5 min;⑦离心,3 000 r/min,2 s;⑧加入 140 μL 70%乙醇洗 1 次;⑨加入 48 μL 无水乙醇(5 枪用量)。

1.2.3 基因枪轰击

将预培养 2 d 的小麦幼胚转入含有 0.5 M 甘露醇的愈伤诱导培养基上,渗透处理 6 h,用于基因枪(Bio-Rad 公司生产的 PDS 1 000/He 型基因枪)轰击,轰击气体压力为 1 100 Pa,真空度为 27 inch Hg,阻挡网与轰击材料之间的距离为 6 cm 和 9 cm,轰击后继续黑暗条件下渗透处理 18 h,之后转入不含甘露醇的诱导培养基中暗培养。轰击 2 d 后进行 GUS 染色(参照 Jefferson R. A. 1987 方法)^[13]。调查每个幼胚上的蓝点数,4℃保存,15 d 后重新调查蓝点数。

1.2.4 抗性愈伤及植株的筛选

将转化的小麦幼胚暗培养一周后转入含 5 mg/L ppt 的诱导培养基中,将存活的愈伤转入含 2 mg/L ppt 的分化培养基中,待存活的绿苗长至 2~3 cm 时,转入不含 ppt 的 1/2 MS 生根培养基中。调查存活愈伤数及存活苗数。

2 结果与分析

2.1 小麦不同品种、不同大小幼胚对愈伤诱导与分化的影响

表 1 小麦不同品种幼胚大小对愈伤诱导与分化的影响

品 种	幼胚大小(mm)	愈伤出现时间(d)	愈伤诱导率(%)	愈伤分化率(%)
辽春 10	<1.0	7	70.8	40.3
	1.0~1.5	3	99.2	70.0
	1.5~2.0	3	98.3	62.1
	>2.0	5	89.0	54.5
铁春 1	<1.0	10	85.3	37.2
	1.0~1.5	6	100.0	53.3
	1.5~2.0	6	98.8	49.3
	>2.0	7	93.6	37.5
丰强 3	<1.0	7	75.0	34.3
	1.0~1.5	3	100.0	50.0
	1.5~2.0	4	96.5	36.2
	>2.0	5	93.3	41.1

结果如表 1 所示,不同大小幼胚对愈伤的出现时间、愈伤诱导率及分化率均有不同程度的影响,幼胚>1.0 mm 能较快形成愈伤,愈伤诱导频率较高,其中 1.0~1.5 mm 大小的幼胚愈伤诱导频率最高达 99%以上,分化频率也高于其它范围的幼胚。幼胚<1.0 mm 愈伤形成

明显延迟 3~4 d,且愈伤诱导频率及分化频率明显下降。不同品种愈伤出现时间、愈伤诱导频率及分化频率有差别。辽春 10 与丰强 3 的愈伤出现时间接近,铁春 1 愈伤形成较上述两品种迟 2~3 d,愈伤分化频率以辽春 10 的较高。可见,1.0~1.5 mm 大小的幼胚为较适宜的转化受体。

2.2 轰击距离、质粒和金粉浓度对小麦幼胚基因枪转化瞬时表达的影响

表 2 轰击距离、质粒和金粉浓度对小麦幼胚基因枪转化瞬时表达的影响

枪数/皿	轰击距离 (cm)	质粒浓度 ($\mu\text{g}/\text{枪}$)	金粉浓度 ($\mu\text{g}/\text{枪}$)	处理 2 d		处理 15 d	
				瞬时表达率 (%)	瞬时表达量 (个)	瞬时表达率 (%)	瞬时表达量 (个)
2	6+9	0.5	300	100	16.0	100	39.2
2	6+9	1.0	600	85	7.9	85	18.9
1	6	0.5	300	75	11.3	85	23.5
1	6	1.0	600	75	4.8	75	15.3
1	9	0.5	300	40	0.4	60	1.8

注:瞬时表达率为有蓝点幼胚占染色幼胚百分率,瞬时表达量为每个幼胚平均蓝点数。

以小麦幼胚为材料进行基因枪转化(表 2),2 d 后 GUS 染色结果(图 1)表明每皿轰击 2 枪(6 cm 和 9 cm 各轰击一次)较轰击 1 枪的瞬时表达率高,最高可达 100%,每个幼胚平均蓝点数为 16.0 个。轰击距离为 6 cm 的瞬时表达率明显要好于 9 cm 的,轰击距离为 9 cm 的瞬时表达率仅为 40%,且表达量较少。质粒与金粉浓度分别为 0.5 $\mu\text{g}/\text{枪}$ 和 300 $\mu\text{g}/\text{枪}$,较 1 $\mu\text{g}/\text{枪}$ 和 600 $\mu\text{g}/\text{枪}$ 的瞬时表达率相近或略高,但表达量明显增加。研究还发现,轰击后 2 d 对幼胚进行 GUS 染色,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 15 d 后,瞬时表达率基本一致,但表达量明显呈上升趋势。

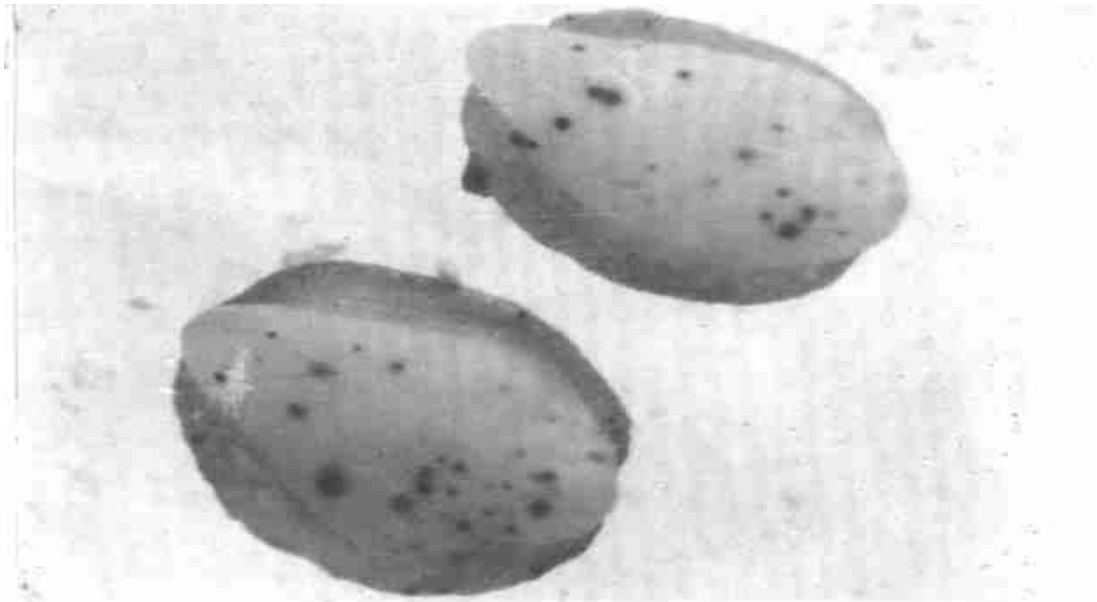


图 1 基因枪轰击小麦幼胚 GUS 染色结果

2.3 不同小麦品种抗性愈伤及抗性植株的筛选

由表 3 可知,经 5 mg/L ppt 和 2 mg/L ppt 二次抗性筛选后,由于受 ppt 选择压力的影响,存活的愈伤数及植株数明显低于最初接种的幼胚数。经二次抗性筛选后辽春 10 品种的再生率为 3.3%,铁春 1 和丰强 3 品种的再生率分别为 1.3%和 1.4%。

表 3 不同小麦品种抗性愈伤及抗性植株的筛选

品 种	幼胚数 (个)	抗 5 mg/L ppt 存活愈伤数(块)	抗 2 mg/L ppt 存活植株数(株)	二次抗性筛选 后的再生率(%)
辽春 10	582	83	19	3.3
铁春 1	372	28	5	1.3
丰强 3	288	30	4	1.4

3 讨 论

辽春 10、铁春 1 和丰强 3 均为东北地区品质较好、性状较优良的春小麦品种,但由于在某些方面抗性(如抗白粉病和抗蚜虫等)较差,因此是作为基因转化的首选材料。本实验在已筛选出愈伤诱导、分化、生根培养基的基础上,比较了不同大小的幼胚对愈伤形成、诱导率和分化率的影响。结果表明:1.0~1.5 mm 大小的幼胚愈伤出现早,诱导率和分化率较高。另外研究表明,将分化出的绿芽转入含有 0.2% 活性炭或 1 mg/L 多效唑的分化培养基上具有明显壮苗作用。

应用基因枪法对小麦幼胚进行转化在小麦基因转化中目前应用比较普遍^[2,4,14],吴琴生等^[3](1992)用基因枪法将 GUS 基因导入小麦成熟胚和悬浮细胞系的完整细胞,小麦幼胚表面的蓝点最多达 40~50 个。本实验将带有 GUS 基因的 pDM803 质粒进行转化,基因枪轰击 2 d 后 GUS 染色幼胚表面蓝点数最多达 53 个,保存 15 d 后蓝点数最多为 91 个,并认为轰击距离以 6 cm 和 9 cm 各轰击一次,质粒和金粉浓度分别为 0.5 $\mu\text{g}/\text{枪}$ 和 300 $\mu\text{g}/\text{枪}$ 较为合适,瞬时表达率与表达量并不因金粉的浓度增加而增加,相反有降低的趋势,这可能与金粉颗粒密度过高,受体材料细胞壁与膜损伤较大有关。每皿轰击 2 枪(6 cm 和 9 cm)的瞬时表达率与表达量虽然较高,但由于金粉价格较昂贵,也可选择表达量与其接近的每皿轰击 1 枪(6 cm)的处理。此外,转化的瞬时表达率与表达量还与金粉的制备、微弹包装质量和基因枪性能等因素有关。转化后进行抗性筛选,由于 ppt 浓度过高(大于 10 mg/L)严重影响愈伤的分化率,所以实验中采用 5 mg/L ppt 进行抗性愈伤的筛选,用 2 mg/L ppt 进一步筛选抗性植株,现已得到抗性植株。进一步在建立一套适宜的转化受体体系的前提下,逐渐优化影响基因枪转化的各个因素,将获得更高的基因转化效率,以利于小麦外源基因导入及转基因小麦植株的获得。

参考文献:

- [1] Becker D. et al. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue[J]. The Plant Journal, 1994, 5(2): 299-307.
- [2] 王小军,等. 可育的抗除草剂溴苯腈转基因小麦[J]. 植物学报, 1996, 38(12): 942-948.
- [3] 吴琴生,等. 用微弹轰击法将 GUS 基因导入小麦的完整细胞[J]. 生物工程学报, 1992, 8(4): 339-341.
- [4] 傅荣昭,等. 用基因枪法将人工雄性不育基因导入小麦的研究初报[J]. 遗传学报, 1997, 24(4): 358-361.
- [5] Bliffied M. et al. Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease[J]. Theor. Appl. Genet., 1999, 98: 1079-1086.
- [6] Cheng M. et al. Genetic transformation of wheat mediated by Agrobacterium tumefaciens[J]. Plant Physiol., 1997, 115: 971-980.
- [7] 曾君社,等. 用花粉管途径获得小麦转基因植株[J]. 中国科学(B 辑), 1993, 23(3): 256-262.
- [8] 郭光沁,等. 用 PEG 法向小麦原生质体导入外源基因获得转基因植株[J]. 科学通报, 1993, 23(13): 1227-1231.
- [9] 王兰岚,等. 利用激光微束穿孔法将外源基因导入小麦的研究[J]. 遗传学报, 1995, 22(5): 394-399.
- [10] Vasil V. et al. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus [J]. Bio/Technology, 1992, 10: 667-674.

- [11] 梁 辉,等.影响基因枪法转化小麦幼胚的几个因素的研究[J].遗传学报,1998,25(5):443-448.
- [12] 周森平,等.小麦基因枪法转化技术的改进[J].江苏农业学报,1999,15(1):62-64.
- [13] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants:the gus gene fusion system[J].Plant Mol.Biol.Rep.,1987,5:387-405.
- [14] 黄 粤,等.通过基因枪轰击转化获得转基因小麦植株的研究[J].西北植物学报,1997,17(2):142-146.

Establishment of an Efficient Bombardment Transformation System in Wheat

WEI Song-hong¹, ZHANG Ling-bing², et al.

(1. The Department of Plant Protection in Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China;

2. Research Center for Plant Genetic Engineering, The Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract: An efficient transformation system for wheat was established by improving transformation conditions for the particle bombardment of immature embryos. Particle bombardment was carried out using pDM803 containing the reporter gene β -glucuronidase (GUS) and bar gene. Transformation parameters, such as the size of immature embryos, the distance of bombardment, the amount of gold particles and plasmid used per bombardment were analyzed. The immature embryo of 1.0~1.5 mm was optimal. The transient expression of GUS reached the highest when the immature embryos were bombarded twice at the distance of 6 cm and 9 cm, using 300 μ g gold particles and 0.5 μ g plasmid per bombardment.

Key words: Wheat; Biolistic transformation; Immature embryos

玉米品种简介

吉单 4011: 由吉农公司北方农作物中心育成, 2000 年经吉林省农作物品种审定委员会审定通过。属晚熟单交种, 生育期 130 d, 需 $\geq 10^{\circ}\text{C}$ 的活动积温 2 850 $^{\circ}\text{C}$ 左右。株高 324 cm, 穗位高 148 cm, 穗长 23.5 cm, 果穗长筒形, 14~16 行, 红轴, 子粒黄色, 呈马齿型, 百粒重 35.3 g, 单穗粒重 241 g。植株半紧凑, 叶片清秀, 活秆成熟, 成熟时茎叶保绿度为 58.6%。含糖 11.7%, 含粗蛋白 5.35%, 粗脂肪 3.14%, 较适合黄贮。高抗叶部斑病和茎腐病, 抗丝黑穗病, 中抗玉米螟。

一般生产条件下, 公顷保苗 4.5 万~5.0 万株。追肥适当晚些进行, 以控制前期生长过盛。平均公顷产量 10 365 kg, 肥水条件好的地块达 14 500 kg。

适于吉林省的辽源、四平、长春等晚熟区种植。

吉单 522: 由吉农公司北方农作物中心育成, 2000 年经吉林省农作物品种审定委员会审定通过。属中熟单交种, 生育期 124 d, 需 $\geq 10^{\circ}\text{C}$ 的活动积温 2 450~2 550 $^{\circ}\text{C}$ 。株高 265 cm, 穗位高 120 cm, 穗长 21.7 cm, 果穗粗大、筒形, 14~16 行, 红轴, 子粒黄色, 呈马齿型, 百粒重 37.6 g, 单穗粒重 210 g。植株半收敛, 叶片清秀, 透光性好, 全株 19 片叶。含粗淀粉 71.08%, 粗蛋白 8.53%, 粗脂肪 5.51%。

叶鞘紫色, 幼苗深绿, 种子拱土能力强。秆强抗倒伏, 耐密性强, 无空秆, 活秆成熟, 后期脱水快。在人工接种条件下, 抗玉米大斑病, 中抗丝黑穗病和茎腐病, 抗玉米螟。

一般公顷保苗 5.0 万~5.5 万株, 高产田块可达 6.0 万株, 平均公顷产量 7 717.6 kg, 比四早 6 增产 7.9%。适于吉林省中熟区种植。