

# 小麦农杆菌转化体系的优化及 HMW-GS 1Bx14 基因转化

刘香利 陈明利 赵惠贤 郭嵩光\*

(西北农林科技大学 生命科学学院/陕西省农业分子生物学重点实验室,陕西 杨凌 712100)

**摘要** 以小麦绵阳 19 和洛阳 8716 幼胚愈伤组织为材料,利用 *gus* 基因的瞬时表达,探讨了农杆菌菌株和侵染条件对转化效率的影响。结果发现,对于农杆菌菌株 EHA105,小麦绵阳 19 和洛阳 8716 幼胚愈伤组织侵染的最佳条件均为 OD<sub>600</sub> 0.8,侵染 30 min。对于农杆菌菌株 LBA4404,绵阳 19 和洛阳 8716 幼胚愈伤组织侵染的最佳条件分别为 OD<sub>600</sub> 1.0,侵染 30 min 和 OD<sub>600</sub> 0.8,侵染 60 min。利用建立的农杆菌转化体系对小麦高分子量麦谷蛋白亚基 1Bx14 基因进行了转化,经潮霉素抗性筛选、PCR 和 PCR-Southern 杂交检测,平均转化率为 0.61%。

**关键词** 小麦; 农杆菌; 转化; 高分子量麦谷蛋白亚基

中图分类号 S 512.135.3; Q 78 文章编号 1007-4333(2011)06-0025-07 文献标志码 A

## Optimization of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat and transformation of HMW-GS 1Bx14 gene

LIU Xiang-li, CHEN Ming-li, ZHAO Hui-xian, GUO Ai-guang\*

(College of Life Sciences, Northwest Agriculture and Forestry University/Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling 712100, China)

**Abstract** The genetic transformation of wheat Mianyang 19 and Luoyang 8716 immature embryo callus mediated by *Agrobacterium tumefaciens* was studied. The factors that influence the efficiency of transformation were investigated by using the transient expression of *gus* gene. The result showed that for both varieties, the best transformation procedure of EHA105 was *Agrobacterium* cell density of OD<sub>600</sub> ≈ 0.8, incubation for 30 min. When using *Agrobacterium* LBA4404, the transformation efficiency of Mianyang 19 and Luoyang 8716 immature embryo callus was highest when cell density was OD<sub>600</sub> ≈ 1.0, incubation for 30 min and cell density of OD<sub>600</sub> ≈ 0.8, incubation for 1h, respectively. Using the optimized conditions, the high molecular weight glutenin subunit 1Bx14 gene was transformed. After selected with hygromycin, tested by PCR and PCR-Southern, the positive progenies were obtained, yielding an average transformation frequency of 0.61%.

**Key words** wheat; *Agrobacterium tumefaciens*; transformation; high molecular weight glutenin subunit

自 1983 年第一株农杆菌介导的转基因植株问世以来,农杆菌介导的遗传转化方法就因其简单有效、转移基因整合效率高,且整合多发于转录活跃区而很快成为双子叶植物基因转化的主导方法。

农杆菌转化的成功依赖于农杆菌与植物细胞之间的相互作用,单子叶植物由于很少或者完全不能产生激活 Ti 质粒 Vir 区基因的信号分子从而严重

影响了农杆菌转化的有效性。利用外源诱导激活分子如乙酰丁香酮等,使得农杆菌介导的转基因水稻和转基因玉米获得成功。这不仅改变了单子叶植物不是农杆菌的天然寄主的看法,而且证明农杆菌介导法完全可以用于禾谷类作物的遗传转化。在农杆菌介导小麦基因转化方面,自 Cheng 等于 1997 年<sup>[1]</sup>首次获得了正常的农杆菌转化的转基因小麦

收稿日期: 2011-07-01

基金项目: 转基因专项重大课题子课题(2008ZX08002-004); 西北农林科技大学校长基金(A213021003)

第一作者: 刘香利,讲师,博士,主要从事植物基因工程研究,E-mail:liuxianglii@163.com

通讯作者: 郭嵩光,教授,主要从事生物化学与分子生物学研究,E-mail:guoai-guang@yahoo.com.cn

植株以来,利用农杆菌转化小麦的研究报道也日益增多<sup>[2-9]</sup>。农杆菌介导小麦转化中,小麦基因型、外植体种类和状态、农杆菌菌株以及菌液浓度、侵染时间等都对转化效率有很大的影响<sup>[2-6]</sup>。很多方法也都被用来提高农杆菌介导的小麦遗传转化效率,如转化中加入 0.2 mmol/L 的乙酰丁香酮诱发 T-DNA 转移,选择致毒能力较强的农杆菌菌株以及在二元载体中引入额外的毒性基因等<sup>[2,7-9]</sup>。

小麦高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)组成与其面包烘烤品质密切相关。研究表明,通过遗传转化向小麦中转入优质 HMW-GS 基因不仅可以改变转基因小麦面粉中 HMW-GS 组成,也可以提高种子总蛋白中高分子量麦谷蛋白的比例,从而提高小麦面团的强度和加工品质<sup>[10-14]</sup>。小麦 HMW-GS *1Bx14* 与优良的面包加工品质呈正相关<sup>[15]</sup>。因此,

本研究在对农杆菌介导的小麦幼胚愈伤组织转化条件进行优化的基础上,利用农杆菌转化法对小麦 HMW-GS *1Bx14* 基因进行了遗传转化,以期利用基因工程进行小麦遗传改良奠定基础。

## 1 材料与方法

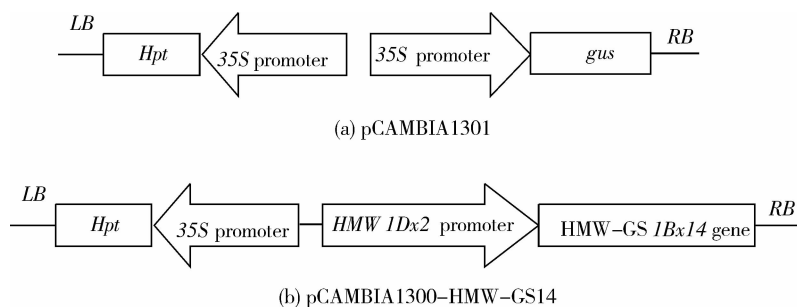
### 1.1 材料

#### 1.1.1 植物材料

小麦绵阳 19 和洛阳 8716 播种于西北农林科技大学农作一站试验田,于花后 14 d 采幼胚培养。

#### 1.1.2 载体及菌株

农杆菌菌株 LBA4404 和 EHA105 以及含植物表达载体 pCAMBIA1301 的农杆菌菌株 LBA4404 和 EHA105 为本研究室保存,植物表达载体 pCAMBIA1300-HMW-GS14 为本研究室构建,其 T-DNA 区结构如图 1。



*Hpt*: 潮霉素抗性基因; *gus*:  $\beta$ -葡糖苷酸酶基因。

图 1 载体 pCAMBIA1301 和 pCAMBIA1300-HMW-GS14 的 T-DNA 区结构

Fig. 1 The T-DNA structure of vector pCAMBIA1301 and pCAMBIA1300-HMW-GS14

### 1.1.3 培养基

1) 愈伤组织诱导及继代培养基 MSD: MS 培养基 + 2.0 mg/L 2,4-D + 30 g/L 蔗糖 + 500 mg/L 酸水解酪蛋白 + 6 g/L 琼脂, pH 5.8。

2) 共培养培养基 MSC: MS 培养基 + 2,4-D 2 mg/L + 0.2 mmol/L 乙酰丁香酮 + 葡萄糖 10 g/L (固体培养基另加 6 g/L 琼脂), pH 5.4。

3) 愈伤组织分化培养基 MSR: MS 培养基 + 1.0 mg/L KT + 1.0 mg/L IAA + 30 g/L 蔗糖 + 500 mg/L 酸水解酪蛋白 + 350 mg/L Carb + 琼脂 6 g/L, pH 5.8。

4) 筛选培养基 MSH1: MSD + 50 mg/L Hyg + 500 mg/L Carb。

5) 筛选培养基 MSH2: MSR + 50 mg/L Hyg + 350 mg/L Carb。

6) 生根培养基: 1/2MS 培养基 + 0.5 mg/L NAA + 15 g/L 蔗糖 + 350 mg/L Carb + 6 g/L 琼脂, pH 5.8。

以上培养基均 121 °C 高压灭菌 20 min。

### 1.2 方法

1.2.1 质粒 pCAMBIA1300-HMW-GS14 导入农杆菌中及其鉴定

质粒 pCAMBIA1300-HMW-GS14 利用 Bio-Rad 公司的电转化仪电击转化农杆菌 LBA4404 和 EHA105, 转化参数为: 电压 2.5 kV, 电容 25  $\mu$ F, 阻抗 400  $\Omega$ 。转化后在含 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 利富平的 YEB 培养基上 28 °C 培养, 挑取单菌落利用 HMW-GS *1Bx14* 基因特异引物进行菌落 PCR 鉴定。引物序列为 1Bx14F: 5'-ATGTG-AGCGCGAGCTCCGGAAGCGCG-3'; 1Bx14R: 5'-

GCGAAGGCGTAGTCTCGCTGGGG-3'。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 45 s; 68 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 45 s; 循环 32 次; 72 °C 延伸 10 min。阳性菌落提取农杆菌中的小质粒, 回转大肠杆菌后提质粒进行酶切鉴定。

### 1.2.2 农杆菌转化体系建立

1) 愈伤组织转化。挑取含有质粒 pCAMBIA1301 的农杆菌 LBA4404、EHA105 单菌落, 接种于含 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 利富平 YEB 液体培养基, 28 °C 培养 24 h 后, 按 1% 接种扩大培养, 28 °C 培养 4~5 h 至 OD<sub>600</sub> 值约 0.6 时, 5 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 用 MSC 液体培养基洗涤 2 次后重新悬浮, 稀释至 OD<sub>600</sub> 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 分别侵染预培养 10 d 的小麦绵阳 19 和洛阳 8716 幼胚愈伤组织, 侵染时间分别为 10、30 和 60 min。侵染结束后取出幼胚愈伤组织, 用无菌滤纸吸干表面菌液; 将愈伤组织接到 MSC 固体培养基上 (25 ± 1) °C 黑暗条件下共培养 3 d 后进行 GUS 组织化学染色。

2) GUS 组织化学染色。GUS 组织化学检测法参照 Jefferson 等<sup>[16]</sup>方法进行。共培养 3 d 后的愈伤组织用无菌水洗去愈伤组织表面的农杆菌, 浸入 X-Gluc 溶液, 37 °C 保温染色 24~48 h, 95% 乙醇脱色, 观察蓝色反应, 统计蓝色愈伤组织数。染色后, 取部分阳性组织压片, 在显微镜下观察并照像, 可见蓝色胞质的细胞。

3) 结果统计。

$$\text{GUS 阳性率}/\% = \frac{\text{出现蓝斑愈伤数}}{\text{转化愈伤数}} \times 100$$

$$\text{转化率}/\% = \frac{\text{阳性植株数}}{\text{转化愈伤数}} \times 100$$

### 1.2.3 HMW-GS *1Bx14* 基因的农杆菌转化

1) 愈伤组织侵染。利用带有双元载体质粒 pCAMBIA1300-HMW-GS14 的农杆菌 LBA4404 和 EHA105 侵染预培养 10 d 的绵阳 19 和洛阳 8716 幼胚愈伤组织。绵阳 19 分别用 OD<sub>600</sub> 0.8 的 EHA105 菌液侵染 30 min, OD<sub>600</sub> 1.0 的 LBA4404 菌液侵染 30 min; 洛阳 8716 分别用 OD<sub>600</sub> 0.8 的 EHA105 菌液侵染 30 min, OD<sub>600</sub> 0.8 的 LBA4404 菌液侵染 60 min。侵染结束后取出幼胚愈伤组织, 用无菌滤纸吸干表面菌液; 将愈伤组织接到 MSC 固体培养基上, (25 ± 1) °C 黑暗条件下共培养 3 d。

2) 转化后愈伤组织的筛选培养及植株再生。共

培养后的愈伤组织用无菌水冲洗 3 次, 用无菌滤纸吸干, 转移到筛选培养基 MSH1 上, 筛选 2 周后转移到筛选培养基 MSH2 上再筛选 2 周, 抗性愈伤组织转至分化培养基 MSR 上, 每两周继代一次, 光强度为 3 000 lx, 光照时间 16 h/d, 温度为 25 °C (光)/22 °C (暗)。待分化出的幼苗长至 2~3 cm 时转移到生根培养基上春化处理 20 d 后 (17 ± 1) °C 恢复培养 5 d, 开瓶口, 定时喷水保湿, 炼苗 3 d 后移栽于温室内生长。

### 1.2.4 转基因植株的检测

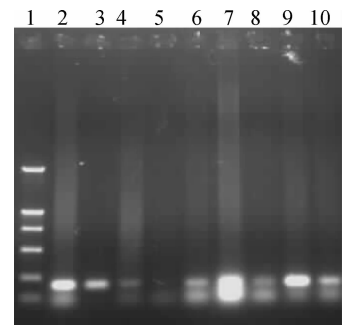
抗性植株叶片用 CTAB 法<sup>[17]</sup>提取基因组 DNA, 利用 HMW-GS *1Bx14* 基因特异引物 1Bx14F/1Bx14R 进行 PCR 检测。待反应结束后, 1% 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色并用凝胶成像仪照相分析。

阳性植株基因组 PCR 扩增电泳后转膜, 以酶切回收的 *1Bx14* 基因为模板, 利用随机引物标记法合成探针, 利用 Roche 公司的地高辛随机标记检测试剂盒进行 PCR-Southern 杂交检测。

## 2 结果分析

### 2.1 质粒 pCAMBIA1300-HMW-GS14 导入农杆菌中及其鉴定

利用电击法将质粒 pCAMBIA1300-HMW-GS14 导入农杆菌 EHA105 和 LBA4404, 转化菌落的菌落 PCR 扩增结果见图 2, 转化后的菌落可扩增出 183 bp 的 *1Bx14* 基因特异性片断。对 2 种农杆

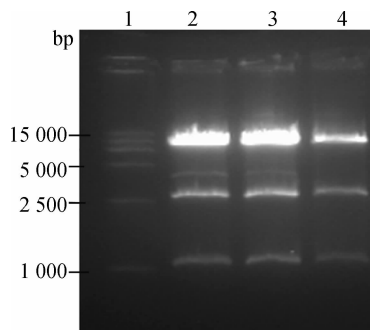


1. DL2000; 2. 质粒 pHU; 3. 重组质粒;  
4. 含重组质粒的 DH5 $\alpha$  菌落;  
5. 农杆菌空菌; 6~10. 转化农杆菌菌落。

图 2 重组质粒 pCAMBIA1300-HMW-GS14 转化后菌落 PCR 检测

Fig. 2 PCR analysis of transformed *Agrobacterium tumefaciens* colony

菌的阳性菌落提取质粒,回转大肠杆菌后进行酶切鉴定,结果如图3所示,2种农杆菌质粒酶切结果与载体 pCAMBIA1300-HMW-GS14 相同,可以切出 1.1 kb 的启动子、2.7 kb 的 *IBx14* 基因和 9 kb 左右的载体片段,说明植物表达载体 pCAMBIA1300-HMW-GS14 已成功转入 2 种农杆菌中。



1. DL15 000; 2. 农杆菌 EHA105 质粒;  
3. 农杆菌 LBA4404 质粒;  
4. 质粒 pCAMBIA1300-HMW-GS14。

图3 转化后农杆菌质粒酶切鉴定

Fig. 3 Digestion of plasmid from transformed *Agrobacterium tumefaciens* colony

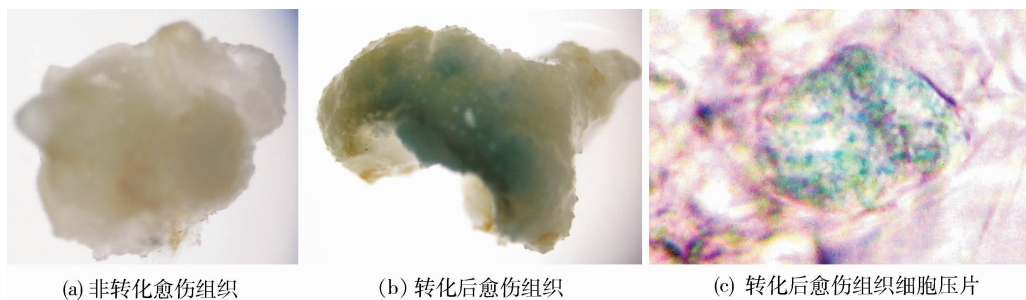


图4 转化和非转化愈伤组织的 GUS 显色

Fig. 4 GUS Histochemical staining of untransformed and transformed callus

表1 不同转化条件下的 GUS 阳性率

Table 1 Frequency of GUS histochemical staining positive callus transformed with different *Agrobacterium tumefaciens* and procedure

品种	农杆菌菌株	菌液浓度/ (OD <sub>600</sub> )	侵染时间/min			品种	农杆菌菌株	菌液浓度/ (OD <sub>600</sub> )	侵染时间/min		
			10	30	60				10	30	60
绵阳 19	EHA105	0.4	2.7	5.4	8.9	洛阳 8716	EHA105	0.4	2.5	7.3	7.5
		0.6	7.5	21.2	35.5			0.6	8.5	23.5	26.7
		0.8	6.8	51.4	32.5			0.8	9.3	46.5	41.5
		1.0	28.5	43.4	23.5			1.0	37.5	36.5	18.5
	LBA4404	0.4	0	3.3	7.3		LBA4404	0.4	0	12.5	14.5
		0.6	5.5	15.5	19.5			0.6	9.0	16.7	22.5
		0.8	8.4	21.3	27.3			0.8	11.0	23.5	45.5
		1.0	13.3	36.7	27.5			1.0	15.5	27.5	5.5

## 2.2 农杆菌转化体系建立

用不同菌液浓度的农杆菌 EHA105 和 LBA4404 对绵阳 19 和洛阳 8716 幼胚愈伤组织进行不同时间的侵染,转化后的愈伤组织共培养 3 d 后进行 GUS 染色处理。经 GUS 染色后,部分愈伤组织染成蓝色,对蓝色愈伤组织细胞压片后可见染成蓝色的细胞质(图 4)。

不同农杆菌菌株、不同菌液浓度和侵染时间转化后小麦绵阳 19 和洛阳 8716 幼胚愈伤组织的 GUS 阳性率统计结果见表 1。

由表 1 可以看出,不同农杆菌、不同菌液浓度与侵染时间对小麦幼胚愈伤组织转化效率存在很大的影响。当菌液浓度 OD<sub>600</sub> 为 0.4 和 0.6 时,对于绵阳 19 和洛阳 8716,2 种农杆菌侵染后愈伤组织 GUS 阳性率都随侵染时间的延长而增加。当菌液浓度 OD<sub>600</sub> 为 0.8 时,对于绵阳 19 和洛阳 8716,EHA105 侵染后 GUS 阳性率则随侵染时间的延长先提高后降低,侵染时间为 30 min 时 GUS 阳性率达到最高,分别为 51.4% 和 46.5%; LBA4404 侵染后 2 个品

种都随侵染时间的延长提高,在侵染 60 min 时洛阳 8716 GUS 阳性率达到最高(45.5%)。在菌液浓度 OD<sub>600</sub> 为 1.0、绵阳 19 愈伤组织 GUS 阳性率随 EHA105 和 LBA4404 侵染时间的增加先升高后降低,LBA4404 侵染时间为 30 min 时最高(36.7%);洛阳 8716 愈伤组织 LBA4404 侵染后 GUS 阳性率也随侵染时间的增加先升高后降低,这可能与高浓度和长时间侵染对愈伤组织造成较大的伤害有关。从本试验结果看,洛阳 8716 对 LBA4404 的敏感性高于绵阳 19。EHA105 对于 2 个品种侵染率都较高,这可能与其毒性较强有关。对于绵阳 19,EHA105 侵染的最佳参数为 OD<sub>600</sub> 0.8,侵染 30 min;LBA4404 侵染的最佳参数为 OD<sub>600</sub> 1.0 侵染 30 min。对于洛阳 8716,EHA105 侵染的最佳参数为 OD<sub>600</sub> 0.8,侵染 30 min;LBA4404 侵染的最佳参

数为 OD<sub>600</sub> 0.8,侵染 60 min。

## 2.3 HMW-GS14 基因的农杆菌转化

### 2.3.1 愈伤组织的诱导、转化及筛选

利用含二元载体 pCAMBIA1300-HMW-GS14 的农杆菌 EHA105 和 LBA4404 在最佳侵染条件下转化小麦绵阳 19 和洛阳 8716 幼胚愈伤组织。经潮霉素筛选培养后,大部分愈伤组织停止生长,逐渐褐化。经过两次筛选后,状态良好的抗性愈伤组织转至分化培养基上进行分化,部分抗性愈伤组织逐渐分化再生成苗(图 5(a)),筛选后愈伤组织生长和分化都较未转化对照(图 5(b))慢。不同农杆菌菌株、不同小麦品种的转化结果统计见表 2。利用 LBA4404 侵染绵阳 19 幼胚愈伤组织 483 块,经潮霉素筛选后共得到绿苗 3 株(标记为 L1~L3),侵染洛阳 8716 愈伤组织 321 块,筛选后仅得到 1 株绿苗

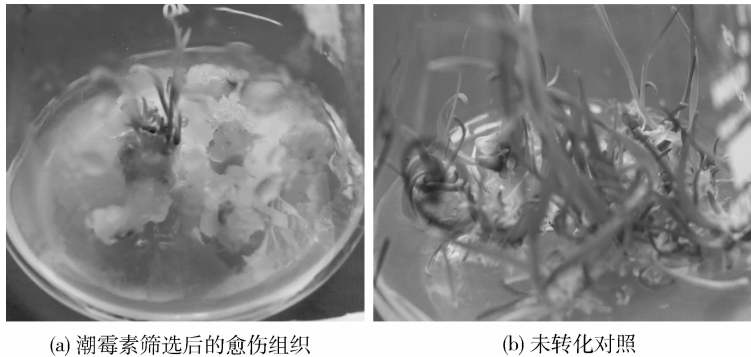


图 5 潮霉素筛选后的愈伤组织和未转化对照的再生

Fig. 5 Regeneration of transformed callus after hygromycin selection and untransformed callus

表 2 绵阳 19 和洛阳 8716 幼胚愈伤组织的农杆菌转化效率

Table 2 Transformation frequency of Mianyang 19 and Luoyang 8716 immature embryo with different *Agrobacterium tumefaciens*

品种	农杆菌菌株	侵染愈伤数	抗性植株数	PCR 阳性植株数	转化率/%
绵阳 19	EHA105	452	6	5	1.10
	LBA4404	483	3	2	0.41
洛阳 8716	EHA105	315	3	2	0.63
	LBA4404	321	1	1	0.31

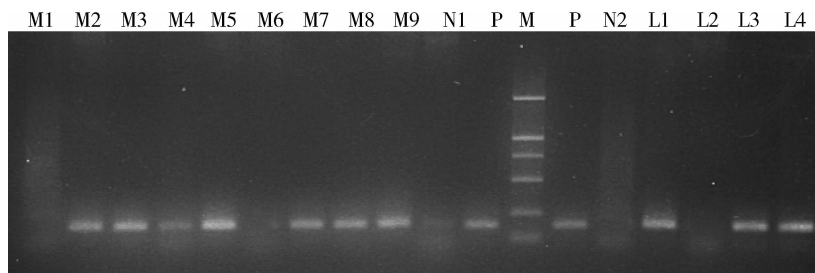
(标记为 L4)。利用 EHA105 转化小麦绵阳 19 幼胚愈伤组织 452 块,筛选后共得到绿苗 6 株绿苗(标记为 E1~E6),侵染洛阳 8716 愈伤组织 315 块,共得到绿苗 3 株(标记为 E7~E9)。待绿色小苗长至 2~3 cm 高时进一步转至生根培养基上长根,春化后移栽。

### 2.3.2 转化植株的 PCR 检测

HMW-GS 1Bx14 基因克隆自优质小麦品种小偃 6 号,因此,以小偃 6 号基因组为阳性对照,未转化的绵阳 19 和洛阳 8716 基因组为阴性对照,对移栽后转基因植株的基因组用 HMW-GS 1Bx14 基因特异引物 1Bx14F/1Bx14R 进行 PCR 检测,结果

如图6所示。13株再生植株PCR分析结果表明,绵阳19转化得到的9株后代中有7株为阳性(M1

和M6为阴性);洛阳8716转化的4株后代中3株为阳性(L2阴性)。



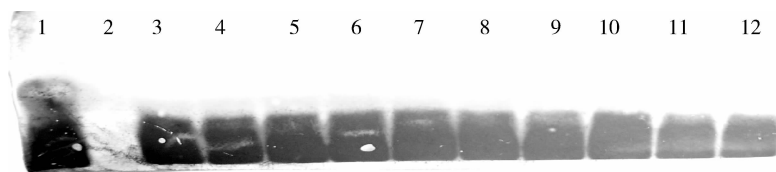
M. DL2000; P. 阳性对照小偃6号; N1. 绵阳19; N2. 洛阳8716;  
M1~M9. 绵阳19转化单株; L1~L4. 洛阳8716转化单株。

图6 转化植株基因组DNA HMW-GS14基因的PCR扩增电泳图

Fig. 6 The HMW-GS14 gene PCR analysis of different transformed plants

利用酶切回收的HMW-GS 1Bx14基因为模板,随机标记探针针对10株PCR阳性植株进行PCR-Southern杂交,结果如图7所示。10株后代PCR

产物均有很强的杂交信号,说明扩增产物来自于HMW-GS14基因。同一种农杆菌对不同品种的转化效率不同,EHA105对绵阳19和洛阳8716的转



1. 阳性对照小偃6 PCR产物; 2. 阴性对照绵阳19 PCR产物; 3~12. 不同转基因单株 PCR产物。

图7 转基因后代的PCR-Southern杂交分析

Fig. 7 PCR-Southern analysis of transformed plants

化率分别为1.1%和0.63%,高于LBA4404对2个品种的转化率0.41%和0.31%,各处理平均转化率0.61%(表2)。

### 3 讨论

小麦农杆菌转化中不同受体基因型、取材时期、预培养时间、农杆菌菌株与载体、菌液浓度和侵染时间等都对转化率有很大影响。因此,选择合适的基因型并采用分裂旺盛、状态良好的外植体作为侵染材料,选择侵染能力较强的农杆菌菌株,优化转化条件来尽量提高转化效率是农杆菌转化的关键。

基因型是影响小麦组织培养的主要因素,也是影响农杆菌转化的重要因素。小麦农杆菌转化中再生率较高的Bobwhite,Florid等依然是应用最多的受体材料。本研究也发现,再生率较高的绵阳19转化效率也高于洛阳8716。另外,外植体的类型、年龄和状态也是影响农杆菌转化效率的重要因素。黄

益洪等<sup>[3]</sup>研究认为,预培养10~15 d幼胚愈伤组织有较高的瞬时表达效率,可以达到60%~80%;而王永勤等<sup>[4]</sup>认为大于10 d龄的农大146愈伤组织作为转化的起始材料要比直接剥离的幼胚好,以直接剥离的幼胚为转化受体所获得的抗性愈伤频率最高为14.7%;而以10 d以上的愈伤组织为受体抗性愈伤频率最高达到55.1%。Cheng等<sup>[1]</sup>以刚剥离的幼胚、预培养的幼胚和幼胚愈伤组织为受体,3种受体都获得了转基因植株,转化效率没有明显差异。Uzé等<sup>[5]</sup>以预培养3、10、17、24 d的幼胚愈伤组织为受体材料,gus瞬时表达的检测结果表明,预培养10 d以上的幼胚愈伤组织比预培养3 d的幼胚愈伤组织gus基因表达活性更高。造成上述研究结果不同可能与所用的品种(基因型)不同有关,但多数结果认为预培养10 d左右的幼胚愈伤组织转化效果最佳。本实验以预培养10 d的小麦幼胚愈伤组织为受体,瞬时表达率最高可达到51.4%。

农杆菌介导小麦转化中,除了小麦基因型、外植体种类和状态影响之外,农杆菌菌株以及菌液浓度、转化诱导因子、侵染时间都对转化效率有很大的影响。不同农杆菌菌株毒性和侵染活力不同,对同一基因型小麦的侵染能力不同。LBA4404 是水稻和玉米转化中使用最多的菌株。Uzé 等<sup>[5]</sup>根据 *gus* 基因的瞬时表达的结果,认为所用的 4 个菌株中发根农杆菌 LBA9402 最为有效, EHA105 次之, LBA4404 最差;黄益洪等<sup>[3]</sup>利用 6 个不同的农杆菌菌株 LBA4404、AGL0、EHA105、COR303、COR309 和 MOG10 对不同小麦基因型及不同外植体进行转化, GUS 表达结果表明,不同农杆菌的致毒力和不同基因型及外植体对农杆菌敏感性各不相同, AGL0 及 MOG101 的瞬时表达结果最好。本研究结果发现,不同品种对同一种农杆菌菌株的敏感性不同, EHA105 对 2 个品种的转化效率高于 LBA4404,这可能与其致毒力较高有关。

在农杆菌浓度和侵染时间上, Cheng 等<sup>[1]</sup>使用菌株 C58(ABD)侵染 3 h,转化率为 0.3%~2.5%;王永勤等<sup>[4]</sup>认为,农杆菌菌液浓度为  $OD_{600} = 1.0$ ,侵染时间为 1 h 时,转化效率较高。本研究发现,当  $OD_{600} = 1.0$ ,侵染时间为 60 min 时,2 个品种愈伤组织均出现褐化,从而导致 GUS 组织化学染色阳性率降低,这可能与高浓度的农杆菌侵染引起愈伤组织细胞损伤增加有关。

## 参 考 文 献

- [1] Cheng M, Joyce E F, Pang S Z, et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Physiology*, 1997, 115: 971-980
- [2] Wu H, Sparks C, Amoah B, et al. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat[J]. *Plant Cell Report*, 2003, 21: 659-668
- [3] 黄益洪, 周因平, 叶兴国, 等. 农杆菌介导法获得小麦转基因植株的研究[J]. *作物学报*, 2002, 28(4): 510-515
- [4] 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
- [5] Uzé M, Potrykus I, Sautter C. Factors influencing T-DNA transfer from *Agrobacterium* to precultured immature wheat embryos (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Cereal Research Communications*, 2000, 28(1/2): 17-23
- [6] Ding L, Li S, Gao J, et al. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat[J]. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36: 29-36
- [7] 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
- [8] Wu H X, Doherty A, Jones H D. Efficient and rapid *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) using additional virulence genes[J]. *Transgenic Research*, 2007(1): 106-109
- [9] Hu T, Metz S, Chay C, et al. *Agrobacterium* mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection[J]. *Plant Cell Reports*, 2003, 21: 1010-1019
- [10] Barro F, Rooke L, Bekes F, et al. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties[J]. *Nature Biotechnology*, 1997, 15: 1295-1299
- [11] He G Y, Jones H D, Ovidio D, et al. Expression of an extended HMW subunit in transgenic wheat and the effect on dough mixing properties[J]. *Journal of Cereal Science*, 2005, 42: 225-231
- [12] Blechl A, Lin J, Nguyen S, et al. Transgenic wheats with elevated levels of Dx5 and/or Dy10 high-molecular-weight glutenin subunits yield doughs with increased mixing strength and tolerance[J]. *Journal of Cereal Science*, 2007, 45: 172-183
- [13] Gadaleta A, Blechl A E, Nguyen S, et al. Stably expressed D-genome-derived HMW glutenin subunit genes transformed into different durum wheat genotypes change dough mixing properties[J]. *Molecular Breeding*, 2008, 22: 267-279
- [14] Rakszegi M, Pastori G, Jones H D, et al. Technological quality of field grown transgenic lines of commercial wheat cultivars expressing the 1Ax1 HMW glutenin subunit gene[J]. *Journal of Cereal Science*, 2008, 47: 310-321
- [15] Deng Z Y, Tian J C, Sun G X. Influence of high molecular weight glutenin subunit substitution on rheological behaviour and bread-baking quality of near-isogenic lines developed from Chinese wheats[J]. *Plant Breeding*, 2005, 124: 428-431
- [16] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M V. GUS fusion:  $\beta$ -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *EMBO Journal*, 1987, 6: 3901-3907
- [17] Saghai-Marouf M A, Soliman K M, Jorgensen R A, et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984, 81: 8014-8018

(责任编辑: 袁文业)