

基因枪介导的高羊茅基因转化体系的建立

马生健^{1,3} 曾富华^{1*} 徐碧玉² 卢向阳^{3*} 吴志华^{1,3}

(¹ 湛江师范学院生物系, 湛江 524048; ² 中国热带农业科学院热带作物国家重点实验室, 海口 571101; ³ 湖南农业大学生物技术系, 长沙 410128)

摘要: 用高羊茅 (*Festuca arundinacea* Schreb.) 种胚离体诱导的胚性愈伤组织作受体进行了基因枪的轰击试验, 确定了以轰击 2 枪, 子弹距可裂圆片 6 cm, 子弹距轰击受体 6 cm 为最佳轰击参数, 建立了基因枪优化转化方案, 获得了遗传稳定的抗除草剂 PPT 的转化植株。随机抽取的转化植株的 *Bar* 基因 PCR 检测、总 DNA 点杂交, 皆成阳性, 除草剂 PPT 抗性试验表明, 转化植株比对照有了更强的抗性。

关键词: 草坪草; 愈伤组织; 基因枪; 转化; 抗除草剂

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 05-0691-03

Protocol Establishment of Tall Fescue Transgene by Biolistics

Ma Shengjian^{1,3}, Zeng Fuhua^{1*}, Xu Biyu², Lu Xiangyang^{3*}, and Wu Zhihua^{1,3}

(¹ Department of Biology, Zhanjiang Normal College, Zhanjiang 524048, China; ² The State Key Laboratory of Tropical Crops Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; ³ Department of Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: In this paper, excised mature embryos of tall fescue were used as explants to induce embryonic calli, which were used as materials to optimize bombardment parameters of biolistics, and the most suitable delivery parameters for PDS-1000/He were 6 cm shoot distance, 6 cm distance between particles and rupture disks, 1100 psi helium pressure and bombarding 2 shots. An optimized transformation protocol was established and transgenic turfgrass varieties resistant to herbicide with stable heredity were acquired. All tested tall fescues selected randomly were positive by PCR analysis and by dot blotting analysis for *bar* gene. The results of daubing tests with herbicide showed transgenic plants had more resistance than plants control did.

Key words: Turfgrass; Callus; Biolistics; Transformation; Herbicide resistance

1 目的、材料与方法

高羊茅 (*Festuca arundinacea* Schreb.) 作为优良的冷季型草坪草在国内外大面积种植, 但杂草危害非常严重。作者建立了高羊茅的完整基因枪转化体系, 获得了遗传稳定的除草剂抗性转化植株。

pBar-Gus 质粒 (图 1) 含抗除草剂的 *Bar* 基因和 *Gus* 报告基因, 由湖南农业大学易自力教授惠赠。



图 1 pBar-Gus 质粒结构图谱

Fig. 1 Construction of pBar-Gus

M1 (愈伤诱导培养基, 以下没标注单位的数字单位为 mg/L): N6 + 2, 4-D 4.0 + 6-BA 0.1 + 1 %

收稿日期: 2004-02-02; 修回日期: 2004-04-22

基金项目: 广东省科技攻关项目 (2KM03103N); 湛江科技攻关项目 [湛财企 (2001) 114 号; (2001) 121.18]

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: mashengjian1@163.com)

甘露醇; M2 (继代培养基): N6 + 2,4-D 4.0 + 6-BA 0.1 + ABA 4.0 + 1 %甘露醇; M3 (高渗培养基): N6 + 2,4-D 4.0 + 6-BA 0.1 + ABA 4.0 + 5 %甘露醇; M4 (恢复培养基): N6 + 2,4-D 4.0 + 6-BA 0.1 + ABA 4.0 + 1 %甘露醇; M5 (继代扩增筛选培养基): N6 + 2,4-D 4.0 + 6-BA 0.1 + ABA 4.0 + PPT 10 + 1 %甘露醇; M6 (继代扩增筛选培养基): N6 + 2,4-D 4.0 + 6-BA 0.1 + ABA 4.0 + PPT 15 + 1 %甘露醇; M7 (分化长芽筛选培养基): MS + 6-BA 2.0 + NAA 1.0 + CoCl₂ 5.0 + TDZ 0.5 + PPT 10; M8 (生根壮苗筛选培养基): 1/2MS + NAA 1.0 + IAA 0.5 + PPT 10 + MET 2.0 + 0.1 %活性炭。以上各培养基都添加 3 %蔗糖、0.3 % Phytagel, pH 5.8。离体种胚的愈伤诱导及再生系统的建立参照前文^[1]略加改进。

受体材料的轰击: 选取生长状态良好的颗粒状胚性愈伤 (直径约 2 ~ 3 mm) 为转化受体材料, 轰击前将其转至含甘露醇 (5 g/L) 的 M3 上培养 12 ~ 24 h。每枪取 10 μ L 金粉-DNA 复合体, 氦气压力为 1100 psi, 释放时间为 5 s。轰击后再将其转入不含筛选剂的 M4 上恢复一周后进行筛选培养。轰击后两周内进行随机取样进行 Gus 酶活检测^[2]。提取 T₀ 抗性植株叶片总 DNA^[3]。按常规方法进行 Bar 基因的 PCR 反应, Bar 特异性引物为 S1 (5'-GGA TCC ATG AGC CCA GAA-3'), S2 (5'-TCA GAT CTC GGT GAC GGG CA-3'), 扩增产物用 1.2 %琼脂糖凝胶电泳检测。总 DNA 点杂交按 Sambrook 等^[4]的方法进行。

T₀ 代植株的 PPT 抗性检测: 用棉花蘸 0.3 % PPT 液对随机挑取的 10 片转化高羊茅叶片进行全叶涂布, 用量以来回 3 次为准, 分别以各自的非转化组培苗作对照, 室温自然光照培养。另外, 用 0.3 % PPT 液分别对转化高羊茅盆与对照盆进行整体均匀喷施, 用量至全株叶片都浸湿为止。

2 结果与分析

2.1 轰击次数与轰击距离对转化效果的影响

轰击参数优化结果见表 1。无论是轰击 1 枪还是 2 枪, 都以子弹距可裂圆片 6 cm, 子弹距轰击受体 6 cm 抗性率最高。以子弹距可裂圆片 3 cm, 子弹距轰击受体 9 cm 抗性率最低, 这可能是因为 3 cm 距离太近, 氦气迸发时加速距离短而影响对子弹的轰击力, 而 9 cm 则距离太远, 迸发时子弹过于分散且穿壁力减弱。同样轰击距离条

表 1 不同的轰击条件对高羊茅转化效果的影响

Table 1 Effects of different shoot conditions on tall fescue transformation

轰击枪数 No. barrage	子弹距圆片 Distance from particles to rupture discs(cm)	子弹距受体 Distance from particles to calli (cm)	总愈伤数 No. total calli	分化 长芽数 No. calli regenerated (%)	转化率 Frequency of transformation
1	3.0	6.0	262	16.0	6.1 \pm 0.4
1	6.0	6.0	282	24.0	8.5 \pm 0.1
1	6.0	9.0	60	2.0	3.3 \pm 0.3
1	3.0	9.0	231	3.0	1.3 \pm 0.4
2	3.0	6.0	62	8.0	12.9 \pm 0.3
2	6.0	6.0	118	22.0	18.6 \pm 0.5
2	6.0	9.0	235	28.0	11.9 \pm 0.1
2	3.0	9.0	409	9.0	2.2 \pm 0.3

件下, 连续轰击 2 枪比只轰击 1 枪抗性率提高了 1 倍左右。因此, 轰击 2 枪, 子弹距可裂圆片 6 cm, 子弹距轰击受体 6 cm 为最佳轰击参数。

2.2 优化的基因枪转化体系的建立

基因枪轰击后的愈伤组织经 M4 上恢复 1 周后移入 M5 (含 PPT 10 mg/L) 扩繁初筛一个月, 再移入 M6 (含 PPT 15 mg/L) 扩繁再筛 1 个月后, 发现转化瓶中大部分愈伤仍保持轰击前的状态, 少部分褐化, 而非转化对照瓶则出现严重褐化。经两月筛选扩繁后移至 M7 (含 PPT 10 mg/L) 中分化筛选, 非转化对照全逐渐褐化致死, 而转化的抗性愈伤组织分化长出了绿芽 (图版, 1)。刚开始把绿芽放入强光下诱导, 半月后发现生根困难, 及时在培养基中加活性炭及减弱光强与缩短光照时间, 10 d 后发现芽在 M9 上长出了许多白根。转化株经炼苗后移入土壤, 成活率达 100 %。

2.3 GUS 酶活性、Bar 基因 PCR、分子杂交分析

图版, 2 显示了 Gus 酶活检测结果, 上排轰击愈伤出现了蓝色斑点, 下排非轰击对照则无蓝色斑

点, 表明 pBar-Gus 经轰击后在愈伤内有了初步表达。图 2 显示了随机抽取的 5 个转化株的 *Bar* 基因 PCR 检测结果, Lane 3~7 都有 0.5 kb 的特异扩增片段。图 3 显示了随机抽取的 10 个转化植株的总 DNA 点杂交结果, A3~B6 转化株杂交信号都很强, 与 PCR 检测的结果相同。

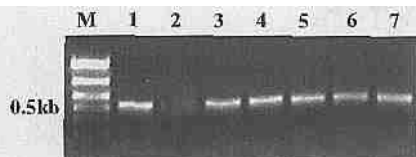


图 2 转化 pBar-Gus 高羊茅植株的 *Bar* 基因 PCR 产物
M: λ DNA/ (EcoR I + Hind III) Marker; 1: 阳性对照;
2: 阴性对照; 3~7: 转化植株。

Fig. 2 *Bar* gene PCR analysis of putative tall fescue transformed pBar-Gus

M: λ DNA/ (EcoR I + Hind III) Marker; 1: Positive control;
2: Negative control; 3~7: Putative plants.

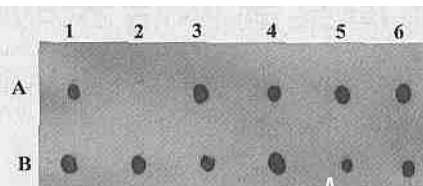


图 3 转化 pBar-Gus 高羊茅植株的 DNA 点杂交分析

A1: 阳性对照; A2: 阴性对照; A3~B6: 高羊茅转化株。

Fig. 3 DNA dot blotting analysis of putative tall fescue transformed pBar-Gus

A1: Positive control; A2: Negative control;
A3~B6: Putative tall fescue plants.

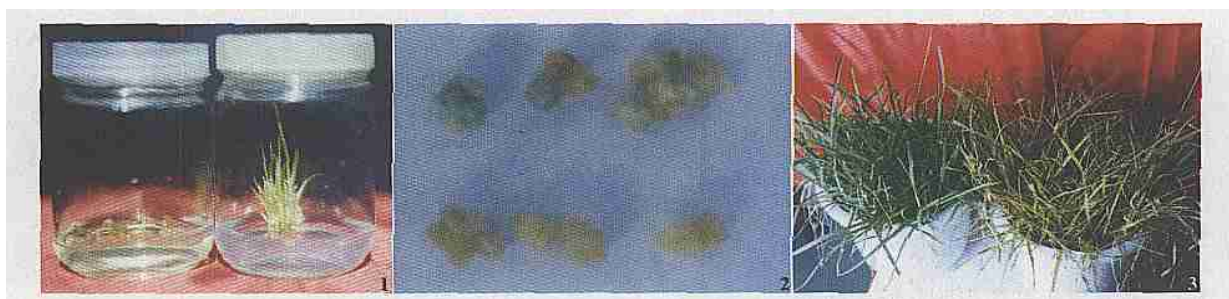
2.4 T_0 转化植株的 PPT 抗性表型检测结果

涂抹后 3 d, 非转化对照叶尖有 1/6 黄化, 叶基有 1/4 黄化, 转化植株仅叶尖有一点发黄; 9 d 对照植株全叶黄化, 叶尖枯萎, 而转基因植株叶尖仅 1/6 黄化; 15 d 后对照全部枯死, 转基因植株叶片仅有 1/4 黄化。随机挑取的 10 片叶 (每株一叶) 全部表现出相同的强抗性, 抗性率为 100%。整盆喷施与上述单个叶片的颜色变化情况大体一致, 喷施 10 d 后非转化对照已由黄化开始枯死, 转化盆则仅叶尖部位略有黄化 (图版, 3)。

我们的转化方案中转基因植株从外植体诱导到移栽入土至少要 5 个月时间, 后期分子检测 *Bar* 基因未发现假阳性个体, 转化率最高达 18.6%, 比 Fredy 等^[5]的 3%~5% 转化率提高了很多。Cho 等^[6]在 2000 年利用基因枪对来自于高羊茅与紫羊茅的种胚愈伤进行了转化, 在 T_0 代植株中分别得到了 25%~27% 和 50%~70% 的高转化基因共表达频率。

参考文献:

- 1 马生健, 曾富华. 高羊茅的组织培养 (摘编). 植物生理学通讯, 2003, 39 (2): 152
- 2 Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plant: The *GUS* gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep., 1987, 5: 387~405
- 3 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社, 1998. 598~599
- 4 Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 1~1000
- 5 Fredy A, Jianping Xu. Rapid production of transgenic turfgrass (*Festuca rubra* L.) plants. Journal of Plant Physiology, 2000, 157: 441~448
- 6 Cho M J, Ha C D, Lemaux P G. Production of transgenic tall fescue and red fescue plants by particle bombardment of mature seed-derived highly regenerative tissues. Plant Cell Reports, 2000, 19 (11): 1084~1089



图版说明: 1. 在分化筛选培养基上分化长芽 (左: 对照, 右: 转化瓶)。2. *Gus* 基因瞬时表达结果。3. 整株喷施 PPT (左: 转化株, 右: 对照)。

Explanation of plates: 1. On differentiation selective medium (Left: Control, Right: Transformed flask). 2. Transient expression of *Gus* gene of tall fescue calli transformed. 3. PPT resistance analysis (Left: Transgenic plants, Right: Control).