

小麦农杆菌转化系统的建立与转基因植株的获得

张艳敏¹, 郭北海¹, 丁占生¹, 温之雨¹, 蒋春志², 李 辉², 李洪杰², 陈受宜³

(1. 河北省农林科学院遗传生理研究所, 河北 石家庄 050051; 2. 河北省农林科学院粮油作物研究所, 河北 石家庄 050031; 3. 中国科学院遗传与发育研究所, 北京 100081)

摘要:针对农杆菌转化系统的诸多影响因素进行了系统研究, 建立了有效的小麦农杆菌转化系统; 利用石 4185、石 6365 的花药愈伤组织为受体, 进行了甜菜碱醛脱氢酶和胆碱氧化酶等目的基因的转化研究。

关键词:小麦; 农杆菌; 转基因; 转化效率

中图分类号:S512.01 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2003)03-0001-03

Transgenic Wheat Regeneration Through Agrobacterium Mediated Transformation Systems

ZHANG Yan-min¹, GUO Bei-hai¹, DING Zhan-sheng¹, WEN Zhi-yu¹,
JIANG Chun-zhi², LI Hui², LI Hong-jie², CHEN Shou-yi³

(1. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China; 2. Cereal and oil Crops Institute, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031; 3. Institute of Genetics and Developmental biology CAS, Beijing 100081, China)

Abstract: An effective transformation system for agrobacterium mediated transformation of wheat was established and optimized. The optimized protocol was successfully employed in the production of transgenic wheat plants containing the betaine aldehyde dehydrogenase and choline monooxygenase gene.

Key words: Agrobacterium transformation; Transgenic Wheat; Transformation Efficiency

农杆菌介导是一种十分重要的遗传转化方式, 据统计, 80% 以上的双子叶转基因植株是通过农杆菌介导方法获得的。由于农杆菌对单子叶植物侵染的不敏感性, 使得这一技术在单子叶植物遗传转化中的应用受到限制。研究发现, 某种芳香族化合物, 譬如共培养液中添加一定浓度的乙酰丁香酮可以诱导、促进农杆菌对单子叶植物的侵染。这一发现极大地促进了单子叶植物农杆菌介导转化研究的开展^[1~3], 本文针对小麦农杆菌介导转化效率的诸多影响因素对系统进行优化, 并利用该系统进行目的基因的转化, 将与甜菜碱合成代谢相关的甜菜碱醛脱氢酶(BADH)和胆碱单加氧酶(CMO)基因导入小麦, 获得转基因植株。

1 材料和方法

1.1 转化受体

受体品种为石 4185 及石 6365, 采用其幼胚、幼穗、成熟胚、花药愈伤组织等为转化受体, 花药愈伤组织诱导培养基为 C17, 其他为 MS。

1.2 质粒载体

所用目的基因及质粒表达载体均有中国科学院遗传与发育研究所的陈受宜实验室克隆并构建。

1.3 共培养

将 28 ℃ 过夜培养的农杆菌 4 ℃ 条件下 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用共培养液 (1/5MS + 200 μmol/L 乙酰丁香酮, pH5.2) 重悬菌体, 调整至

收稿日期: 2003-01-20

基金项目: 863 计划项目 (2001AA212121); 国家转基因植物研究与产业化专项 (J99-B-010) 资助

作者简介: 张艳敏 (1963-), 女, 河北盐山人, 副研究员, 硕士, 主要从事组织培养及细胞工程育种研究工作。

所需要的浓度($OD_{600} = 1.0$ 左右)。将愈伤置于上述共培养液中,放置 30 min,偶尔摇动几下,以促使愈伤与菌体的接触。然后将愈伤置于灭菌滤纸上吸去多余水份,摆放到共培养基上(采用湿润培养方法,配方同上),25℃黑暗条件下培养 3 d。

1.4 转化体筛选

共培养后先在含 250 mg/L 头孢霉素的营养液或无菌水中振荡培养 30 min,然后用无菌水清洗,直至冲洗液清澈透明,最后转到筛选培养基(MS + 0.5~2.0 mg/L 2,4-D + 250 mg/L 头孢霉素 + 25 mg/L G418 或 100 mmol/L NaCl)上,培养温度 25℃,每天 16 h 光照。

1.5 转化体再生

将外观较好的抗性愈伤转到分化培养基上(MS + 1.0 mg/L KT + 0.5 mg/L NAA + 250 mg/L 头孢霉素 + 100~150 mmol/L NaCl + 3%蔗糖)。

1.6 再生植株的检测

从试管苗剪取叶片提取基因组 DNA 进行 PCR 检测,用于 BADH 基因检测的 PCR 引物序列为:

5'端引物:5'AGAATGGCGTTCCCAATTCTGCTC 3'

3'端引物:5'TTCAAGGAGACTTGTACCATCCCCA 3'

用于 CMO 基因检测的 PCR 引物序列为:

5'端引物:5'AAGTCCAGAGTTGGTTAATGATGCCAG 3'

3'端引物:5'CAAGAACTCAATTACTTCAAAGTTTGTTC 3'

PCR 反应体系为 20 μ L,包括 10 \times buffer, 0.2 mmol/L dNTPs each, 1.5 U Taq E, 50~100 mg DNA 模板, 1 μ mol/L Primer 1, 1 μ mol/L Primer 2。经过 30 个循环的扩增(94℃ 1 min, 59℃ (CMO)/56℃ (BADH) 1.5 min, 72℃ 1.5 min),后接 72℃ 10 min 的延伸反应,扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离。

2 结果与分析

2.1 农杆菌转化系统的建立和优化

以愈伤组织作为转化受体进行农杆菌介导转化最容易出现共培养后的农杆菌污染问题。为此,首先应用不同来源的愈伤组织(幼胚、幼穗、成熟胚和花药)、不同质粒(1649(Ubil-Gus)、1708(Ubil-Bar)、pGA1734(Ubil-Bar))、以及不同菌株(LBA4404, AGL1)和各种抗生素,围绕农杆菌转化的诸多影响因素进行了系统研究,以建立有效的农杆菌转化系统。

2.1.1 抗生素类型及使用浓度的筛选 供试验的抗生素包括 PPM(Plant Preservative Mixture)、头孢唑啉钠、头孢噻肟钠、头孢拉定、羧苄青霉素钠等,试验浓度为 250, 500 和 1000 mg/L (PPM 除外)。几种抗生素的抑菌效果由强到弱依次为 PPM、头孢噻肟钠、头孢唑啉钠、头孢拉定和羧苄青霉素钠,后者的抑菌效果最差,对 AGL1 菌株基本无效果。PPM 为美国产品,抑菌效果不错,共培养后用 2% 的 PPM 冲洗,在抑菌培养基中添加 0.2% 的 PPM 就可达到较好的抑菌效果,但目前国内还没有代理商,且价格较贵,不宜作为常用药品。其他几种抗生素的使用浓度一般为 500 mg/L,几种抗生素混合使用,效果更好。

2.1.2 愈伤组织状态对抑菌效果的影响 幼胚、幼穗、成熟胚、花药愈伤等都曾作为转化的受体材料,总的来讲,不管愈伤组织来源如何,只要愈伤组织为结构比较密集的颗粒状,就比较容易达到理想的抑菌效果。处理前将愈伤培养在高渗培养基上培养,利于愈伤组织向结构密集的方向发展,进而容易冲洗和抑菌。

2.1.3 共培养后的冲洗方式对抑菌效果的影响 共培养后大多采用先用含一定浓度抗生素的无菌水冲洗,然后大量无菌水多次冲洗的办法,以求达到一种既灭菌又避免抗生素对愈伤组织造成伤害的效果,结果一直不稳定。冲洗方式试验表明,共培养后在含有一定浓度的混合有几种抗生素的液体中震荡培养 0.5~1.0 h,然后用无菌水清洗,直至冲洗液清澈透明,最后直接转到固体培养基上,效果良好。

2.1.4 菌液浓度及共培养时间对抑菌效果的影响 菌液浓度 $OD_{600} = 0.1, 0.2, 0.5, 0.7, 1.0$ 几种处理,在共培养一段时间后均能在愈伤表面发现明显菌斑,但是 $OD = 0.5$ 以上时,共培养时间必须缩短为 2 d 以内,否则,愈伤被农杆菌吞噬,抑菌相当困难。

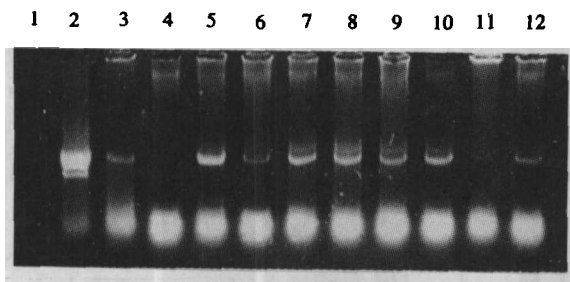
2.2 目的基因的农杆菌介导转化及转基因植株的获得

受体材料为石 4185 及石 6365 小麦花药诱导的单倍体愈伤组织,目的基因为 BADH 和 CMO,这两个基因分别由 CaM 35S 和玉米 Ubiquitin 启动子控制,质粒携带 NPT II 卡那霉素抗性基因,农杆菌菌株均为 AGL1。转化体的筛选采取 NaCl 盐筛和 G-418 筛选。

2.2.1 以石 4185 花药愈伤为受体的 CMO 基因的转化 处理愈伤 1360 块,共培养后立即将愈伤置

于 25 mg/L G418 选择压力下, 经过 20 d 的筛选, 80%~90% 愈伤生长明显受阻, 表现在愈块没有增大, 颜色泛白等, 也有个别愈块明显增大, 有明显生长点, 有的还有芽点, 但这种类型的愈伤数量太少, 仅占处理愈伤数的 0.67%, 加上愈块稍微有些增大的二级类愈伤, 所占比例仍然低于 10%。将这些愈伤转至 50 mmol/L 氯化钠继代筛选、100 mmol/L 氯化钠下分化, 得到再生植株 4 丛, 绿苗获得率仅为 0.29%。由于试管苗弱小, 还没有进行分子检测。

2.2.2 以石 6365 花药愈伤为受体的 *badh* 基因转化 处理愈伤 1 480 块, 鉴于上一试验中立即施加的选择压对愈伤存活构成的潜在威胁太大, 本试验采取了逐步提高选择压的筛选策略, 并且共培养后不立即施加选择压力, 让愈伤在无选择压力下恢复生长 14 d, 以消除农杆菌介导系统中共培养期的低 pH 对愈伤活力的不利影响。恢复性生长过后先后进行 50 mmol/L 和 100 mmol/L 氯化钠筛选, 各维持 14~21 d。经筛选得到抗性愈伤组织 250 块, 占处理愈伤总数的 16.89%, 经分化获得绿苗 94 丛, 绿苗率为 6.35%。对其中的 33 丛试管苗提取 DNA 进行 PCR 分析, 结果 20 份呈阳性反应, 占检测总数的 60.61%。由绿苗率和 PCR 阳性率计算得到转化效率为 3.85%。部分转基因植株的 PCR 检测结果见图 1。



泳道 1 为阴性对照石 6365, 泳道 2 为阳性对照质粒 *BADH*, 泳道 3~12 为转基因植株

图 1 石 6365 的部分 PCR 检测结果

2.2.3 以石 4185 花药愈伤为受体的 *BADH* 和 *CMO* 基因共转化 将带有两种质粒载体的农杆菌体等浓度混合后转化石 4185 花药愈伤组织, 共处理愈伤 1 000 块, 共培养后直接在 50 mmol/L 氯化钠下筛选转化体, 然后逐步提高至 150 mmol/L。50 mmol/L 盐浓度下获得绿苗 22 丛, 150 mmol/L 盐浓度下获得绿苗 9 丛, 共计获得绿苗 31 丛, 绿苗获得率为 3.1%。对其中的 9 丛试管苗提取 DNA 进行

PCR 分析, 结果 3 丛呈 *BADH* 阳性反应, 占检测总数的 1/3, 没有获得 *CMO* 阳性株。

3 讨论

在培养基中添加乙酰丁香酮和降低离子浓度解决了农杆菌对小麦等单子叶植物不侵染的问题, 但是与基因枪转化方法相比, 农杆菌介导的单子叶植物遗传转化效率还很低。本研究 3 个批次试验的总体转化效率为 1.84%, 远远低于夏光敏报道的转化效率 3.7%~5.9%^[4]。这可能有小麦基因型的差异, 也可能是本系统还不够完善高效。农杆菌介导转化与基因枪法有诸多不同之处。首先农杆菌介导转化的受体愈伤处于更加不利的生长环境中, 共培养期相对较低的 pH, 使愈伤活力大大降低; 转化体筛选过程中除了承受与基因枪法相同的选择剂压力外, 还要额外承受对愈伤生长同样具有相当抑制作用的杀菌剂。通过添加亚精胺来调节再生培养基中的多胺比率, 可以促进绿苗再生从而提高转化效率^[5]。本研究表明在尽量减少无性系变异副作用的前提下, 适当地给以恢复性生长, 使之具有和基因枪法同等的愈伤活力和对选择剂的耐受水平, 对获得足够数量的转化再生植株、提高转化效率也是十分必要的。

参考文献:

- [1] Hiei Y, Ohta S, Komari T, *et al.* Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. *Plant J*, 1994, 6: 271-282.
- [2] Ishida Y, Saito H, Ohta S, *et al.* High efficiency transformation of maize mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 1: 745-750.
- [3] Cheng M, Fry J E, Pang S Z, *et al.* Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Physiol*, 1997, 115: 971-980.
- [4] 夏光敏, 李忠谊, 贺展霞, 等. 根癌农杆菌介导的小麦转基因植株再生(英文)[J]. *植物生理学报*, 1999, 25: 22-28.
- [5] Khanna H K, Daggard G E. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyamine - supplemented regeneration medium[J]. *Plant Cell Rep - Abstract* DOI 10.1007/s00299-002-0529-x. <http://www.springerlink.com>