



崔志钢,王琨,赵会芳,等.基因枪介导 BYDV-GPV-CP 和 Bar 基因共转化小麦幼胚愈伤组织[J].黑龙江农业科学,2022(5):18-21.

# 基因枪介导 BYDV-GPV-CP 和 Bar 基因共转化小麦幼胚愈伤组织

崔志钢<sup>1</sup>,王琨<sup>1</sup>,赵会芳<sup>1</sup>,陈耀峰<sup>2</sup>

(1. 铜仁职业技术学院 农学院,贵州 铜仁 554300;2. 西北农林科技大学 农学院,陕西 杨凌 712100)

**摘要:**为了优化小麦基因枪转化技术体系,提高小麦基因枪转化效率,分别以小麦品种小偃 22、千斤早、西农 979、扬麦 18 和扬麦 12 诱导 9 d 的幼胚愈伤组织为受体材料,使用基因枪介导 BYDV-GPV-CP 基因和抗除草剂 Bar 基因进行小麦幼胚愈伤组织共转化。结果表明:5 种基因型小麦幼胚材料愈伤组织诱导效果存在显著差异,在接受基因枪轰击后再生苗率存在显著差异。在基质中添加  $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  多效唑后再生苗平均分蘖最多,数量达 6.47,证实添加  $4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  多效唑,可以有效促进壮苗和增加分蘖。

**关键词:**基因枪;愈伤组织;基因型;再生苗

自 1992 年 Vasil 等<sup>[1]</sup>应用基因枪技术获得第一株转基因小麦植株后,小麦转基因技术开始快速发展。近年来,大量有关小麦转基因科研工作相继开展,促进了小麦转基因技术的迅速发展。基因枪介导的小麦遗传转化在抗病、抗逆、品质改良、提高产量等方面取得了显著进展<sup>[2-7]</sup>,特别是以小麦幼胚愈伤组织为受体材料的基因枪转化<sup>[8-11]</sup>。但是应用小麦幼胚愈伤组织对抗病毒基因遗传转化的相关研究较少,且转化效率不高<sup>[12]</sup>,转化苗的移栽成活率较低,最高仅为 88.1%<sup>[12-13]</sup>,不利于后继研究的开展。

生物胁迫是限制植物生长发育的重要因子,也是影响作物产量的一个主要因素<sup>[14]</sup>。因此,利用植物基因工程技术改良小麦抵御生物胁迫的能力具有重要意义。小麦黄矮病在中国的危害范围比较广。目前,国内外的控制策略是主要依赖于化学杀虫剂。然而,蚜虫的化学防治存在诸多缺陷。化学防治一般费用较高,农药残留和环境污染严重,而且蚜虫发生情况很难准确预报<sup>[15]</sup>。国内外的抗性品种不多,采用常规育种的方法存在周期长、工作量大、定向性差、易带入不良性状的弊端,因此,最经济有效的控制途径是将大麦黄矮病毒(Barley Yellow Dwarf Virus, BYDV)抗性基

因转入主推种植品种,选育抗 BYDV 新种质和新品种。BYDV 病毒的传播涉及病毒粒子表面成分与蚜虫体内专化性受体的相互作用, BYDV 病毒粒子表面的主要成分是植物病毒外壳蛋白(CP),利用 CP 来介导抗病性是目前应用最广泛的一类抗病毒基因工程策略。本研究以栽培小麦品种小偃 22、千斤早、西农 979、扬麦 18 和扬麦 12 为材料,应用基因枪介导黄矮病毒外壳蛋白基因(BYDV-GPV-CP)和抗除草剂 Bar 基因、对小麦幼胚愈伤组织进行共转化,同时在基质中添加不同浓度的多效唑,优化遗传转化体系,提高转化苗的移栽成活率,获得 BYDV-GPV-CP 基因转化苗,以为小麦抗病毒遗传改良研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 受体材料 供试的受体材料为小麦品种小偃 22、千斤早、西农 979、扬麦 18 和扬麦 12 的幼胚愈伤组织。

1.1.2 载体和引物 载体:含有 BYDV-GPV-CP 基因和 Bar 基因的 pMCG161 质粒。

引物:BYDV-GPV-CP 基因的特异引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,5'端引物序列为:ATGAATTCAGTAGGCCCTAGA;3'端引物序列为:CTATTTGGGAGTCATGTTGGC。

1.1.3 培养基 供试培养基类型、用途及附加成分详见表 1。

收稿日期:2022-01-15

基金项目:铜仁市六大主导产业中园林元素与休闲农业融合发展创新团队(铜职院办发[2020]118号)。

第一作者:崔志钢(1985—),男,硕士,副教授,从事园艺技术和农业生物技术研究。E-mail:279949107@qq.com。

表 1 培养基

培养基用途	基本培养基	附加成分
愈伤组织诱导	SD <sub>2</sub>	2,4-D 2.0 mg•L <sup>-1</sup> + 琼脂 5.0 g•L <sup>-1</sup>
高渗	MS	山梨醇 0.2 mol•L <sup>-1</sup> +甘露醇 0.2 mol•L <sup>-1</sup> + 琼脂 6.0 g•L <sup>-1</sup>
恢复	SD <sub>2</sub>	2,4-D 2.0 mg•L <sup>-1</sup> +琼脂 5.0 g•L <sup>-1</sup>
筛选分化	1/2MS	KT 1.0 mg•L <sup>-1</sup> +NAA 1.0 mg•L <sup>-1</sup> +琼脂 5.0 g•L <sup>-1</sup> +Bialaphos 2 mg•L <sup>-1</sup>
生根	1/2MS	NAA 0.5 mg•L <sup>-1</sup> +琼脂 5.0 g•L <sup>-1</sup> +Bialaphos 2 mg•L <sup>-1</sup>
壮苗	1/2MS	琼脂 5.0 g•L <sup>-1</sup> +Bialaphos 2 mg•L <sup>-1</sup>

注:所有培养基 pH 均为 5.8,且所有培养基均添加 30 g•L<sup>-1</sup>蔗糖,并采用高温高压灭菌;筛选剂 Bialaphos 采用过滤灭菌,待培养基冷却至 40~50 ℃时加入,以防 Bialaphos 变质降解。

1.2 方法

1.2.1 幼胚愈伤组织诱导 材料处理及接种方法参照权军利等<sup>[16]</sup>的方法。

剥取直径 1 mm 左右的幼胚,接种到幼胚愈伤组织诱导培养基上,24 ℃遮光培养 9 d。

1.2.2 高渗处理 基因枪轰击前将在诱导培养基上诱导 9 d 的小麦幼胚愈伤组织按原生长方向转移到高渗培养基上。高渗培养基使用 9 cm 直径的培养皿盛装,愈伤组织摆放在中央直径 3 cm 左右,进行 4~6 h 高渗处理,使愈伤组织处于质壁分离状态,以降低愈伤组织接受轰击时受到的损伤程度。

1.2.3 微弹制备 基因枪轰击试剂用量参照权军利等<sup>[16]</sup>的方法。每枪金粉用量分别为 60 μg•枪<sup>-1</sup>,质粒 DNA 用量 1.0 μg。取 4 ℃保存的金粉(直径 1 μm),按表 2 用量加入,再分别加入 CaCl<sub>2</sub>、亚精胺和质粒 DNA;混合后涡旋振荡 5 min,室温静置 10 min,10 000 r•min<sup>-1</sup>离心 30 s,弃上清;500 μL 70%乙醇洗涤微弹载体及管壁,室温静置 15 min 后 10 000 r•min<sup>-1</sup>离心 30 s,弃上清;加入 1 mL 无水乙醇重悬沉淀,10 000 r•min<sup>-1</sup>离心 30 s,弃上清;按每枪 10 L 用量加入无水乙醇稀释金粉微弹;密闭储存于 4 ℃备用,使用时吸取 10 μL DNA 微弹悬液,均匀涂在承载膜上,吹干备用。试验过程中所用质粒 DNA 均采用碱裂解法提取获得。

表 2 每枪试剂的用量

试剂	浓度	用量/μL
金粉	30 μg•μL <sup>-1</sup>	2
DNA	1 μg•μL <sup>-1</sup>	1
CaCl <sub>2</sub>	2.5 mol•L <sup>-1</sup>	5
亚精胺	0.1 mol•L <sup>-1</sup>	2

1.2.4 基因枪转化 基因枪轰击的相关操作参照孔娜<sup>[17]</sup>的方法进行。基因枪轰击后在原高渗

培养基上继续对幼胚愈伤组织进行高渗处理 16~18 h。在高渗处理后 2 h 内,将愈伤组织及时转移至恢复培养基上,进行 14 d 暗恢复培养。

1.2.5 筛选分化 对恢复 14 d 后的愈伤组织用 1/2MS 附加 KT 1.0 mg•L<sup>-1</sup>和 NAA 1.0 mg•L<sup>-1</sup>筛选分化培养基筛选再生,在温度 24 ℃、3 000 lx、每天光照 10 h 条件下筛选分化培养 30 d。

1.2.6 生根壮苗 待幼胚愈伤组织分化出的绿芽长至 2 cm,将绿芽转入生根培养基上,直到小苗伸长并分蘖(24 ℃、光强 3 000 lx、光照 10 h•d<sup>-1</sup>)。待到小苗伸长到 4~5 cm 时,将小苗移入壮苗培养基(表 1)上壮苗(24 ℃、3 000 lx,每天光照 10 h)。再生苗生长到苗高 6~8 cm,根系较为健壮时,分别移入培养钵(添加含多效唑 2.0, 4.0 和 6.0 mg•L<sup>-1</sup>营养液)中,4 ℃左右光照春化培养,春化时间根据不同材料有所不同,经 18~30 d 春化后移入大田。

1.2.7 转化苗的 PCR 检测 取筛选得到的小麦抗性再生苗的叶片,CTAB 法提取叶片基因组 DNA,进行 PCR 检测<sup>[18]</sup>。

BYDV-GPV-CP 基因扩增条件为:94 ℃,预变性 5 min;94 ℃变性 60 s,55 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 70 s,35 个循环;72 ℃延伸 10 min;4 ℃保存 15 min。

2 结果与分析

2.1 基因枪转化小麦幼胚愈伤组织结果

通过优化小麦幼胚愈伤组织基因枪转化再生体系,建立了以小麦幼胚愈伤组织为受体,以 BYDV-GPV-CP 基因为目的基因的小麦基因枪转化体系。通过 9 d 的小麦幼胚愈伤组织诱导,基因枪轰击金粉用量为 60 μg•枪<sup>-1</sup>,使用添加 NAA 1.0 mg•L<sup>-1</sup>和 KT 1.0 mg•L<sup>-1</sup>的 1/2 MS 分化培

培养基,经愈伤组织诱导、基因枪轰击、筛选分化、多效唑处理、移栽等多个步骤,共获得成活的抗性苗81株,愈伤组织诱导率达99.71%。获得3株共转化苗,共转化率为0.86%。

2.2 不同基因型小麦的愈伤组织诱导率

由表3可知,不同基因型小麦幼胚材料愈伤组织诱导效果差异很大。相同条件下,小偃22、千斤早、西农979、扬麦18和扬麦12的愈伤组织诱导率分别为96.57%、89.71%、89.14%、99.71%和96.00%。单因素方差分析结果显示,扬麦18愈伤组织平均块数与西农979和千斤早存在显著差异,千斤早和西农979之间无显著差异。扬麦18的幼胚愈伤组织诱导率最高。

表3 不同基因型小麦愈伤组织的诱导率和再生苗率					
品种	接种幼胚数量	愈伤组织平均块数	愈伤组织诱导率/%	平均再生苗数	再生苗率/%
小偃22	350	338 abA	96.57	17 abcA	5.03
千斤早	350	314 bA	89.71	10 bcA	3.18
西农979	350	312 bA	89.14	7 cA	2.24
扬麦18	350	349 aA	99.71	26 aA	7.45
扬麦12	350	336 abA	96.00	21 abA	6.25

注:不同大小写字母分别表示  $P<0.01$  或  $P<0.05$  水平差异显著。

2.3 不同基因型小麦的再生苗率

由表3可知,相同条件下,扬麦18、扬麦12、小偃22、千斤早和西农979的基因枪转化再生苗率分别为7.45%、6.25%、5.03%、3.18%和2.24%,单因素方差分析显示扬麦18、扬麦12和小偃22的平均再生苗数显著高于千斤早和西农979。

2.4 多效唑处理对再生苗生长的影响

在营养钵基质中添加不同浓度多效唑溶液处理再生苗。使用含有 $4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 多效唑(图1A)的壮苗培养基处理15株再生苗,再生苗叶片较为宽厚,浓绿,植株矮壮,分蘖较多,平均分蘖数为6.47;相比之下,使用含 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 多效唑(图1B)的壮苗培养基处理的15株植株叶片细长、瘦弱,生长速度过快,平均分蘖数为2.33;使用含 $6.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 多效唑(图1C)的培养基培养的15株再生苗虽然植株最为健壮,但是分蘖减少或不分蘖,生长过于缓慢,平均分蘖数为1.20。以上结果说明过高浓度的多效唑将会对再生苗产生毒害,反而抑制其生长。不同浓度多效唑处理后的再生苗生长发育情况详见图1。

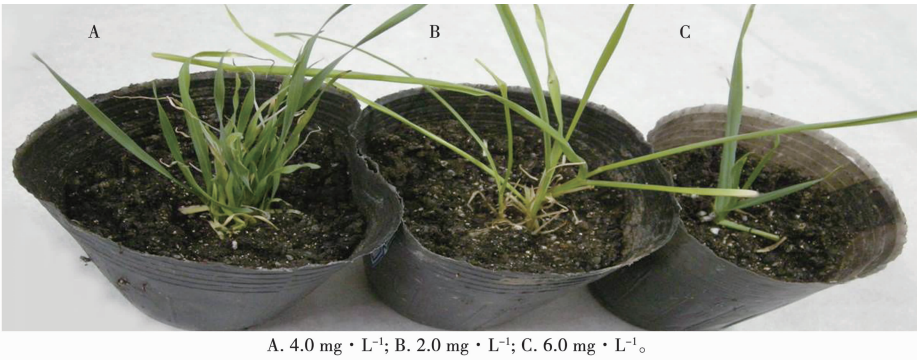


图1 添加不同浓度多效唑培养的再生苗

3 讨论

史勇等<sup>[19]</sup>证实在添加多效唑和连续继代培养条件下,成功地实现了矮败小麦F<sub>1</sub>花粉植株越冬,证明在越冬培养过程中, $4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 多效唑表现出的延缓生长作用较 $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 更好,并未见存在毒害作用。本试验在此基础上,证实在基质中添加 $4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 多效唑进行培养,可以有效促进壮苗和增加分蘖,提高再生苗的生长势,较多的分蘖可以拆分栽培,为后继试验提供一定的材料保障。

早期的基因枪法转化小麦的转化频率大约为1%左右<sup>[20]</sup>,随着研究者对转化过程中各种参数的优化,转化率有所提高。本试验获得了3株含BYDV-GPV-CP和Bar基因的转化苗,共转化率为0.86%。而彭琳<sup>[21]</sup>采用基因枪共转化法,将线性DREB4A基因和Bar基因转入受体小麦济麦19,两个基因共转化率为0.18%,推测这种差异可能与携带目的基因质粒载体在受体基因组中的重组整合能力和试验过程中的环境条件有关。

4 结论

本研究证实基因型对小麦幼胚材料愈伤组织诱导影响较大,对接受基因枪轰击的幼胚愈伤组织分化再生有显著影响。在再生苗培养基质中添加 4 mg·L<sup>-1</sup> 多效唑可以有效促进壮苗和增加分蘖。

参考文献:

[1] VASIL V, CASTILLO A M, FROMM M E, et al. Herbicide resistance fertile transgenic wheat plants obtained by micro-projectile bombardment of regenerable embryo-genic callus [J]. *Biotechnology*, 1992, 10(7): 667-674.

[2] 王华忠, 邢丽萍, 陈佩度. 小麦抗白粉病相关基因的转化 [J]. *遗传*, 2007(2): 243-249.

[3] OKUBARA P A, BLECHL A E, MCCORMICK S P, et al. Engineering deoxynivalenol metabolism in wheat through the expression of a fungal trichothecene acetyltransferase gene[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2002, 106: 74-83.

[4] BLECHL A E, ANDERSON O D. Expression of a novel high-molecular-weight gluten subunit gene in transgenic wheat[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 875-879.

[5] 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.

[6] ROOKE L, BÉKÉS F, FIDO R, et al. Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength [J]. *Journal of Cereal Science*, 1999, 30: 115-120.

[7] SESTILI F, JANNI M, DOHERTY A, et al. Increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the SBella genes[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 144-164.

[8] 董福双, 张艳敏, 杨帆, 等. 小麦芽生长点的基因枪转化技术研究[J]. *华北农学报*, 2009, 24(5): 1-6.

[9] 张晓东, 李冬梅, 徐文英, 等. 用基因枪将除草剂 Basta 抗性

基因与小麦 HMW 谷蛋白亚基因导入小麦获得转基因植株[J]. *华北农学报*, 1997(1): 134-137.

[10] 陈梁鸿, 王新望, 张晓东, 等. 基因枪转化小麦不同受体的研究[J]. *华北农学报*, 1998(1): 2-6.

[11] 周森平, 余桂红, 孙晓波, 等. 基因枪共转化将拟南芥 DREB2A 基因和 bar 基因导入小麦[J]. *江苏农业学报*, 2009, 25(6): 1224-1228.

[12] 王海凤. 不同品种小麦幼胚组织培养再生性能及基因枪介导的遗传转化研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011: 52.

[13] 郑博. 基因枪法介导拟南芥 *AtMYB44* 基因转化小麦的研究[D]. 合肥: 安徽大学, 2013: 52.

[14] 孙啸. 大豆抗逆相关转录因子基因 *GmDREB3* 的功能分析及启动子的克隆[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2007: 1-9.

[15] 张文斌, 安德荣, 任向辉. 中国小麦黄矮病的发生及综合防控研究进展[J]. *麦类作物学报*, 2009, 29(2): 361-364.

[16] 权军利, 何玉科, 陈耀锋, 等. 普通小麦基因枪转化高效受体系统的建立[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2007(7): 117-122.

[17] 孔娜. 耐盐相关基因 HAL1 在烟草、小麦上的遗传转化研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.

[18] 李春霞, 李宏飞. CTAB 法高效提取苹果叶片 DNA 的研究[J]. *北方园艺*, 2009(2): 49-52.

[19] 史勇, 白延红. 有机添加物对矮败小麦 F<sub>1</sub> 可育株花药培养及花培苗越冬的影响[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2010, 38(5): 73-79.

[20] VASIL V, SRIVASTAVA V, CASTILLO A M, et al. Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos[J]. *Nature Biotechnology*, 1993, 11: 1553-1558.

[21] 彭琳. DREB4A 和 W17 转录因子基因对小麦的遗传转化及相关研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.

Gene Gun Mediated BYDV GPV-CP and Bar Genetic Transformation to Wheat Immature Embryo Callus

CUI Zhi-gang<sup>1</sup>, WANG Kun<sup>1</sup>, ZHAO Hui-fang<sup>1</sup>, CHEN Yao-feng<sup>2</sup>

(1. College of Agronomy, Tongren Polytechnic College, Tongren 554300, China; 2. College of Agronomy, Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** In order to optimize wheat genetic transformation system and improve the efficiency of genetic transformation by gene gun, we used immature embryo callus as receptor materials which induced nine days come from Xiaoyan 22, Qianjinzaio, Xinong 979, Yangmai 18, Yangmai 12 as materials, and used gene gun to co-transform BYDV-GPV-CP gene and herbicide resistance Bar gene into wheat immature embryo callus. Experiments confirmed that, under the same conditions, immature embryo callus induction rate of five different genotypes is significant difference. Confrontational plants had the most tillering with 4 mg·L<sup>-1</sup> Paclobutrazol, the number reached 6. 47. The results showed that adding 4. 0 mg·L<sup>-1</sup> paclobutrazol to the medium could effectively promote seedling growth and increase tillering.

**Keywords:** gene gun; callus; genotype; regeneration plants