

基因枪介导小麦成熟胚遗传转化的影响因素

丁莉萍, 高莹, 李圣纯, 汪成, 汪越胜, 何光源*

(华中科技大学中英 HUST-RRes 基因工程和基因组学联合实验室, 武汉 430074)

摘要: 小麦成熟胚作为转化受体可克服小麦幼胚存在的受季节和幼胚发育阶段限制的缺点。以湖北省小麦品种‘鄂麦 12’和模式品种‘Bobwhite’为材料,成熟胚为转化受体,优化基因枪转化法的轰击压力、轰击距离、选择剂等因素,建立以小麦成熟胚为转化受体的高效转化系统。结果表明:小麦成熟胚作为转化受体时,适宜轰击压力和轰击距离组合是 900 psi,6 cm;成熟胚对选择剂 G418 的敏感性强于幼胚,轰击后需要延长恢复时间,选择剂 G418 的适合浓度为 20 ~ 40 mg/L。在以上优化条件下小麦成熟胚转化频率达 0.3% ~ 0.9%,已初步建立基因枪介导的小麦成熟胚遗传转化系统。

关键词: 小麦;成熟胚;遗传转化

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)03-0217-05

Study on Influencing Factors of Mature Embryos of Wheat by Particle Bombardment

DING Li-Ping, GAO Ying, LI Sheng-Chun, WANG Cheng, WANG Yue-Sheng, HE Guang-Yuan*

(China-UK HUST-RRes Genetic Engineering and Genomics Joint Laboratory, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Mature embryos of wheat as explants have many advantages for transformation. They can overcome some of the immature embryos' disadvantages, which is difficult to obtain throughout the year and strictly limited by their suitable stage for culture. Mature embryos of wheat from cultivar EM12 in Hubei province and mode variety Bobwhite were used as target materials. The effects of bombardment pressure, bombardment distance, geneticin etc. on mature embryos of wheat by particle bombardment have been optimized in order to obtain a high frequency of plant transformation system. The results show that optimal values of bombardment parameters were found to be a bombardment pressure of 900 psi at a distance of 6 cm for mature embryos. Mature embryos were more sensitive to geneticin G418 than immature embryos, and they had to be grown for longer time before application of the selectant. The optimal selective concentration of G418 for mature embryos is 20 ~ 40 mg/L. Under these optimum conditions, the frequency of transformation for mature embryos of wheat was up to 0.3% ~ 0.9%. The transformation system of mature wheat embryos using particle bombardment has been set up preliminarily.

Key words: Wheat (*Triticum aestivum* L.); Mature embryos; Transformation

小麦(*Triticum aestivum* L.)是重要的粮食作物之一,基因工程技术已发展成为其遗传改良的重要手段。自 Vasil 等首次报道利用基因枪法获得 *gus* 和 *bar* 基因的转基因植株以来^[1],基因枪法已广泛应用于小麦的遗传改良,已成功获得抗病、优质、雄性不育的转基因小麦^[2-4]。以往通常采用幼胚作为转化受体,但幼胚具有受季节和时间限制、难以重复试验的不足。而小麦成熟胚则能克服幼胚的缺点,具有取材方便,周期短,不同个体间生理状态相似,

实验重复性强等优点^[5],有望发展成为较理想的转化受体。小麦以成熟胚为外植体进行植株再生的报道已有不少^[6-8],但以成熟胚为转化受体获得转基因植株的例子尚未见报道。我们在已建立的小麦成熟胚高频植株再生系统的基础上^[9],以湖北省主栽品种‘鄂麦 12’和模式品种‘Bobwhite’为材料,以成熟胚为转化受体,优化基因枪转化法的轰击压力、轰击距离、选择剂等因素,旨在建立以小麦成熟胚为转化受体的高效转化系统。

收稿日期:2006-10-27,修回日期:2006-11-23。

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2002CB111302)资助。

作者简介:丁莉萍(1979-),女,博士研究生,从事小麦遗传转化和分子生物学研究(E-mail:dlp_tracy@sohu.com)。

* 通讯作者(E-mail:hegy@mail.hust.edu.cn)。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料 转化受体品种为湖北省小麦 (*Triticum aestivum* L.) 品种‘鄂麦 12’和遗传转化的模式品种‘Bobwhite’ (由英国洛桑研究所的 Peter Shewry 教授提供)。

质粒 应用基因枪法将含有目的基因 (如 *lax15*)、报告基因 (如 *gus*)、选择基因 (如 *npt II*) 的不同质粒共转化小麦的研究较多^[3,10],也有将上述单个基因导入小麦的研究报道^[11,12]。本研究用于转化的质粒 pCal-neo, 只含有选择标记基因 *neo* 基因 (编码新霉素磷酸转移酶 NPT II), 由 CaMV35S 启动子所驱动, 全长 4630 bp (图 1)。

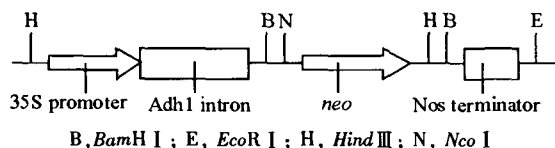


图 1 质粒 pCal-neo 酶切图谱

Fig. 1 The restriction endonuclease of pCal-neo

1.2 方法

1.2.1 受体材料的准备

成熟胚: 取颜色、大小一致的小麦种子, 0.1% HgCl_2 消毒 10 min 左右, 无菌蒸馏水洗涤 3 次, 放置在无菌装有吸水海绵的平皿中, 25℃ 黑暗培养 12 h, 使种子吸胀露白。次日, 再将种子进行消毒处理。70% 乙醇消毒 5 min, 无菌蒸馏水洗涤 1~3 次, 再用 0.1% HgCl_2 消毒 10~15 min, 无菌蒸馏水漂洗 3~5 次, 将消毒好的种子置于无菌空皿中, 剥取成熟胚, 直径 9 cm 培养皿平均每皿 20~30 个完整胚。

幼胚: 取供试小麦开花后 12~17 d 的幼嫩种子。用 70% 乙醇消毒 30 s, 无菌蒸馏水洗涤 1 次, 再用 0.1% 的 HgCl_2 消毒 6 min, 无菌蒸馏水漂洗 3~5 次。在超净工作台上剥离盾片, 盾片组织向上放入诱导培养基中, 9 cm 培养皿平均每皿 30~40 个盾片。

成熟胚、幼胚轰击之前分别在 25℃、黑暗条件下在诱导培养基上预培养 3~5 d 和 1~2 d。预培养可以使外植体在被基因枪轰击前从分离过程中得到恢复, 并且若有任何污染可以在轰击前被检测到。

1.2.2 基因枪转化法

将 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 质粒 pCal-neo 包裹在直径 0.6 μm 金粉微粒上, 采用 PDS-1000/He system 基因枪 (美

国 BIO-RAD 公司生产) 轰击靶材料。每个处理质粒和金粉的使用量为 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 每个处理轰击 8 枪, 即每枪的质粒和金粉用量为 0.625 $\mu\text{g}/125 \mu\text{g}$ 。每皿轰击 1 次。同时设计了轰击压力为 900、650 psi, 轰击距离为 3、6、9 cm 共 6 个组合对基因枪转化效果的影响。

1.2.3 轰击后材料的培养、选择及植株再生

基因枪轰击后的材料分别置于诱导培养基 MSSP₁ (成熟胚) 和 MSSP₂ (幼胚) 上^[13], 诱导出愈伤组织, 每 2 周继代 1 次。以 G418 作为 *neo* 基因的选择剂, G418 浓度设置为 20、30、40、50 mg/L 共 4 个处理。将恢复培养后的愈伤组织转至含 G418 的诱导培养基上, 筛选出抗性愈伤组织。然后在含 G418 的分化培养基 R_{DZ} 上筛选出抗性芽苗。待壮苗后转入不添加 G418 的生根培养基 R^[14] 上进行生根培养, 当幼苗长至 6~8 cm 时炼苗盆栽。各培养基成分详见表 1。

表 1 诱导、分化培养基成分

Table 1 The component of induction, regeneration culture medium

培养基 Culture medium	储存液 Storage liquid	1000 mL
诱导培养基 (MSSP ₁ or MSSP ₂)	MS Macrosalts (10 ×)	100 mL
	L Microsalts (1000 ×)	1 mL
	MS FeNaEDTA (100 ×)	10 mL
	MS (-Gly) Vitamins (1000 ×)	1 mL
	Myo Inositol	100 mg
	3AA (25 ×) *	20 mL
分化培养基 R _{DZ}	Sucrose	30 g
	Hormones	Picloram (1.0 mg for mature embryos culture and 2.0 mg for immature embryos culture)
	L7 Macrosalts (10 ×)	100 mL
	L Microsalts (1000 ×)	1 mL
	MS FeNaEDTA (100 ×)	10 mL
	Vitamins/Inositol L (200 ×)	5 mL
生根培养基 R ^[14]	Maltose	30 g
	Hormones	2,4-D 0.1 mg + zeatin 5 mg

注: 调节 pH 值为 5.7。*, 如果依次加入 3 种氨基酸, 分别为: L-谷氨酰胺 1.5 g, L-脯氨酸 0.3 g, L-天冬酰胺 0.2 g。

Notes: pH adjust 5.7. *, If adding 3AA separately: L-Glutamine 1.5 g, L-Proline 0.3 g, L-Asparagine 0.2 g.

1.2.4 转基因植株的鉴定

用 CTAB 法提取总基因组 DNA 做模板, 进行 PCR 扩增。neo 基因上游引物序列为: 5'-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG-3'; 下游引物序列为: 5'-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA-3', 扩增的产物为 679 bp 的 neo 基因片段。每个反应体积为 20 μL ,

上游引物和下游引物含量为 20 pmol, 4 种 dNTP 混合物的量为: 250 μ mol, 2 μ L 10 $\times$ *Taq* 酶缓冲液, 1.5 mmol $MgCl_2$, 1U 的 *Taq* 酶(Takana 产品)。PCR 的程序: (1) 95 $^{\circ}C$ 5 min; (2) 95 $^{\circ}C$ 1 min, 57 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 1 min, 30 个循环; (3) 72 $^{\circ}C$ 10 min。取 PCR 产物 5 μ L 在 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离并观察。

2 结果与分析

2.1 不同轰击压力和轰击距离对小麦成熟胚转化效果的影响

基因枪轰击压力和轰击距离是影响转化效率的重要因素。以湖北省小麦品种‘鄂麦 12’为转化品种, 成熟胚和幼胚为转化受体, 根据以往研究结果^[3,14,15], 选择轰击压力为 900, 650 psi, 轰击距离为 3、6、9 cm。综合不同选择剂处理的实验结果, 分析各轰击压力、轰击距离参数组合对小麦成熟胚转化效果的影响(见表 2)。

表 2 不同轰击压力和轰击距离对小麦成熟胚和幼胚的转化效果

Table 2 The transformation effects of different combination of bombardment pressure and distance on mature embryos and immature embryos of wheat

转化受体 Explants	轰击压力和距离 Combination of bombardment pressure and distance	接种数 (个) Num. of inoculation	抗性愈伤组织 获得率(%) Frequency of resistant calli acquired	抗性愈伤组织 绿苗率(%) Frequency of resistant buds produced
成熟胚 Mature embryos	900 psi + 3 cm	60	5.7	0
	900 psi + 6 cm	60	27.6	19.8
	900 psi + 9 cm	60	20.2	12.5
	650 psi + 3 cm	50	8.6	0.9
	650 psi + 6 cm	50	15.2	8.7
	650 psi + 9 cm	50	10.8	4.4
幼胚 Immature embryos	900 psi + 3 cm	60	10.9	8.1
	900 psi + 6 cm	60	26.1	21.3
	900 psi + 9 cm	60	35.3	29.2
	650 psi + 3 cm	50	13.6	9.1
	650 psi + 6 cm	50	21.7	14.8
	650 psi + 9 cm	50	19.7	11.3

轰击后的小麦成熟胚和幼胚均能诱导出抗性愈伤组织。与幼胚相比, 成熟胚形成愈伤组织的时间较长, 形态多为乳白色, 水浸状, 胚性差。从表 2 可以看出, 以成熟胚为转化受体, 轰击参数为 900 psi + 6 cm 时的抗性愈伤组织获得率为 27.6%, 绿苗率为 19.8%, 均比其它参数组合高; 此外, 以幼胚为转化受体, 轰击压力为 900 psi + 9 cm 的抗性愈伤组织获得率为 35.3%, 绿苗率为 29.2%, 比其它参数组合转化效果好。

2.2 选择剂 G418 对小麦成熟胚转化的选择效果

本试验所用的选择标记基因是 *neo* 基因, 其在真核细胞中的表达产物能使卡那霉素、新霉素及

G418 失活。Nehra 等^[16] 和 Bower 等^[17] 认为卡那霉素作为选择剂并不适合小麦转化子的筛选, 因为它会妨碍愈伤组织在早期阶段的再生能力, 并对叶绿素合成有抑制作用。因此, 本研究探索 G418 作为选择剂的选择效果。

小麦成熟胚和幼胚经基因枪轰击后, 诱导出愈伤组织, 每 2 周继代 1 次, 分别在含有 20、30、40、50 mg/L G418 的选择培养基中进行转化子筛选; 以未经基因枪轰击的成熟胚和幼胚所诱导的愈伤组织作为对照。综合不同轰击参数下的实验结果, 比较不同浓度的 G418 对小麦成熟胚转化效果的影响, 结果见图 2。

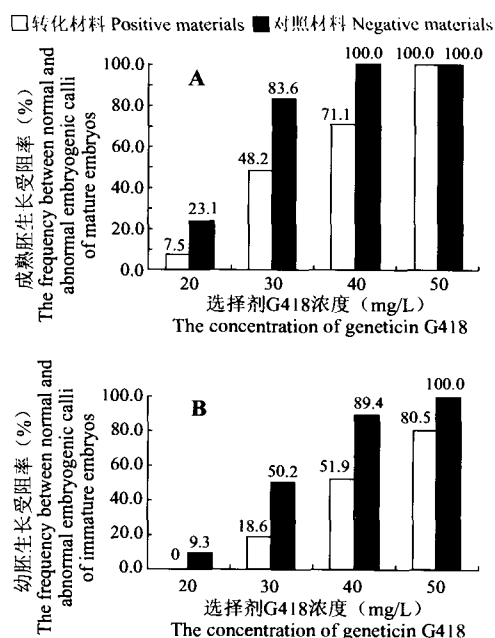


图 2 小麦成熟胚(A)和幼胚(B)愈伤组织在含 G418 选择培养基上的生长受阻率

Fig. 2 The frequency between normal and abnormal embryogenic calli of mature embryos (A) and immature embryos (B) cultured on medium containing geneticin G418

从图 2 可以看出, G418 浓度为 20 mg/L 时, 小麦成熟胚和幼胚的转化材料、对照材料(未经轰击的材料)生长受阻率分别为 7.5%、23.1% 和 0、9.3%, 即成熟胚对 G418 敏感性强, 在低浓度选择时成熟胚转化材料立即出现受抑制现象, 而幼胚转化材料生长未受到抑制。随着 G418 浓度增加至 30 mg/L 时, 成熟胚反应强烈, 转化材料受阻率增加为 48.2%, 对照材料致死率 83.6%, 只有少数存活; 而幼胚仅有 18.6% 的转化材料生长受抑制, 对照材料受阻率增加为 50.2%。当 G418 浓度为 40 mg/L

时,成熟胚转化材料的生长受到极大的抑制,受阻率达到71.1%,材料褐化现象严重,根部腐烂多,对照材料全部死亡,致死率为100%;此时幼胚转化材料生长受阻率增加为51.9%,对照材料生长受阻率达到89.4%。G418浓度为50 mg/L时,幼胚对照材料全部致死,转化材料生长受阻率增加为80.5%。综合以上分析,G418对成熟胚的最佳选择浓度为20~40 mg/L,幼胚则为30~50 mg/L;成熟胚对G418的敏感性要高于幼胚,因此基因枪轰击后需要延长恢复时间。

2.3 优化条件下基因枪介导的小麦成熟胚转化频率
在优化上述轰击参数、选择系统等基础上,以湖北省小麦品种‘鄂麦12’和模式品种‘Bobwhite’为材料,以成熟胚和幼胚(对照)为转化受体,选取轰

击参数900 psi + 6 cm,轰击后的受体组织在20~40 mg/L G418下进行筛选,获得了转基因幼苗,结果见表3。成熟胚、幼胚为转化受体的抗性愈伤组织获得率分别为34.1%~40.8%和36.2%~45.5%,两者的抗性愈伤组织在形态和色泽上差别较大(图3:a,d),获得的抗性幼苗数分别为287株和159株(图3:b,e)。幼苗长至叶片2 cm以上时转至无选择剂的生根培养基中进行生根培养(图3:c,f),壮苗后盆栽。对移栽成活植株全部提取基因组DNA进行PCR检测(见图4)。分子检测结果表明,在优化条件下小麦成熟胚转化频率为0.3%~0.9%,此时幼胚转化频率为0.5%~1.2%。这说明以成熟胚为受体能够实现外源基因的成功导入,并且转化频率接近幼胚的转化频率。

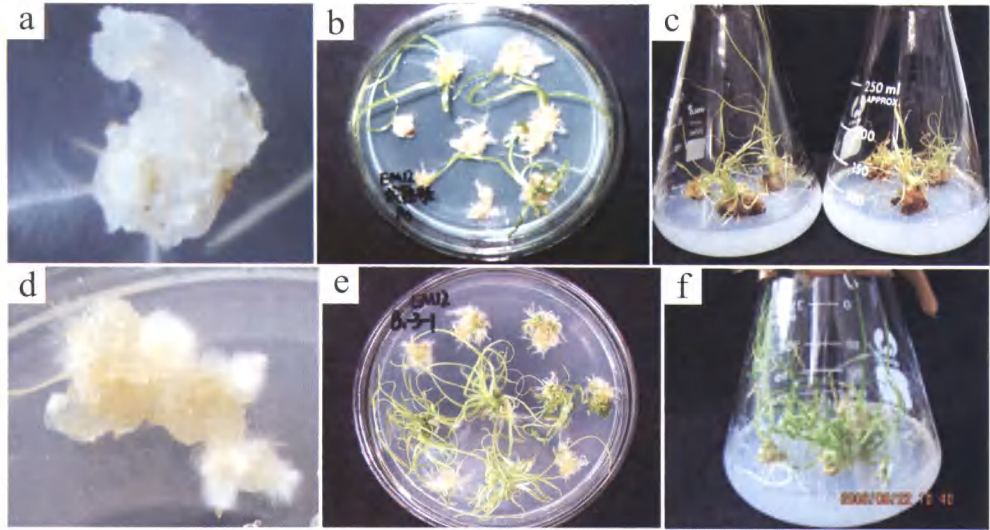
表3 优化条件下基因枪介导的小麦成熟胚转化频率

Table 3 The frequency of transgenic plantlets of mature embryos of wheat by particle bombardment on optimum conditions

转化受体 Explants	基因型 Genotypes	接种数(个) Num. of inoculation	抗性愈伤组织数(个) Num. of resistant calli acquired	抗性愈伤组织获得率*(%) Frequency of resistant calli acquired	抗性植株数(个) Num. of transgenic plantlets	PCR 阳性植株数(个) PCR positive plant	转化频率** (%) Frequency of transgenic plantlets
成熟胚 Mature embryos	EM12	413	141	34.1	23	1	0.3
	Bobwhite	358	146	40.8	35	3	0.9
	Total	811	287		58	4	
幼胚 Immature embryos	EM12	207	75	36.2	14	1	0.5
	Bobwhite	185	84	45.5	20	2	1.2
	Total	392	159		34	3	

注:*,抗性愈伤组织获得率=(抗性愈伤组织数/接种数)×100%;**,转化频率=(PCR 阳性植株数/接种数)×100%。

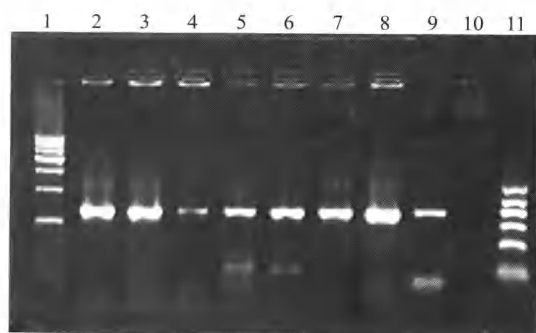
Notes:*,Frequency of resistant calli acquired=(Num. of resistant calli acquired/ Num. of inoculation)×100%;**,Frequency of transgenic plantlets=(PCR positive plant/ Num. of inoculation)×100%。



a, b, c 分别为成熟胚抗性愈伤组织、分化抗性芽、生根培养; d, e, f 分别为幼胚抗性愈伤组织、分化抗性芽、生根培养
a, b, c for resistant calli from mature embryos, resistant buds and resistant roots, respectively; d, e, f for resistant calli from immature embryos, resistant buds and resistant roots, respectively

图3 小麦成熟胚和幼胚抗性愈伤组织生长情况

Fig. 3 The status of resistant calli from mature embryos and immature embryos of wheat



1:500 bp DNA Ladder; 2:Plasmid pCal-neo; 3-9: T_0 transgenic plants M1, M2, M3, M4 (mature embryos) and I1, I2, I3 (immature embryos); 10: non-transformed; 11: Marker II

图4 T_0 代抗性植株的PCR分析

Fig.4 PCR analysis of resistant T_0 plants

3 讨论

遗传转化成功的关键包括建立具有高频再生能力的受体系统和优化转化条件^[18]。良好的受体系统需要具备高效稳定的再生能力和稳定的外植体来源。小麦成熟胚作为稳定的外植体来源其独特优点是毋庸置疑的。我们通过探讨多种因素对小麦成熟胚植株再生的影响,优化了小麦成熟胚组织培养条件,建立了以栽培品种‘鄂麦12’为基础的小麦成熟胚组织培养高频植株再生系统^[10]。本研究是在上述研究基础上,以幼胚为对照,研究小麦成熟胚为主要转化受体的基因枪转化试验。与幼胚相比,在轰击参数优化的基础上,经选择剂G418筛选后的成熟胚抗性愈伤组织表现出良好的绿苗率,这可能是由于离体成熟胚自制的营养物质促进愈伤组织的出芽。但是,小麦成熟胚抗性愈伤组织的生根率较幼胚差,可能是由于成熟胚对选择剂G418敏感性高,通过降低选择剂的筛选浓度和减少筛选时间可以改善根的生长情况,此外,还可以通过调节生根培养基中激素的种类和浓度来促使根的生长。

参考文献:

- [1] Vasil V, Castillo A M, Fromm M E, Vasil I K. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus[J]. *Bio/Tech*, 1992, **10**:667-674.
- [2] Chen W P, Gu X, Liang G H, Muthukrishnan S, Chen P D, Liu D J, Gu B S. Introduction and constitutive expression of rice chitinase gene in bread wheat using biolistic bombardment and the bar gene as a selectable maker[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, **97**(1): 1296-1306.
- [3] He G Y, Rooke L, Steele S, Bekes F, Gras P, Tatham A S, Fido R, Barcelo P, Shewry P R, Lazzeri P A. Transformation of pasta wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) with high-molecular-weight glutenin subunit genes and modification of dough functionality[J]. *Molecular Breeding*, 1999, **5**:377-386.
- [4] De Block M, Debrouwer D, Moens T. The development of a nuclear malesterility system in wheat, expression of the barnase gene under the control of tapetum specific promoters[J]. *Theor Appl Genet*, 1997, **95**:125-131.
- [5] 李宏潮, 胡道芬, 王虹. 影响小麦成熟胚培养因素的研究[J]. *华北农学报*, 1990, **5**(1):22-27.
- [6] Özgen M, Turet M, Altinok S, Sancak C. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes[J]. *Plant Cell Rep*, 1998, **18**(3-4):331-335.
- [7] Delporte F, Mostade O, Jacquemin J M. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat[J]. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 2001, **67**:73-80.
- [8] 柯退义, 陈春洪, 杨芳, 李宝健. 影响小麦成熟胚培养的几种因素研究[J]. *广东农业科学*, 1995(6):12-14.
- [9] 丁莉萍, 何光源. 小麦成熟胚高频植株再生系统的建立[J]. *植物生理学通讯*, 2004, **40**(2):187-190.
- [10] Barro F, Rooke L, Bekes F, Gras P, Tatham A S, Fido R, Lazzeri P A, Shewry P R, Barcelo P. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improving functional properties[J]. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**(2):1295-1299.
- [11] Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, Stoger E, Vasil I K. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants[J]. *Plant Cell Rep*, 1996, **16**:12-17.
- [12] 刘伟华, 李文雄, 胡尚莲, 徐香玲, 李集临. 小麦组织培养和基因枪轰击影响因素探讨[J]. *西北植物学报*, 2002, **22**(3):602-610.
- [13] Barro F, Cannell M E, Lazzeri P A, Barcelo P. The influence of auxins on transformation of wheat and tritordeum and analysis of transgene integration patterns in transformants[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, **97**:684-695.
- [14] Weeks J T, Anderson O D, Blechl A E. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *Plant Physiol*, 1993, **102**:1077-1084.
- [15] Becker D, Brettschneider R, Lorz H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue[J]. *Plant J*, 1994, **5**:299-307.
- [16] Nehra N, Chibbar R N, Leung N, Leung N, Caswell K, Mallard C, steinhauer L, Baga M, Kartha K K. Self-fertile transgenic wheat plant regenerated from isolated scutellum tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs[J]. *Plant J*, 1994, **5**:285-297.
- [17] Bower R, Birch R G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment[J]. *Plant J*, 1992, **2**(3):409-416.
- [18] Perl A, Blumenthal A, Galili G, Galun E. Improvement of plant regeneration and GUS expression in scutellar wheat calli by optimization of culture conditions and DNA-microprojectile delivery procedures[J]. *Mol Gen Genet*, 1992, **235**:279-284.