

TaCHP耐盐转基因小麦新种质创制

刘晓华, 王敏琴*, 夏光敏

山东大学生命科学院, 植物细胞工程与种质创新教育部重点实验室, 济南250100

摘要: 为提高小麦的耐盐性,以农杆菌介导的生长点转化法将TaCHP基因导入小麦品种‘济南17’和‘济麦22’中。经潮霉素涂抹和PCR检测, T₀代转基因植株的阳性率分别为6.7%和5.8%; T₁代阳性率为11.1%和19.0%; T₂代阳性率为4.3% (JN17, 1个株系)和9.4% (JM22, 5个株系)。转基因株系现已种植到T₅代, 遗传分析表明该基因已在T₅代转基因株系中稳定表达。T₅代阳性株系显示了明显耐盐性, 已进行盐碱地的安全性中间试验。抗逆生理指标分析显示, NaCl胁迫下, 与亲本小麦对照相比, 转基因株系的脯氨酸含量升高, MDA含量降低, POD和CAT酶活都有所增加。表明TaCHP基因通过渗透调节和维持氧化还原稳态提高了小麦对盐胁迫的耐受性。

关键词: 普通小麦; 盐胁迫; TaCHP基因; 生长点转化; 转基因植株

Creation of New Transgenic Wheat Germplasm with Salt Tolerance of TaCHP

LIU Xiao-Hua, WANG Min-Qin*, XIA Guang-Min

The Key Laboratory of Plant Cell Engineering and Germplasm Innovation, Ministry of Education, School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: To obtain salt tolerant wheat, a salt-tolerance TaCHP gene was introduced into two wheat varieties ‘Jinan17’ (JN17) and ‘Jimai22’ (JM22) under *Agrobacterium* inoculum to shoot apical meristem of wheat seedling. 29 (JN17) and 32 (JM22) T₀ transgenic plants were obtained by hygromycin resistant and the PCR identification respectively. The average transformation efficiency of T₀ generation was 6.7% and 5.8% in two wheat varieties respectively. The transformation frequency of T₁ generation was 11.1% and 19.0% respectively. The positive transgenic rate of T₂ was 4.3% and 9.4% individually. Genetic analysis shows that one transgenic line of JN17 and five transgenic lines of JM22 in T₂ transgenic plants were obtained. Now, the positive transgenic plants have been cultivated to T₅ generation and showed more salt tolerance than control plants grown on salt-alkaline area. The salt tolerance analysis of the transgenic lines shows that the proline content in the transgenic wheat was higher than in control, the MDA content was lower in the transgenic wheat than in control. With the increasing of salinity, the activity of POD and CAT were higher in the transgenic wheat than in negative control.

Key words: wheat (*Triticum aestivum* L.); salt tolerance; TaCHP gene; transformation of shoot apical meristem; transgenic plant

小麦(*Triticum aestivum* L.)是世界上分布最广、最重要的粮食作物之一,为人们提供了丰富的能量和蛋白质。随着环境的日益恶化,小麦等粮食作物的种植和产量受到严重限制,据统计我国有可利用潜力的盐渍土面积约 1.33×10^7 hm²,占全国耕地面积的10%左右(王佳丽等2011)。利用转基因技术培育抗盐性小麦品种,改良作物对盐胁迫的耐受性,在未来农业生产中应用前景广阔。

转基因技术突破了传统育种种质资源交流的限制,增强了小麦育种种质资源的利用和育种改良技术的可操作性(欧巧明等2005)。自1993年Vasil等利用基因枪法将GUS/Bar基因转入小麦愈

伤组织,获得了可育转基因植株以来,人们尝试通过基因枪、农杆菌介导、花粉管通道及PEG介导等方法转化小麦,涉及的受体材料包括幼胚、成熟胚、花药愈伤组织、幼穗、芽尖和花器官等(欧巧明等2005;叶兴国等2011)。在抗病虫害、耐盐、旱、涝及冷逆境胁迫,品质改良等转基因小麦研究中取得了许多突破(薛哲勇等2003; Zhao等

收稿 2013-06-04 修定 2013-06-19

资助 国家转基因专项(2011ZX08002-002)。

* 通讯作者(E-mail: minqinwang2002@sdu.edu.cn; Tel: 0531-88364997)。

2006; 张彦等2012)。

与其他禾本科植物相比, 小麦转基因的成功率非常低, 主要原因是小麦愈伤组织培养及高频再生受到外植体来源、基因型及培养基组成等多种因素影响, 成为限制获得可育转基因植株的“瓶颈”(Filippov等2006; Ren等2010)。为了避开转基因技术对组织培养的过分依赖, Zhao等(2006)利用农杆菌介导的茎生长点转化法(transformation by *Agrobacterium* inoculum to shoot apical meristem), 首次获得转 β -1,3-葡聚糖酶基因的可育小麦转基因株系, 经PCR、Southern和Northern检测证明该基因已整合到小麦基因组中, 转基因植株对白粉病表现一定抗性。Supartana等(2006)尝试用蘸有农杆菌的细针穿刺浸泡1 d的小麦种子芽尖部位, 2 d后进行灭菌和春化处理, Southern杂交鉴定出5个农艺性状表现差异的转基因株系。梁欣欣等(2007)通过农杆菌介导的茎尖转化法实现*DREB1A*基因导入小麦。Yang等(2008)用农杆菌侵染刺伤处理的小麦幼苗芽尖, 比较了苗龄和农杆菌侵染时间对小麦茎尖转化效率的影响。董福双等(2009)利用基因枪轰击芽生长点法, 将*BADH*基因导入小麦获得T₁代抗性转基因植株。赵同金等(2010)通过农杆菌介导, 将大麦Mlo反义基因导入小麦获得了具有白粉病抗性的转基因株系, T₀代平均转化率达13.58%, 体现了生长点转化法简单、快速、高效的特点。胡晓晴等(2013)比较了农杆菌介导的小麦芽生长点和分蘖节遗传转化, 认为芽生长点法高于分蘖节法的转化率。

‘山融3号’(Shanrong No.3, SR3)是本实验室构建的高产耐逆小麦体细胞杂种新品种, 通过对SR3及其亲本‘济南177’(Jinan 177, JN177)经不同时间盐胁迫后不同组织的诱导表达谱分析, 发现一个在SR3和JN177中有明显特异表达的锌指蛋白(zinc finger protein)基因*TaCHP* (Li等2010)。前期的实验结果表明, *TaCHP*受胁迫诱导, 其在小麦和拟南芥的过表达导致转基因株系耐逆能力明显上升。本实验采用农杆菌介导的小麦茎尖生长点转化技术, 获得了稳定遗传的转基因株系。表型、遗传及理化分析表明, 转基因小麦株系耐盐性明显高于亲本对照株系, 已经用于生物安全性中间试验。

材料与方法

1 实验材料

1.1 受体材料

选用山东省推广种植的优质小麦(*Triticum aestivum* L.)品种‘济南17’(Jinan17, JN17)及‘济麦22’(Jimai22, JM22) (由山东省农业科学院作物所提供)为受体。

1.2 表达载体

将本实验室前期从SR3 cDNA中克隆到的*TaCHP*基因(Li等2010), 经过限制性内切酶(*Sac*I和*Kpn*I)双酶切连接到pUN1301载体上构成pUN-1301-ubi-*TaCHP*, 并转化大肠杆菌DH5 α 完成载体构建, 经测序无误后转化农杆菌(Li等2010)。

1.3 药品与试剂

克隆基因所用的引物合成及测序由上海生工公司完成。凝胶回收试剂盒, 质粒提取试剂盒购自上海生工公司。RNA提取所用的TRIzol、DNA聚合酶、限制性内切酶、DNA Marker等购自TaKaRa公司。过氧化氢酶检测试剂盒购自碧云天公司。M-MLV反转录酶由Promega公司生产。Southern杂交所用尼龙膜为Amershan Biosciences公司生产的Hybond-N⁺, 试剂盒为ROCHE生产的DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I。

2 实验方法

2.1 受体材料的准备

取饱满的JN17和JM22小麦种子, 0.1%升汞灭菌15 min, 无菌水冲洗4~5遍, 加少量无菌水, 于摇床(200 rpm)振荡浸泡12 h, 摆放在湿润无菌滤纸上使其萌发, 置于4 °C暗培养, 春化28~30 d。

2.2 农杆菌浸染液的制备

从YEP平板上挑取农杆菌的单菌落, 接种于液体YEP培养基(含50 mg·L⁻¹卡那霉素+50 mg·L⁻¹利福平)中, 于28 °C、200 rpm培养到OD₆₀₀=0.8~1.0, (1 359~2 124)×g离心15 min, 弃上清液, 沉淀用等体积的含100 μmol·L⁻¹乙酰丁香酮(actosyringone, AS)的无菌水重新悬浮, 备用。

2.3 小麦茎尖生长点转化

用75%酒精擦拭过的刀片, 沿胚芽中轴切开至基部, 去除一侧胚芽鞘和未展开的幼叶, 使生长点暴露并造成创伤, 用注射器吸取侵染液, 滴于生

长点处,反复侵染操作2~3次,具体转化方法参见Zhao等(2006)和赵同金等(2010)。将幼苗置于无菌培养皿中,室温下,暗培养3 d,光照培养至新叶长出后,移栽于土壤中。

3 转基因小麦的筛选和分子检测

3.1 转基因植株的抗生素筛选

移栽入土的转化植株生长3周后,用100 mg·L⁻¹的潮霉素 B (hygromycin B, Hyg)溶液涂抹其新生叶片,并对涂抹部位进行标记,2 d涂抹1次,每次均在标记处进行,共进行2周。待T₀代植株生长到4~5片叶时,剪取Hyg抗性植株的新生叶片进行PCR检测,以后每代均进行PCR阳性植株检测。

3.2 T₁~T₅代转基因株系的PCR检测

用改良的CTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide)法(Doyle和Doyle 1990)提取T₁~T₅代转基因株系基因组DNA,根据Ubiquitin启动子和*TaCHP*基因序列设计PCR检测引物UTA (5'-TTTATGATTAGAGTCCCGC-3')和TF8S (5'-TTAGC-CATTCTCCCATC-3'),扩增片段大小为751 bp。反应体系为20 μL,PCR扩增程序:94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35个循环; 72 °C 10 min。以1.0%琼脂糖凝胶100~120 V稳压电泳(北京六一仪器厂, DYY-8C型电泳仪) 20 min, 溴化乙锭 (ethidium bromide, EB)染色10 min, 用自来水冲洗干净,置于凝胶成像仪(UVP Biospectrum Ac System with Gel Camera)上照相观察。

收获的阳性T₀代种子种植于花盆中,对T₁植株进行PCR阳性检测并单穗收获种子;将收获的T₁代种子种植于实验室温室中进行加代,同时进行T₂代转基因PCR阳性植株测定并单株、单穗收获T₂代种子。

3.3 耐盐转基因小麦T₃~T₅代的盐碱地种植筛选

为了检验转*TaCHP*基因植株在盐碱地的生长状态,挑选所得的6个转基因纯系的部分T₂代转基因植株和亲本小麦的种子,于2010年10月至2011年6月(T₃代)、2011年10月至2012年6月(T₄代)及2012年10月至2013年6月(T₅代)种植于山东省林科院东营实验站盐碱试验田中(含盐量0.3%~0.4%, pH 8),每代种子均单株/穗收获。每年从来源于JN17和JM22的6个转基因株系中分别随机选取部分植株进行PCR阳性检测。

3.4 转基因小麦T₅代的RT-PCR检测

选取T₅代PCR阳性的转基因株系和亲本对照植株,用2.1的方法萌发后培养于1/2Hoagland培养液中,待其生长至三叶期,以含200 mmol·L⁻¹ NaCl的1/2Hoagland培养液分别处理植株24 h后,取植株根系0.02 g,液氮速冻并保存于-80 °C,用于提取总RNA。以Olig (dT)为引物,参照M-MLV反转录酶说明书反转录cDNA。小麦*B-Actin*内参引物为*TaActin-A*: 5'-GAACCTCCACTGAGAACAACAT-TACC-3'; *TaActin-S*: 5'-GTTCCAATCTATGAGG-GATACACGC-3'; *TaCHP*基因及上游启动子引物为UTA: 5'-TTTATGATTAGAGTCCCGC-3'; TF8S: 5'-TTAGCCATTCTCCCATC-3'。反应体系20 μL,PCR扩增程序:94 °C, 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35个循环; 72 °C, 10 min, 10 °C保存。电泳、染色并观察同3.2。

3.5 转基因小麦T₅代的Southern杂交分析

取PCR和RT-PCR检测为阳性的转基因植株基因组DNA 120 μg,经HindIII单酶切,以亲本小麦作为阴性对照,质粒pUN1301-ubi-*TaCHP*为阳性对照,0.8%的琼脂糖凝胶电泳后,用碱变性真空吸印,转至尼龙膜上。根据*GUS*基因序列设计探针。具体操作参见DIG试剂盒说明书。探针长度为570 bp。

4 T₅代转基因小麦耐盐性分析

4.1 转基因小麦实验室水培耐盐性分析

选取T₄代转基因株系和亲本小麦种子用2.1的方法萌发并培养于1/2Hoagland培养液中,待其生长至三叶期,用含200 mmol·L⁻¹ NaCl的1/2Hoagland培养液处理14 d,观察植株形态改变。

4.2 转基因植株耐盐生理指标测定

选取经RT-PCR及Southern杂交为阳性的T₄代转基因株系及亲本小麦的种子,用2.1的方法萌发后,培养于1/2Hoagland培养液中,待其生长至三叶期,进行NaCl处理,浓度分别为0、100和200 mmol·L⁻¹,为防止盐激作用,每2 d以50 mmol·L⁻¹浓度递增,直到预定浓度,然后处理7~10 d,观察叶片及根的生长状态并进行耐盐生理指标测定。

4.2.1 脯氨酸(proline, Pro)含量测定 实验操作参照张殿忠等(1990)方法。取RT-PCR及Southern杂交为阳性的T₅转基因和亲本小麦的新鲜叶片0.5 g,

加3%磺基水杨酸5 mL,充分研磨,经加热、离心,取上清液,即为Pro粗提液。加入酸性茚三酮并加热后,溶液即呈红色,再用甲苯萃取,色素则全部转移至甲苯中。色素的深浅与Pro含量呈正相关。在520 nm波长下比色。从标准曲线上查出(或用回归方程计算)Pro的含量。

4.2.2 丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量测定 采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛的含量(林植芳等1984)。分别剪取RT-PCR及Southern杂交为阳性的T₅转基因和亲本小麦叶片0.4 g,加入5 mL 5%三氯乙酸(TCA)和少量石英砂充分研磨,9 168×g离心10 min,所得上清液即为样品提取液。取2 mL提取液,加入等体积的0.67%硫代巴比妥酸溶液,加热处理。迅速冷却、离心、取上清液。测量450 nm、532 nm和600 nm处的OD值(A),以水代替提取液调零。以 $C=6.45 \times (OD_{532} - OD_{600}) - 0.56 \times OD_{450}$ (C:MDA的浓度, $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)公式,根据植物组织的鲜重($\text{FW} \cdot \text{g}^{-1}$)计算测定样品中MDA的含量:MDA浓度 [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (FW)]=C×提取液体积(mL)×0.001。

4.2.3 过氧化氢酶(catalase, CAT)活性 采用碧云天公司生产的过氧化氢酶检测试剂盒测定,编号S0051。

4.2.4 过氧化物酶(peroxidase, POD)测定 实验操作参照高俊凤(2006)方法。分别剪取RT-PCR及Southern杂交为阳性的T₅转基因和亲本小麦叶片0.5 g (W),加入2 mL的0.05 mol·L⁻¹的磷酸缓冲液(pH=7.8),冰浴研磨,4 °C离心取0.02 mol·L⁻¹上清液(a),比色(pH=7.8的磷酸缓冲液为对照)。加入3

mL (V)的反应液后,每隔1 min (t)读取一次470 nm下的OD值。按此公式计算POD活性:POD总活性 [$\text{nm} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (FW)]= $\Delta OD_{470} \times V \times (a \times W \times t)^{-1}$ 。

5 数据分析

用SPSS 17.0 Statistics (Statistical Product and Service Solutions)对所得到的各项生理指标进行数据的统计学分析。

实验结果

1 转TaCHP基因T₀~T₅代阳性植株的获得及分析

经Hyg涂抹及PCR检测获得T₀代阳性转基因植株29 (JN17)和32 (JM22)株。阳性率分别为6.7%和5.8%。将获得的T₀代阳性种子种下,T₁代转基因PCR测定阳性率分别为11.1%和19.0%。T₂代转基因PCR阳性检测率分别4.3% (JN17的1个株系, No. 25)和9.4% (JM22的5个株系, No. 86、148、167、255和420)。从T₃代起选取6个纯合转基因株系的部分植株种植在山东省林科院东营实验站盐碱试验田中,所选植株均经PCR测定为阳性。将阳性植株单穗收获。现已得到稳定遗传至T₅代的6个转基因株系。T₀~T₂代转基因植株PCR检测阳性率统计结果如表1。图1表示进行茎尖生长点转化的操作流程。图2为部分T₀代阳性植株的Hyg涂抹筛选、PCR检测结果及东营盐碱地种植的T₅代转基因植株(JN17的No.25)。东营盐碱地的转基因株系表现为株高比亲本小麦高,分蘖数增加(统计数据未显示)。实验及统计结果还显示,种植于盐碱地的转基因株系的生理指标、农艺性状及产量等优于亲

表1 生长点法T₀~T₂代PCR检测为阳性转基因小麦的统计结果

Table 1 The PCR results of T₀-T₂ of transgenic plants

亲本品种	T ₀ 代转基因植株				T ₁ 代转基因植株		T ₂ 代转基因植株	
	Hyg阳性率/%	PCR阳性植株数	PCR阳性率/%	结穗率/%	PCR阳性率/%	结穗率/%	PCR阳性率/%	结穗率/%
JN17	62.8	29	6.7	34.5	11.1	100.0	4.3	100
JM22	52.2	32	5.8	65.6	19.0	87.5	9.4	100

本对照(统计数据未显示)。

2 部分T₅代转基因小麦RT-PCR分析

选取T₅代5个阳性株系来源的部分植株进行RT-PCR,转基因株系中均有TaCHP基因mRNA表达,并高于亲本小麦对照(图3),表明外源基因能够

在转基因株系中稳定表达。

3 部分T₅代转基因小麦的Southern杂交结果

选取部分T₅代阳性转基因小麦植株(JN17的No. 25-2-5、JM22的No. 86-3-2、148-2-1、167-3-6和255-2-4)进行Southern杂交(图4),结果显示

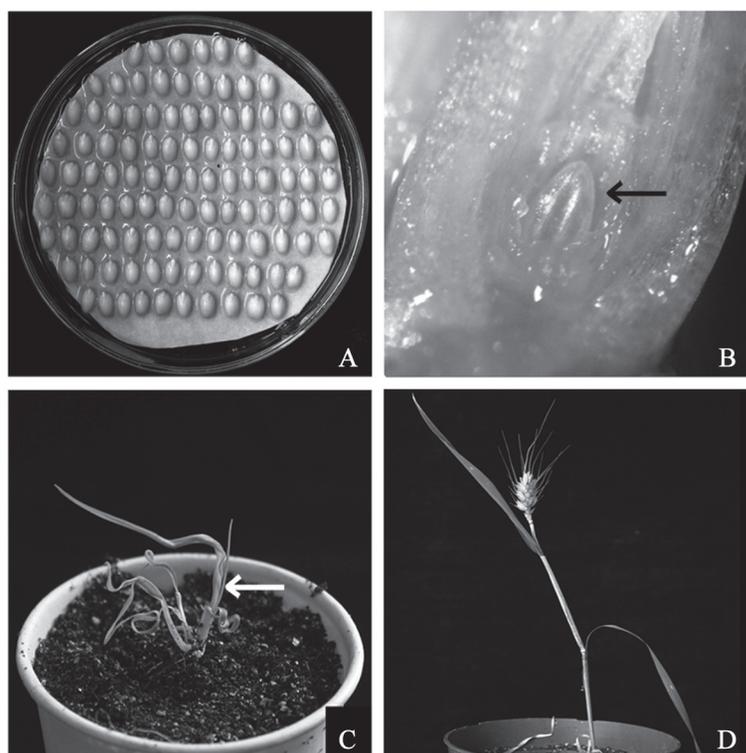


图1 小麦生长点转化法的操作流程

Fig.1 Wheat transformation by *Agrobacterium* inoculum to shoot apical meristem

A: 摆放在培养皿中萌发的种子; B: 种苗纵切暴露出生长点(箭头示生长点); C: 生长点转化后移栽入土的幼苗(箭头示新长出的幼叶); D: 抽穗的T₀代阳性植株。

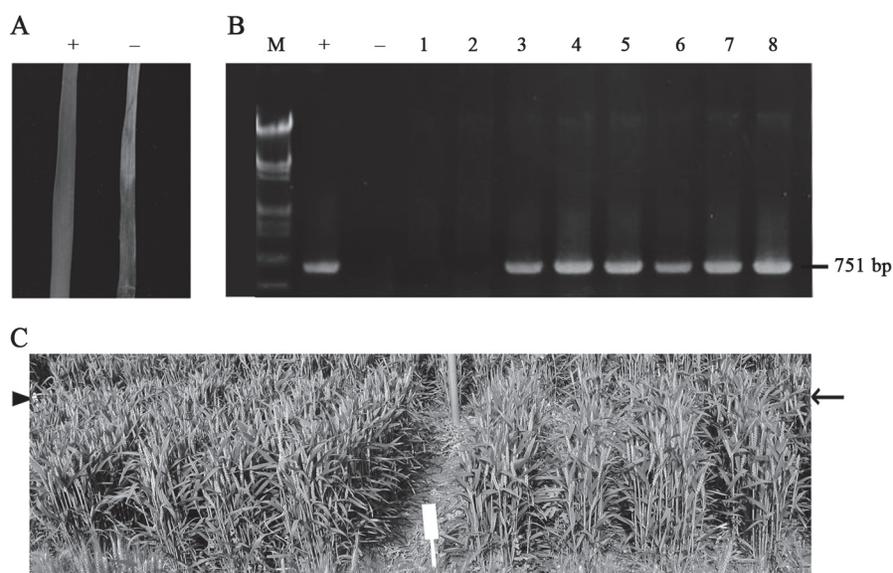


图2 转基因植株的筛选及T₅代盐碱地中间试验

Fig.2 The selection of transgenic plant and intermediate test of T₅ generations in salinity-alkalinity soil of Dongying

A: Hyg涂沫的转基因及亲本小麦的叶片(+: 潮霉素抗性植株, -: 潮霉素敏感亲本小麦); B: 部分T₀代阳性植株PCR结果(M: λDNA/*EcoRI*+*Hind*III marker; +: 阳性质粒; -: 水; 1~2: 亲本小麦JN17、JM22; 3~4: JN17转基因阳性株系No. 21、33; 5~8: JM22转基因阳性株系No. 51、148、179和189); C: 种植在东营盐碱土中的T₅代转基因株系及亲本小麦, 箭头“▶”所指为转基因株系(JN17的No. 25), 箭头“←”所指为亲本(JN17)对照。

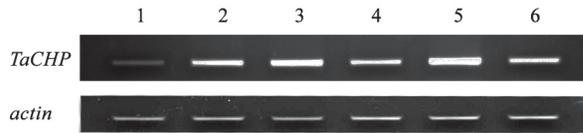


图3 T_5 代部分转基因株系RT-PCR结果

Fig.3 The RT-PCR result of *TaCHP* gene in T_5 transgenic wheats

1: 亲本对照; 2~6: 转基因株系JN17的No. 25-2-5、JM22的No. 86-3-2、148-2-1、167-3-6和255-2-4。

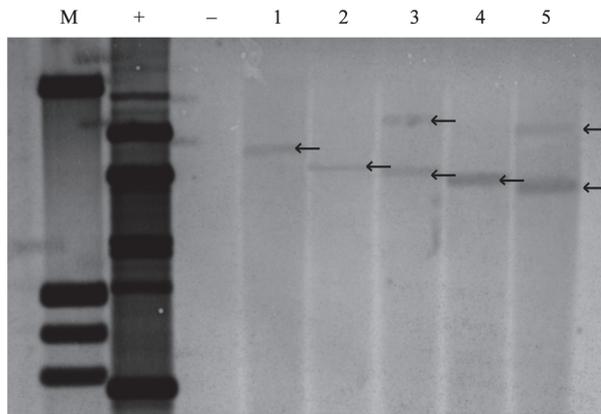


图4 T_5 代阳性植株Southern杂交结果

Fig.4 The Southern blotting profile of T_5 positive transgenic plants

M: λ DNA/*EcoRI*+*HindIII* marker; +: 阳性质粒pUN1301-ubi-*TaCHP*对照; -: 亲本小麦对照; 1: JN17的No. 25-2-5; 2~5: JM22的No. 86-3-2、148-2-1、167-3-6和255-2-4转基因株系。

RT-PCR检测呈阳性的株系, Southern杂交后均表现阳性, 而亲本对照无杂交信号。其中, 来源于JN17的No. 25-2-5、JM22的No. 86-3-2和167-3-6中

*TaCHP*基因是以单拷贝形式整合到受体基因组中; 来源于JM22的148-2-1和255-2-4以双拷贝形式整合入受体基因组中。

4 T_5 代转基因小麦耐盐性分析

4.1 转基因水培植株耐盐性分析

取部分转基因植株(JN17的No. 25-2-5)和亲本对照植株, 用 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl溶液处理14 d后, 观察植株形态变化。与转基因植株相比, 亲本小麦植株发育明显受到抑制, 植株萎蔫瘦小, 叶尖变黄(图5-A, 1), 根较短(图5-B, 1), 呈盐胁迫的表型; 而转基因植株生长基本正常, 植株挺拔强壮, 叶片色绿(图5-A, 2), 根系明显长于亲本小麦植株(图5-B, 2), 表明在实验室水培及NaCl处理下, 转基因株系对盐胁迫有更强的耐受性。

4.2 T_5 代转基因植株生理指标测定

4.2.1 转基因植株叶片中Pro含量分析

未施加NaCl处理时, 转基因株系及亲本小麦的Pro含量没有明显差异, 含量介于 $(130\sim 170)\times 10^{-6} \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)之间; 随着NaCl浓度的升高, 转基因及亲本小麦植株中脯氨酸含量均有增加(图6-A), 当NaCl处理浓度达 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时转基因小麦中Pro平均含量为 $1\ 026\times 10^{-6} \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), 此时亲本对照中Pro含量约为 $720\times 10^{-6} \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), 差异极其显著($P<0.01$), $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理下6个转基因株系JN17的No. 25-2-5, JM22的No. 86-3-2、148-2-1、167-3-6、255-2-4和420-3-1比亲本对照Pro含量分别增加了47%、53%、33%、29%、65%和29%。说明转基因小麦积累脯氨酸能力更强, 其适应渗透调节能力更强。

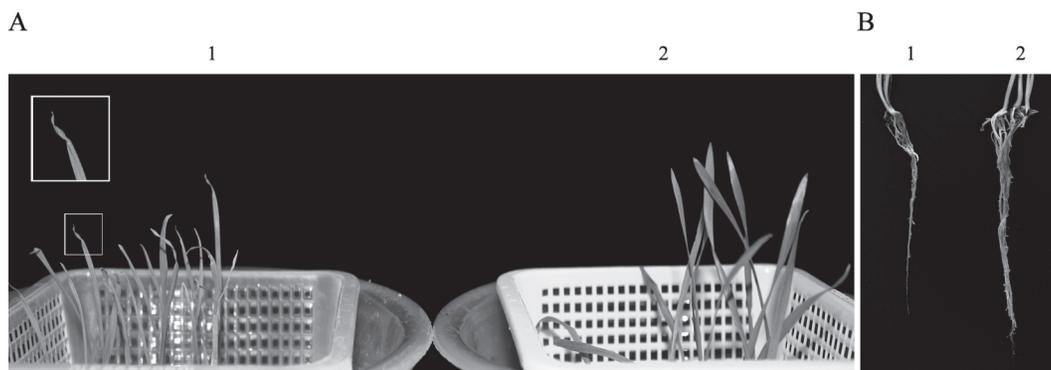


图5 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理14 d后转基因小麦与亲本对照生长状态的比较

Fig.5 Comparing the growth status of transgenic plants (JN17, No. 25-2-5) and their control under $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl treatment for 14 days

A: 叶片的生长状态; B: 根的生长状态; 1: 亲本对照; 2: 转基因株系JN17的No. 25-2-5。

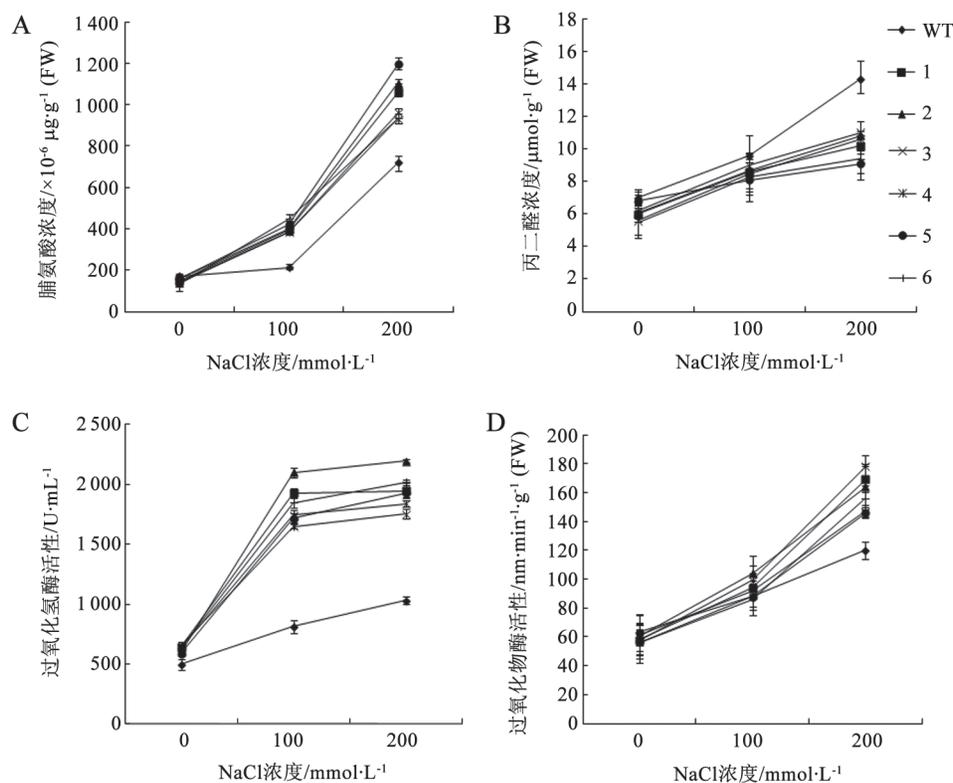


图6 T₃代转基因小麦生理指标测定

Fig.6 Determination of physiological indexes on effects of salt stress of transgenic wheat

NaCl处理后转基因与对照株系叶片中A: Pro含量测定; B: MDA含量测定; C: CAT酶活性变化; D: POD酶活性变化。图中WT: 亲本株系; 1~6: JN17的No. 25-2-5、JM22的No. 86-3-2、148-2-1、167-3-6、255-2-4和420-3-1。

4.2.2 转基因植株叶片中MDA含量分析 图6-B示转基因与亲本小麦植株叶片中MDA含量的测定结果。NaCl处理前(0 mmol·L⁻¹ NaCl), 转基因与亲本小麦植株MDA含量差异不大, 约为5.4~7 μmol·g⁻¹。经100 mmol·L⁻¹ NaCl处理, 转基因植株叶片中MDA含量介于8~9.2 μmol·g⁻¹, 亲本对照叶片中MDA含量升高至9.6 μmol·g⁻¹, 差异不显著($P>0.05$); 200 mmol·L⁻¹ NaCl处理后, 转基因植株叶片中MDA含量增至9~11 μmol·g⁻¹, 6个转基因株系(JN17的No. 25-2-5、JM22的No. 86-3-2、148-2-1、167-3-6、255-2-4和420-3-1)分别比0 mmol·L⁻¹ NaCl处理时增加202%、265%、190%、168%、228%和218%; 而亲本对照植株叶片中CAT酶活性为813 U·mL⁻¹, 比0 mmol·L⁻¹ NaCl处理组增加63.5% 两者差异显著($P<0.01$)。经200 mmol·L⁻¹ NaCl处理, 转基因与亲本对照植株叶片中CAT平均酶活性分别为1 947 U·mL⁻¹和1 032 U·mL⁻¹, 比100 mmol·L⁻¹ NaCl处理组CAT酶活性均略有上升, 增长趋势相似。

4.2.3 转基因植株中CAT和POD酶活性分析 CAT酶活性测定结果如图6-C。0 mmol·L⁻¹ NaCl处理下, 转基因植株叶片中CAT平均酶活性为624 U·mL⁻¹, 亲本植株叶片中为497 U·mL⁻¹。以100 mmol·L⁻¹ NaCl处理后, 转基因植株叶片中CAT的平均酶活性为1 831 U·mL⁻¹, 比0 mmol·L⁻¹ NaCl处理组提高107%两者差异显著($P<0.01$)。6个转基因株系(JN17的No. 25-2-5、JM22的No. 86-3-2、148-2-1、167-3-6、255-2-4和420-3-1)分别比0 mmol·L⁻¹ NaCl处理时增加202%、265%、190%、168%、228%和218%; 而亲本对照植株叶片中CAT酶活性为813 U·mL⁻¹, 比0 mmol·L⁻¹ NaCl处理组增加63.5% 两者差异显著($P<0.01$)。经200 mmol·L⁻¹ NaCl处理, 转基因与亲本对照植株叶片中CAT平均酶活性分别为1 947 U·mL⁻¹和1 032 U·mL⁻¹, 比100 mmol·L⁻¹ NaCl处理组CAT酶活性均略有上升, 增长趋势相似。

图6-D为POD酶活性测定结果, 随着NaCl处理浓度的逐渐增高, 转基因小麦叶片的平均愈创木

酚-POD活力分别为59、93和159 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), 亲本对照株系分别为56、88和120 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。转基因植株经100及200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理后, 叶片中POD酶活性比亲本对照平均提高6.6%和32.8%, 其中200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理后6个转基因株系(JN17 No. 25-2-5、JM22 No. 86-3-2、148-2-1、167-3-6、255-2-4和420-3-1)分别比对照亲本株系增加40%、36%、22%、48%、21%和30%。

转基因株系在NaCl胁迫下POD、CAT两种抗氧化酶类增加量均比亲本株系大, 说明转基因植株具有较强的氧自由基清除能力。

讨 论

1 影响转化效率的因素

农杆菌介导的小麦茎尖转化是近几年发展起来的实验技术, 具有易于取材、操作简便、转化率高等优点。避免了组织培养周期长、对受体基因型依赖性强、植株再生困难等限制(Zhao等2006)。要提高小麦农杆菌茎尖转化的效率应注重以下几方面操作: (1)单子叶植物不是农杆菌的天然宿主, 要提高农杆菌对单子叶植物的感染性, 对受体人为造成机械损伤是农杆菌侵入细胞的重要条件。生长点位于芽轴的顶端, 其细胞不断分裂、分化产生新的芽结构, 使芽轴伸长。本实验用刀片对小麦幼芽进行纵切, 暴露生长点并适度在生长点上造成创面, 操作中既要防止切面过深而切掉生长点, 又要将生长点充分暴露并产生伤口达到受体与农杆菌的充分互动, 实现外源基因遗传转化的目的。(2)张明洲等(2006)认为, 菌液浓度对高粱茎尖分生组织细胞中的*GUS*基因瞬时表达频率影响显著。本研究发现菌液浓度对小麦茎尖分生组织的转化效率影响显著, 最佳侵染菌液浓度应维持在 $\text{OD}_{600}=0.1\sim 0.2$ 。由于切割后的小麦茎尖分生组织与农杆菌的共培养时间长达7~10 d, 直至新的幼叶长出后才能移栽入土(图1-C), 在此过程中农杆菌大量增殖。如果侵染初期使用的农杆菌侵染液浓度过高, 茎尖细胞受到农杆菌的伤害过度, 新叶不易长出, 而且根部常被过度增殖的农杆菌菌液包裹导致植株烂根死亡。(3)因幼芽切割和其后的共培养过程不能保证环境为严格的无菌状态, 幼芽培养液易被杂菌污染, 使转基因植株

的成活率降低, 故在共培养过程应经常查看幼芽, 如发现农杆菌增殖过快或受到杂菌污染, 可用无菌水冲洗幼芽, 以提高转基因幼苗移栽的成活率。(4)切割出茎尖分生组织的过程使大部分已生成的幼叶被破坏, 共培养实质上是幼苗恢复和新叶形成的过程, 当叶原基分化出的新叶展开, 可充分进行光合作用保证植株生长所需时, 才可将幼苗移栽入土, 移栽中应注意不使土壤覆盖住新生的叶片。通过这些实际操作可显著提高转基因幼苗的成活率并保证转化效率。

2 影响目的基因稳定性的原因

获得的转基因植物能否保持外源基因的稳定性的, 即能否稳定地遗传给后代, 直接关系到基因工程新品种的培育。本实验观察统计了 T_0 代阳性植株的结穗数及穗粒数, 其中阳性植株的结穗率只有46.8%, 均没有分蘖, 平均穗粒数为3.3粒, 转基因植株生长缓慢, 矮小。而对照植株平均穗粒数36以上, 分蘖能力强。可能原因是对茎尖切割转基因处理使生长点因机械损伤及农杆菌侵染而受到严重伤害, 打断了幼苗的正常生长进程, 必须重新分化幼叶, 以重建植株形态。因新生幼叶在分生组织生长和发育阶段就受到外界环境的影响, 从而造成了植株矮小、生长缓慢, 进而导致结实率低下。由表1知, T_2 代转基因植株PCR检测阳性率明显低于 T_1 代, T_1 代转基因阳性率明显低于 T_0 代, 意味着大量 T_0 代阳性植株中目的基因并没有经 T_1 代稳定遗传至 T_2 代。茎尖转化法得到纯合的不发生分离的转基因后代需要经过几代连续的阳性筛选, 原因如下: 茎尖转化获得的当代转基因植株由多细胞嵌合体组成。从细胞水平看小麦生殖发育形成的小穗原基、小花原基、苞叶原基和种子等由转基因细胞和非转基因细胞形成的嵌合体组成。小麦为自花授粉植物, T_1 代转基因嵌合体植株在营养生长和生殖生长过程中, 会形成纯合的转基因后代(T_1 代种子)。但外源基因在植物核基因组中整合时远比常规育种复杂, 常规育种是染色体水平上的重组及同源染色体单体在减数分裂过程中的交换, 其遗传规律明确(王关林和方宏筠1998)。而外源基因的转移, 对于受体基因组而言应该是一种“干扰”, 生物体必定要作出反应(张福泉等2000)。整合位点的复杂性导致有性繁殖过程

的遗传规律比较复杂。阎新甫等(1994)指出保持整合外源基因的完整性是实现基因转化的基本条件。但外源基因的整合涉及到基因的缺失、易位、倒位及重复等一系列的结构变化,这种外源基因的重排既对基因的表达调控有重要影响,也可导致整合位点多、拷贝数多、整合的遗传效应复杂等(Das和Bhowmik 1997)。本实验Southern杂交显示(图4), T_5 代中不同株系仍有单拷贝和双拷贝外源基因的插入事件,推测在转基因初期(T_0)可能存在着外源的多拷贝插入。 T_0 ~ T_2 代连续出现转基因阳性植株检出率降低也说明外源基因在受体细胞中经历着一个复杂的过程,它与转化细胞的有丝分裂及减数分裂异常相关,使外源基因在受体中呈现逐渐稳定的过程。正如张福全等(2000)认为的转基因植物性状的逐渐稳定实质上是植物体的一种“排异本能”的反应。此外,在 T_0 代共培养过程中,转基因植株上常有农杆菌残留,导致检测时 T_0 代阳性率较高。植株的顶端分生组织由叶原基和芽原基包裹,而生殖器官的分化较晚,所以只有外源基因成功导入茎顶端分生组织细胞,才能得到稳定遗传的转基因后代。如果只有叶原基或芽原基被转化,则形成 T_0 代的假阳性植株,其后代无法检测到外源基因。解决方法是使用机械手段适度损伤生长点,使农杆菌与茎尖分生组织细胞充分互作。同时应注意对每代阳性转基因植株进行PCR测定并对所得高代转基因植株进行RT-PCR(或real-time PCR)测定及Southern杂交验证,才能确保转基因成功。

3 转基因植株的耐盐性分析

盐胁迫对植物的伤害包括离子胁迫、渗透胁迫及这两种胁迫导致的二级胁迫如活性氧胁迫等。廖宝文等(2010)指出,植物体内的抗逆生理指标随逆境胁迫的大小而变化,是细胞结构和功能遭受伤害的反映,也反映了植物对逆境的适应能力。盐渍条件下,植物通过渗透调节来减轻或避免伤害(李敏等2012)。多个研究显示,植物受到盐胁迫时会积累高水平的渗透调节物质如脯氨酸等以降低细胞的渗透势,保持细胞内水分的平衡而不至于外流,从而维持细胞内渗透压的平衡和稳定(Singh等1972)。Vendruscolo等(2007)证明干旱、高渗等逆境会导致小麦体内脯氨酸浓度的迅

速积累,从而增强小麦的抗逆性。本实验中转基因小麦经 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理后,Pro含量约为 $0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理组的7倍左右,是亲本小麦的1.43倍(图6-A)。转基因株系中Pro积累水平明显高于亲本对照,这对转基因植株维持较高的细胞膨压和细胞吸水能力非常重要。He等(2010)将耐盐基因*betA*导入小麦,使盐胁迫下转基因株系Pro含量较亲本株系升高76%,与本研究结果类似。

植物细胞膜对维持细胞的微环境和正常的代谢起着重要作用。MDA是膜脂过氧化的产物可与蛋白质氨基酸残基反应生成烯胺并造成蛋白质交联。MDA含量的高低反应细胞质膜的完整性,是衡量膜脂过氧化的指标(文镜等2003)。Takahashi和Asada(1983)认为植物遭受干旱、低温等逆境胁迫时,活性氧(ROS)会剧烈增加,若不及时清除将对细胞产生毒害作用,比如攻击膜脂中的不饱和键引发膜脂过氧化,而膜脂过氧化程度可用MDA的含量变化加以显示。本试验中, $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理后亲本小麦株系中MDA平均含量为转基因株系的1.4倍,转基因株系及亲本小麦对照经 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理后MDA平均含量分别比相应 $0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理组增加了69%和104%(图6-B),转基因株系的MDA平均含量增长较亲本缓和,抵抗逆境胁迫带来的膜脂过氧化能力更强,这与我们在该基因过表达拟南芥中的结果一致(Zhao等2012)。与此类似,Du等(2013)对*TaSIP*转基因水稻在盐胁迫下MDA含量测定,也发现转基因株系MDA比亲本株系增加量低。

盐胁迫会打乱植物体正常的代谢活动,导致植物体内过氧化氢(H_2O_2)、单线态氧($^1\text{O}_2$)等生物活性物质(reactive oxygen species, ROS)大量迸发,若不及时清除将对细胞产生毒害作用,如攻击膜脂中的不饱和键引起膜脂过氧化等,使植株活性氧代谢失调(Hasegawa等2000)。植物内源保护酶类,如过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)能够抑制细胞过氧化,提高植物的耐盐性,减轻活性氧的伤害(Gao等2008; Cadet等2010)。不同细胞会含有一种或几种抗氧化剂来清除ROS对细胞产生的毒害作用(Suzuki和Mittler 2006)。本研究中, $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理后,转基因株系中CAT和POD平均酶活性分别比 $0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理组增加了

211%和169%, 而200 mmol·L⁻¹ NaCl处理的亲本小麦比0 mmol·L⁻¹ NaCl亲本小麦植株中CAT和POD活性增加63.5%和114%。100 mmol·L⁻¹ NaCl和200 mmol·L⁻¹ NaCl处理组中转基因株系的CAT和POD平均酶活性均比相应亲本小麦中高, 且差异显著(图6-C、D)。Suzuki和Mittler (2006)认为, 植物以最经济的方式利用淬灭ROS的酶类来应对环境变化, 在整个代谢网络中, 由ROS通过直接激活相关的转录因子, 或通过激活其他代谢途径重要酶类而调节非生物胁迫条件下胁迫信号的传导。本实验结果预示NaCl胁迫会引发转基因植株中ROS大量产生, 作为转录因子的*TaCHP*基因受到ROS调控, 产生大量的基因产物, 间接促使细胞中与氧化代谢相关的POD、CAT等酶类活性提高。而非转基因株系中, 虽然细胞受氧化胁迫但其应激产生的POD、CAT等酶类活性提高程度不如转基因株系。综上, 所获转*TaCHP*基因的小麦株系可能通过渗透调节、活性氧的去除两个方面来提高受体植株的耐盐性。

参考文献

- 董福双, 张艳敏, 杨帆, 梁新朝, 刘桂如, 王海波(2009). 小麦芽生长点的基因枪转化技术研究. 华北农学报, 24 (5): 1~6
- 高俊凤(2006). 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社
- 胡晓晴, 郭丽羨, 武海娜, 赵艳红, 王小龙, 王睿辉, 刘桂茹(2013). 农杆菌介导的小麦芽生长点和分蘖节遗传转化研究. 中国农学通报, 29 (3): 36~41
- 李敏, 张健, 李玉娟, 谈峰, 丛小丽(2012). 植物耐盐生理及耐盐基因的研究进展. 江苏农业科学, 40 (10): 45~48
- 梁欣欣, 刘录祥, 赵林姝, 张举仁, 郭会君, 赵世荣, 郑企成(2007). 农杆菌介导法向小麦茎尖导入*DREB1A*基因的研究初报. 麦类作物学报, 27 (1): 16~19
- 廖宝文, 邱凤英, 张留恩, 管伟, 李玫(2010). 盐度对尖瓣海莲幼苗生长及其生理生态特性的影响. 生态学报, 30 (23): 6363~6371
- 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 孙谷畴, 郭俊彦(1984). 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系. 植物学报, 26 (6): 605~615
- 欧巧明, 陈玉梁, 张正英, 倪建福 (2005). 小麦转基因技术研究进展及其在育种中的应用. 中国农学通报, 21 (1): 41~45
- 王佳丽, 黄贤金, 钟太洋, 陈志刚(2011). 盐碱地可持续利用研究综述. 地理学报, 66 (5): 673~684
- 王关林, 方宏筠(1998). 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社
- 文镜, 张春华, 董雨, 郭豫(2003). 蛋白质羰基含量与蛋白质氧化损伤. 食品科学, 24 (10): 153~157
- 薛哲勇, 支大英, 夏光敏, 马秀玲, 张慧, 赵彦修(2003). 根癌农杆菌介导*AtNHX1*基因转化小麦. 山东大学学报(理学版), 38 (1): 106~109
- 阎新甫, 刘文轩, 王胜军, 王西成, 王锡锋(1994). 大麦DNA导入小麦产生抗白粉病变异的遗传研究. 遗传, 16 (1): 26~30
- 叶兴国, 陈明, 杜丽璞, 徐惠君(2011). 小麦转基因方法及其评述. 遗传, 33 (5): 422~430
- 张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤(1990). 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法. 植物生理学报, 4 (1): 62~65
- 张福泉, 蒋建雄, 李宗道, 郑思乡, 周光宇(2000). 棉花DNA导入苧麻引起变异的研究. 中国农业科学, 33 (1): 104~106
- 张明洲, 崔海瑞, 舒庆尧, 夏英武(2006). 高粱茎尖再生体系及其遗传转化影响因子的研究. 核农学报, 20 (1): 23~26
- 张彦, 喻修道, 唐克轩, 夏兰琴(2012). 用基因枪法获得转基因南星基因*aha*抗蚜虫小麦. 作物学报, 38 (7): 1~6
- 赵同金, 刘恒, 赵双宜, 陈惠民, 夏光敏(2010). 农杆菌介导的大麦Mlo反义基因转化小麦获得抗白粉病后代. 植物生理学通讯, 46 (7): 731~736
- Alexandria S, Paula RM, Tim O, Leslie ES, Bryan P (2002). The induced sector *Arabidopsis* apical embryonic fate map. Development, 12: 3403~3410
- Cadet J, Douki T, Ravanat JL (2010). Oxidatively generated base damage to cellular DNA. Free Radical Biol Med, 49: 9~21
- Das RK, Bhowmik G (1997). Some somaclonal variants in pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] plants obtained from different propagation techniques. Inter J of Trop Agric, 15 (14): 95~100
- Doyle JJ, Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13~15
- Du HY, Shen YZ, Huang ZJ (2013). Function of the wheat *TaSIP* gene in enhancing drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* and rice. Plant Mol Biol, 81 (1): 417~429
- Filippov M, Miroshnichenko D, Vernikovskaya D, Dolgov S (2006). The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. Plant Cell Tiss Org, 84: 213~222
- Gao C, Wang Y, Liu G, Yang C, Jiang J, Li H (2008). Expression profiling of salinity-alkali stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Tamarix hispid*. Plant Mol Biol, 66 (3): 245~258
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnerts HJ (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 51 (1): 463~469
- He CM, Yang AF, Zhang WW, Gao Q, Zhang JR (2010). Improved salt tolerance of transgenic wheat by introducing *betA* gene for glycine betaine synthesis. Plant Cell Tiss Organ Cult, 101 (1): 65~78
- Li C, Lv J, Zhao X, Ai X, Zhu X, Wang M, Zhao S, Xia G (2010). *TaCHP*: a wheat zinc finger protein gene down-regulated by abscisic acid and salinity stress plays a positive role in stress tolerance. Plant Physiol, 154 (1): 211~221
- Ren JP, Wang XG, Yin J (2010). Dicamba and sugar effects on callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of wheat. Agri Sci China, 9 (1): 31~37
- Singh TN, Aspinal D, Palley LG (1972). Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: a potential metabolic measure of drought resistance. Nature New Bio, 236: 188~190
- Supartana P, Shimizu T, Nogawa M, Shioiri H, Nakajima T, Haramoto N, Nozue M, Kojima M (2006). Development of simple and ef-

- efficient *in planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Biosci Bioeng, 102 (3): 162~170
- Suzuki N, Mittler R (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol Plantarum*, 126: 45~51
- Takahashi MA, Asda K (1983). Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Arch Biochem Biophys*, 226 (2): 558~566
- Vasil V, Srivastavu V, Castillo AM (1993). Rapid production of transgenic wheat of cultured immature embryos. *BioTechnol*, 11: 1553~1558
- Vendruscolo ECG, Schuster I, Pileggi M, Scapim CA, Molinari HBC, Marur CJ (2007). Stress induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Plant Physiol*, 64 (10): 367~376
- Yang B, Ding LP, Yao L, He GY, Wang YS (2008). Effect of seedling ages and inoculation durations with *Agrobacterium tumefaciens* on transformation frequency of the wheat wounded apical meristem. *Mol Breed*, 6 (2): 358~362
- Zhao TJ, Zhao SY, Chen HM, Zhao QZ, Hu ZM, Hou BK, Xia GM (2006). Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling. *Plant Cell Rep*, 25: 1199~1204
- Zhao X, Wang MC, Quan TY, Xia GM (2012). The role of *TaCHP* in salt stress responsive pathways. *Plant Signal Behav*, 7 (1): 1~4