

农杆菌介导小麦遗传转化影响因素的研究

贺杰, 胡海燕, 周岩, 赵俊杰, 魏琦超

(河南科技学院, 河南新乡 453003)

摘要: 选用河南科技学院近年来选育的小麦品种百农160的成熟胚愈伤组织和农杆菌菌株LBA4404, 对农杆菌介导遗传转化中农杆菌浓度、感染时间、乙酰苯酮浓度、头孢霉素质量浓度等几个重要影响因素进行了研究, 建立小麦高效转化体系。结果表明, 菌液 $OD_{600}=0.6$, 感染时间30 min时对愈伤组织的生存和转化最有利; 浓度为 $200\mu\text{mol/L}$ 的乙酰苯酮可显著提高抗性愈伤再生率; 随着头孢霉素浓度的升高, 愈伤组织出现褐化, 生长缓慢, 再生率低, 所以在有效抑制农杆菌的浓度范围内, 尽量采取较低的质量浓度。在后期的抑菌分化筛选中, 在继代培养基中添加头孢霉素的质量浓度为 500mg/L , 继代扩增筛选培养2个月, 每10~15 d换一次培养基; 而在分化培养基中添加 200mg/L 头孢霉素, 即可获得再生率高的抗性愈伤。最适条件下转化频率达2.36%。

关键词: 小麦; 农杆菌转化; 感染时间; 头孢霉素

中图分类号: S512.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)02-0041-04

Factors Affecting Wheat Transformation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

HE Jie, HU Hai-yan, ZHOU Yan, ZHAO Jun-jie, WEI Qi-chao

(Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: To establish highly efficient wheat transformation system, factors which influenced wheat transformation including agrobacterium concentration, infection period, and concentration of acetosyringone and cephalosporin were studied with the mature embryo callus of wheat variety Bainong 160 and agrobacterium strain LBA4404. The results showed that the transformation efficiency was clearly improved with agrobacterium density of $OD_{600}=0.6$ and incubation for 30 min. Acetosyringone with the concentration of $200\mu\text{mol/L}$ could significantly enhance the rate of resistant calluses. Considering the inhibition of cephalosporin on agrobacterium cells, it was suggested that 500mg/L of cephalosporin should be used in the latter stage of antibacterial screening, and then 200mg/L of cephalosporin should be used in differentiation medium to get resistant calluses of high regeneration efficiency. The transgenic frequency was 2.36% under the optimal conditions.

Key words: Wheat; Transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*; Infection period; Cephalosporin

小麦作为世界上最重要的粮食作物之一, 有着最广阔的种植面积和最高的总产量。但由于病虫害等一些不利因素的影响, 常造成产量的大幅度下降

和品质降低^[1-2]。因此, 提高小麦的抗性并对其进行品质改良历来是小麦育种工作的主要目标。常规育种主要依靠有性杂交和诱变等方法来增加品种的变

收稿日期: 2010-07-12

基金项目: 河南科技学院重点科研项目(5050); 河南省科技厅科技攻关项目(2007210008)

作者简介: 贺杰(1978-), 女, 河南周口人, 硕士, 主要从事植物分子生物学方面的研究。E-mail: hejie190@126.com

异类型,从中选育出优良的品种。但由于自然界中普通小麦种质资源欠缺,原有种内一些抗源特性丧失,并且远缘杂交不亲和,劳动强度大等原因,限制了常规育种发展。近年来,随着 DNA 重组以及细胞组织培养等技术的飞速发展,利用基因转移的遗传操作技术,打破种属限制,将远缘种中某些特定的外源基因导入小麦细胞进行品种改良,大大缩短了育种进程^[3]。1992 年第 1 株转基因小麦的报道,是小麦转基因研究的里程碑^[4]。1997 年,Cheng 利用该方法获得小麦转基因植株^[5]。随后,国内外研究小麦转基因技术取得很大的进展。王永勤等对影响小麦农杆菌转化的因素作了系统研究,为该方法的应用奠定了基础^[6]。Xia 等也报道了利用农杆菌介导法获得转基因小麦植株^[7]。另外,Khanna 等^[8]、王翠亭等^[9]也相继报道了农杆菌介导的小麦遗传转化,这些研究结果为建立小麦的农杆菌介导转化系统提供了宝贵经验,做出了积极贡献。但是农杆菌介导小麦遗传转化的一个主要问题是转化效率低,已报道的最高转化频率只有百分之几,远远不能满足依靠遗传转化方法改良小麦的实际要求;另外,在具体的转化方法和影响因素方面各研究所得结果也不尽一致^[10-11]。这都反映出农杆菌介导小麦遗传转化仍处于体系建立的初级阶段。因此,有必要对该系统进行深入地研究。本研究以小麦成熟胚愈伤组织为材料,探讨了影响农杆菌转化小麦的几个因素,以期建立起较为稳定和高效的农杆菌介导的小麦遗传转化体系。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为普通小麦品种百农 160,由河南科技学院茹振钢教授提供。选用的农杆菌菌株为 LBA4404,植物表达载体为 pBIN,由中国热带农业科学院橡胶研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 培养基 LB 培养基:蛋白胨(1%) + 酵母膏(0.5%) + 氯化钠(1%),pH 7.0;愈伤组织诱导培养基:MS+2,4-D(4mg/L) + 蔗糖(30mg/L) + 琼脂(0.8%),pH 5.8;继代筛选培养基:MS+2,4-D(1.0mg/L) + 6-BA(0.01mg/L) + 维生素 B₁(4.0mg/L) + 头孢霉素(500mg/L) + 卡那霉素(50mg/L) + 草胺膦(1mg/L),pH 5.8;恢复培养基:MS+2,4-D(1.0mg/L) + 6-BA(0.01mg/L) + 维生素 B₁(4.0mg/L) + 头孢霉素(500mg/L),pH 5.8;分化筛选培养基:MS+KT(1mg/L) + 6-BA(1mg/L) + IBA(0.25mg/L) + 头孢霉

素(250mg/L) + 卡那霉素(100mg/L) + 草胺膦(1mg/L) + 维生素 B₁(4.0mg/L),pH 5.8;生根培养基:MS(1/2 大量元素) + NAA(0.1mg/L) + 头孢霉素(200mg/L) + 卡那霉素(100mg/L) + 维生素 B₁(4.0mg/L),pH 5.8。

1.2.2 外植体的获得 选取籽粒饱满的当年小麦种子,在无菌条件下,先用 75%乙醇消毒 5 min,无菌水冲洗 1~2 遍,再用 0.1%升汞消毒 20 min,无菌水冲洗 5~6 遍,再用无菌水浸泡 15~17 h,然后将小麦倒入装有滤纸的培养皿中,用镊子和小刀在超净工作台将胚取出,盾片向上置于愈伤组织诱导培养基上,每皿接 15 个左右,培养皿用封口膜封好,暗培养 1 周。

1.2.3 根癌农杆菌菌液制备 农杆菌单菌落或单菌落培养物的甘油冻存液接种于含利福平(质量浓度 50mg/L)和卡那霉素(质量浓度 50mg/L)的二抗 LB 液体培养基,28℃振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.8~1.0,2000 r/min 离心收集菌体,用含 AS(乙酰丁香酮)的 MS 液体培养基重新悬浮,备用。

1.2.4 遗传转化方法 (1)挑选质量较好的愈伤组织,用活化的农杆菌侵染。先用无菌水洗 2 遍,再用加 500mg/L 头孢霉素的蒸馏水洗涤,然后用无菌滤纸擦干,转入恢复培养基恢复培养 7 d。(2)继代扩增筛选培养 2 个月,每 10~15 d 换一次培养基,以防抑菌素失效。(3)转入分化筛选培养基,每 10 d 换一次。待分化出小苗小芽后,转入生根培养基。

2 结果与分析

2.1 农杆菌菌液 OD 值及感染时间对转化频率的影响

取小麦成熟胚诱导出的愈伤组织,经过继代培养,挑选质量好的愈伤组织,调整农杆菌菌液 OD₆₀₀ 值为 0.2、0.6、0.8,感染时间设置 5 min、10 min、20 min、30 min 4 个梯度,共培养 3 d,恢复培养 7 d,然后转入分化筛选培养基中诱导培养,30 d 后统计分化率。

农杆菌对受体的侵染方法不适当(菌液 OD 值过大或偏小;感染时间过长或不足)不是导致受体被农杆菌侵染过度致死,就是受体细胞未被感染。本试验结果表明,以农杆菌菌液 OD₆₀₀ = 0.6 处理外植体效果较好,得到了较高的抗性再生率。侵染时间较短时,尽管褐化程度较轻,但因为侵染时间过短,农杆菌未能充分吸附于愈伤组织的细胞上,因而转化率很低,大部分外植体在共培养和筛选过程中逐渐发白死亡。试验证明,以 OD₆₀₀ = 0.6 的菌液处理外植体 20 min,转化效率最高,达 36%(表 1)。

表 1 农杆菌菌液 OD 值及感染时间对小麦愈伤组织转化的影响

感染时间/ min	菌液 OD ₆₀₀ 值	愈伤组织数/ 块	抗性愈伤数/ 块	抗性愈伤再生率/ %
5	0. 2	100	15	15
	0. 6	100	20	20
	1. 0	100	14	14
10	0. 2	100	26	26
	0. 6	100	33	33
	1. 0	100	19	19
20	0. 2	100	18	18
	0. 6	100	36	36
	1. 0	100	16	16
30	0. 2	100	9	9
	0. 6	100	12	12
	1. 0	100	—	—

2.2 添加诱导因子乙酰丁香酮对小麦愈伤组织转化频率的影响

以农杆菌侵染过的愈伤组织为材料, 在共培养培养基中添加不同浓度的乙酰丁香酮, 浓度梯度为 50 μ mol/L、100 μ mol/L、200 μ mol/L、300 μ mol/L, 然后转入选择培养基并观察结果。结果表明, 共培养培养基中添加乙酰丁香酮对保证 T-DNA 的转移非常必要, 为小麦胚性愈伤组织转化所必需, 侵染菌液中添加乙酰丁香酮 200 μ mol/L 可明显提高抗性愈伤组织再生率, 抗性愈伤组织再生率高达 31% (表 2、图 1)。

表 2 乙酰丁香酮对小麦愈伤组织转化的影响

乙酰丁香酮的浓度/(μ mol/L)	愈伤组织数/ 块	抗性愈伤数/ 块	抗性愈伤再生率/ %
50	100	23	23
100	100	26	26
200	100	31	31
300	100	17	17

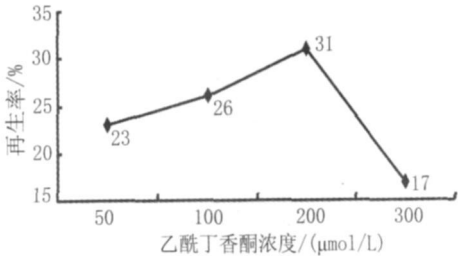


图 1 乙酰丁香酮对小麦愈伤组织转化的影响

2.3 头孢霉素对小麦愈伤组织再生的影响

取小麦成熟胚诱导出的愈伤组织, 经过共培养, 挑选质量好的愈伤组织, 接种于加不同质量浓度梯度(50、100、200、400、600 mg/L)头孢霉素的 MS 培养基中分化培养, 20 d 后统计再生率。从图 2 可以看出, 头孢霉素对小麦愈伤组织再生的影响作用不大。但是, 随着头孢霉素质量浓度的升高, 其愈伤组

织褐化, 生长缓慢, 再生率降低。所以, 在小麦愈伤组织转化过程中, 头孢霉素的质量浓度可以在有效抑制农杆菌的基础上尽量采取比较低的质量浓度。在配制分化筛选培养基的过程中, 适当的头孢霉素质量浓度, 即在继代培养基中添加 500 mg/L 的头孢霉素, 再在分化培养基中添加 200 mg/L 的头孢霉素, 可有效抑制农杆菌生长。

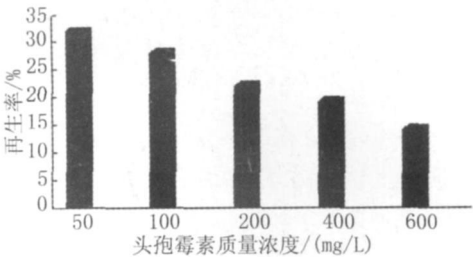


图 2 头孢霉素对小麦愈伤组织再生的影响

2.4 卡那霉素质量浓度和加入方法对小麦抗性愈伤组织的影响

设定卡那霉素质量浓度为 25 mg/L、50 mg/L、100mg/L、150 mg/L、200 mg/L、300 mg/L, 采用梯度方法加入。卡那霉素不同质量浓度和超纯琼脂粉质量浓度对愈伤组织的长势状态有很大影响。试验表明, 当超纯琼脂粉质量浓度为 2.0 mg/L 时, 卡那霉素一次加到 50 mg/L, 就出现整个培养皿愈伤死亡的现象。当超纯琼脂粉质量浓度为 3.0 mg/L 以上时, 卡那霉素一次加到 200mg/L, 在 20 d 观察时一皿只有 3~4 个愈伤变褐。采用梯度加法, 即第 1 次加 25mg/L, 以后每换一次培养基逐次加大质量浓度, 进行愈伤培养, 未发现变褐。当愈伤组织转入分化培养基后, 有极少数愈伤组织开始变褐。但超纯琼脂粉质量浓度为 5.0 mg/L 时, 愈伤在转入分化培养基培养后也未见变褐, 并开始分化。推测可能采用梯度加法, 愈伤的抗性增强, 对卡那霉素的抵抗力增强。

3 讨论

影响农杆菌介导小麦遗传转化的因素很多。本试验对预培养时间、侵染的农杆菌菌液 OD 值、侵染时间、共培养时间以及选择压和培养基的激素含量等因素进行摸索和改进, 建立了一个较高效的遗传转化体系, 与其他转化系统相比, 具有转化过程简单、周期短、转化率高等优点。对影响转化效率诸因素的研究发现: (1) 菌液 $OD_{600} = 0.6$, 侵染时间 30 min 对愈伤组织的生存和转化最有利; 在 $OD_{600} = 0.18$ 的农杆菌菌液中侵染 10 min 后, 抗性愈伤诱导率最高, 达到 36%; (2) 添加浓度为 $200 \mu\text{mol/L}$ 的乙酰丁香酮可显著提高抗性愈伤获得率; (3) 随着头孢霉素质量浓度的升高, 愈伤组织出现褐化, 生长缓慢, 再生率降低。所以, 应在有效抑制农杆菌的基础上, 尽量采取比较低的质量浓度。在后期的抑菌分化筛选中, 在继代培养基中添加头孢霉素的质量浓度为 500 mg/L , 继代扩增筛选培养 2 min, 每 10 ~ 15 d 换一次培养基; 而在分化培养基中添加 200 mg/L 头孢霉素, 即可获得再生率高的抗性愈伤。

本试验初步建立了农杆菌转化体系, 最适条件下转化频率高达 2.36%, 但总体来说转化率还比较低, 这需要对影响转化的其他因素进一步研究分析, 并找出其最优转化方法, 以提高转化频率, 并建立一套完整的转化体系, 为更好地开展转基因小麦的后续工作奠定基础。

参考文献:

[1] 叶兴国, 徐惠君, 杜丽璞, 等. 小麦遗传转化几个因素的研究[J]. 中国农业科学, 2001, 34(2): 128-132.

[2] Mooney P A, Good P B, Dennis E S, *et al.* *Agrobacterium faciens* gene transfer into wheat tissues[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1991, 25: 209-218.

[3] Wu H, Sparks C, Amoah B, *et al.* Factors influencing sccessfull agrobacterium-mediated genetic transformation of wheat[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(7): 659-668.

[4] Vasil V, Castillo A M, Fromm M E, *et al.* Herbicide resistance fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus[J]. Bio Technology, 1992, 10: 667-674.

[5] Cheng M, Fry J E, Pang S Z, *et al.* Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Physiology, 1997, 115(5): 971-980.

[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] Xia G M, Li Z Y. Transgenic plant regeneration from wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Acta Phytophysiol Sin, 1999, 25(1): 22-28.

[8] Khanna H K, Daggard G E. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using a superbinaryvector and a polyamine-supplemented regeneration medium[J]. Plant Cell Report, 2003, 21: 429-436.

[9] 王翠亭, 卫志明. 根癌农杆菌介导小麦幼胚遗传转化的影响因素[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(2): 521-529.

[10] Khanna H, Daggard G. *Arrbacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat wheat using a superbinary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(5): 429-463.

[11] 肖兴国. 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): 111-116.