

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00422

小麦转基因方法及其评述

叶兴国, 陈明, 杜丽璞, 徐惠君

中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081

摘要: 小麦是遗传转化比较困难的作物之一。为了克服小麦基因工程育种和功能基因组学研究的障碍, 人们分别尝试利用基因枪、花粉管通道、超声波、离子束注入、激光微束穿刺、PEG(Polyethylene glycol)、电击和农杆菌等方法转化小麦, 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。文章对小麦主要遗传转化方法及其应用进行了介绍、回顾和评述, 分析、比较了获得安全型转基因小麦的几种策略, 以期增强读者对小麦转基因技术和进展的了解, 促进小麦转化技术的持续改进和提高。

关键词: 小麦; 遗传转化

Description and evaluation of transformation approaches used in wheat

YE Xing-Guo, CHEN Ming, DU Li-Pu, XU Hui-Jun

Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Genetic transformation is a valuable tool for direct crop improvement and functional genomics study. Unfortunately, wheat is considered as a recalcitrant plant to genetic transformation due to its low efficiency and genotype dependency. To overcome these problems, various transformation methods such as biolistic bombardment, *Agrobacterium tumefaciens*, pollen-tube pathway, ion implantation, laser microbeams puncture, treatment with polyethylene glycol and ultrasonic wave, and electroporation have been reported in wheat using various types of explants including immature embryos, mature embryos, anthers derived calluses, inflorescences, apical meristems, and other floral organs. In this review, several major transformation approaches and their applications in wheat are reviewed, and potential strategies for the development of safe transgenic wheat plants are discussed. The objective of this review is to provide an update on current status of wheat transformation, and to stimulate further research for improving transformation efficiency in wheat.

Keywords: wheat; genetic transformation

小麦是世界上重要的粮食作物之一, 与社会经济发展、粮食安全供给和人类营养健康密切相关。遗传改良是提高小麦产量和品质的主要环节, 目前小麦品种改良仍然主要采用常规杂交育种途径, 但传统育种方法存在周期长、性状改良不显著和范围

窄等缺点。基因工程育种作为杂交育种的主要补充手段, 已经在大豆、玉米、棉花和油菜等作物中取得了巨大成功, 赋予了这些作物本身所不具备的抗除草剂、抗虫等性状^[1]。相比之下, 小麦属于异源六倍体植物, 基因组庞大, 重复序列多, 再生能力差,

收稿日期: 2010-10-09; 修回日期: 2010-12-04

基金项目: 国家重大科技专项(编号: 2008ZX08010-004)资助

作者简介: 叶兴国, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 小麦生物技术育种。E-mail: yexg@mail.caas.net.cn

网络出版时间: 2011-04-02 17:53:03

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110402.1753.005.html>

遗传转化比较困难,这可能是小麦基因工程育种速度缓慢的主要原因。自1992年以来人们尝试利用多种转化方法和多种外植体转化小麦,转化方法包括基因枪、农杆菌、花粉管通道、超声波法、离子束注入法、激光微束穿刺法和PEG(Polyethylene glycol)法等,外植体包括幼胚、成熟胚、花药愈伤组织和幼穗等,探讨了农杆菌介导的植株水平转化,取得了一定进展,促进了功能基因向小麦中的转化。

1 小麦基因枪转化

基因枪法也称为粒子轰击(Microprojectile bombardment),其原理是将载有外源基因的金(钨)等颗粒借助动力(如氦气等)射入植物细胞。目前主要应用的是Bio-Rad公司生产的PDS-1000/He基因转化系统。组织培养和植株再生是基因枪转化植物的基础。影响基因枪转化的因素包括:(1)基因枪轰击参数。如压力大小、粒子速度、轰击距离、轰击次数、DNA纯度及浓度、CaCl₂及亚精胺浓度等;(2)生物因子。如外植体类型、细胞生理状态、轰击前后的培养条件、筛选程序和抗性植株再生率等。基因枪转化小麦研究开始早,应用比较成功。

1992年Vasil等^[2]以小麦幼胚愈伤组织为受体材料,利用基因枪介导法将*bar*基因导入了小麦,获得了世界上第一例转基因小麦植株。Weeks等^[3]于1993年、Nehra等^[4]于1994年利用基因枪介导法分别将*GUS*基因、*bar*基因导入了小麦,建立了基因枪转化小麦幼胚的技术体系。随后,利用基因枪转化小麦幼胚技术,Becker等^[5]将*GUS*基因和*bar*基因同时导入了小麦,Zhou等^[6]将*CP4*基因和*GOX*基因导入了小麦,Altpeter等^[7]、Ortiz等^[8]、Takumi等^[9]、Witzens等^[10]分别将*GUS*基因、*bar*基因、*CP*基因和*hpt*基因转入了小麦,完善了基因枪法转化小麦幼胚的技术体系。利用该转化技术,Altpeter等^[11]、Blechl等^[12]、Barro等^[13]、陈梁鸿等^[14]、Rooke等^[15]分别将编码高分子量谷蛋白亚基1*Ax1*、1*Dx5*、1*Dy10*基因导入了小麦,为利用基因工程手段改良小麦加工品质奠定了基础。在抗病虫方面,徐惠君等^[16]将*Nib8*复制酶基因导入了小麦,梁辉等^[17]将*GNA*基因导入了小麦,Okubara等^[18]将*FsTR1101*基因转入了小麦,获得的转基因小麦对黄花叶病毒病、蚜虫和赤霉病表现较强抗性或一定抗性。为了进一步提高基因枪转化小

麦幼胚效率,Pellegrineschi等^[19]对129个来自同一组合的Bobwhite姊妹系进行了转化能力鉴定,其新鲜幼胚在含15%麦芽糖培养基上高渗处理后用基因枪轰击,SH98110、SH9829、SH9897、SH9896、SH9856、SH9826等Bobwhite姊妹系转化率高达60.8%~73.8%。Taiichi等^[20]以水稻乙酰乳酸合酶(Acetolactate synthase, *ALS*)突变体作为筛选标记,基因枪转化小麦基因型Bobwhite S-26新鲜幼胚获得了转基因植株,转化率达16.7%。最近,Sestili等^[21]利用基因枪转化技术沉默了淀粉合成途径中的*SBella*基因,提高了硬粒小麦支链淀粉的含量。

用于基因枪转化的外源目标基因需要构建到质粒载体上才能完成转基因事件,表达载体上除了含有目标基因表达盒以外,通常还携带植物筛选标记基因表达盒(如*bar*基因、*hpt*基因、*nptII*基因等)和细菌筛选标记基因表达盒(如*bla*基因、*aadA*基因、*nptII*基因等)等骨架序列,转化过程完成后这些元件在植物中的存在就变的多余,给转基因植物的进一步试验和评价带来了隐患。为此,Fu等^[22]设计了基因枪介导的最小表达框转化技术,即从表达载体上酶切回收包括启动子、目标基因和终止子在内的目标基因表达框,与标记基因载体或表达框混合共转化,并利用基因枪将*bar*、*GUS*和*hpt*基因线状表达盒转入水稻,证明该转化技术获得的转基因植株中外源基因拷贝数低、整合方式简单。随后,在水稻中进一步验证了基因枪介导的线状DNA转化技术,将抗虫基因转入水稻后抗虫蛋白表达量提高^[23]。Yao等^[24]参考水稻基因枪无载体骨干序列转化技术,开展了线状DNA表达框转化小麦研究,对获得的转基因小麦进行了遗传分析。Shi等^[25]利用该技术在小麦中成功进行了小麦高分子量麦谷蛋白亚基编码基因1*Ax1*的过表达,证明利用基因枪向小麦转化线状DNA的确可行。

尽管基因枪转化在小麦中的应用比较广泛,但基因枪介导法存在转化效率比较低、插入外源DNA片段不明确、导入大片段DNA困难、成本高、操作复杂等缺点,因此,有必要加强农杆菌转化小麦的研究。

2 小麦离体组织农杆菌转化

农杆菌包括根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)和发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*),同

属于革兰氏阴性土壤杆菌,前者携带Ti质粒,后者携带Ri质粒,二种质粒上都含有一段可以转入植物细胞中的T-DNA(Transfer DNA),农杆菌侵染植物后伴随着T-DNA的进入,构建到T-DNA上的目标基因即被带入植物,进一步进入细胞核,整合到染色体上。自1983年农杆菌介导转化烟草获得成功以来,农杆菌转化法一直是植物遗传转化的主要方法。Hess等^[26]、Mooney等^[27]率先对农杆菌转化小麦进行了尝试,但未能获得转基因植株。1997年,Cheng等^[28]在配制CM4C培养基的基础上,利用农杆菌转化小麦首次获得了转基因植株,为利用农杆菌介导法向小麦导入功能基因奠定了基础。随后,许多学者对农杆菌介导法转化小麦的影响因素进行了研究,并将一些目标基因转入了小麦,转化效果和重复性逐步提高,基因型和外植体逐步拓宽。

2.1 幼胚外植体农杆菌转化

在所有小麦组织培养外植体中,幼胚再生性最强,所以目前利用农杆菌介导法转化小麦的大多数报道基本上都以幼胚为受体。Cheng等^[28]以小麦Bobwhite基因型为材料,利用携带*nptII*基因和*GUS*基因的C58(ABI)农杆菌菌株侵染小麦幼胚首次获得了转基因植株,Southern分析表明外源基因在35%的植株中为单拷贝整合,在多数T₁代株系中的分离符合孟德尔遗传规律。夏光敏等^[29]、叶兴国等^[30]利用农杆菌介导法相继将*npt II*、*bar*、*GUS*等外源基因转入了小麦,获得了转基因植株。Khanna等^[31]以小麦基因型Veery5的幼胚为受体,利用携带超级双元表达载体pHK21(含有额外*VirB*、*VirC*、*VirG*基因)的LBA4404菌株转化小麦幼胚,通过在分化培养基中添加0.1M亚精胺,植株再生率由7.0%提高到24.2%,平均转化率由1.2%提高到3.9%。Cheng等^[32]的研究表明,对农杆菌侵染后的小麦幼胚在共培养过程中进行干燥处理能有效促进T-DNA的转移,转基因植株中单拷贝整合占67%。Hu等^[33]以来源于农杆菌的抗除草剂基因*EPSPS*为选择标记,用农杆菌菌株CP4(*aroA*:CP4)侵染预培养4d的Bobwhite幼胚,将*EPSPS*基因导入了小麦,平均转化率4.4%,分子检测表明*EPSPS*基因在46%的T₁代植株中符合孟德尔遗传规律,单拷贝插入占67%。Zhou等^[34]利用农杆菌介导法将抗除草剂的Roundup基因转入了Bobwhite,培育

了Roundup Ready转基因小麦,该小麦对除草剂表现完全抗性。叶兴国等^[35]利用农杆菌介导法将几丁质酶基因和 β -1,3-葡聚糖酶双价基因(*GCE*)导入了扬麦10号和Bobwhite,转化效率分别为1.4%和1.0%,抗病性鉴定结果表明,转基因植株对赤霉病具有一定抗性。Wu等^[36]利用MG/L液体培养基培养携带辅助质粒(含*VirG*、*VirB*、*VirC*基因)的农杆菌菌株AGL1,在添加400 μ mol/L乙酰丁香酮的CM4C液体培养基中重悬后转化四倍体硬粒小麦新鲜幼胚,获得了0.6%~9.7%的转化率。利用相似方法转化春小麦和冬小麦新鲜幼胚,转化率为0.3%~9.0%^[37]。

2.2 成熟胚外植体农杆菌转化

小麦幼胚虽然再生能力强,但取材受时间、种植条件和季节的限制,受体材料由于生物因素和非生物因素的影响,导致幼胚在生理状态上很不一致,一定程度制约了小麦基因工程育种和功能基因组学研究。小麦成熟胚取材方便,不受季节、环境条件和植株发育状况等因素的限制,个体间生理状态一致,是开展小麦遗传转化较为方便的外植体。但是,小麦成熟胚植株再生率非常低,限制了成熟胚在小麦遗传转化中的应用。Khurana等^[38]利用携带Act1-BI121载体的农杆菌LBA4404转化四倍体硬粒小麦成熟胚愈伤组织获得了转基因植株,组织化学染色结果证实外源基因已整合到小麦基因组中。Patnaik等^[39]分别利用携带Act1-BI121、p35SGUSINT双元表达载体的LBA4404农杆菌侵染小麦成熟胚及其愈伤组织,PCR和Southern分析证实外源基因已整合到小麦基因组中。Ding等^[40]利用含pBI121载体的LBA4404农杆菌侵染小麦成熟胚,以组织化学染色检测和分子检测结果为依据,对农杆菌转化的影响因素进行了探讨,认为干燥条件下共培养有利于农杆菌对小麦细胞的侵染。Wang等^[41]利用携带pUN-GUS载体的C58C1农杆菌侵染轮选987、豫麦66、扬麦6号和Bobwhite等小麦基因型成熟胚碎末组织,组织化学染色、PCR和Southern结果表明转化率为0.12%~1.79%。

2.3 幼穗和花药外植体农杆菌转化

小麦花药培养虽然受限于基因型的依赖性和自然加倍的低频率,但部分基因型再生率比较高,且

基因型纯合快, 在单倍体育种中被广泛运用。小麦幼穗诱导愈伤组织比较容易, 但分化植株比较困难。尽管如此, 人们对基于小麦花药培养和幼穗培养的转化还是进行了有益尝试。陈梁鸿等^[42]利用基因枪转化小麦幼穗愈伤组织, 将*EPSPS*基因转入了小麦, 获得了转基因植株。Brisibe等^[43]利用基因枪转化源于小麦花药的胚性愈伤组织, 在愈伤组织中检测到*GUS*基因瞬间表达和稳定表达, 以及潮霉素筛选标记基因的存在, 但没有获得转基因植株。Amoah等^[44]利用农杆菌侵染小麦幼穗, 研究了影响*GUS*基因在幼穗中表达的因素, 最终也没有获得转基因植株。黄益洪等^[45]分别以小麦幼穗和花药为受体材料, 利用不同农杆菌菌株感染, 发现农杆菌菌株、小麦基因型和外植体对转化效果均有影响, 幼穗侵染后*GUS*基因瞬时表达率高于花药。张艳敏等^[46]以石 4185、石 6365 的花药愈伤组织为受体, 进行了甜菜碱醛脱氢酶和胆碱氧化物酶等目的基因的转化, PCR检测到阳性抗性再生植株。王艳丽等^[47]利用含*GUS*基因的C58C1农杆菌菌株转化 83 个小麦基因型的幼穗, *GUS*基因表达率 66.7%~82.8%, 发现CA9924、北农 49、西农 2611、京冬 11 等基因型幼穗对农杆菌侵染比较敏感; 但农杆菌侵染后小麦幼穗切段仅仅不断膨大, 几乎不产生愈伤组织, 难以获得再生植株。

3 小麦植株水平农杆菌转化

3.1 芽尖转化

传统的小麦农杆菌转化和基因枪转化依赖于组织培养和植株再生途径, 具有较强的基因型特异性, 且操作复杂、耗时较长、工作量较大、容易产生体细胞变异等, 不依赖于组织培养的植株水平转化一直吸引人们的兴趣。Razzaq等^[48]将萌芽的小麦种子剥去胚芽鞘, 暴露生长点, 细针刺伤生长点后利用农杆菌侵染, PCR检测到了阳性植株。Zhao等^[49]以小麦茎尖为受体, 用携带 β -1, 3-葡聚糖酶基因的农杆菌侵染, 经PCR、Southern和Northern检测, 证明 β -1, 3-葡聚糖酶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^[50]将小麦种子在水中浸泡 1 d, 用蘸有农杆菌的细针穿刺芽尖部位, 2 d后灭菌和春化处理, 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^[51]利用农杆菌感染小麦幼苗茎尖, 经在含有除草剂的培养基上筛选得到了抗性植株, 进一步对抗性植株进行了PCR检测。Yang等^[52]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, 表明不同苗龄处理间无显著差异, 侵染时间显著影响转化效果, 侵染处理 30 min时*GUS*基因瞬时表达率最高。

3.2 花器官转化

在生殖生长期利用农杆菌转化花器官是一种极具吸引力的转化技术, 具有操作简单、工作量小、筛选容易、不依赖于组织培养和基因型等优点, 在拟南芥、芥菜、小萝卜、苜蓿等双子叶植物上先后取得了成功, 尤其在拟南芥中应用广泛^[53]。事实上, 小麦是最早尝试花器官转化的植物。Hess等^[26]、Mooney等^[54]、Langridge等^[55]分别利用农杆菌侵染小麦植株上的小穗和小花, 虽然没有获得转基因植株, 但证明农杆菌可以侵染小麦植株。Chumakov等^[56]以农杆菌侵染小麦植株, 也未能得到转基因植株, 认为光强和温度影响植株水平转化。何道一等^[57]将农杆菌滴入小麦开花期的小花中, 然后对幼胚和成熟种子进行卡那霉素筛选, 通过PCR和Southern检测, 首次报道利用该方法获得了转基因小麦植株。Zale等^[58]在小麦孕穗期(花粉发育处于单核中晚期)将穗子从叶鞘中剥出, 在农杆菌菌液中浸泡 1~2 min, 下一代经巴龙霉素筛选和PCR、Southern检测, 证明获得了转基因植株。

3.3 未成熟籽粒转化

最近, Risacher等^[59]描述了一种利用农杆菌在植株上注射小麦未成熟籽粒的转化方法。小麦开花授粉后 16~18 d(幼胚 1 mm左右大小)时从植株基部切断, 每穗植株保留茎秆和旗叶, 放入 500 mL装有适量蒸馏水的量筒中。轻轻剥去每个小花的颖片和外稃, 露出未成熟籽粒背面, 用微量注射器将农杆菌悬浮液(含 400 μ mol/L AS 的TSIM培养基)注入幼胚附近的胚乳中, 每个籽粒每次注射 1 μ L, 共注射 2 次。然后用透明塑料袋套住量筒上方保湿, 22 $^{\circ}$ C、光照条件下在植株上进行共培养。2~3 d后从麦穗上收集籽粒, 依次用 70%酒精、20%次氯酸钠灭菌, 无菌

条件下取出幼胚接种在含有抗菌素和筛选剂的培养基上先后诱导愈伤组织和分化植株,抗性再生植株移栽后进行分子检测。据报道,转化率 1%~30%,平均转化率 5%以上,30%~50%的转化植株为单拷贝整合,转基因植株农艺性状正常。

4 小麦花粉管通道转化

花粉管通道法是 80 年代初期根据植物远缘杂交理论提出的外源基因导入方法,即利用植物授粉后在子房中形成的花粉管(花粉引导组织),外源质粒 DNA 经花粉管和珠心进入胚囊,进一步进入受精卵,由于刚刚完成受精的卵细胞还处于类似原生质体状态,尚未形成细胞壁,正在活跃的进行 DNA 复制和细胞分裂,可以将外源 DNA 片段整合到受体基因组中。Langridge 等^[55]尝试了花粉管通道法,但没有获得转基因植株。曾君祉等^[60]利用花粉管通道法将 *nptII* 基因导入了小麦,获得了小麦转基因植株。成卓敏等^[61]利用花粉管通道法将大麦黄矮病毒 CP 基因导入了小麦,培育了抗黄矮病转基因小麦新材料。后来,我国学者对花粉管通道法在小麦中的应用进行了更多探索和应用^[62,63]。

5 小麦转化方法评述

1996 年以来,笔者课题组参考已报道方法,相继对小麦主要转化技术进行了实践。以矮败小麦、轮选 987、CB037 等为材料,矮败小麦直接授粉,普通小麦材料去雄后 3 d 授粉,授粉后 1~2 h 利用携带 *GUS* 基因的 pPTN290 质粒 DNA 进行花粉管通道法转化,同时利用携带 pPTN290 质粒的 C58C1 农杆菌进行花器官转化,17~18 d 时剥取幼胚进行组织化学染色检测,在花粉管通道法转化的 4 612 个未成熟胚和花器官农杆菌转化的 3 809 个未成熟胚中均没有检测到 *GUS* 基因的表达;进一步参考 Zale 等^[58]描述的方法,以轮选 987、科农 199 等小麦品种为材料,孕穗期将穗子从叶鞘中剥出,利用携带 pPTN290 质粒的 C58C1 农杆菌侵染,17~18 d 时剥取幼胚进行组织化学染色检测,在转化后获得的 4 800 多个未成熟胚中没有检测到 *GUS* 基因的表达;利用携带 pPTN290 质粒的农杆菌分别转化 Verry、Alondra、新春 9 号等小麦品种 1.0~1.5 cm 大小的幼穗和花药愈伤组织,转化后虽然检测到 *GUS* 基因表达,但幼穗

外植体难以获得胚性愈伤组织及其再生植株,在花药愈伤组织分化的抗性再生植株中没有检测到阳性植株;按照 Risacher 等^[59]描述的未成熟籽粒转化技术,将携带 pPTN290 质粒的农杆菌注入科农 199 开花后 12~13 d 的未成熟籽粒,虽在共培养后的幼胚及其产生的抗性愈伤组织中均检测到 *GUS* 基因瞬间表达和稳定表达,但在抗性再生植株中没有检测到 *GUS* 基因表达;同时,利用基因枪介导转化小麦幼胚技术,多数基因型 *GUS* 基因瞬间表达率 70% 以上,先后将 *Nib8*^[16]、*GO*^[64]、*GmDREB*^[65]、*GhDREB*^[66]、*TiERF1*^[67] 等目标基因转入了小麦,转化率 0.79%~3.52%,转化成功的基因型包括扬麦 158、济麦 19、鲁麦 14、济麦 20、扬麦 12、扬麦 18、CB037、科农 199 等;利用农杆菌介导转化小麦幼胚技术,敏感基因型 *GUS* 基因瞬间表达率达 50% 以上,分别将 *nptII*、*GUS*、*RIP*、*BCL*、*GCE* 等目标基因转入了小麦,转化率 0.18%~3.50%,转化成功的基因型包括扬麦 10 号、PM97034、新春 9 号、扬麦 6 号、CB037、石 4185、豫麦 66 等^[30,35,47];在建立小麦成熟胚高频率再生体系的基础上,利用农杆菌和基因枪转化小麦成熟胚均取得了成功,转化率 0.10%~1.98%^[41]。

目前,从实际应用角度出发,小麦转基因育种应该优先选择基因枪转化法和农杆菌转化法,农杆菌介导和基因枪介导转化小麦幼胚的重复性高、证据充分。农杆菌介导或基因枪介导转化小麦成熟胚虽然有成功的报道^[38~41],但转化体系有待进一步完善。幼穗、花药愈伤组织作为外植体的转化技术需要继续探索,花粉管通道转化和农杆菌侵染芽尖、花器官、未成熟籽粒等植株水平转化技术需要更多证据的支持。就以小麦幼胚再生为基础的转化技术而言,基因枪介导法转化效果好、适宜转化的基因型多,但操作较为复杂、成本较高、转入 DNA 片段不明确、拷贝数较多等,需要进一步提高效率和最大限度避免载体骨架序列的转入;农杆菌转化法操作简单、成本低、转入 DNA 片段明确、拷贝数较少、目标基因容易表达等,但转化效率还不稳定、基因型的依赖性还比较强,尤其农杆菌侵染后导致小麦幼胚细胞褐化死亡现象严重^[68],不能大量获得候选转化植株,需要克服幼胚褐化死亡现象、提高抗性植株再生率和转化效率。农杆菌介导和基因枪介导转化小麦幼胚的转化效率除与受体基因型有关外,

还与受体材料的生理状态有关, 供体植株生长期间的温度条件对转化效率有至关重要的影响, 开花-取样期间适宜的昼夜温度有利于诱导胚性愈伤组织和再生植株, 提高转化效率。

6 安全型转基因小麦培育策略

近年来, 利用转基因方法培育的植物品种逐年增加。同时, 由于很多国家政府和消费者对转基因植物安全性的重视, 以及转基因植物内在的安全性障碍, 多数转基因植物品种难以获准商业化生产, 包括对转基因小麦生物安全性的关注。其中, 筛选标记基因的存在是转基因植物安全性的主要隐患。

选择标记基因的应用虽然提高了获得转基因植物的效率, 但由于选择标记基因大多属于编码抗生素或除草剂的抗性基因, 随着选择过程的结束, 这些外源选择基因在植物基因组中的存在和表达变的没有必要。通常情况下, 获得转基因植物涉及到的筛选标记有二类, 其一是细菌筛选标记, 如*amp*、*kan*、*aadA*等, 用于筛选构建的载体及转化的细菌; 其二是植物筛选标记, 如*nptII*、*bar*、*hpt*等, 用于筛选转化的植物细胞和再生植株。基因枪介导法不但转入了植物筛选标记, 也转入了细菌筛选标记。农杆菌介导法虽然可以避免将细菌筛选标记引入植物, 但目标基因与植物筛选标记紧密连锁。鉴于此, 人们先后提出了几种获得无筛选标记转基因植物的技术, 包括共转化法、定位重组体系、多元自动转化载体系统、转座子系统和同源重组体系等, 但只有共转化法应用最为成功。基因枪介导的共转化法虽然可以去除植物筛选标记, 但不能去除细菌筛选标记。农杆菌介导的双T-DNA载体共转化法不但可以避免将细菌筛选标记转入植物, 而且可以从转基因植物中排除*nptII*、*bar*、*hpt*等筛选标记, 在获得安全型转基因植物方面具有独特优势。然而, 实际情况并非完全如此, Wu等^[69]对利用农杆菌介导法获得的转基因小麦株系的分析发现, 约 2/3 的株系含有转化载体上T-DNA外围的侧翼序列, 尤其LB外侧的载体序列出现频率较高, 44%的株系含有不完整的T-DNA区段, 这给农杆菌转化植物的优势蒙上了阴影。在获得安全性转基因小麦方面, 基因枪介导的最小表达框转化技术可能比农杆菌介导的双T-DNA载体转化技术更可靠, 为了提高线状DNA进入小麦细胞后的

稳定性和向基因组中整合的效率, 在目标基因表达框二测添加SAR(Scaffold attachment region)序列或许是一种行之有效的策略^[70]。基于基因枪转化法和农杆菌转化法的优点, Hansen等^[71]将包含目标基因的植物双元表达载体(T-DNA载体)和携带农杆菌来源*VirD1*、*VirD2* 基因的表达式载体利用基因枪共转化植物细胞, 证明了*VirD1*、*VirD2* 蛋白对T-DNA载体的剪切和后者在植物基因组中的整合, 提出了“Agrolistic”转化技术, 在获得安全转基因植物方面也具有可行性。

参考文献(References):

- [1] Clive J. 2009 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势——第一个十四年 1996~2009. 中国生物工程杂志, 2010, 30(2): 1-22.
- [2] Vasil V, Castillo A, Fromm ME, Vasil IK. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Nat Bio/Technol*, 1992, 10(6): 667-674. DOI
- [3] Weeks JT, Anderson OD, Blechl AE. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol*, 1993, 102(4): 1077-1084.
- [4] Nehra NS, Chibbar RN, Leung N, Caswell K, Mallard C, Steinhauser L, Baga M, Kartha KK. Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with 2 distinct gene constructs. *Plant J*, 1994, 5(2): 285-297. DOI
- [5] Becker D, Brettschneider R, Lörz H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *Plant J*, 1994, 5(2): 299-307. DOI
- [6] Zhou H, Arrowsmith JW, Fromm ME. Glyphosate-tolerant CP4 and GOX genes as a selectable marker in wheat transformation. *Plant Cell Rep*, 1995, 15(3-4): 159-163.
- [7] Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, Stöger E, Vasil IK. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Plant Cell Rep*, 1996, 16(1-2): 12-17. DOI
- [8] Ortiz JPA, Reggiardo MI, Ravizzin RA, Altabe SG, Cervigni GDL, Spitteler MA, Morata MM, Elias FE, Vallejos RH. Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation. *Plant Cell Rep*, 1996, 15(12): 877-881. DOI
- [9] Takumi S, Shimada T. Production of transgenic wheat through particle bombardment of scutellar tissues: fre-

- quency is influenced by culture duration. *J Plant Physiol*, 1996, 149(3-4): 418-423.
- [10] Witzens B, Brettell RIS, Murray FR, McElroy D, Li Z, Dennis ES. Comparison of three selectable marker genes for transformation of wheat by microprojectile bombardment. *Aust J Plant Physiol*, 1998, 25(1): 39-44. DOI
- [11] Blechl AE, Anderson OD. Expression of a novel high-molecular-weight glutenin subunit gene in transgenic wheat. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(7): 875-879. DOI
- [12] Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, Vasil IK. Integration and expression of the high molecular weight glutenin subunit *1Ax1* gene into wheat. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(9): 1155-1159. DOI
- [13] Barro F, Rooke L, Békés F, Gras P, Tatham AS, Fido R, Lazzeri PA, Shewry PR, Barceló P. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(2): 1295-1299. DOI
- [14] 陈梁鸿, 王新望, 张晓东, 张文俊, 胡道芬, 刘广田. 小麦编码高分子量谷蛋白亚基基因的转化. 作物学报, 1999, 25 (4): 437-440.
- [15] Rooke L, Bekes F, Fido R, Barro F, Gras P, Tatham AS, Barcelo P, Lazzeri P, Shewry PR. Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength. *J Cereal Sci*, 1999, 30(2): 115-120. DOI
- [16] 徐惠君, 庞俊兰, 叶兴国, 杜丽璞, 李连城, 辛志勇, 马有志, 陈剑平, 陈炯, 程顺和, 吴宏亚. 基因枪法向小麦导入 *Nib8* 黄花叶病毒复制酶基因的研究. 作物学报, 2001, 27(6): 688-693.
- [17] 梁辉, 朱银峰, 朱祯, 孙东发, 贾旭. 雪花莲凝集素基因转化小麦及转基因小麦抗蚜性的研究. 遗传学报, 2004, 31(2): 189-194.
- [18] Okubara PA, Blechl AE, McCormick SP, Alexander NJ, Dill-Macky R, Hohn TM. Engineering deoxynivalenol metabolism in wheat through the expression of a fungal trichothecene acetyltransferase gene. *Theor Appl Genet*, 2002, 106(1): 74-83.
- [19] Pellegrineschi A, Noguera LM, Skovmand B, Brito RM, Velazquez L, Salgado MM, Hernandez R, Warburton M, Hoisington D. Identification of highly transformable wheat genotypes for mass production of fertile transgenic plants. *Genome*, 2002, 45(2): 421-430. DOI
- [20] Ogawa T, Kawahigashi H, Toki S, Handa H. Efficient transformation of wheat by using a mutated rice acetolactate synthase gene as a selectable marker. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(8): 1325-1331. DOI
- [21] Sestili F, Janni M, Doherty A, Botticella E, D'Ovidio R, Masci S, Jones HD, Lafiandra D. Increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the *SBella* genes. *BMC Plant Biol*, 2010, 10(1): 144-164. DOI
- [22] Fu XD, Duc LT, Fontana S, Bong BB, Tinjuangjun P, Sudhakar D, Twyman RM, Christou P, Kohli A. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Trans Res*, 2000, 9(1): 11-19. DOI
- [23] Loc NT, Tinjuangjun P, Gatehouse AMR, Christou P, Gatehouse JA. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate transgenic rice plants which accumulate higher levels of proteins conferring insect resistance. *Mol Breed*, 2002, 9(4): 231-244. DOI
- [24] Yao Q, Cong L, Chang JL, Li KX, Yang GX, He GY. Low copy number gene transfer and stable expression in a commercial wheat cultivar via particle bombardment. *J Exp Bot*, 2006, 57(14): 3737-3746. DOI
- [25] Shi NN, He GY, Li KX, Wang HZ, Chen GP, Xu Y. Transferring a gene expression cassette lacking the vector backbone sequences of the *1Ax1* high molecular weight glutenin subunit into two Chinese hexaploid wheat genotypes. *Agric Sci China*, 2007, 6(4): 381-390. DOI
- [26] Hess D, Dressler K, Nimrichter R. Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelets of wheat. *Plant Sci*, 1990, 72(2): 233-244.
- [27] Mooney PA, Goodwin PB. Adherence of *Agrobacterium tumefaciens* to the cells of immature wheat embryos. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 1991, 25(3): 199-208.
- [28] Cheng M, Fry JE, Pang SZ, Zhou HP, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan YC. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol*, 1997, 115(3): 971-980.
- [29] Xia GM, Li ZY, He CX, Chen HM, Brettell R. Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Phytophysiol Sin*, 1999, 25(1): 22-28.
- [30] 叶兴国, Shirley S, 徐惠君, 杜丽璞, Clemente T. 小麦农杆菌介导转基因植株的稳定获得和检测. 中国农业科学, 2001, 34(5): 465-468.
- [31] Khanna HK, Daggard GE. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using a super binary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium. *Plant Cell Rep*, 2003, 21(5): 429-436.
- [32] Cheng M, Hu TC, Layton J, Liu CN, Fry JE. Desiccation of plant tissues post-*Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation effi-

- ciency in wheat. *In Vitro Cell Dev Biol*, 2003, 39(6): 595–604. [DOI](#)
- [33] Hu T, Metz S, Chay C, Zhou HP, Biest N, Chen G, Cheng M, Feng X, Radionenko M, Lu F, Fry J. *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. *Plant Cell Rep*, 2003, 21(10): 1010–1019. [DOI](#)
- [34] Zhou H, Berg JD, Blank SE, Chay CA, Chen G, Eskelsen SR, Fry JE, Hoi S, Hu T, Isakson PJ, Lawton MB, Metz SG, Rempel CB, Ryerson DK, Sansone AP, Shook AL, Starke RJ, Tichota JM, Valenti SA. Field efficacy assessment of transgenic roundup ready wheat. *Crop Sci*, 2003, 43(3): 1072–1075. [DOI](#)
- [35] 叶兴国, 程红梅, 徐惠君, 杜丽璞, 陆维忠, 黄益洪. 转几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶双价基因小麦的获得和鉴定. *作物学报*, 2005, 31(5): 583–586.
- [36] Wu X, Doherty A, Jones HD. Efficient and rapid *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) using additional virulence genes. *Trans Res*, 2008, 17(3): 425–436. [DOI](#)
- [37] Wu H, Doherty A, Jones HD. *Agrobacterium*-mediated transformation of bread and durum wheat using freshly isolated immature embryos. *Methods Mol Biol*, 2009, 478(2): 93–103.
- [38] Khurana J, Chugh A, khurana P. Regeneration from mature and immature embryos and transient gene expression via *Agrobacterium*-mediated transformation in emmer wheat (*Triticum dicoccum* Schuble). *Indian J Exp Biol*, 2002, 40(11): 1295–1303.
- [39] Patnaik D, Vishnudasan D, Khurana P. *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryos of *Triticum. aestivum* and *Triticum durum*. *Curr Sci*, 2006, 91(3): 307–317.
- [40] Ding LP, Li SC, Gao JM, Wang YS, Yang GX, He GY. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(1): 29–36. [DOI](#)
- [41] Wang YL, Xu MX, Yin GX, Tao LL, Wang DW, Ye XG. Transgenic wheat plants derived from *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryo tissues. *Cereal Res Commun*, 2009, 37(1): 1–12. [DOI](#)
- [42] 陈梁鸿, 王新望, 张文俊, 张晓东, 胡道芬, 刘广田. 抗除草剂草甘膦 *EPSPS* 基因在小麦中的转化. *遗传学报*, 1999, 26 (3): 239–243.
- [43] Brisibe EA, Gajdosova A, Olesen A, Andersen SB. Cyto-differentiation and transformation of embryogenic callus lines derived from anther culture of wheat. *J Exp Bot*, 2000, 51(343): 187–196. [DOI](#)
- [44] Amoah BK, Wu H, Sparks C, Jones HD. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue. *J Exp Bot*, 2001, 52(358): 1135–1142. [DOI](#)
- [45] 黄益洪, 周森平, 叶兴国, 唐克轩, 程红梅, 陆维忠. 农杆菌介导法获得小麦转基因植株的研究. *作物学报*, 2002, 28(4): 510–515.
- [46] 张艳敏, 郭北海, 丁占生, 温之雨, 蒋春志, 李辉, 李洪杰, 陈受宜. 小麦农杆菌转化系统的建立与转基因植株的获得. *华北农学报*, 2003, 18(3): 1–3.
- [47] 王艳丽, 叶兴国, 刘艳鹏, 杜丽璞, 徐惠君. 农杆菌敏感小麦基因型的筛选研究. *麦类作物学报*, 2005, 25(6): 6–10.
- [48] Razzaq A, Zhang YM, Yang F, You YJ, Zhao H, Ma ZY, Wang HB. In planta transformation of wheat apical meristem: a preliminary study. *Acta Agric Boreali-Sin*, 2005, 20(1): 17–22. [DOI](#)
- [49] Zhao TJ, Zhao SY, Chen HM, Zhao QZ, Hu ZM, Hou BK, Xia GM. Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(11): 1199–1204. [DOI](#)
- [50] Supartana P, Shimizu T, Nogawa M, Shioiri H, Nakajima T, Haramoto N, Nozue M, Kojima M. Development of simple and efficient in planta transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Biosci Bioeng*, 2006, 102(3): 162–170. [DOI](#)
- [51] 梁欣欣, 刘录祥, 赵林姝, 张举仁, 郭会君, 赵世荣, 郑企成. 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*, 2007, 27(1): 16–19.
- [52] Yang B, Ding LP, Yao L, He GY, Wang YS. Effect of seedling ages and inoculation durations with *Agrobacterium tumefaciens* on transformation frequency of the wheat wounded apical meristem. *Mol Breed*, 2008, 6(2): 358–362.
- [53] Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998, 16(6): 735–743. [DOI](#)
- [54] Mooney PA, Goodwin PB, Dennis ES, Llewellyn DJ. *Agrobacterium tumefaciens*-gene transfer into wheat tissues. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 1991, 25(3): 209–218.
- [55] Langridge P, Brettschneider R, Lazzeri P, Lorz H. Transformation of cereals via *Agrobacterium* and the pollen pathway: a critical assessment. *Plant J*, 1992, 2(4): 631–638. [DOI](#)
- [56] Chumakov MI, Kurbanova IV, Solovova GK. *Agrobacterium* transformation of uninjured plants. *Russ J Plant*

- Physiol*, 2002, 49(6): 799–803. [DOI](#)
- [57] 何道一, 李中存, 王洪刚. 农杆菌介导的小麦活体转化. 中国农业科学, 2003, 36(12): 1437–1441.
- [58] Zale JM, Agarwal S, Loar S, Steber CM. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(6): 903–913. [DOI](#)
- [59] Risacher T, Craze M, Bowden S, Paul W, Barsby T. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat via in planta inoculation. *Methods Mol Biol*, 2009, 478(2): 115–124.
- [60] 曾君祉, 王东江, 吴有强, 张健, 周文娟, 朱小平, 徐乃正. 用花粉管途径获得小麦转基因植株. 中国科学(B辑), 1993, 23(3): 256–262.
- [61] 成卓敏, 何小源, 陈彩层, 张杰, 肖红, 周广和. 大麦黄矮病毒外壳蛋白基因合成及用花粉管途径获得小麦转基因植株. 自然科学进展, 1993, 3(6): 560–564.
- [62] 侯文胜, 郭三堆, 路明. 利用花粉管通道法将 *cryIa* 基因导入小麦. 作物学报, 2003, 29(6): 806–809.
- [63] 王立新, 常利芳, 段绍光, 徐民新, 王凤格, 孙家柱. 通过花粉管通道导入外源 DNA 创造抗白粉病小麦新种质. 中国农业科学, 2003, 36(12): 1576–1581.
- [64] 康乐, 叶兴国, 徐惠君, 杜丽璞. 葡萄糖氧化酶基因转化小麦的研究. 作物学报, 2005, 31(6): 686–691.
- [65] Gao SQ, Xu HJ, Cheng XG, Chen M, Xu ZS, Li LC, Ye XG, Du LP, Hao XY, Ma YZ. Improvement of wheat drought and salt tolerance by expression of a stress-inducible transcription factor *GmDREB* of soybean (*Glycine max*). *Chin Sci Bull*, 2005, 50(23): 2714–2723.
- [66] Gao SQ, Chen M, Xia LQ, Xiu HJ, Xu ZS, Li LC, Zhao CP, Cheng XG, Ma YZ. A cotton (*Gossypium hirsutum*) DRE-binding transcription factor gene, *GhDREB*, confers enhanced tolerance to drought, high salt, and freezing stresses in transgenic wheat. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(2): 301–311. [DOI](#)
- [67] Chen L, Zhang ZY, Liang HX, Liu HX, Du LP, Xu HJ, Xin ZY. Overexpression of *TiERF1* enhances resistance to sharp eyespot in transgenic wheat. *J Exp Bot*, 2008, 59(15): 4195–4204. [DOI](#)
- [68] Parrott DL, Anderson AJ, Carman JG. *Agrobacterium* induces plant cell death in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiol Mol Pathol*, 2002, 60(2): 59–69. [DOI](#)
- [69] Wu H, Sparks CA, Jones HD. Characterisation of T-DNA loci and vector backbone sequences in transgenic wheat produced by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol Breed*, 2006, 18(3): 195–208. [DOI](#)
- [70] Allen GC, Hall GE, Childs LC, Werssinger AK, Spiker S, Thompson WF. Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells. *Plant Cell*, 1993, 5(6): 603–613.
- [71] Hansen G, Chilton MD. “Agroclistic” transformation of plant cells: Integration of T-strands generated in planta. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(25): 14978–14983. [DOI](#)

• 科学新闻 •

水稻减数分裂同源染色体分离机制研究新进展

与有丝分裂不同, 减数分裂染色体复制一次, 细胞分裂两次。这种质的差异与染色体臂上及着丝粒处黏着蛋白的逐步消失有关。染色体臂上黏着蛋白在减数第一次分裂消失是保证同源染色体分离的前提; 而着丝粒处黏着蛋白的维持是保证姊妹染色单体在减数第二次分裂才相互分开。shugoshin 是一个着丝粒定位的蛋白, 其主要功能是保护姊妹染色单体着丝粒区域黏着蛋白在减数第一次分裂过程中不被降解。shugoshin 蛋白在真核生物中具有较高的保守性, 上世纪 90 年代在果蝇中首先发现了 shugoshin 蛋白(Mei-S332), 然而其功能在不同物种中有了进一步分化。

中国科学院遗传与发育生物学研究所基因组生物学研究中心祝宽课题组的研究发现, 水稻中也存在 shugoshin 蛋白 OsSGO1。在 *Ossgo1* 突变体中, 姊妹染色单体的着丝粒在中期 I 就有提前分开的趋势, 而到后期 II 姊妹染色单体发生随机分离, 表明 OsSGO1 对维持姊妹染色单体着丝粒处黏着的重要性。免疫荧光定位研究表明, 在减数第一次分裂和有丝分裂前期, OsSGO1 从核仁中逐渐转移到染色体的着丝粒上, 中期后逐步从着丝粒上脱离。并且在 *Ossgo1* 突变体中, 联会复合体延迟形成并提早消失, 说明它对于维持联会复合体的稳定具有重要作用, 这也揭示了植物界 shugoshin 蛋白在减数分裂前期 I 的特殊功能。

该研究为进一步揭示植物减数分裂过程中同源染色体分离的分子机制提供了新思路。相关结果于 2011 年 4 月 19 日在国际杂志 *Plant Journal* 上在线发表(DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04615.x)。博士生王莫为该论文第一作者, 该研究得到了科技部和国家自然科学基金委的资助。

(摘自中国科学院遗传与发育生物学研究所网站)