

根癌农杆菌介导小麦成熟胚的遗传转化研究

郭 丽¹, 谷俊涛², 龙素霞¹, 郭程瑾¹, 肖 凯¹

(1. 河北农业大学 农学院, 河北 保定 071001; 2. 河北农业大学 生命科学学院, 河北 保定 071001)

摘要: 以小麦成熟胚为转化受体, 采用农杆菌介导的遗传转化技术, 建立了小麦的转基因株系。结果表明, 建立的小麦遗传转化和植株再生体系, 在选择压下由侵染的小麦成熟胚中, 获得的抗性愈伤组织频率为 57.50%, 愈伤组织分化频率为 8.58%, 植株分化比例为 0.83%。对再生植株中报告基因 *Gus* 的 PCR 检测结果表明, 供试 3 株小麦的 PCR 均为阳性。与未进行遗传转化的对照植株相比, 再生植株的 *Gus* 活性明显提高。表明再生的供试植株均为转基因植株。因此, 本研究建立的小麦成熟胚遗传转化和再生体系, 为今后小麦的高频转基因系的获得提供了参考依据。

关键词: 小麦 (*Triticum aestivum* L.); 成熟胚; 遗传转化; 分子鉴定

中图分类号: S512.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)增刊-0054-04

Studies on Wheat Genetic Transformation Mediated Via *Agrobacterium tumefaciens* in Which the Mature Embryos to be Explants

GUO Li¹, GU Jun-tao², LONG Su-xia¹, GUO Cheng-jin¹, XIAO Kai¹

(1. College of Agronomy, Baoding 071001, China; 2. College of Life Science, Baoding 071001, China)

Abstract: In this study, the genetic transformation procedure of wheat mediated via *Agrobacterium tumefaciens* in which the mature embryos to be the explants was established. Under selection pressure condition, the generation rate of resistant calli to the transformed total mature embryos was 57.50%, with a differentiation rate of resistant buds to the transformed total mature embryos being 8.58%, and a plant generation rate of generated plants to the transformed total mature embryos being 0.83%. In the tested three generated plants, PCR amplifications for the reporter gene *Gus* were all positive. In the meantime, the *Gus* activities in the plants were all significantly higher than the control (non-transformed plants). These results demonstrated that the tested plants generated from the transformed mature embryos were transgenic. Therefore, the genetic transformation approach established in this study would provide a powerful method for establishment of transgenic wheat lines in the future.

Key words: Wheat (*Triticum aestivum* L.); Mature embryos; Genetic transformation; Molecular identification

农杆菌介导的植物遗传转化, 具有操作简单、转移基因拷贝数低、易于转移大片段 DNA、转化效率高、因插入拷贝数少后代易于纯和等优点等^[1]。利用农杆菌介导的植物遗传转化首次在烟草中获得成功^[2]。以后相继在棉花、马铃薯等大部分双子叶植物中得到了成功的应用^[3]。目前, 农杆菌介导的遗传转化技术已成为双子叶植物和作物遗传转化的重要途径。

近年来, 有关根癌农杆菌介导的单子叶植物遗传转化也取得了重要进展。如采用农杆菌介导遗传

转化, 在水稻、玉米等多种单子叶植物中均已有成功报道^[4]。有关农杆菌介导小麦遗传转化的研究, 已有一些学者进行了试验, 获得了一些有价值的研究结果^[5-6]。在阐明基因型、菌株和载体、胚的大小、预培养时间、共培养条件、乙酰丁香酮 (AS) 的作用、培养基成份等影响小麦遗传转化因素的基础上^[7-10], 已成功建立了育性正常的转基因小麦植株^[11, 12]。但迄今小麦遗传转化和转基因植株再生的研究, 多采用小麦幼胚作为转化受体, 利用根癌农杆菌介导小麦成熟胚遗传转化的研究还报道尚

收稿日期: 2009-03-12

基金项目: 科技部“973”前期项目 (2007CB116209) 资助; 河北省重点基础研究项目 (08965525D)

作者简介: 郭 丽 (1983-), 女, 河北衡水人, 硕士, 主要从事作物高产与分子生物学研究。

通讯作者: 肖 凯 (1963-), 男, 河北秦皇岛人, 教授, 博士生导师, 主要从事作物生理与分子生物学研究。

少^[13]。

利用小麦成熟胚作为遗传转化受体,能克服以小麦幼胚作为遗传转化受体遭遇的受生长季节和幼胚发育阶段限制的缺点,具有取材方便、周期短、个体间生理状态相似、试验重复性强等优点^[14]。尽管迄今有关以小麦成熟胚为转化受体、农杆菌介导的小麦遗传转化已有一些报道^[13],但存在着选用的基因型少、遗传转化和转基因系的建立效率低等不足。基于此,笔者以前期研究鉴定的其成熟胚具有高效再生植株能力的河农 822 为材料^[15],以成熟胚为农杆菌侵染的外植体,建立了具有高频特征的小麦遗传转化技术体系。该研究为今后小麦高频转基因系的获得奠定了有利条件。

1 材料和方法

1.1 植物材料和成熟胚预培养

用于遗传转化的小麦品种为已审定的品种河农 822。前期研究已表明,河农 822 的成熟胚具有较强的再生植株的能力^[15]。

选取当年度收获的饱满种子,进行 5 min 70% 乙醇消毒,用灭菌蒸馏水冲洗干净,4℃下浸泡 36 h 后,将胚剥离,转入预培养基。预培养基的组分如下:1×MS 盐及 MS 维生素、基本培养基(100 mg/L Glutamine, 100 mg/L Hydrolysate, 100 mg/L Ascorbic acid, 1.95 g/L MES),另含有 40 g/L Maltose, 1 mg/L Picloram, 4 mg/L 2,4-D, 10 g/L Agar。25℃下暗培养 2~3 周。

1.2 小麦成熟胚的侵染和共培养

用于小麦成熟胚遗传转化的植物二元表达载体为 pCambia3301,携带该载体的菌株为 EHA05。将预培养后的成熟胚愈伤转入侵染培养液(1×MS 盐及 MS 维生素、基本培养基,另含有 10 g/L Glucose, 40 g/L Maltose, 1 mg/L Picloram 和 200 μmol/L Acetosyringone),25℃下侵染 1 h,用灭菌的滤纸吸干后转移至共培养基(侵染培养液,10 g/L Agar)上,25℃条件下黑暗培养 3 d。

1.3 愈伤组织的诱导、筛选与再生

共培养后,将转化受体转至诱导培养基(1×MS 盐及 MS 维生素、基本培养基,40 g/L Maltose, 0.1 mg/L 2,4-D, 5 mg/L Zeatin, 250 mg/L cef, 5 mg/L PPT, 10 g/L Agar),每 2 周继代 1 次,筛选出抗性愈伤组织。然后,转入分化培养基(1×MS 盐及 MS 维生素,30 g/L Maltose, 0.1 mg/L 2,4-D, 5 mg/L

Zeatin, 250 mg/L cef, 5 mg/L PPT, 10 g/L Agar),培养约 4 周,筛选出抗性芽、苗。待芽苗长至 3 cm 左右,转入生根培养基(1×MS 盐及 MS 维生素,250 mg/L cef, 2.5 mg/L PPT, 10 g/L Agar)和营养土内生长。

1.4 再生植株的 PCR 检测和 Gus 活性测定

将生根后的再生植株转入生长室,于营养土内培养。取叶片样本,采用 CTAB 法提取植株的基因组 DNA,依据二元表达载体 pCambia3301 中的报告基因 Gus(β-葡萄糖醛酸酶基因)序列,合成基因的特异性引物。正向引物为 5'-GTGAAGTGGTCTC GTGACAAG,反向引物为 5'-TCACACGTGATGGT-GATGGTGAT,扩增大片段大小为 654 bp。PCR 的条件如下:94℃预变性 5 min;94℃变性 45 s,55℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,30 个循环;72℃10 min;4℃保温。再生植株的 Gus 活性测定参照 Jefferson 的方法^[16]进行。

1.5 抗性愈伤、分化愈伤和再生植株比例计算

通过在选择压(5 mg PPT)下 2 周时,出现新生抗性愈伤的数量与转化成熟胚总数的比值计算抗性愈伤频率。由经过 2 周分化培养出现的分化愈伤数量与转化成熟胚总数的比值计算分化愈伤频率,由再生植株的数量与转化成熟胚总数的比值计算再生植株比例。

2 结果与分析

2.1 小麦成熟胚愈伤组织诱导、遗传转化和植株再生过程

剥取小麦成熟胚(图 1-A),在预培养基上培养后(图 1-B),进行农杆菌侵染和遗传转化。经过 3 d 共培养后,转入诱导培养基,经过一段时间的生长后,诱导出抗性愈伤组织(图 1-C)。将诱导的愈伤组织转入分化培养基,4 周左右,获得抗 PPT 的芽、苗(图 1-D)。获得的抗性芽苗进一步在生根培养基生长(图 1-E),获得再生植株(图 1-F)。

2.2 抗性愈伤和分化愈伤的频率

本研究中,以小麦成熟胚为外植体,诱导的愈伤侵染农杆菌后,在选择压下获得了较高的抗性愈伤频率、分化愈伤频率和植株再生比例。其中,由转化的小麦成熟胚获得的抗性愈伤组织频率平均为 57.50%,在转化的小麦成熟胚中,获得的分化愈伤组织频率平均为 8.58%,再生植株与转化成熟胚总数的比例平均为 0.83%。表明本研究中采用的愈伤组织诱导、农杆菌侵染和植株再生条件是适宜的。

表 1 抗性愈伤比例、分化愈伤比例和再生小麦植株比例

Tab. 1	The percentages of resistant calli bud differentiations and generated plants to the infected mature embryos respectively						
试验 Experi—ment	感染成熟胚数 Infected mature embryos	抗性愈伤数量 Resistant calli	抗性愈伤比例/% Ratio of resistant calli	分化愈伤数量 Differentiated calli	分化愈伤比例/% Ratio of differentiated calli	再生植株数量 Generated plants	再生植株比例/% Ratio of generated plants
I	400	262	65.50	41	10.25	3	0.75
II	400	220	55.00	32	8.00	5	1.25
III	400	208	52.00	30	7.50	2	0.50
平均值	400	230	57.50	34.33	8.58	3.33	0.83

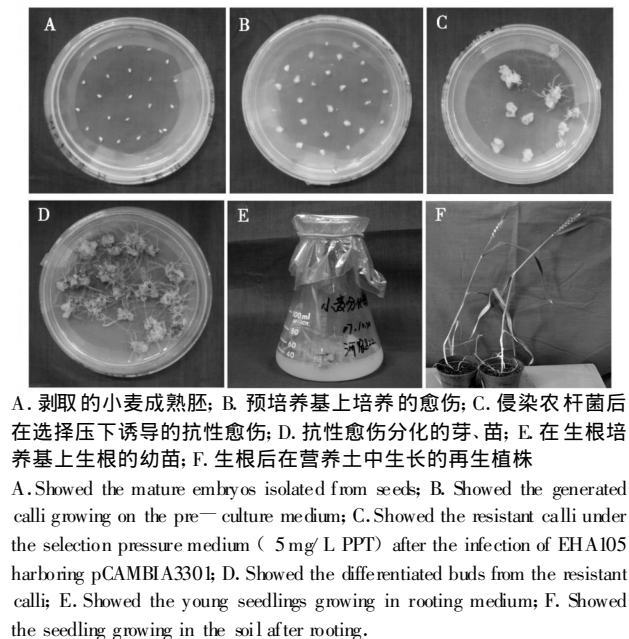


图 1 小麦成熟胚的遗传转化和植株再生过程
Fig. 1 The process of genetic transformation and plant generation derived wheat mature embryos

2.3 供试再生植株的 PCR 分子鉴定

以未进行遗传转化的植株为对照(CK), 以可能整合至再生植株的报告基因 *Gus* 为检测基因, 对获得的其中 3 个再生植株进行了 PCR 鉴定。首先, 采用 CTAB 技术提取了对照(CK)和再生植株的基因组 DNA(图 2—A)。以提取的基因组 DNA 为模板, PCR 结果表明, 待测的 3 株再生植株均为 PCR 阳性(图 2—B)。表明 *Gus* 基因已整合至再生植株的基因组中。

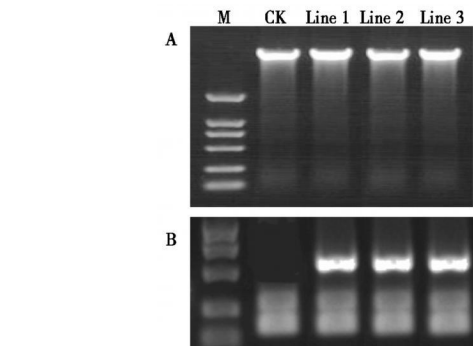


图 2 对照(CK)和再生植株的基因组 DNA 提取(A)和 PCR 鉴定(B)
Fig. 2 The extracted DNA (A) and PCR amplification (B) in the control (CK, wild type) and the generated plants

2.4 供试再生植株的 *Gus* 活性测定

对对照(CK)和 3 株再生植株的 *Gus* 活性测定结果表明, CK 中的 *Gus* 活性很低, 而 3 株再生植株中的 *Gus* 活性明显高于对照(图 3)。这进一步证实, 本研究中采用农杆菌介导小麦成熟胚的再生小麦植株, 已整合了农杆菌中的双元表达载体 T—DNA 片段内的报告基因 *Gus*。因此, 本研究表明, 以农杆菌介导小麦成熟胚遗传转化, 辅以适当的愈伤组织分化和植株再生体系, 能有效建立小麦的转基因植株。

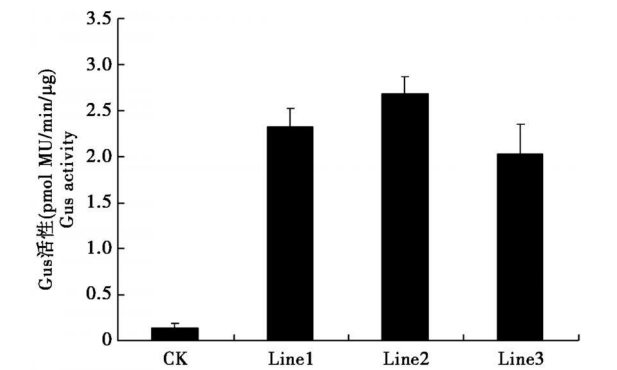


图 3 对照(CK)和再生小麦植株的 *Gus* 活性测定
Fig. 3 The *Gus* activities of the contrd (CK, non—transformed plants) and generated plants from the mature embryos

3 讨论

小麦是我国和世界许多国家的重要粮食作物。采用基因工程途径创建抗逆、高产、高效的小麦品种对于加快小麦育种进程具有重要的实践意义。前人有关小麦遗传转化的研究, 主要以基因枪法为主^[17, 18], 但该转化技术具有需昂贵设备、在转基因植株中插入基因的拷贝数多、后代不易纯合等不足。农杆菌介导的植物遗传转化技术, 具有设备和技术简单、插入目标基因的拷贝数少使得后代易于纯合等优点。有关以小麦幼胚为转化外植体的小麦遗传转化研究以有较多报道^[7—10], 并建立了育性和表型正常的转基因植株^[11, 12]。但由于以小麦幼胚为外植体的遗传转化和转基因系的建立, 存在着取材受到季节限制、幼胚间的生理状态往往存在较大差异等限制, 在开展小麦转基因系的研究和应用中存在较大的局限性。利用小麦成熟胚作为遗传转化

受体,能克服以小麦幼胚作为遗传转化受体遭遇的受生长季节和幼胚发育阶段限制的缺点,具有取材方便、周期短、个体间生理状态相似、试验重复性强等优点^[13-14]。因此,建立农杆菌介导的以小麦成熟胚为外植体的遗传转化和转基因植株再生体系,具有重要的实践意义。

目前,以小麦成熟胚高频再生植株的技术体系日益完善^[15-19],但采用农杆菌介导小麦成熟胚遗传转化和建立转基因植株的研究还相对较少,其主要限制因素是进行农杆菌侵染和遗传转化后,成熟胚芽苗分化频率低的问题往往得不到很好地解决^[13]。本研究在前期建立小麦成熟胚高频再生体系^[18]和开展较多植物遗传转化和转基因系建立^[20]工作的基础上,通过对农杆菌侵染条件、共培养时间、适当选择压的筛选、选择压下适合抗性愈伤形成、分化和植株再生等条件的优化,建立了具有较高遗传转化效率和植株再生比例的农杆菌介导成熟胚遗传转化和植株再生的技术体系。对再生植株的PCR分子鉴定和可能整合至小麦基因组的报告基因Gus编码蛋白活性的测定结果证实,农杆菌携带的双元表达载体内T-DNA片段已整合至再生的小麦植株中。

本研究中,由感染的小麦成熟胚获得的抗性愈伤组织频率平均为57.50%,在感染的小麦成熟胚中,获得的分化愈伤组织频率平均为8.58%,再生植株与侵染成熟胚总数的比例平均为0.83%。表明本研究中采用的愈伤组织诱导、农杆菌侵染和植株再生条件是适宜的。该技术体系为今后建立农杆菌介导的小麦成熟胚高频遗传转化和转基因植株提供了重要参考依据。

本研究发现,与未经农杆菌感染的对照相比,进行农杆菌感染后的愈伤组织,具有相对较好的出芽能力,但生根能力明显变差。表现为生根部位褐化坏死现象较重,导致难以再生完整的转基因植株。因此,进一步改善农杆菌侵染后愈伤组织的生根能力,有望有效提高分化芽的再生植株效率。相关问题有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学出版社,1996:233.
- [2] Zambryski P, Joos H, Genetello C. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity[J]. The EMBO Journal, 1983, 2 (12): 2143—2150.
- [3] Grant J E, Dommissie E M, Christey M C. Gene transfer to plants using *Agrobacterium*. In: Murray D R, ed. Advanced methods in plant breeding and biotechnology[J]. CAB International, Wallingford, 1991, 50—73.
- [4] Chan M T, Lee T M, Chang H H. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant and Cell Physiology, 1992, 33: 577—583.
- [5] Hess D, Dressler K, Nimmrichter R. Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium tumefaciens* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Science, 1990, 72: 233—244.
- [6] Mooney P A, Goodwin P B. Adherence of *Agrobacterium* to the cells of immature wheat embryos[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1991, 25: 199—208.
- [7] Neeta S, Chawla H S. Use of silicon carbide fibers for *Agrobacterium*—mediated transformation in wheat [J]. Current Science, 1999, 76 (11): 1483—1485.
- [8] Munrielle U, Ingo P, Christof S. Factors influencing T—DNA transfer from *Agrobacterium* to precultured immature wheat embryo (*Triticum aestivum* L.) [J]. Cereal Research Communication, 2000, 28: 17—23.
- [9] 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 Reports, 2003, 21: 429—436.
- [10] Wu H, Sparks C, Amoah B. Factors influencing successful *Agrobacterium*—mediated genetic transformation of wheat [J]. Plant Cell Reports, 2003, 21: 659—668.
- [11] Cheng M, Fry J E, Pang S Z, et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Physiology, 1997, 115: 971—980.
- [12] Xia G M, He Z Y, Chen H M, et al. Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Acta Phytophysicologica Sinica, 1999, 25(1): 22—28.
- [13] 丁莉萍,陈 冷,李圣纯,等.根癌农杆菌介导小麦成熟胚遗传转化影响因素的研究[J].麦类作物学报, 2007, 27(5): 761—766.
- [14] 彭朝华,毛炎麟.小麦成熟胚愈伤组织的诱导和植株再生[J].北京农业大学学报,1989,15(4): 397—402.
- [15] 龙素霞,赵芳华,许振龙,等.冬小麦成熟胚高频愈伤组织形成和分化的适宜条件研究[J].华北农学报, 2008, 23(增刊): 26—30.
- [16] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1987, 5(4): 387—405.
- [17] 刘永伟,徐兆师,杜丽璞,等.病毒复制酶基因Nib8和ERF转录因子W17基因枪法共转化小麦[J].作物学报, 2007, 33(9): 1548—1552.
- [18] 王海波,张艳贞,晏月明.基因枪法转化小麦谷蛋白基因研究进展[J].生物技术通报, 2007, (3): 101—104.
- [19] 于 洋,卫志明.影响小麦成熟胚再生频率因素的研究[J].分子细胞生物学报, 2007, 40(6): 443—450.
- [20] 谷俊涛,赵红梅,刘祝玲,等.农杆菌介导白三叶草高效遗传转化和转基因植株再生[J].草业学报, 2007, 16 (2): 84—89.