

# 农杆菌转化小麦幼胚获得转 bar 基因再生植株

梁雪莲<sup>1</sup>, 孙毅<sup>1</sup>, 郭平毅<sup>2</sup>, 刘惠民<sup>1</sup>, 刘少翔<sup>1</sup>, 王景雪<sup>1</sup>, 解志红<sup>2</sup>

(1. 山西省农业科学院生物技术中心, 山西 太原 030031; 2. 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801)

**摘要:**用农杆菌转化小麦授粉 10 d 后的幼胚, 经 5%PPT 筛选获得大量正常再生植株。PCR 及 PCR-Southern 杂交检测证明其中 23% (18 株) 再生苗为转化 bar 基因植株, 这些植株可明显提高对 *basta* 的抗性。还总结了农杆菌转化小麦幼胚高效获得转基因再生植株的处理程序。

**关键词:** 农杆菌; 转化; 小麦; 幼胚; bar 基因

中图分类号: Q785; S512.103.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)01-0012-05

## A Study of *Agrobacterium*-mediated Bar Gene Transformation on Wheat

LIANG Xue-lian<sup>1</sup>, SUN Yi<sup>1</sup>, GUO Ping-yi<sup>2</sup>, LIU Hui-min<sup>1</sup>,  
LIU Shao-xiang<sup>1</sup>, WANG Jing-xue<sup>1</sup>, XIE Zhi-hong<sup>2</sup>

(1. Biotechnology Research Center, Shanxi Academy of Agriculture Sciences, Taiyuan 030031, China;

2. Agronomy Department, Shanxi Agriculture University, Taigu 030801, China)

**Abstract:** A bar gene was introduced into wheat immature embryos (10 days after pollination) by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. PPT (5%) selection and further PCR and PCR-Southern blot test demonstrated that bar gene has been integrated into plant genome. The major procedures for obtaining high frequency regenerated plants were also discussed.

**Key words:** Wheat; Embryo; *Agrobacterium tumefaciens*; Bar gene; Transformation

尽管禾谷类尤其是小麦曾被认为不是农杆菌的天然宿主, 然而, 早在 1988 年就有人证明农杆菌能侵染小麦并进行遗传转化, 随后又有人观察到农杆菌能附着到经部分酶解和未酶解的小麦幼胚细胞, 但在很长一段时间中一直没有得到小麦转基因植株<sup>[1,2]</sup>。Cheng Ming 等<sup>[3]</sup>于 1997 年首次用农杆菌介导法获得正常的转基因小麦植株。2 年后, 夏光敏等<sup>[4]</sup>也报道获得农杆菌介导的转基因小麦植株。目前农杆菌介导法正成为禾谷类转化的首选方法。刘庆法<sup>[5]</sup>等人研究了小麦转化的优化条件, 安海龙等人<sup>[6]</sup>摸索了小麦幼胚再生技术系统, 肖兴国等<sup>[7]</sup>获得了转化再生植株。前人的研究也已证明乙酰丁香酮(AS)有利于农杆菌转化, 是活化 Ti 质粒上 Vir 区

基因的信号分子, 而且浓度以 100  $\mu\text{mol/L}$  最佳, 但未确定何时加入最为有效。也有人报道在预培养基和细菌培养基中加入高浓度蔗糖能提高转化率。为了进一步提高小麦转化率, 我们系统地研究了不同小麦品种, 在幼胚愈伤诱导及转化前后过程中添加 AS, 使用高糖培养基, 以及在 MS 与 MB 培养基上的不同分化表现, 并对获得的植株进行分子检测, 获得了大量在 PCR-Southern 水平上呈阳性的转化植株。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

本试验选用目前生产上推广的 7 个小麦品种, 分别为: 晋麦 45 号, 晋春 13 号, G54, 扬麦 158, 甘 94

收稿日期: 2002-06-10

基金项目: 山西省科委攻关项目(981001)

作者简介: 梁雪莲(1969-), 女, 山西文水人, 助理研究员, 博士, 主要从事作物抗逆性基因转育方面的研究工作。

鉴 64, 89178 和冀 411。

1.2 愈伤培养与转化筛选及移栽

小麦授粉后 10~ 15 d 内, 选取饱满穗子, 剥取绿色子粒, 灭菌时先用 75% 酒精浸泡 20 min, 再用 0.1% 升汞浸泡 5 min, 用无菌水洗涤 4 次。然后挑取幼胚于培养基上(表 1), 在 25℃ 黑暗条件下生长 3

~ 4 d 后, 用浓度为 10<sup>8</sup> cfu/mL 的菌液浸泡感染幼胚愈伤, 菌液中加入有 100 μmol/L 的 AS, 感染后的愈伤首先在共培养基上共培养 3 d, 然后转于杀菌筛选培养基上, 筛选 15 d 左右, 接于分化培养基上, 30~ 60 d 后移到生根培养基上, 壮苗 30 d 后, 于 2~ 4℃ 春化 30 d, 后移出栽于花盆中。

表 1 不同阶段的培养基

培养基	成分( pH 值 5. 8)
预培养基	MS(MB)+ 2, 4- D 2 mg/L+ 3% 蔗糖+ 0. 8% 琼脂糖
感染液	MS(MB)+ 2, 4- D 2 mg/L+ 8% 蔗糖+ 3% 葡萄糖+ 100 μmol/L AS
共培养基	MS(MB)+ 2, 4- D 2 mg/L+ 3% 蔗糖+ 0. 8% 琼脂糖+ 100 μmol/L AS
筛选培养基	MS(MB)+ 2, 4- D 2 mg/L+ 3% 蔗糖+ 0. 6% 琼脂糖+ 500 mg/L 羧苄青霉素培养基+ 5 mg/L ppt
分化培养基	MS(MB)+ 3% 蔗糖+ 0. 6% 琼脂糖+ 500 mg/L 羧苄青霉素培养基+ 2 mg/L ppt
生根培养基	1/2MS(MB)+ 20% 蔗糖+ 0. 7% 琼脂糖+ 500 mg/L 羧苄青霉素培养基

1.3 分子检测

农杆菌小种为 LBA4404, 质粒结构如图 1:

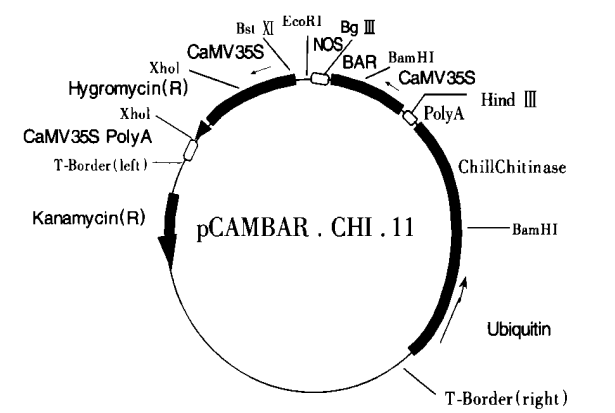


图 1 质粒 pCAMBAR. CHI. 11 物理图谱

DNA 提取采用改良 SDS 碱裂解法<sup>[8]</sup>; PCR 扩增体系为 25 μL, 扩增程序为:

94℃ 45s, 58℃ 45s, 72℃ 1min 45s, 30 次循环<sup>[9]</sup>; 根据质粒中 bar 基因序列设计引物如下(其扩增片段为 438 bp): 上游: 5'-ACCATCGTCAACCACTACAT-3'; 下游: 5'-AGTCCAGCTGCCAGAAACCC-3'。

Southern 杂交<sup>[10]</sup>取 10 μL PCR 呈阳性的产物进行, 用 PCR 地高辛探针标记试剂盒标记质粒中的 bar 作为探针, 用随机引物法标记分子标记, 用 CSPD 法显影。

2 结果与分析

2.1 操作注意事项

根据报道, 在幼胚 0.5~ 1.5 mm 时接种, 出愈率及分化率最高<sup>[6]</sup>, 而到大于 1.5 mm 时则转化率几乎

为 0, 所以一定要取 1.5 mm 以下的幼胚。预培养时间, 以 3~ 4 d 为好, 因为幼胚预培养 2~ 3 d 时, 已开始明显膨大, 4 d 后幼胚快速增殖, 7~ 10 d 后出现胚状体, 表明其体细胞胚胎发生开始于培养初期<sup>[11]</sup>, 因此采用预培养 3~ 4 d 的幼胚作为转化受体, 使感染后的共培养期正处于细胞分裂旺盛及形成胚状体的时期, 从而有利于外源基因的整合及转化植株的获得。

细菌感染时, 取对数生长期的菌以 10<sup>8</sup> cfu/mL 的菌液感染。取对数生长期的细菌是因为此时细菌的活力很强; 浓度的选择是因为菌过稀会影响转化率, 而过浓则对愈伤细胞伤害过大, 也会影响以后的分化与再生; 菌液浸泡时间以 8~ 10 min 为好, 太长也会对愈伤细胞引起大的伤害。

2.2 AS 在感染前后不同阶段的作用

本试验表明, 无论在预培养基中、感染液中还是共培养基中添加 AS 均有利于提高转化率, 但 3 个阶段中, 感染液中的 AS 最为关键, 能显著提高转化率, 以感染液与共培养基中共同添加的效果最佳(表 2)。

表 2 不同培养基中加入 AS 后的转化率

培养基	总处理愈伤数	筛选成活愈伤数	转化率(%)
预培养基	400	218	54. 5
共培养基	400	260	65. 0
感染液	500	360	72. 0
感染液+ 共培养基	500	386	77. 2

2.3 高糖培养基的选取

有人报道较高的渗透压有利于农杆菌转化<sup>[12~ 15]</sup>, 因而在本研究中采用了 8% 葡萄糖+

3% 蔗糖浓度。另外本试验还表明,高糖处理的感染后农杆菌生长低于对照,好象受到抑制,其机理还不清楚。为了抑制农杆菌在共培养基上生长过旺,也应注意愈伤感染后在吸水纸上要尽量吸干,而且要一粒粒分别摆于培养基上,不能先堆上去再铺开,否则易造成污染。我们还观察到高糖处理再生苗的生

长势明显优于低糖处理的,其颜色淡黄、鲜艳、生长健壮,而低糖处理中的某些品种如扬麦 158,颜色呈灰白或苍白。总之,高糖处理中的愈伤组织的绿色芽点发生率,愈伤成活率及成苗率均高于低糖处理(表 3)。有人认为高渗培养基处理后效果较佳是由于愈伤细胞中多余的水外渗所致<sup>[16]</sup>。

表 3 不同培养基与糖浓度下愈伤生长情况 %

考 察 项 目	培养基		糖浓度	
	MB	MS	8% 蔗糖+ 3% 葡萄糖	3% 蔗糖
生长势	在分化阶段 MB 略好于 MS,但在开始生根阶段,MS 则表现更好		高糖处理的生长势明显优于对照,其颜色淡黄、鲜艳、生长健壮	
绿色芽点发生率	45	38	66	30
抗性愈伤筛选率	75	73	80	50
成苗率(植株/ 筛选愈伤)	10	10	12.5	8

2.4 在 MS 与 MB 培养基上的不同表现

筛选 15 d 后将抗性愈伤继代于无 2,4- D 的分化培养基中,此时在 MS 与 MB 培养基上表现不同(表 3),即刚转入分化培养基时,MB 优于 MS,绿芽点发生率较多,分别为 45% 和 38%;20 d 后芽苗开始生根时又发生改变,MS 培养基上的再生苗生长势

更旺一些,也就是说幼苗在分化阶段 MB 是略好于 MS,但在开始生根阶段,MS 则表现更好。在总的愈伤筛选成活率与成苗率上,两者无大的区别,都分别在 70% 和 10% 以上。

2.5 小麦 7 个品种组培分化率、褐化率与成苗率的比较

表 4 7 个小麦品种组培分化率、褐化率与成苗率的比较

品 种	愈伤块数	分化芽数	分化率 (%)	褐化数	褐化率 (%)	苗数	成苗率(%)	
							苗数/ 愈伤块数	苗数/ 分化芽数
晋麦 45 号	507	78	15.4c	176	34.7a	50	9.9a	64.1a
89178	149	15	10.1d	35	23.5b	5	3.4c	33.3c
晋春 13 号	92	1	1.1e	30	32.6a	0	0e	0e
甘 94 鉴 64	124	4	3.2e	28	22.6b	2	1.6d	50.0b
扬 158	298	67	22.5b	46	15.4c	9	3.0c	13.4d
G54	266	104	39.1a	27	10.1c	17	6.4b	16.3d
冀 411	96	2	2.1e	24	25.0b	0	0e	0e

注:表中同一列间,有相同字母的处理为在 P= 0.05 的水平上差异不显著,无相同字母的处理为在 P= 0.05 的水平上差异显著

从表 4 中看出,对于分化率而言,G54 的分化率最高,依次为扬麦 158、晋麦 45 号、89178,最低的为晋春 13 号、甘 94 鉴 64 和冀 411。对于褐化率而言,晋麦 45 号与晋春 13 号相同,褐化率最高,89178 与甘 94 鉴 64 和冀 411 相同,褐化率次之,扬麦 158 与 G54 相同,是褐化最轻的品种。对于成苗率而言,无论是成苗/总愈伤还是成苗/分化芽,晋麦 45 号最高,其次是 G54,其成苗/总愈伤居第二,而扬麦 158 的成苗/分化芽居第二。

总起来讲,从表 4 中可以优选出 3 个品种,第一是 G54,其分化率最高褐化率又最低,成苗率第二,是组培的理想品种;其二是晋麦 45 号,该品种分化

率中等,褐化率很高,但其成苗率却最高,因此该品种关键在于前期愈伤分化的培养,一旦分化出芽则会达很高的成苗率;其三是扬麦 158,其分化率第二,但褐化率最低,成苗率居中,也是好的组培材料。

表 4 同时说明,小麦中不同的基因型在组培表现上有显著的差别,是基因型决定了他的表现呢?还是不同的基因型适合不同的培养基呢?可以说两种可能都有,寻找他们之间的优化组合是以后要进一步探讨的。

2.6 农杆菌转化小麦高效植株再生体系

取授粉 10~ 15 d 后,0.5~ 1.5 mm 大小的幼胚——在 25℃黑暗条件下生长 3~ 4 d ——用浓度为

10<sup>8</sup> cfu/mL 的菌液浸泡感染幼胚愈伤 8 min →在共培养基上共培养 3 d →在杀菌筛选培养基上, 筛选 10 d 左右 →在分化培养基上培养 30~ 60 d →在生根培养基上壮苗 30 d →于 2~ 4 ℃春化 30 d →移栽于花盆中。

2.7 愈伤转化筛选移栽

根据以上操作程序, 幼胚预培养 4 d 后经菌液感染, 再经筛选除去污染及褐化愈伤后, 得到平均 70% 的成活愈伤, 再把它们转到分化培养基生长(图 2), 分化率平均为 50%; 在移入生根培养基 20 d 后

根开始发生。如果能在继代时剪去部分叶片(不要伤到生长点)来壮苗的话, 根系会更加发达(图 3)。生根幼苗春化后移栽入花盆(图 4, 5)为转化后成苗。

2.8 分子检测结果

春化苗叶片经 SDS 碱裂解提取并纯化 DNA 后进行 PCR 扩增(图 6), 在 438 bp 处有明显的目的条带, 对此 PCR 产物进行Southern 杂交, 共有 23% 的样品呈阳性。图 7 为部分样品的杂交结果。最后获得 18 株分子检测呈阳性的植株。

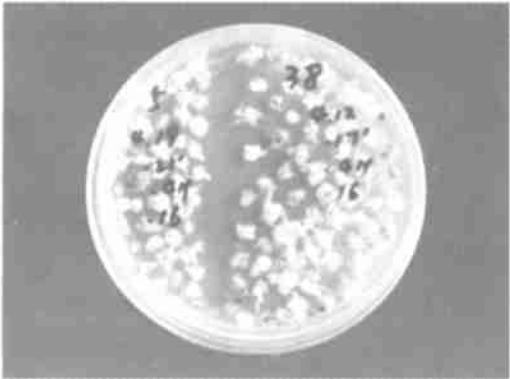


图 2 分化愈伤

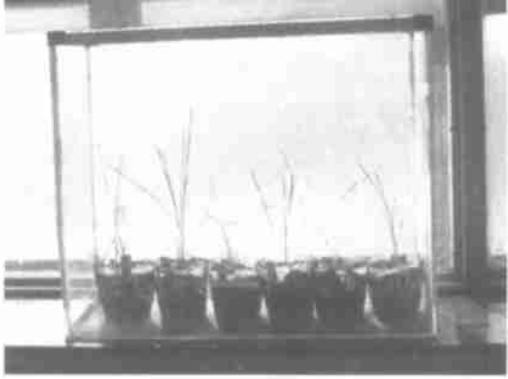


图 4 移栽后的幼苗

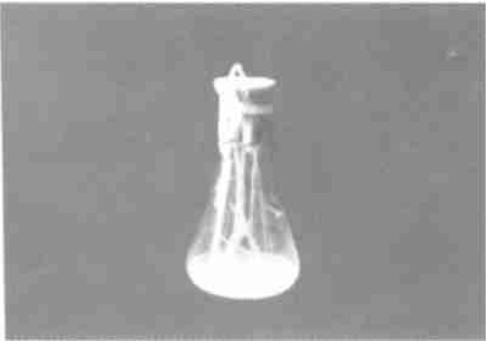


图 3 生根苗



图 5 移栽后的成苗

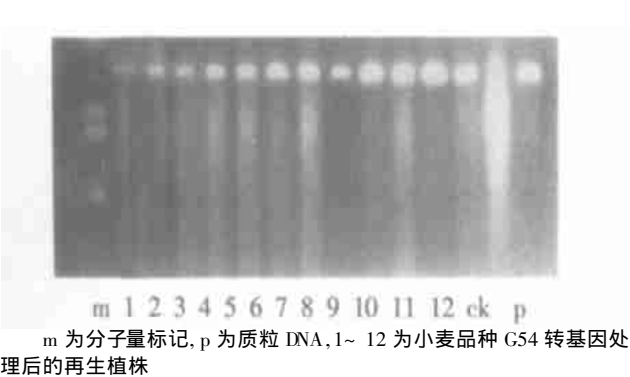


图 6 PCR 结果

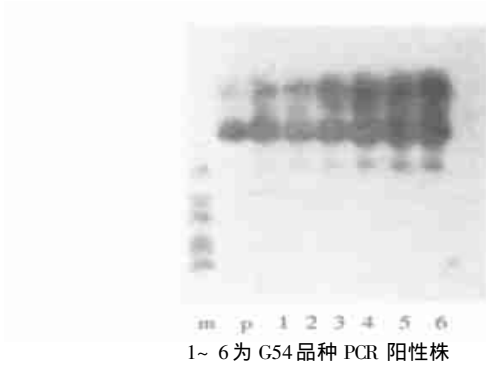


图 7 PCR-Southern

## 参考文献:

- [ 1 ] Binns A N. Agrobacterium-mediated gene delivery and the biology of host range limitations [ J ]. *Physiologia Plantarum*, 1990, 79: 135-139.
- [ 2 ] Potrykus I. Gene transfer to cereals: an assessment [ J ]. *Biotechnol*, 1990, 8: 535-542.
- [ 3 ] Cheng Ming, Joyce E F, Shengahi P, *et al*. Genetic transformation of wheat mediated by agrobacterium tumefaciens [ J ]. *Plant Physiol*, 1997, 115: 974-980.
- [ 4 ] Xia Guang-Min, Li Zhong-yi. Transgenic plant regeneration from wheat Mediated by Agrobacterium tumefaciens [ J ]. *Acta Phytophysiological Sinica*, 1999, 25( 1 ) : 22-28.
- [ 5 ] 刘庆法,唐克轩,叶建明,等. 农杆菌介导的小麦遗传条件的研究[ J ]. *复旦学报( 自然科学版 )*, 1998, 37( 4 ): 569-572.
- [ 6 ] 安海龙,卫志明,黄健秋. 小麦幼胚培养高效成株系统的建立[ J ]. *植物生理学报*, 2000, 26( 6 ) : 523-538.
- [ 7 ] 肖国兴,张爱民,聂秀玲,转基因小麦的研究进展与展望[ J ]. *农业生物技术学报*, 2000, 8( 2 ) : 114-116.
- [ 8 ] Wang Jing-xue, Sun Yi. Transgenic Maize plants obtained by Pollen-mediated transformation [ J ]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43( 3 ) : 275-279.
- [ 9 ] Fu R Z, Sun Y R, Jia S R. Technical Manual for Plant Genetic Transformation [ C ]. Beijing: China Science and Technology Press, 1994.
- [ 10 ] Mariatis T. Molecular Cloning [ C ]. New York: Gold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [ 11 ] 梁 辉,唐顺学,张 弛,等. 提高小麦基因枪转化率的研究[ J ]. *遗传学报*, 1999, 26( 6 ) : 643-648.
- [ 12 ] 黄 璐,卫志明. 农杆菌介导的玉米遗传转化[ J ]. *实验生物学报*, 1999, 32( 4 ) : 384-386.
- [ 13 ] Alf-Moerbe J, Neddermann P, Vonlontig J, *et al*. Temperature sensitive steps in Ti Plasmid Vir region induction and correction with cytokinin secretion by agrobacterium [ J ]. *Mol Gen Genet*, 1988, 213: 4-8.
- [ 14 ] Stachel S E, Zambryski P C. VirA and VirC control the plant induced activation of the T-DNA transfer process of agrobacterium tumefaciens [ J ]. *Cell*, 1986, 46: 325-333.
- [ 15 ] Turk S C H J, Melchers L S, Den Dulke-Ras H, *et al*. Environmental conditions differentially affect Vir gene induction in different agrobacterium strains. Role of the VirA sensor protein [ J ]. *Plant Mol Biol*, 1991, 16: 1051-1059.
- [ 16 ] 赵天永,黄 忠,王国英,等. 影响玉米基因枪转化效率的几个因素[ J ]. *农业生物技术学报*, 1997, 5( 1 ) : 35-39.