

# 利用农杆菌浸种法将叶片衰老抑制基因 $P_{SAG12}$ -IPT 导入普通小麦的研究

奚亚军<sup>1,2</sup>, 张启发<sup>1</sup>, 林拥军<sup>1</sup>, 侯文胜<sup>2</sup>, 路明<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>华中农业大学/作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070; <sup>2</sup>西北农林科技大学学院, 杨凌 712100)

**摘要:** 以普通小麦品种西农1376和西农2611为材料, 利用农杆菌浸种法获得1株导入了叶片衰老抑制基因  $P_{SAG12}$ -IPT的转基因植株。经PCR、GUS组织化学染色和Southern杂交分析, 证明目的基因已整合到小麦基因组中并在转基因植株中能够稳定遗传。转基因小麦在叶片细胞分裂素(异戊烯基腺嘌呤)含量、叶片衰老进程及农艺性状方面与对照无明显差异, 初步表明叶片衰老抑制基因  $P_{SAG12}$ -IPT在转基因植株体内可能未表达或表达量不足。

**关键词:** 小麦; 农杆菌浸种法; 叶片衰老;  $P_{SAG12}$ -IPT

## Introduction of Leaf Senescence-Inhibiting Gene $P_{SAG12}$ -IPT into Common Wheat via *Agrobacterium tumefaciens* Soaked Seeds

XI Ya-jun<sup>1,2</sup>, ZHANG Qi-fa<sup>1</sup>, LIN Yong-jun<sup>1</sup>, HOU Wen-sheng<sup>2</sup>, LU Ming<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> National Key Laboratory for Crop Genetics and Improvement/Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070 ;

<sup>2</sup> Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100 )

**Abstract:** A transgenic plant with  $P_{SAG12}$ -IPT gene was obtained by means of *Agrobacterium tumefaciens* soaked seeds from wheat Xinong1376. The integration of  $P_{SAG12}$ -IPT gene into the wheat genome was confirmed by PCR amplification, GUS histochemical and Southern blot hybridization analysis and the  $P_{SAG12}$ -IPT gene could be inherited stably. The investigation on leaf cytokinin (isopentenyladenine) content, leaf senescence development and agronomical characters showed that there were no significant difference between transgenic wheat and Xinong1376. The result indicated that  $P_{SAG12}$ -IPT gene might not express (gene silencing) or express partially in transgenic wheat plant.

**Key words:** Wheat; *Agrobacterium tumefaciens* soaked seeds; Leaf senescence;  $P_{SAG12}$ -IPT

农杆菌介导的基因转化系统因其具有转化的外源DNA结构完整、遗传稳定、拷贝数低、转化的DNA片段较大等优点, 已成为目前大多数植物基因转化的首选方法, 在已获得的200多种转基因植物中, 约80%是由农杆菌介导完成的<sup>[1]</sup>。然而, 实践中发现农杆菌介导法对组织培养技术依赖性强, 组织培养条件要求严格, 存在基因型限制, 使其在一些较难进行组织培养的植物如小麦、玉米等上的普遍应用受到很大限制。探索一种既能利用农杆菌介导体系的优点, 又避开组织培养途径的转化方法, 对植物基因转化研究将起到很大的促进作用。

1987年, Feldmann等<sup>[2]</sup>首次报道利用农杆菌浸种法将 *npt II* 基因导入了抑南芥, 并对获得的一部分  $T_2$  代植株做了Southern杂交分析, 证明在转化植株中外源基因按孟德尔规律遗传。随后许耀等<sup>[3]</sup>以微伤处理的受体态种胚为材料, 利用该方法将 *npt II* 基因导入了黄瓜和番茄, 并从生理生化及分子水平上证实了外源基因的转移、整合与表达。最近, 林拥军<sup>[4]</sup>用同样方法转化水稻, 获得了4.8%的转化效率。小麦是重要的农作物, 其组织培养技术研究相对滞后, 利用农杆菌浸种法对小麦进行遗传转化的尝试具有重要的理论意义和应用价值。

收稿日期: 2003-01-23

基金项目: 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室开放课题资助项目和国家重点科技(攻关)资助项目(96-009-01-14), 国家转基因专项资助项目(jy03-b-23-02)

作者简介: 奚亚军(1969-), 男, 陕西白水人, 副研究员, 博士, 主要从事小麦杂种优势利用及转基因研究。Tel: 029-87082205; E-mail: xyjysc@163.net

提高小麦品种的抗旱能力是小麦育种的重要目标。Gan 等人<sup>[5]</sup>构建的叶片衰老抑制基因  $P_{SAG12}$ -IPT 导入烟草<sup>[6,7]</sup>、水稻<sup>[8]</sup>后,提高了衰老叶片内的细胞分裂素含量,使叶片早衰特性得到改善。本试验研究的目的是探索能否利用农杆菌浸种法将  $P_{SAG12}$ -IPT 基因导入生产上有早衰缺陷的普通小麦品种,以对其进行遗传改良。

## 1 材料与方 法

### 1.2 方 法

**1.2.1 小麦种子预处理** 取成熟饱满发芽率在 90% 以上的小麦种子,70% 的酒精表面消毒后,用 0.15% 升汞消毒 20 min,无菌水冲洗 4~5 次,24℃ 催芽至种子露白待用。

**1.2.2 农杆菌准备** 用 LA 培养基划线接种农杆菌,28℃ 静置暗培养 2~3 d。刮出全部菌体接入悬浮培养基 MSM(1/2 MS+100 u MAs+1%Glucose+2%Sucrose, pH 5.5),28℃,220 r/min 振荡培养 2~3 h,分光光度计测定菌液浓度,用 MSM 调至 1.5 OD。

**1.2.3 农杆菌浸泡转化** 取经过预处理的西农 1376,西农 2611 小麦种子,用无菌水冲洗干净,加入适量 1.5 OD 农杆菌(含 pCMLA35-1 质粒)悬浮菌液拌匀种子,19℃ 放置 1~2 h,倒去菌液,继续培养直至 2 d。用自来水将种子冲洗干净,24℃ 培养至芽长 1 cm,播种到大田,管理与常规品种相同。

**1.2.4 PCR 检测** PCR 引物依据叶片衰老启动子  $P_{SAG12}$  序列设计,引物序列为:  $P_{SAG12}$ -R: 5' TGGCTGAAGTGATAACCGTC 3',  $P_{SAG12}$ -F: 5' GCAAAGAGACGAGGAAGAAA 3'。PCR 循环参数为 94℃ 预变性 3 min → 94℃ 1 min,56℃ 1 min,72℃ 1.5 min,35 个循环 → 72℃ 延伸 7 min,4℃ 保存。

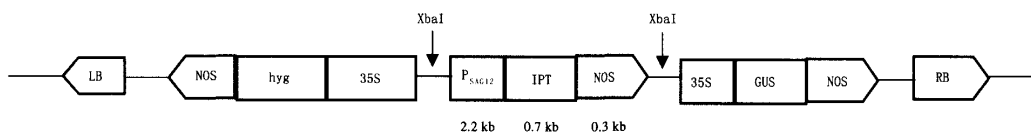
**1.2.5 Southern 杂交和 GUS 基因表达的组织化学法** 检测方法参照《分子克隆实验指南》<sup>[10]</sup>和 Rueb<sup>[11]</sup>的方法稍加修改后进行。

**1.2.6 转基因植株的表达分析** 根据转基因植株衰老

### 1.1 材 料

**1.1.1 供试植物** 西农 1376 和西农 2611,由西北农林科技大学小麦中心提供。

**1.1.2 菌株和质粒** 菌株 EHA105,为携带卸甲辅助质粒 pTiBo542 的脂碱型菌株,由澳大利亚 CAMBIA 实验室提供。质粒 pCMLA351 (原始载体为 pCMBIA1301)能在大肠杆菌 DH5a 中扩增,由曹孟良<sup>[9]</sup>构建,简图如下:



叶片细胞分裂素含量(异戊烯基腺嘌呤)及形态学特征研究目的基因的表达。异戊烯基腺嘌呤含量测定方法采用酶联吸附免疫分析法(ELISA)<sup>[12]</sup>,其中 Ab 为单克隆抗体,以辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为二抗进行检测。叶片衰老进程记载标准为 0 级:全叶青绿;1 级:叶尖缺绿坏死;2 级:叶尖叶缘缺绿坏死;3 级:半叶失绿坏死;4 级:全叶坏死。

**1.2.7 转基因植株后代 ( $T_1$ ) 的遗传分析**  $T_0$  代套袋自交,从收获单株种子中随机取少量  $T_1$  代种子盆栽播种,提取单株 DNA 进行 PCR 检测,分析  $T_1$  代植株中  $P_{SAG12}$ -IPT 基因的遗传方式。

## 2 结果与分析

### 2.1 转基因植株的 PCR 和 GUS 检测

在小麦苗期提取叶片 DNA,以 pCMLA35-1 质粒为阳性对照,利用 SAG12 的引物进行 PCR 扩增,其中用农杆菌浸泡过的西农 1376 有一个单株(T7-1)和阳性对照能扩增出预期大小的目标片段(526 bp),而在阴性对照(未转化株)和西农 2611 中未扩增出相应的片段(表 1,图 1)。在拔节期和抽穗开花期对苗期所得阳性单株重复进行 PCR 检测验证,与苗期所得结果完全符合。对 PCR 阳性单株 T7-1 取叶片进行 GUS 染色分析,其叶片显示了特有的 GUS 蓝色反应,初步证明  $P_{SAG12}$ -IPT 基因序列可能插入小麦 T7-1 的基因组中。同时,从表 1 可以看出,农杆菌浸种后对小麦

表 1 转化植株的 PCR 和 GUS 分析

Table 1 PCR and GUS analysis of transgenic plants

品 种	处理种子数	出苗率 (%)	对照出苗率 (%)	PCR 阳性株	GUS 阳性株
Variety	No. of seeds treated	Seedling ratio	CK seedling ratio	No. of PCR positive plants	No. of GUS positive plants
西农 1376	2 000	79.2	92.0	1	1
Xinong1376					
西农 2611	2 000	73.5	90.5	0	0
Xinong2611					

种子的发芽率有一定影响。

### 2.2 转基因植株的 Southern 杂交分析

对 PCR 和 GUS 初步检测为阳性的 T7-1 单株叶片 DNA 和 pCMLA35-1 质粒用 Xba I 限制性内切酶进行酶切，以 PCR 扩增的  $P_{SAG12}-IPT$  基因片段为探针，进行 Southern 杂交分析，以进一步确证是否为转化体。

图 2 结果显示，转基因植株 T7-1 和阳性对照 pCMLA35-1 在 3.2kb 处均有杂交带，与  $P_{SAG12}-IPT$  基因大小基本一致，而阴性对照没有杂交信号，说明带有特异启动子的目的基因已完整整合到小麦 T7-1 的基因组中。

### 2.3 转基因植株叶片异戊烯基腺嘌呤含量和衰老进程分析

在小麦生长后期，当对照西农 1376 的倒二叶、倒三叶外观已呈明显的衰老迹象时分次调查转基因植株和

对照的叶片异戊烯基腺嘌呤含量和叶片衰老进程。从调查结果来看（图 3、表 2），转基因植株 T7-1 的叶片异戊烯基腺嘌呤含量略高于对照，叶片衰老进程较对照稍有延缓，但从总体上与对照差异不明显。同时，转基因植株在形态特征和农艺性状上与对照也无明显差异，初步表明叶片衰老抑制基因  $P_{SAG12}-IPT$  在转基因植株体内可能未表达（发生基因沉默）或表达量不足。

### 2.4 转基因植株后代 ( $T_1$ ) 遗传分析

PCR 检测结果显示（表 3）， $P_{SAG12}-IPT$  基因在转基因植株体内能稳定遗传。 $T_1$  代中 PCR 阳性植株与阴性植株的分离比例符合孟德尔的 3:1 分离规律，为单拷贝整合。同时，把 T7-1 植株的部分  $T_1$  代种子在杨陵按株系种植，在小麦生长后期，观察到转基因植株后代的叶片衰老进程与对照无明显差异。

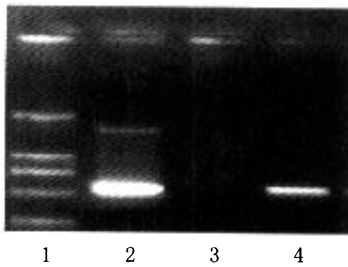


图 1 转基因植株的 PCR 分析  
Fig.1 PCR analysis of transgenic plant



图 2 转基因植株的 Southern 杂交分析  
Fig.2 Southern blot analysis of transgenic plant

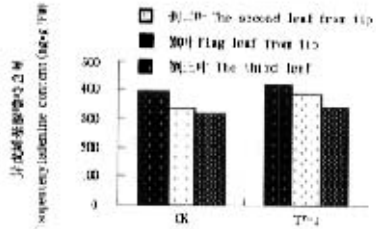


图 3 转基因植株叶片异戊烯基腺嘌呤含量（花后 20d）  
Fig.3 Leaf isopentenyladenine content analysis of transgenic plant by ELISA (20 d after flowering stage)

### 表 2 小麦生长后期叶片衰老进程分析

Table 2 Analysis of wheat leaf senescence development at old stage

时间 Time	材料 Material	旗叶 Flag leaf	倒二叶 The second leaf from tip	倒三叶 The third leaf from tip
25/4	CK	1	2	2
	T7-1	1	1	2
5/5	CK	2	3	3
	T7-1	2	2	3
15/5	CK	4	4	4
	T7-1	3	4	4

### 表 3 转基因植株 $T_1$ 代 PCR 分析

Table 3 PCR analysis of  $T_1$  transgenic plant

材料 Material	$T_1$ 代种子数 No. of $T_1$ seeds	出苗数 No. of seedling	PCR 阳性株数 No. of PCR positive plants	分离比例 Positive /negative	$\chi^2$ (3:1)
T7-1	25	21	14	2:1	0.399 < $\chi^2_{0.05} = 3.84$

### 3 讨论

种子是一幼小植物的雏形,具有天然的形态建成能力和遗传传递能力。当干燥的种子吸水后,胚性细胞酶活性提高,呼吸作用迅速加强,细胞分裂旺盛,核酸、蛋白质重新合成。而DNA的合成和细胞分裂是农杆菌成功转化植物的一个重要因素<sup>[13]</sup>。因此,利用根癌农杆菌作用于植物萌动种子,有可能使其T-DNA转移并整合到胚细胞的细胞核中,从而实现转化。根据农杆菌浸种法在拟南芥<sup>[2]</sup>、黄瓜、番茄<sup>[3]</sup>及水稻<sup>[4]</sup>上取得的转化结果,表明利用该方法可以实现外源基因对植物的转化。本试验采用农杆菌浸种法转化小麦,经PCR、GUS组织化学染色和Southern杂交验证,获得了1株导入了叶片衰老抑制基因 $P_{SAG12}$ -IPT的转基因植株。虽然在本试验中转化率仅有0.06% (1/1583),但却表明利用农杆菌浸种法转化小麦具有一定的可行性,为探寻避开通过严格的组织培养实现转化提供了一条简便易行的途径。

在本试验中,叶片衰老抑制基因 $P_{SAG12}$ -IPT导入西农1376后,转基因植株在叶片异戊烯基腺嘌呤含量、叶片衰老进程及农艺性状上与对照并无明显差异,说明 $P_{SAG12}$ -IPT基因在转基因植株体内可能未表达(发生基因沉默)或表达量不足。结合其它植物的转化经验,植物转基因研究必须保证转基因植株大量群体的获得,这样才能有利于性状优良的目标植株的筛选。因此,必须对农杆菌浸种法转化小麦的体系进行筛选,以提高其转化效率。

### References

- [1] 李卫,郭光泌,郑国辑.根癌农杆菌介导遗传转化研究的若干新进展.科学通报,2000,45(8):798-807.  
Li W,Guo G M,Zheng G C.New advances in plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Chinese Science Bulletin*, 2000,45(8):798-807. (in Chinese)
- [2] Feldmann K A,Marks M D. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. *Molecular & General Genetics*, 1987, 208:1.

- [3] 许耀,王艇,李宝健.根癌农杆菌介导的外源基因转化植物萌动种胚的研究.实验生物学报,1991,24(2):109-115.  
Xu Y,Wang T,Li B J.Studies on transformation of seed-germinating embryos of plants by *Agrobacterium*-mediated foreign genes. *Acta Biologica Experimentalis Sinica*, 1991, 24(2):109-115. (in Chinese)
- [4] 林拥军.农杆菌介导的水稻高效遗传转化体系的研究.华中农业大学博士论文,2001.  
Lin Y J.The studies on *Agrobacterium*-mediated rice genetic transformation. Ph. D. Dissertation. Huazhong Agricultural University, 2001. (in Chinese)
- [5] Gan S,Amasino R M. Inhibition of leaf senescence by auto-regulated production of cytokinin. *Science*, 1995, 270: 1986-1988.
- [6] Gan S,Amasino R M. Making sense of senescence-Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology*, 1997, 113(2): 3131-3139.
- [7] Astrid W,Von Schaewen A,Leegood R C,Lea P J,Quick W P. Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars and light. *Plant Physiology*, 1998, 116:329-335.
- [8] 付永彩,丁月云,刘新仿,孙传清,曹守云,王东江,何德洁,王象坤,李良材,田文忠.抑制衰老的嵌合基因在水稻中的转化.科学通报,1998,43(18):1963-1967.  
Fu Y C,Ding Y Y,Liu X F,Sun C Q,Cao S Y,Wang D J,He S J,Wang X K,Li L C,Tian W Z. Transformation of rice with senescence-inhibition chimeric gene. *Chinese Science Bulletin*, 1998, 43(18):1963-1967. (in Chinese)
- [9] 曹孟良.自我调控延缓叶片衰老基因的亚克隆.湖南师范大学学报,2000,23(1):73-78.  
Cao M L. Sub-cloning an autoregulatory gene of inhibition leaf senescence. *Journal Hunan Normal University*, 2000, 23(1):73-78. (in Chinese)
- [10] Sambrook J,Fritsch E F,Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] Rueb S,Hensgens L A M. Improved histochemical staining for  $\beta$ -D-glucuronidase activity in monocotyledonous plants. *Rice Genetics Newsletter*, 1989, 6:168-169.
- [12] 中国科学院上海植物生理研究所编.现代植物生理学实验指南.北京:科学出版社,1999.  
Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy of Science. *Modern Phytophysiological Experiments*. Beijing: Science Press, 1999. (in Chinese)
- [13] An G. High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiology*, 1985, 79:568-570.

(责任编辑 孙雷心)