

基因枪介导甘蔗遗传转化几个影响因素的研究

秦新民, 叶云, 于兰

(广西师范大学生命科学院, 广西桂林 541004)

摘要: 用基因枪 GJ1000 介导将 Bt 基因转入甘蔗嫩叶、I 型愈伤组织和 II 型愈伤组织。结果表明, 用 II 型愈伤组织作为受体最有利于转化; 气体压力、轰击距离、轰击次数和真空度对转化效率有不同程度的影响。条件优化后, 得到了大量的抗性愈伤组织和一些抗性植株, 转化率分别为 34.9% 和 3.36%。

关键词: 甘蔗; 基因枪; 遗传转化; 抗性植株

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2003)04-0339-04

Factors affecting microprojectile bombardment-mediated transformation of sugarcane (*Saccharum officinarum*)

QIN Xin-min, YE Yun, YU Lan

(College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: Tender leaves, I-type calli and II-type calli were transformed with Bt gene by Microprojectile bombardment GJ1000. The results showed that II-type calli as receptor was propitious to transformation. The efficiency of transformation was varied with gas pressure, distance of bombardment, time of bombardment and degree of vacuum. After optimizing these factors, a large number of resistant calli and some resistant plantlets were obtained. The efficiency of transformation are 34.9% and 3.36% respectively.

Key words: sugarcane; microprojectile bombardment; genetic transformation; resistant plantlet

基因枪转化技术是由二十世纪 80 年代末逐渐发展起来的一种基因转化的方法, 它的最大优点是无明显的宿主限制, 几乎适用于任何受体材料, 另外它只需要简单的组织培养, 不必经过复杂的原生质体的制备和培养阶段, 为植物基因转化工作提供了一种更为简化的手段。对于对农杆菌不敏感的单子叶植物来说, 基因枪技术更为一种理想的转化方法, 人们利用该方法已经获得了水稻、小麦、玉米 (Christou 等, 1991; Vaisil 等, 1999; Wan 等, 1995) 等转基因植株。在甘蔗的遗传转化研究方面, 美国的 Marezki 等 (1990) 首次用基因枪把 GUS 基因导

入甘蔗愈伤组织, 并得到了瞬时表达。澳大利亚的 Bower 等 (1992) 用基因枪法把由 Emu 启动子调控下的 GUS 基因导入到甘蔗的胚性愈伤组织中, 16 周后获得了转基因植株。国内这方面的研究则相对较少, 目前获得转基因植株的报道仅见一例 (张树珍等, 2001)。然而在上述报道中其基因转化效率都较低, 如何将微弹对轰击的植物材料的损伤降至最小, 同时使受体能有效分化是提高基因枪转化效率的关键所在。因此, 对基因枪转化的参数条件进行优化, 对建立高效的甘蔗的遗传转化体系有较大的意义。本文对受体材料、轰击距离、轰击次数、气体

收稿日期: 2002-12-02 修订日期: 2003-02-20

基金项目: 广西自然科学基金资助项目 (20007007)

作者简介: 秦新民 (1956-), 男, 广西灵川人, 博士, 研究员, 从事植物分子生物学研究。

压力和真空度这几个影响转化率的关键因素进行了比较,试图建立一个合适的甘蔗基因枪高效转化系统。

1 材料与方 法

1.1 菌种与质粒

菌种为 DH5 α ,质粒为 pBIWIQ-5,其上含 NPT II 基因和由 Mas-35S 双启动子调控的 Bt(Cry I B) 抗虫基因(秦新民等,1999)。

1.2 轰击受体的选择

以台糖 22 为材料,于田间取其生长健壮的尾梢部分,在无菌状态下将-1、-2 片叶,剪成 1 cm \times 1 cm 大小的片段,置于 M1(MS+1.5 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂粉,pH5.8)培养基上,26 $^{\circ}$ C 黑暗条件下诱导愈伤组织,2 周后叶片上长满了致密的白色愈伤组织(I 型愈伤组织),将其转移到新的诱导培养基 M₁ 上继代培养,20 d 左右发育成淡黄色、松脆的胚性愈伤组织(II 型愈伤组织)。

1.3 抗生素敏感性实验

选取新鲜的-1、-2 片叶和继代培养 20 d 的胚性愈伤组织,接种于含不同卡那霉素(Km)浓度的 M₁ 培养基中进行卡那霉素抗性测定。卡那霉素设 5、10、20、30、40、50、100、200、300 mg/L 9 种浓度梯度,并以不含卡那霉素的培养基作为对照,共 10 种处理,培养 1 个月后观察其生长情况。

1.4 质粒 DNA 的提取

按碱裂解法(金冬雁等,1992)大量提取质粒。将质粒 DNA 浓度调至 1 μ g/ μ L,置于-20 $^{\circ}$ C 下贮存备用。

1.5 基因枪轰击

无菌状态下制备钨粉的甘油溶液,浓度为 60 mg/mL。每次轰击前取 50 μ L 悬浮液,依次加入 5 μ L 质粒 DNA(1 μ g/ μ L),0.1 M 亚精胺 20 μ L 和 2.5 M CaCl₂ 50 μ L,旋涡振荡 1 min。离心去上清,分别用 150 μ L 70%酒精和 150 μ L 无水酒精洗涤 1 次;加入 60 μ L 无水酒精,每次轰击取 10 μ L 悬浮液。

设置真空度-0.09 MP、-0.095 MP;轰击距离 4.5 cm、5.5 cm;气体压力 7 MP、8 MP;轰击次数为 1、2、3 次;以嫩叶、I 型愈伤组织、II 型愈伤组织 3 种材料作为受体,进行不同组合的轰击。其中以嫩叶作为受体材料的轰击压力均为 9 MP。

1.6 恢复培养

将轰击后的材料转入愈伤组织诱导培养基 M₁,在 26 $^{\circ}$ C、光照和黑暗两种不同条件下培养 1~2 周,培养基中不加卡那霉素等选择压力,以利于受轰击愈伤组织的恢复及充分表达外源基因。

1.7 抗性筛选

1.7.1 预筛选 将基因枪轰击后的愈伤组织转入不含 Km 的愈伤组织诱导培养基 M1 培养 1~2 周,让其充分分化出新的胚状体,然后转入含 Km 的愈伤组织诱导培养基中。

1.7.2 成苗筛选 约半个月后将生长良好的愈伤组织转入成苗培养基 M₂(MS+Km 10 mg/L+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂粉,pH5.8)进行抗性筛选,并设对照。26 $^{\circ}$ C,每天光照 16 h,光强 1 500 lx 进行选择培养。

1.7.3 生根筛选 待 M₂ 培养基上分化的绿芽长到 2 cm 左右时,将其转入含 Km 的生根培养基 M₃(MS+Km 10 mg/L+NAA 1 mg/L+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂粉,pH5.8),于 26 $^{\circ}$ C,每天光照 16 h,光强 1 500 lx 进行生根筛选。

2 结果及分析

2.1 抗生素浓度的确定

接种在 20、30、40、50、100、200、300 mg/L Km 的 M₁ 培养基中的甘蔗叶片和胚性愈伤组织都逐渐褐化变黑死亡;在 10 mg/L Km 的 M₁ 上胚性愈伤组织则能分化出少量白化苗;而在 5 mg/L Km 中的胚性愈伤组织除了分化出白化苗之外还有少量绿苗,同时叶片也能分化出少量愈伤组织;对照中长出的则全部都是绿苗。由此确定 10 mg/L 的卡那霉素浓度作为抗性筛选的浓度。

2.2 抗性植株的获得

成苗筛选 15~20 d 后,抗性胚性愈伤组织上开始分化出芽,未转化的愈伤组织逐渐变褐死亡,呈水渍状坏死或只分化出白化苗,用未带载体(未包埋 DNA)的微弹轰击的愈伤组织也逐渐褐化死亡。只有部分有质粒 DNA 轰击的愈伤组织能继续发育成胚状体,并能进一步发育成绿色的幼苗。而生根培养是更严格的筛选,只有部分绿苗能分化出不定根,而其他的则逐渐坏死。

2.3 受体材料对转化的影响

嫩叶、I 型和 II 型愈伤组织轰击后,转入 M₁ 培

培养基上培养 10 d 左右,再转入 M₂ 培养基中筛选。嫩叶作为轰击受体只获得了极少的抗性植株,而且在生根培养的时候很难形成有效的根系。而用 I 型愈伤组织和 II 型愈伤组织作为受体进行轰击则获得

了较多的抗性植株,其中 II 型愈伤组织的效果明显优于 I 型愈伤组织。以愈伤组织为受体的轰击,参数均为真空度-0.095 MP、轰击距离 5.5 cm、气体压力 7 MP,轰击 2 次,以此作为比较(表 1)。

表 1 受体材料对转化效率的影响
Table 1 Effect of receptor material on transformation

受体类型 Type of receptor	嫩叶 Tender leaves	I 型愈伤组织 I-type callus	II 型愈伤组织 II-type callus
外植体数 Number of explants	206	117	157
抗性愈伤组织数 Number of resistant callus	11	26	54
愈伤组织转化率 Transformation efficiency(%)	5.34	22.22	34.39
抗性植株数 Number of resistant plantlets	1	2	5
抗性植株转化率 Transformation efficiency(%)	0.49	1.71	3.18

表 2 轰击条件对转化的影响
Table 2 Effect of bombardment on transformation

处理 Treatment	1	2	3	4	5	6	7	8
轰击距离 Distance(cm)	4.5	5.5	4.5	5.5	4.5	5.5	4.5	5.5
轰击次数 Time	1	1	2	2	2	2	3	3
真空度 Degree of vacuum (MP)	-0.09	-0.095	-0.095	-0.095	-0.09	-0.09	-0.095	-0.095
气体压力 Gas pressure (MP)	9	9	7	7	8	8	7	7
外植体数 Numbers of explants	102	104	132	149	164	152	101	116
抗性愈伤组数 Number of resistant callus	25	22	36	52	43	40	18	22
愈伤组织转化率 Transformation efficiency (%)	24.51	21.15	27.27	34.90	26.22	26.32	17.82	18.96
抗性植株数 Number of resistant plantlets	1	1	4	5	3	3	2	2
抗性植株转化率 Transformation efficiency (%)	0.98	0.96	3.03	3.36	1.83	1.97	1.98	1.72

2.4 轰击条件对转化的影响

以 II 型愈伤组织为材料,进行不同的真空度、气体压力、轰击距离和轰击次数的比较,结果在各种组合中,真空度-0.095 MP、轰击距离 5.5 cm、气体压力 7 MP,轰击 2 次所获得的抗性愈伤组织和抗性植株都是最多的(表 2)。

3 讨 论

植物受体在遗传转化中起重要的作用,在基因枪法介导的遗传转化中靶受体类型广泛,任何具有潜在分生能力的组织或细胞都可以用基因枪进行轰击转化。目前,单子叶植物的基因转化以幼胚(徐子勤,2001)和原生质体(Malhotra 等,1994)作为受体的情况较多。然而,在一般种植条件下甘蔗很少有开花的现象,即使开花结实其种子很小,利用幼胚作为受体材料操作相对困难。虽然原生质体是转化过程中外源 DNA 的理想受体,但甘蔗的原生质体培养非常困难。而其组织培养技术已经比较成熟,所以胚性愈伤组织是甘蔗较为理想的轰击受体。

Robert 等(1992)用愈伤组织作为轰击受体获得了高效转化的转基因植株。本研究以嫩叶、I 型愈伤组织和 II 型愈伤组织为受体进行转化,均获得了抗性愈伤组织和抗性植株。其中以 II 型愈伤组织为受体进行的转化,抗性愈伤组织获得率达 34.9%,抗性植株获得率可达 3.36%。本研究还试图用幼嫩叶片作为受体以缩短实验周期,但转化效率并不是很理想,仅获得了一棵抗性植株,其转化条件还待进一步研究。

微弹轰击的速度是影响转化效率的又一重要因素,而决定微弹速度的关键是气体压力和真空度。气体压力越大,微弹获得的推动力越大;真空度越高,微弹飞行所受的阻力越小,速度就越大。由于微弹会对细胞产生一定程度的伤害,速度过大会加剧这一影响;另外,细胞在真空状态下也会受到一定的伤害,因而通过调整气体压力和真空度来获得合适的速度是非常必要的。对受体进行多次轰击,增加了获得外源基因的机会,但细胞所受到的伤害也会变大。本研究表明 2 次轰击对转化较为有利。

另外,轰击前对受体材料进行渗透处理 4 h,轰

击后再处理 24 h 可以提高转化效率。可能是由于高渗处理使细胞质壁分离,从而减轻轰击时钨粉对细胞的伤害(徐子勤,2001)。

参考文献:

- 金冬雁,黎孟枫. 1992. 分子克隆实验指南(第2版)[M]. 北京:科学出版社,26—27.
- Bower R, Birch R G. 1992. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment [J]. *Plant Journal*, 2: 409—416.
- Christou P, Ford T L, Kofron M. 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) Plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos[J]. *Bio/Tech*, (9): 957—962.
- Malhotra S D. 1994. Biotechnology and Sugarcane[J]. *Sugar Cane*, (3): 2—4.
- Maretzki A, Sun SSM, Nagai C, et al. 1990. Development of a transformation system for sugarcane[J]. *Proc Int Assoc Plant Tissue Cult*, 8: 68.
- Qin XM(秦新民), Gao CW(高成伟), Li CY(李春瑶), et al. 1999. Transformation of bacillus thuringiensis Cry IB gene of *B. campestris* L. ssp. *Chinensis* (L.) Makina var. *Commanis* Tsen et Lee(小白菜苏云金芽孢杆菌 Cry IB 基因的遗传转化)[J]. *Journal of Guangxi Normal University*(广西师范大学学报), 17(3): 77—82.
- Robert Bower, Robert G Birch. 1992. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment [J]. *The Plant Journal*, 2(3): 409—416.
- Vaisil IK, Vasil V. 1999. Transformation of wheat via particle bombardment[J]. *Methods in Molecular Biology*, 111: 349—358.
- Wan Y, Widholdm JM, Lemaux PG. 1995. Type I callus as a bombardment target for generating fertile transgenic maize(*Zea mays* L.)[J]. *Planta*, 196: 7—14.
- Xu ZQ(徐子勤). 2001. Transgenic Researches of Important Cereal Species(重要禾谷类植物转基因研究)[J]. *Progress in Biotechnology*(生物工程进展), 21(1): 59—74.
- Zhang SZ(张树珍), Zheng XQ(郑学勤). 2001. Genetic Transformation of Sugar cane Via Microprojectile Bombardment(基因枪介导甘蔗遗传转化研究初报)[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*(热带作物学报), 3: 35—41.
- Hu SY(胡适宜). 1993. Experimental methods in plant embryology(I) determination of pollen viability(植物胚胎学实验方法(一)花粉生活力的测定)[J]. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报), 10(2): 60—62.
- Kling J. 1996. Could transgenic super crops one day breed super weeds? [J]. *Science*, 274: 180—181.
- Qian YQ(钱迎情), Wei W(魏伟), Tian Y(田彦), et al. 1999. Application and potential problems of transgenic crops(转基因作物在生产中的应用及某些潜在问题)[J]. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), 5(4): 427—423.
- Richards AJ. 1997c. *Plant Breeding System*[M]. London: Chapman and Hall.
- Schefler JA, Philip JD. 1994. Opportunities for gene transfer from transgenic oilseed rape(*Brassica napus*) to related species[J]. *Transgenic Research*, 3: 263—278.
- Snow AA, Anderson B, Jorgensen RB. 1999. Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from *Brassica napus* into weedy *B. rapa*[J]. *Molecular Ecol*, 8: 605—615.
- Song XL(宋小玲), Qiang S(强胜), Xu YH(徐言红), et al. 2002. Biological characters of anthesis *Echinochloa* spp. (稗类植物的开花生物学特性)[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*(植物资源与环境学报), 11(3): 12—15.
- Wei W(魏伟), Qian YQ(钱迎情), Ma KP(马克平). 1999. Gene flow between transgenic crops and their wild related species(转基因作物与野生亲缘种间的基因流)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 41(4): 343—348.

(上接第 346 页 Continue from page 346)