

高亲和铵转运因子在春小麦中的遗传转化研究

张宏纪,刘东军,孙 岩,郭怡璠,刘文林,杨淑萍,宋凤英

(黑龙江省农业科学院 作物育种研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为了培育可高效吸收利用铵态氮的小麦品种,将高亲和铵转运因子 AtPRP3-AtAMT1;1 融合基因导入优质强筋小麦品种龙辐 18 中,利用基因枪法对 3 760 个小麦幼胚愈伤组织进行了轰击。结果表明:经过筛选分化共获得 69 株抗性苗。用 2 对特异引物对转基因植株进行检测,成功获得 4 个转基因植株,转化率为 0.11%,可作为选育高亲和铵转运因子小麦的原始材料。

关键词:小麦;基因枪法;高亲和铵转运因子

中图分类号:S512.103

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)06-0001-04

氮素是植物合成蛋白质、核酸和氨基酸等的必需元素之一,对作物的生长发育、产量形成及品质优劣等具有重要影响。氮肥的使用大大提高了农作物产量,然而氮肥的过量使用也会导致氮肥的大量流失和利用效率的大幅下滑,我国每年约有 1 000 万 t 纯氮损失,氮肥的利用效率平均仅 32%~35%,对生态环境也构成了严重威胁^[1]。因此,提高作物对氮素的利用效率已成为降低农业生产成本及缓解环境压力的突破口。

土壤中的铵态氮和硝态氮是高等植物根系吸收无机氮的主要形式,一般来说, NH_4^+ 被优先吸收利用,植物对铵态氮表现出明显的偏好性^[2]。但是,铵盐的浓度在土壤中通常较低,硝酸盐是铵盐浓度的 10~1 000 倍^[3]。农作物根系从土壤中对铵的吸收主要由根细胞质膜上相应的 NH_4^+ 转运因子 (AMT) 负责^[4]。铵转运因子主要由 AtAMT1 和 AtAMT2 两大基因家族编码,其中 AtAMT1 家族基因对 NH_4^+ 的亲合力最高,可以特异性地将铵离子从细胞外转移到细胞内^[5],这

就可以使其从贫瘠土地中有效吸收氮肥。铵转运因子在根系中的过量特异表达提高了番茄抗低氮胁迫能力和氮肥的利用效率,改善了果实品质,同时延缓了衰老,提高了叶绿素含量^[6-7]。利用生物技术培育高亲和铵转运因子的作物品种成为解决氮肥利用效率低的有效途径。该研究通过基因枪法将高亲和铵转运因子 AtPRP3-AtAMT1;1 融合基因转化至黑龙江省主栽强筋小麦品种龙辐麦 18 中,培育高亲和铵转运因子的小麦新品种,为在小麦生产过程中减少氮肥施用量、降低生产成本减轻环境污染等提供技术储备。

1 材料与方法

1.1 材料

供试受体材料是黑龙江省农业科学院作物育种研究所培育的优质强筋小麦品种龙辐麦 18,供体是 AtPRP3-AtAMT1;1 融合基因表达载体,由南开大学生命科学院王宁宁教授提供,菌株质粒载体为 pCambia1301。

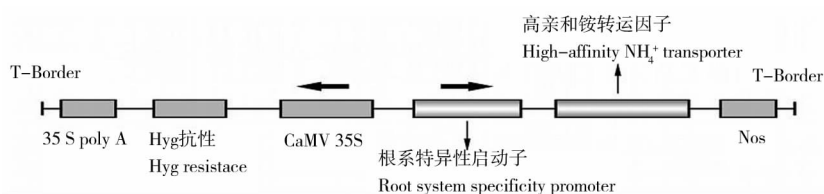


图 1 AtPRP3-AtAMT1;1 融合基因结构^[8]

Fig. 1 The structure of fusion gene AtPRP3-AtAMT1;1

1.2 方法

1.2.1 小麦幼胚组织培养 2007 年 6 月,在小麦开花授粉后 13~14 d,从小麦植株中未成熟种子,用 70% 的酒精表面消毒 1~2 min,15%~20% 次氯酸钠灭菌 15 min。用手术刀切去胚尖,

收稿日期:2014-02-13

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(C200830)

第一作者简介:张宏纪(1969-),男,黑龙江省抚远县人,博士,研究员,从事小麦辐射诱变与生物技术研究。E-mail:fu-mai@163.com。

挑出幼胚接种在诱导培养基上,25℃暗培养7 d,诱导愈伤组织。

小麦幼胚组织培养过程中的培养基按照各个培养基的组成成分配制,pH调至5.8(见表1)。

表1 小麦幼胚组培培养基组成

Table 1 Medium component for wheat immature embryo

培养阶段 Stages	培养基组成 Medium component
诱导培养基 Inducing medium	MS+3.0% Sugar+1.0 mg·L ⁻¹ VB ₁ +2.0 mg·L ⁻¹ 2,4-D+150 mg·L ⁻¹ Asparagine
高渗培养基 Osmotic medium	MS+3.0% Sugar+1.0 mg·L ⁻¹ VB ₁ +2.0 mg·L ⁻¹ 2,4-D+150 mg·L ⁻¹ Asparagine+0.2 mol·L ⁻¹ Sorbitol+0.2 mol·L ⁻¹ Mannitol
筛选培养基 Screening medium	1/2MS+0.5 mg·L ⁻¹ VB ₁ +0.25 mg·L ⁻¹ VB ₆ +0.25 mg·L ⁻¹ Nicotinic acid+1 mg·L ⁻¹ Glycine+50 mg·L ⁻¹ Inositol+2.0% Sugar+5.0 mg·L ⁻¹ ZT+Hygromycin
再生培养基 Regeneration medium	1/2MS+0.5 mg·L ⁻¹ VB ₁ +0.25 mg·L ⁻¹ VB ₆ +0.25 mg·L ⁻¹ Inositol+1mg·L ⁻¹ Glycine+50 mg·L ⁻¹ Inositol+2.0% Sugar+0.3 mg·L ⁻¹ IAA+0.5 mg·L ⁻¹ MET

1.2.2 小麦遗传转化 将预培养7 d的小麦幼胚愈伤组织转移到高渗培养基上,处理4~6 h。基因枪轰击(参数为1 100 psi,1 μg DNA,60 μg金粉·枪⁻¹)后继续在高渗培养基处理16~18 h,转回诱导培养基上,25℃暗培养14 d诱导胚性愈伤组织。

根据小麦幼胚愈伤组织对潮霉素的筛选浓度的研究^[9-10],设置了2个潮霉素筛选浓度:50和100 mg·L⁻¹。将暗培养的胚性愈伤组织转移到筛选培养基上筛选2~3次,在光照条件下分化。将再生芽转移至再生培养基上,在25℃的光照条件下壮苗。

1.2.3 转基因后代的检测 当愈伤组织分化成苗,移栽至温室,取分化苗叶片0.2 g,CTAB法提取基因组DNA,用PCR方法检测转基因后代。为了对获得的转基因植株进行检测,根据高亲和转因因子序列设计并合成3个PCR引物。Primer1: 5'-AGATCTCAACATGTCTTGCTCGGCCA-3'; Primer2: 5'-AAGCTGCATAGAGAA GACAAGGT-3'; Primer3: 5'-TAATCATCG-CAAGACCGGCAACA-3';其中,Primer1和Primer2在转基因小麦中可以扩增出184 bp的基因片段,Primer1和Primer3在转基因小麦中可以扩增出1 608 bp的基因片段。

PCR反应体系为20 μL,含2 μL 10×缓冲液,1.5 μL(25 mmol·L⁻¹) MgCl₂,0.2 μL(5 U) rTaq DNA聚合酶,1.6 μL(2.5 μmol·L⁻¹) dNTP,每条引物1 μL(10 μmol·L⁻¹),40~60 ng模板DNA。PCR反应程序为94℃预变性3 min;

94℃变性40 s,55℃退火40 s,72℃延伸90 s,35个循环;最后72℃延伸10 min。PCR扩增产物用1.0%的琼脂糖凝胶,以120 V恒压电泳分离,EB染色,凝胶成像系统进行分析。

2 结果与分析

2.1 潮霉素抗性植株的获得

1 840个愈伤组织在50 mg·L⁻¹潮霉素进行

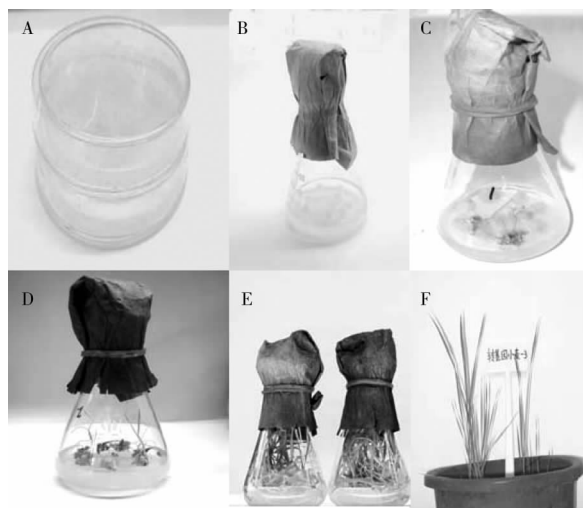


图2 基因枪介导 AtPRP3-AtAMT1;1 融合基因转化小麦

A为幼胚愈伤组织诱导;B为基因枪轰击后暗培养;C、D为愈伤组织筛选;E为壮苗后获得的抗性苗;F为温室里的转基因植株

Fig. 2 Biolistic-mediated transformation of wheat with AtPRP3-AtAMT1;1 gene

A. Callus induction from immature embryos; B. Dark culture after bombarding immature embryo calli; C, D. Immature embryo callus-selection of hygromycin; E. Obtain of hygromycin-resistance plants; F. Transgenic plant in greenhouse

筛选,共得到 69 个抗性苗,成苗率为 2.34%。1 920 个愈伤组织在 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 潮霉素中筛选,没有得到分化苗。将获得的 69 个抗性苗移栽温室(见图 2)。

2.2 转基因植株 PCR 检测

对获得的潮霉素抗性植株进行 PCR 检测,试验中用两对引物同时扩增,A 为 Primer1 和 Primer2 的电泳结果,B 为 Primer1 和 Primer3 的电泳结果,其中,以质粒为阳性对照,最后两个泳道为阳性对照,小基因片段大小为 184 bp,大基因片段为 1 608 bp。扩增结果见图 3,Primer1 和 Primer2 的扩增结果中(见图 3A),8、15、31 和 38

四条泳道有目标条带,如箭头所示,特异条带比非特异条带稍高,与阳性对照小片段大小一致。在 Primer1 和 Primer3 的扩增结果中(见图 3B),在 8、15、31 和 38 四个泳道中也均扩增出了约 1 608 bp 的条带,与该研究的阳性对照的大片段基因大小一致,通过两对特异引物的检测,确认铵转运因子已成功地转化到 4 株再生植株中。该试验用基因枪法共转化 3 760 个愈伤组织,其中 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 潮霉素筛选愈伤组织 1 840 个,共计获得抗性苗 69 株,抗性芽分化率为 3.75%,PCR 检测共有 4 个阳性植株,转化率为 0.11%。

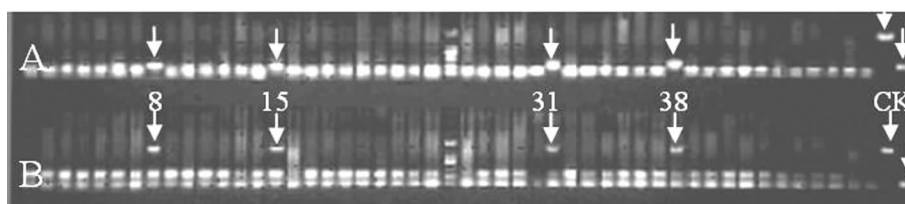


图 3 转基因植株的 PCR 检测结果

Fig. 3 PCR detection of genomic DNA of transformed wheat

3 结论与讨论

该研究以强筋小麦龙辐麦 18 为受体,高亲和铵转运因子为目标基因,转化小麦龙辐麦 18,获得了 4 株转化植株,转化率为 0.11%,与其它研究者对小麦幼胚愈伤组织的转化率 0.33%~2.45%^[11-14]相比较,偏低。在基因转化过程中,小麦基因型、基因枪轰击参数(金粉和质粒 DNA 用量、轰击距离、轰击次数)和培养介质等都是影响转化率的因素。尽管小麦基因枪转化成功的报道已经不少,但是,在小麦基因枪转化中优化转化因素,提高转化效率仍然是基因转化的关键^[15]。曹团武研究认为金粉用量越高,转化频率越高,质粒 DNA 用量以 $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{枪}^{-1}$ 最佳^[16]。孙正红却认为 $250 \mu\text{g}$ 的金粉用量优于 $500 \mu\text{g}$,单枪与双枪差别不大,9 cm 靶距的处理效果较好^[17],在基因枪转化中,金粉用量越大,对细胞的损伤也就越大,这将直接影响胚性细胞的形成及分化^[16]。刘伟华转化菜豆几丁质酶基因时的研究表明,不同轰击参数影响金粉分布的范围和密度,轰击距离为 6 或 9 cm 时,内部金粉密度大而外围金粉密度小,差异极大。轰击距离为 12 cm 时,内部和外围金粉密度差异小,均匀度好^[18]。闵东宏对金粉大小、轰击距离及轰击压力进行了系统研究,结

果表明 3 个因素的不同组合对幼胚的愈伤诱导效率没有明显影响,但对再生率影响较大,以金粉 $0.6 \mu\text{m}$ 、轰击距离 5.5 cm 的再生率和 GUS 瞬时表达量最高。金粉 $0.6 \mu\text{g}$ 、轰击距离 5.5 cm 和轰击压力 650 psi 的处理的平均转化率达 2.45%^[11]。不同的培养基介质对转化频率也有很大影响,尹钧对基因枪法转化小麦幼胚的培养基优化研究表明,在 MS、 $\text{N}_6\text{B}_5\text{MS}$ (N_6 大量元素, B_5 微量元素,有机物和铁盐)、 B_5 和 L_3 四种基本培养基中, L_3 培养基的愈成率最高,且增殖速度快,MS 培养基次之。以 L_3 为基本培养基,分化培养基中添加 NAA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 ZT $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对比对愈伤组织诱导分化的效果最好,分化率达到 50% 以上。 $1/2 \text{ MS}$ 培养基中添加 IAA $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的生根效果好,且移栽成活率高^[19]。权军利利用基因枪轰击小麦幼胚愈伤组织转化外源基因 *pRCK2* 研究表明,高渗处理可以使基因枪转化频率得到明显提高^[20]。该研究中高亲和铵转运因子的基因枪法的轰击参数、筛选剂浓度及组织培养中培养基的选择还有待于优化,以提高外源基因的转化效率。由此成功获得的转基因植株通过杂交和回交等手段拓宽携带高亲和铵转运因子转基因小麦资源,为培育优质、高产、耐低氮环境的小麦品种奠定材料基础。

参考文献:

- [1] 李晓鸣. 黑龙江省化肥利用现状及对策[J]. 农业系统科学与综合研究, 2002, 18(1): 55-57, 61.
- [2] 李园枚, 傅明辉, 蒋丽花. 植物铵转运蛋白研究进展[J]. 广东农业科学, 2012, 39(19): 142-145.
- [3] 刘婷, 张永建, 安霞, 等. 氮素吸收调控中铵转运蛋白与锚蛋白的互作研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17(6): 1293-1299.
- [4] Mayer M, Dynowski M, Ludewig U. Ammonium ion transport by the AMT/Rh homologue LeAMT1;1[J]. Biochem. J., 2006, 396(3): 431-437.
- [5] Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, et al. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots[J]. Plant Cell, 1999, 11(5): 937-948.
- [6] 张茹, 常立, 刘仲齐, 等. 根系特异性过表达铵转运因子可以提高微型番茄 Micro-Tom 的抗低氮能力和果实品质[C]//中国农业生物技术学会第三届会员代表大会暨学术交流会, 中国: 天津, 2006.
- [7] 王宁宇, 张茹, 林景瑜, 等. 高亲和铵转运因子融合基因及其在植物中的应用: 中国, CN 200510014544[P]. 2006-02-22.
- [8] 郇志荣, 孙亚卿, 李国龙, 等. 农杆菌介导获得高亲和 NH_4^+ 转运因子转基因甜菜[J]. 分子植物育种, 2010, 8(2): 287-292.
- [9] 于晓红, 朱祯, 徐鸿林, 等. 基因枪法转化小麦及转基因植株的获得[J]. 高技术通讯, 2000(2): 13-17.
- [10] 奚亚军, 范学科, 侯文胜, 等. 小麦遗传转化中潮霉素适宜筛选浓度的研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2003(1): 39-42.
- [11] 闵东红, 何莎, 张彦, 等. 基因枪转化小麦主要轰击参数的优化[J]. 作物学报, 2013(1): 60-67.
- [12] 侯文胜, 郭三堆, 路明. 基因枪法获得转基因小麦植株[J]. 中国农业科学, 2003(5): 469-472.
- [13] 张媛媛, 江昌俊, 蒋明权. 用基因枪法将抗除草剂 bar 基因导入小麦的研究[J]. 南京农业大学学报, 2005(1): 11-15.
- [14] 徐琼芳, 李连城, 马有志, 等. 用天花粉蛋白基因转化小麦获得转基因植株[J]. 遗传, 2001(2): 135-137.
- [15] 吕瑞华, 曹团武, 陈耀锋, 等. 基因枪法转化小麦幼胚瞬时表达[J]. 农业生物技术学报, 2006(1): 143-144.
- [16] 曹团武, 朱建楚, 亢福仁, 等. 基因枪转化小麦愈伤组织的影响因素研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005(7): 65-67, 72.
- [17] 孙红正, 陈新建, 吕德彬, 等. 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(2): 123-126.
- [18] 刘伟华, 李文雄, 胡尚连, 等. 基因枪法向小麦导入几丁质酶基因的研究[J]. 西北植物学报, 2003(1): 54-59.
- [19] 尹钧, 任江萍, 宋丽, 等. 基因枪转化小麦幼胚的再生培养与转基因植株的获得[J]. 西北植物学报, 2003(9): 1565-1570.
- [20] 权军利, 何玉科, 陈耀锋, 等. 普通小麦基因枪转化高效受体系统的建立[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007(7): 117-122.

Wheat Transformation with High-affinity NH_4^+ Transporter Gene by Particle Bombardment Method

ZHANG Hong-ji, LIU Dong-jun, SUN Yan, GUO Yi-fan, LIU Wen-lin, YANG Shu-ping, SONG Feng-ying

(Crop Breeding Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In order to breed wheat variety which could absorb NH_4^+ effectively, high-affinity NH_4^+ transporter fusion gene was transformed into immature embryo callus of wheat variety Longfumai 18 by particle bombardment method, after selection on media supplemented with different concentration of hygromycin, 69 resistant plants were regenerated from 3 760 immature embryo calluses. 4 transgenic plants were detected and confirmed by 2 pairs of specific primers. The average transformation frequency was 0.11%. It laid a solid foundation for breeding wheat with high efficiency NH_4^+ absorption.

Key words: wheat; particle bombardment method; high-affinity NH_4^+ transporter gene