

# 农杆菌介导的小麦转化体系的优化

张月婷<sup>1,2</sup> 廖玉才<sup>1,2</sup> 黄涛<sup>1,3</sup> 刘正位<sup>1</sup> 高春生<sup>1</sup> 李和平<sup>1,3</sup>

1. 华中农业大学麦类作物分子生物技术实验室, 武汉 430070;

2. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070;

3. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

**摘要** 为建立农杆菌介导的高效小麦遗传转化体系, 分析比较了不同小麦栽培品种、不同培养处理条件下的愈伤诱导、分化及转化效率。结果表明: 2 个长江中下游主推小麦品种扬麦 158 和华麦 13 的幼胚愈伤诱导没有差异, 但扬麦 158 形成的胚性愈伤多、分化率及转化率高于华麦 13, 是优良的农杆菌介导的遗传转化受体基因型。预培养 20 d 的愈伤转化率最高, 高渗处理可进一步提高转化率。获得的 T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub> 代转基因植株, 经 PCR 分析鉴定, 表明外源基因已经整合到小麦基因组中。

**关键词** 小麦; 农杆菌; 幼胚; 除草剂; 转化体系

**中图分类号** S 512.103.53

**文献标识码** A

**文章编号** 1000-2421(2012)01-0023-05

根癌农杆菌介导的植物遗传转化, 是基于能实现 DNA 转移和整合的天然系统发展而来的技术, 具有可转移大片段 DNA、基因插入拷贝数低、发生转基因沉默相对较少、外源基因在后代不易丢失、操作简单、成本低等优点。这一方法已成为大多数植物遗传转化的首选方法, 在已获得的约 200 种转基因植物中, 约 80% 是由农杆菌介导完成的<sup>[1]</sup>。

小麦的农杆菌转化始于 Hess 等<sup>[2]</sup> 对小麦进行的转化试验。随后, Mooney 等<sup>[3]</sup> 也做了有益尝试, 但均未能获得转基因植株。直到 1997 年, Cheng 等<sup>[4]</sup> 将带有 *gus* 和 *npt II* 基因的 C58 农杆菌菌株转化春小麦幼胚、预培养的幼胚以及胚性愈伤组织, 才成功获得了转基因植株。

在中国, Xia 等<sup>[5]</sup> 获得了农杆菌介导的转 *npt II* 基因的小麦植株。随后, 王永勤等<sup>[6]</sup>、叶兴国等<sup>[7]</sup>、Uzé 等<sup>[8]</sup>、Amoah 等<sup>[9]</sup>、Khanna 等<sup>[10]</sup>、Przetakiewicz 等<sup>[11]</sup> 对影响小麦农杆菌转化效率的因素进行了研究。但在小麦转化中, 仍以基因枪为主, 农杆菌介导的小麦转化较少。本文对影响小麦农杆菌转化效率的几个重要因素进行了研究, 旨在进一步优化该转化体系。

*ACE-D2* 基因是将抗真菌蛋白基因与镰刀菌特

异抗体基因融合在一起, 经表达后的融合蛋白基因, 可以发挥抗真菌蛋白和抗体的双重功能, 能更加有效地抑制赤霉菌。Peschen 等<sup>[12]</sup> 将抗真菌-镰刀菌特异性单链抗体融合基因转化拟南芥, 证明融合基因比单独抗菌肽基因有更高的抗菌效果。Li 等<sup>[13]</sup> 将抗病基因 *AG*-镰刀菌特异性单链抗体融合基因转化小麦 Bobwhite, 得到的转基因植株对赤霉病的抗性与抗病品种苏麦 3 号相当。本研究将 *ACE-D2* 融合基因通过农杆菌介导法转入长江流域推广小麦品种, 对于培育抗病优良小麦新品种具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

小麦品种扬麦 158、华麦 13, 质粒 pTRAc-BAR-ACED2 和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101, 由笔者所在的实验室提供。质粒中的抗除草剂基因 *bar* 和 *ACE-D2* 融合基因, 均由 Ubiquitin 启动子驱动。

### 1.2 方 法

1) 培养基成分。诱导培养基含 MS 基本培养基<sup>[14]</sup> (无 MS 有机), B5 有机, 肌醇 100 mg/L, 脯氨

收稿日期: 2011-05-28

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20070504010)和转基因专项(2009ZX08002-001B)

张月婷, 硕士研究生。研究方向: 植物生物技术。E-mail: yueting@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 李和平, 教授。研究方向: 麦类作物分子生物学。E-mail: hepingli@mail.hzau.edu.cn

酸 200 mg/L, 水解酪蛋白 300 mg/L, 2, 4-D 2 mg/L, 麦芽糖 30 g/L, 琼脂 7 g/L; 浸染培养基、分化筛选培养基、生根筛选培养基及生根壮苗培养基参照文献[2-3]的方法。

2) 愈伤诱导。选取小麦开花后 12~15 d、体被白色绒毛的幼嫩颖果, 用 70% 乙醇表面消毒 30 s, 然后用无菌水冲洗 1 次, 随后用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  灭菌 5 min, 再用无菌水冲洗 3~5 次, 每次 2 min。用解剖针剥取直径为 0.5~1.0 mm 的小麦幼胚, 盾片向上放置在诱导培养基上, 25 °C、黑暗条件下诱导愈伤 10~20 d。

3) 农杆菌菌液的准备。将含转化质粒的农杆菌 GV3101 菌液按 1:50 的比例接种到 YEB 液体培养基, 于 28 °C、200 r/min 振荡, 待培养至  $D_{600\text{nm}} = 0.6\sim 0.8$  时, 离心(4 500 r/min, 10 min)收集菌体, 以浸染培养基重悬菌体至  $D_{600\text{nm}} = 0.6\sim 0.8$ , 用于小麦转化。

4) 农杆菌介导的转化及转基因材料筛选。以农杆菌菌液浸染愈伤组织, 其间用超声波处理 30 s, 浸染 30 min。取出浸染的愈伤组织在无菌滤纸上吸干表层菌液, 于 23 °C、黑暗下干燥共培养 3 d。再将愈伤转至恢复培养基中, 25 °C 条件下暗培养 2~3 周。在含 5 mg/L PPT 的分化筛选培养基中筛选 2 轮, 每轮 2 周; 将分化出的绿苗转移至含 4 mg/L PPT 的生根筛选培养基中筛选 2~3 轮, 每轮 2 周。再将抗性苗转至不含筛选压的生根壮苗培养基中, 培养 2~3 周。从分化阶段开始均在 25 °C、光照条件下培养。将长出健壮根的绿苗在 4 °C 条件下春化 2 周、室温下炼苗 5 d 后移栽至土壤中, 16 h/8 h (光/暗)、19 °C 条件下培养。

5) 植株再生及鉴定。当移栽至土壤中的小麦植株生长至 4~5 片叶时, 将 200 mg/L PPT 水溶液分别涂抹在对照和转化植株的最上面一片叶上, 1 周后观察结果。用 CTAB 法提取小麦叶片总 DNA<sup>[15]</sup>, 用于转化植株的 PCR 鉴定。用引物 P5 (5'-CATCTCTGTATATGCATCAG-3') 和 P6 (5'-CGGTAGTTCTACTTCTGTTC-3') 扩增启动子基因, 可扩增出 495 bp 的条带; 用引物 P9 (5'-ACTC-CATGGCACAGAACATATGCCCAAGGG-3') 和 P10 (5'-TCAATCACGTGCGGCCGCGTTAATC-CTGCCGATTGAATT-3') 扩增 ACE-D2 基因,

目的条带为 308 bp。PCR 程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 50 s, 58 °C 50 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min; 10 °C 10 min。

将幼胚接种到愈伤诱导培养基上, 暗培养 2 周后统计不同小麦基因型的愈伤诱导率和发芽率。愈伤组织经农杆菌浸染后进入分化阶段时, 经分化筛选 2 周后统计分化率。再生植株经 PCR 鉴定后统计转化率。

## 2 结果与分析

### 2.1 小麦转化植株的筛选

选取小麦开花后 12~15 d 的幼嫩颖果, 经灭菌后剥下直径为 0.5~1.0 mm、呈半透明状的小麦幼胚(图 1-A), 盾片向上接种在诱导培养基上。在诱导培养基上培养 14 d 后, 部分愈伤颜色淡黄色, 质地较密, 为胚性愈伤组织(图 1-B)。愈伤经农杆菌浸染 30 min 后, 于 23 °C、黑暗条件下干燥共培养 3 d, 再经恢复培养后转到分化筛选培养基。分化筛选 21 d 后, 大部分愈伤未分化, 只有再生能力强的愈伤分化出绿芽(图 1-C)。将再生的幼苗转到生根筛选培养基上, 筛选 2 轮后, 少部分幼苗抗性较强(图 1-D)。将抗性幼苗转至无筛选压的壮苗培养基中, 培养 21 d 后生根良好(图 1-E)。壮苗培养后的植株经春化后移栽到温室, 成活的植株能正常抽穗(图 1-F)。

### 2.2 小麦基因型对转化效率的影响

不同小麦基因型的愈伤形成和分化能力存在差异, 同时, 对农杆菌浸染的敏感性也不同, 从而导致转化效率的差异。本研究对长江流域推广的小麦栽培品种扬麦 158、华麦 13 在愈伤诱导率、分化率及转化效率等方面进行了比较。如表 1 所述, 2 个小麦基因型的幼胚愈伤诱导率都在 90% 以上, 没有显著差异。但扬麦 158 诱导的愈伤生长较为整齐, 且大多数为淡黄色致密状的胚性愈伤, 而华麦 13 多为白色或灰白色愈伤, 水渍状。同时, 华麦 13 比扬麦 158 更易在愈伤诱导阶段就萌发出芽, 不利于愈伤的生长。在分化率和转化率上, 扬麦 158 优于华麦 13。因此, 扬麦 158 比华麦 13 更适宜作为遗传转化的受体基因型, 随后的优化条件分析均以扬麦 158 为材料。

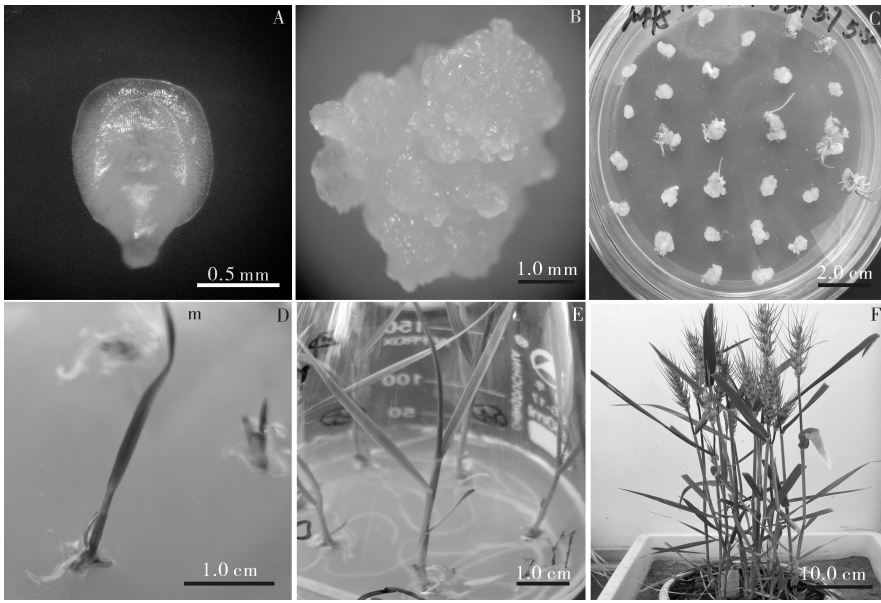


图 1 扬麦 158 愈伤诱导(A、B)、农杆菌转化(C)及植株再生(D~F)

Fig.1 Callus induction (A、B) of Yangmai 158, *Agrobacterium*-mediated transformation (C) and plant regeneration (D~F)

表 1 不同小麦基因型的愈伤诱导率、分化率及转化率比较

Table 1 Comparison of callus induction, regeneration and transformation efficiency of different wheat genotypes

小麦基因型 Wheat genotype	愈伤诱导率 Callus induction efficiency	发芽率 Germination efficiency	分化率 Regeneration efficiency	转化率 Transformation efficiency
扬麦 158 Yangmai 158	99.73	15.49	30.94	2.33
华麦 13 Huamai 13	95.78	27.99	11.49	0.44

2.3 愈伤预培养时间对转化效率的影响

比较扬麦 158 预培养 3、10、20 及 30 d 的愈伤转化率,结果表明(表 2),预培养 20 d 的愈伤组织用于转化的效率(2.48%)最高,预培养 10 d 的转化率(1.95%)紧随其后。而预培养 30 d 的愈伤,由于在

转化时体积较大,转到分化筛选培养基后大量非转化细胞由于交叉保护而使非转化子继续分化,从而导致大量假阳性苗的逃逸,增加了工作量,所以在 122 株再生苗中仅 5 株为 PCR 阳性;预培养 3 d 的材料,转化率最低。

表 2 扬麦 158 不同预培养时间愈伤转化率的比较

Table 2 Comparison of transformation efficiency of Yangmai 158 calli precultured for different days

愈伤预培养天数/d Callus preculture days	转化愈伤数 No. of transformed calli	再生苗数 No. of regenerated plants	PCR 阳性苗数 No. of positive PCR plants	转化率/% Transformation efficiency
3	606	31	5	0.83
10	359	44	7	1.95
20	483	48	12	2.48
30	320	122	5	1.56

2.4 高渗处理对转化的影响

进一步选择扬麦 158 品种、预培养 20 d 的愈伤组织为外植体,在农杆菌浸染前将部分愈伤置于含 0.4 mol/L 甘露醇的 MS 培养基上高渗处理 6 h。结果如图 2 所示,高渗处理的转化率高于未进行高渗处理的愈伤,说明在小麦农杆菌介导的遗传转化中,高渗处理能提高转化效率。

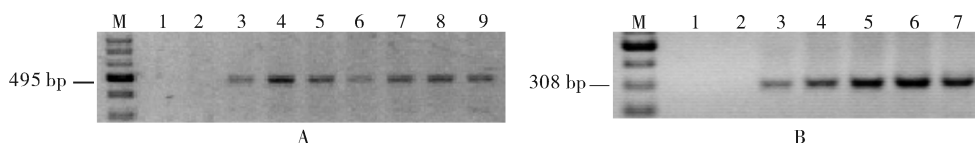
2.5 PPT 抗性检测及 PCR 鉴定

以未转化的植株作为对照,对种植于温室的 T<sub>0</sub> 代再生植株和 T<sub>1</sub> 代转基因植株的叶片涂抹 200 mg/L PPT 进行抗性检测。转基因小麦植株表现出较强的除草剂抗性。

提取小麦再生植株的基因组 DNA,首先以启动子引物 P5 和 P6(图 2-A)进行扩增,筛选阳性转基

因植株,然后再用 *ACE-D2* 基因特异引物进一步验证。结果表明,*ACE-D2* 基因也已整合到了小麦的

基因组中(图 2-B)。对部分 PCR 阳性植株进行 Southern 杂交分析,证实目的基因已整合。



A:启动子 P5 和 P6 引物 PCR 扩增的产物 PCR products amplified with promoter primers P5/P6; B:ACE-D2P9 和 P10 引物 PCR 扩增的产物 PCR products amplified with ACE-D2 primers P9/P10; 1:没有模板 DNA 的对照 Control without DNA template; 2:未转化植株 DNA 为模板的对照 Control with DNA from nontransgenic plants as template; A-3~9:不同转基因植株 Different transgenic plants; B-3~7:不同转基因植株 Different transgenic plants; M:分子量标记 Marker.

图 2 扬麦 158 T<sub>0</sub>代转基因植株的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of Yangmai 158 transgenic plants of T<sub>0</sub> generation

### 3 讨论

基因型依赖性限制小麦遗传转化的关键因素之一。不同的小麦基因型具有不同的愈伤形成能力及分化再生能力,直接影响转化效率。Xia 等<sup>[5]</sup>对 7 种小麦基因型进行了转化,仅 B137、99P、Jinan177 得到了转基因植株。目前,在小麦农杆菌介导的遗传转化中,多为模式品种和少数组培特性较好的品种,而这些品种大多农艺性状较差,难以在生产中大面积推广。而本研究的品种为长江流域推广的栽培品种,具有产量高、品质优等特点,对其进行转基因研究更具有实际应用意义。本研究发现扬麦 158 胚性愈伤组织的诱导能力和分化能力较好,转化效率也较高,是优良的转化受体基因型。

外植体的生理状态对农杆菌浸染起着至关重要的作用,而外植体的生理状态除了与外植体的类型有关外,还与外植体的预培养时间紧密相关。本研究结果表明,扬麦 158 预培养 10 d 以上的幼胚愈伤组织转化率高于预培养 3 d 的幼胚愈伤,这与 Uzé 等<sup>[8]</sup>的结果一致,且愈伤预培养 20 d 时得到的转化效率最高;本研究预培养 50 d 以上的愈伤未得到 PCR 阳性植株,这与 Xia 等<sup>[5]</sup>的报道不同,可能与所选用的小麦基因型不同有关。

在小麦遗传转化中,对高渗处理的作用看法不一,这可能与使用的基因型和高渗处理的条件不同有关。Uzé 等<sup>[8]</sup>用 20% 的麦芽糖对小麦愈伤组织进行 4~6 h 高渗预处理后并没有提高 *Gus* 基因瞬时表达频率;王永勤等<sup>[6]</sup>在农杆菌浸染前用 0.4 mol/L 的甘露醇对部分幼胚及其愈伤组织进行高渗预处理 12 h,能较显著地提高抗性愈伤的频率;梁雪莲等<sup>[16]</sup>发现 8% 蔗糖、3% 葡萄糖处理后的愈

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。本研究在农杆菌浸染前将愈伤组织在含 0.4 mol/L 甘露醇的培养基上预处理 6 h,使转化效率提高了 0.44%。因此,高渗处理能促进农杆菌的转化,但对于使用何种渗透剂以及处理多长时间最为有效,还有待进一步的研究。上述研究结果为进一步开展以小麦幼胚愈伤组织为外植体的农杆菌介导的遗传转化提供了资料。

### 参 考 文 献

- [1] 李卫,郭光沁,郑国锟. 根癌农杆菌介导遗传转化研究的若干新进展 [J]. 科学通报, 2000, 45(8): 798-807.
- [2] HESS D, DRESSLER K, NIMMRICHTER R, et al. Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium tumefaciens* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Sci, 1990, 72: 233-244.
- [3] MOONEY P A, GOODWIN P B, DENNIS E S, et al. *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer into wheat tissues [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1991, 25: 209-218.
- [4] CHENG M, FRY J E, PANG S, et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Physiol, 1997, 115: 971-980.
- [5] XIA G M, LI Z Y, HE C X, et al. Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Acta Phytophysiol Sin, 1999, 25(1): 22-28.
- [6] 王永勤,肖兴国,张爱民. 农杆菌介导的小麦遗传转化几个影响因素的研究 [J]. 遗传学报, 2002, 29(3): 260-265.
- [7] 叶兴国,徐惠君,杜丽璞. 小麦农杆菌介导转基因植株的稳定获得和检测 [J]. 中国农业科学, 2001, 4(5): 465-468.
- [8] UZE M, POTRYKUS I, SAUTTER C. Factors influencing T-DNA transfer from *Agrobacterium* to precultured immature wheat embryos (*Triticum aestivum* L.) [J]. Cereal Res Com,



- 2000,28(1/2):17-23.
- [9] AMOAH B K, WU H, SPARKS C, et al. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue [J]. *J Exp Bot*, 2001, 52(358):1135-1142.
- [10] 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*, 2003, 21:429-436.
- [11] PRZETAKIEWICZ A, KARAS A, ORCZYK W, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of polyploid cereals. The efficiency of selection and transgene expression in wheat [J]. *Cell Mol Bio Lett*, 2004, 9:903-917.
- [12] PESCHEN D, LI H P, FISCHER R, KREUZALER F, LIAO Y C. Fusion proteins comprising a *Fusarium*-specific antibody linked to antifungal peptides protects plants against a fungal pathogen [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22:732-738.
- [13] LI H P, ZHANG J B, SHI R P, et al. Engineering *Fusarium* head blight resistance in wheat by expression of a fusion protein containing a *Fusarium*-specific antibody and an antifungal peptide [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2008, 21(9):1242-1248.
- [14] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. *Plant Physiology*, 1962, 15:473-497.
- [15] DELLAPORTA S L, WOOD J, HICHS J B. A plant DNA mini-preparation [J]. *Version II Plant Mol Biol Rep*, 1983, 1:19-21.
- [16] 梁雪莲, 孙毅, 郭平毅, 等. 农杆菌介导转化小麦幼胚获得抗除草剂再生植株 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2003, 29(6):501-506.

## Optimization of genetic transformation of wheat cultivars mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

ZHANG Yue-ting<sup>1,2</sup> LIAO Yu-cai<sup>1,2</sup> HUANG Tao<sup>1,3</sup>  
LIU Zheng-wei<sup>1</sup> GAO Chun-sheng<sup>1</sup> LI He-ping<sup>1,3</sup>

1. *Molecular Biotechnology Laboratory of Triticeae Crops, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*
2. *College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*
3. *College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** To develop an efficient transformation system for wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, comparative analyses of callus induction, regeneration and transformation efficiency were carried out by using different elite wheat cultivars and different culture and induction conditions. The results indicated that two wheat elite cultivars, Yangmai 158 and Huamai13, showed no difference in callus induction, but Yangmai 158 formed more embryogenic calli and had a higher efficiency of regeneration and transformation. Yangmai 158 is a good wheat genotype used for *Agrobacterium*-mediated transformation. Furthermore, different pre-culture duration times were compared and the results showed that 20 days for the pre-culture gave rise to the highest transformation efficiency. With the method established in this study, transgenic T<sub>0</sub> and T<sub>1</sub> wheat lines were generated and identified by PCR analysis. These results provide useful information for *Agrobacterium*-mediated transformation of elite wheat cultivars.

**Key words** wheat; *Agrobacterium tumefaciens*; immature embryo; herbicide; transformation system