

农杆菌介导小麦遗传转化的影响因素

赵慧茹, 谷运红, 焦 滇[†], 秦广雍 (郑州大学离子束生物工程重点实验室, 河南郑州 450052)

摘要 [目的]对农杆菌菌株、小麦品种、培养基状态及报告基因选择等进行优化筛选,为进一步完善农杆菌介导小麦遗传转化方法提供参考。[方法]用携带质粒 pCAMBIA1304 的农杆菌菌株 LBA4404、EHA105,对温麦 19、郑离 03 和郑离 06 小麦的幼胚愈伤组织进行遗传转化,从农杆菌菌株、小麦品种、共培养基状态及报告基因选择等方面进行探讨。[结果]农杆菌菌株 EHA105 转化效率较高,最高达到 22.58%;姊妹系郑离 03 与郑离 06 的转化率差别极大,郑离 06 转化率最高而郑离 03 最低;农杆菌与愈伤组织共培养时,使用 MS 半固体培养基的转化率高于 MS 固体培养基;GFP 和 GUS 都可以用作判断转化率的报告基因,GFP 优势更明显。[结论]高毒性农杆菌菌株 EHA105 转化效率明显高于菌株 LBA4404;小麦基因型是影响转化效率的重要因素之一;农杆菌与愈伤组织共培养时使用半固体培养基可提高转化率;通过 GFP 瞬时表达,可有效进行小麦转化效率的研究。

关键词 农杆菌;小麦;愈伤;影响因素

中图分类号 S512.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)23-09885-03

Influencing Factors of *Agrobacterium tumefaciens* Transforming into Wheat Callus

ZHAO Hui-ru et al (Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052)

Abstract [Objective] The types of *Agrobacterium tumefaciens*, the varieties of wheat, the state of co-cultivating media and reporting gene were optimized in order to supplement the way of genetic transformation through *Agrobacterium tumefaciens* transforming into wheat. [Method] The callus of three wheat varieties Wenmai19, Zhengli03 and Zhengli06 was transformed using the *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and EHA105 with the plasmid pCAMBIA1304. The types of *Agrobacterium tumefaciens*, the varieties of wheat, the state of co-cultivating media and the effect of reporting gene were studied. [Result] The highest transformation ratio of EHA105 was 22.58%. The sister varieties of Zhengli03 and Zhengli06 had great differences in the genetic transform efficiency. The efficiency of Zhengli06 was the highest while that of Zhengli03 was the lowest. The transformation efficiency of MS half solid-state co-cultivating media was higher than MS solid-state co-cultivating media. GFP and GUS had the same result as the reporting gene and GFP had more superiority. [Conclusion] The transformation efficiency of EHA105 with powerful virulence was higher than LBA4404. The gene types of wheat had great influence on the transformation ratio. The half solid-state co-cultivating media could improve the efficiency. The genetic transformation efficiency could be deduced effectively by GFP reporter.

Key words *Agrobacterium tumefaciens*; Wheat; Callus; Influencing factor

小麦是世界上最重要的农作物之一,在人类生活中占相当重要的地位。由于小麦基因组庞大,转基因小麦研究于 20 世纪 90 年代才开始起步^[1-5]。目前使用较多的小麦转基因方法有基因枪法、花粉管通道法和农杆菌法。虽然有报道称 90% 以上成功转化的转基因小麦是采用基因枪法得到的^[6],但是基因枪法成本高,转化率低,且多拷贝插入易造成表达失活。农杆菌法的优点在于费用低廉;外源目的基因大小几乎不受限制,可达到 50 kb;尤其重要的是,转化后代中 35% 的目的基因是以单拷贝形式整合到小麦基因组的,符合孟德尔遗传定律,表达需要的目标性状^[7]。但是,由于小麦不是农杆菌的天然宿主,农杆菌中的质粒 DNA 附着和进入小麦组织细胞有一定难度,同时比较容易转化的小麦外植体是幼胚愈伤组织,而生长状态良好的幼胚愈伤组织较难得到,因此该法的使用和发展受到限制。目前采用农杆菌法获得的转基因小麦只限于由组织培养得到来源于特定农杆菌菌株和特定基因型小麦外植体组合的品种。笔者拟通过对农杆菌菌株、小麦品种、培养基状态及报告基因选择等进行优化筛选,以期为进一步完善农杆菌介导小麦遗传转化方法提供参考,也为农杆菌介导法的推广应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株。含有抗旱调控序列 DREB/RD29A 的质粒 pCAMBIA1304 由实验室构建并保存^[8]。根癌农杆菌菌株

株 LBA4404 由河南农业科学研究院陈占宽老师惠赠;菌株 EHA105 由山东大学夏光敏老师惠赠。所用载体携带硫酸链霉素抗性基因、利福霉素抗性基因及卡那霉素抗性基因等选择性标记基因,并含有 GUS 和 GFP 2 种报告基因。

1.1.2 受体材料与愈伤培养。供试小麦品种为温麦 19、郑离 03 和郑离 06(后 2 个品系是由实验室选育得到的姊妹系)。于盛花期 12 d 选取种子,浓度 70% 乙醇浸泡 2 min 进行表面消毒后,用灭菌的镊子将幼胚取出,盾片朝上接种于诱导愈伤培养基(MS 基本培养基 + 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L NAA),15 d 后继代培养(MS 基本培养基 + 1 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L KT + 0.2 mg/L 6-BA)。

1.2 方法

1.2.1 质粒导入农杆菌。将质粒 pCAMBIA1304 (DREB/RD29A)用 CaCl₂ 法分别导入农杆菌 LBA4404 和 EHA105,用含有硫酸链霉素 100 mg/L、利福霉素 50 mg/L、卡那霉素 50 mg/L 的培养基筛选出转化成功的单菌落,然后在含有上述抗生素的 YEB 液体培养基(5 g/L 牛肉浸膏 + 1 g/L 酵母膏 + 5 g/L 蛋白胨 + 5 g/L 蔗糖 + 0.3 g/L MgSO₄·7H₂O, pH 值 7.2)中 28 °C、250 r/min 条件下过夜培养。

1.2.2 农杆菌转化小麦幼胚愈伤组织。农杆菌过夜培养,当 OD₆₀₀ 达 1.0 时吸取菌液,与继代 4~5 d 的小麦幼胚愈伤组织共培养^[9]。共培养的培养基分为 MS 固体培养基(含有 2.5% 琼脂)和 MS 半固体培养基(含有 0.25% 琼脂),25 °C 条件下暗培养 2~3 d。以未导入质粒的农杆菌菌株作为对照。

1.2.3 GUS 的组织化学染色。用灭菌水清洗共培养 2~3 d 的愈伤组织后,将愈伤组织转移到 GUS 染色液中,37 °C 保温过夜。GUS 染色液配方及检测参照王关林等方法^[10]。

基金项目 国家自然科学基金项目(10505018)。

作者简介 赵慧茹(1979-),女,河南郑州人,博士研究生,研究方向:离子束与生物相互作用。[†]通讯作者。

收稿日期 2008-05-30

1.2.4 GFP 的荧光检测。用干净的刀片从共培养后的小麦愈伤组织上切取厚度为 1 mm 左右的小的愈伤块,放在干净的载玻片上,滴少量 MS 液体培养基,在激光共聚焦显微镜下观察,所用激光共聚焦显微镜为德国产 Leica SP2。所用激发光波长为 488 nm,检测光波长为 505 ~ 530 nm。

2 结果与分析

2.1 不同菌株对小麦愈伤转化率的影响 从图 1 可以看出,含有相同质粒的农杆菌菌株 LBA4404 和 EHA105 同时侵染温麦 19、郑离 03 和郑离 06 的愈伤组织,瞬时表达率差别很大。LBA4404 的转化率达 0 ~ 3.64%, EHA105 达 0 ~ 18.18%。显然,高毒性农杆菌菌株 EHA105 的转化率比 LBA4404 要高得多。此外, EHA105 对不同品种小麦的转化率差别也很大。供试郑离 03 与郑离 06 虽然是姊妹系,但是 EHA105 对郑离 03 的转化率最低,对郑离 06 转化率最高。由此可见,农杆菌侵染小麦愈伤的效率与小麦基因型密切相关。

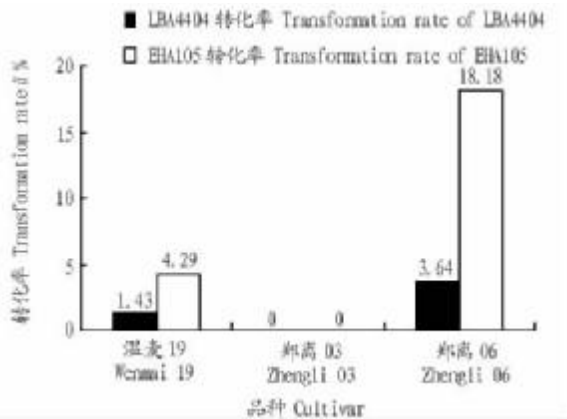


图 1 菌株 LBA4404 与 EHA105 对小麦愈伤转化率的影响
Fig. 1 Effects of LBA4404 and EHA105 on the transformation rate of wheat callus

2.2 MS 固体培养基与 MS 半固体培养基对小麦愈伤转化率的影响 小麦幼胚愈伤组织在 MS 培养基上能保持良好的生长状态,而细菌的生长在液体培养状态较为迅速。因此,该试验尝试用 MS 固体、MS 半固体培养基作为 EHA105/pCAMBIA1304 侵染小麦愈伤的共培养培养基。共培养后的愈伤组织在 GUS 染色液中 37 °C 保温过夜,以每个愈伤组织块为单位计数。由图 2 可知,无论培养基状态如何, EHA105/pCAMBIA1304 对郑离 03 愈伤的转化率为 0;对温麦 19 与郑离 06 愈伤进行转化时,MS 半固体培养基转化率要高于 MS 固体培养基,尤其是郑离 06,半固体培养基时 GUS 瞬时表达率达 22.58%。

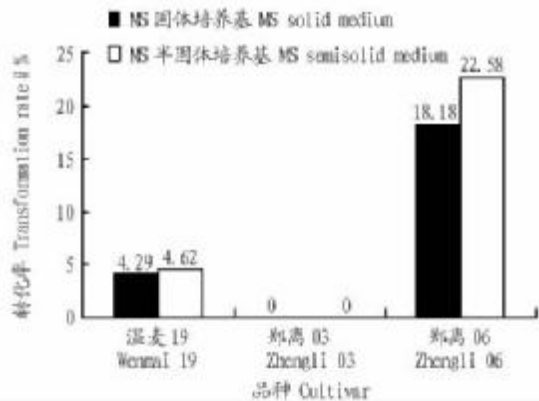


图 2 MS 固体培养基与 MS 半固体培养基对小麦愈伤转化率的影响
Fig. 2 Effects of MS solid and semisolid mediums on the transformation rate of wheat callus

2.3 GUS 与 GFP 报告基因效果的比较

2.3.1 未转化小麦愈伤中 GUS 与 GFP 效果。未导入质粒的农杆菌菌株与小麦愈伤共培养 2 ~ 3 d 后,进行 GUS 组织化学染色,愈伤组织没有显示蓝色(图 3A)。在每块愈伤组织 10 个部位切下薄片,在激光共聚焦显微镜下观察,同样没



注:A. 未转化小麦愈伤 GUS 染色图片(20 × 1);B. 未转化小麦愈伤 GFP 荧光图片。
Note: A. GUS dyeing photo of untransformed wheat callus(20 × 1);B. GFP fluorescence photo of untransformed wheat callus.

图 3 未转化小麦愈伤中 GUS 与 GFP 效果

Fig. 3 GUS and GFP effect of untransformed wheat callus

有显示出 GFP 的绿色荧光(图 3B)。

2.3.2 转化小麦愈伤中 GUS 与 GFP 效果。将导入质粒的农杆菌菌株与小麦愈伤共培养 2 ~ 3 d 后,进行 GUS 组织化学染色,肉眼和解剖镜下观察,转化成功的愈伤组织显示蓝色(图 4A、B)。在每块愈伤组织显蓝色的部位切下薄片,在

激光共聚焦显微镜下观察,出现清晰的 GFP 绿色荧光(图 4C、D)。

3 讨论

农杆菌介导的小麦遗传转化是最具潜力的一种转基因方法。多年来人们一直致力于影响转化率各个方面的研究,

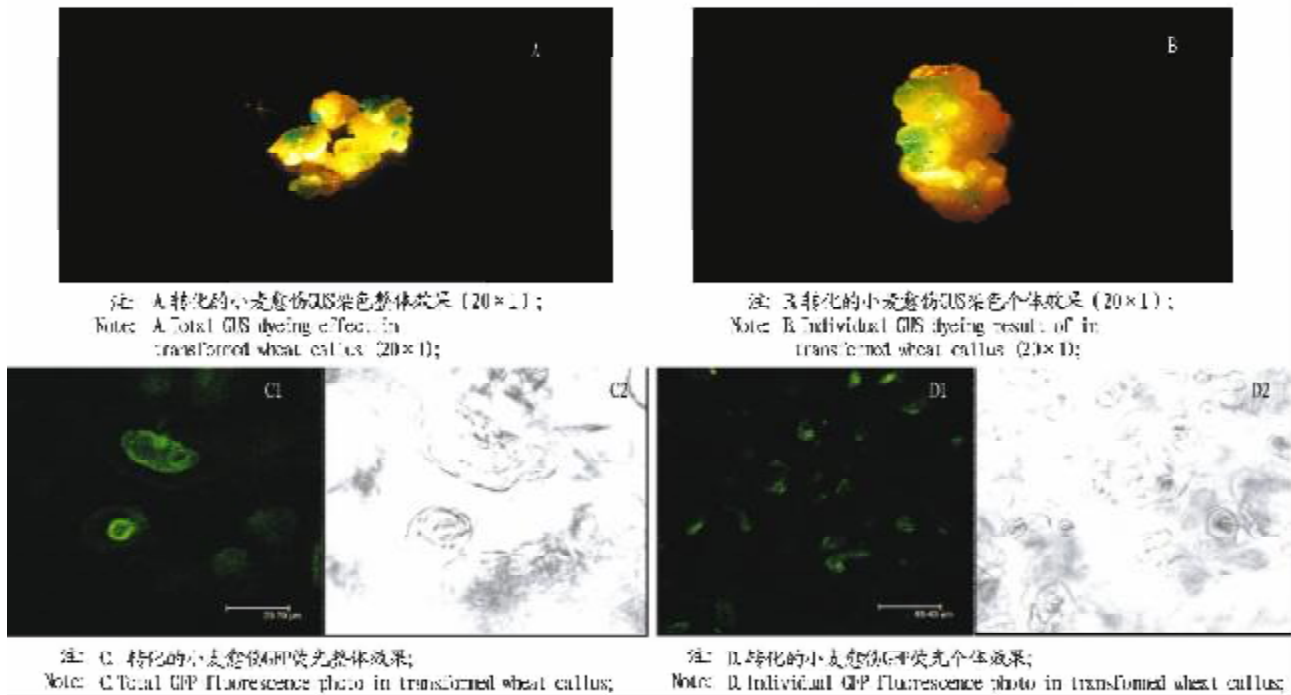


图4 转化小麦愈伤中 GUS 与 GFP 效果

Fig. 4 GUS and GFP effects of transformed wheat callus

包括小麦基因型、外植体源、预培养时间、侵染和共培养时间、乙酰丁香酮、农杆菌菌株、载体以及筛选剂等。外植体类型以及生理状态被证明是影响转化最重要的因素之一,具有活力的小麦胚性愈伤组织有利于农杆菌的介导转化^[11]。为了保证愈伤生长良好,该试验所用幼胚用浓度 75% 乙醇浸泡 2 min 进行表面消毒后直接转入诱导愈伤的培养基中,没有进一步进行常规的 NaClO₃ 或 HgCl₂ 消毒,避免了这 2 种强氧化剂对幼胚细胞的伤害。在解剖镜下观察,继代培养 4~5 d 愈伤组织呈淡黄色,颗粒状明显,共聚焦显微镜下愈伤组织细胞饱满,呈圆形,核大而圆。以上特征完全符合胚性愈伤组织的定义,非常适合作转化的外植体。

该试验用 2 种农杆菌菌株 EHA105 和 LBA4404 分别介导小麦遗传转化,转化效率差别明显。LBA4404 的转化率几乎为 0,而 EHA105 转化率达 0~22.58%。显然,高毒性的菌株 EHA105 对小麦具有更强的侵染力。这与王宏芝等的报道结果一致^[12]。

GUS 是一种最常用的报告基因,但是 GUS 染色的底物价格高昂,染液对愈伤组织有破坏作用。相比之下,GFP 作为报告基因避免了 GUS 的缺陷,有进一步发展的空间。目前,GFP 作为报告基因来优化农杆菌介导的转基因体系的研究越来越多,在水稻^[13]和辣椒^[14]上都有相关报道。该文用 GUS 和 GFP 相结合的方式,在组织表面多部位取材进行绿色荧光检测,可以清晰观察到细胞状态,从而快速判断出有效的转化体系及敏感的菌株、基因型。该试验证实,通过 GFP 瞬时表达,可进行小麦转化效率的研究。

鉴于细菌在液体培养时生长更迅速,该试验尝试用半固体培养基(琼脂含量是固体培养基的 1/10)作为农杆菌转化小麦愈伤的共培养培养基。试验结果显示,半固体培养基比固体培养基的转化率高,农杆菌在半固体培养基中可能更容

易附着在愈伤组织的细胞膜上。该方法是一种新的尝试。培养基各成分的比例还需进一步优化选择。

参考文献

- [1] VASIL V, CASTILLO A M, FROMM M E, et al. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryonic callus[J]. Bio-Technology, 1992, 10: 667-674
- [2] VASIL V, SRIVASTAVA V, CASTILLO A M, et al. Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos[J]. Bio-Technology, 1993, 11: 1553-1558.
- [3] WEEKS J T, ANDERSON O D, BLECHL A E. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Plant Physiology, 1993, 102: 1077-1084.
- [4] NEHRA N S, CHIBBAR R N, LEUNG N, et al. Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs[J]. Plant Journal, 1994, 5: 285-297.
- [5] BECKER D, BRETTSCHEIDER R, LORZ H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue [J]. Plant Journal, 1994, 5: 299-307
- [6] 叶兴国, SHIRLEY SATO, 徐惠君, 等. 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, 34(5): 469-474.
- [7] 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.
- [8] 押辉远, 秦广雍, 霍裕平. Prd29A 及 DREB1A 的克隆和干旱诱导型植物表达载体的构建与鉴定[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(3): 371-375.
- [9] 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 Phytobiologica Sinica, 1999, 25(1): 22-28.
- [10] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 585-586, 598.
- [11] 于惠敏, 夏光敏, 侯丙凯. 提高农杆菌介导小麦遗传转化效率的几个因素[J]. 山东大学学报: 理学版, 2005, 40(6): 120-124.
- [12] 王宏芝, 魏建华, 李瑞芬. 农杆菌介导的小麦生殖器官的整体转化[J]. 中国农业科技导报, 2004, 6(3): 22-26.
- [13] 王泽宙, 邱全胜. 绿色荧光蛋白基因 *rag0.4* 在水稻愈伤组织中的瞬时表达[J]. 北京师范大学学报, 2000(36): 385-388.
- [14] 杨国顺, 谢丙炎, 杨宇红, 等. 应用绿色荧光蛋白报告基因优化辣椒的遗传转化体系[J]. 园艺学报, 2004, 31(6): 737-742.